

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ПОЧИВАЛОВ АЛЕКСЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

МИКРОЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ  
АНАЛИЗЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И НЕСТЕРОИДНЫХ  
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., профессор РАН А.В. Булатов

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1 Обзор литературы</b> .....	11
1.1 Общая характеристика фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и диклофенака .....	11
1.2 Микроэкстракционные методы .....	16
1.2.1 Жидкостная микроэкстракция.....	17
1.2.2 Твердофазная микроэкстракция .....	36
1.2.3 Автоматизация жидкостной и твердофазной микроэкстракции для определения фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ .....	49
1.3 Основные методы определения фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ .....	65
<b>Заключение</b> .....	69
<b>Глава 2 Методика экспериментальных исследований</b> .....	71
2.1 Средства измерений и оборудование.....	71
2.2 Реактивы и приготовление растворов.....	72
2.3 Пробоотбор и предварительная подготовка лекарственных препаратов, биологических жидкостей и тканей животного происхождения.....	74
2.4 Условия определения и микроэкстракционного выделения фторхинолонов, тетрациклинов, сульфаниламидов и диклофенака .....	76
2.4.1 Условия хроматографического определения фторхинолонов, тетрациклинов и сульфаниламидов .....	76
2.4.2 Условия микроэкстракционного выделения фторхинолонов, сульфаниламидов и тетрациклинов для последующего хроматографического анализа .....	78
2.4.3 Условия автоматизированного хемилюминесцентного скрининг-определения фторхинолонов в биологических жидкостях с предварительным их выделением на ферромагнитных наночастицах .....	80
2.4.4 Условия экстракционно-фотометрического определения диклофенака в лекарственных препаратах и слюне .....	81

<b>Глава 3 Хроматографическое определение лекарственных веществ с микроэкстракционным выделением в экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью».....</b>	<b>82</b>
<b>Глава 4 Проточное хемилюминесцентное определение общего содержания фторхинолонов в биологических жидкостях с выделением на ферромагнитных наночастицах .....</b>	<b>133</b>
<b>Глава 5 Проточное экстракционно-фотометрическое определение диклофенака в лекарственных препаратах и слюне .....</b>	<b>144</b>
<b>Заключение .....</b>	<b>153</b>
<b>Список сокращений и условных обозначений.....</b>	<b>156</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>158</b>
<b>Приложение.....</b>	<b>206</b>

## Введение

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** Антибактериальные и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (ЛС) находят обширное применение при фармакотерапии широкого круга заболеваний человека и животных. Поэтому, с одной стороны, актуальным направлением является разработка новых, совершенствование, унификация и валидация методов контроля качества ЛС с целью обеспечения эффективности и безопасности выпускаемой продукции. С другой стороны, существуют проблемы определения ЛС в более сложных матрицах, таких как биологические жидкости, а также органы и ткани животного происхождения. При этом актуальность определения ЛС в биологических жидкостях также обусловлена требованиями персонализированной медицины, где кроме традиционного подхода к лечению пациента требуется учитывать индивидуальные особенности его организма при фармакотерапии, что в свою очередь требует контроля содержания лекарственных веществ (ЛВ) или продуктов их метаболизма в биологических жидкостях. В этом направлении особый интерес представляют неинвазивные методы определения ЛВ в слюне и моче.

Как правило, сложный и многокомпонентный состав перечисленных выше объектов и зачастую низкие концентрации целевых аналитов требуют включения в общую схему анализа стадий их выделения и концентрирования. В последнее время для выделения ЛВ из различных матриц активно применяются методы жидкостной и твердофазной микроэкстракции, позволяющие упростить процедуры пробоподготовки, обеспечивая ее высокую эффективность при минимальных расходах реагентов и проб. Кроме того, повысить экспрессность и воспроизводимость фармацевтического анализа и снизить его трудозатраты можно путем автоматизации процедур пробоподготовки на принципах проточных методов, которые в случае ряда антибактериальных и нестероидных противовоспалительных ЛС имеют ограниченное применение на практике.

---

Научным консультантом по диссертационной работе являлся д.х.н., проф. **Гармонов Сергей Юрьевич**

*Диссертационная работа выполнялась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (16-33-00037 мол\_а, 18-33-01176 мол\_а, 18-33-20004 мол\_а\_вед), Правительства Санкт-Петербурга (распоряжения Комитета по науке и высшей школе от 27.11.2015 №134, от 28.11.2016 №148 и от 17.11.2017 №167) и Visegrad Scholarship Program (Visegrad Scholarship ID 51600237 от 03.06.2016).*

**Цель работы** состояла в разработке новых эффективных схем определения фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и диклофенака натрия в лекарственных препаратах, биологических жидкостях, органах и тканях животного происхождения на основе использования жидкостной и твердофазной микроэкстракции.

Для достижения цели решались следующие **задачи**:

- оптимизировать условия хроматографического разделения и детектирования фторхинолонов, сульфаниламидов и тетрациклинов в варианте обращенно-фазовой жидкостной хроматографии;

- обосновать возможность применения ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоты и глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) на основе тимола и высших карбоновых кислот в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью» для реализации жидкостной микроэкстракции из гомогенного раствора; при этом оценить их экстрагирующую способность по отношению к целевым ЛВ, а также выявить условия, необходимые для образования гомогенного раствора экстрагента с пробой, и найти эффективные способы инициирования фазового разделения и массопереноса;

- разработать гидравлические схемы для автоматизации процедур микроэкстракционного выделения, концентрирования целевых ЛВ и предложить подходы к жидкостной микроэкстракции в экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью» на импрегнированных мембранах и с выделением дисперсной фазы экстрагента на вращающемся пористом гидрофобном диске после ее *in situ* образования;

- оптимизировать условия автоматизированного хемилюминесцентного определения фторхинолонов в условиях проточной мультинасосной системы с предварительным сорбционным выделением на ферромагнитных наночастицах и подобрать состав элюента, совместимый с разработанной системой;

- оптимизировать условия дериватизации диклофенака для его проточного экстракционно-фотометрического определения с применением оптоволоконного зонда;

- апробировать разработанные подходы при анализе реальных объектов и подтвердить правильность получаемых результатов референтными методами.

### **Научная новизна:**

- для автоматизированного определения фторхинолонов в гомогенных растворах (лекарственные препараты, моча) разработана гидравлическая схема, включающая их жидкостную микроэкстракцию из гомогенного раствора пробы в экстрагент с «переключаемой гидрофильностью»;

- для определения фторхинолонов в суспендированных пробах (лекарственные препараты, ткани животного происхождения) разработан новый метод, предполагающий микроэкстракционное выделение на мембранах, импрегнированных экстрагентами с «переключаемой гидрофильностью» (высшими карбоновыми кислотами);

- предложен метод экспрессного микроэкстракционного концентрирования тетрациклинов, включающий *in situ* образование дисперсной фазы экстрагента с «переключаемой гидрофильностью» с ее одновременным выделением на вращающемся пористом гидрофобном диске;

- для микроэкстракционного выделения сульфаниламидов из сложных матриц предложены новые экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью»: ди-(2-этилгексил)-фосфорная кислота и ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот;

- для автоматизированного определения сульфаниламидов в лекарственных препаратах и моче разработана гидравлическая схема, включающая их

жидкостную микроэкстракцию из гомогенного раствора пробы в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту непосредственно в камере шприцевого насоса;

- для автоматизированного спектрофотометрического определения диклофенака в лекарственных препаратах и слюне разработана гидравлическая схема, включающая его дериватизацию, экстракцию дериватива и детектирование в экстракте с помощью оптоволоконного зонда;

- разработан новый подход к проточному хемилюминесцентному скрининг-определению фторхинолонов в биологических жидкостях, предполагающий концентрирование аналитов на ферромагнитных наночастицах.

**Теоретическая и практическая значимость** состоит в том, что разработаны новые способы высокочувствительного определения фторхинолонов, сульфаниламидов и тетрациклинов в лекарственных препаратах, биологических жидкостях, тканях животного происхождения методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с фотометрическим (ВЭЖХ-УФ) и флуориметрическим (ВЭЖХ-ФЛ) детектированием, включающие микроэкстракционное выделение аналитов. На их основе предложены схемы автоматизированного экстракционно-фотометрического определения диклофенака в лекарственных препаратах, слюне и автоматизированного хемилюминесцентного скрининг-определения фторхинолонов в биологических жидкостях, обеспечивающие высокую чувствительность и прецизионность анализа.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт Петербургский государственный университет», НОЦ фармации ФГАО ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (приложение).

**Методология и методы исследований.** Для определения лекарственных веществ использовали методы ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ФЛ, ВЭЖХ-МС/МС (высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия), спектрофотометрию, флуориметрию, мультинасосный

проточный анализ с хемилюминесцентным детектированием, циклический инъекционный анализ с фотометрическим детектированием.

**Положения, выносимые на защиту:**

- автоматизированный метод пробоподготовки для ВЭЖХ-ФЛ определения офлоксацина в гомогенных растворах (лекарственные препараты, моча), предполагающий микроэкстракционное выделение в экстрагент с «переключаемой гидрофильностью»;

- эффективный подход к микроэкстракционному выделению фторхинолонов из суспендированных проб (лекарственные препараты, ткани животного происхождения) на мембранах, импрегнированных экстрагентами с «переключаемой гидрофильностью» для их последующего ВЭЖХ-ФЛ определения;

- принцип экспрессного микроэкстракционного концентрирования тетрациклинов, основанный на *in situ* образовании дисперсной фазы экстрагента с «переключаемой гидрофильностью» с ее одновременным выделением на вращающемся пористом гидрофобном диске, для их последующего ВЭЖХ-УФ определения в лекарственных препаратах и моче;

- обоснование возможности применения ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоты и ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью» для реализации жидкостной микроэкстракции сульфаниламидов из лекарственных препаратов и мочи в камере шприцевого насоса проточного анализатора и статических условиях для их последующего ВЭЖХ-УФ определения;

- принцип регистрации оптической плотности органической фазы посредством оптоволоконного зонда в условиях жидкостной экстракции для автоматизированного экстракционно-фотометрического определения диклофенака в лекарственных препаратах и слюне;

- метод проточного хемилюминесцентного определения общего содержания фторхинолонов в молоке с предварительным концентрированием аналитов на ферромагнитных наночастицах;

- метрологические характеристики разработанных способов анализа и результаты их испытаний в фармацевтическом анализе.

**Степень достоверности и апробация результатов работы.** Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ФЛ, спектрофотометрии, хемилюминесцентного и проточного анализа, а также математической статистики при обработке экспериментальных данных.

Результаты работы и основные положения диссертации были доложены и обсуждены на Всероссийской студенческой конференции-конкурсе «Химия молодым» (Санкт-Петербург, 2015), IX международной конференции среди молодых ученых по химии «Mendeleev — 2015» (Санкт-Петербург, 2015), III Всероссийской студенческой конференции с международным участием «Химия и химическое образование XXI века» (Санкт-Петербург, 2015), международной конференции «Flow analysis XIII» (Прага, Чехия, 2015), международной студенческой конференции «Science and Progress-2015» (Санкт-Петербург, 2015), XIX Всероссийской конференции молодых ученых-химиков (Нижний Новгород, 2016), XX международной конференции «International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques» (Пальма-де-Майорка, Испания, 2016), X международной конференции среди молодых ученых по химии «Mendeleev — 2017» (Санкт-Петербург, 2017), международном конгрессе «IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2017» (Хайкоу, Китай, 2017), XXI международной конференции «International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques» (Санкт-Петербург, 2017), III международной конференции «International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment» (Кошта-да-Капарика, Португалия, 2018), XI международной конференции среди молодых ученых по химии «Mendeleev — 2019» (Санкт-Петербург, 2019).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области специальности, конкретно п. 3,4 паспорта специальности

«Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 19 печатных изданиях, включая 7 статей в рецензируемых изданиях, рекомендуемых для размещения материалов диссертаций и 12 тезисов докладов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, заключения, списка литературы, включающего 390 источников. Работа изложена на 205 страницах машинописного текста, иллюстрирована 82 рисунками и 22 таблицами.

**Личный вклад автора.** Автор принимал участие в обсуждении цели и задач исследования, выборе и обосновании методик эксперимента. Экспериментальные исследования выполнены лично автором. Автор активно участвовал в анализе и обобщении полученных экспериментальных результатов, установлении закономерностей и формулировке выводов, написании статей, подготовке и представлении докладов на Всероссийских и международных конференциях.

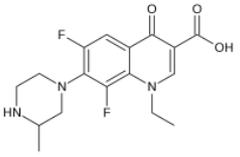
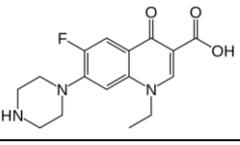
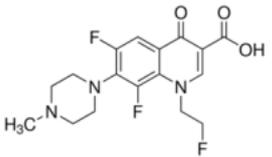
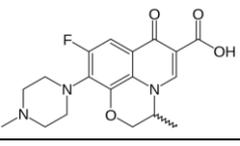
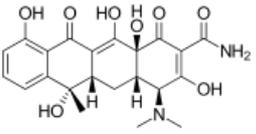
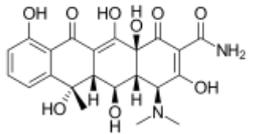
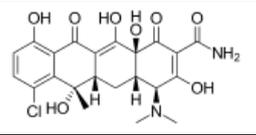
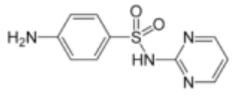
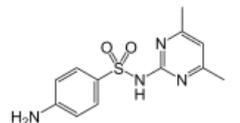
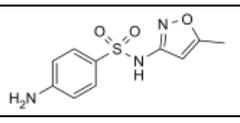
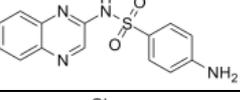
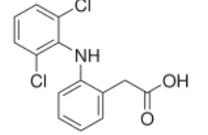
**Благодарности.** Автор работы выражает глубокую благодарность научному руководителю д.х.н., профессору РАН А.В. Булатову, научному консультанту д.х.н., профессору С.Ю. Гармонову, к.х.н., доценту К.С. Вах и к.х.н., доценту И.И. Тимофеевой за руководство и помощь при выполнении и написании работы; Dr. Prof. V. Andruch и Dr. S. Koronkiewicz за помощь при выполнении исследований в области автоматизации процедур пробоподготовки; к.х.н., доценту Е.А. Бессоновой и С.А. Лебединец за помощь при оптимизации условий хроматографического анализа; ресурсному центру СПбГУ «Методы анализа состава вещества».

## Глава 1 Обзор литературы

### 1.1 Общая характеристика фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и диклофенака

**Фторхинолоны** являются производными 4-хинолона (таблица 1) и представляют собой синтетические антибактериальные агенты, обладающие широким спектром противомикробной активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Их антибактериальная активность связана с нарушением синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) бактериальной клетки за счет ингибирования ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, что во многом обусловлено наличием атома фтора в 6 положении [1]. Лекарственные препараты, содержащие фторхинолоны, в виде различных лекарственных форм (таблетки, растворы для инфузий, мази глазные, капли глазные и ушные) применяют в клинической практике для лечения инфекций дыхательных и мочевыводящих путей, кишечных и офтальмологических инфекций, туберкулеза и многих других [2]. Офлоксацин, флероксацин и ломефлоксацин обладают высокой биодоступностью (более 85%), в то время как для норфлоксацина она составляет 30–40%. При одновременном приеме антацидных средств может наблюдаться снижение биодоступности из-за образования комплексных соединений. Максимальная концентрация в плазме крови достигается за 1–2 ч и варьируется от 1 до 5 мг/л при приеме лекарственного препарата, содержащего 400 мг фармацевтической субстанции [3]. Время полувыведения фторхинолонов составляет 5–10 ч. Хорошее проникновение данных лекарственных веществ в ткани и жидкости организма обуславливает их эффективность по отношению к инфекциям различной локализации. От 5 до 20 % принятой дозы метаболизируется в печени с образованием N-десметилированного и N-оксидного производных. Выведение фторхинолонов и их метаболитов осуществляется почками, главным образом, в неизменном виде.

**Таблица 1** – Структурные формулы и рКа фторхинолонов, тетрациклинов, сульфаниламидов и диклофенака

Группа		Наименование	Структурная формула	рКа <sub>1</sub>	рКа <sub>2</sub>	рКа <sub>3</sub>
Антибактериальные лекарственные вещества	Фторхинолоны	Ломефлоксацин		5,8 [4]	9,3 [4]	-
		Норфлоксацин		6,3 [4]	8,4 [4]	-
		Флероксацин		5,5 [4]	8,1 [4]	-
		Офлоксацин		6,1 [4]	8,2 [4]	-
	Тетрациклины	Тетрациклин		3,4 [5]	7,3 [5]	9,9 [5]
		Окситетрациклин		3,5 [5]	7,3 [5]	9,6 [5]
		Хлортетрациклин		3,3 [5]	6,7 [5]	8,8 [5]
	Сульфаниламиды	Сульфадиазин		2,0 [6]	6,4 [6]	-
		Сульфаметазин		2,4 [6]	7,4 [6]	-
		Сульфаметоксазол		1,7 [6]	5,6 [6]	-
		Сульфахиноксалин		2,3 [7]	6,0 [7]	-
	Нестероидное противовоспалительное лекарственное вещество	Диклофенак		4,0 [8]	-	-

Фторхинолоны являются амфотерными соединениями: в сильноокислой среде существуют в катионных формах за счет протонирования атома азота в положении 4 пиперазинового кольца, в слабоокислой среде находятся в молекулярных или цвиттер-ионных формах, а в нейтральной и щелочной средах образуют анионные формы за счет депротонирования карбоксильной группы (таблица 1). В нейтральных формах фторхинолоны имеют низкую растворимость в воде, метаноле и этаноле, умеренно растворимы в хлороформе [9, 10]. В щелочной и кислой водной среде растворимость фторхинолонов повышается. В частности, образование катионных форм обуславливает высокую растворимость антибактериальных агентов фторхинолонового ряда в уксусной кислоте. По той же причине гидрохлориды фторхинолонов, применяемые в качестве фармацевтических субстанций наравне с исходными формами, являются водорастворимыми [11].

**Сульфаниламиды** в отличие от фторхинолонов обладают бактериостатическим, а не бактерицидным эффектом. В их структуре в паре-положении к сульфаниламидной группе находится первичная аминогруппа (таблица 1). Такое сходство с *n*-аминобензойной кислотой приводит к конкурентному ингибированию дигидроптероатсинтетазы, необходимой для синтеза дигидрофолиевой кислоты, в результате чего размножение бактерий прекращается. Спектр противомикробного действия сульфаниламидов является широким, что позволяет применять их при инфекционных заболеваниях различного характера. В данном исследовании рассматриваются сульфадиазин, сульфахиноксалин, сульфаметоксазол и сульфаметазин. Первые два из них применяются в животноводстве либо в качестве лекарственных препаратов местного действия в виде мазей и кремов. Сульфаметоксазол и сульфаметазин входят в состав таблеток, суспензий для приема внутрь, а также растворов для инфузий [2]. Биодоступность сульфаметоксазола и сульфаметазина составляет более 70%. Максимальная концентрация в плазме крови наблюдается спустя 0,5–4 ч и при приеме 800 мг в пересчете на фармацевтическую субстанцию составляет 30–50 мг/л [12]. Метаболизм сульфаниламидов происходит в печени под

действием фермента N-ацетилтрансферазы с образованием неактивных ацетильных метаболитов. Время полувыведения рассматриваемых лекарственных веществ зависит от фенотипа ацетилирования и может изменяться от 2 до 5 ч [13]. Сульфаниламиды выводятся почками в форме метаболитов или в неизменном виде.

Сульфаниламиды имеют две функциональные группы, участвующие в кислотно-основных взаимодействиях: ароматическую аминогруппу и сульфаниламидную группу (таблица 1). Первая из них протонируется в сильноокислых средах и при  $\text{pH} < \text{pK}_{a1}$  данные лекарственные вещества существуют преимущественно в катионных формах. Вплоть до слабокислой среды преобладает молекулярная форма с отсутствием заряда на функциональных группах. Сульфаниламидная группа депротонируется в слабокислой или слабощелочной средах и при  $\text{pH} > \text{pK}_{a2}$  начинает превалировать анионная форма. Благодаря амфотерным свойствам сульфаниламиды растворимы в кислых и щелочных средах. В молекулярной форме лекарственные вещества данной группы имеют низкую растворимость в воде, хлороформе и этаноле, а высокую – в ацетоне [14].

**Тетрациклины** представляют собой группу природных и полусинтетических антибактериальных агентов широкого спектра действия (Таблица 1). Лекарственные препараты на основе тетрациклинов в виде таблеток, мазей и аэрозолей применяются при инфекциях дыхательных путей и мочеполовой системы, холецистите, кожных заболеваниях. Бактериостатический эффект тетрациклинов обусловлен их связыванием с бактериальной рибосомой, из-за чего блокируется синтез белка [15]. Биодоступность значительно варьируется от 25–30% для хлортетрациклина до 80–90% для тетрациклина. Окситетрациклин занимает промежуточное положение. На всасывание оказывают негативное влияние ионы двухвалентных металлов, поэтому соблюдается необходимая пауза при приеме содержащих их лекарственных препаратов. Максимальная концентрация тетрациклинов в плазме крови составляет 2–5 мг/л и достигается за 2–4 ч при дозе от 250 до 500 мг. Время полувыведения находится в

промежутке от 6 до 11 ч. Антибактериальные агенты тетрациклинового ряда практически не подвергаются метаболизму, однако для тетрациклина наблюдается образование эписмера в незначительном количестве (5%). Экскретируются почками (<50%) и кишечником (>40%) [16].

Тетрациклины, как амфотерные соединения, пребывают в четырех различных формах в зависимости от pH раствора (таблица 1). Катионная форма образуется в сильнокислой среде за счет протонирования азота диметиламинового заместителя. В слабокислой и нейтральной преобладает цвиттер-ионная форма благодаря депротонированию фенольного гидроксила. В щелочной среде происходит последовательное отщепление протонов от трикарбонилметановой группировки и положительно заряженной диметиламмониевой группы. Тетрациклины практически нерастворимы в воде в нейтральной среде, но при подкислении или подщелачивании переходят в гидрофильные формы. Более высокая растворимость наблюдается в полярных органических растворителях (например, в этаноле [17]).

*Диклофенак* является производным фенилуксусной кислоты (таблица 1) и относится к группе нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ, обладая также выраженным анальгезирующим и умеренным жаропонижающим действием. Фармакологические эффекты диклофенака основаны на угнетении активности циклооксигеназы, что снижает выработку простагландинов, способствующих развитию воспалительного процесса. В состав лекарственных средств диклофенак входит в виде натриевой или калиевой соли, которая образуется при депротонировании карбоксильной группы. Солевая форма данного лекарственного вещества растворима в воде, метаноле и этаноле, но обладает низкой растворимостью в ацетоне [18]. Лекарственные препараты, содержащие диклофенак, в основном применяются для лечения воспалительных и дегенеративных заболеваний опорно-двигательного аппарата, купирования посттравматического послеоперационного болевого синдрома. Этим объясняется чрезвычайное разнообразие лекарственных форм для наружного применения, которые представлены гелями, мазями, кремами, пластырями, суппозиториями и

аэрозолями. Тем не менее, лекарственные препараты на основе диклофенака натрия принимают также внутрь в виде таблеток или капсул, а также вводят внутримышечно или внутривенно в виде раствора [2].

Биодоступность диклофенака составляет около 90%. При приеме 50 мг лекарственного вещества максимальная концентрация в плазме крови (1 мг/л) достигается за 0,8 ч, что немногим меньше времени полувыведения (1 ч) [19]. В ходе метаболизма происходит метоксилирование с образованием пяти фенольных производных, из которых только два сохраняют частичную биологическую активность. Диклофенак и его метаболиты выводятся из организма почками и кишечником в конъюгированной форме.

## **1.2 Микроэкстракционные методы**

Стадия пробоподготовки зачастую является самой длительной и ответственной при проведении фармацевтического анализа. Несмотря на то, что к настоящему времени разработано множество точных и чувствительных инструментальных аналитических методов, пробоподготовка необходима для перевода пробы в удобную для анализа форму, устранения матричного влияния и, если требуется, концентрирования аналитов. Важное место в решении данных задач занимают методы разделения и концентрирования, широко применяемые в химическом анализе. Одними из самых востребованных и наиболее значимых с практической точки зрения для извлечения лекарственных веществ из разнообразных матриц являются методы жидкостной и твердофазной экстракции, основанные на различиях в распределении аналитов между фазами. Особую популярность в последнее время получили микроэкстракционные методы, которые позволяют упростить процедуру пробоподготовки, снизить расход пробы и экстрагентов, увеличить экспрессность и эффективность экстракции [20-23]. В данном разделе будут рассмотрены основные принципы и возможности методов жидкостной и твердофазной микроэкстракции, нашедших применение для выделения антибактериальных (фторхинолоны, тетрациклины, сульфаниламиды) и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ из

лекарственных препаратов, биологических жидкостей и органов и тканей животного происхождения.

### 1.2.1 Жидкостная микроэкстракция

Жидкостная микроэкстракция отличается от традиционной малыми объемами экстрагента (обычно 0,5-100 мкл) и высокой скоростью установления межфазного равновесия [24-26]. На сегодняшний день предложен арсенал микроэкстракционных методов, различающихся по способу осуществления экстракционного процесса [27]. Основные аналитические и метрологические характеристики рассматриваемых схем, включающих жидкостную микроэкстракцию, приведены в таблице 2.

*Капельная микроэкстракция* осуществляется при погружении в пробу с помощью микрошприца капли экстрагента (обычно 1-3 мкл, рисунок 1), которая после проведения извлечения отбирается обратно для последующего анализа, чаще всего хроматографического [28-30]. Объем пробы превосходит объем экстрагента на 3-4 порядка, что позволяет добиться высоких коэффициентов концентрирования, если коэффициенты распределения достаточно высоки. Привлекательной является возможность прямого ввода экстракта в аналитический прибор. Недостатками метода являются нестабильность капли при перемешивании или наличии взвешенных частиц в водной фазе, а также замедленный массоперенос.



Рисунок 1 – Схема осуществления капельной микроэкстракции [28]

**Таблица 2** – Аналитические и метрологические характеристики схем, включающих жидкостную микроэкстракцию фторхинолонов, тетрациклинов, сульфаниламидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость, %	Ссылка
КМЭ	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Плазма крови, моча	октан-1-ол и додекан-2-ол (50)	5 мл	1,1-1,7 мкг/л	-	43-61	4-5	[31]
	Фторхинолоны	КЭ-УФ	Моча	дихлорметан:толуол = 1:1 (350)	3,5 мл	7,4-31,5 мкг/л	-	-	4-8	[32]
	НПВС	КЭ-УФ	Моча	этилацетат (300)	0,4 мл	1-2,5 мг/л	-	12-44	9-15	[33]
МЖМЭ	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Мед	октан-1-ол	1 г	4,6-6,8 мкг/кг	-	7-10	<11	[34]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко, плазма	октан-1-ол	11 мл	0,5-1 мкг/л	25-45	125-180	4-9	[35]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Плазма	октан-1-ол	10 мл	0,5 мкг/л	27-33	115-137	<5	[36]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Куриная печень	октан-1-ол	5 г	0,5-20 мкг/кг	-	175-700	3-12	[37]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-ФЛ	Моча	октан-1-ол	-	0,7-35 нг/л	-	175-1000	-	[38]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Молоко	1-бутил-3-метилмидазолия тетрафторборат	1 мл	0,01-0,05 мг/л	-	116-156	3-4	[39]
	НПВС	ВЭЖХ-МС/МС	Рыба	дигексильовый эфир	1 г	0,12-0,34 мкг/кг	-	1900-3000	-	[40]
	Диклофенак	Спектрометрия	Моча, плазма	n-додекан	4 мл	21-34 мкг/л	-	-	5-7	[41]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Масло	1-октил-3-метилмидазолия гексафторфосфат	30 г	1,2-2,2 мкг/кг	-	-	<7	[42]
	НПВС	ВЭЖХ-МС/МС	Водные среды	октан-1-ол (15)	5 мл	0,5-1,25 мкг/л	-	195-346	<11	[43]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	октан-1-ол /фуллерен (10)	4 мл	5-10 мкг/л	83-94	166-188	5	[44]
	НПВС	ВЭЖХ-ФЛ/ ВЭЖХ-УФ	Моча	дигексильовый эфир	50 мл	2/40 мкг/л	-	-	-	[45]
	Диклофенак	ВЭЖХ-УФ	Моча	октан-1-ол	24 мл	2 мкг/л	15	300	10	[46]
	НПВС	КЭ-УФ	Моча, плазма	1-этил-2-нитробензол	-	0,017-0,22 мг/л	20-81	0,8-3,2	3-15	[47]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко	октан-1-ол	3 мл	0,95-3,6 мкг/л	-	-	<8,66	[48]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	дигексильовый эфир	6,4 мл	1,6-4,3 мкг/л	-	43-97	-	[49]
НПВС	ВЭЖХ-УФ	Волосы	октан-1-ол/магнитные наночастицы	-	0,01-0,1 мг/л	-	413-2450	3-7	[50]	
НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма крови, молоко	октан-1-ол	0,5 мл	2,7-5 мкг/л	-	31-66	3-13	[51]	
Диклофенак	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма крови	октан-1-ол	5 мл	10 мкг/л	-	166-243	<7,6	[52]	

Продолжение таблицы 2

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
ДЖМЭ	Тетрациклины	ПИА-УФ	Яйца	хлороформ (100)	2,5 г	6,4-11,1 мкг/л	84-93	-	3-10	[53]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Молочная смесь	1-гексил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (70)	0,4 г	2,9-16,7 мкг/кг	≈100	-	1-4	[54]
	Энрофлоксацин	ВЭЖХ-ФЛ	Яйца	дихлорметан (160)	1 г	5,6 мкг/кг	-	-	2-10	[55]
	Окситетрациклин	ВЭЖХ-УФ				0,32 мг/кг				
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	ундекан-1-ол (20)	5 мл	3-5 мкг/л	-	-	1	[56]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Куриная печень	хлороформ (200)	5 мл	5-19 мкг/кг	-	-	4-8	[57]
	Сульфаниламиды, Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Мед	хлороформ (200)	1 г	3-7 мкг/кг	-	-	5-15	[58]
	Фторхинолоны	КЭ-УФ	Свиная кровь	дихлорметан (250)	0,5 мл	1,55-4,55 мг/л	53-96	10	1-12	[59]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-МС/МС	Говядина	дихлорметан (200)	1 г	2,2-3,6 мкг/кг	98	-	2-7	[60]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Куриная печень	1,2-дихлорэтан (650)	5 г	0,4-8,4 мкг/кг	-	-	1-3	[61]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Мед	тетрахлорэтан (40)	1 г	0,8-1,7 мкг/кг	-	42-81	<2	[62]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Курица, свинина, рыба	1-бутил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (50)	2 г	0,5-1,1 мкг/л	60-96	11-42	2-4	[63]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Свиной корм	1-октил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (80)	1 г	0,07-0,61 мкг/кг	91-97	-	1-7	[64]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Яйца	1-бутил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (50)	2 г	2-12 нг/г	59-95	12-44	2-4	[65]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-ФЛ	Мед, молоко, плазма крови	1-гексил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (100)	10 мл/1 г/10 мл	0,011-0,269 мкг/кг	-	24-44	1-7	[66]
	НПВС	СФХ-УФ	Напитки	1-октил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (74)	10 мл	0,62-7,37 мкг/л	-	126-132	<12	[67]
Фторхинолоны	ВЭЖХ-МС/МС	Коровье молоко	трихлорметан (570)	1 г	0,3-6,6 мкг/кг	40-80	-	4-12	[68]	
Тетрациклины, Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Мед	хлороформ (200)	1 г	6,3-6,8 мкг/кг, 3,1-3,5 мкг/кг	-	-	2-16	[69]	

Продолжение таблицы 2

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
ДЖМЭ	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко, яйца	1-бутил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (80-160)	5 мл	0,8–1,1 мкг/кг	97	-	1-6	[70]
	Фторхинолоны	Спектрофлуориметрия	Моча, сыворотка крови, твердые лекарственные формы	хлороформ (300)	10 мл	1,61 мкг/л	-	51	1	[71]
	Офлоксацин	Спектрофлуориметрия	Моча, сыворотка крови, твердые лекарственные формы	1-гексил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (45 мг)	10 мл/1 мл/0,05 г	0,03 мкг/л	-	50	3	[72]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко	1-октил-3-метилмидазолия гексафторфосфат (115)	3 мл	0,11-0,79 мкг/л	≈100	-	1-6	[73]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Моча	ГЭР на основе октан-1-ола и метилтриоктиламмония хлорида (60)	10 мл	0,02-0,06 мкг/л	31-92	62-648	5-8	[74]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Соки	ГЭР на основе октан-1-ола и метилтриоктиламмония хлорида (800)	5 мл	0,02-0,05 мг/л	-	-	1-3	[75]
	НПВС	ВЭЖХ-МС/МС	Говяжья печень	ГЭР на основе муравьиной кислоты и ментола (1,25 г)	0,5 г	0,1-0,3 мкг/кг	87-91	22-23	8-9	[76]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Плазма крови	1,2-дихлорэтан (37)	8 мл	0,1-0,3 мкг/л	51-66	80-104	<8	[77]
	НПВС	ГХ-ПИД	Моча и плазма крови	хлороформ (30)	5 мл	0,06-13 мкг/л	72-78	364-412	4-5	[78]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Сухое молоко, яйца	трихлорметан (900)	2/3 г	5-10 мкг/кг	≈100	-	1-8	[79]
НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	дигексильный эфир (400)	20 мл	0,5 мкг/л	-	47-53	7-8	[80]	
ГЖМЭ	Сульфаниламид	ВЭЖХ-УФ	Молоко, моча, плазма крови	ацетонитрил (250)	0,5 мл	0,3 мкг/л	-	-	2	[81]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Молоко, яйца, мед	ацетон (791)	6 мл	0,07-0,53 мкг/кг	95	-	1-6	[82]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Животные жиры	1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторборат (200)	2 г	0,4-0,5 мкг/кг	-	-	1-9	[83]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Животные ткани	1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторборат (200)	0,2 г	4,3-3,14 мкг/кг	-	-	<9,3	[84]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Молоко, мед	1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторборат (1000)	10 г	0,15-0,3 мкг/л	-	-	3-5	[85]

Окончание таблицы 2

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
ГЖМЭ	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Мед, моча	ацетонитрил (150)	0,5 мл	1,4-4,5 мкг/л	-	-	7-9	[86]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Мясо курицы, говядина, свинина, рыба	ацетон (589)	2 г	0,06-0,64 мкг/кг	-	-	1-7	[87]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Мед Молоко	ацетонитрил (1000)	1 г 0,5 мл	0,48-2,49 мкг/кг 0,8-5 мг/кг	-	-	<7	[88]
	Сульфаниламиды, Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Молоко	1-гексил-3-метилимидазолия тетрафторборат (60)	2 мл	4-15,8 мкг/л	-	-	1-7	[89]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко/яйца/мед	1-бензил-3-метилимидазолия хлорид (140)	5 мл/2 г/1 г	0,12-0,45 мкг/л	-	25-98	1-7	[90]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	1-бутил-3-метилимидазолич гексафторфосфат (150)	6,25 мл	20 мкг/л	54-74	82	4-8	[91]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Молоко	N,N-диметилпиперидин (250)	2 мл	0,12-0,18 мг/л	-	-	1-8	[92]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Свинина	дихлорметан (350)	5 г	0,2-1 мкг/кг	-	17-31	3-4	[93]
ММЭ	Сульфаниламиды	Спектрофлуориметрия	Мед	этоксированный нонилфенол NP-7	10 мл	0,5-5 мкг/л	-	-	2-4	[94]
	Тетрациклин	Спектрофотометрия	Твердые лекарственные формы	этоксированный 4-третоктилфенол Triton X-114	0,1-0,2 г	20 мкг/л	-	5	<5	[95]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Моча	этоксированный 4-третоктилфенол Triton X-114	10 мл	3-6 мкг/л	-	-	3-10	[96]
	Фторхинолоны	Спектрофлуориметрия	Твердые лекарственные формы, плазма крови, моча	смесь этоксилированного нонилфенола PONPE 7.5 и додецилсульфата натрия	2 г/1 мл	0,04-0,06 мкг/л	-	-	2-5	[97]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Плазма и сыворотка крови	смесь 1-дециламина и тимола	1 мл	20 мкг/л	70-77	6-7	3-8	[98]
	Тетрациклин	ВЭЖХ-УФ	Моча	1-октиламин (50)	1 мл	0,17 мг/л	90	18	4-8	[99]

МЭ – микроэкстракция

КМЭ – капельная микроэкстракция

МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция

ДЖМЭ – дисперсионная жидкостная микроэкстракция

ГЖМЭ – жидкостная микроэкстракция из гомогенного раствора

ММЭ – мицеллярная микроэкстракция

НПВС – нестероидные противовоспалительные лекарственные средства

ПИА-УФ – проточно-инжекционный анализ со спектрофотометрическим детектированием

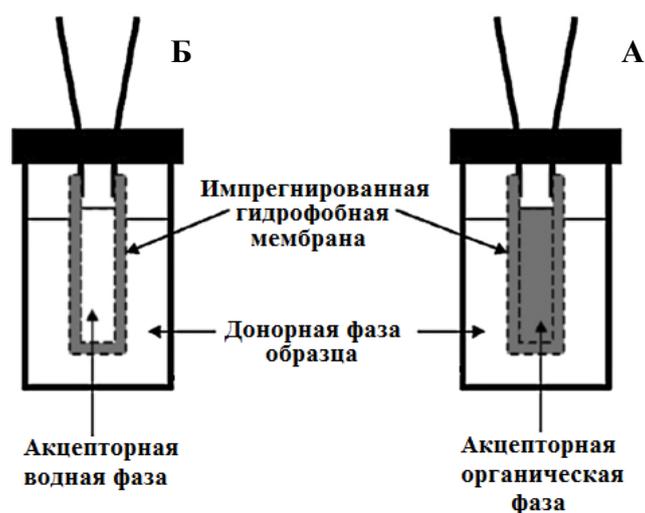
СФХ-УФ – высокоэффективная сверхкритическая флюидная хроматография со спектрофотометрическим детектированием

Введение экстрагента в пробу в виде капли возможно и без помощи микрошприца. В этом случае при перемешивании с помощью магнитной мешалки создают условия для образования воронки на поверхности жидкости, в которую помещают экстрагент, плотность которого ниже, чем у пробы. Такой подход снимает ограничения по объему экстрагента, связанные с устойчивостью капли на конце иглы микрошприца. Например, в работе [31] В. Varfi и сотрудники проводили ВЭЖХ-УФ определение нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ в биологических жидкостях с предварительным извлечением в высшие спирты (50 мкл) из 5 мл пробы. Значительно больший по сравнению с классическим вариантом капельной микроэкстракции объем экстрагента, с одной стороны, способствует более быстрому достижению равновесия в системе, но, с другой стороны, обуславливает более низкие коэффициенты концентрирования (от 43 до 61). Авторы исследовали различные варианты проведения экстракционного процесса и один из них включал кристаллизацию экстракта при снижении температуры для облегчения его отделения. Экстрагент при этом должен иметь температуру плавления близкую к комнатной (в данном случае, додекан-2-ол).

Ускорение массопереноса без снижения коэффициентов концентрирования потенциально возможно при проведении извлечения в трехфазной системе при условии наличия кислотных или основных свойств у целевых аналитов. Для этого к образцу, в котором аналиты находятся в молекулярных формах, добавляют экстрагент (несколько сотен мкл) и помещают в органическую фазу каплю водного раствора кислоты или щелочи с помощью микрошприца. Аналиты извлекаются в неполярный экстрагент, после чего реэкстрагируются в акцепторный раствор за счет перехода в ионную форму. Так, экстракцию фторхинолонов из проб мочи проводили в смесь дихлорметана и толуола [32], а извлечение нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ – в этилацетат [33]. В обоих случаях реэкстракция осуществлялась в раствор гидроксида натрия, где аналиты образовывали анионные формы, с последующим их определением методом капиллярного электрофореза с фотометрическим

детектированием (КЭ-УФ). Причем в работе [33] каплю получали гидродинамическим способом непосредственно на входе в капилляр для электрофоретического разделения. После выделения аналитов каплю таким же образом отбирали обратно и заменяли двухфазную систему на фоновый электролит для проведения анализа экстракта.

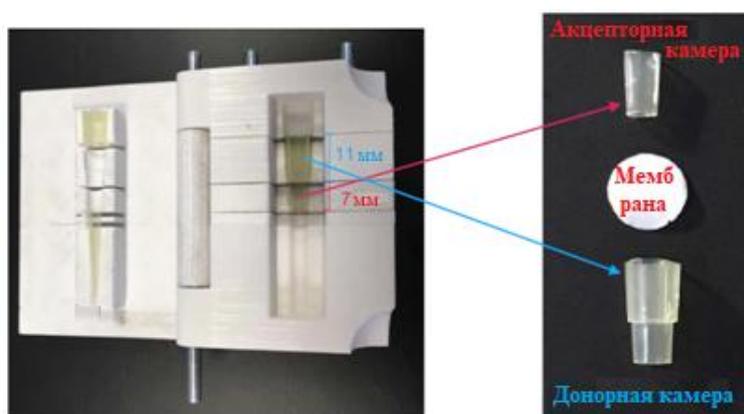
Для решения проблем со стабильностью органической фазы по отношению к внешним воздействиям и увеличения площади межфазного взаимодействия предложен метод **мембранной микроэкстракции**, который предполагает извлечение целевых аналитов в фазу экстрагента, находящуюся в порах полимерной мембраны [100-102]. Чаще всего применяются полипропиленовые мембраны в виде полого капилляра, один из концов которого запаивают либо задают ему U-образную форму. Перед погружением в пробу мембрану импрегнируют подходящим экстрагентом и закрепляют на конце иглы микрошприца. В двухфазном варианте внутреннюю полость заполняют тем же экстрагентом (рисунок 2А), а в трехфазном – акцепторным водным раствором (рисунок 2Б). В последнем случае движущей силой процесса является градиент рН: в донорной фазе пробы создаются условия для образования незаряженных форм аналитов, а в акцепторной фазе – для получения ионных форм. Для этой цели применяются растворы кислот (соляной [34], фосфорной [35] или азотной [36]) и оснований (гидроксида натрия [37, 38], дигидрофосфата натрия [39]), а также буферные растворы [40]. Акцепторная фаза может также состоять из полярного органического растворителя (например, метанола), что обеспечивает ее совместимость с масс-спектрометрическим детектированием благодаря отсутствию нелетучих компонентов [41]. Для интенсификации массопереноса экстракцию проводят в



**Рисунок 2** – Схема осуществления мембранной микроэкстракции в двухфазном (А) и трехфазном (Б) вариантах [103]

мембрану, вращающуюся под действием внешнего магнитного поля. В этом случае мембрана снабжена металлическим стержнем [42]. Кроме того, могут быть использованы одновременно несколько мембран, а магнитные свойства позволяют легко отделять их от образца после извлечения. В литературе описан и нестандартный подход: импрегнированную мембрану размещают в газовой фазе над образцом в закрытом сосуде и под действием ультразвукового поля обеспечивают постоянное распыление донорной фазы с образованием аэрозоля [34].

Мембранная микроэкстракция может быть реализована и на плоских полимерных мембранах. Для этого коллективом ученых из Чехии и Испании предложено изготавливать одноразовые экстракционные ячейки из наконечников для автодозатора с помощью специального устройства, полученного путем 3D печати (рисунок 3, [47]). Три лезвия разделяли среднюю часть наконечника на две камеры – донорную и акцепторную (емкость 16 и 6 мкл соответственно), между которыми после их извлечения из устройства закреплялась плоская



**Рисунок 3** – Схема изготовления экстракционной ячейки для трехфазной мембранной жидкостной микроэкстракции [47]

мембрана с последующим ее импрегнированием. В нижнюю (донорную) камеру помещали раствор пробы мочи или сыворотки крови, а в верхнюю (акцепторную) – раствор тетрабората натрия. Ячейку устанавливали внутри виалы на пружину во избежание потери донорной фазы, удерживаемой при помощи капиллярных сил. Далее виалу устанавливали на перемешивающее устройство для экстракции нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ, после чего переносили в автосамплер системы КЭ-УФ. При этом исключается возможность загрязнения реэкстракта за счет его прямого ввода в прибор из экстракционной ячейки. Недостатком схемы являются низкие

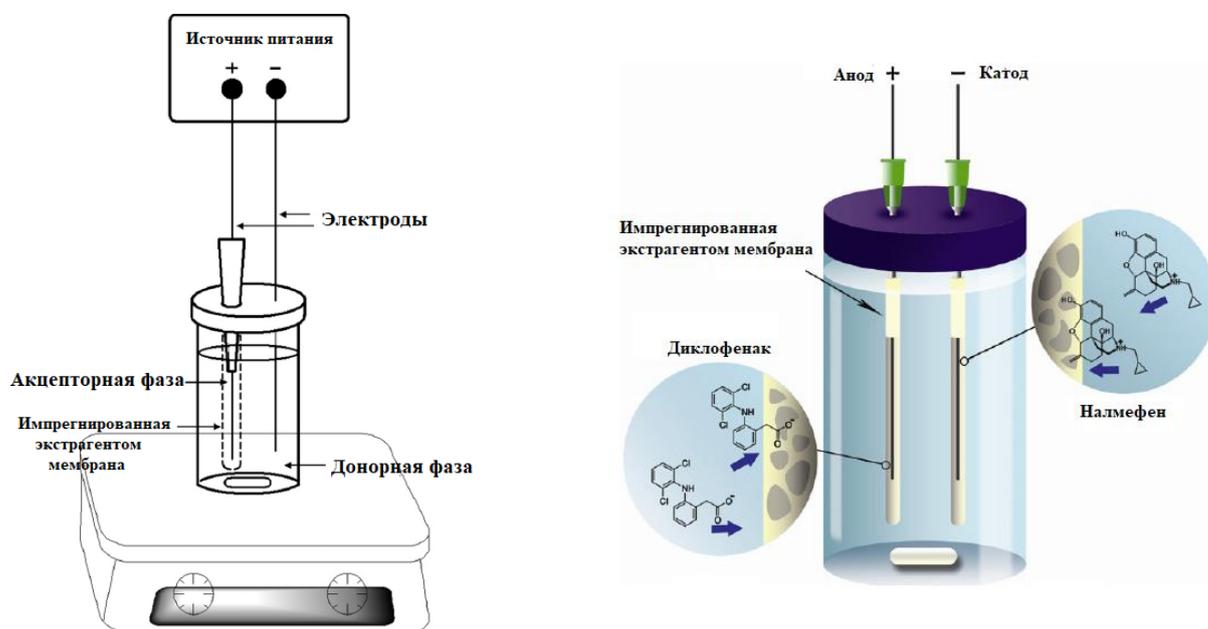
мембрана с последующим ее импрегнированием. В нижнюю (донорную) камеру помещали раствор пробы мочи или сыворотки крови, а в верхнюю (акцепторную) – раствор тетрабората натрия. Ячейку устанавливали внутри виалы на пружину во избежание потери донорной фазы, удерживаемой

коэффициенты концентрирования ( $<4$ ). Пределы обнаружения варьировались от 17 до 217 мкг/л.

В качестве экстрагента для извлечения антибактериальных и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ чаще всего используется октанол [43, 44, 46], реже – дигексиловый эфир [45], додекан [41], этилнитробензол [47] и имидазолиевые ионные жидкости [39, 42]. Для повышения эффективности извлечения возможно введение ион-парных агентов или наноматериалов в фазу экстрагента. Так, для извлечения фторхинолонов [36] и тетрациклинов [48] из биологических жидкостей мембрану импрегнировали *n*-октанолом с 10% содержанием ионной жидкости (метилтриоктиламмония хлорида). В донорной фазе поддерживали щелочную среду для связывания анионных форм аналитов с четвертичными аммониевыми катионами в органической фазе, а в акцепторной – кислотную для разрушения ионной пары и реэкстракции аналитов. Для офлоксацина и ципрофлоксацина коэффициенты концентрирования составили 115 и 137 соответственно. Внедрение наноматериалов путем их диспергирования в экстрагенте позволяет реализовать одновременное извлечение аналитов по механизмам жидкостной и твердофазной микроэкстракции. Например, при определении нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ в пробах мочи и волос нашли применение углеродные нановолокна [49] и магнитные наночастицы, модифицированные кремнеземом и оксидом титана [50]. В первом случае коэффициенты концентрирования варьировались от 43 для кетопрофена до 97 для диклофенака, а во втором – от 413 для напроксена до 2450 для пироксикама.

Одной из разновидностей трехфазной мембранной микроэкстракции является электромембранная. Миграция аналитов, находящихся в ионной форме, из донорной фазы в акцепторную происходит путем наложения разности потенциалов на электроды, находящиеся в них (рисунок 4А). При этом время, необходимое для извлечения, сокращается до 5-15 минут [51, 52]. Интересный подход, который состоит в расположении катода и анода в двух импрегнированных мембранах в виде полого капилляра, продемонстрирован S.

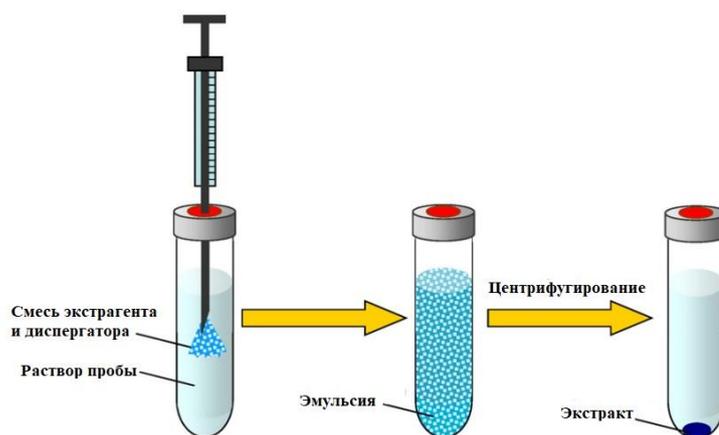
Seidi и др. в работе (рисунок 4Б, [46]). Преимущество схемы заключается в одновременном извлечении аналитов, обладающих кислотными и основными свойствами, за один экстракционный цикл. В данном случае, диклофенак мигрировал в анодное пространство, а налмефен (лекарственное средство для лечения алкогольной зависимости) – в катодное. После извлечения акцепторные фазы объединяли и проводили ВЭЖХ-УФ анализ. Коэффициенты концентрирования достигали 300 и 350, а пределы обнаружения составили 2 и 4 мкг/л соответственно. При проведении электромембранной микроэкстракции в условиях повышенного солевого фона, характерного для реальных образцов, стабильность фазы экстрагента может нарушаться из-за нагрева и образования газа в побочных процессах электролиза. Для решения данной проблемы предложено создавать пульсацию напряжения, которая также повышает эффективность экстракции за счет уменьшения толщины двойного электрического слоя [52]. В частности, коэффициент концентрирования диклофенака увеличился со 178 до 243 при переходе от постоянного напряжения к пульсирующему.



**Рисунок 4** – Схема осуществления электромембранной микроэкстракции с одной (А) и двумя (Б) импрегнированными мембранами [46, 51]

Экспрессным методом является **дисперсионная микроэкстракция**, которая предполагает диспергирование экстрагента в пробе с образованием

тонкодисперсной эмульсии, в которой быстро (не более 1 мин) устанавливается межфазное равновесие за счет резкого увеличения площади массообмена [104-106]. В классическом и получившем наибольшее распространение варианте ее осуществления смесь неполярного экстрагента и растворителя-диспергатора, неограниченно смешивающегося с ним и пробой, быстро вводят в анализируемый раствор, в результате чего фаза экстрагента равномерно распределяется в нем в виде тонкодисперсной эмульсии (рисунок 5). Иногда дополнительно включают обработку экстракционной смеси в ультразвуковом поле для дальнейшего эмульгирования [53, 54]. Разделение фаз достигается центрифугированием и органическую фазу отбирают для проведения анализа. Для упрощения отделения фазы возможна ее кристаллизация при условии подходящей температуры плавления [55, 56]. В зависимости от природы экстрагента и аналитического метода может потребоваться замена растворителя или реэкстракция. Для рассматриваемых в данном диссертационном исследовании лекарственных веществ в качестве экстрагентов чаще всего применяют хлорорганические растворители (хлороформ [53, 57, 58], дихлорметан [59, 60], 1,2-дихлорэтан [61], тетрахлорэтилен [62]) и гидрофобные ионные жидкости [63-67], а в качестве диспергаторов – ацетонитрил [68, 69], метанол [66] и гидрофильные ионные жидкости [70]. Например, для флуориметрического определения фторхинолонов в пробах мочи, сыворотки крови и твердых лекарственных формах в пробу инжектировали смесь хлороформа и ацетонитрила и после разделения фаз центрифугированием переносили экстракт в кювету спектрофлуориметра [71]. Предложенная схема позволяла сконцентрировать аналиты до 50 раз. Такой же коэффициент концентрирования был достигнут и без применения токсичных органических растворителей. В работе иранских ученых M. Zeeb, M.R. Ganjali и P. Nagouzi [72] смесь гидрофобной ионной жидкости (1-гексил-3-метилимидазолия гексафторфосфат) и этанола вводили в раствор пробы лекарственного препарата, мочи или плазмы для извлечения офлоксацина. Полученный экстракт анализировали методом спектрофлуориметрии.



**Рисунок 5** – Схема осуществления дисперсионной микроэкстракции [107]

Недостаток метода состоит в уменьшении коэффициентов распределения аналитов из-за присутствия полярного растворителя, поэтому для более полного выделения аналитов возможно введение высаливающих агентов в отобранную водную фазу с образованием фазы диспергатора, которую объединяют с фазой экстрагента. Такой процесс реализован при извлечении фторхинолонов [64] и тетрациклинов [73] из проб молока и кормов в ионные жидкости. Было обнаружено, что предложенный подход позволяет повысить степени извлечения фторхинолонов до 91-97%, что на 15-20% выше по сравнению с классической схемой. Однако, чтобы избежать разбавления экстракта, необходимо удалить диспергатор из смеси, что удлиняет процедуру пробоподготовки. Похожий прием используется при введении смеси двух ионных жидкостей – гидрофобной (1-гексил-3-метилимидазолия гексафторфосфат) и гидрофильной (1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторборат) [54]. После образования эмульсии в систему вводят гексафторфосфат натрия и в результате реакции обмена анионами из гидрофильной ионной жидкости образуется гидрофобная. В конечном итоге, выделяется органическая фаза, состоящая из двух гидрофобных ионных жидкостей. Описанная схема нашла применение для ВЭЖХ-УФ определения сульфаниламидов в пробах сухого молока. Пределы обнаружения составили от 3 до 17 мкг/кг.

В некоторых случаях удается избежать отрицательного влияния диспергатора, что нашло отражение в работах по извлечению антибактериальных [74, 75] и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ [76, 108]

в глубоко эвтектические растворители (ГЭР). ГЭР представляют собой эвтектические смеси, состоящие из акцептора и донора водородной связи, благодаря чему находятся в жидком состоянии при комнатной температуре. В качестве акцептора водородной связи наиболее часто выступают четвертичные аммониевые соли (хлорид холина, хлорид тетраметиламмония), а донорами являются органические соединения, имеющие карбоксильную, карбамидную, гидроксильную или аминогруппу (карбоновые кислоты, амины, спирты, сахарады) [109]. ГЭР нашли применение в различных областях химии благодаря простоте приготовления, экологической безопасности и биоразлагаемости [110]. В последнее время ГЭР стали активно внедряться в химический анализ, в основном в качестве экстрагентов. Первая обзорная статья, посвященная данной тематике, была подготовлена в 2017 году доц. А.Ю. Шишовым и проф. А.В. Булатовым совместно с учеными из Италии и Словакии [111]. Комбинирование прекурсоров позволяет создавать экстрагенты с требуемыми свойствами, что выгодно отличает ГЭР от классических растворителей. Большинство изученных ГЭР является гидрофильными, что делает их непригодными для жидкостно-жидкостной микроэкстракции, в отличие от квази-гидрофобных и гидрофобных [112, 113]. Первые частично разрушаются в водной среде из-за наличия водорастворимого компонента, а вторые полностью состоят из нерастворимых в воде прекурсоров, что обуславливает их стабильность при контакте с водой. Квази-гидрофобные ГЭР удобны для дисперсионной микроэкстракции, так как при введении экстрагента в пробу гидрофильный компонент растворяется, диспергируя гидрофобную составляющую. Так, в случае фторхинолонов [74] и сульфаниламидов [75] извлечение проводили в ГЭР на основе *n*-октанола и метилтриоктиламмония хлорида. Второй компонент выступал не только как диспергатор, но и дополнительно стабилизировал эмульсию благодаря поверхностно-активным свойствам, а также образовывал ионные пары с депротонированными аналитами в щелочной среде, способствуя их экстракции. Ультразвуковая обработка повышает степени извлечения на 5–10 % [75]. Диспергирование углекислым газом при введении ГЭР для выделения

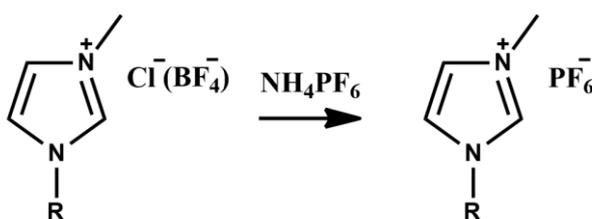
лекарственных веществ впервые предложено в научной группе проф. А.В. Булатова [76]. ГЭР на основе ментола и муравьиной кислоты инжесктировали в пробу, содержащую карбонат натрия. Выделяющийся углекислый газ диспергировал экстрагент (ментол), а также способствовал разделению фаз. Кроме того, образующиеся соли оказывали высаливающий эффект и создавали буферную систему, что положительно сказывалось на эффективности экстракции. После кристаллизации органической фазы при охлаждении ее отделяли и анализировали. Степени извлечения для диклофенака и кетопрофена составили 87 и 91 % соответственно. Ранее теми же авторами было показано, что данные аналиты экстрагируются в расплавленный ментол за счет образования с ним эвтектической смеси [108, 114], что является движущей силой процесса независимо от выбранной схемы. Еще одним простым подходом к диспергированию газовой фазой является многократный отбор и сброс смеси экстрагента и пробы в экстракционный сосуд с помощью шприца [77, 78], при этом для разделения фаз центрифугированием требуется в 4 раза меньше времени, чем в традиционной схеме [79].

P. Moradi и A. Asghari предложили новый подход, который позволяет проводить дисперсионную микроэкстракцию без центрифугирования [80]. Сначала в пробу добавляют дигексиловый эфир (экстрагент) и диспергируют его воздухом с помощью шприца. Затем эмульсию пропускают через гидрофильный политетрафторэтиленовый фильтр (насадка на шприц) для удержания органической фазы. Далее фильтр присоединяют к другому шприцу, содержащему щелочной раствор, и резким поднятием штока фаза экстрагента эмульгируется, а аналиты реэкстрагируются в акцепторный раствор. Наконец, шток опускают и водную фазу собирают для анализа. Предложенная схема была применена для ВЭЖХ-УФ определения нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ в пробах мочи. Коэффициенты концентрирования находились в интервале от 47 до 53.

Одним из актуальных направлений, активно развивающихся на данный момент, является *жидкостная микроэкстракция из гомогенного раствора*

(рисунок б), которая предполагает получение раствора экстрагента или его ионной формы в пробе с последующим инициированием фазового разделения путем изменения химического состава или физических свойств системы [115-117]. Преимуществом метода является равномерное образование микрокапель экстрагента по всему объему раствора, что обуславливает быстрое достижение межфазного равновесия. В качестве экстрагентов чаще всего используются полярные органические растворители (ацетонитрил [81], ацетон [82], гидрофильные имидазолиевые ионные жидкости [83-85]), а фазовое разделение достигается введением в гомогенный раствор пробы и экстрагента высаливающих агентов (хлорид натрия [86], сульфаты натрия [87], магния [88] и аммония [85]), ионы которых препятствуют гидратации молекул растворителя.

Экстрагент выделяется, как правило, не полностью, что снижает эффективность извлечения. Для решения данной проблемы были предложены другие способы проведения экстракции. В случае имидазолиевых ионных жидкостей реализуются два механизма – замена противоиона или изменение температуры. В первом случае гидрофильная ионная жидкость, содержащая тетрафторборат- [89] или хлорид-анион [90], реагирует с гексафторфосфатом аммония и образуемая в результате обмена анионами гидрофобная ионная жидкость выделяется в собственную фазу:



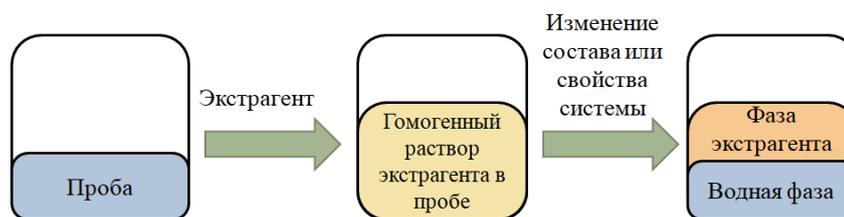
**1-алкил-3-метилимидазолия  
хлорид (тетрафторбрат)**

**1-алкил-3-метилимидазолия  
гексафторфосфат**

Такой подход нашел применение для извлечения тетрациклинов [90] и сульфаниламидов [89] из проб молока, яиц и меда. Коэффициенты концентрирования для тетрациклинов варьировались от 25 до 98.

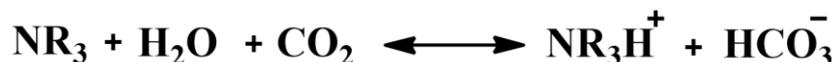
Во втором случае изначально используется ионная жидкость, обладающая гидрофобными свойствами, но повышение температуры до 50 °С вызывает ее

растворение в образце, а охлаждение – выделение органической фазы [91]. Данный способ нашел применение для экстракции диклофенака и мефенамовой кислоты из проб мочи. Степени извлечения составили 74 и 54 % соответственно.



**Рисунок 6** – Схема осуществления микроэкстракции из гомогенного раствора

В качестве альтернативы выступают экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью», которые способны переходить из гидрофильной (ионной) формы в гидрофобную (молекулярную) форму при изменении pH раствора пробы [117]. В этот класс экстрагентов входят в основном третичные амины, которые при смешении с водой и пропускании углекислого газа образуют водные растворы собственных гидрокарбонатов:



При добавлении такого раствора к пробе и подщелачивании выделяется органическая фаза:



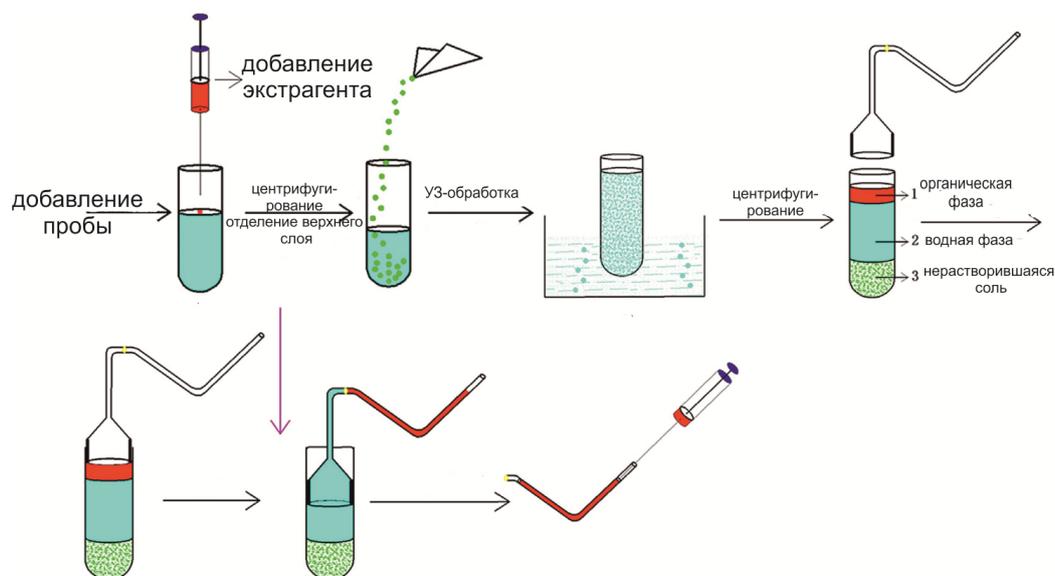
При ВЭЖХ-УФ определении ряда нестероидных противовоспалительных препаратов в пробах грудного молока, мочи и слюны использовали N,N-диметилциклогексилламин в качестве экстрагента [92]. Пределы обнаружения составили 0,12-0,18 мг/л.

В работе [93] для дополнительного концентрирования экстракта W. Tsai и др. предложили инициировать фазовое разделение в системе неполярный экстрагент/полярный органический растворитель введением небольшого количества воды. Сульфаниламиды извлекали из пробы мышечной ткани в подкисленный ацетонитрил, который смешивали с дихлорметаном. Добавление воды в количестве около 4% от общего объема смеси вызывало образование фазы хлорорганического растворителя. Коэффициенты концентрирования

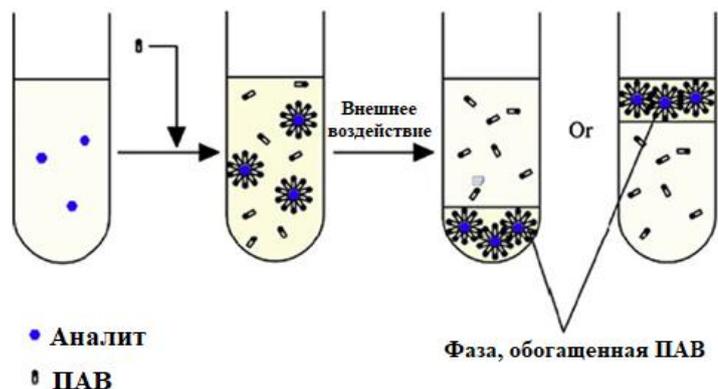
варьировались от 17 до 31. Это показывает возможности применения принципов микроэкстракции из гомогенного раствора и в органических средах.

Для более удобного отбора небольшого объема органической фазы экстракцию можно проводить в специальных стеклянных сосудах с вытеснительной воронкой (рисунок 7, [82]) либо с помощью шприцев [81]. Оба подхода были опробованы при ВЭЖХ-ФЛ определении фторхинолонов и ВЭЖХ-УФ определении сульфаниламидов в пробах биологических жидкостей (кровь, плазма крови, моча) и продуктов животного происхождения (мед, яйца, молоко). В первом случае после ультразвуковой обработки экстракционной смеси с целью ее насыщения высаливающим агентом и фазового разделения в экстракционный сосуд сверху опускается воронка, в результате чего фаза экстрагента выталкивается в узкий капилляр, из которого она отбирается микрошприцом. Во втором случае между собой с помощью переходника соединяют два шприца, один из которых содержит водный раствор пробы и высаливающего агента, а второй – полярный органический растворитель. Поочередное перекачивание обеспечивает перемешивание компонентов, затем смесь оставляют в одном из шприцев до фазового разделения и движением штока выдавливают органическую фазу в наконечник шприца.

**Мицеллярная микроэкстракция** основана на солюбилизации аналитов внутри супрамолекулярных агрегатов (мицелл), сформированных поверхностно-активными веществами (ПАВ) в водном растворе пробы (рисунок 8, [118-120]). В результате физического воздействия на полученный изотропный раствор или введения в него дополнительных компонентов образуется двухфазная система, в которой одна из фаз обогащена ПАВ и целевыми аналитами, а другая – обеднена. Наибольшее распространение в мицеллярной микроэкстракции получили неионогенные ПАВ (в основном, этоксилированные алкилфенолы и спирты), водные растворы которых претерпевают фазовое разделение при достижении определенной температуры, которая называется точкой помутнения.

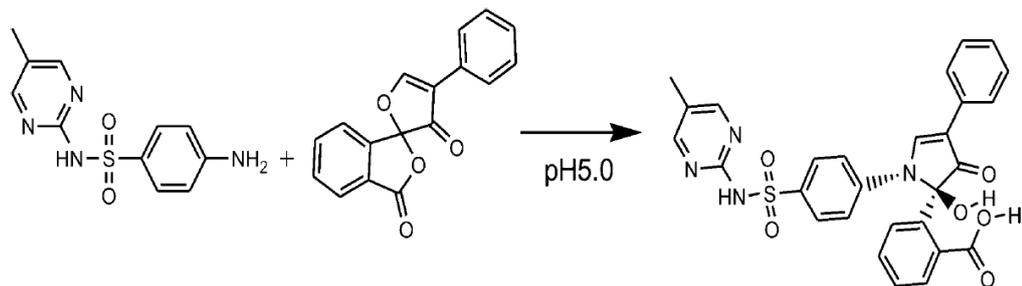


**Рисунок 7** – Схема осуществления жидкостной микроэкстракции из гомогенного раствора с применением стеклянного сосуда с вытеснительной воронкой [82]

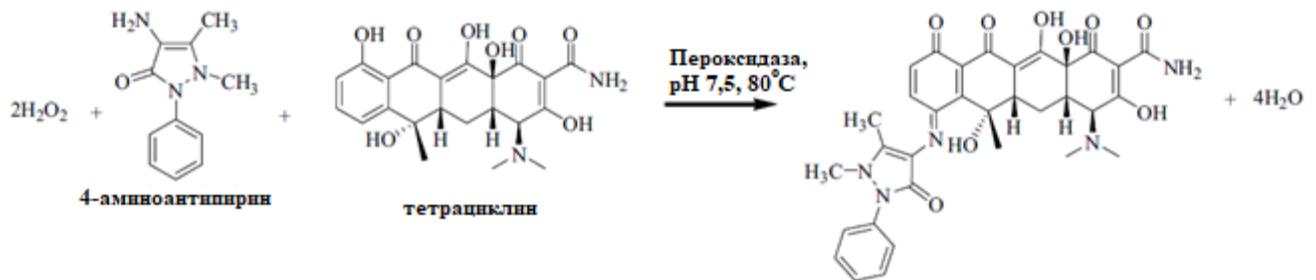


**Рисунок 8** – Схема проведения мицеллярной экстракции [121]

Так, для флуориметрического определения сульфаниламидов в меде проводили дериватизацию с флуорескамином, после чего добавляли раствор этоксилированного нонилфенола NP-7 и устанавливали на водяную баню при температуре 35 °С для инициирования фазового разделения [94]. Фазу, обогащенную ПАВ, разбавляли метанолом и измеряли интенсивность флуоресценции экстракта. Производные сульфаниламидов (в данном случае – сульфамеразина) получали по следующей реакции:



Для спектрофотометрического определения тетрациклинов в твердых лекарственных формах [95] и ВЭЖХ-УФ определения сульфаниламидов в моче [96] применяли экстракционную систему на основе этоксилированного 4-третоктилфенола Triton X-114. Особенностью первой работы является получение окрашенных производных с 4-аминоантипирином при ферментативном разложении пероксида водорода под действием пероксидазы из корнеплодов редьки посевной:



В смешанных мицеллярных системах, содержащих неионогенные и ионогенные ПАВ, гидрофобные взаимодействия мицелл с аналитами дополняются электростатическими, что играет важную роль при извлечении относительно полярных аналитов. Однако присутствие ионогенного ПАВ приводит к появлению заряда на поверхности мицелл, что вызывает их электростатическое отталкивание и, как следствие, резкое повышение температуры помутнения. Для исключения стадии нагревания в систему вводят электролиты, которые снижают температуру помутнения ниже комнатной. Например, для флуориметрического определения фторхинолонов в твердых лекарственных формах, моче и плазме крови к пробе добавляли раствор этоксилированного нонилфенола PONPE 7.5 и додецилсульфата натрия [97]. При добавлении навески хлорида натрия образовывалась фаза, обогащенная ПАВ. После центрифугирования пробу помещали в ледяную баню для кристаллизации экстракта, после чего его отделяли и разбавляли этанолом для измерения интенсивности флуоресценции. Пределы обнаружения составили 40 и 60 нг/л для офлоксацина и гатифлоксацина соответственно.

Часто используемые этоксилированные алкилфенолы и спирты обладают высокой вязкостью, что усложняет отбор экстракта и обуславливает

необходимость его разбавления перед вводом в аналитическое оборудование. В связи с этим изучаются новые экстракционные системы, характеризующиеся меньшей вязкостью. В частности, длинноцепочечные первичные амины обладают поверхностно-активными свойствами и образуют изотропные растворы. Научной группой под руководством проф. А.В. Булатова было предложено использовать в качестве инициаторов фазового разделения электролиты (хлорид натрия) либо монотерпеноиды. Во втором случае депротонированная гидроксильная группа тимола или ментола электростатически взаимодействовала с функциональной группой первичного амина, что вызывало выделение фазы, обогащенной обоими компонентами. Разработанные схемы были применены для выделения сульфаниламидов [98] и тетрациклина [99] из биологических жидкостей для последующего ВЭЖХ-УФ определения. Степени извлечения сульфаниламидов варьировались от 70 до 77 %. Для тетрациклина эффективность экстракции составила 90 %.

### **1.2.2 Твердофазная микроэкстракция**

Твердофазная микроэкстракция является современным методом пробоподготовки, предполагающим сорбцию целевых аналитов на поверхности наноматериалов (массой от единиц до десятков мг) или тонких полимерных пленок (от десятков до сотен мкм) из жидкой или газовой фазы с последующим элюированием или термодесорбцией в испарителе газового хроматографа [122-125]. В последнем варианте полностью исключается применение органических растворителей, что является преимуществом перед жидкостной микроэкстракцией. Тем не менее, по экспрессности твердофазная микроэкстракция, в целом, уступает ей из-за более медленного массообмена. Аналитические и метрологические характеристики обсуждаемых схем представлены в таблице 3.

**Таблица 3** – Аналитические и метрологические характеристики схем, включающих твердофазную микроэкстракцию фторхинолонов, тетрациклинов, сульфаниламидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Сорбент/материал покрытия (масса сорбента/толщина покрытия)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость, %	Ссылка
ВТФМЭ	НПВС	ГХ-МС	Молоко	полидиметилсилоксан	10 г	-	-	-	-	[126]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Моча	сополимер полидиметилсилоксана и дивинилбензола (60 мкм)	5 мл	0,12-0,17 мкг/л	-	-	<1	[127]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-МС	Свинина	сополимер полидиметилсилоксана и дивинилбензола (65 мкм)	10 г	16-39 мкг/кг	4-27	-	8-19	[128]
	НПВС Сульфаниламиды Фторхинолоны Тетрациклины	ВЭЖХ-МС	Куриное мясо	сополимер дивинилбензола и N-винилпирролидона	2 г	1-20 мкг/кг	-	-	1-34	[129]
	Офлоксацин	ВЭЖХ-УФ	Молоко	полимер с молекулярными отпечатками	10 г	-	-	-	От 6 до 7	[130]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-ФЛ	Куриное мясо Молоко	солимер с молекулярными отпечатками (19,5 мкм)	2 г 5 мл	1,0-2,3 мкг/л	-	-	3-12	[131]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Куриное мясо, рыба, молоко	полимер с молекулярными отпечатками	5 г	0,38-0,72 мкг/кг	-	-	1-7	[132]
	Ципрофлоксацин	ВЭЖХ-УФ	Сыворотка и плазма крови, твердые лекарственные формы	полимер с молекулярными отпечатками	4 мл/0,1-0,2 г	0,023-0,033 мкг/л	-	159-163	1-7	[133]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча, сыворотка и плазма крови, твердые лекарственные формы	нанокompозит на основе металлоорганических каркасных структур	0,15 мл/5 мл/0,5 г	0,03-0,05 мкг/кг	-	343-416	1-5	[134]
	НПВС	ГХ-ПИД	Моча	диоксид титана, сшитый с многослойными углеродными нанотрубками (20 мкм)	3 мл	0,03-0,07 мкг/л	-	-	5-9	[135]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-МС	Мёд	монолитный полимер на основе муконовой кислоты и этилендиметакрилата	2 г	7,3-17,1 нг/кг	-	31-82	4-10	[136]
Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Мёд	монолитный полимер на основе метакриловой кислоты и триметилпропантриметакрилата	30 мл	10,6-15,5 мкг/л	-	-	2-7	[137]	

Продолжение таблицы 3

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Сорбент/материал покрытия (масса сорбента/толщина покрытия)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
ВТФМЭ	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-МС	Мёд	монолитный полимер на основе 4-винилбензойной и 4-винилфенилбороновой кислот и дивинилбензола	2 г	0,31-2,3 нг/л	-	-	1-10	[138]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Моча	полипиррольный полимер с молекулярными отпечатками	15 мл	0,5-1,9 мкг/л	-	-	3-7	[139]
ТТФМЭ	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	оксид титана (IV)	10 мл	0,2-2,0 мкг/л	-	16-21	5-7	[140]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча и плазма крови	наночастицы оксида кобальта (II,III)	10 мл	0,2-1,3 мкг/л	70-87	105-169	4-6	[141]
	Диклофенак	ВЭЖХ-УФ	Моча и плазма крови	никелевая фольга, модифицированная нановолокнами оксида никеля и наночастицами оксида кобальта (II,III)	10 мл	0,15 мкг/л	-	-	4-5	[142]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Молоко, яйца	полисульфон с включениями полимеров с молекулярными отпечатками (10 мкм)	10 мл	0,9-1,5 мкг/л	-	-	1-10	[143]
	Диклофенак	ВЭЖХ-УФ	Моча и плазма крови	композит оксида графена и слоистого двойного гидроксида магния (II) и алюминия (III)	10 мл	0,14 мкг/л	-	-	7	[144]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча и плазма крови	оксид графена	10 мл	0,04-0,25 мкг/л	-	-	3-5	[145]
	НПВС	ВЭЖХ-МС	Моча	полимерная имидазолиевая ионная жидкость	1,5 мл	3,8-15,7 мкг/л	-	-	1-13	[146]
СМЭ-ВМ	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Куриные мясо и печень	композит оксида графена и полиэтиленгликоля	2 г	0,5-1,9 мкг/л	-	42-66	6-9	[147]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Молоко	полиэтиленгликоль	1 мл	17 мкг/кг	12-16	-	<8	[148]
ТФМЭ-НП	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Яйца	октилсиликагель и сильнокислотный катионит	0,5 г	-	-	-	<10	[149]
	Улифлоксацин	ВЭЖХ-УФ	Моча и плазма крови	октадецилсиликагель (4 мг)	0,05 мл	7 мкг/л	-	-	1-4	[150]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	октадецилсиликагель	5 мл	1-16 мкг/л	-	-	1-9	[151]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Яйца	монолитный полимер на основе метакриловой кислоты и этиленгликольметакрилата	1 г	8,8-11,2 мкг/кг	-	-	<8	[152]

Продолжение таблицы 3

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Сорбент/материал покрытия (масса сорбента/толщина покрытия)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
ТФМЭ-НП	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-МС	Молоко, яйца	монолитный полимер на основе метакриловой кислоты и этиленгликольметакрилата	0,5 мл/0,5 г	0,5-9,8 мкг/кг	26-98	5-20	1-10	[153]
	Сульфаниламиды	КЭ-УФ	Куриное мясо		1,5 г	3,5-16,7 мкг/кг	-	-	<13	[154]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко	силикагель, модифицированный восстановленным оксидом графена (7 мг)	5 мл	0,05-0,95 мкг/л	-	-	<19	[155]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	оксид графена, функционализированный порфирином (12 мг)	5 мл	0,5-2,0 мкг/л	29-59	5-10	<10	[156]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	слоистый двойной гидроксид никеля (II) и железа (III) (8 мг)	2,25 мл	1-10 мкг/л	-	-	<7	[157]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Кровь	композит слоистый двойной гидроксид никеля (II) и железа (III) с полиамидным волокном	1 мл	15-25 мкг/л	-	4	3-8	[158]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	кора пробкового дуба (5 мг)	5 мл	1,5-3 мкг/л	-	-	<7	[159]
ДТФМЭ	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко	силикагель, модифицированный аминами и карбоксигруппами (30 мг)	4 мл	0,7-3,5 мкг/л	>90	-	2-5	[160]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Куриное мясо	нанокompозиты на основе металлоорганических каркасных структур	1 г	0,2-0,6 мкг/кг	-	18-37	6-10	[161]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-МС/МС	Молоко		2 мл	0,012-0,145 мкг/л	-	-	1-3	[162]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча и плазма крови	нанокompозит многослойных углеродных нанотрубок и слоистого двойного гидроксида цинка (II) и алюминия (III) (8 мг)	5 мл	0,1-0,2 мкг/л	65-74	161-184	6-8	[163]
М-ДТФМЭ	Офлоксацин	Флуориметрия	Моча, плазма крови	магнетит, покрытый мезопористым кремнеземом	0,5 мл	0,21 мкг/л	-	-	<3	[164]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Молоко, яйца, куриное мясо	композит графена и магнетита (5 мг)	2 г	0,05-0,3 мкг/кг	-	68-79	5-12	[165]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Молоко	композит бентонита и магнетита (2 мг)	5 мл	0,1 мкг/л	-	119-125	4-8	[166]

Окончание таблицы 3

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Сорбент/материал покрытия (масса сорбента/толщина покрытия)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
М-ДТФМЭ	Тетрациклины	Хемилюминесцентный анализ	Молоко	магнетит, модифицированный кремнеземом и оксидом цинка (12 мг)	10 мл	0,17 мкг/л	88	-	6-7	[167]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко	магнетит, модифицированный кремнеземом и оксидом графена (10 мг)	4 мл	1,8-2,7 мкг/л	-	667	<8	[168]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Сыворотка крови	магнетит, покрытый ПАВ (10 мг)	0,25 мл	30-80 мкг/л	-	-	1-6	[169]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Свинина, куриное мясо, мясо креветок	магнетит, покрытый ковалентно- и металлоорганическими каркасными структурами (10 мг)	6 г	0,1-0,5 мкг/л	-	-	<4	[170]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Молоко, куриное мясо	магнитные многослойные углеродные нанотрубки с привитыми тиольными группами (20 мг)	10 мл	0,02-1,5 мкг/л	-	-	<6	[171]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-МС/МС	Куриное мясо	композит магнетита и полимера с молекулярными отпечатками в виде наноклея (15 мг)	10 г	0,005-0,03 мкг/кг	-	-	2-7	[172]
	Диклофенак	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма крови	магнетит, покрытый декановой кислотой (10 мг)	1,5-2,5 мл	1,5 мкг/л	-	64-77	5-9	[173]
ТФМЭ-УМ	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Молоко, куриное мясо	сополимер метакриловой кислоты и этиленгликоль-диметакрилата (20 мг)	0,5-1 г	0,38-0,62 мкг/л	-	-	3-14	[174]
	Диклофенак	Спектрофотометрия	Моча, плазма крови	полимер с молекулярными отпечатками, содержащий многослойные углеродные нанотрубки	25 мл	0,7 мкг/л	-	96-137	<4	[175]

ВТФМЭ – волоконная твердофазная микроэкстракция

ТТФМЭ – тонкослойная твердофазная микроэкстракция

СМЭ-ВМ – сорбционная микроэкстракция на вкладыше магнитной мешалки

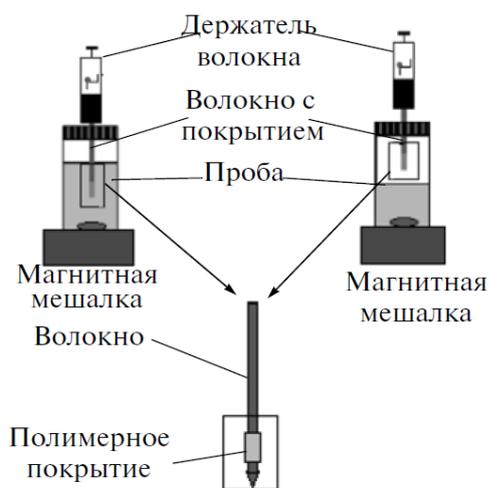
ТФМЭ-НП – твердофазная микроэкстракция в набивном патроне

ДТФМЭ – дисперсионная твердофазная микроэкстракция

М-ДТФМЭ – магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция

ТФМЭ-УМ – твердофазная микроэкстракция с упаковкой сорбента внутрь мембраны

Одним из вариантов является *волоконная твердофазная микроэкстракция* (рисунок 9), которая включает иммобилизацию полимерной фазы на поверхности стержня из стали, кварца или стекла либо получение монолитных сорбентов в виде стержней [176, 177]. Для извлечения антибактериальных и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ нашли применение покрытия из полиметилсилоксана [126], а также сополимеров дивинилбензола с полиметилсилоксаном [127, 128] и N-винилпирролидоном [129]. Также предложено проводить силанизацию поверхности стержня и модифицировать ее полимерами с молекулярными отпечатками, которые имеют полости, комплементарные целевым анализам, для повышения селективности. Такой подход нашел применение для анализа продуктов животного происхождения (органы и ткани курицы и рыбы, молоко [130-132]), а также биологических жидкостей (сыворотка и плазма крови) и твердых лекарственных форм [133]. Золь-гель технология позволяет получать покрытия нанокомпозитов на основе металлоорганических каркасных структур [134] или диоксида титана, сшитого с многослойными углеродными нанотрубками с помощью полиэтиленгликолевых звеньев [135], которые обеспечивают эффективную сорбцию диклофенака, напроксена, ибупрофена и налидиксовой кислоты из проб мочи и лекарственных препаратов. В первом случае коэффициенты концентрирования варьировались от



**Рисунок 9** – Схема осуществления волоконной твердофазной микроэкстракции [122]

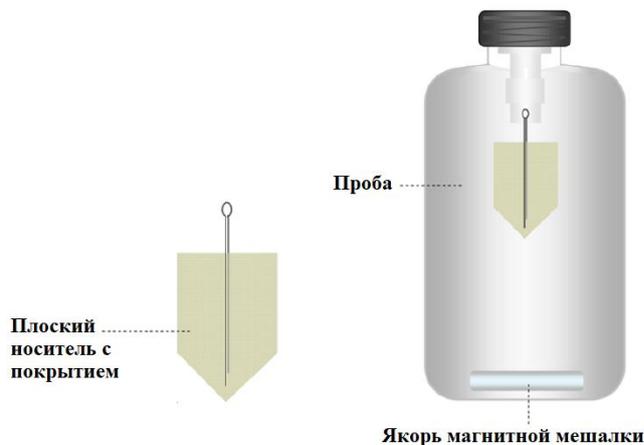
343 для ибупрофена до 416 для напроксена. Для второго сорбента волоконная твердофазная микроэкстракция была совмещена с двухфазной мембранной жидкостной микроэкстракцией путем погружения волокна внутрь импрегнированной и заполненной фазой экстрагента мембраны в виде полого капилляра. После завершения извлечения органическую фазу удаляли с поверхности покрытия фильтровальной бумагой и проводили термодесорбцию с последующим анализом

методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Несмотря на более высокую сложность модификации по сравнению с классическими полимерами, такие покрытия оправдывают себя с точки зрения улучшения сорбционных свойств за счет возможности варьирования в широких пределах их состава и морфологии. Те же преимущества сохраняются и для монолитных сорбентов, которые к тому же обладают большей сорбционной емкостью. Для их синтеза смесь реагентов помещают в капилляр, где при нагревании происходит полимеризация, после чего часть капилляра удаляют для получения доступной для сорбции поверхности. При хроматографическом определении тетрациклинов и сульфаниламидов в меде пригодными оказались монолитные полимеры, для которых в качестве функциональных мономеров использовали муконовую [136], метакриловую кислоты [137] и смесь 4-винилбензойной и 4-винилфенилбороновой кислот [138], а в роли сшивающих агентов – дивинилбензол [138], его смесь с этилендиметакрилатом [136] либо триметилпропантриметакрилат [137].

Для повышения эффективности экстракции интерес представляют токопроводящие полимерные покрытия. Например, в работе [139] пленку полипиррольного полимера с молекулярными отпечатками получали на платиновой проволоке, предварительно покрытой многослойными углеродными нанотрубками путем электроосаждения для стабилизации полимерной пленки. Далее модифицированную проволоку использовали как рабочий электрод в трехэлектродной ячейке. При наложении разности потенциалов анионные формы аналитов мигрировали из водной фазы к положительно заряженному полимерному покрытию. Описанная схема была реализована для ВЭЖХ-УФ определения фторхинолонов в пробах мочи. Пределы обнаружения находились в интервале от 0,5 до 1,9 мкг/л.

В *тонкослойной твердофазной микроэкстракции* сорбционное покрытие наносят на плоский носитель (обычно квадратной формы) для уменьшения толщины слоя сорбента при сохранении его объема и увеличении общей площади контакта фаз, благодаря чему извлечение протекает в несколько раз быстрее, чем

в волоконном варианте (рисунок 10, [178, 179]). Металлическая фольга или пена являются удобными субстратами для нанесения наноструктур и пористых материалов, в том числе электроосаждением. Так, на поверхности алюминиевой фольги получали мезопористые покрытия оксида титана [140] и нанолисты оксида кобальта (II,III) [141]. Никелевую фольгу последовательно модифицировали нановолокнами оксида никеля и нанолистами оксида кобальта (II,III) [142]. После сорбции нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ из проб плазмы крови и мочи на данных сорбентах

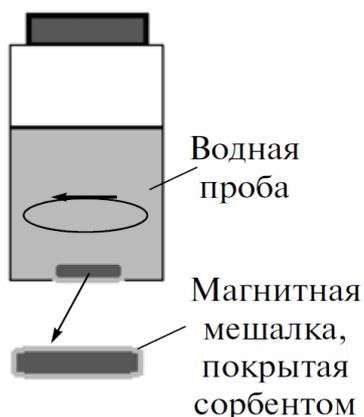


**Рисунок 10** – Схема осуществления тонкослойной твердофазной микроэкстракции [180]

проводили их определение методом ВЭЖХ-УФ. Нанолисты оксида кобальта (II, III) обеспечивали наиболее высокие коэффициенты концентрирования (от 105 до 169). Модификация поверхности губчатого никеля пленкой из полисульфона с включениями полимеров с молекулярными отпечатками обеспечивает селективное извлечение фторхинолонов из проб молока и яиц [143]. Показано, что сульфаниламиды не сорбируются полученным покрытием, в то время как для фторхинолонов наблюдается более чем 50-кратное концентрирование. Носители также представлены целлюлозными и синтетическими полимерными материалами. Например, композит оксида графена и слоистого двойного гидроксида магния (II) и алюминия (III) был инкорпорирован внутрь матрицы поливинилиденфторида [144] и хлопка [145], а пористую структуру фильтровальной бумаги модифицировали полимерной имидазолиевой ионной жидкостью [146], гидрофобность которой регулировалась природой противоиона. Так, ацетат-ион обуславливает гидрофильные свойства поверхности, а гексафторфосфат-ион – гидрофобные.

проводили их определение методом ВЭЖХ-УФ. Нанолисты оксида кобальта (II, III) обеспечивали наиболее высокие коэффициенты концентрирования (от 105 до 169). Модификация поверхности губчатого никеля пленкой из полисульфона с включениями полимеров с молекулярными отпечатками обеспечивает селективное извлечение фторхинолонов из проб молока и яиц

Перемешивание играет важную роль в сорбционных процессах, обеспечивая постоянное поступление целевого вещества в диффузионный слой сорбента. Обычно сорбент находится в неподвижном состоянии, а перемешивание происходит в водной фазе. Для интенсификации массопереноса и уменьшения времени, необходимого для достижения равновесия в системе, была предложена *сорбционная микроэкстракция на вкладыше магнитной мешалки* (рисунок 11), которая предполагает вращение носителя фазы сорбента в магнитном поле в объеме раствора пробы за счет установленного внутри металлического стержня [181, 182]. Для ВЭЖХ-ФЛ определения фторхинолонов в органах и тканях животного происхождения металлический стержень запаивали внутрь стеклянного капилляра, который затем покрывали композитом оксида графена и полиэтиленгликоля [147].



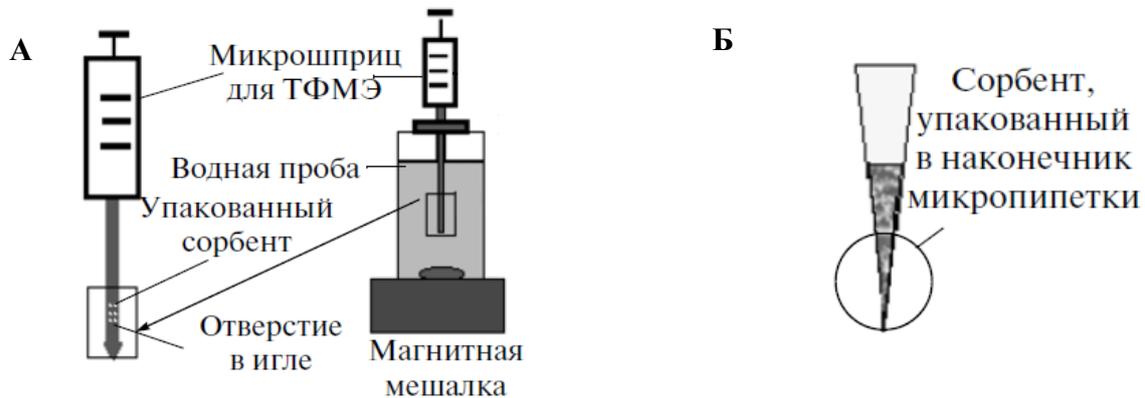
**Рисунок 11** – Схема осуществления сорбционной микроэкстракции на вкладыше магнитной мешалки [122]

В работе [148] различные полимерные покрытия наносили на хлопковую основу с помощью золь-гель технологии, помещали внутрь стальной стержень и вводили в полипропиленовую мембрану в виде полого капилляра. После запайки обоих концов сорбент был готов к использованию. Покрытие на основе полиэтиленгликоля показало наилучшие результаты при извлечении сульфаниламидов из проб молока (степени выделения от 12,1 до 15,6 %), хотя при экстракции из водных растворов полидиметилсилоксановое покрытие превосходило остальные по сорбционным свойствам (степени выделения от 21,4 до 52,2 %), что показывает его несовместимость с матрицей образца.

Логичным следствием проблемы замедленности массопереноса в статических вариантах твердофазной микроэкстракции является развитие динамических способов ее проведения, в которых слой сорбента неподвижен, а водная фаза направленно перемещается относительно него. В этом направлении

**проточная твердофазная микроэкстракция** представляет собой классический подход, основанный на применении металлических, кварцевых или полимерных трубок (капилляров), заполненных монолитным или дисперсным сорбентом либо покрытых изнутри полимерной пленкой [183, 184]. Во время сорбции поток пробы пропускают через капилляр для выделения аналитов, после чего их элюируют и направляют элюат на анализ. Такие схемы практически всегда автоматизированы путем коммутации колонки с многоходовым краном системы ВЭЖХ или КЭ с различными вариантами детектирования и будут подробно рассмотрены далее в разделе 1.2.3. Для **твердофазной микроэкстракции в набивном патроне**, также реализуемой в динамическом варианте, иглу микрошприца заполняют сорбентом (0,5-1 мг, рисунок 12А) либо помещают его (5-15 мг, рисунок 12Б) непосредственно в шприц или наконечник микродозатора между слоями инертного материала (полипропилен, хлопок, стекловата), после чего однократно или многократно отбирают и сбрасывают раствор пробы с последующим элюированием [185, 186]. В первом случае используются коммерчески доступные иглы, содержащие силикагель с привитыми октильными [149] и октадецильными [150, 151] группами. В нескольких работах [152-154] для выделения сульфаниламидов из продуктов животного происхождения описано получение монолитного сорбента на основе метакриловой кислоты и этиленгликольдиметакрилата. Во втором случае процедура упаковки сорбента является более простой и открывает больше возможностей для выбора сорбента. Для извлечения тетрациклинов из проб молока применяли силикагель, модифицированный восстановленным оксидом графена [155], а для экстракции диклофенака, кеторолака и мелоксикама из проб мочи – оксид графена, функционализированный порфирином [156]. Слоистый двойной гидроксид никеля (II) и железа (III) [157], в том числе в составе композита с полиамидным волокном [158], характеризуется высокой пористостью и наличием ионообменных групп, что обеспечивает смешанный характер сорбции. Определенный интерес представляют также биodeградируемые и дешевые материалы, например, измельченная кора пробкового дуба [159]. Такие сорбенты

нашли применение для ВЭЖХ-УФ определения нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ в пробах мочи и крови.



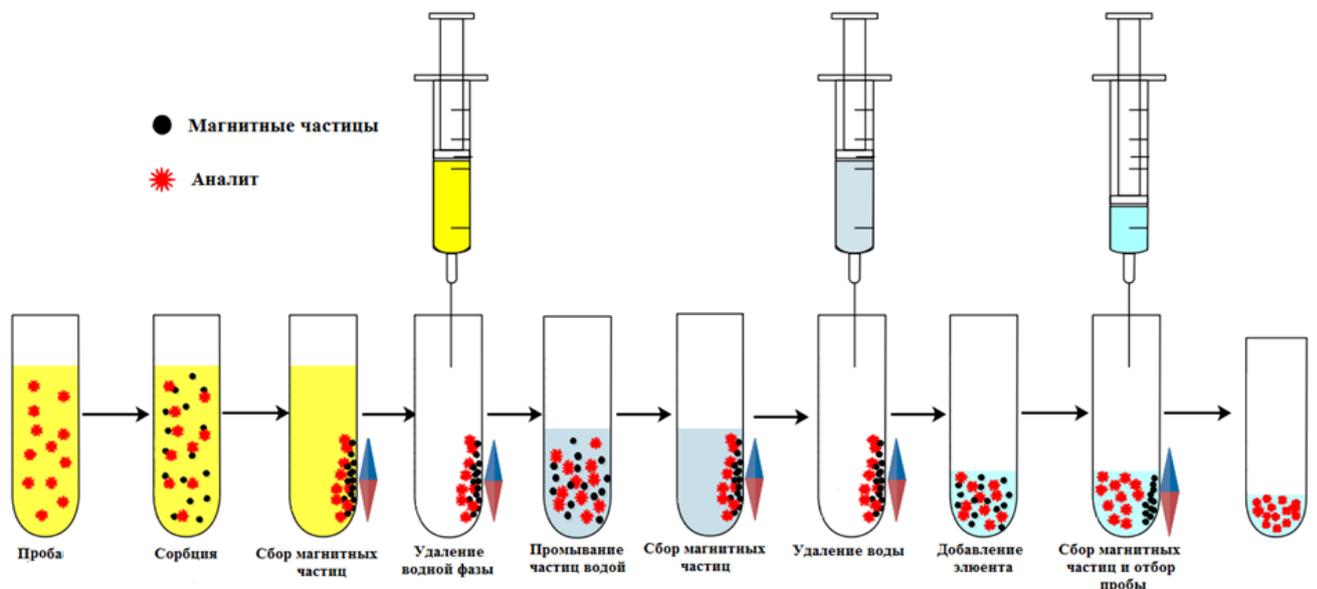
**Рисунок 12** – Схема осуществления твердофазной микроэкстракции в набивном патроне: варианты упаковки сорбента в шприц (А) и наконечник (Б) [122]

В отличие от рассмотренных ранее подходов **дисперсионная твердофазная микроэкстракция** предполагает диспергирование наночастиц сорбента (масса навески 2–20 мг) в растворе пробы [187, 188]. Развитая поверхность наночастиц, их высокая сорбционная емкость и равномерное распределение по всему объему раствора при перемешивании обеспечивает быструю (2–15 мин) и эффективную сорбцию аналитов. Иногда извлечение проводят в ультразвуковом поле для дополнительного ускорения массопереноса [164]. К недостаткам метода относится склонность частиц к агломерации, что негативно влияет на степени извлечения. Основным способом повышения агломерационной устойчивости состоит в модификации поверхности наночастиц либо синтезе композитных материалов. Более того, это позволяет регулировать селективность, смачиваемость и улучшать сорбционно-десорбционные характеристики. Так, для извлечения тетрациклинов из ацетонитрильных экстрактов проб молока были изучены различные модифицированные силикагели и полимерные материалы [160]. Было обнаружено, что силикагели, имеющие на поверхности полярные амино- и карбоксигруппы, показали наилучшие результаты (степени извлечения выше 90 %), что может объясняться ионообменным механизмом сорбции и образованием водородных связей, учитывая многообразие функциональных групп в молекулах аналитов. Для сорбции тетрациклинов и сульфаниламидов предложены нанокompозитные сорбенты на основе металлоорганических каркасных структур

[161, 162], которые в первом случае являлись ядром для нанесения полимера с молекулярными отпечатками, а во втором случае – оболочкой наночастиц оксида графена. S. Arghavani-Beydokhti совместно с коллегами синтезировал нанокompозит многослойных углеродных нанотрубок и слоистого двойного гидроксида цинка (II) и алюминия (III), обладающий выраженными сорбционными свойствами по отношению к сульфаниламидам [163]. После экстракции смесь отбирали в шприц и пропускали через фильтр с наноразмерными порами для отделения сорбента. Основные свойства двойного гидроксида позволяли элюировать аналиты раствором сильной органической кислоты вместе с неорганической составляющей сорбента. Для дополнительного концентрирования данная схема была совмещена с дисперсионной жидкостной микроэкстракцией в ундекан-1-ол в ультразвуковом поле. Разделение фаз осуществлялось на колонке, заполненной хлоридом натрия, с последующей кристаллизацией органической фазы. Таким образом, стадия центрифугирования была полностью исключена. Коэффициенты концентрирования варьировались от 161 до 184.

Удобным решением проблемы фазового разделения является применение ферромагнитных наночастиц, чаще всего на основе магнетита, которые быстро отделяются от водной фазы под действием внешнего магнитного поля (рисунок 13, [189, 190]). В большинстве случаев проводится модификация поверхности наночастиц магнетита или получение магнитных композитных материалов с целью повышения стабильности и задания сорбенту требуемых свойств, обеспечивающих связывание аналита. Для выделения фторхинолонов поверхность покрывали слоем мезопористого кремнезема [164], функционализированного аминогруппами, а также получали композитные сорбенты, включающие графен [165] и бентонит (гидроалюмосиликат) [166]. В случае тетрациклинов модификацию проводили послойно – сначала кремнеземом, а затем оксидом цинка [167] или оксидом графена, ковалентно связанным с бета-циклодекстрином [168]. Также в научной группе проф. А.В. Булатова была продемонстрирована возможность прямой модификации магнитных наночастиц

катионными, анионными и неионогенными поверхностно-активными веществами, способствующими сорбции за счет гидрофобных взаимодействий с аналитами [169]. Такой подход позволил сократить длительность получения покрытия до 10 мин, тогда как ранее предложенные схемы требуют для этого до 36 ч. Для сорбции сульфаниламидов помимо последовательного покрытия ковалентно- и металлорганическими каркасными структурами [170], а также получения магнитных многослойных углеродных нанотрубок с привитыми тиольными группами [171], был реализован синтез наноколец сложной структуры [172]: наночастицы магнетита встраивались в структуру полимера с молекулярными отпечатками кольцеобразной формы. Модификация поверхности сорбента может происходить и в динамическом режиме. Например, для извлечения диклофенака применяли наночастицы магнетита, покрытые декановой кислотой, с последующим введением в пробу добавки цетилтриметиламмония бромида, который сорбировался на границе раздела фаз за счет своих поверхностно-активных свойств и образовывал ион-парные ассоциаты с аналитами [173]. Коэффициент концентрирования составил 77.



**Рисунок 13** – Схема осуществления магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции [169]

В редких случаях дисперсный сорбент помещают внутрь полипропиленовой мембраны для защиты от воздействия твердых компонентов суспензий и

выделения сорбента из раствора пробы без центрифугирования и внешнего магнитного поля. В работе [174] полимерные частицы (сополимер метакриловой кислоты и этиленгликольдиметакрилата) упаковывали в мембранный квадратный конверт для выделения сульфаниламидов из молока и тканей курицы в ультразвуковом поле. Альтернативный вариант предполагал *in situ* формирование гелевой структуры полимера с молекулярными отпечатками, содержащего многослойные углеродные нанотрубки, внутри мембраны в виде полого капилляра [175]. Данная схема применена для спектрофотометрического определения диклофенака в пробах мочи и плазмы крови с предконцентрированием до 137 раз.

### **1.2.3 Автоматизация жидкостной и твердофазной микроэкстракции для определения фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ**

Наряду с миниатюризацией фармацевтического анализа актуальной задачей является его частичная или полная автоматизация. Благодаря этому удается улучшить его прецизионность и повысить экспрессность, снизить трудозатраты и вероятность ошибок из-за человеческого фактора. Универсальным решением в этой области является автоматизация на принципах проточных методов, которые позволяют достаточно свободно выбирать конфигурацию гидравлической схемы, подстраивая ее под поставленную аналитическую задачу [191-194]. Микрофлюидные платформы имеют более узкую направленность и применяются для миниатюризации и автоматизации мембранной жидкостной микроэкстракции в динамическом режиме [195]. В некоторых случаях производится модификация узлов ввода пробы аналитического оборудования. Так, автоматизированная проточная твердофазная микроэкстракция реализуется посредством установки сорбционной колонки вместо петли инжектора [183]. В таблице 4 приведены основные аналитические и метрологические характеристики автоматизированных схем, рассматриваемых в данном разделе.

**Таблица 4** – Аналитические и метрологические характеристики автоматизированных схем, включающих жидкостную и твердофазную микроэкстракцию фторхинолонов, тетрациклинов, сульфаниламидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)/ Сорбент или полимер (масса сорбента или полимера)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
КМЭ	Сульфаниламиды Фторхинолоны	ВЭЖХ-МС/МС	Водные среды	смесь дихлорметана и этилацетата (<90)	8 мл	15 мкг/л 35 мкг/л	-	12-18 9-11	4-8	[196]
ДЖМЭ	Офлоксацин	ВЭЖХ-ФЛ	Куриное мясо	дихлорметан (200)	1 г	0,7 мкг/л	-	-	2-7	[197]
ММЭ	Тетрациклин	ВЭЖХ-УФ	Моча	1-октиламин (50)	1 мл	0,17 мг/л	90	18	4-8	[99]
МЖМЭ	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Молоко	октан-1-ол	3 мл	0,95-3,6 мкг/л	-	-	<8	[48]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	дигексильный эфир	6,4 мл	1,6-4,3 мкг/л	-	43-97	-	[49]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Моча	октан-1-ол	0,01 мл	0,09-0,11 мг/л	35-62	-	<6	[198]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	дигексильный эфир	0,41 мл	0,7-8,5 мкг/л	45-95	9-20	1-2	[199]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Слюна	дигексильный эфир	0,5 мл	-	-	75	<2	[200]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	октан-1-ол (0,005 мл)	0,0075 мл	0,5-2,3 мг/л	52-77	-	<7	[201]
ПТФМЭ	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Плазма крови	полимер на основе гидрофильного ГЭР и этилендиметакрилата	2 мл	0,01-0,05 мкг/л	-	98-103	<4	[202]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Моча	магнетит, покрытый додецилсульфатом натрия	-	0,01-0,05 мкг/л	-	-	<5	[203]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча, сыворотка крови	стальные частицы, покрытые пленкой полипиррола	20 мл	0,02-0,04 мкг/л	-	-	3-5	[204]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Плазма крови	углеродные волокна, покрытые поли(3,4-этилендиокситиофеном)	20 мл	0,05 мкг/л	-	317-710	2-5	[205]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча и плазма крови	углеродные волокна, покрытые нановолокнами целлюлозы	-	1-2,4 мкг/л	-	194-210	10-11	[206]
	Сульфаниламиды Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Свиная печень, куриное мясо	полимер с молекулярными отпечатками	10 г	0,02-0,11 мкг/л	-	69-136	<7	[207]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ ВЭЖХ-ФЛ	Яйца	монолитный полимер на основе метакриловой кислоты и этиленгликольметакрилата	1 г	0,1-2,6 мкг/кг	75-94	68-85	<7	[208]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Рыба		1 г	16-30 мкг/кг	29-76	-	<4	[209]
	Сульфаниламиды	КЭ-УФ	Куриное мясо		1,5 г	3,5-16,7 мкг/кг	-	-	<13	[154]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Молоко	монолитный сорбент на основе силикагеля	1 мл	1-3 мкг/л	-	8-20	<12	[210]

Окончание таблицы 4

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)/ Сорбент или полимер (масса сорбента или полимера)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	Повторяемость, %	Ссылка
ВТФМЭ	Фторхинолоны	ВЭЖХ-УФ	Моча	сополимер полидиметилсилоксана и дивинилбензола	5 мл	0,12-0,17 мкг/л	-	-	<1	[127]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-ФЛ	Куриное мясо Молоко	полимер с молекулярными отпечатками (19,5 мкм)	2 г 5 мл	1,0-2,3 мкг/л	-	-	3-12	[131]
	НПВС Сульфаниламиды Фторхинолоны Тетрациклины	ВЭЖХ-МС	Куриное мясо	сополимер дивинилбензола и N-винилпирролидона	2 г	1-20 мкг/кг	-	-	1-34	[129]
СМЭ-ВМ	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	политетрафторэтилен, модифицированный октадецильными и сульфоновыми группами	10 мл	0,02-0,04 мг/л	-	15-18	3-6	[211]
М-ДТФМЭ	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛ	Детское питание	ферромагнитные наночастицы	0,15 г	1,5-3 мкг/л	75-80	-	5-8	[212]

КМЭ - капельная микроэкстракция

ДЖМЭ - дисперсионная жидкостная микроэкстракция

ММЭ – мицеллярная микроэкстракция

МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция

ПТФМЭ – проточная твердофазная микроэкстракция

ВТФМЭ – волоконная твердофазная микроэкстракция

СМЭ-ВМ – сорбционная микроэкстракция на вкладыше магнитной мешалки

М-ДТФМЭ – магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция

В фармацевтическом анализе, особенно при выполнении производственного контроля качества, широкое распространение получили роботизированные системы, которые применяются для количественного определения лекарственных веществ в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах после их автоматизированной пробоподготовки, а также для изучения растворимости и однородности лекарственных средств [213-215]. Такие системы предполагают полную автоматизацию процесса от отбора пробы до анализа полученного раствора методами спектрофотометрии [216, 217], флуориметрии [218], ВЭЖХ-УФ [219, 220] и ВЭЖХ-МС/МС [221]. Частично роботизация коснулась и микроэкстракционных методов выделения лекарственных веществ [129, 196]. Преимуществом роботизированного подхода является возможность точного воспроизведения стадий пробоподготовки стационарных схем. К недостаткам относятся громоздкость и высокая стоимость. Ведущим производителем роботизированного оборудования для фармацевтического анализа является швейцарская компания «Sotax AG», которая выпускает приборы Zymark APW и TPW для анализа фармацевтических субстанций и твердых лекарственных форм соответственно [222]. В случае Zymark APW (рисунок 14А) автоматический порошковый дозатор помещает навеску пробы в предварительно взвешенную на встроенных весах пробирку, которая затем повторно взвешивается для определения массы навески. Далее с помощью шприцевого насоса в пробирку подается определенный объем растворителя и проба растворяется при перемешивании на вихревой мешалке либо при помощи ультразвукового зонда, после чего система позволяет провести фильтрацию раствора и последовательное разбавление для последующего спектрофотометрического или хроматографического определения лекарственных веществ (рисунок 14Б).

В схему Zymark TPW в отличие от предыдущего прибора включен погружной гомогенизатор, снабженный набором вращающихся лезвий. В экстракционную ячейку прокачивается определенный объем растворителя (рисунок 15А) и помещается проба (например, таблетки или капсулы) путем переворачивания пробирки. Масса пробы и растворителя измеряется при помощи

встроенных весов. При необходимости выдерживается пауза для предварительного смачивания пробы и осуществляется ее диспергирование (рисунок 15Б). Полученная суспензия пропускается через фильтр, а фильтрат разбавляется с последующим перемешиванием на вихревой мешалке и анализом подходящим методом [322, 325] (Рисунок 15В).



Рисунок 14 – Внешний вид прибора Zymark APW (А) и цикл его работы (Б) [222]

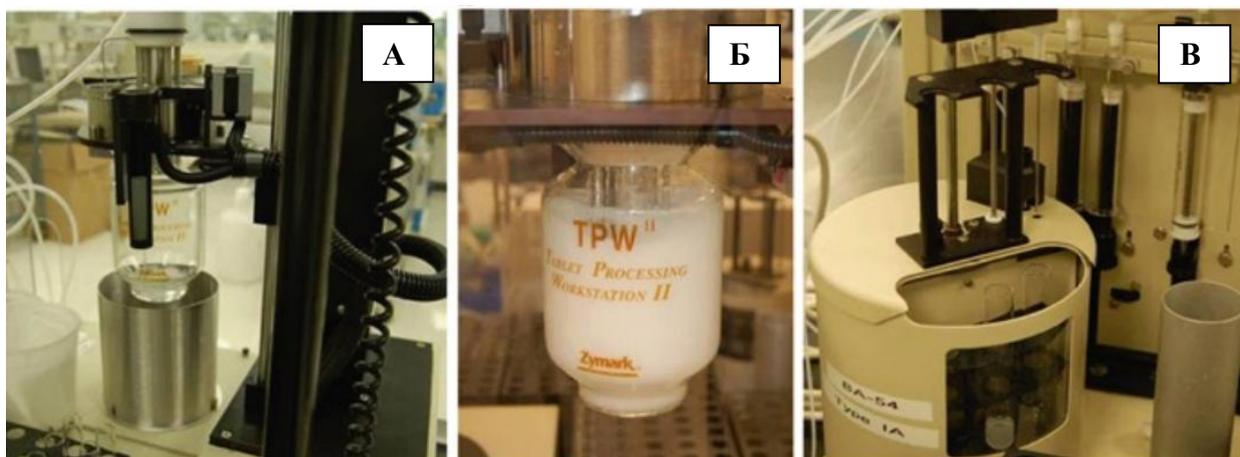
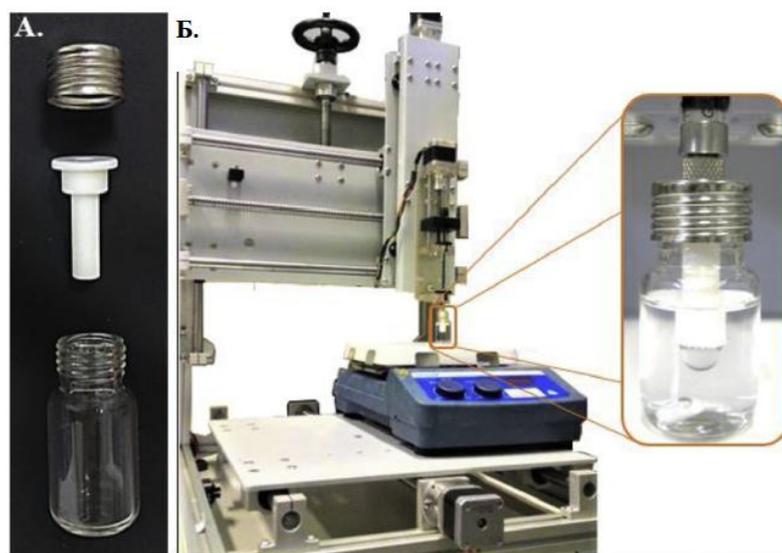


Рисунок 15 – Основные этапы роботизированной пробоподготовки с помощью прибора Zymark TPW: добавление растворителя и внесение пробы (А), диспергирование пробы (Б) и разбавление (В) [222]

Для частичной автоматизации *капельной микроэкстракции* была предложена роботизированная схема, выполняющая четыре последовательные операции с помощью шприцевого насоса: отбор экстрагента; его ввод в специальную насадку из политетрафторэтилена (рисунок 16А), установленную во флакон с образцом, для создания капли в верхней части раствора; отбор экстракта

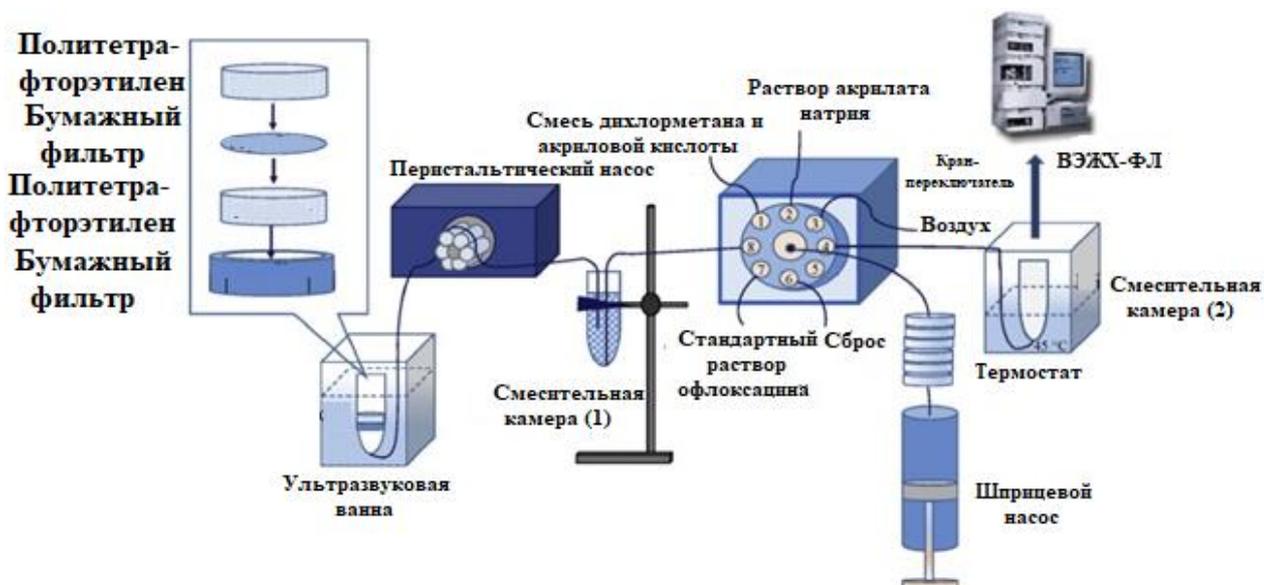
и его сброс в вialу [196]. Предварительная подготовка флакона с пробой, контроль перемешивания и стадия замены растворителя проводится в ручном режиме. Применение насадки позволяет получать устойчивые капли большого объема (до 90 мкл) для более быстрого извлечения за счет большей площади контакта фаз (рисунок 16Б). Преимуществом схемы является возможность проводить экстракцию в динамическом режиме для ускорения массопереноса, когда капля периодически отбирается и возвращается обратно в раствор, что трудно реализуемо без привлечения автоматизированных систем. По сравнению со статическим режимом в этом случае экстракция протекает значительно быстрее. Среди недостатков можно отметить наличие выполняемых вручную операций и узкий круг решаемых задач, высокую стоимость оборудования и его громоздкость. Разработанная схема была применена для ВЭЖХ-УФ определения фторхинолонов и сульфаниламидов в водных средах. В рамках данной установки можно реализовать анализ лекарственных препаратов и биологических жидкостей.



**Рисунок 16** – Схема изготовленной в лаборатории роботизированной установки для капельной жидкостной микроэкстракции: введение политетрафторэтиленовой насадки во флакон с образцом (А) и общий вид (Б) [196]

Для автоматизации микроэкстракционных методов широкими возможностями обладает циклический инъекционный анализ, предложенный А.В. Мозжухиным, А.Л. Москвиным и проф. Л.Н. Москвиным в 2007 году [223],

концепция которого реализована в докторской диссертации проф. А.В. Булатова [224-226]. Наличие смесительной камеры, позволяющей перемешивать реакционную или экстракционную смесь потоком воздуха, обеспечивает оптимальные условия для реализации как жидкостной, так и твердофазной микроэкстракции. Также, благодаря тому, что смесительная камера сообщается с атмосферой, стала возможной автоматизация **дисперсионной жидкостной микроэкстракции** в варианте диспергирования экстрагента газовой фазой. Впервые такой подход был предложен в группе проф. А.В. Булатова для спектрофотометрического определения антипирина в пробах слюны [227]. На принципах циклического инъекционного анализа была автоматизирована схема дисперсионной жидкостной микроэкстракции для последующего ВЭЖХ-ФЛ определения офлоксацина в пробах куриного мяса [197]. Гидравлическая схема проточной системы представлена на рисунке 17. Изначально в полимерный картридж на фильтр из спеченного порошка политетрафторэтилена помещали навеску пробы, добавляли щелочной раствор сульфата натрия и проводили жидкостно-твердофазную экстракцию аналита в ультразвуковом поле. Затем экстракт перекачивали в смесительную камеру (1), при этом взвешенные частицы оставались на фильтре. Далее посредством шприцевого насоса в удерживающую спираль отбирали смесь дихлорметана и акриловой кислоты и вводили в пробу, после чего таким же образом осуществляли перемешивание воздухом. Растворение акриловой кислоты в щелочной среде способствовало эффективному диспергированию экстрагента с образованием эмульсии. В это время в термостатируемую при 45 °С смесительную камеру (2) посредством шприцевого насоса и удерживающей спирали подавали раствор акрилата натрия, а далее – фазу экстрагента после разделения фаз. После подачи воздуха осуществлялась замена растворителя за счет испарения дихлорметана и водную фазу перекачивали в хроматографическую виалу для анализа.

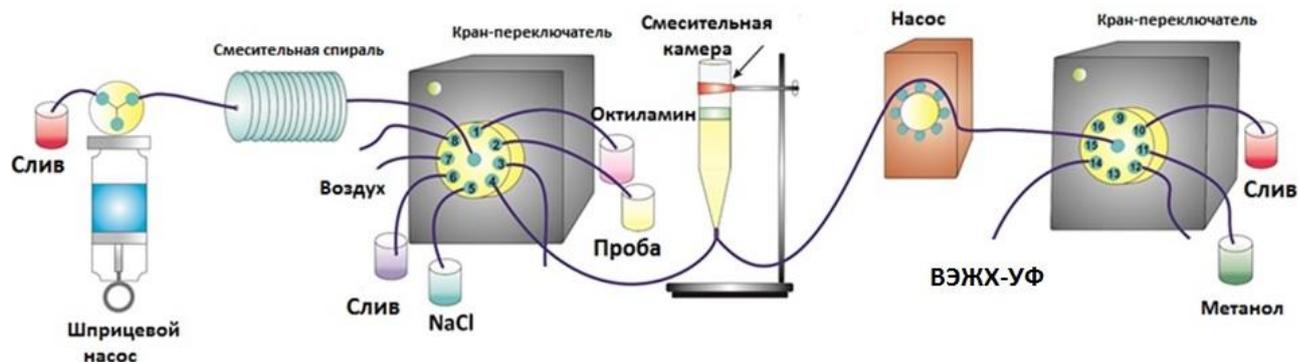


**Рисунок 17** – Гидравлическая схема дисперсионной жидкостной микроэкстракции в условиях циклического инъекционного анализа [197]

Предложенная экстракционная система включала акриловую кислоту в качестве диспергатора. Ее преимуществом перед традиционно применяемыми полярными органическими растворителями (ацетонитрил, метанол) является способность растворяться в щелочной среде образца с образованием акрилата натрия, благодаря чему обеспечивается быстрое разделение фаз. Ограничениями предложенной схемы является невозможность выделения аналитов, способных к ионизации в щелочной среде, и необходимость подготовки одноразовых картриджей. Предел обнаружения составил 0,7 мкг/л.

Для автоматизации *мицеллярной микроэкстракции* тетрациклина из проб мочи была разработана гидравлическая схема проточной системы на принципах циклического инъекционного анализа ([99], рисунок 18). На первом этапе с помощью шприцевого насоса в смесительную спираль последовательно отбирались *n*-октиламин и проба, образуя изотропный раствор в ходе продвижения по ней. Полученный раствор направлялся в смесительную камеру, после чего таким же образом в нее вводился раствор хлорида натрия. После перемешивания смеси газовой фазой с помощью перистальтического насоса система становилась двухфазной. Затем происходило фазовое разделение и фазу, обедненную ПАВ, направляли на сброс. Экстракт разбавляли метанолом при перемешивании газовой фазой и прокачивали в хроматографическую вилу для

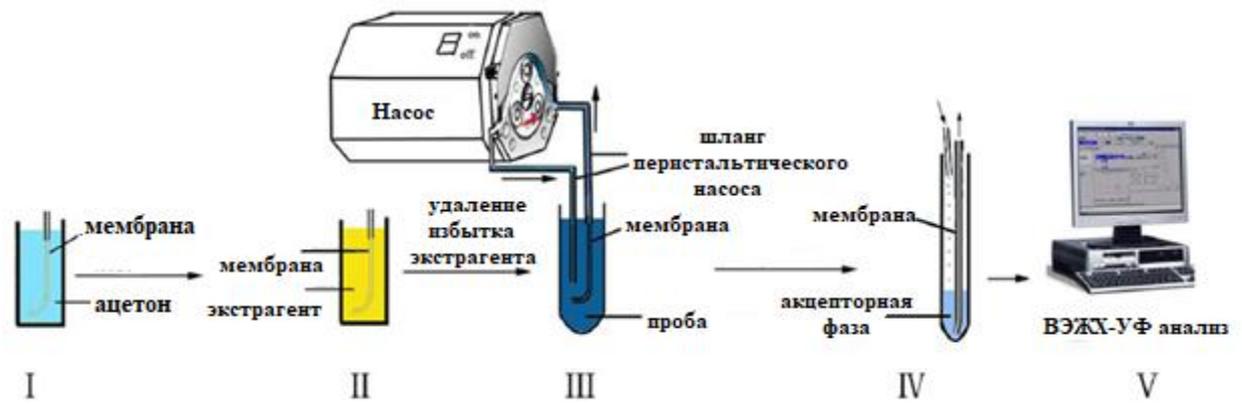
последующего ВЭЖХ-УФ анализа. Степень извлечения тетрациклина составила 90 %.



**Рисунок 18** – Гидравлическая схема мицеллярной микроэкстракции в условиях циклического инъекционного анализа [99]

**Мембранную жидкостную микроэкстракцию** наиболее часто автоматизируют в трехфазном динамическом варианте. В данном случае появляется вероятность многократного использования импрегнированной мембраны, что исключает стадию ее ручной замены, а легкость создания потоков водных сред позволяет проводить экстракцию в динамическом режиме.

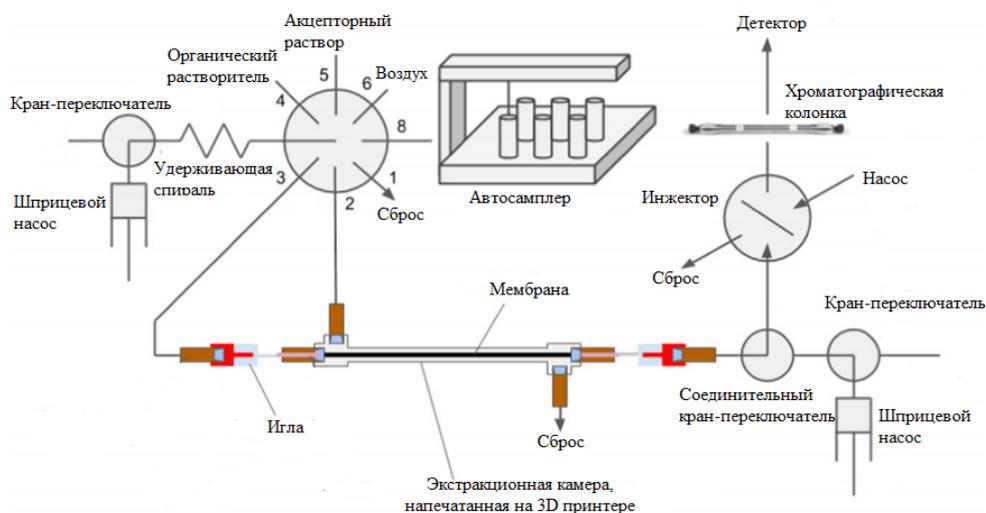
Мембраны в виде полого капилляра имеют удобную форму для пропускания растворов через их внутренний канал. Например, в полуавтоматизированной схеме, изображенной на рисунке 19, проводилась последовательная циркуляция донорного (III) и акцепторного (IV) растворов посредством перистальтического насоса [48]. Подготовку мембраны (промывка ацетоном (I), импрегнирование экстрагентом (II)) проводили в ультразвуковом поле для лучшего проникновения растворителей в ее поры. Предложенное решение является достаточно простым, но оставляет большое количество ручных процедур. Данный подход нашел применение для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в молоке (V). Стоит отметить, что перед анализом не было необходимости удаления белков и жиров, производилось только пятикратное разбавление пробы, что является несомненным достоинством схемы. Тем не менее, из-за сложности анализируемой матрицы мембрана является одноразовой.



**Рисунок 19** – Схема полуавтоматизированной трехфазной динамической мембранной микроэкстракции: I – промывка мембраны ацетоном, II – импрегнирование мембраны октаноном с добавкой метилтриоктиламмония хлорида, III – экстракция тетрациклинов из донорного раствора, IV – реэкстракция аналитов в акцепторный раствор ортофосфорной кислоты, V – ВЭЖХ-УФ анализ [48]

Полностью автоматизированная схема на принципах проточного анализа была предложена С. Worawit и др. (рисунок 20, [49]). Многофазовая мембрана в виде полого капилляра, модифицированная углеродными нановолокнами, помещалась в экстракционную ячейку, изготовленную методом 3D печати. Сначала в удерживающую спираль посредством шприцевого насоса последовательно отбирались акцепторный водно-метанольный раствор гидроксида натрия и экстрагент (дигексиловый эфир) с воздушным зазором между ними. При прохождении зон внутри полой мембраны осуществлялось ее импрегнирование экстрагентом в режиме остановленного потока и дальнейшее заполнение канала акцепторным раствором. Затем перпендикулярно по отношению к мембране с внешней ее стороны порционно подавался донорный раствор пробы (моча). После извлечения с целью нейтрализации попеременным прокачиванием экстракта и подкисленного метанола с помощью двух шприцевых насосов создавался условно сегментированный поток по направлению к петле инжектора хроматографической системы. Когда нейтрализованный экстракт попадал в петлю, происходил его ввод в колонку для ВЭЖХ-УФ определения кетопрофена, диклофенака и ибупрофена. Коэффициенты концентрирования варьировались от 43 до 97. К преимуществам предложенной схемы можно отнести полную автоматизацию с синхронизацией циклов жидкостной

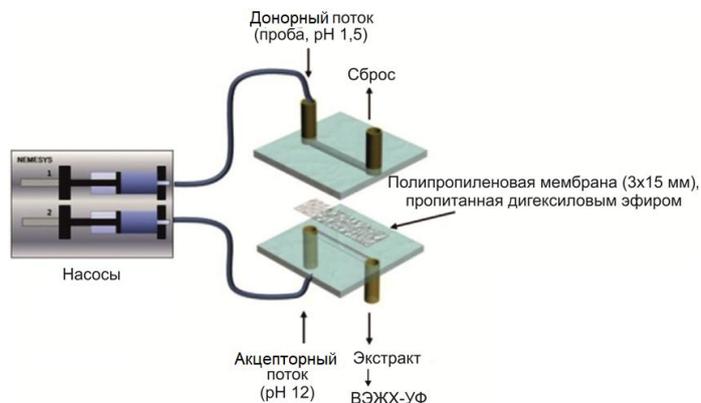
микроэкстракции и хроматографического анализа, а также многократное использование мембраны без ее замены.



**Рисунок 20** – Гидравлическая схема автоматизированного ВЭЖХ-УФ определения нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ, включающая трехфазную динамическую мембранную микроэкстракцию [49]

Микрофлюидные платформы позволяют осуществить миниатюризацию мембранной жидкостной микроэкстракции и ее автоматизацию при простом аппаратном оформлении (рисунок 21). Экстракционная ячейка представляет собой две соединенные винтами пластины из полиметилметакрилата, на внутренней стороне которых в центральной части расположены каналы глубиной 60-120 мкм и шириной 2-3 мм для потоков донорного и акцепторного растворов, создаваемых шприцевыми насосами. Между пластинами располагается плоская полипропиленовая мембрана, импрегнированная экстрагентом, а массоперенос обеспечивается градиентом pH. Такой подход помогает добиться рекордно низкого расхода образца (до 7 мкл) и быстрого протекания процесса (5-20 мин). Для достижения высоких коэффициентов концентрирования извлечение проводится в режиме остановленного потока акцепторного раствора. Напротив, при одновременной подаче обоих потоков достигается наибольшая эффективность экстракции вплоть до близкой 100 %. Недостаток подхода заключается в необходимости периодической замены импрегнированной мембраны вручную. Аналитические возможности платформ такого типа были продемонстрированы при ВЭЖХ-УФ определении фторхинолонов [198] и

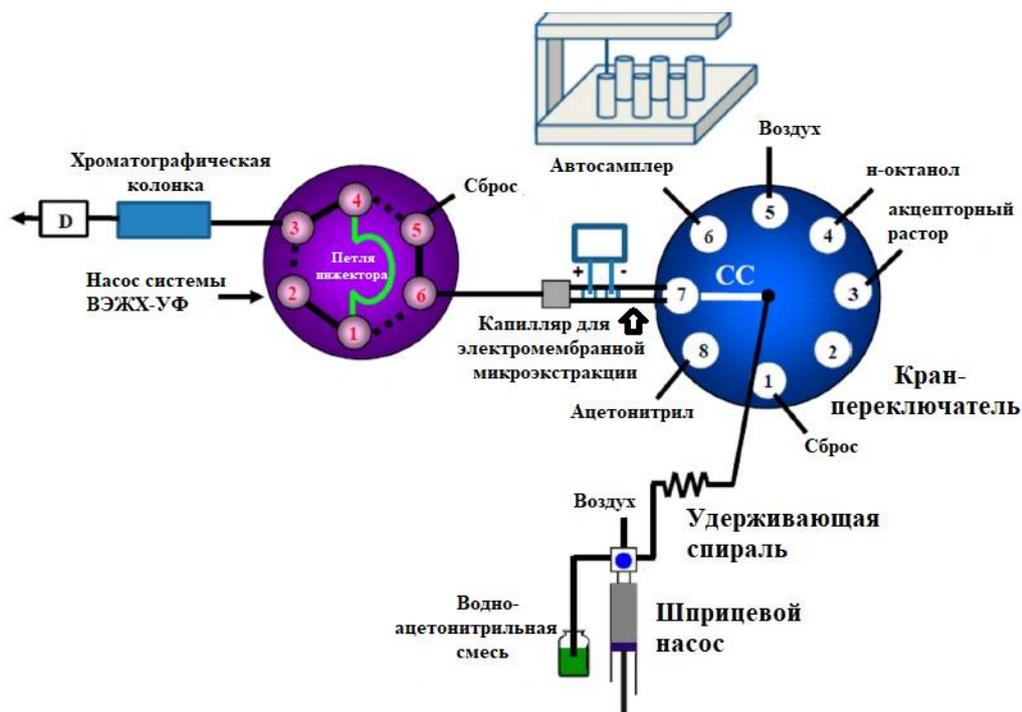
нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ [199, 200] в пробах биологических жидкостей (моча, слюна). Наибольший коэффициент концентрирования среди предложенных схем составил 75.



**Рисунок 21** – Гидравлическая схема трехфазной жидкостной мембранной микроэкстракции с применением микрофлюидной платформы [200]

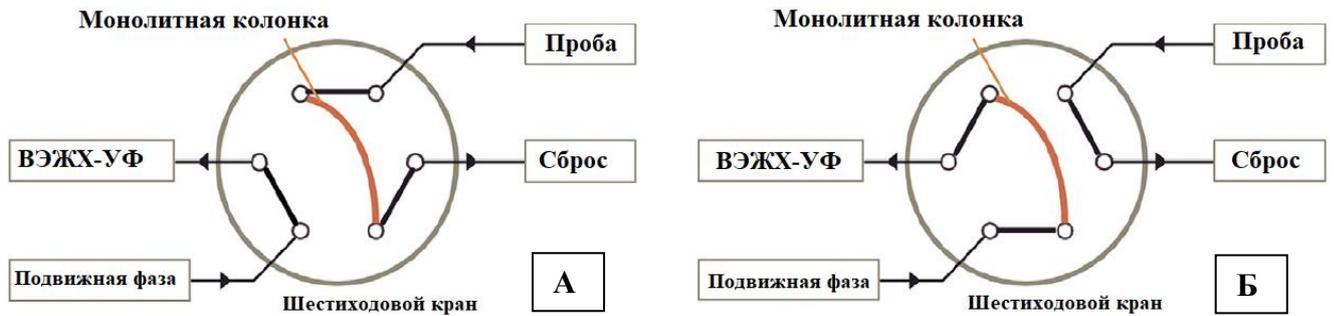
Необычный подход к автоматизации электромембранной жидкостной микроэкстракции на принципах проточного анализа разработал E.J. Carrasco-Correa совместно с коллегами [201]. С помощью шприцевого насоса и удерживающей спирали в прозрачный капилляр, изготовленный из сополимера тетрафторэтилена и гексафторпропилена, последовательно по отдельности подаются микролитровые объемы акцепторного раствора, экстрагента и донорного раствора (рисунок 22). По существу зона экстрагента в капилляре выступает в качестве своеобразной «мембраны», что является особенностью схемы. В зонах акцепторного и донорного раствора располагаются электроды из платиновой проволоки для наложения разности потенциалов. После экстракции в статическом режиме содержимое капилляра отбирается в удерживающую спираль так, чтобы в капилляре осталось около 5 мкл экстракта, а остальное направляется на сброс. Затем экстракт в потоке водно-ацетонитрильной смеси попадает в петлю инжектора хроматографической системы. Преимуществами подхода помимо полной автоматизации являются низкий расход пробы, быстрая процедура извлечения (10 мин) и обновления фазы экстрагента после каждой пробы, что устраняет эффект памяти при анализе сложных по составу проб. Недостатком является разбавление экстракта более чем в 10 раз на заключительной стадии. В данной работе показана возможность проведения экстракции диклофенака,

кетопрофена, ибупрофена и напроксена из проб неразбавленной мочи для их последующего ВЭЖХ-УФ определения.



**Рисунок 22** – Гидравлическая схема для автоматизированного ВЭЖХ-УФ определения нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ, включающая электромембранную микроэкстракцию [201]

**Проточная твердофазная микроэкстракция** наиболее просто среди всех методов данной группы сочетается с системами ввода пробы гибридных методов анализа, что послужило активному внедрению такого подхода на практике. Обычно полимерные, кварцевые или стальные капилляры (колонки) покрывают изнутри слоем полимера, заполняют их дисперсным сорбентом/волокнами либо получают внутри монолитный материал *in situ*. Готовый капилляр, как правило, устанавливают вместо петли инжектора, соединенной с многоходовым краном системы ввода пробы жидкостного хроматографа, как показано на рисунке 23 [202, 207, 210]. После пропускания определенного объема образца посредством шприцевого или перистальтического насоса и сорбции аналитов проводят десорбцию подвижной фазой и направляют элюат в аналитическую колонку для хроматографического анализа. Иногда используют более сложные системы с дополнительными многоходовыми кранами и насосами [204, 208].



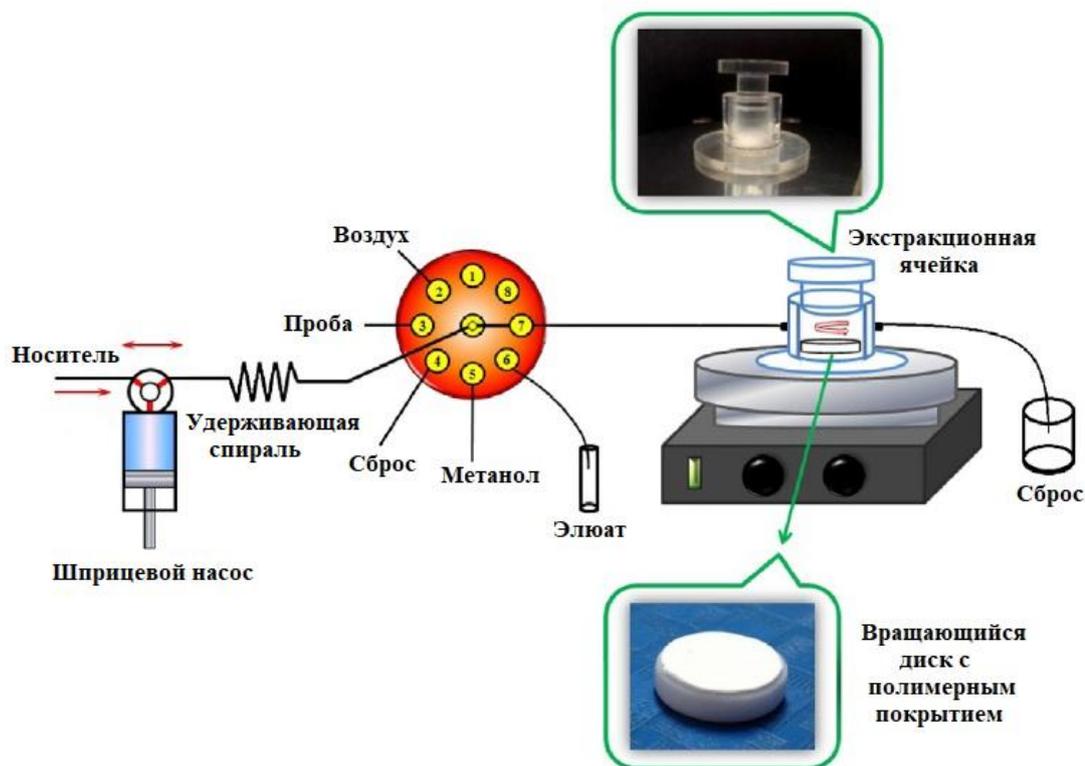
**Рисунок 23** – Общая схема автоматизированной проточной твердофазной: стадии сорбции (А) и десорбции (Б) [202]

Для выделения рассматриваемых антибактериальных и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ в варианте автоматизированной проточной твердофазной микроэкстракции был предложен ряд сорбентов и технических решений. Среди дисперсных материалов можно выделить магнитные наночастицы [203] и стальные частицы, покрытые пленкой полипиррола [204]. Первые удерживали в колонке с помощью магнитного поля, чтобы небольшое количество сорбента (10 мг) противостояло потоку жидкости. Вторые плотно упаковывали в стальную колонку, причем электрополимеризацию проводили *in situ*. Токопроводящие свойства полимера позволяли контролировать процессы сорбции/десорбции наложением разности потенциалов на две последовательно соединенные колонки: одна из них содержала немодифицированные стальные частицы, а вторая – модифицированные. Волокнистые сорбенты представлены углеродными волокнами, покрытыми поли(3,4-этилендиокситиофеном) [205], и нановолокнами целлюлозы [206]. В первом случае сорбция обуславливалась гидрофобными и электростатическими взаимодействиями, а также образованием водородных связей. Во втором случае предположительно реализовывался последний механизм. Монолитные сорбенты обеспечивают эффективную сорбцию на основе различных принципов: молекулярный импринтинг (полимеры с молекулярными отпечатками [207]), ионный обмен и гидрофобные взаимодействия (полимер на основе метакриловой кислоты и этилендиметакрилата [154, 208, 209], органоминеральный сорбент на основе кремнезема, содержащий октильные и сульфоновые группы [210]), а также

образование водородных связей (полимер на основе гидрофильного ГЭР и этилендиметакрилата [202]).

Термическая десорбция в испарителе газового хроматографа является удобным инструментом для упрощения процедуры **волоконной твердофазной микроэкстракции**. В случае же жидкостной хроматографии необходимо проведения отдельной стадии элюирования. В связи с этим предложено устанавливать вместо петли инжектора герметичную десорбционную камеру, в которую сверху вводится стержень с полимерным покрытием [127, 131]. Элюирование может проводиться в статическом или динамическом режиме. Для автоматизации всего микроэкстракционного процесса разработана роботизированная система, на манипуляторе которой устанавливается 96 стержней [129]. Кондиционирование, экстракция, промывка и десорбция осуществляется в отдельных экстракционных планшетах, помещенных на подвижные платформы для перемешивания. Полный цикл для пробоподготовки 96 образцов занимает около двух часов, что обеспечивает производительность около 50 проб в час. Недостатками являются громоздкость и высокая стоимость роботизированного оборудования.

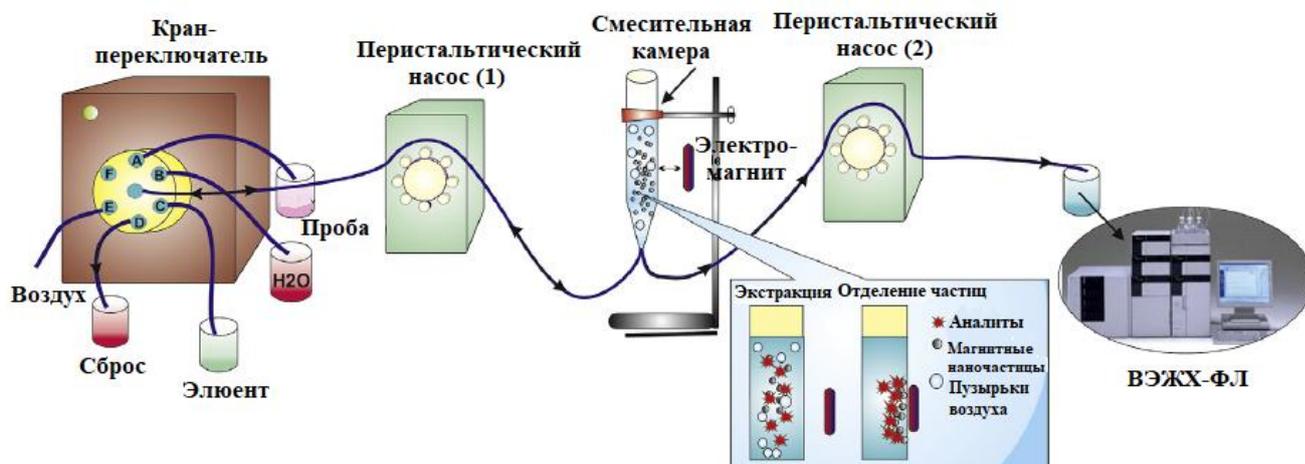
Для автоматизированного проведения **сорбционной микроэкстракции на вкладыше магнитной мешалки** предложена довольно простая схема проточной системы (рисунок 24, [211]). Проба и элюент отбираются в удерживающую спираль посредством шприцевого насоса для подачи в смесительную камеру. Тефлоновый диск с сорбционным полимерным покрытием, содержащим октадецильные и сульфоновые группы на поверхности, приводится в движение в магнитном поле за счет установленного внутри металлического стержня. Многократное использование диска (не менее 15 раз) делает систему достаточно автономной. Разработанная схема практически не обеспечивает концентрирования, поэтому элюат упаривают в токе азота и сухой остаток растворяют в метаноле перед анализом. Предложенная схема была применена для ВЭЖХ-УФ определения нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ в пробах мочи.



**Рисунок 24** – Гидравлическая схема сорбционной микроэкстракции на вкладыше магнитной мешалки в условиях проточного анализа [211]

Автоматизация *магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции* в кипящем слое была основана на принципах циклического инъекционного анализа [212]. На предварительном этапе фторхинолоны извлекали из детского питания в раствор соляной кислоты в ацетонитриле и помещали навеску ферромагнитных наночастиц в смесительную камеру. Затем, согласно схеме, приведенной на рисунке 25, полученный ацетонитрильный экстракт и деионизированную воду посредством перистальтического насоса (1) подавали в смесительную камеру и перемешивали потоком воздуха в течение 10 минут для сорбции аналитов в кипящем слое. Присутствие ацетонитрила способствовало смачиванию частиц водной фазой и обеспечивало более эффективное диспергирование сорбента. После завершения процесса сорбции активировался электромагнит, установленный сбоку смесительной камеры, и наночастицы удерживались на ее стенке, в то время как водная фаза направлялась на сброс. Далее в смесительную камеру подавали раствор гидроксида калия в метаноле в качестве элюента и при перемешивании в течение 5 минут проводили десорбцию, после чего элюат с помощью перистальтического насоса (2)

прокачивали в хроматографическую вials для ВЭЖХ-ФЛ анализа. Степени извлечения находились в промежутке от 75 до 80 %.



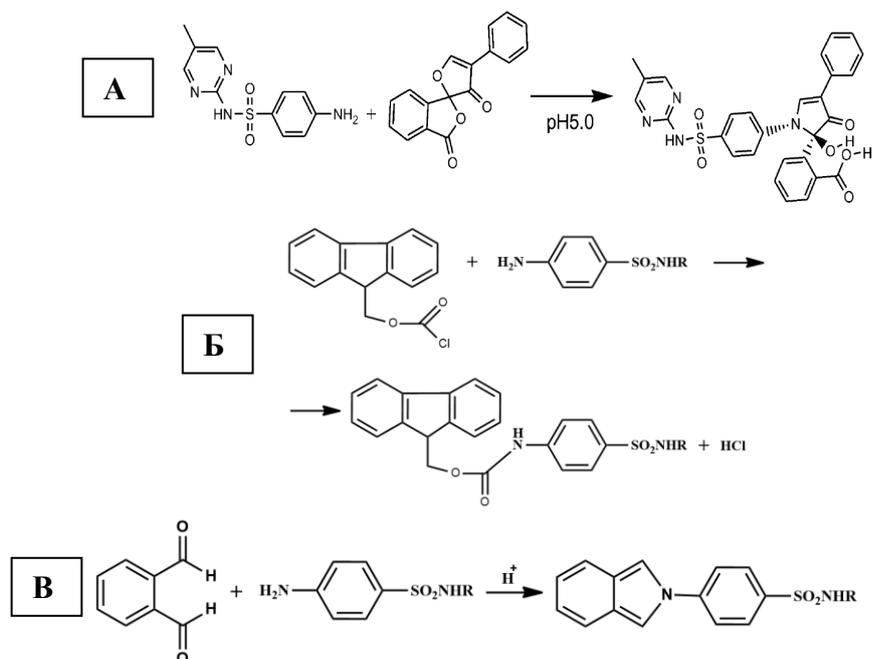
**Рисунок 25** – Гидравлическая схема дисперсионной твердофазной микроэкстракции в условиях циклического инъекционного анализа [212]

### 1.3 Основные методы определения фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ

Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации количественное определение лекарственных веществ в фармацевтических субстанциях или лекарственных формах чаще всего проводят с помощью титриметрических методов анализа, более редко – методами ВЭЖХ-УФ и спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра. Содержание ибупрофена и напроксена определяют алкалиметрически в среде метанола с визуальной индикацией конечной точки титрования в присутствии фенолфталеина [228, 229], а офлоксацина – потенциометрическим титрованием раствором хлорной кислоты в среде уксусной кислоты [9]. Для сульфаниламидов (сульфагуанидин, сульфадиметоксин, сульфадимидин (сульфаметазин), сульфаниламид и сульфациетамид натрия) реализуют метод нитритометрического титрования, в основе которого лежит реакция диазотирования, с потенциометрической или амперометрической индикацией конечной точки титрования [14, 230-233]. Также возможно применение внутренних (трапеолин

ОО, его смесь с метиленовым синим либо нейтральный красный) или внешних (йодкрахмальная бумага) индикаторов. ВЭЖХ-УФ определение проводят в случае ципрофлоксацина и его гидрохлорида [10, 11], тетрациклина [17] и кеторолака [234].

Для определения лекарственных веществ в биологических жидкостях и органах и тканях животного происхождения в аналитической практике широкое распространение получили гибридные методы анализа, такие как ВЭЖХ и КЭ с различными методами детектирования [235-238]. Наиболее универсальными с точки зрения определяемых веществ являются фотометрический и масс-спектрометрический детекторы. Первый из них лучше всего подходит для решения аналитических задач, не требующих высокой чувствительности и селективности, которые присущи второму, поэтому при анализе лекарственных препаратов и биологических жидкостей обычно используют фотометрические детектирование [238, 239], а анализ органов и тканей животного происхождения не всегда осуществим на уровне ниже предельно допустимых концентраций без возможностей масс-спектрометрии [240]. Флуориметрическое детектирование занимает промежуточное положение и особенно удобно при наличии собственной флуоресценции аналитов, как это наблюдается для фторхинолонов [241]. В остальных случаях требуется проведение пред- или постколоночной дериватизации, что удлиняет пробоподготовку либо требует внедрения дополнительных блоков в аналитическую систему. Для сульфаниламидов дериватизацию чаще всего проводят с флуорескамином (рисунок 26А, [242]) и 9-фторенилметоксикарбонилхлоридом (рисунок 26Б, [243]), реже – проводят реакцию с о-фталдиальдегидом с образованием производного изоиндола (рисунок 26В, [244]). Более простым способом является фотохимическая деструкция сульфаниламидов при облучении ультрафиолетовым излучением, в результате чего получают продукты распада, способные к флуоресценции [245]. В случае тетрациклинов в подвижную фазу вводят изначально или в постколоночном варианте соли магния (II) [246], кальция (II) [247] для образования флуоресцирующих комплексных соединений.

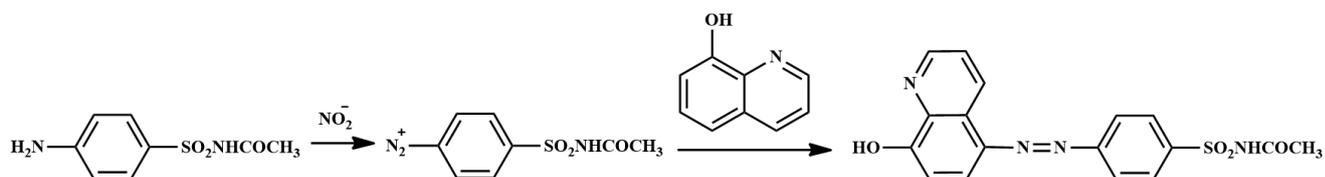


**Рисунок 26** – Дериватизация сульфаниламидов с флуорескамином (А), 9-фторенилметоксикарбонилхлоридом (Б) и о-фталдальдегидом (В)

Тонкослойная хроматография в основном применяется для подтверждения подлинности лекарственных средств, но позволяет проводить и количественное определение, особенно в высокоэффективном варианте и в сочетании с чувствительными методами детектирования (флуориметрия, масс-спектрометрия) [248].

Актуальными являются также спектральные методы анализа. Спектрофотометрия наиболее часто находит применение для анализа лекарственных препаратов и биологических жидкостей. При отсутствии компонентов, мешающих определению, и высоких концентрациях аналитов измерения проводят в ультрафиолетовой области, в то время как для более сложных задач необходимо получение производных, поглощающих в видимой области и обеспечивающих более высокие молярные коэффициенты светопоглощения. Фторхинолоны и тетрациклины способны образовывать окрашенные комплексные соединения с ионами переходных металлов (например, железа (III) [249], меди (II) [250], циркония (IV) [251]) и комплексы с переносом заряда с различными акцепторами электронов (хлораниловая кислота [252], 7,7,8,8-тетрацианохинодиметан [253]). Первые также образуют ион-парные ассоциаты с ксантеновыми [254] и сульфонфталеиновыми [255] красителями. Для

сульфаниламидов за счет наличия аминогруппы характерны реакции диазотирования и азосочетания с фенольными соединениями (8-оксихинолин [256], рисунок 27) или аминами (N-(1-нафтил)этилендиамин [257]). Для спектрофотометрического определения нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ проводят реакции окисления (азотной кислотой [258], гесационоферратом калия [259]), комплексообразования с ионами металлов [260], образования комплексов с переносом заряда [261] и получения ион-парных ассоциатов с различными группами красителей, например, триарилметановыми [262].



**Рисунок 27** – Реакции диазотирования и азосочетания сульфаниламидов

Спектрофлуориметрические методы являются более чувствительными и селективными, благодаря чему они сильнее ориентированы на анализ органов и тканей животного происхождения и биологических жидкостей, чем на контроль качества лекарственных препаратов. Фторхинолоны обладают собственной флуоресценцией, что обуславливает распространенность флуориметрии при определении данных веществ. Еще большей чувствительности в спектрофлуориметрическом анализе можно добиться путем реакций комплексообразования с различными ионами металлов, в особенности лантаноидов [263], и галогенпроизводными 1,4-бензохинона [264]. Для прочих рассматриваемых лекарственных веществ требуется проведение стадии дериватизации для получения флуоресцирующих производных, как описано выше для случая ВЭЖХ-ФЛ определения. В случае тетрациклинов и нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ также получают флуоресцирующие координационные соединения с ионами лантаноидов [265]. Для вторых известен и косвенный метод, основанный на их окислении в присутствии церия (IV) в кислой среде с последующим измерением флуоресценции церия (III) [266].

## Заключение

Определение лекарственных веществ в различных матрицах является актуальной задачей в современном мире. Аналитический контроль на фармацевтических производствах и персонализированная медицина представляют важные направления, в рамках которых находят применение методы химического анализа.

В обзоре литературы были представлены различные подходы к миниатюризации схем жидкостной и твердофазной экстракции с обсуждением их достоинств и недостатков. На основании представленной информации можно сделать вывод о значительном прогрессе, произошедшем в этой области в течение последних нескольких десятков лет. Тем не менее, постоянное появление новых научных идей приводит к внедрению неизвестных ранее экстракционных систем в практику микроэкстракционных методов и принципиально иных способов реализации процесса пробоподготовки. К тому же, каждый из вариантов жидкостной и твердофазной микроэкстракции до сих пор имеет нерешенные проблемы. В условиях значительной нагрузки на аналитические лаборатории и высокой сложности поставленных аналитических задач остро ощущается необходимость дальнейшего развития в области методов разделения и концентрирования. Одним из существенных направлений представляется разработка автоматизированных схем осуществления микроэкстракционных процессов, в том числе на принципах проточного анализа.

Экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью» являются относительно новым классом растворителей для жидкостной микроэкстракции из гомогенного раствора. Из этого следует, что круг таких экстрагентов ограничен и необходимо проводить поиск новых представителей данного класса. Кроме того, в литературе представлены лишь единичные работы по автоматизации экстракционных процессов с применением данных растворителей. Также эти растворители могут быть реализованы в других вариантах жидкостной микроэкстракции, например, мембранной.

Еще одним недостаточно развитым направлением остается микроэкстракция для скрининг-определения классов целевых аналитов. Потенциальная экспрессность обоих подходов позволяет повысить производительность схем анализа в целом.

## Глава 2 Методика экспериментальных исследований

### 2.1 Средства измерений и оборудование

1. Жидкостный хроматограф LC - 20 (Shimadzu, Япония) с фотометрическим (диодная матрица) и флуориметрическим детекторами.
2. Жидкостный хроматограф LC - 30 (Shimadzu, Япония) с тройным квадрупольным масс-селективным детектором LCMS-8030.
3. Электронные весы «Ohaus Pioneer PA214C» (Ohaus, Китай), 2-ой класс точности, предел взвешивания 210 г, погрешность 0,1 мг.
4. pH-метр pH-410 (ООО «Аквилон», Россия).
5. Перемешивающее устройство LOIP LS-120 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия).
6. Шестиходовой соленоидный кран-переключатель (Cole - Parmer, США).
7. Соленоидные микронасосы (Cole - Parmer, США).
8. Перистальтический насос «MasterFlex L/STM» (Cole - Parmer, США) (скорость потока от 0,5 до 6 мл/мин).
9. Шприцевой насос (Crison, Испания).
10. Циркуляционный термостат (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия).
11. Ванна ультразвуковая 2,8 л («Сапфир», Россия, Москва). Температурный диапазон от +15 °С до +70 °С. Точность поддержания температуры  $\pm 1$  °С.
12. Оптоволоконный спектрофотометр «USB 4000», (Ocean Optics, США), источник видимого света «LS-1» и оптический зонд с длиной оптического пути 10 мм (Expedeon, Великобритания).
13. Спектрофлуориметр RF-5301PC (Shimadzu, Япония), длина оптического пути 10 мм.
14. Хроматографическая колонка Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).
15. Центрифуга лабораторная ОПН-8 (Россия).
16. Шприц хроматографический вместимостью 100 мкл.

## 2.2 Реактивы и приготовление растворов

Все используемые в работе реактивы имели квалификацию не ниже ч.д.а.

### *Приготовление растворов аналитов*

В химический стакан помещали навеску аналита согласно таблице 5 и добавляли 10 мл раствора гидроксида натрия с концентрацией 0,01 моль/л (в случае тетрациклинов – метанола), перемешивали смесь до полного растворения вещества и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, промывая стаканчик тремя порциями раствора гидроксида натрия (в случае тетрациклинов – метанола) по 2 мл. Доводили объём раствора в колбе до метки раствором гидроксида натрия (в случае тетрациклинов – метанолом) и тщательно перемешивали. Рабочие растворы веществ готовили путём последовательного разбавления исходного раствора.

**Таблица 5** – Перечень аналитов и массы навесок

Наименование	Производитель	Масса навески, мг	Концентрация, г/л
Ломефлоксацина гидрохлорид	Sigma-Aldrich, США	27,6	1,0
Норфлоксацин		25,0	1,0
Флероксацин		25,0	1,0
Офлоксацин		25,0	1,0
Тетрациклин		50,0	2,0
Окситетрациклина гидрохлорид		54,0	2,0
Хлортетрациклин		50,0	2,0
Сульфадиазин		25,0	1,0
Сульфаметазин		50,0	2,0
Сульфаметоксазол		50,0	2,0
Сульфахиноксалин		25,0	1,0
Диклофенак натрия		538,0	20,0

### *Приготовление раствора триэтиламмония ацетата (1 моль/л)*

В химический стакан добавляли 7 мл триэтиламина, 43 мл деионизированной воды и 3,1 мл уксусной кислоты (>99%) и перемешивали смесь до достижения гомогенного состояния.

### *Приготовление раствора дигидрофосфата натрия (50 ммоль/л)*

В химический стакан помещали 3,9 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , добавляли 20 мл деионизированной воды и перемешивали смесь до полного растворения реагента. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл,

промывали стакан тремя порциями деионизированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали.

*Приготовление раствора гидрофосфата натрия (50 ммоль/л)*

В химический стакан помещали 3,55 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , добавляли 20 мл деионизированной воды и перемешивали смесь до полного растворения соли. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, промывали стакан тремя порциями деионизированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали.

*Приготовление фосфатного буферного раствора (pH 6,4, 20 ммоль/л триэтиламмония ацетата)*

В химический стакан вместимостью 500 мл добавляли 127,5 мл 50 ммоль/л раствора гидрофосфата натрия и 372,5 мл 50 ммоль/л дигидрофосфата натрия и перемешивали. pH контролировали с помощью pH-метра. Затем полученный раствор смешивали с раствором триэтиламмония ацетата (1 моль/л) в соотношении 98:2.

*Приготовление фосфатного буферного раствора (pH 8,0; 48,5 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )*

В химический стакан вместимостью 500 мл добавляли 485,0 мл 50 ммоль/л раствора гидрофосфата натрия и 15,0 мл 50 ммоль/л дигидрофосфата натрия и перемешивали. pH контролировали с помощью pH-метра.

*Приготовление аммиачно-формиатного буферного раствора (pH=4,0)*

В химический стакан помещали 480 мл деионизированной воды и 3,5 мл муравьиной кислоты, затем доводили значение pH до 4,0 с помощью pH-метра путем добавления концентрированного раствора аммиака (28 %). Содержимое стакана переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводили до метки деионизированной водой и перемешивали.

## **2.3 Пробоотбор и предварительная подготовка лекарственных препаратов, биологических жидкостей и тканей животного происхождения**

### *Пробоотбор и предварительная подготовка слюны*

Пробы слюны были отобраны у добровольцев с утра в полипропиленовые пробирки объемом 5 мл. За 10 минут до отбора полость рта ополаскивалась дистиллированной водой. К 1,9 мл отобранной пробы добавляли 0,1 мл раствора диклофенака с концентрацией 3,0, 6,0 или 15,0 г/л и перемешивали. Перед анализом образцы разбавляли в 50 раз дистиллированной водой.

### *Пробоотбор и предварительная подготовка мочи*

Пробы мочи отбирались добровольцами в полипропиленовые контейнеры с утра. При оценке фенотипа ацетилирования пробы отбирались через каждые 2 часа в течение 8 часов и объем мочи, отобранной в контейнер, определяли с помощью мерного цилиндра.

Перед определением офлоксацина к 4,8 мл пробы мочи добавляли 0,2 мл раствора аналита с концентрацией 250, 500 и 750 мг/л и разбавляли в 100 раз дистиллированной водой.

Перед определением тетрациклинов к 4,8 мл пробы мочи вводили 0,2 мл смешанного раствора аналитов с концентрацией каждого из них равной 25, 250 и 625 мг/л и добавляли 350 мкл 0,1 моль/л раствора сульфата цинка для осаждения мочевины. Затем центрифугировали в течение 3 мин при 5000 об./мин. и надосадочную жидкость пропускали через мембранный фильтр (0,45 мкм). 100 мкл фильтрата разбавляли дистиллированной водой в 10 раз и анализировали.

Перед определением сульфаниламидов с предварительным извлечением в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту к 4,8 пробы мочи добавляли 0,2 мл смешанного раствора аналитов с концентрацией каждого из них равной 125, 500 и 1000 мг/л доводили до рН 5,5 при помощи 1 моль/л раствора серной кислоты. Затем разбавляли в 20 раз раствором гидроксида натрия (0,4 моль/л) и пропускали через мембранный фильтр и анализировали. В пробы мочи, предназначенные для определения фенотипа ацетилирования, добавки аналитов не вводили.

*Пробоотбор и предварительная подготовка лекарственных препаратов*

Лекарственные препараты приобретали в аптеках, расположенных в г. Санкт-Петербург. Ампулы, флаконы и флаконы-капельницы с жидкими лекарственными формами перемешивали встряхиванием в течение 2 мин, отбирали необходимое количество пробы для анализа и разбавляли дистиллированной водой до требуемой концентрации. Перед извлечением сульфаниламидов в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту разбавление лекарственного препарата производили раствором гидроксида натрия (0,4 моль/л).

Твердые лекарственные формы подвергали измельчению и гомогенизации в фарфоровой ступке. При определении фторхинолонов в варианте мембранной микроэкстракции требуемую навеску гомогенизированного препарата напрямую отбирали для пробоподготовки, а в остальных случаях – предварительно экстрагировали лекарственные вещества из навески в 0,01 моль/л раствор гидроксида натрия в течение 10 минут, после чего надосадочную жидкость пропускали через мембранный фильтр (0,45 мкм) и фильтрат анализировали по разработанным схемам после нейтрализации 1 моль/л раствором серной кислоты.

*Пробоотбор и предварительная подготовка тканей животного происхождения и молока*

Пробы креветок и курицы, а также молоко различной жирности были куплены в супермаркете (г. Санкт-Петербург). Мышечная ткань курицы и креветки была отделена от органов и заморожена. Перед проведением анализа ткани размораживали при комнатной температуре, и излишки воды удаляли фильтровальной бумагой. Далее проводили измельчение в лабораторном гомогенизаторе и анализировали по разработанной схеме. Затем в предварительно взвешенный на весах химический стакан помещали 4,8 г гомогенизированной пробы и добавляли 0,2 г смешанного раствора аналитов с концентрацией каждого из них равной 2,50 или 3,75 мг/кг. Содержимое стакана перемешивали стеклянной палочкой в течение 20 минут.

Для подготовки молока отбирали навеску массой 1 г, добавляли 50 мкл этанола и 50 мкл 4 моль/л раствора соляной кислоты. Аналиты в протонированной форме переходили в водную фазу, в то время как белки денатурировали. После центрифугирования при 15000 об./мин в течение 3 мин 400 мкл надосадочной жидкости отбирали и смешивали со 100 мкл н-гексана для удаления жиров. Пробу центрифугировали в тех же условиях, водную фазу отбирали и разбавляли в 40 раз дистиллированной водой для последующего анализа. Для приготовления проб с добавками аналитов в предварительно взвешенный на весах стеклянный флакон вместимостью 25 мл помещали 9,8 г молока и вносили 0,2 г смешанного раствора аналитов с общей концентрацией 150, 1200 или 2250 мг/кг. Флакон перемешивали в течение 10 минут на перемешивающем устройстве. Дальнейшую подготовку проводили таким же образом, как и для проб без добавок.

## **2.4 Условия определения и микроэкстракционного выделения фторхинолонов, тетрациклинов, сульфаниламидов и диклофенака**

### **2.4.1 Условия хроматографического определения фторхинолонов, тетрациклинов и сульфаниламидов**

Разделение аналитов проводится на хроматографической колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).

#### *ВЭЖХ-ФЛ определение фторхинолонов*

Подвижная фаза состоит из фосфатного буферного раствора (pH=6,4, 12,8 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 37,2 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 ммоль/л триэтиламмония ацетата) и метанола в соотношении 55:45 (изократический режим). Скорость потока – 0,7 мл/мин. Длины волн возбуждения и эмиссии равны 278 и 466 нм соответственно. Общее время хроматографического анализа – 14 мин.

#### *ВЭЖХ-УФ определение тетрациклинов*

Подвижная фаза состоит из 0,5% раствора муравьиной кислоты (фаза А) и смеси ацетонитрила и метанола (2:1) (фаза Б). Элюирование осуществляется в градиентном режиме в соответствии с таблицей 6. Скорость потока – 0,75

мл/мин. Длина волны поглощения составляет 355 нм. Общее время хроматографического анализа – 20 мин.

**Таблица 6** – Режим градиентного элюирования для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов

Время, мин	Концентрация фазы Б, %
0	20
9	20
16	80
18	80
20	20

*ВЭЖХ-УФ определение сульфаниламидов в условиях их предварительного выделения в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту*

Подвижная фаза состоит из фосфатного буферного раствора (рН=8,0, 48,5 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (фаза А) и метанола (фаза Б). Элюирование осуществляется в градиентном режиме в соответствии с таблицей 7. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Длина волны поглощения составляет 263 нм. Общее время хроматографического анализа – 25 мин.

**Таблица 7** – Режим градиентного элюирования для ВЭЖХ-УФ определения сульфаниламидов в условиях их предварительного выделения в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту

Время, мин	Концентрация фазы Б, %
0	0
1	0
15	40
17	40
19	70
25	70
27	0

*ВЭЖХ-УФ определение сульфаниламидов в условиях их предварительного выделения в фазу ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот*

Подвижная фаза состоит из аммиачно-формиатного буферного раствора (рН=4, фаза А) и смеси ацетонитрила и метанола (2:1, фаза Б). Элюирование

осуществляется в градиентном режиме в соответствии с таблицей 8. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Длина волны поглощения составляет 263 нм. Общее время хроматографического анализа – 20 мин.

**Таблица 8** – Режим градиентного элюирования для ВЭЖХ-УФ определения сульфаниламидов в условиях их предварительного выделения в фазу ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот

Время, мин	Концентрация фазы Б, %
0	40
10	40
11	90
17	90
18	40
20	40

#### **2.4.2 Условия микроэкстракционного выделения фторхинолонов, сульфаниламидов и тетрациклинов для последующего хроматографического анализа**

*Автоматизированное ВЭЖХ-ФЛ определение офлоксацина в гомогенных растворах (лекарственные препараты, моча)*

Разработанная гидравлическая схема представлена в Главе 3. На первом этапе движением шприцевого насоса со скоростью 3 мл/мин в смесительную спираль длиной 80 см последовательно отбирается 300 мкл 2 моль/л раствора карбоната натрия (*a*), 1 мл пробы (*b*) и 50 мкл гексановой кислоты (*в*), после чего полученный гомогенный раствор прокачивается в смесительную камеру. Смесительная спираль промывается водой дважды по 200 мкл (3 мл/мин), в нее отбирается 300 мкл 2 моль/л раствора серной кислоты и подается в смесительную камеру. После фазового разделения водная фаза направляется на сброс, а к оставшейся органической фазе добавляется 450 мкл подвижной фазы и смесь перемешивается с помощью потока воздуха в течение 20 с (3 мл/мин) и направляется в автосамплер системы ВЭЖХ-ФЛ.

*ВЭЖХ-ФЛ определение фторхинолонов в суспендированных пробах (лекарственные препараты, ткани животного происхождения)*

Мембрану МФФК-0,25 (размер пор – 0,25 мкм) размером 10×10 мм импрегнируют 4 мкл нонановой кислоты, закрепляют на стальной игле и помещают в 3 мл водной суспензии пробы. Экстракцию проводят в течение 30 минут при перемешивании на орбитальном шейкере (200 об./мин) с последующим элюированием органической фазы 0,5 мл 1 моль/л водного раствора гидроксида калия в течение 1 мин при встряхивании вручную. Элюат нейтрализуют 2 мкл 10% водного раствора уксусной кислоты.

*ВЭЖХ-УФ определение тетрациклинов в лекарственных препаратах и моче*

К 1 мл раствора пробы добавляют 0,1 мл 3,2 моль/л водного раствора гексаноата натрия и помещают внутрь пористый мембранный диск диаметром 15 мм. После подкисления 20 мкл 6 моль/л водного раствора соляной кислоты органическую фазу выделяют на вращающийся в магнитном поле диск в течение 5 мин при 600 об./мин. Затем осуществляют элюирование 100 мкл метанола в течение 5 мин при вращении диска в другом флаконе с такой же скоростью.

*Автоматизированное ВЭЖХ-УФ определение сульфаниламидов в лекарственных препаратах и моче*

Разработанная гидравлическая схема представлена в Главе 3. Сначала в камеру шприцевого насоса последовательно отбираются 1,5 мл щелочного раствора пробы ( $C(\text{NaOH}) = 0,4$  моль/л), 175 мкл ди-(2-этилгексил)фосфорной кислоты и 1,5 мл щелочного раствора пробы ( $C(\text{NaOH}) = 0,4$  моль/л). Далее в течение 15 с осуществляется перемешивание с помощью магнитной мешалки и посредством шприцевого насоса отбирается 210 мкл раствора серной кислоты (3 моль/л) при перемешивании магнитной мешалкой. Затем магнитная мешалка останавливается и в течение 15 с происходит фазовое разделение. Водная фаза направляется на сброс, а органическая фаза – в хроматографическую виалу, содержащую 200 мкл метанола и находящуюся в автосамплере системы ВЭЖХ-УФ.

*ВЭЖХ-УФ определение сульфаниламидов в лекарственных препаратах*

К 10 мл пробы добавляют 0,5 мл щелочного водного раствора тимола и октановой кислоты (концентрации тимола и нонановой кислоты – 100 мг/л, концентрация гидроксида натрия – 2 моль/л) и перемешивают. Добавляют 170 мкл 3 моль/л раствора серной кислоты, перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при 5000 об./мин. Смесь 50 мкл органической фазы и 50 мкл смеси ацетонитрила и метанола (объемное отношение 2:1) перемешивают до гомогенного состояния.

**2.4.3 Условия автоматизированного хемилюминесцентного скрининг-определения фторхинолонов в биологических жидкостях с предварительным их выделением на ферромагнитных наночастицах**

*Микроэкстракционное выделение фторхинолонов*

Во флакон объемом 5 мл вносят 4 мл раствора пробы молока (рН=6), полученной в соответствии с разделом 2.3, 5 мг магнитных наночастиц и 0,1 мл ацетонитрила, после чего перемешивают в течение 10 мин на орбитальном шейкере (200 об./мин). Наночастицы отделяют от раствора с помощью внешнего магнита, промывают двумя порциями воды по 2 мл и проводят элюирование с помощью 300 мкл 5% раствора аммиака в метаноле при перемешивании на орбитальном шейкере (200 об./мин) в течение 2 мин. Затем наночастицы отделяют с помощью внешнего магнита, а элюат упаривают при 65 °С. Полученный сухой остаток растворяют в 250 мкл деионизированной воды.

*Хемилюминесцентное определение фторхинолонов*

Разработанная гидравлическая схема представлена в Главе 4. Для проведения анализа производится одновременный однократный ввод 50 мкл раствора пробы (насос 1) и смесей 10 мкл раствора церия(IV) (насос 2;  $10^{-3}$  моль/л) и 10 мкл раствора тербия(III) (насос 3;  $10^{-2}$  моль/л), а также 10 мкл раствора сульфита натрия (насос 4;  $0,7 \cdot 10^{-2}$  моль/л) и 10 мкл деионизированной воды (насос 5) с помощью соленоидных насосов и Y-образных разветвителей.

После смешения растворов проводится регистрация испускаемого излучения в режиме остановленного потока в форме пика в течение 12 с.

#### **2.4.4 Условия экстракционно-фотометрического определения диклофенака в лекарственных препаратах и слюне**

Разработанная гидравлическая схема представлена в Главе 5. Сначала 500 мкл пробы (50 мкл/с), 50 мкл 7 моль/л гидроксида натрия (10 мкл/с) и 50 мкл 0,05 моль/л гексацианоферрата(III) калия (10 мкл/с) последовательно отбираются в удерживающую спираль и направляются в смесительную камеру с помощью шприцевого насоса. В течение 10 с (200 мкл/с) происходит подача воздуха. Через 90 с в удерживающую спираль отбирается 600 мкл ацетонитрила (100 мкл/с) и подается в смесительную камеру посредством шприцевого насоса. После перемешивания смеси воздухом (10 с, 200 мкл/с) и паузы длительностью 20 с начинается измерение оптической плотности органической фазы (453 нм) оптоволоконным зондом в течение 30 с интервалом в 1 с. Рассчитывают среднее арифметическое значений оптической плотности, полученных с 15-ой по 30-ую с, и принимают его в качестве значения аналитического сигнала. Затем содержимое смесительной камеры направляется на сброс и система дважды промывается дистиллированной водой.

### Глава 3 Хроматографическое определение лекарственных веществ с микроэкстракционным выделением в экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью»

Хроматографические методы являются универсальным инструментом для выполнения фармацевтического анализа, обеспечивающим селективность, требуемую чувствительность и производительность, которые достигаются путем варьирования условий хроматографического разделения и выбора подходящего метода детектирования. Несмотря на неоспоримые достоинства, они требуют проведения пробоподготовки с целью извлечения аналитов из жидких и твердофазных объектов, устранения влияния матричных компонентов и, если необходимо, концентрирования.

Микроэкстракционные методы находят все более широкое применение в фармацевтическом анализе для выделения и концентрирования лекарственных веществ из твердофазных и жидких проб за счет большей эффективности, экспрессности, простоты выполнения и меньшему расходу экстрагента (сорбента) и пробы по сравнению с традиционными методами жидкостной и твердофазной экстракции [267].

Эффективным и активно развивающимся на данный момент методом разделения и концентрирования является жидкостная микроэкстракция в экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью», которые способны переходить из гидрофильной формы в гидрофобную форму при изменении pH раствора пробы. *In situ* образование диспергированной фазы экстрагента из гомогенного раствора пробы обеспечивает высокую скорость массопереноса целевых аналитов и может быть легко автоматизировано на принципах проточных методов.

Такие свойства первоначально были открыты группой профессора P.J. Jessor для растворителей, относящихся к классу амидинов [268], а также вторичных и третичных аминов [269]. Впервые их аналитическое применение в контексте микроэкстракции было продемонстрировано в 2014 году коллективом ученых из университета Кордовы (Испания) [270]. N,N-диметилциклогексиламин смешивали с водой в соотношении 1:1 и добавляли сухой лед (CO<sub>2</sub>) до полного

перехода амина в гидрофильную форму гидрокарбоната. Полученный раствор вводили в пробу и добавляли раствор гидроксида натрия для выделения экстрагирующей аналиты фазы исходного амина (гидрофобной формы). Начиная с этого момента наибольшее распространение в аналитической практике в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью», проявляющих основные свойства, получили N,N-диметилциклогексиламин [92, 271-275] и триэтиламин [276-284]. Единичные работы опубликованы в случае 1-этилпиперидина [285], N,N-диметилоктиламина [286], N,N-диметилбензиламина [287], N,N-диметилбутиламина [288] и дипропиламина [289, 290]. Недавно была показана возможность замены неудобного в обращении углекислого газа в твердом или газообразном виде на раствор минеральной кислоты [275, 289, 290]. При этом получение гидрофильной формы экстрагента можно проводить *in situ*, что облегчает и ускоряет процедуру микроэкстракции [289, 290]. Представленные третичные и вторичные амины являются гидрофобными экстрагентами с основными свойствами, поэтому они применимы для извлечения неполярных веществ (полициклические ароматические углеводороды [270]), либо основных соединений, находящихся в незаряженной форме в щелочной среде (триазиновые гербициды [271], метамфетамин [289], хлорамфеникол [274], антидепрессанты [275, 290]). Для выделения катионных четвертичных аммониевых соединений (протоберберинового алкалоиды [283], бипиридиловый гербицид паракват [279]) в качестве ион-парного агента используют додецилсульфат натрия, а для экстракции анионных форм ( $\alpha$ -нафтоловый оранжевый [281]) – метилтриоктиламмония хлорид. При извлечении ионов тяжелых металлов (Cd(II), Hg(II), Pd(II), Co(II)) их связывают в комплексные соединения с дитизоном [272, 278], 1-(2-пиридилазо)-2-нафтолом [277], 1-(2-нитрозо)-2-нафтолом [286], пирролидиндитиокарбаматом [276, 282] или дифенилкарбазоном [287]. В случае иона никеля (II) дополнительные реагенты не требуются, так как экстракция протекает по механизму образования координационного соединения с экстрагентом (триэтиламином) [280, 285]. Сильнощелочная среда, создаваемая органическими аминами при их частичном растворении в водной фазе, делает их

непригодными для извлечения амфотерных соединений без введения ион-парных агентов. Однако в литературе представлена такая работа, посвященная определению нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ в пробах грудного молока, слюны и мочи [92]. Авторы предварительно проводили экстракцию из гомогенного раствора в фазу ацетонитрила при помощи высаливающего агента, а затем ацетонитрильный экстракт разбавляли в 4 раза водой и осуществляли извлечение в N,N-диметилциклогексиламин при изменении кислотности. Судя по всему, в данном случае присутствие ацетонитрила играет решающую роль: на второй стадии за счет большой ионной силы раствора он также выделяется в органическую фазу, способствуя массопереносу аналитов.

Высшие карбоновые кислоты были предложены H. Shih и коллегами в 2014 году в качестве альтернативы вторичным и третичным аминам как кислотные экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью» при определении алкилфенолов в сточных водах [291]. Пробу смешивали с гептановой кислотой и раствором аммиака, в результате чего образовывалась ее водорастворимая соль и система становилась однофазной. После добавления раствора серной кислоты выделялась фаза экстрагента за счет протонирования его гидрофильной формы. Преимуществом высших карбоновых кислот по сравнению с аминами является слабокислая реакция водной фазы, что открывает возможность извлечения амфотерных и кислотных соединений, находящихся в таких условиях в нейтральных формах, без введения дополнительных ион-парных агентов.

Следующая работа в данном направлении появилась в рамках настоящего диссертационного исследования и стала первым приложением экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью» к области фармацевтического анализа. Для решения проблемы с фазовым разделением и устранения стадии центрифугирования было предложено использовать карбонат натрия для создания щелочной среды, в которой происходит диссоциация высшей карбоновой кислоты с получением ее гидрофильной формы. При последующем введении раствора минеральной кислоты наблюдается *in situ* образование диспергированной фазы экстрагента (гидрофобная форма) и быстрое разрушение образующейся эмульсии

благодаря перемешиванию фаз пузырьками углекислого газа, которые выделяются в результате реакции карбонат-ионов с минеральной кислотой. Предложенная схема была автоматизирована на принципах проточного анализа, что ранее не было представлено в литературе для жидкостной микроэкстракции в экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью». В ходе исследований решалась задача ВЭЖХ-ФЛ определения офлоксацина в лекарственных препаратах и моче. Разработанный подход был впоследствии применен другими авторами при определении фторхинолонов и тетрациклинов [292], сульфаниламидов [293] и V(V) в виде комплекса [294] в пробах природной и питьевой воды, органов и тканей животного происхождения и донных отложений, а также метаболитов полициклических ароматических углеводов в моче [295]. Для отделения фазы экстрагента в двух случаях проводили ее кристаллизацию [292, 295], как и в более ранней работе, касающейся определения пиретроидов в природных водах, но не предполагающей выделение углекислого газа [296].

Затем группой проф. А.В. Булатова было предложено два новых подхода. Первый состоит в прессовании гидрокарбоната натрия, твердой органической кислоты и соли высшей карбоновой кислоты в таблетку. При помещении ее в раствор пробы экстрагент переходит в гидрофобную форму и диспергируется в процессе образования углекислого газа, после чего органическая фаза выделяется в верхней части раствора. Схема была применена для определения стероидных гормонов в природных водах [297], а позднее другие авторы расширили круг аналитов до триазиновых гербицидов [298] и пластификаторов [299]. Второй подход [300] заключается в реализации непрерывного смешения потоков подкисленной пробы и растворов соли высшей карбоновой кислоты и комплексообразующего реагента в условиях проточного анализа с последующим удержанием органической фазы на монолитной колонке, заполненной пористым политетрафторэтиленом, и элюированием раствором гидроксида натрия. Элюат смешивается с потоками растворов соляной кислоты и боргидрида натрия для

генерации гидридов аналитов (As(III), Se(IV)), которые переносятся в токе аргона в атомно-флуоресцентный спектрометр.

Данная глава посвящена новым решениям в области жидкостной микроэкстракции в кислотные экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью», в том числе в рамках проточного анализа, и их практическому применению для ВЭЖХ-ФЛ и ВЭЖХ-УФ определения антибактериальных лекарственных веществ (фторхинолонов, тетрациклинов, сульфаниламидов) в лекарственных препаратах, биологических жидкостях и тканях животного происхождения. В настоящей работе впервые рассматривается возможность применения ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоты и ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот в качестве таких экстрагентов.

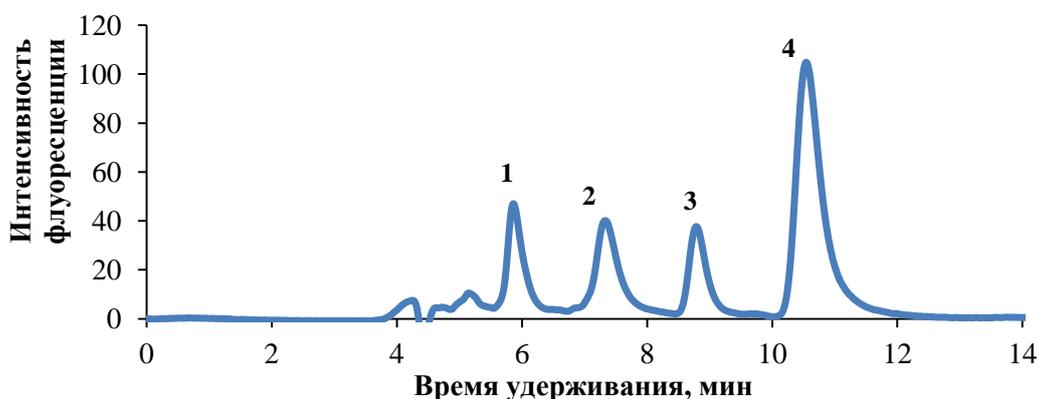
Выбор кислотных экстрагентов обусловлен тем, что целевые аналиты представляют собой амфотерные соединения, существующие в слабокислой среде в незаряженных формах, хорошо экстрагирующихся в гидрофобный экстрагент. Создаваемая третичными и вторичными аминами щелочная среда приводит к переходу аналитов в анионные формы, которые имеют низкое сродство к органической фазе и в таком случае без введения дополнительных агентов извлечение не протекает.

#### *Условия ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ФЛ анализа*

При выборе состава подвижных фаз для определения целевых аналитов учитывали растворимость в них экстрагентов, влияние состава фаз на аналитические сигналы и рабочий диапазон рН (от 2 до 8) используемой хроматографической колонки.

Были оптимизированы условия ВЭЖХ-ФЛ определения ломефлоксацина, офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина в 2,2-диметилпропановой, гексановой и нонановой кислотах. Установлено, что подвижная фаза, состоящая из фосфатного буферного раствора (рН=6,4, 12,8 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 37,2 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) и метанола в соотношении 55:45, является универсальной для хроматографического разделения аналитов в изократическом режиме. Для

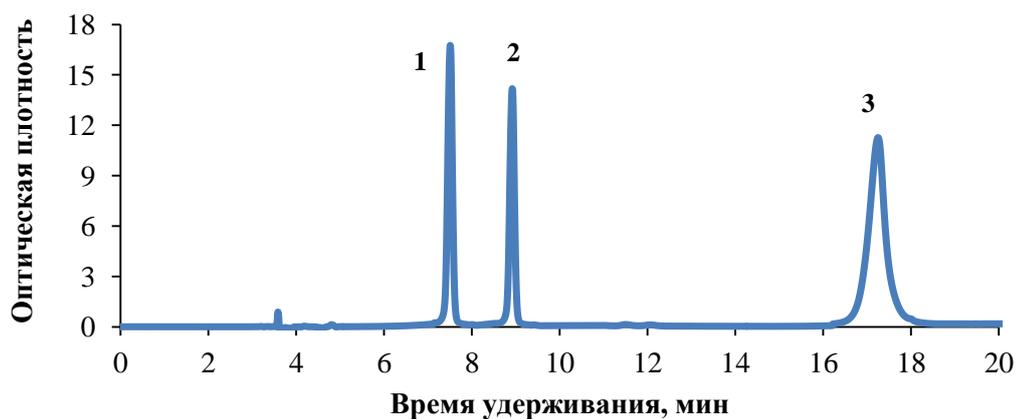
устранения остаточных взаимодействий аналитов со свободными силанольными группами сорбента в фосфатный буферный раствор вводили триэтиламмония ацетат (20 ммоль/л). Для совместного определения фторхинолонов были выбраны длины волн возбуждения и эмиссии 278 и 466 нм, отвечающие их наиболее интенсивной флуоресценции. Времена удерживания ломефлоксацина, норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина составили 5,84, 7,28, 8,76 и 10,52 мин соответственно (рисунок 28). Общее время хроматографического анализа – 14 мин.



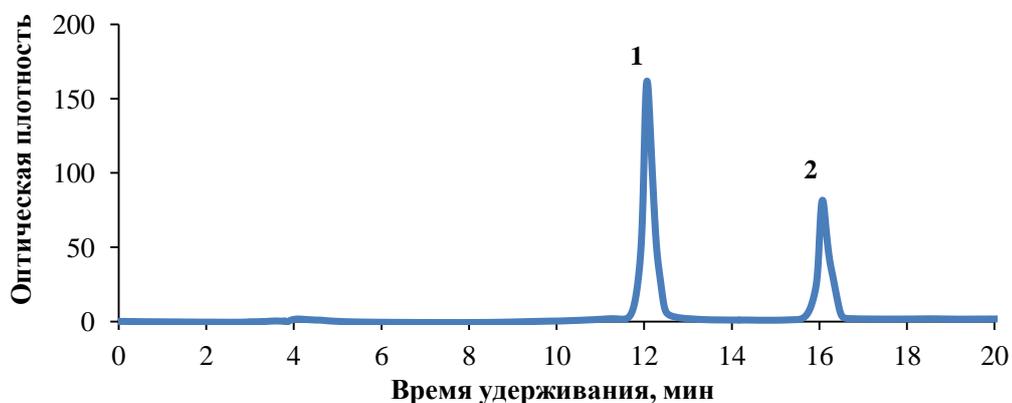
**Рисунок 28** – Хроматограмма экстракта фторхинолонов (концентрация ломефлоксацина (1), норфлоксацина (2), флероксацина (3) и офлоксацина (4) – 25 мкг/л). Условия приведены в разделе 2.4.1

Для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина (рисунок 29) в 2,2-диметилпропановой, гексановой, нонановой и олеиновой кислотах была выбрана подвижная фаза, состоящая из 0,5% раствора муравьиной кислоты (фаза А) и смеси ацетонитрила и метанола (2:1) (фаза Б). Для эффективного разделения аналитов, отличающихся гидрофобностью, был оптимизирован градиентный режим элюирования: сначала концентрация фазы Б поддерживается постоянной (20%, 9 мин) для разделения пиков окситетрациклина и тетрациклина, после чего линейно увеличивается (от 20 до 80%, 7 мин) и остается неизменной (80%, 3 мин), обеспечивая элюирование хлортетрациклина. Оптимальная длина волны поглощения составила 355 нм. Времена удерживания окситетрациклина, тетрациклина и хлортетрациклина составили 7,51, 8,92 и 17,23 мин соответственно. Общее время хроматографического анализа – 20 мин.

Для ВЭЖХ-УФ определения сульфаметоксазола и сульфаметазина (рисунок 30) в ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоте была исследована серия подвижных фаз, состоящих из полярного органического растворителя (метанол, ацетонитрил) и фосфатного буферного раствора (рН от 6,0 до 8,0, общая концентрация  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  от 20 до 50 ммоль/л). Наиболее эффективное разделение аналитов было достигнуто при использовании подвижной фазы, состоящей из метанола и фосфатного буферного раствора (рН=8,0, 48,5 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Элюирование осуществлялось в градиентном режиме, благодаря чему сначала наблюдалась диссоциация экстрагента в щелочной среде и его удаление из колонки, а затем происходило разделение аналитов. Оптимальная длина волны поглощения, соответствующая максимальной чувствительности, составила 263 нм. Времена удерживания сульфаметоксазола и сульфаметазина составили 12,45 и 16,45 мин соответственно. Общее время хроматографического анализа – 25 мин.

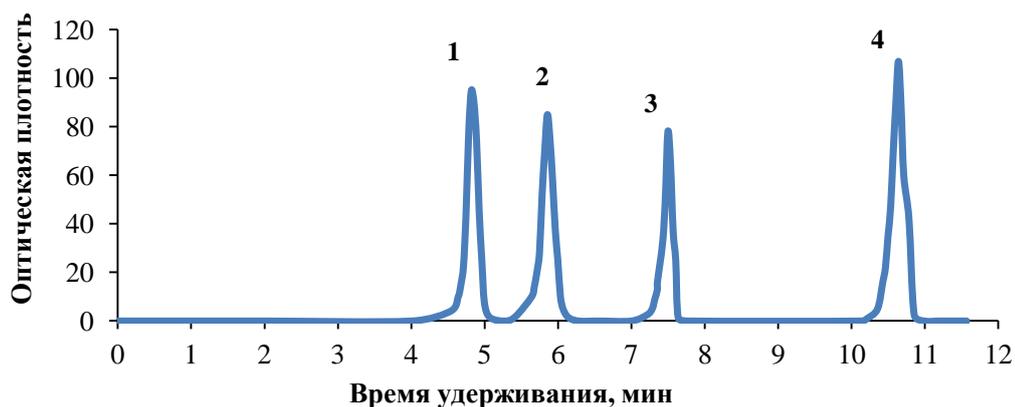


**Рисунок 29** – Хроматограмма экстракта тетрациклинов (концентрация тетрациклина (1), окситетрациклина (2) и хлортетрациклина (3) – 25 мг/л). Условия приведены в разделе 2.4.1



**Рисунок 30** – Хроматограмма экстракта сульфаниламидов (концентрация сульфаметоксазола (1) и сульфаметазина (2) – 10 мг/л). Условия приведены в разделе 2.4.1

Установлено, что подвижная фаза, состоящая из аммиачно-формиатного буферного раствора (pH=4) и смеси ацетонитрила и метанола (2:1) в соотношении 60:40 обеспечила удовлетворительное хроматографическое разделение сульфадиазина, сульфаметоксазола, сульфаметазина и сульфахиноксалина (рисунок 31) в фазах ГЭР на основе тимола и гексановой, гептановой, октановой, нонановой и декановой кислот. После разделения аналитов концентрация смеси ацетонитрила и метанола (2:1) в подвижной фазе увеличивалась до 90% для удаления компонентов ГЭР из колонки. Оптимальная длина волны поглощения, соответствующая максимальной чувствительности ВЭЖХ-УФ анализа, составила 263 нм. Времена удерживания сульфадиазина, сульфаметазина, сульфаметоксазола и сульфахиноксалина составили 4,78, 5,82, 7,50 и 10,64 мин соответственно. Общее время хроматографического анализа – 20 мин.



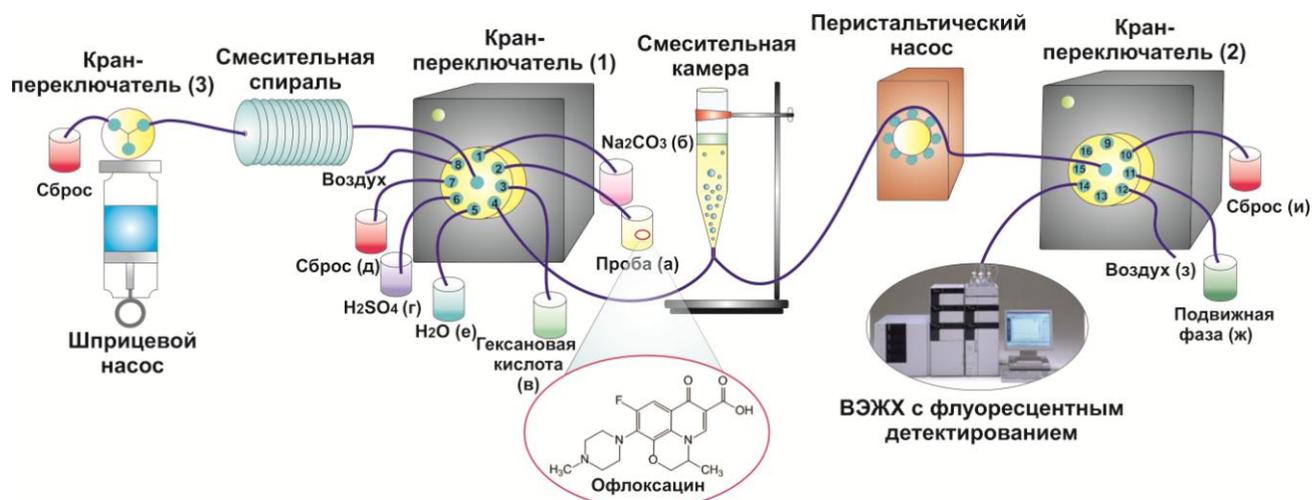
**Рисунок 31** – Хроматограмма экстракта сульфаниламидов (концентрация сульфадиазина (1), сульфаметазина (2), сульфаметоксазола (3) и сульфахиноксалина (4) – 10 мг/л). Условия приведены в разделе 2.4.1

#### *Микроэкстракционное выделение фторхинолонов.*

Представленные ранее схемы реализации процесса микроэкстракции в высшие карбоновые кислоты предполагали проведение центрифугирования для разделения фаз, что нежелательно при автоматизации процедуры на принципах проточного анализа. В данной работе был предложен новый подход, основанный на конверсии экстрагента в ионную форму в присутствии карбоната натрия,

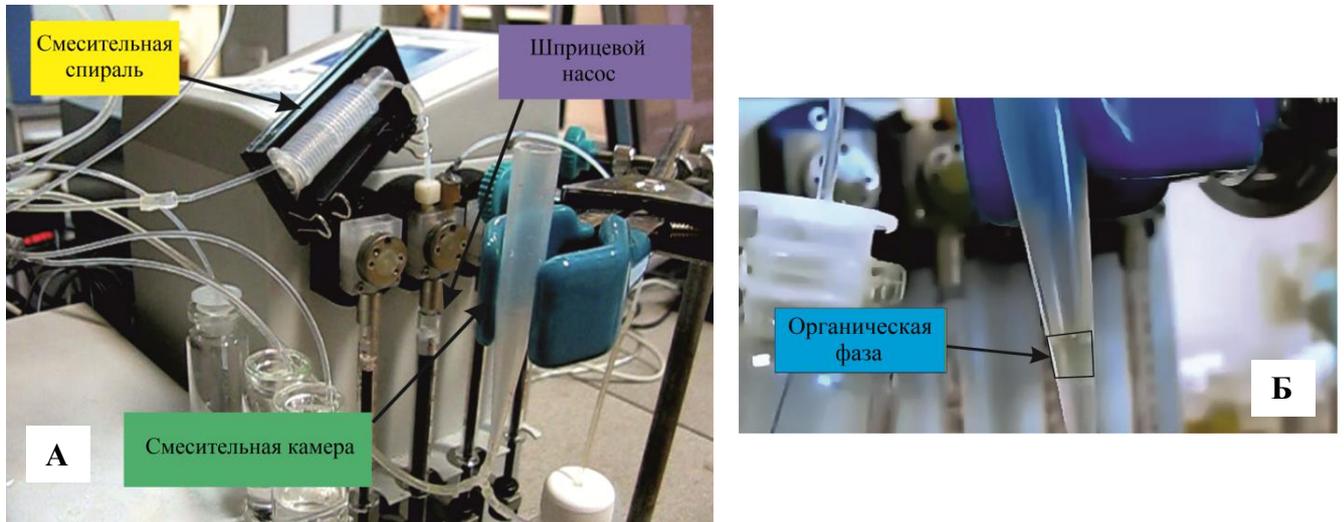
который обеспечивает при подкислении выделение пузырьков углекислого газа, обеспечивающих быстрое фазовое разделение.

Для автоматизированного определения офлоксацина в гомогенных растворах (лекарственные препараты, моча) была разработана гидравлическая схема, предполагающая коммутацию двух кранов-переключателей, шприцевого (для подачи реагентов и пробы) и перистальтического (для разбавления экстракта подвижной фазой) насосов, смесительной спирали и смесительной камеры (Рисунок 32, 33А). Согласно разработанной схеме в смесительную камеру последовательно подаются гомогенный раствор, полученный при смешении в смесительной спирали раствора пробы (а), раствора карбоната натрия (б) и высшей карбоновой кислоты (в), и раствор серной кислоты (г). Уменьшение рН до 6 обеспечивает переход гидрофильной формы экстрагента в его гидрофобную форму и, как следствие, образование диспергированной фазы экстрагента и массоперенос в нее молекулярной формы аналита. Для быстрого разрушения образующейся эмульсии в смесительной камере была реализована идея перемешивания фаз пузырьками углекислого газа, которые образуются в результате реакции гидрокарбонат-ионов с серной кислотой. После сброса водной фазы (д) экстракт (Рисунок 33Б) разбавляется подвижной фазой (ж) (смесь фосфатного буферного раствора (рН=6,4) и метанола в соотношении 55:45) и направляется в автосамплер системы ВЭЖХ-ФЛ.



**Рисунок 32** – Гидравлическая схема для автоматизированного определения офлоксацина в гомогенных растворах (лекарственные препараты, моча)

С целью достижения наибольшей чувствительности были оптимизированы такие параметры экстракционной системы как природа высшей карбоновой кислоты, объем пробы и экстрагента, концентрации карбоната натрия и серной кислоты, а также гидродинамические параметры (скорость потока, длина смесительной спирали).



**Рисунок 33** – Фотографии проточной системы (А) и смесительной камеры в момент сброса водной фазы после фазового разделения (Б) (Институт Химии СПбГУ)

Для экстракции офлоксацина были изучены 2,2-диметилпропановая ( $pK_a=5,03$  [301]), гексановая ( $pK_a=4,85$  [301]) и нонановая ( $pK_a=4,96$  [301]) кислоты. Для выбора оптимального экстрагента движением шприцевого насоса со скоростью 3 мл/мин в смесительную спираль последовательно отбирали 300 мкл 2 моль/л раствора карбоната натрия (а), 1,5 мл пробы (б) и 50 мкл изучаемой высшей карбоновой кислоты (в), после чего полученный гомогенный раствор прокачивали в смесительную камеру (рисунок 32). Смесительную спираль промывали дважды водой, отбирали в нее 300 мкл 2 моль/л раствора серной кислоты и подавали в смесительную камеру. Водную фазу направляли на сброс, а к оставшейся органической фазе добавляли 450 мкл подвижной фазы, перемешивали с помощью потока воздуха в течение 20 с (3 мл/мин) и направляли в автосамплер. Было установлено, что офлоксацин, как относительно полярное вещество, наилучшим образом извлекается в гексановую кислоту (степень извлечения  $80\pm 3\%$ ). При использовании 2,2-диметилпропановой кислоты наблюдается неполное выделение фазы экстракта вследствие ее относительно

высокой растворимости в водной фазе, что приводит к снижению степени извлечения офлоксацина до  $30 \pm 2\%$ . Нонановая кислота обладает большей гидрофобностью и меньшей экстрагирующей способностью по отношению к офлоксацину (степень извлечения  $70 \pm 3\%$ ).

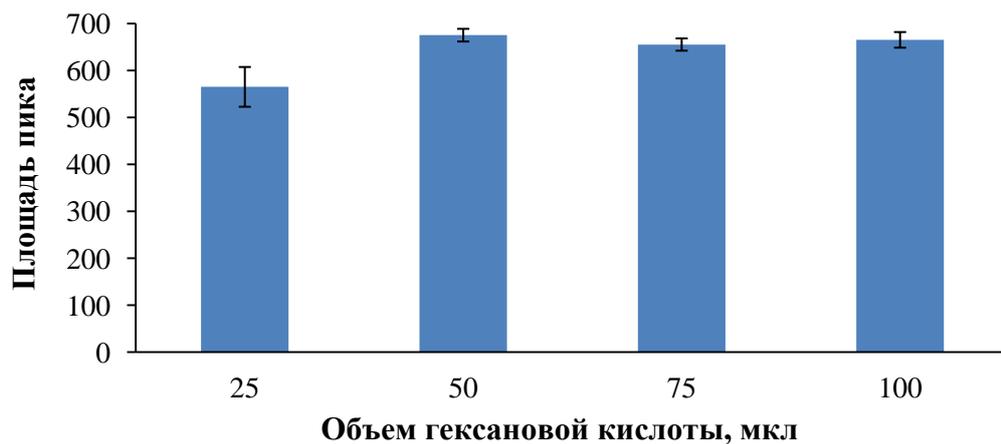
Расчет степени извлечения ( $R$ , %) проводили по следующей формуле:

$$R = \frac{C_э \cdot V_э}{C_и \cdot V_и} \cdot 100\%,$$

где  $C_и$  и  $C_э$  – концентрации аналита в исходном растворе и фазе экстрагента соответственно, мг/л;

$V_и$  и  $V_э$  – объем исходного раствора и фазы экстрагента соответственно, мл.

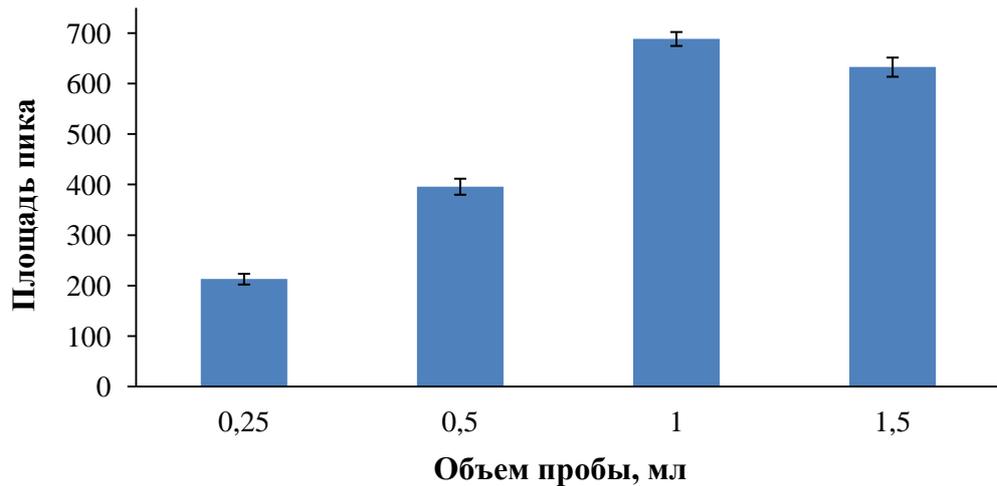
Дальнейшую оптимизацию проводили по вышеописанной схеме, варьируя значения различных параметров. Объем экстрагента изменяли в диапазоне от 25 до 100 мкл. При объемах меньше 50 мкл наблюдался более низкий сигнал из-за меньшей степени извлечения, поэтому объем равный 50 мкл был выбран в качестве оптимального (рисунок 34). Объем пробы исследовали в интервале от 0,25 до 1,5 мл. При его увеличении сигнал возрастал, после чего стал снижаться из-за уменьшения эффективности экстракции вследствие большого отношения объемов пробы и экстрагента (рисунок 35). Оптимальный объем составил 1 мл.



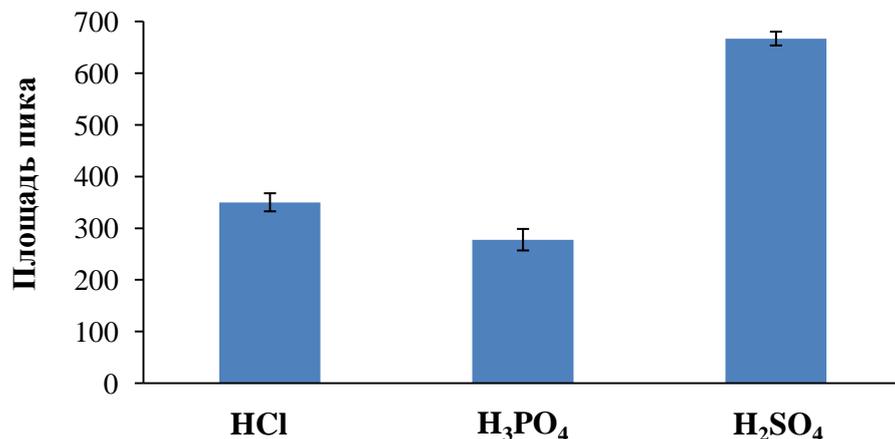
**Рисунок 34** – Влияние объема экстрагента на площадь хроматографического пика офлоксацина ( $C_{\text{аналита}} = 200$  мкг/л;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2$  моль/л;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2$  моль/л; объем пробы – 1,5 мл;  $n=3$ )

Для микроэкстракции офлоксацина были изучены растворы серной, фосфорной и соляной кислот, необходимые для перевода гидрофильной формы

гексановой кислоты в гидрофобную. Как видно из рисунка 36, природа минеральной кислоты оказывает существенное влияние на эффективность экстракционного процесса, что может быть связано с различным высаливающим эффектом анионов. В ряду Гофмейстера ( $\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{Cl}^-$ ) сульфат-ионы имеют наибольшую энергию гидратации и как следствие проявляют максимальный высаливающий эффект для эффективного извлечения офлоксацина.



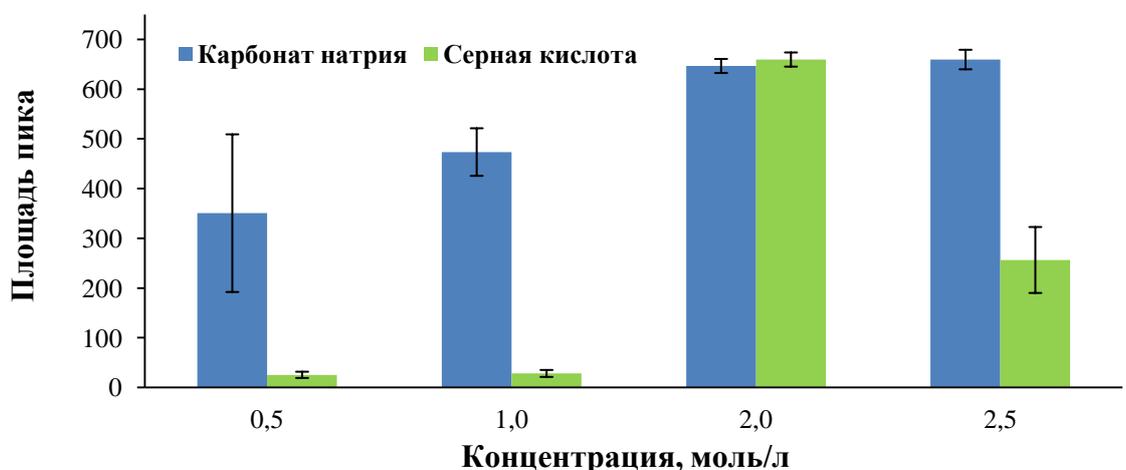
**Рисунок 35** – Влияние объема пробы на площадь хроматографического пика офлоксацина ( $C(\text{офлоксацина}) = 200$  мкг/л;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2$  моль/л;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2$  моль/л; объем экстрагента – 50 мкл;  $n=3$ )



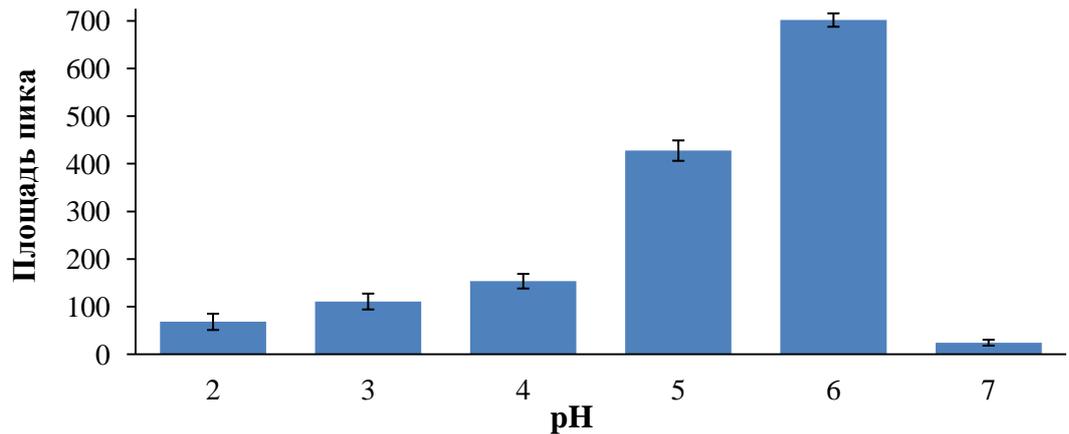
**Рисунок 36** – Влияние природы минеральной кислоты на площадь хроматографического пика офлоксацина ( $C_{\text{аналита}} = 200$  мкг/л;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2$  моль/л;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2$  моль/л;  $C(\text{H}_3\text{PO}_4) = 2$  моль/л;  $C(\text{HCl}) = 4$  моль/л; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл;  $n=3$ )

Фторхинолоны являются амфотерными соединениями: в сильнокислой среде существуют в катионных формах, в слабокислой среде находятся в молекулярных или цвиттер-ионных формах, а в нейтральной и щелочной средах

образуют анионные формы (таблица 1). В связи с этим концентрации растворов карбоната натрия и серной кислоты оказывают влияние на pH водной фазы и, следовательно, формы существования аналитов, а также интенсивность выделения пузырьков углекислого газа. Сначала варьировали концентрацию раствора карбоната натрия в диапазоне от 0,5 до 2,5 моль/л, сохраняя эквимольные соотношения между реагентами. Как видно из рисунка 37, при концентрации 2 моль/л зависимость выходит на плато при наименьшем СКО, так как выделяющегося углекислого газа становится достаточно для эффективного разделения эмульсии. Затем изменяли концентрацию серной кислоты в том же диапазоне, но при постоянной оптимальной концентрации карбоната натрия (2 моль/л). При низких концентрациях серной кислоты выделения органической фазы практически не происходило, так как реакция нейтрализации протекала неполностью. Кроме того, офлоксацин в таких условиях находится в плохо экстрагируемой анионной форме. При концентрациях превышающих 2 моль/л среда становилась кислой и наблюдалось снижение аналитического сигнала из-за увеличения доли катионной формы офлоксацина. Таким образом, извлечение офлоксацина протекает наиболее эффективно в гидрофобной молекулярной форме в слабокислой среде (pH=6) при равных концентрациях реагентов (2 моль/л). Зависимость интенсивности аналитического сигнала от pH водной фазы представлена на рисунке 38.

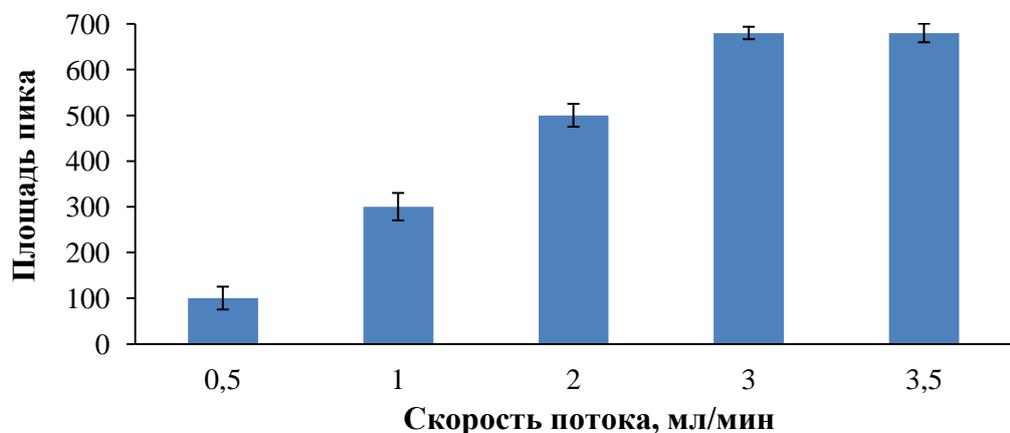


**Рисунок 37** – Влияние концентраций растворов карбоната натрия и серной кислоты на площадь хроматографического пика офлоксацина ( $C_{\text{аналита}} = 200$  мкг/л; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл;  $n=3$ )

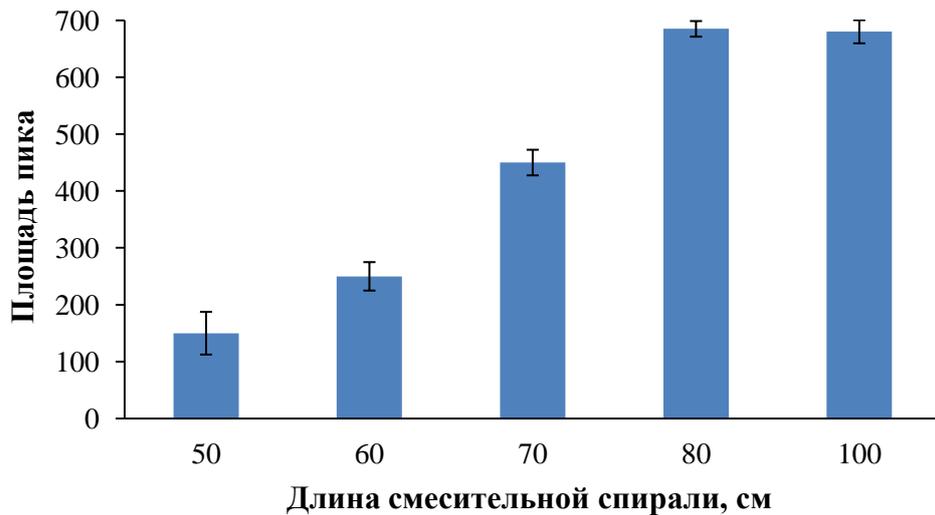


**Рисунок 38** – Влияние pH водной фазы на площадь хроматографического пика офлоксацина ( $C_{\text{аналита}} = 200$  мкг/л; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл;  $n=3$ )

Исследование влияния гидродинамических параметров является важным для обеспечения полного перемешивания реагентов в смесительной спирали. Скорость движения шприцевого насоса изменяли в диапазоне от 0,5 до 3,5 мл/мин (рисунок 39). Оптимальная скорость составила 3 мл/мин, так как в этих условиях наблюдается образование гомогенного раствора и наиболее полное выделение офлоксацина. Смесительная спираль обеспечивает перемешивание растворов пробы и реагентов за счет создания турбулентного потока и ее длина должна быть достаточной для перекрывания зон реагентов. Длину смесительной спирали варьировали от 50 до 100 см (рисунок 40). Наименьшая длина, обеспечивающая максимальный аналитический сигнал, составила 80 см и была выбрана в качестве оптимальной.



**Рисунок 39** – Влияние скорости потока на площадь хроматографического пика офлоксацина ( $C_{\text{аналита}} = 200$  мкг/л;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2$  моль/л;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2$  моль/л; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл; длина смесительной спирали – 80 см;  $n=3$ )



**Рисунок 40** – Влияние длины смесительной спирали на площадь хроматографического пика офлоксацина ( $C_{\text{аналита}} = 200$  мкг/л;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2$  моль/л;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2$  моль/л; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл; скорость потока – 3 мл/мин;  $n=3$ )

В выбранных условиях анализа градуировочная зависимость была линейна в диапазоне концентраций офлоксацина от 12 до 2400 мкг/л ( $r=0,998$ ). Предел обнаружения ( $3\sigma$ ) составил 4 мкг/л. Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность характеризовались с помощью значения среднеквадратического отклонения результатов измерений в соответствующих условиях для нижней и верхней границы диапазона определяемых концентраций и составили от 2 до 4 % и от 3 до 6% ( $n=5$ ) соответственно. Степень извлечения была равна  $90\pm 5\%$  ( $n=3$ ). Время пробоподготовки одной пробы составляло 7 мин.

Для изучения мешающего влияния различных компонентов мочи и лекарственных препаратов (капли глазные) в водный раствор офлоксацина (20 мг/л) вводили добавки неорганических ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) и органических компонентов (лимонная, гиппуровая и мочевая кислоты; глюкоза, креатинин, глицин, мочеви́на). Полученные растворы разбавляли дистиллированной водой в 100 раз и анализировали по разработанной схеме. В качестве критерия отсутствия мешающего влияния выступало отклонение аналитического сигнала не более чем на 5%. Как видно из таблицы 9, заметно мешать определению офлоксацина могут глюкоза, гиппуровая и лимонная кислоты, однако при анализе реальных объектов значительных отклонений не наблюдалось.

**Таблица 9** – Влияние различных компонентов мочи и лекарственных препаратов на ВЭЖХ-ФЛ определение офлоксацина (концентрация офлоксацина – 20 мг/л)

<b>Мешающий компонент</b>	<b>Допустимый избыток</b>
Лимонная кислота	10
Гиппуровая кислота	10
Глюкоза	10
Креатинин	100
Глицин	100
Мочевая кислота	100
$\text{NO}_3^-$	100
$\text{Zn}^{2+}$	100
$\text{Mg}^{2+}$	100
$\text{SO}_4^{2-}$	100
$\text{HPO}_4^{2-}$	100
Мочевина	1000
$\text{K}^+$	1000
$\text{Na}^+$	1000
$\text{Cl}^-$	1000
$\text{NH}_4^+$	1000
$\text{Ca}^{2+}$	1000

Правильность получаемых результатов подтверждали методом «введено-найдено», а также проводили анализ проб референтным методом [97]. К 10 мл разбавленной пробы мочи или лекарственного препарата добавляли 2 мл буферного раствора Бриттона–Робинсона (рН 4) и 0,4 мл раствора додецилсульфата натрия (7,5 %) и полиэтиленгликоля моно-*n*-нонилфенилового эфира (5%), после чего вносили 0,6 г хлорида натрия. После перемешивания двухфазную систему центрифугировали 15 мин при 3000 об./мин и помещали в ледяную баню на 10 мин. Водную фазу отбрасывали, а закристаллизовавшуюся мицеллярную фазу растворяли в 0,2 мл этанола и измеряли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения и эмиссии 299 и 496 нм соответственно. Результаты были сравнены с помощью F- и t-тестов и представлены в таблице 10. Полученные F-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи валидируемой и референтной схем.

**Таблица 10** – Результаты определения офлоксацина в пробах мочи и лекарственных препаратах ( $n=3$ ,  $P = 0,95$ ,  $F_{кр} = 19,00$ ,  $t_{кр} = 2,78$ )

Проба (содержание офлоксацина)	Единица измерения	Введено	Найдено		F- критерий	t- критерий
			ВЭЖХ-ФЛ	Флуориметрия [97]		
Моча (<ПО)	мг/л	10,0	9,9±1,2	10,4±1,4	1,36	1,17
		20,0	19,0±2,1	21,1±2,7	1,65	2,66
		30,0	28,7±2,7	30,6±2,8	1,08	2,11
Капли глазные «Офлоксацин- СОЛОфарм» (3 мг/мл)	мг/мл	–	3,05±0,12	3,08±0,15	1,56	0,68
Капли глазные «Флоксал» (3 мг/мл)			2,96±0,09	3,06±0,14	2,42	2,60

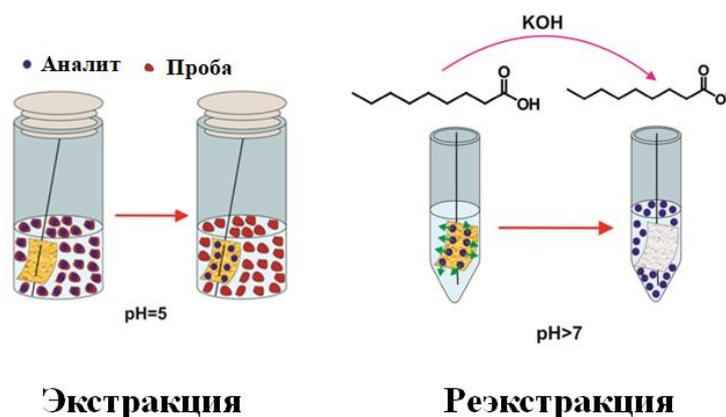
Для автоматизированного определения офлоксацина в моче и лекарственных препаратах в литературе представлен ряд схем, основанных на принципах проточно-инжекционного анализа с хемилюминесцентным [302-306], спектрофотометрическим [307] и потенциометрическим [308] детектированием. Часть из них предполагает применение больших объемов органических растворителей (смесь дихлорметана и изопропилового спирта [305], этилацетат [307]) для предварительного извлечения офлоксацина из проб мочи с последующим упариванием экстракта или удалением мешающих компонентов на оксиде свинца и катионите [304]. Некоторые схемы включают только разбавление пробы [303, 306, 308] или осаждение белков трихлоруксусной кислотой [302], но это обуславливает низкую селективность, особенно в условиях хемилюминесцентного детектирования. В последнем случае требуется длительное центрифугирование (15 мин) для отделения осажденных белков. Жидкие лекарственные формы разбавляют дистиллированной водой. **Преимуществом разработанной в данном исследовании схемы является автоматизация стадии пробоподготовки, экспрессное проведение экстракционного процесса и использование небольших объемов нетоксичных экстрагентов.**

Результатом проведенных исследований стала автоматизированная схема микроэкстракционного выделения и ВЭЖХ-ФЛ определения офлоксацина в гомогенных растворах, возможности которой были продемонстрированы при

анализе лекарственных препаратов и мочи. По итогам работы была опубликована статья в журнале *Analytica Chimica Acta* [309].

Для определения фторхинолонов в суспендированных пробах (лекарственные препараты, ткани животного происхождения) была разработана схема их микроэкстракционного выделения на мембранах, импрегнированных высшими карбоновыми кислотами. В этом случае в порах гидрофобной полимерной мембраны удерживается экстрагент, а мембрана минимизирует контакт между органической фазой и твердофазными компонентами матрицы пробы. Кроме того, кислотные свойства карбоновой кислоты позволяют проводить быстрое элюирование аналитов за счет ионизации экстрагента в щелочной среде. В представленных ранее работах в случае мембранной микроэкстракции Рb(II) в гексановую [310] и эстрогенов в нонановую [311] кислоты для этой цели применяли метанол. В данном случае удастся избежать использования токсичных органических растворителей для элюирования.

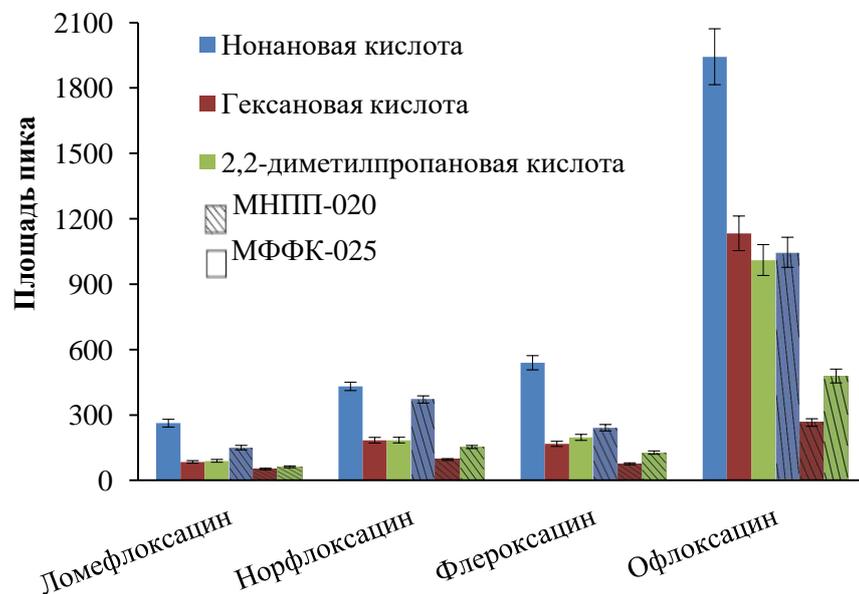
Разработанная схема микроэкстракции включает два этапа (рисунок 41). На первом этапе происходит извлечение аналитов из водной суспензии в фазу экстрагента, удерживаемую в порах гидрофобной мембраны, при перемешивании. На втором этапе экстракт элюируют водным раствором сильного основания и анализируют элюат методом ВЭЖХ-ФЛ.



**Рисунок 41** – Схема микроэкстракционного выделения фторхинолонов из суспендированных проб на мембранах, импрегнированных высшими карбоновыми кислотами

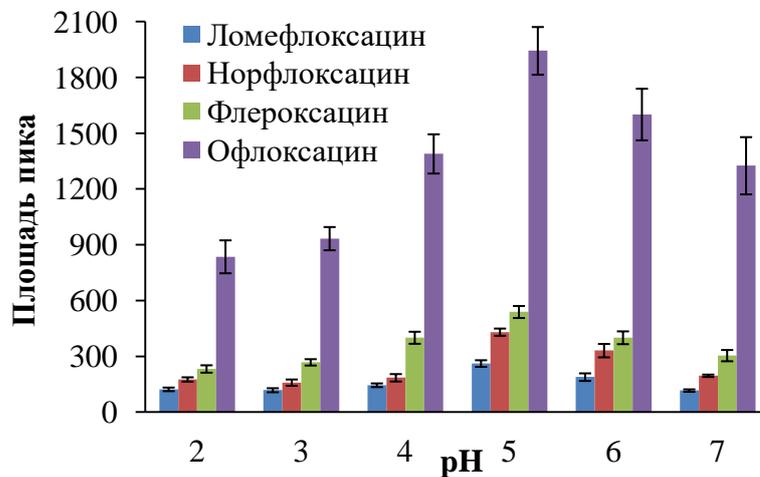
Для извлечения фторхинолонов исследовали два типа коммерчески доступных гидрофобных мембран на основе сополимера тетрафторэтилена и

винилиденфторида (МФФК-0,25, размер пор – 0,25 мкм) и полипропилена (МНПП-0,20, размер пор – 0,2 мкм). Для этого отдельные мембраны каждого типа (10×10 мм) импрегнировали высшими карбоновыми кислотами (2,2-диметилпропановой, гексановой и нонановой), закрепляли на иглах и помещали в 3 мл водного раствора фторхинолонов. Экстракцию проводили 40 минут при перемешивании на орбитальном шейкере с последующим элюированием органической фазы 0,5 мл 1 моль/л раствора гидроксида калия и ВЭЖХ-ФЛ анализом элюата после частичной нейтрализации 2 мкл 10% раствора уксусной кислоты. Мембрана типа МФФК-0,25 обеспечивала наиболее эффективное извлечение всех анализов, что может быть следствием более надежного удерживания экстрагентов в ее порах по сравнению с мембраной типа МНПП-020 из-за большей гидрофобности полимера. В целом эффективность экстракции возрастала с увеличением длины углеводородного радикала карбоновой кислоты, что связано с уменьшением растворимости экстрагента в водной фазе и его более прочным удерживанием в порах мембраны (рисунок 42). На основании этого, в качестве оптимального экстрагента была выбрана нонановая кислота.



**Рисунок 42** – Влияние типа мембраны и природы экстрагента на площади хроматографических пиков фторхинолонов (размер мембраны – 10×10 мм; объем пробы – 3 мл (рН=5);  $C_{\text{аналита}} = 100$  мкг/л; время экстракции и элюирования – 40 и 1 мин соответственно;  $n=3$ )

Важным параметром является кислотность водной фазы, которая двойственно влияет на эффективность экстракции. рН донорного раствора варьировали в диапазоне от 2 до 7, используя серию цитратно-фосфатных буферных растворов. С одной стороны, фторхинолоны пребывают в молекулярной форме в слабокислых средах и в таких условиях извлекаются наиболее полно, в то время как при дальнейшем понижении рН переходят в водорастворимые катионные формы (таблица 1). С другой стороны, ионизация органической фазы подавляется в сильнокислых средах ( $\text{pH} < \text{pK}_a$ ). При  $\text{pH}=5,0$  (рисунок 43) наблюдалась максимальная экстракция фторхинолонов на импрегнированных мембранах.

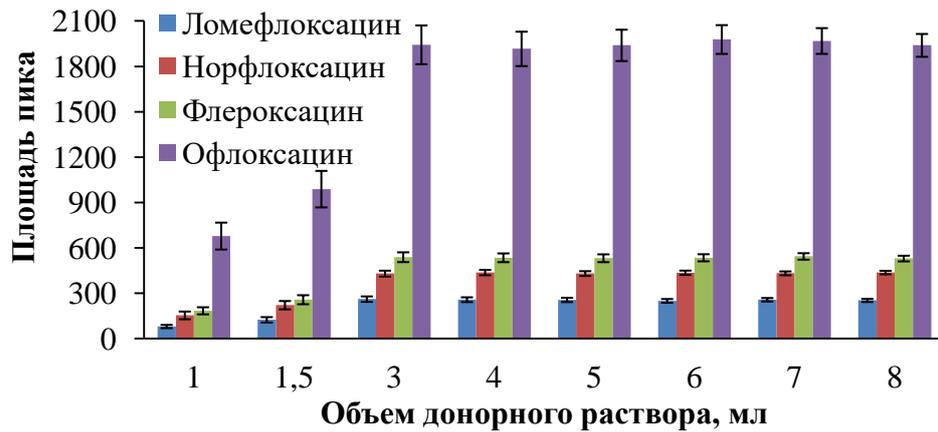


**Рисунок 43** – Влияние рН донорного раствора на площади хроматографических пиков фторхинолонов (тип мембраны – МФФК-025; размер мембраны – 10×10 мм; объем пробы – 3 мл;  $C_{\text{аналита}} = 100$  мкг/л; время экстракции и элюирования – 40 и 1 мин соответственно;  $n=3$ )

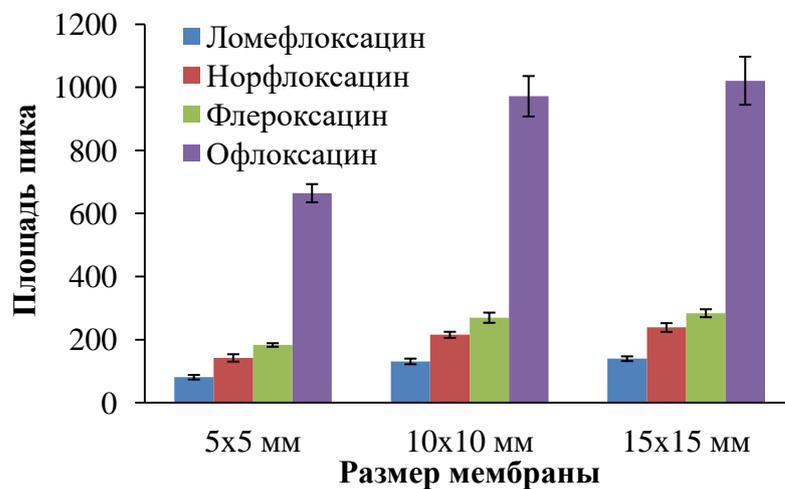
Объем донорного раствора существенно влияет на соотношение объемов контактирующих фаз и коэффициенты концентрирования. Площади хроматографических пиков аналитов возрастали при увеличении объема пробы до 3 мл, после чего зависимость выходила на плато, что может быть связано с частичным растворением экстрагента при больших объемах (рисунок 44). Таким образом, оптимальный объем составил 3 мл.

Площадь мембраны оказывает влияние на объем фазы экстрагента и, следовательно, на эффективность экстракции. Было проведено извлечение фторхинолонов на импрегнированных мембранах, имеющих различную площадь

(5×5 мм, 10×10 мм и 15×15 мм). Размер мембраны 10×10 мм был выбран в качестве оптимального, так как при дальнейшем увеличении ее площади, не происходило значительного увеличения аналитического сигнала (рисунок 45). Это может являться следствием высоких коэффициентов распределения аналитов, так как для эффективного извлечения аналитов требуется малый объем экстрагента.



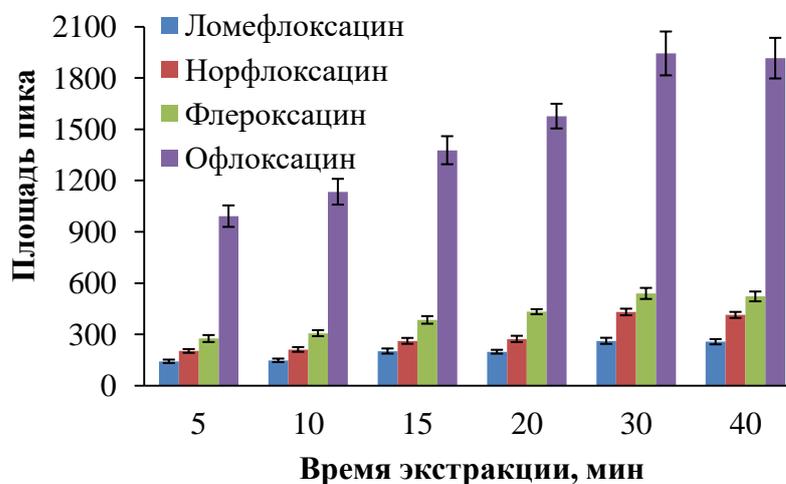
**Рисунок 44** – Влияние объема донорного раствора на площади хроматографических пиков фторхинолонов (тип мембраны – МФФК-025; размер мембраны – 10×10 мм; pH пробы – 5;  $C_{\text{аналита}} = 100$  мкг/л; время экстракции и элюирования – 40 и 1 мин соответственно;  $n=3$ )



**Рисунок 45** – Влияние размера мембраны на площади хроматографических пиков фторхинолонов (тип мембраны – МФФК-025; объем пробы – 3 мл (pH=5);  $C_{\text{аналита}} = 100$  мкг/л; время экстракции и элюирования – 40 и 1 мин соответственно;  $n=3$ )

Скорость определяющей стадией экстракционного процесса является диффузия аналитов из водной фазы в органическую, находящуюся в порах мембраны. Обычно длительность экстракции выбирается на основе компромисса между чувствительностью, экспрессностью и повторяемостью. В данном случае

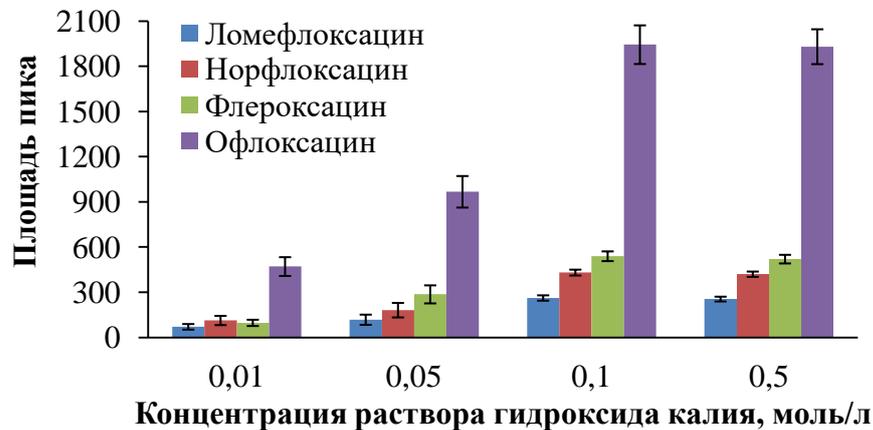
извлечение проводили в промежутке от 5 до 40 минут. Было обнаружено, что равновесие в системе достигается спустя 30 мин, что является оптимальным временем для экстракции аналитов (рисунок 46).



**Рисунок 46** – Влияние времени экстракции на площади хроматографических пиков фторхинолонов (тип мембраны – МФФК-025; размер мембраны – 10×10 мм; объем пробы – 3 мл (рН=5);  $C_{\text{аналита}} = 100$  мкг/л; время элюирования – 0,5 мин соответственно;  $n=3$ )

Элюирование экстракта с мембраны осуществлялось с помощью водного раствора сильного основания, в качестве которого был выбран гидроксид калия. Благодаря его высокой растворимости в полярных органических растворителях обеспечивается совместимость элюата с подвижной фазой. В результате химической реакции между высшей карбоновой кислотой и гидроксидом калия в ходе элюирования образуется водорастворимая соль высшей карбоновой кислоты. Аналиты также переходят в анионные формы в таких условиях, что способствует их пребыванию в растворе. Концентрацию гидроксида калия в элюенте варьировали в диапазоне от 0,01 до 0,5 моль/л. Было обнаружено, что наименьшая концентрация гидроксида калия, необходимая для полного элюирования фазы экстрагента из пор мембраны, составляет 0,1 моль/л, поэтому данная концентрация и была выбрана в качестве оптимальной (рисунок 47). Объем раствора варьировали от 0,1 до 1 мл. Для дальнейших исследований был выбран объем равный 0,5 мл. Элюирование меньшими объемами акцепторного раствора приводило к увеличению СКО из-за неполного погружения мембраны, в то время как элюирование в большие объемы приводило к нежелательному разбавлению.

Время элюирования изучали в диапазоне от 0,2 до 5 мин. Было установлено, что перемешивания в течение 1 мин достаточно для максимально эффективного элюирования ( $85\pm 5\%$  по результатам ВЭЖХ-УФ определения нонаноата калия) за наименьшее время. Следовательно, элюирование происходит экспрессно и без использования дополнительного оборудования.



**Рисунок 47** – Влияние концентрации гидроксида калия на площади хроматографических пиков фторхинолонов (тип мембраны – МФФК-025; размер мембраны –  $10\times 10$  мм; объем пробы – 3 мл ( $pH=5$ );  $C_{\text{аналита}} = 100$  мкг/л; время экстракции и элюирования – 30 и 1 мин соответственно;  $n=3$ )

В найденных условиях градуировочные зависимости были линейными в диапазоне от 0,036 до 18 мг/кг ( $r=0,998$ ) для офлоксацина, от 0,12 до 12 мг/кг ( $r=0,999$ ) для норфлоксацина, от 0,18 до 18 мг/кг ( $r=0,999$ ) для ломефлоксацина и флероксацина. Пределы обнаружения составили 0,012 мг/кг для офлоксацина, 0,036 мг/кг для норфлоксацина и 0,06 мг/кг для ломефлоксацина и флероксацина. Повторяемость и внутрिलाбораторная прецизионность для нижней и верхней границы диапазона определяемых концентраций составили от 4 до 8 % и от 7 до 11% ( $n=5$ ) соответственно. Длительность стадии пробоподготовки – 30 минут. Были достигнуты степени извлечения равные  $84\pm 4\%$ ,  $87\pm 4\%$ ,  $83\pm 4\%$  и  $85\pm 4\%$  для офлоксацина, норфлоксацина, ломефлоксацина и флероксацина соответственно.

Подтверждение правильности получаемых результатов проводили путем проведения анализа по референтному методу (ВЭЖХ-МС/МС) [312]. Компонентами подвижной фазы являлись 0,1 % раствор муравьиной кислоты и метанол. Элюирование осуществлялось в градиентном режиме. Референтная

схема пробоподготовки заключалась в следующем [313]: к 1 г пробы добавляли 4 мл 1% раствора уксусной кислоты в этаноле, перемешивали в течение 10 мин и центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об./мин. 4 мл надосадочной жидкости упаривали потоком азота досуха, растворяли в 1 мл подвижной фазы и фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) перед анализом. Для проведения пробоподготовки по разработанной схеме готовили суспензию пробы путем добавления навески (250 мг пробы мышечной ткани или 10 мг гомогенизированного лекарственного препарата) к 3 мл цитратно-фосфатного буферного раствора (рН 5,0). Диспергирование пробы происходило во время перемешивания на перемешивающем устройстве.

Полученные результаты были сравнены с помощью *F*- и *t*-тестов. Полученные *F*-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные *t*-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи валидируемой и референтной схем (таблица 11). Таким образом, предложенная схема анализа применима для анализа твердофазных образцов.

**Таблица 11** – Результаты определения фторхинолонов в твердофазных образцах ( $n=3$ ,  $P = 0,95$ ,  $F_{кр} = 19,00$ ,  $t_{кр} = 2,78$ )

Проба (содержание аналита)	Аналит	Единица измерения	Введено	Найдено		F- критерий	t- критерий
				ВЭЖХ- ФЛ	ВЭЖХ- МС/МС [312]		
Таблетки «Ломфлоркс» (400 мг)	Ломефлоксацин	мг	–	395±13	403±12	1,17	1,96
Таблетки «Офлоксацин- Тева» (200 мг)	Офлоксацин			202±8	196±9	1,27	2,15
Таблетки «Нолицин» (400 мг)	Норфлоксацин			406±12	398±11	1,19	2,13
Мышечная ткань креветки (<ПО)	Флероксацин	мкг/кг	100	96±11	95±10	1,21	0,29
	Ломефлоксацин			98±11	99±10	1,44	0,28
	Норфлоксацин			97±14	103±11	1,62	1,46
	Офлоксацин			98±11	97±9	1,49	0,30
Мышечная ткань курицы (<ПО)	Флероксацин		150	147±16	144±15	1,14	0,59
	Ломефлоксацин			145±15	147±14	1,15	0,42
	Норфлоксацин			151±17	149±16	1,13	0,37
	Офлоксацин			153±18	155±17	1,12	0,35

Описанные в литературных источниках методы пробоподготовки (таблица 12) предполагают извлечение фторхинолонов из твердофазных проб в водные растворы органических и неорганических кислот или подкисленные полярные органические растворители (ацетонитрил, метанол). Во всех схемах анализа необходимо проведение центрифугирования, а в некоторых случаях, упаривание растворителя. Полученный жидкий экстракт подвергают твердофазной или мицеллярной экстракции для дальнейшего удаления мешающих компонентов и концентрирования. *Разработанная схема характеризуется сопоставимыми с уже известными схемами анализа пределами обнаружения, но при этом не требует проведения многостадийной пробоподготовки, центрифугирования и использования больших количеств органических растворителей и пробы.*

В рамках работы была предложена схема микроэкстракционного выделения фторхинолонов из суспендированных проб на мембранах, импрегнированных высшими карбоновыми кислотами. Разработанный подход был успешно реализован для ВЭЖХ-ФЛ определения аналитов в лекарственных препаратах и пробах мышечной ткани курицы и креветок. Полученные результаты опубликованы в журнале *Analytica Chimica Acta* [314].

**Таблица 12** – Аналитические характеристики методик ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ФЛ определения фторхинолонов в твердофазных пробах и схемы пробоподготовки

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Время пробоподготовки, мин	Масса образца, г	Предел обнаружения	Ссылка
ВЭЖХ-УФ	Лекарственные препараты	Разбавление смесью ацетонитрила и воды, центрифугирование	5	0,05	83 мкг/л	[315]
ВЭЖХ-УФ	Лекарственные препараты	Жидкостная экстракция в метанол или смесь воды и ацетонитрила ультразвуковом поле, фильтрация, разбавление	25	0,1	160 мкг/л	[316]
ВЭЖХ-УФ	Лекарственные препараты	Жидкостная экстракция в смесь воды и ацетонитрила ультразвуковом поле, центрифугирование	25	0,03	180 мкг/л	[317]
ВЭЖХ-УФ	Куриные яйца, ткани креветок	Жидкостная экстракция в раствор трихлоруксусной кислоты, мицеллярная экстракция	885	2	6,8 мкг/кг	[318]

## Продолжение таблицы 12

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Время пробоподготовки, мин	Масса образца, г	Предел обнаружения	Ссылка
ВЭЖХ-ФЛ	Ткани курицы, рыбы	Жидкостная экстракция в смесь 0,3% ортофосфорной кислоты и ацетонитрила (1:1, об.), твердофазная экстракция	20*	2	1,8-8,4 мкг/кг	[319]
ВЭЖХ-ФЛ	Ткани креветок	Жидкостная экстракция в смесь метанола и уксусной кислоты (98:2, об.); твердофазная экстракция	44*	1	15 и 25 мкг/кг	[320]
ВЭЖХ-ФЛ	Ткани креветок, рыбные полуфабрикаты	Жидкостная экстракция в смесь ацетонитрила и метанола (1:1, об.); твердофазная экстракция	5,3*	2	0,24-15 мкг/кг	[321]
ВЭЖХ-ФЛ	Лекарственные препараты, мышечная ткань курицы и креветок	Жидкостная микроэкстракция на мембранах, импрегнированных нонановой кислотой	30	0,01/0,25	12-60 мкг/кг	Данная работа

\*не учитывая время, затрачиваемое на твердофазную экстракцию

#### Микроэкстракционное выделение тетрациклинов.

При реализации схемы микроэкстракционного выделения на мембранах, импрегнированных экстрагентами с «переключаемой гидрофильностью», было выявлено, что процесс массопереноса является кинетически замедленным. Это свойственно методу мембранной жидкостной микроэкстракции в целом, длительность которой может достигать одного-двух часов [322]. Одним из приемов для ускорения экстракционного процесса является вращение в магнитном поле импрегнированной мембраны, закрепленной на носителе с установленным внутри металлически стержнем. Однако и в этом случае извлечение обычно проводят в течение 30 минут и более [323]. Для преодоления кинетических ограничений была предложена модифицированная схема микроэкстракции, включающая *in situ* образование дисперсной фазы экстрагента с «переключаемой гидрофильностью» с ее одновременным выделением на вращающемся пористом гидрофобном диске. Новая схема была использована для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина в твердофазных лекарственных препаратах и моче.

Топология разработанного диска предполагала две однотипные гидрофобные мембраны типа МФФК-065 (сополимер тетрафторэтилена и винилиденфторида; размер пор – 0,65 мкм), между которыми размещалась пленка Parafilm M в форме диска и металлическая проволока (рисунок 48). Мембраны склеивались с пленкой Parafilm M при нагревании, что обеспечивало устойчивость диска к повреждениям при его вращении в пробе с помощью магнитной мешалки.

Предлагаемая схема (рисунок 49) включает образование гомогенного раствора при введении в пробу водного раствора соли высшей карбоновой кислоты и *in situ* генерирование дисперсной фазы экстрагента при подкислении. Образование тонкодисперсной гидрофильной эмульсии способствует ускоренному массопереносу аналитов в органическую фазу. Отделение экстракта происходит на вращающемся пористом гидрофобном диске. После элюирования концентрата полярным органическим растворителем элюат анализируется методом ВЭЖХ-УФ.

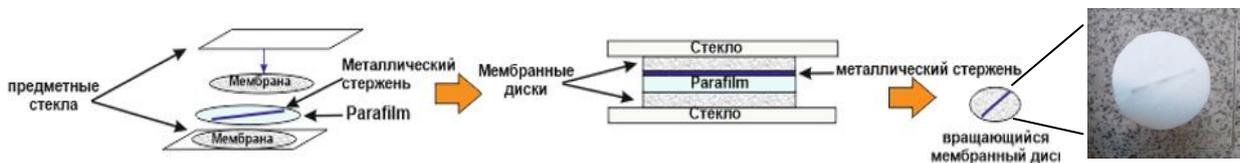


Рисунок 48 – Процедура изготовления мембранного диска

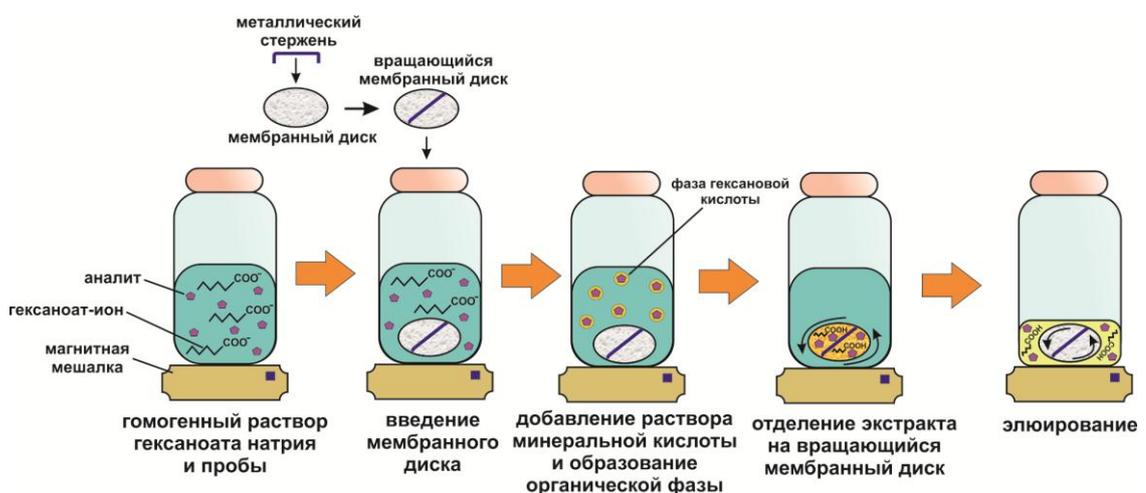
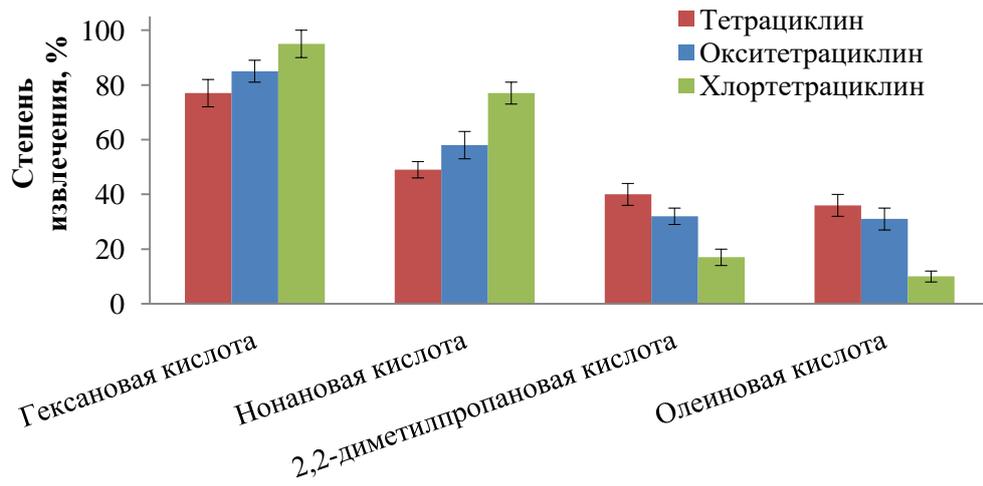


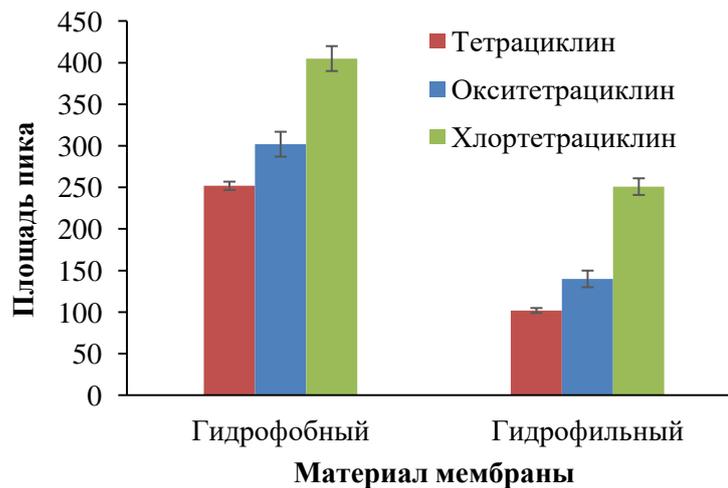
Рисунок 49 – Схема микроэкстракционного концентрирования тетрациклинов, включающая *in situ* образование дисперсной фазы экстрагента с «переключаемой гидрофильностью» с ее одновременным выделением на вращающемся пористом гидрофобном диске, для их последующего ВЭЖХ-УФ определения в лекарственных препаратах и моче

Для достижения максимальной эффективности процесса проводили оптимизацию основных параметров, контролирующих протекание стадий извлечения и элюирования. Первоначально был изучен ряд высших карбоновых кислот (2,2-диметилпропановая, гексановая, нонановая и олеиновая) в качестве экстрагентов для извлечения тетрациклинов. К 1 мл раствора тетрациклинов (25 мг/л) добавляли 0,1 мл 3,6 моль/л раствора 2,2-диметилпропаноата, гексаноата, нонаноата или олеата натрия и помещали внутрь пористый мембранный диск. После подкисления 20 мкл 6 моль/л раствора соляной кислоты образовывалась эмульсия и органическую фазу выделяли на вращающийся в магнитном поле диск в течение 10 мин при 600 об./мин. Затем осуществляли элюирование 300 мкл метанола в течение 10 минут при вращении диска в другом флаконе. Элюат отбирали и анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Было показано, что наиболее эффективным экстрагентом для извлечения тетрациклинов является гексановая кислота, что можно объяснить формированием стабильной эмульсии и относительной полярностью, благоприятной для извлечения цвиттер-ионных форм тетрациклинов (рисунок 50). Нонановая и олеиновая кислоты являются более гидрофобными, вследствие чего протекает быстрая агломерация микрокапель экстрагента и его выделение в виде отдельной фазы, что затрудняет ее поглощение вращающимся диском. Несмотря на устойчивость эмульсии 2,2-диметилпропановой кислоты, ее относительно высокая растворимость в водной фазе снижает ее экстрагирующую способность.

Материал мембраны играет важную роль в процессах выделения экстракта из водной фазы и его удерживания в поровом пространстве. Было исследовано два типа коммерчески доступных мембран: гидрофильная – ММК-065 (материал – полиамид, размер пор 0,65 мкм) и гидрофобная – МФФК-065 (материал – сополимер политетрафторэтилена и поливинилиденфторида, размер пор 0,65 мкм). Как видно из рисунка 51, эффективность экстракции в случае гидрофобной мембраны значительно выше, что обусловлено гидрофобными взаимодействиями между мембраной и экстрагентом, обеспечивающими более полное выделение и стабильность органической фазы.

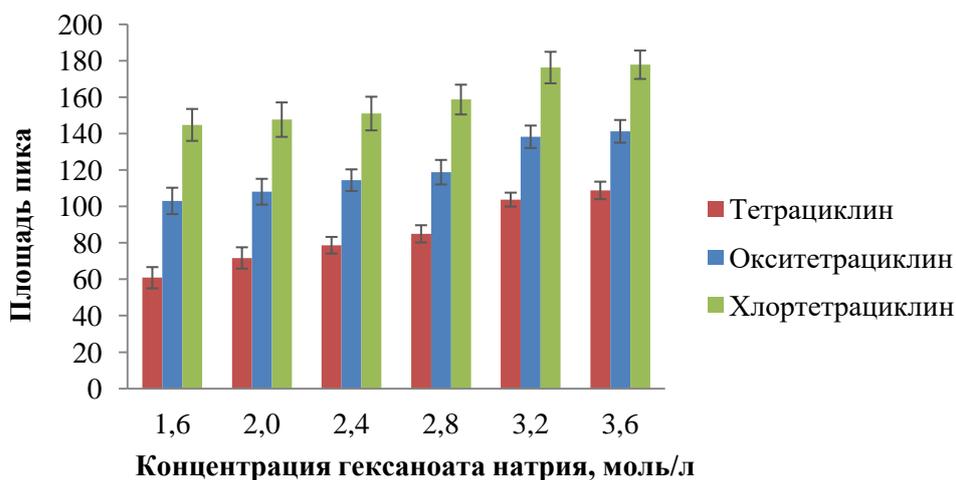


**Рисунок 50** – Влияние природы экстрагента на степени извлечения тетрациклинов (тип мембраны – МФФК-065; диаметр диска – 15 мм; объем пробы – 1 мл; концентрация натриевой соли высшей карбоновой кислоты – 3,2 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время выделения и элюирования – 10 мин; элюент – метанол; объем элюента – 300 мкл;  $n=3$ )



**Рисунок 51** – Влияние материала мембраны на площади хроматографических пиков тетрациклинов (диаметр диска – 15 мм; объем пробы – 1 мл; концентрация гексаноата натрия – 3,2 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время выделения и элюирования – 10 мин; элюент – метанол; объем элюента – 300 мкл;  $n=3$ )

Концентрация гексаноата натрия влияет на объем выделяющейся органической фазы, который в свою очередь определяет стабильность эмульсии и эффективность экстракции. Данный параметр варьировали в диапазоне от 1,6 до 3,6 моль/л. Наблюдалось постепенное увеличение аналитических сигналов, связанное с увеличением объема экстрагента, вплоть до концентрации равной 3,2 моль/л, которая была выбрана в качестве оптимальной (рисунок 52).

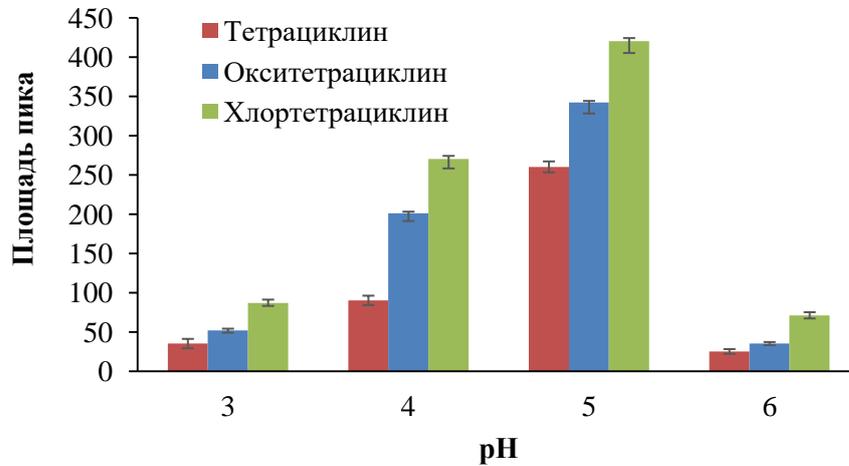


**Рисунок 52** – Влияние концентрации гексаноата натрия на площади хроматографических пиков тетрациклинов (диаметр диска – 15 мм; объем пробы – 1 мл;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время выделения и элюирования – 10 мин; элюент – метанол; объем элюента – 500 мкл;  $n=3$ )

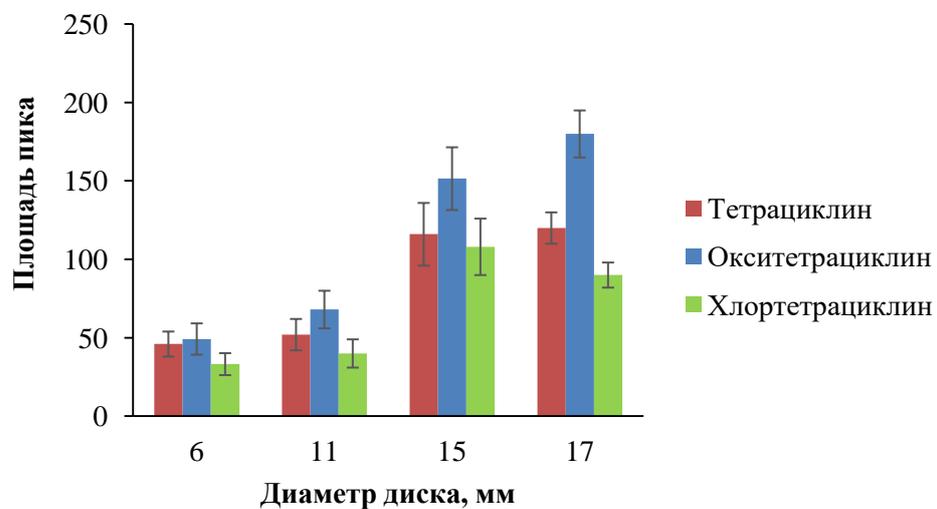
Кислотность водной фазы во многом определяет способность аналитов переходить в органическую фазу. Тетрациклины, как амфотерные соединения, пребывают в четырех различных формах в зависимости от pH раствора (таблица 1). Катионная форма образуется в сильнокислой среде, в слабокислой и нейтральной преобладает цвиттер-ионная форма, а в щелочной среде тетрациклины переходят в анионные формы. Для регулирования pH водной фазы экстракцию проводили, используя от 15 до 30 мкл 6 моль/л раствора соляной кислоты. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что аналиты извлекаются наилучшим образом в цвиттер-ионной форме при  $\text{pH}=5$  и объеме раствора соляной кислоты равному 20 мкл (рисунок 53). При увеличении pH экстрагент начинает диссоциировать, а аналиты переходят в анионные формы, что снижает эффективность экстракции. В более кислых средах образуются протонированные формы, которые плохо извлекаются в неполярный экстрагент.

Диаметр вращающегося диска должен быть достаточным для полного поглощения органической фазы и обеспечивать элюирование как можно меньшим объемом элюента. Данную величину варьировали в интервале от 6 до 17 мм. Наименьший диаметр, удовлетворяющий предъявляемым требованиям, составил 15 мм и был выбран в качестве оптимального (рисунок 54). При меньших

диаметрах общий объем пор был недостаточен для удержания органической фазы, а при больших – исключается возможность снижения объема элюента для достижения более высоких коэффициентов концентрирования.



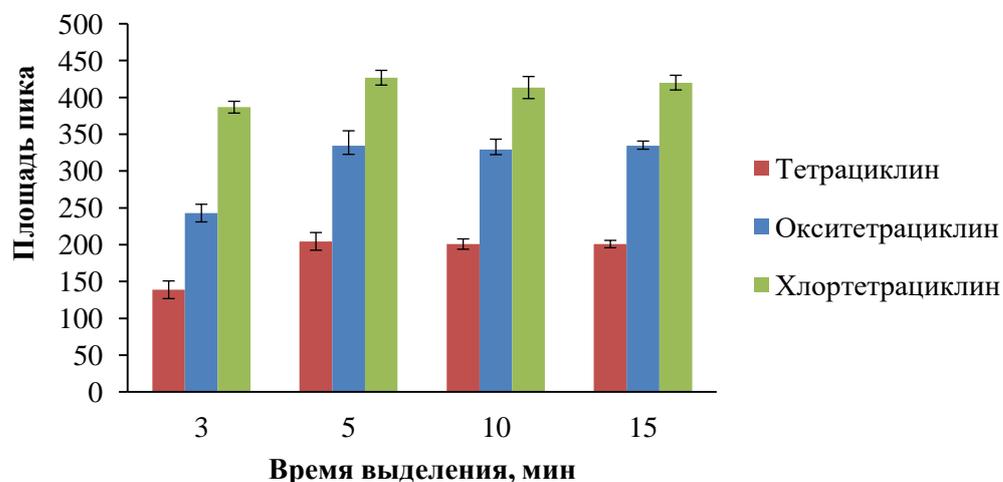
**Рисунок 53** – Влияние pH водной фазы на площади хроматографических пиков тетрациклинов (диаметр диска – 15 мм; объем пробы – 1 мл; концентрация гексаноата натрия – 3,2 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время выделения и элюирования – 10 мин; элюент – метанол; объем элюента – 300 мкл;  $n=3$ )



**Рисунок 54** – Влияние диаметра диска на площади хроматографических пиков тетрациклинов (объем пробы – 1 мл; концентрация гексаноата натрия – 3,2 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время выделения и элюирования – 10 мин; элюент – метанол; объем элюента – 500 мкл;  $n=3$ )

Еще одним параметром, оказывающим влияние на полноту выделения органической фазы, является время, в течение которого протекает данный процесс. При вращении диска микрокапли экстракта постепенно проникают в поры мембраны и в конечном итоге эмульсия разрушается. Время выделения

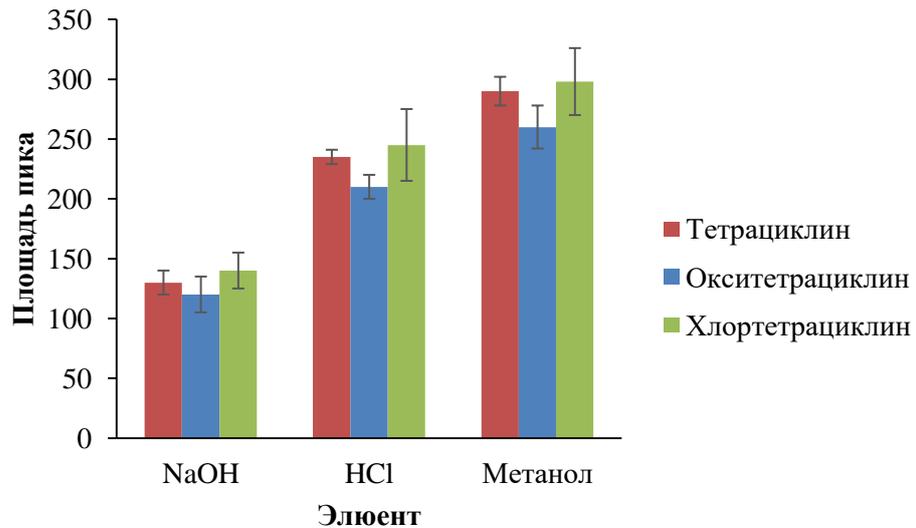
изучали в диапазоне от 3 до 15 минут. Было обнаружено, что наибольший аналитический сигнал за наименьшее время достигается при выделении экстракта на вращающийся диск в течение 5 минут (рисунок 55).



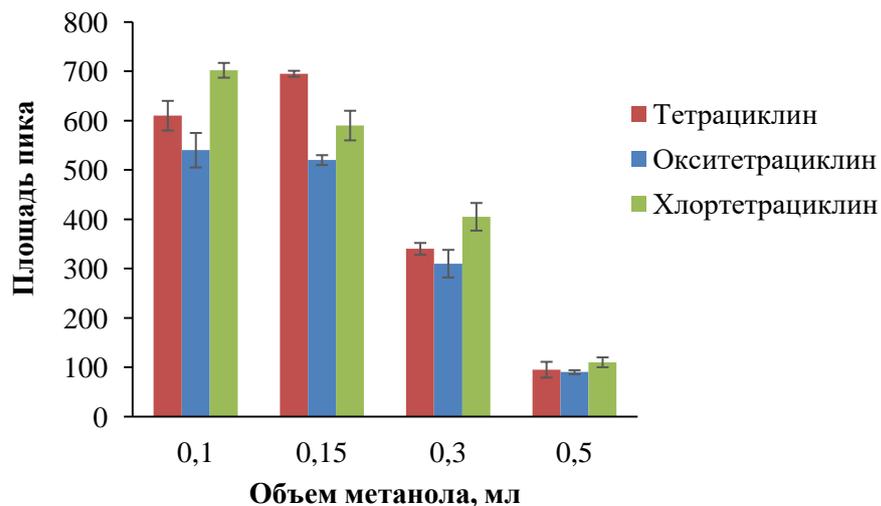
**Рисунок 55** – Влияние времени выделения органической фазы на площади хроматографических пиков тетрациклинов (объем пробы – 1 мл; концентрация гексаноата натрия – 3,2 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время элюирования – 10 мин; элюент – метанол; объем элюента – 300 мкл;  $n=3$ )

В качестве элюентов были изучены метанол, а также водные растворы гидроксида натрия (0,5 моль/л) и соляной кислоты (0,5 моль/л). Метанол характеризуется высокой растворимостью в нем экстрагента и аналитов. Раствор гидроксида натрия обладает похожими свойствами: элюирование происходит в результате диссоциации высшей карбоновой кислоты в щелочной среде и перехода аналитов в анионные формы. Предполагалось, что раствор соляной кислоты может обеспечить элюирование за счет образования катионных форм аналитов, имеющих большую растворимость в водной фазе. На основании экспериментальных результатов было выявлено, что оптимальным элюентом является метанол (рисунок 56). Элюенты на водной основе оказались менее предпочтительны из-за возможной деградации аналитов в сильнощелочной среде и неполной рекстракции в сильнокислой среде, в частности из-за вероятной кинетической замедленности такого процесса. Для полного элюирования необходимо вращение диска в элюенте в течение 5 мин.

Объем элюента должен быть достаточным для полного элюирования органической фазы. Для изучения влияния данного параметра на величину аналитического сигнала проводили элюирование различными объемами метанола (от 0,1 до 0,5 мл). Было установлено, что наименьший возможный объем элюента демонстрирует наилучшие результаты (рисунок 57). Увеличение объема приводит к разбавлению и снижению чувствительности при определении аналитов методом ВЭЖХ-УФ.



**Рисунок 56** – Влияние природы элюента на площади хроматографических пиков тетрациклинов (объем пробы – 1 мл; концентрация гексаноата натрия – 3,2 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время элюирования – 10 мин; объем элюента – 300 мкл;  $n=3$ )



**Рисунок 57** – Влияние объема метанола (элюента) на площади хроматографических пиков тетрациклинов (объем пробы – 1 мл; концентрация гексаноата натрия – 3,2 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 25$  мг/л; время элюирования – 10 мин;  $n=3$ )

В выбранных условиях были установлены аналитические и метрологические характеристики разработанной схемы. Для окситетрациклина, тетрациклина и хлортетрациклина градуировочные зависимости были линейны в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мг/л ( $r=0,999$ ,  $0,997$  и  $0,998$  соответственно), а пределы обнаружения составили 0,03 мг/л. Повторяемость ( $n=5$ ) находилась в интервале от 5 до 8% для нижней и верхней границы диапазона определяемых концентраций, а внутрилабораторная воспроизводимость ( $n=5$ ) – в диапазоне от 8 до 12%. Извлечение аналитов и элюирование в совокупности занимают 10 минут. Степени извлечения составили  $78\pm 3\%$ ,  $84\pm 4\%$  и  $91\pm 5\%$  для тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина соответственно.

Для подтверждения правильности получаемых результатов применяли метод «введено-найдено», а также проводили анализ в соответствии с референтным методом ВЭЖХ-ФЛ [324]. Подвижная фаза состояла из метанола и буферного раствора (рН 6,5), содержащего малоновую кислоту и хлорид магния. Длины волн возбуждения и эмиссии составляли 375 и 535 нм соответственно. Пробоподготовка мочи и раствора для инъекций [325] включала следующие этапы: к 500 мкл пробы, доведенной до рН 8,0 при помощи 1,5 моль/л раствора гидроксида натрия, добавляли 1,5 мл метанола и 1,5 мл ацетонитрила, перемешивали и центрифугировали в течение 5 минут при 5000 об./мин. Для экстракции тетрациклинов из твердых лекарственных форм 250 мг гомогенизированной пробы смешивали с 25 мл метанола и проводили извлечение в течение 5 минут при перемешивании на магнитной мешалке [326]. Надосадочную жидкость в обоих случаях фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм).

Полученные результаты были сравнены с помощью  $F$ - и  $t$ -тестов. Полученные  $F$ -значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные  $t$ -значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи валидируемой и референтной схем (таблица 13).

**Таблица 13** – Результаты определения тетрациклинов в моче и лекарственных препаратах ( $n=3$ ,  $P = 0,95$ ,  $F_{кр} = 19,00$ ,  $t_{кр} = 2,78$ )

Проба (содержание аналита)	Аналит	Единица измерения	Введено	Найдено		F- критерий	t- критерий
				ВЭЖХ- УФ	ВЭЖХ- ФЛ [324]		
Моча (<ПО)	Тетрациклин	мг/л	1,00	1,05±0,08	1,07±0,09	1,27	0,72
	Окситетрациклин		1,00	0,97±0,07	1,03±0,08	1,31	2,44
	Хлортетрациклин		1,00	0,98±0,07	1,02±0,06	1,36	1,88
	Тетрациклин		10,0	8,2±0,6	8,4±0,7	1,36	0,94
	Окситетрациклин		10,0	9,1±0,8	8,5±0,6	1,78	2,59
	Хлортетрациклин		10,0	8,2±0,7	8,3±1,2	2,94	0,31
	Тетрациклин		25,0	25,1±0,5	24,1±1,6	10,24	2,58
	Окситетрациклин		25,0	27,4±2,7	26,1±1,4	3,72	1,85
	Хлортетрациклин		25,0	24,2±1,1	24,1±1,5	1,86	0,23
Таблетки «Тетрациклин- ЛекТ» (100 мг)	Тетрациклин	мг	-	99±6	98±7	1,36	0,47
Таблетки «Метрици- клин» (929 мг)	Хлортетрациклин		-	934±51	939±54	1,12	0,29
Раствор для инъекций «Окситетраци- клин 100» (93 мг/мл)	Окситетрациклин	мг/мл	-	95±4	94±5	1,56	0,68

Предложенная схема не уступает по чувствительности существующим методам ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в лекарственных препаратах и моче, а в ряде случаев обеспечивает более низкие пределы обнаружения, чем у аналогов (таблица 14). **Одним из главных преимуществ разработанной схемы является экспрессность пробоподготовки.** Имеющиеся подходы к выделению аналитов на вращающуюся импрегнированную мембрану требуют от 30 до 45 мин для достижения равновесия [323, 327]. Проведение электромембранной микроэкстракции позволяет уменьшить время извлечения до 10–20 мин [328]. В данной работе для выделения аналитов из раствора пробы необходимо 5 мин. **Кроме того, по сравнению с твердофазной экстракцией предложенная схема не требует больших объемов органических растворителей для элюирования.**

***К недостаткам представленного подхода относится необходимость предварительного изготовления одноразовых дисков.***

**Таблица 14** – Аналитические характеристики методик ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в лекарственных препаратах и моче

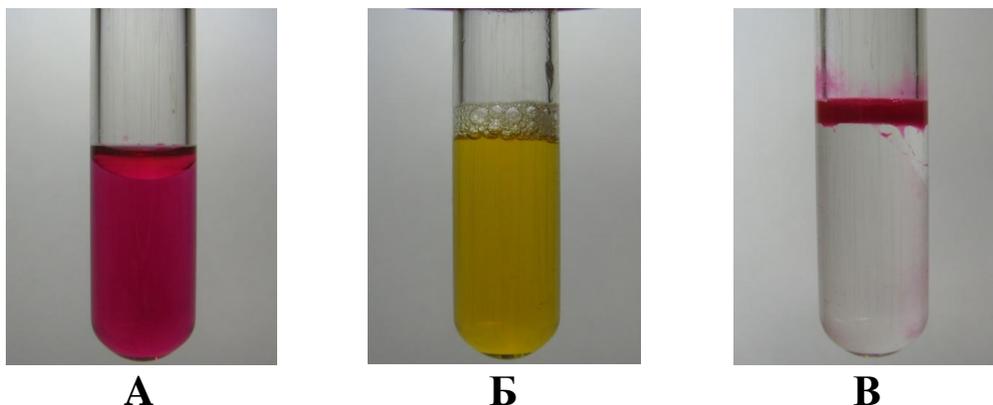
Объект анализа	Схема пробоподготовки	Аналит	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Ссылка
Твердые лекарственные формы	Жидкостная экстракция в дистиллированную воду и дериватизация с ионами Au(III) и Hg(II)	Тетрациклин	10–150 мг/л	2,5–2,6 мг/л	[329]
	Жидкостная экстракция в водный раствор о-фосфорной кислоты в ультразвуковом поле	Тетрациклин	0,8–0,16 г/л	-	[330]
Моча	Твердофазная экстракция	Окситетрациклин	0,81–20 мкг/л	0,37 мкг/л	[325]
		Хлортетрациклин	0,40–20 мкг/л	0,22 мкг/л	
	Удаление белков смесью метанола и ацетонитрила	Окситетрациклин	-	0,65 мкг/л	
		Хлортетрациклин	-	0,51 мкг/л	
	Автоматизированная мицеллярная микроэкстракция в н-октиламин	Тетрациклин	0,5–20 мг/л	170 мкг/л	[99]
	Трехфазная мембранная жидкостная микроэкстракция	Тетрациклин	0,4–4 мг/л	0,08 мг/л	[331]
Окситетрациклин		1,4–32 мг/л	0,8 мг/л		
Хлортетрациклин		1,6–18 мг/л	0,7 мг/л		
Твердые и жидкие лекарственные формы, моча	Жидкостная микроэкстракция в гексановую кислоту с выделением экстракта на мембранном диске	Тетрациклин, окситетрациклин и хлортетрациклин	0,1–100 мг/л	30 мкг/л	Данная работа

По итогам проведенных исследований была разработана схема микроэкстракционного концентрирования тетрациклинов, предполагающая *in situ* образование дисперсной фазы гексановой кислоты с ее одновременным выделением на вращающемся пористом гидрофобном диске. Предложенный подход был успешно апробирован при анализе лекарственных препаратов и проб мочи. Результаты работы отражены в статье в журнале *Journal of Chromatography A* [332].

*Микроэкстракционное выделение сульфаниламидов.*

Поиск новых эффективных, экологически безопасных и доступных экстрагентов остается важной задачей в области методов разделения и концентрирования. В рамках настоящей работы впервые была изучена и обоснована возможность применения ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоты и ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью».

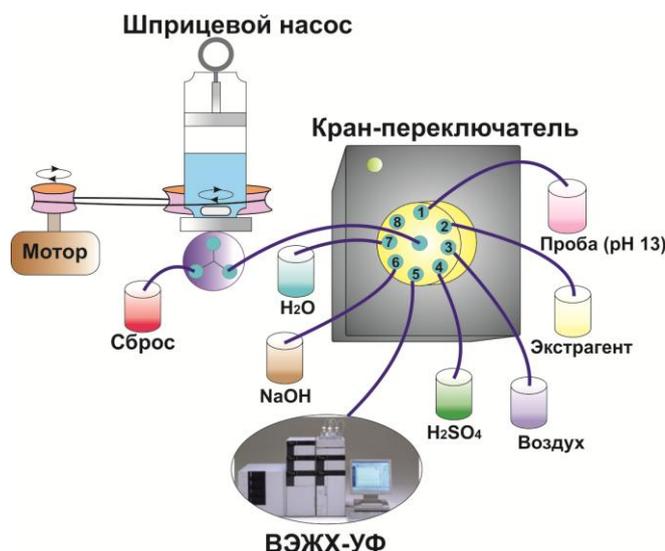
Ди-(2-этилгексил)-фосфорная кислота в смеси с другими растворителями нашла применение, в основном, для экстракции и разделения переходных элементов за счет образования комплексных соединений [333], а также как ион-парный агент для извлечения органических веществ [334]. В данной работе установлено, что ди-(2-этилгексил)-фосфорная кислота способна солубилизироваться в щелочных средах и образовывать собственную фазу при подкислении (рисунок 58).



**Рисунок 58** – Демонстрация фазового поведения изучаемой экстракционной системы в присутствии красителя: смесь водного раствора нейтрального красного (2,7 мл, 10 мг/л, нижняя фаза) и ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоты (0,175 мл, верхняя фаза) (А), гомогенный раствор после добавления раствора гидроксида натрия (0,3 мл, 4 моль/л) к смеси А (Б) и фазовое разделение после добавления раствора серной кислоты (0,21 мл, 3 моль/л) и извлечения нейтрального красного в органическую фазу

Кроме того, разделение фаз в экстракционной системе происходит относительно быстро и самопроизвольно. Эти особенности позволили реализовать микроэкстракционный процесс непосредственно в камере шприцевого насоса, где перемешивание фаз пузырьками газа невыполнимо. Для

ВЭЖХ-УФ определения сульфаниламидов в моче и лекарственных препаратах была разработана гидравлическая схема, предполагающая коммутацию шприцевого насоса с восьмифазовым краном-переключателем (рисунок 59). Такой подход ранее не был реализован для автоматизации микроэкстракции в экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью» и отличается простотой и экспрессностью.

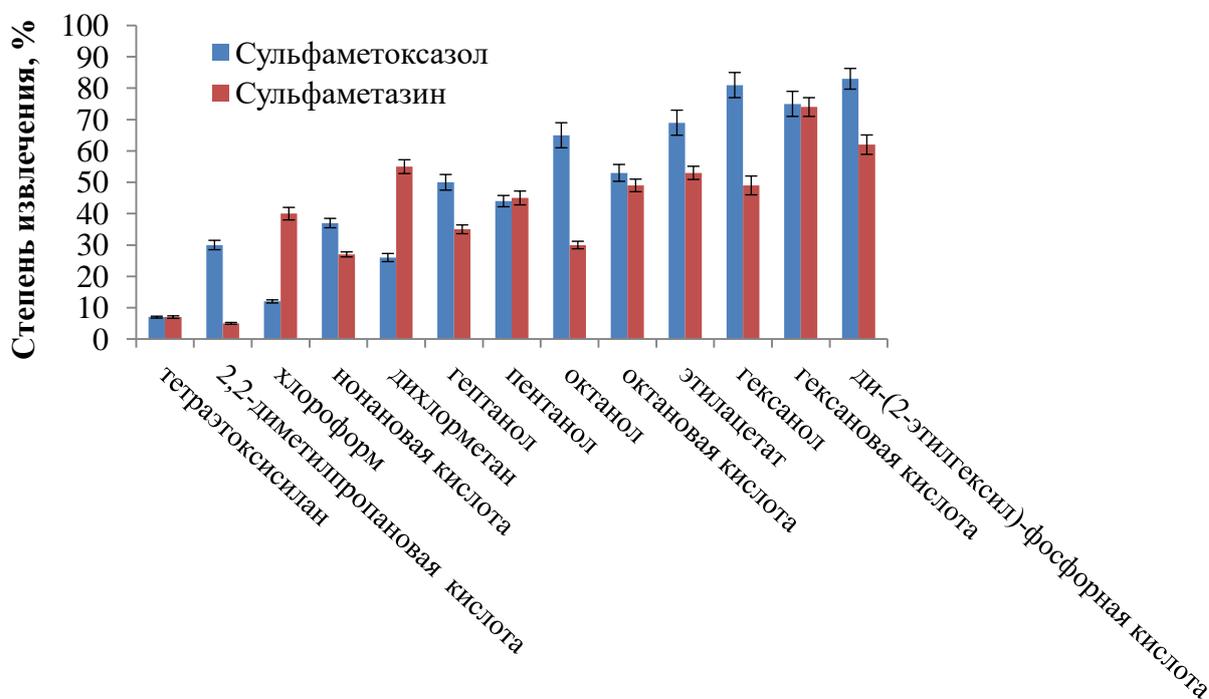


**Рисунок 59** – Гидравлическая схема автоматизированного определения сульфаниламидов в гомогенных растворах (лекарственные препараты, моча)

В соответствии с разработанной схемой анализа в камеру шприцевого насоса последовательно отбираются щелочной раствор пробы и экстрагент с образованием гомогенного раствора ди-(2-этилгексил)фосфата натрия в пробе при перемешивании. Для конверсии экстрагента в гидрофобную форму и выделения органической фазы в камеру подается раствор минеральной кислоты. Водная фаза направляется на сброс, а экстракт направляется в автосамплер системы ВЭЖХ-УФ.

На первоначальном этапе с целью сравнения эффективности извлечения сульфаниламидов в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту и известные экстрагенты были найдены степени их извлечения в статических условиях (рисунок 60). При соотношении органической и водной фаз равном 1:5 ди-(2-этилгексил)-фосфорная кислота обеспечила максимальные степени извлечения, которые составили для сульфаметоксазола и сульфаметазина  $83 \pm 3$  и  $62 \pm 3\%$  соответственно. Для неполярных растворителей (насыщенные и ароматические

углеводороды, полностью галогенированные алканы) степени извлечения составили не более 5%, в то время как для относительно полярных растворителей (жирные спирты и кислоты, этилацетат) – от 20 до 70%, что соответствует природе аналитов, представляющих собой амфотерные соединения.

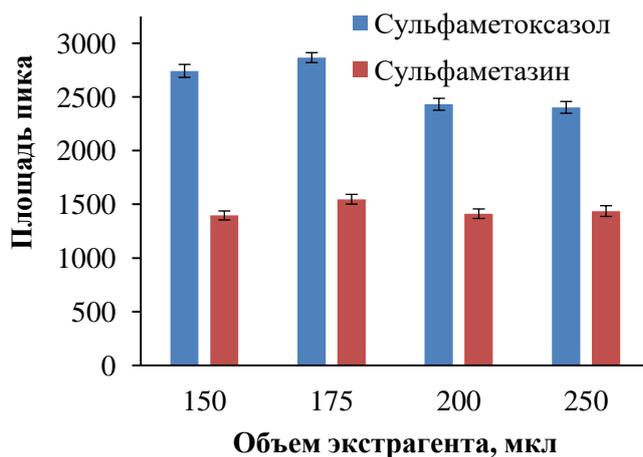


**Рисунок 60** – Влияние природы экстрагента на степень извлечения сульфаметоксазола и сульфаметазина (время экстракции – 10 мин;  $C_{\text{аналита}} = 1$  мг/л; соотношение органической и водной фаз 1:5;  $n=3$ )

Среди факторов, оказывающих влияние на эффективность экстракции, исследовались объемы экстрагента и пробы, а также природа и объем раствора минеральной кислоты.

Объем экстрагента является важным параметром, напрямую влияющим на степени извлечения. Для установления его оптимального значения в камеру шприцевого насоса (рисунок 59) последовательно отбирались 1,2 мл щелочного раствора пробы ( $C(\text{NaOH}) =$  от 0,47 до 0,60 моль/л), от 150 до 250 мкл экстрагента и 1,2 мл щелочного раствора пробы ( $C(\text{NaOH}) =$  от 0,47 до 0,60 моль/л). Далее в течение 15 с осуществлялось перемешивание с помощью магнитной мешалки до получения гомогенного раствора ди-(2-этилгексил)фосфата натрия в пробе. Затем посредством шприцевого насоса отбиралось 200 мкл раствора серной кислоты (от 2,8 до 3,6 моль/л) при

перемешивании магнитной мешалкой, вследствие чего происходило выделение и концентрирование аналитов в образующую органическую фазу фосфорорганической кислоты. Далее водная фаза направлялась на сброс, а органическая фаза – в хроматографическую вials, содержащую 200 мкл метанола и находящуюся в автосамплере для последующего ВЭЖХ-УФ анализа. Концентрацию гидроксида натрия в пробе варьировали, так как при увеличении объема экстрагента требуется больше реагента для образования водорастворимой соли. Концентрацию серной кислоты выбирали так, чтобы количества щелочи и кислоты были эквимольны. Оптимальный объем экстрагента составил 175 мкл, так как он обеспечивал наибольший аналитический сигнал, а при дальнейшем увеличении объема преобладало влияние разбавления органической фазы (рисунок 61).

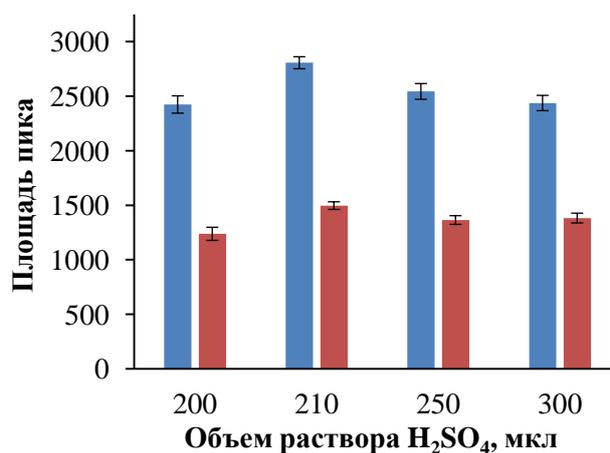


**Рисунок 61** – Влияние объема экстрагента на площади хроматографических пиков сульфаметоксазола и сульфаметазина (объем пробы – 2,4 мл; концентрация гидроксида натрия – от 0,47 до 0,60 моль/л; объем раствора серной кислоты – 200 мкл; концентрация раствора серной кислоты – от 2,8 до 3,6 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 10$  мг/л;  $n=3$ )

В качестве минеральных кислот, вызывающих фазовое разделение, были изучены соляная, серная и ортофосфорная. Существенных различий в величине площадей хроматографических пиков не наблюдалось, поэтому для дальнейших экспериментов выбрали серную кислоту, так как в этом случае требуется наименьшая концентрация реагента.

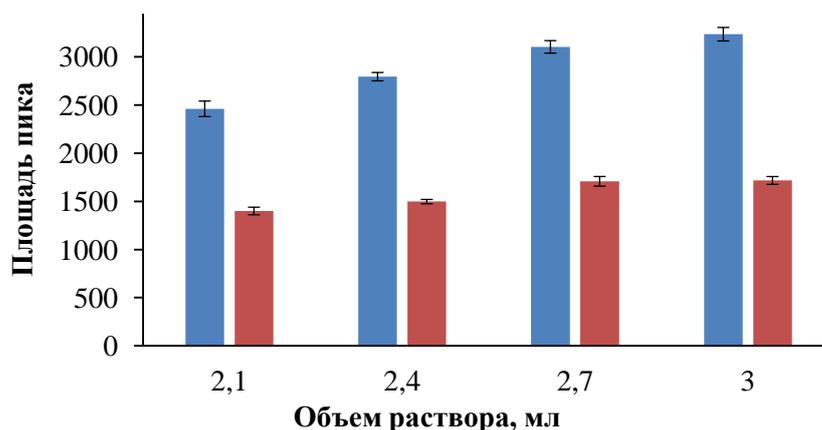
Сульфаниламиды имеют две функциональные группы, участвующие в кислотно-основных взаимодействиях: ароматическую аминогруппу и

сульфаниламидную группу (таблица 1). Первая из них протонируется в сильноокислых средах и при  $pH < pK_{a1}$  преимущественно существует в катионной форме. Вплоть до слабокислой среды преобладает молекулярная форма с отсутствием заряда на функциональных группах. Сульфаниламидная группа депротонируется в слабокислой или слабощелочной средах и при  $pH > pK_{a2}$  преимущественно образуется анионная форма. Объем раствора серной кислоты оказывает влияние на эффективность экстракции за счет изменения кислотности водной фазы. Было обнаружено, что наиболее эффективное извлечение аналитов происходит при  $pH = 2,5 \pm 0,1$  при добавлении эквимольного количества серной кислоты (0,21 мл, 3 моль/л) по отношению к гидроксиду натрия, введенному в пробу (рисунок 62). В таких условиях преобладают молекулярные формы аналитов.



**Рисунок 62** – Влияние объема раствора серной кислоты на площади хроматографических пиков сульфаметоксазола и сульфаметазина (объем экстрагента – 175 мкл; объем пробы – 2,4 мл; концентрация гидроксида натрия – 0,53 моль/л; концентрация раствора серной кислоты – 3 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 10$  мг/л;  $n=3$ )

Для достижения наивысших коэффициентов концентрирования варьировали объем пробы, и на основании полученных результатов было выявлено, что при увеличении объема пробы аналитические сигналы возрастают. В качестве оптимального объема выбрали 3 мл, что обусловлено ограничениями размеров камеры шприцевого насоса (рисунок 63).



**Рисунок 63** – Влияние объема раствора пробы на площади хроматографических пиков сульфаметоксазола и сульфаметазина (объем экстрагента – 175 мкл; концентрация гидроксида натрия – от 0,42 до 0,60 моль/л; объем раствора серной кислоты – 210 мкл; концентрация раствора серной кислоты – 3 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 10$  мг/л;  $n=3$ )

В найденных условиях градуировочные зависимости были линейны в диапазонах от 0,06 до 50 мг/л ( $r=0,999$ ) от 0,13 до 50 мг/л ( $r=0,999$ ) для сульфаметоксазола и сульфаметазина соответственно. Пределы обнаружения составили 0,02 мг/л для сульфаметоксазола и 0,03 мг/л для сульфаметазина. Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность для нижней и верхней границы диапазона определяемых концентраций составили от 2 до 3 % и от 3 до 4% ( $n=5$ ) соответственно. Длительность стадии пробоподготовки – 5 минут. Коэффициенты концентрирования были равны  $7,8 \pm 0,4$  и  $3,4 \pm 0,2$  для сульфаметоксазола и сульфаметазина соответственно.

Расчет коэффициентов концентрирования ( $E$ ) проводили по следующей формуле:

$$E = \frac{C_{\text{э}}}{C_{\text{и}}},$$

где  $C_{\text{и}}$  и  $C_{\text{э}}$  – концентрации аналита в исходном растворе и фазе экстрагента соответственно, мг/л.

Для подтверждения правильности получаемых результатов применяли метод «введено-найдено», а также проводили анализ в соответствии с референтным методом [335]. Пробоподготовка мочи или раствора для инъекций [325] осуществлялась таким же образом, как и в случае тетрациклинов. Затем полярные органические растворители упаривали на водяной бане при  $40^{\circ}\text{C}$ ,

растворяли остаток в 0,25 мл водного раствора соляной кислоты (3 моль/л) и добавляли 0,25 мл 3,5 моль/л раствора ацетата натрия и 0,1 мл 0,2 % раствора флуорескамина для дериватизации. Перемешивали и через 20 мин анализировали методом ВЭЖХ-ФЛ. Подвижная фаза состояла из смеси ацетонитрила и 2 % водного раствора уксусной кислоты. Длины волн возбуждения и эмиссии равнялись 405 и 495 нм соответственно.

Полученные результаты были сравнены с помощью *F*- и *t*-тестов. Полученные *F*-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные *t*-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи валидируемой и референтной схем (таблица 15).

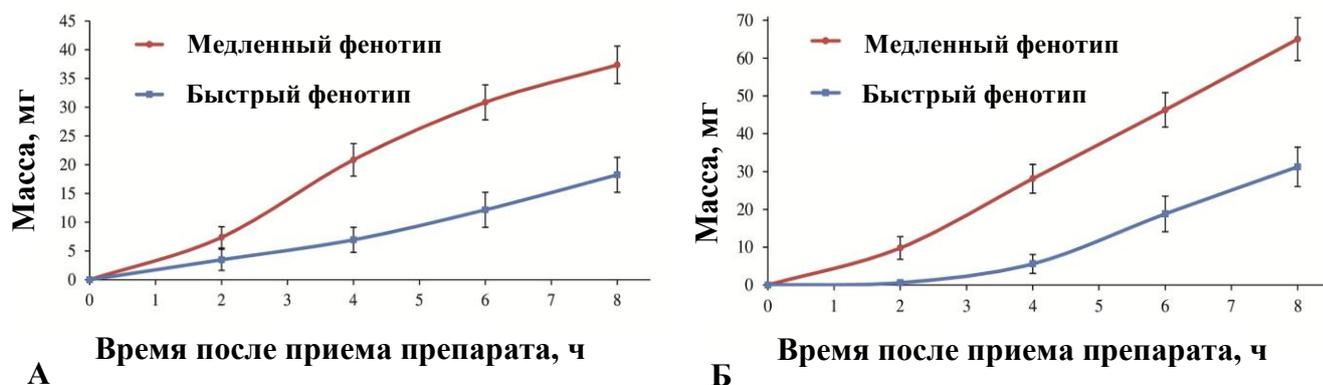
**Таблица 15** – Результаты определения сульфаниламидов в моче и лекарственных препаратах ( $n=3$ ,  $P = 0,95$ ,  $F_{кр} = 19,00$ ,  $t_{кр} = 2,78$ )

Проба (содержание аналита)	Аналит	Единица измерения	Введено	Найдено		F- критерий	t- критерий
				ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-ФЛ [335]		
Моча (<ПО)	Сульфаметоксазол	мг/л	5,00	4,20 ± 0,40	4,24 ± 0,22	3,31	0,38
	Сульфаметазин		5,00	4,93 ± 0,17	4,90 ± 0,50	8,65	0,25
	Сульфаметоксазол		20,0	16,3 ± 1,3	16,6 ± 0,9	2,09	0,82
	Сульфаметазин		20,0	19,4 ± 0,9	18,8 ± 1,5	2,78	1,48
	Сульфаметоксазол		40,0	36,4 ± 1,2	37,4 ± 1,3	1,17	2,44
	Сульфаметазин		40,0	37,9 ± 1,6	37,3 ± 0,6	7,11	1,52
Раствор для инъекций «Дитрим» (200 мг/мл)	Сульфаметазин	мг/мл	-	204±7	203±8	1,31	0,41

С помощью разработанной схемы была изучена экскреция сульфаметоксазола и сульфаметазина с мочой добровольцев ( $n=44$ ). Исследования проводились совместно с проф. С.Ю. Гармоновым (Казанский национальный исследовательский технологический университет). Под действием фермента N-ацетилтрансферазы в печени образуются ацетильные метаболиты сульфаниламидов. Определение степени ацетилирования сульфаниламидов в моче является технически простой и информативной операцией, позволяющей судить о фенотипе ацетилирования, оценка которого необходима в рамках персонализированной медицины для подбора лекарственных препаратов и режима их дозирования. Параметры экскреции сульфаниламидов в группе

обследуемых распределяются бимодально, что позволяет формировать группы быстрых и медленных ацетиляторов в зависимости от индивидуальных различий в активности N-ацетилтрансферазы [336].

На основе определения концентрации сульфаметоксазола и сульфаметазина в почасовых пробах мочи были получены фармакокинетические кривые кумулятивной экскреции лекарственных веществ с мочой (рисунок 64). Быстрому фенотипу ацетилирования соответствует меньшая экскреция и, наоборот, медленному фенотипу – более высокая экскреция. Было обнаружено, что площади под кривыми в пределах от приема препарата до 8 ч ( $AUC_{8ч}$ ) различаются у быстрых и медленных ацетиляторов более чем в 2 раза, что позволяет проводить надежное установление фенотипа. Контрольное фенотипирование у добровольцев проводилось с помощью гидразида изоникотиновой кислоты в дозе 0,6 г [337]. На основании полученных данных соотношение ацетиляторных фенотипов у добровольцев составляет 55% медленных и 45% быстрых ацетиляторов, что согласуется со сведениями из литературы [338].



**Рисунок 64** – Фармакокинетические кривые для быстрых (снизу) и медленных (сверху) ацетиляторов после приема 0,4 г сульфаметоксазола (А) или 0,5 г сульфаметазина (Б) (n=44)

Предложенные в литературе (таблица 16) методы ВЭЖХ-УФ и спектрофотометрического определения сульфаметоксазола и сульфаметазина в лекарственных препаратах и моче предполагают разбавление пробы полярными органическими растворителями, растворами кислот и буферными растворами. В некоторых случаях далее проводится жидкостная или твердофазная экстракция и дериватизация. *Преимуществом разработанной схемы является возможность*

*проводить пробоподготовку экспрессно и в автоматизированном режиме. Также достигнуты более низкие пределы обнаружения по сравнению с существующими схемами [325, 339-341].*

**Таблица 16** – Аналитические характеристики методик спектрофотометрического и ВЭЖХ-УФ определения сульфаметоксазола и сульфаметазина в лекарственных препаратах и моче

Метод	Объект анализа	Аналиты	Пробоподготовка	Линейный диапазон, мг/л	Предел обнаружения, мкг/л	Ссылка
Спектрофотометрия	Лекарственные препараты	Сульфаметоксазол	Жидкостная экстракция в этанол в ультразвуковом поле или разбавление	4–25	-	[343]
		Сульфаметоксазол	Жидкостная экстракция в раствор соляной кислоты	5-50	400	[340]
ВЭЖХ-УФ		Сульфаметоксазол	Разбавление смесью этанола и воды	1–16	130	[339]
ВЭЖХ-УФ	Моча	Сульфаметоксазол, сульфаметазин	Разбавление метанолом и ацетонитрилом, твердофазная экстракция	0,42-20	120	[325]
				0,25-20	70	
		Сульфаметазин	Разбавление водой, экстракция из гомогенного раствора с высаливанием	0,01-10	3,8	[86]
		Сульфаметоксазол	Дериватизация	1-20	100	[341]
		Сульфаметоксазол	Разбавление раствором соляной кислоты в метаноле	0,1-300	100	[344]
		Сульфаметоксазол	Разбавление фосфатным буферным раствором	0,1-60	35	[345]
		Сульфаметоксазол, сульфаметазин	Разбавление раствором гидроксида натрия, автоматизированная микроэкстракция из гомогенного раствора в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту	0,06-50 0,13-50	20 40	Данная работа

В рамках работы была разработана автоматизированная схема микроэкстракционного выделения сульфаниламидов из лекарственных препаратов и мочи в ди-(2-этилгексил)-фосфорную кислоту. Полученные результаты опубликованы в журнале *Talanta* [342].

ГЭР представляют собой «дизайнерские» растворители, комбинируя их прекурсоры можно получать экстрагенты с требуемыми свойствами. В состав ГЭР входят акцептор и донор водородной связи, которые образуют эвтектическую смесь. В зависимости от природы прекурсоров выделяют гидрофильные и

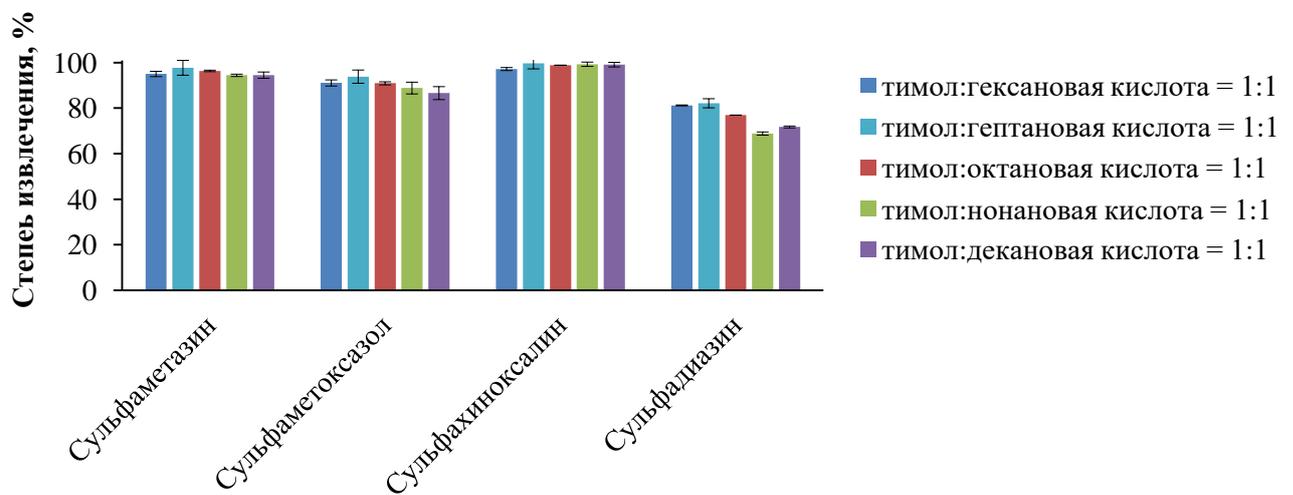
гидрофобные ГЭР. Последние стабильны при контакте с водной фазой, поэтому их применение для жидкостно-жидкостной экстракции из водных фаз предпочтительно.

Для выделения сульфаниламидов из лекарственных препаратов была изучена возможность применения гидрофобных ГЭР на основе тимола (донор водородной связи) и высших карбоновых кислот (акцепторы водородной связи). Выбор данных прекурсоров обусловлен их низкой растворимостью в воде и природой аналитов (таблица 1). Тимол за счет наличия ароматического кольца обеспечивает  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия, а высшие карбоновые кислоты – гидрофобные и электростатические. Кроме того, в структуре аналитов присутствуют амино- и сульфаниламидная группы, способные к образованию водородной связи с гидроксильной группой тимола и карбоксильной группой высшей карбоновой кислоты.

Разработанная схема микроэкстракции предполагает введение щелочного раствора прекурсоров ГЭР в пробу с образованием гомогенного раствора. При подкислении смеси раствором минеральной кислоты происходит протонирование анионных форм тимола и высших карбоновых кислот с *in situ* образованием ГЭР и извлечением аналитов в выделяющуюся фазу экстрагента. После центрифугирования полученный экстракт анализируется методом ВЭЖХ-УФ. ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот еще не были описаны в литературе в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью». Обычно ГЭР такого состава получают перед добавлением к пробе [346] либо смешивают пробу с прекурсорами ГЭР [347]. Оба процесса требуют нагревания.

Оптимизация условий микроэкстракции выполнялась путем варьирования состава ГЭР, объемов водной и органической фаз. В качестве прекурсоров ГЭР был изучен ряд высших карбоновых кислот (гексановая, гептановая, октановая, нонановая, декановая). Для этого готовили щелочной водный раствор прекурсоров ГЭР (суммарное содержание тимола и высшей карбоновой кислоты 400 г/л; мольное отношение 1:1; концентрация гидроксида натрия – 4 моль/л). 0,5 мл полученного раствора смешивали с 0,5 мл раствора пробы, добавляли 340 мкл

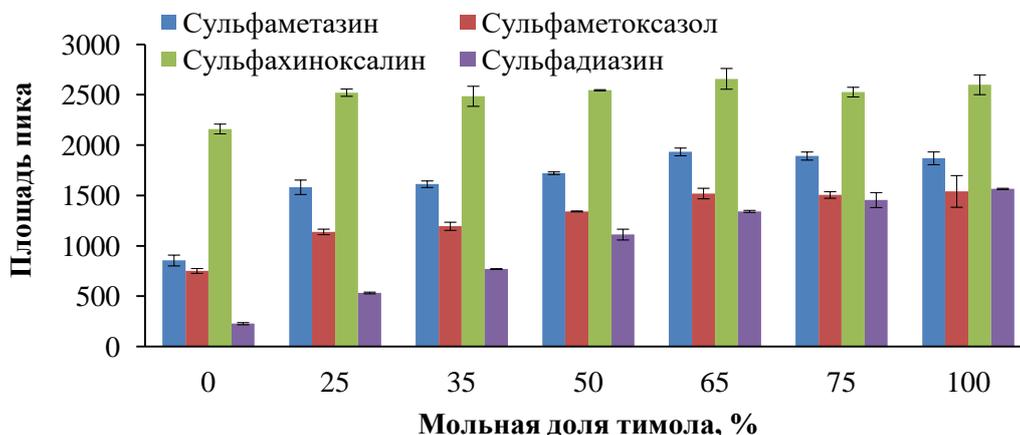
3 моль/л раствора серной кислоты, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об./мин. Органическую фазу разбавляли в 2 раза смесью ацетонитрила и метанола (объемное отношение 2:1) и анализировали методом ВЭЖХ-УФ. При прочих равных условиях ГЭР на основе тимола и октановой кислоты обеспечил максимальные степени извлечения аналитов (>75%) (рисунок 65). Октановая кислота обеспечивает оптимальную гидрофобность эвтектической смеси, благодаря чему сульфаниламиды эффективно извлекаются в экстрагент, а органическая фаза является более стабильной при контакте с водными растворами.



**Рисунок 65** – Влияние состава ГЭР на степень извлечения сульфаниламидов (мольное отношение компонентов ГЭР = 1:1; концентрация серной кислоты – 3 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 10$  мг/л;  $n=3$ )

Соотношение компонентов ГЭР оказывает существенное влияние на экстрагирующую способность и физико-химические свойства смеси. Для выбора наиболее подходящего соотношения готовили серию щелочных водных растворов прекурсоров ГЭР с мольной долей тимола в интервале от 0 до 100% (суммарное содержание тимола и высшей карбоновой кислоты 200 г/л; концентрация гидроксида натрия – 2 моль/л). 0,5 мл полученного раствора смешивали с 0,5 мл раствора пробы и добавляли 170 мкл 3 моль/л раствора серной кислоты, после чего поступали аналогично предыдущему случаю. Было обнаружено, что эффективность извлечения возрастала при увеличении мольной доли тимола в составе ГЭР, что говорит о возможной доминирующей роли  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий в

экстракционном процессе. Мольное отношение компонентов равное 2:1 (65 % тимола) было выбрано в качестве оптимального (рисунок 66), так как в этом случае наблюдается максимальная эффективность экстракции при минимальной вязкости образующейся фазы, которая также возрастает с увеличением мольной доли тимола.

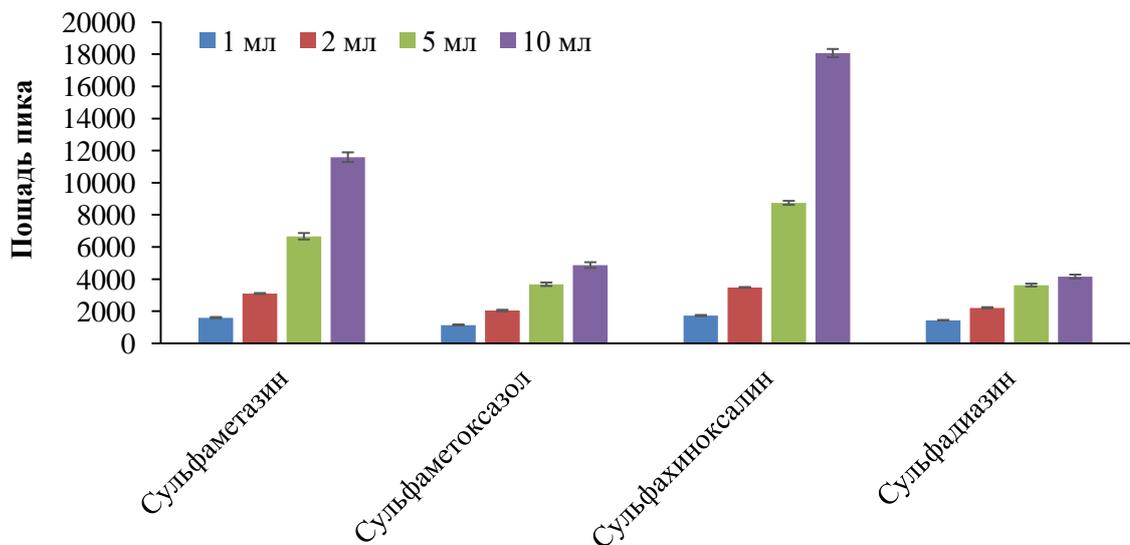


**Рисунок 66** – Влияние мольной доли тимола на площади хроматографических пиков сульфаниламидов (объем щелочного раствора прекурсоров ГЭР и пробы – 0,5 мл; концентрация серной кислоты – 3 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 10$  мг/л;  $n=3$ )

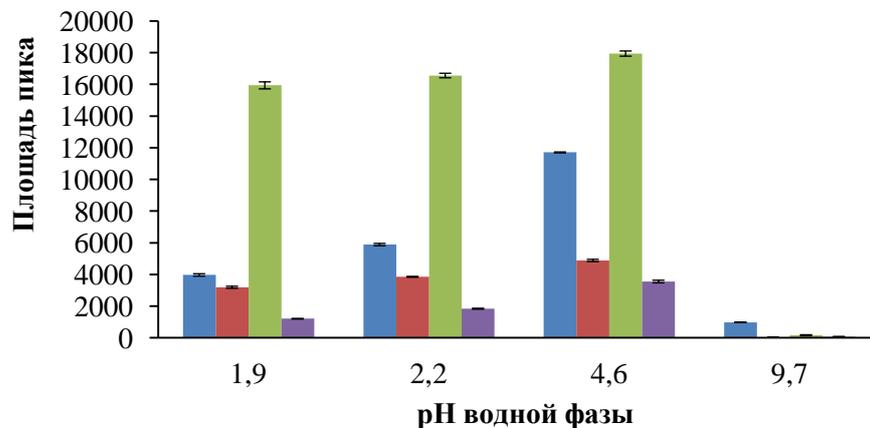
Важнейшим параметром для достижения наибольших коэффициентов концентрирования является объем пробы, который варьировали в интервале от 1 до 10 мл. Площади пиков постоянно возрастала при увеличении объема пробы, поэтому максимальное значение (10 мл) было выбрано в качестве оптимального (рисунок 67). При этом относительно гидрофобные аналиты (сульфаметазин, сульфахиноксалин) демонстрируют более быстрый рост по сравнению с более полярными (сульфаметоксазол, сульфадиазин), что связано с различиями в коэффициентах распределения исследуемых веществ.

Серная кислота была выбрана для подкисления раствора пробы и инициирования фазового разделения, так как сульфат-ионы оказывают наибольший высаливающий эффект при экстракции полярных аналитов из 10 мл пробы. Объем серной кислоты изучали в диапазоне от 130 до 260 мкл. При этом среда водной фазы изменялась от сильнощелочной до сильнокислой. При небольших объемах серной кислоты органическая фаза выделяется неполностью, а щелочной среда способствует существованию аналитов в анионных формах,

которые плохо экстрагируются в фазу ГЭР. Эквимолярное количество серной кислоты (170 мкл, 3 моль/л) по отношению к гидроксиду натрия обеспечивало требуемую кислотность для образования фазы ГЭР и экстракции сульфаниламидов (рисунок 68). При  $pH \approx 5$  аналиты пребывают в водной фазе в молекулярной форме. При дальнейшем увеличении объема серной кислоты среда становится более кислой и происходит переход аналитов в протонированные формы, обладающие большим сродством к водной фазе.



**Рисунок 67** – Влияние объема пробы на площади хроматографических пиков сульфаниламидов (объем щелочного раствора прекурсоров ГЭР– 0,5 мл; концентрация серной кислоты – 3 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 5$  мг/л;  $n=3$ )



**Рисунок 68** – Влияние pH водной фазы на площади хроматографических пиков сульфаниламидов (объем пробы – 10 мл; объем щелочного раствора прекурсоров ГЭР– 0,5 мл; концентрация серной кислоты – 3 моль/л;  $C_{\text{аналита}} = 5$  мг/л;  $n=3$ )

В выбранных условиях градуировочные зависимости являлись линейными в диапазоне от 3 до 1000 мкг/л для сульфаметазина ( $r=0,997$ ) и сульфахиноксалина ( $r=0,999$ ), от 10 до 1500 мкг/л ( $r=0,999$ ) для сульфаметоксазола и от 15 до 1500 мкг/л ( $r=0,998$ ) для сульфадиазина. Пределы обнаружения равнялись 1 мкг/л для сульфаметазина и сульфахиноксалина, 3 мкг/л для сульфаметоксазола и 5 мкг/л для сульфадиазина. Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность для нижней и верхней границ диапазонов определяемых концентраций составили от 4 до 7 % и от 6 до 9% ( $n=5$ ) соответственно. Стадия пробоподготовки занимает 5 минут. Коэффициенты концентрирования составили  $69\pm 3$ ,  $39\pm 2$ ,  $103\pm 4$  и  $22\pm 1$  для сульфаметазина, сульфаметоксазола, сульфахиноксалина и сульфадиазина соответственно.

Правильность получаемых результатов подтверждали методом «введено-найденно», а также проводили анализ по референтному методу (ВЭЖХ-ФЛ) [335]. Для извлечения сульфаниламидов к 100 мг измельченной пробы в случае твердых лекарственных форм или к 2 мл пробы в случае раствора для орального применения добавляли 40 мл метанола и проводили УЗ-обработку в течение 10 минут, после чего фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) [348]. Далее проводили упаривание растворителя, дериватизацию и анализ так же, как для предыдущей работы.

Полученные результаты были сравнены с помощью  $F$ - и  $t$ -тестов. Полученные  $F$ -значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные  $t$ -значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи валидируемой и референтной схем (таблица 17).

По сравнению с ранее разработанными подходами к ВЭЖХ-УФ определению сульфаниламидов (таблица 16) *предложенная схема характеризуется гораздо более высокой чувствительностью за счет эффективного концентрирования аналитов. При этом процедура пробоподготовки является простой и быстрой. Также, извлечение в ГЭР происходит более селективно, чем, к примеру, в варианте жидкостной*

*экстракции из гомогенного раствора в полярный органический растворитель [86] за счет подбора оптимального состава экстрагента. Ограничением разработанной схемы является необходимость центрифугирования для разделения фаз.*

**Таблица 17** – Результаты определения сульфаниламидов в лекарственных препаратах (n=3, P = 0,95, F<sub>кр</sub> = 19,00, t<sub>кр</sub> = 2,78)

Проба (содержание аналита)	Аналит	Единица измерения	Найдено		F- критерий	t- критерий
			ВЭЖХ- УФ	ВЭЖХ-ФЛ [335]		
Таблетки «Сульф 120» (92 мг)	Сульфадиазин	мг	94±3	93±4	1,78	0,86
Таблетки «Ко- тримоксазол» (400 мг)	Сульфаме- токсазол		399±15	402±17	1,28	0,57
Таблетки «Сульфадимезин» (500 мг)	Сульфаме- тазин		506±19	503±17	1,25	0,51
Раствор для орального применения «Плурикокцин» (75 мг/мл)	Сульфахино- ксалин	мг/мл	74±3	73±4	1,78	0,86

В ходе исследований была предложена схема микроэкстракционного концентрирования сульфаниламидов в фазу ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот из гомогенного раствора прекурсоров ГЭР и пробы. Аналитические возможности представленной схемы были продемонстрированы при определении аналитов в лекарственных препаратах.

## **Глава 4 Проточное хемилюминесцентное определение общего содержания фторхинолонов в биологических жидкостях с выделением на ферромагнитных наночастицах**

Одним из подходов для оперативного получения аналитической информации является применение методологии скрининга, которая заключается в экспрессном полуколичественном определении содержания конкретного вещества или суммарного содержания ряда веществ [349]. Во втором случае полученный результат представляют в пересчете на концентрацию одного из аналитов. Наиболее часто для скрининг-анализа применяются методы молекулярной спектроскопии (спектрофотометрия [350], инфракрасная спектроскопия [351], спектроскопия комбинационного рассеяния [352], флуориметрия [353]), электрохимические [354], иммунологические [355] и микробиологические [356] методы. В последнее время развитие получили хемилюминесцентные методы, преимуществом которых является отсутствие необходимости использования дополнительных источников возбуждающего излучения в отличие от флуориметрических. Присутствие аналита обуславливает увеличение или снижение аналитического сигнала в зависимости от механизма, по которому он оказывает влияние на систему. Хемилюминесцентное определение аналитов, в основном, проводят в проточных системах, позволяющих автоматизировать процесс, сократить расход реагентов, а также обеспечить постоянство гидродинамических условий, что особенно важно в силу того, что хемилюминесцентные реакции протекают с высокой скоростью и детектирование испускаемого излучения необходимо производить в момент смешения потоков реагентов [357]. В подавляющем большинстве случаев применяемые проточные системы основаны на принципах проточно-инжекционного анализа, предполагающего ввод пробы в непрерывный ламинарный поток носителя [358]. Они характеризуются быстрым откликом, не требуют больших объемов пробы и дорогого оборудования. Реже используются системы последовательного инъекционного анализа [359], непрерывного проточного анализа [360] и мультикоммутационного проточного анализа [361].

Первый из них основан на последовательном отборе носителя, образца и реагентов в смесительную спираль с последующим смешением зон, что позволяет резко сократить расход пробы и растворов реагентов, однако, менее предпочтительно, так как хемилюминесцентная реакция начинается до доставки смеси в детектор. Второй предполагает непрерывное смешение потоков пробы и реагентов, что делает его пригодным для on-line мониторинга, но требует большого расхода пробы и растворов реагентов. Третий основан на коммутации типичных элементов проточных анализаторов. Для автоматизации хемилюминесцентного анализа среди мультикоммутационных проточных систем наиболее пригодны мультинасосные, в которых для подачи каждого из растворов используется свой соленоидный поршневой насос, работающий в импульсном режиме и дозирующий строго определенный его объем. Такие системы были предложены в научной группе Dr. S. Koronkiewicz [362], где в том числе выполнялось исследование, рассматриваемое в данной главе. Благодаря пульсации создается турбулентный поток, что позволяет одновременно с точным дозированием обеспечить смешение растворов реагентов и пробы в непосредственной близости к детектору, что обуславливает максимально эффективную регистрацию испускаемого излучения. Кроме того, такие системы характеризуются минимальным объемом образующихся отходов и компактностью.

Хемилюминесцентные методы являются высокочувствительными, но неселективными, что, с одной стороны, позволяет получать отклик для группы аналитов схожей структуры, а с другой стороны, требует определенной пробоподготовки. В данной работе впервые предложен подход к хемилюминесцентному скрининг-определению фторхинолонов в молоке.

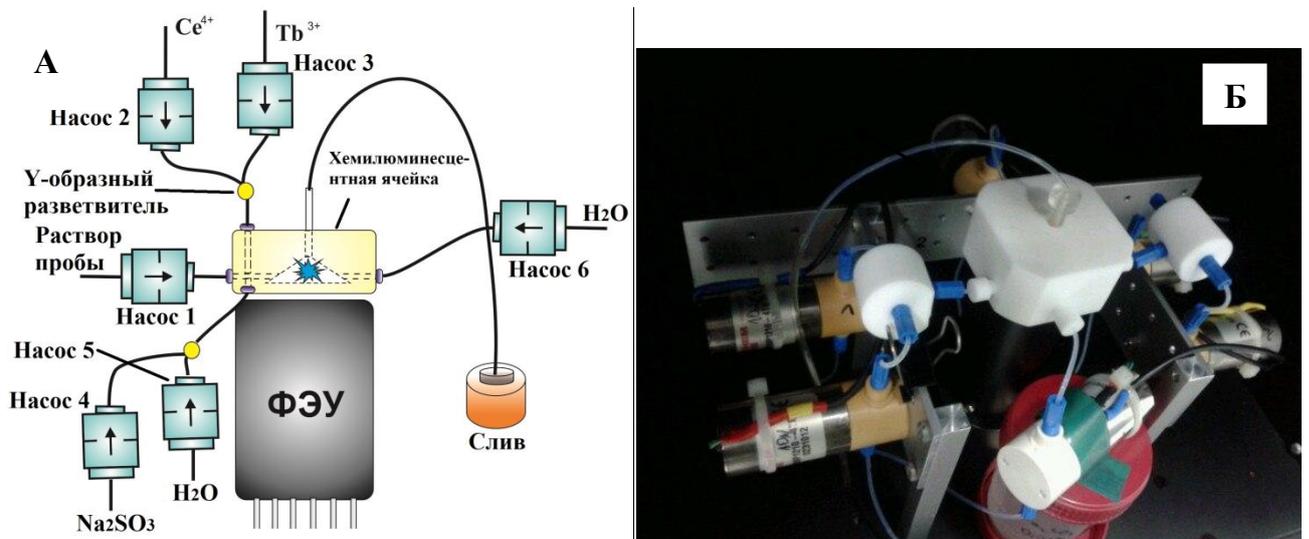
На основании литературных данных для хемилюминесцентного определения фторхинолонов была выбрана система:  $\text{Ce}^{4+}$ - $\text{SO}_3^{2-}$ - $\text{Tb}^{3+}$  [363]. Окислительно-восстановительная реакция между  $\text{Ce}^{4+}$  и  $\text{SO}_3^{2-}$ , протекающая в кислой среде дает слабый сигнал, тогда как в присутствии аналитов происходит его увеличение. Фторхинолоны способны образовывать устойчивые комплексы с

ионами лантаноидов (в частности,  $Tb^{3+}$ ) за счет наличия донорных атомов азота и кислорода в их структуре. Предполагаемый механизм является следующим: интермедиат  $SO_2^*$ , образующийся в ходе реакции между  $Ce^{4+}$  и  $SO_3^{2-}$  и обладающий избыточной энергией, переводит лиганд (фторхинолон) в возбужденное состояние; затем происходит внутримолекулярный перенос энергии с лиганда на центральный атом (Tb); после чего испускается характеристическое для  $Tb^{3+}$  излучение [364].

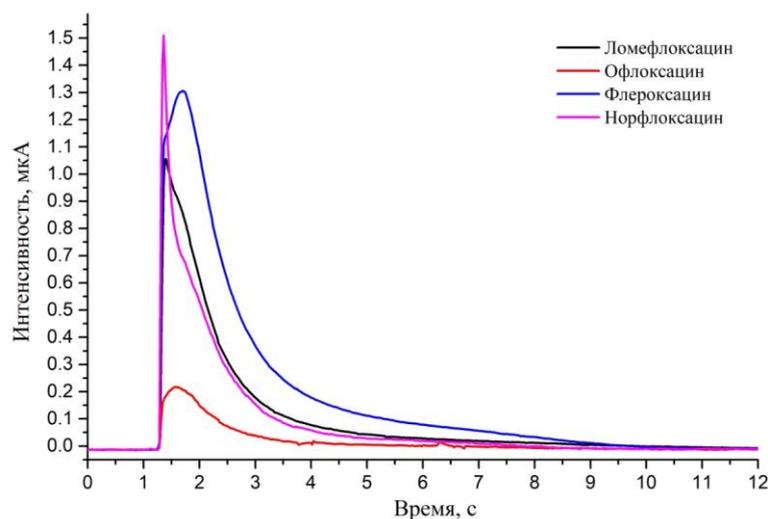
Гидравлическая схема включала детектор, который представлял собой блок из политетрафторэтилена с конусообразной камерой (объем – 280 мкл), установленной напротив фотоэлектронного умножителя (напряжение – 1000 В), и каналами для подачи растворов и сброса смеси. Соленоидные насосы коммутировались посредством шлангов из политетрафторэтилена (диаметр – 0,8 мм). Цикл работы насоса производился с частотой 2 Гц. При оптимизации условий детектирования были проверены различные варианты размещения соленоидных насосов, отвечающих за подачу растворов реагентов и пробы; варьировались объемы, прокачиваемые насосами за одну пульсацию. Оптимизированная конфигурация гидравлической схемы, обеспечивающая наилучшую повторяемость (СКО = 2 %), и наибольшую чувствительность, представлена на рисунке 69. Разработанная схема анализа предполагает одновременный однократный ввод 50 мкл раствора пробы (насос 1) и смесей 10 мкл раствора церия(IV) (насос 2;  $10^{-3}$  моль/л) и 10 мкл раствора тербия(III) (насос 3;  $10^{-2}$  моль/л), а также 10 мкл раствора сульфита натрия (насос 4;  $0.7 \cdot 10^{-2}$  моль/л) и 10 мкл деионизированной воды (насос 5) с помощью соленоидных насосов и Y-образных разветвителей. После смешения растворов проводится регистрация испускаемого излучения в режиме остановленного потока в форме пика в течение 12 с. Аналитическим сигналом является площадь пика. Между вводом проб осуществляли промывку ячейки деионизированной водой (насос 6).

Кинетические кривые хемилюминесценции, полученные для каждого из аналитов, представлены на рисунке 70. Исходя из полученных зависимостей, можно заключить, что наибольшая чувствительность наблюдается для

флероксацина, а наименьшая – для офлоксацина. В литературе не описаны критерии для выбора аналита, который используется для выражения результатов скрининг-анализа. В работе был выбран аналит, для которого чувствительность является наибольшей. При этом оптимизацию параметров хемилюминесцентной реакции проводили для офлоксацина, к которому скрининг-система наименее чувствительна. Таким образом, уже при минимальном содержании флероксацина, превышающем предел обнаружения, скрининг-система покажет положительный отклик.

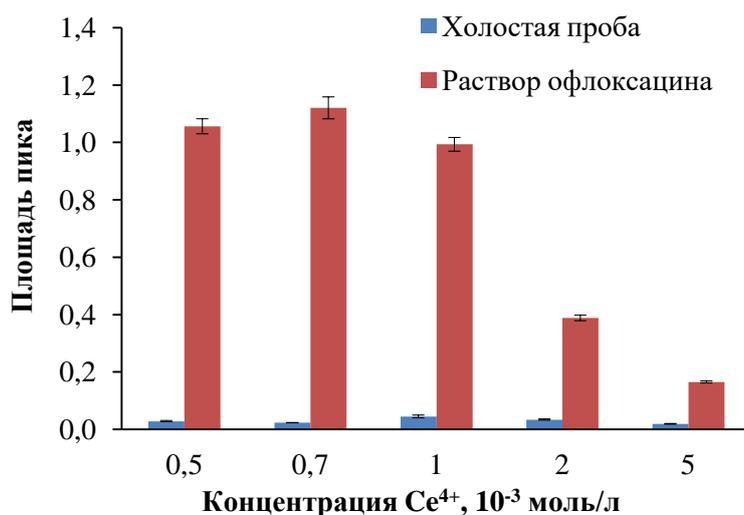


**Рисунок 69** – Гидравлическая схема для хемилюминесцентного определения общего содержания фторхинолонов в молоке (А), Внешний вид мультинасосной проточной системы (Варминьско-Мазурский университет (Ольштын, Польша)) (Б)



**Рисунок 70** – Кинетические кривые, получаемые при инъекции растворов фторхинолонов и реагентов (объем пробы – 50 мкл; объемы реагентов – 10 мкл;  $C_{\text{аналита}} = 0,25 \cdot 10^{-6}$  моль/л)

При выборе концентраций реагентов критерием служила наибольшая разница между площадями пиков для холостой пробы и раствора офлоксацина. Концентрацию раствора церия (IV) варьировали в диапазоне от  $5 \cdot 10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Наибольший аналитический сигнал наблюдался при  $0,7 \cdot 10^{-3}$  моль/л, однако, в качестве оптимальной концентрации была выбрана  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л, вследствие большей стабильности раствора (рисунок 71). Дальнейшее увеличение концентрации раствора приводило к тушению хемилюминесценции.

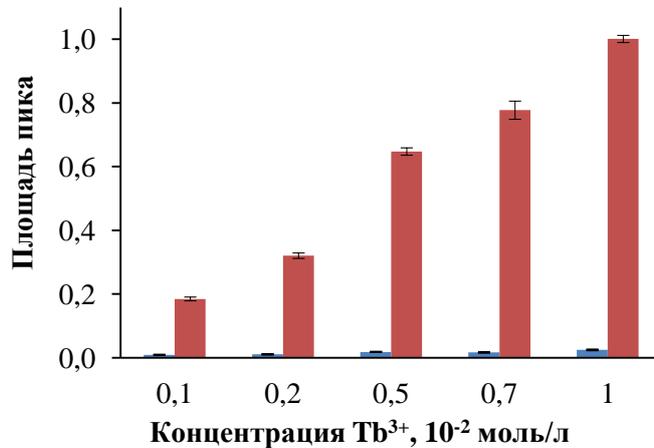


**Рисунок 71** – Влияние концентрации раствора церия(IV) на площадь пика (концентрации тербия(III) и сульфита натрия –  $10^{-2}$  и  $10^{-3}$  моль/л соответственно; объем пробы – 50 мкл; объемы реагентов – 10 мкл;  $C_{\text{аналита}} = 10^{-6}$  моль/л;  $n=3$ )

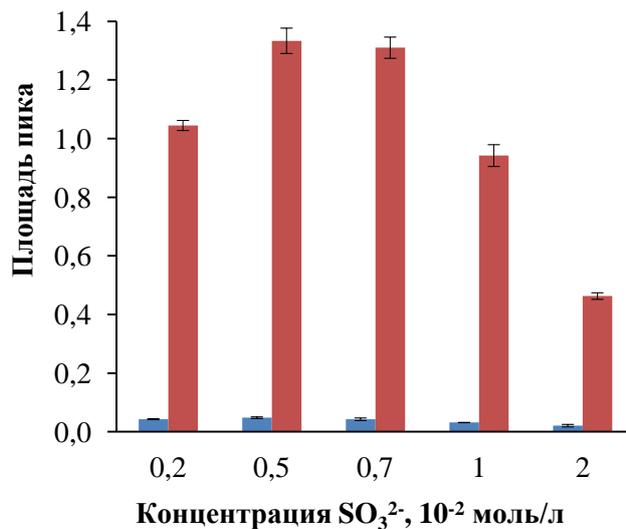
Влияние концентрации раствора тербия (III) изучали в промежутке от  $1 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Аналитический сигнал возрастал с ростом концентрации  $Tb^{3+}$  в исследованном диапазоне (рисунок 72). Концентрация  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л обеспечивает наибольшую чувствительность, поэтому использовалась в последующих экспериментах. Применение более концентрированных растворов не оправдано с экономической точки зрения.

Концентрацию раствора  $SO_3^{2-}$  изменяли в диапазоне от  $0,2 \cdot 10^{-2}$  до  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/л. В системе осуществляли разбавление раствора в соотношении 1:1 путем коммутации через Y-разветвитель с соленоидным насосом инжектирующим деионизированную воду (рисунок 69), по причине того, что в таком случае может быть использован более концентрированный раствор, обладающий большей стабильностью. Оптимальная концентрация  $SO_3^{2-}$  составила  $0,7 \cdot 10^{-2}$  моль/л

(рисунок 73). При более высоких концентрациях происходит снижение аналитического сигнала.



**Рисунок 72** – Влияние концентрации раствора тербия(III) на площадь пика (концентрации церия(IV) и сульфата натрия –  $10^{-3}$  моль/л; объем пробы – 50 мкл; объемы реагентов – 10 мкл;  $C_{\text{аналита}} = 10^{-6}$  моль/л;  $n=3$ )

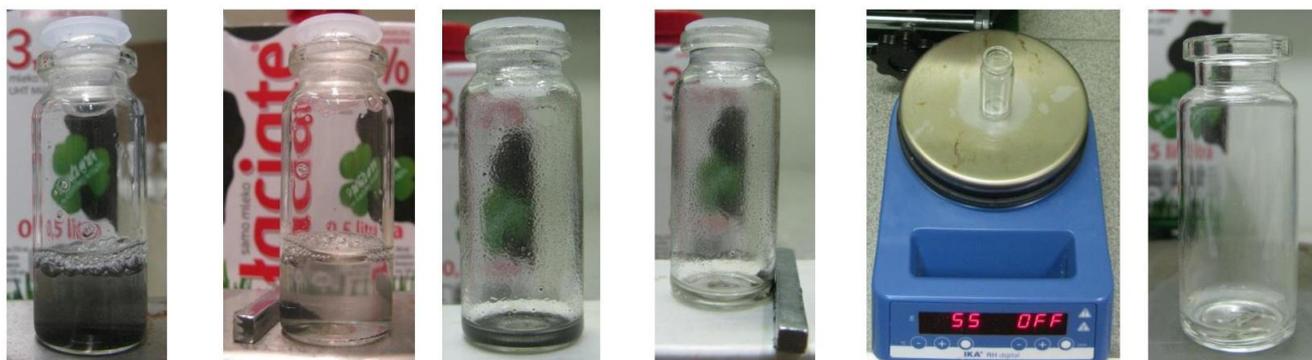


**Рисунок 73** – Влияние концентрации раствора сульфит-ионов на площадь пика (концентрации церия(IV) и тербия(III) –  $10^{-3}$  и  $10^{-2}$  моль/л соответственно; объем пробы – 50 мкл; объемы реагентов – 10 мкл;  $C_{\text{аналита}} = 10^{-6}$  моль/л;  $n=3$ )

Для повышения селективности хемилюминесцентного определения фторхинолонов в молоке была реализована схема их выделения, включающая магнитную твердофазную микроэкстракцию на ферромагнитных наночастицах, содержащих оксид циркония и углеродные нанотрубки. Магнетит является одним из самых доступных материалов, обеспечивающих магнитные свойства сорбента.

Оксид циркония обладает выраженными сорбционными свойствами и предохраняет поверхность наночастиц от окисления. Углеродные нанотрубки служат для увеличения гидрофобности и уменьшения плотности заряда на поверхности наночастиц, что необходимо для быстрого элюирования аналитов. Синтез наночастиц описан [365] и выполнен доцентом В.Н. Постновым на кафедре химии твердого тела Института Химии СПбГУ.

В соответствии с предложенной схемой дисперсионной микроэкстракции (рисунок 74) в супернатант, полученный после удаления белков и жиров из молока, вносили навеску ферромагнитных наночастиц и добавку ацетонитрила для их смачивания, после чего проводили сорбцию. Наночастицы отделяли с помощью внешнего магнита, промывали деионизированной водой. Условия сорбции были выбраны на основании литературных данных: рН пробы – 6, масса сорбента – 5 мг и время извлечения – 10 мин [212]. Специфика хемилюминесцентной реакции потребовала введения дополнительной стадии – замены растворителя после элюирования, так как полярные органические растворители и высокая ионная сила раствора приводят к тушению хемилюминесценции. В качестве элюента было решено использовать легколетучий раствор аммиака в метаноле, так как щелочная среда обеспечивала переход аналитов в анионные водорастворимые формы, а органический растворитель уменьшал гидрофобные взаимодействия между сорбентом и аналитами.



Добавление  
наночастиц к  
пробе и  
сорбция

Выделение  
наночастиц из  
водной фазы

Элюиро-  
вание

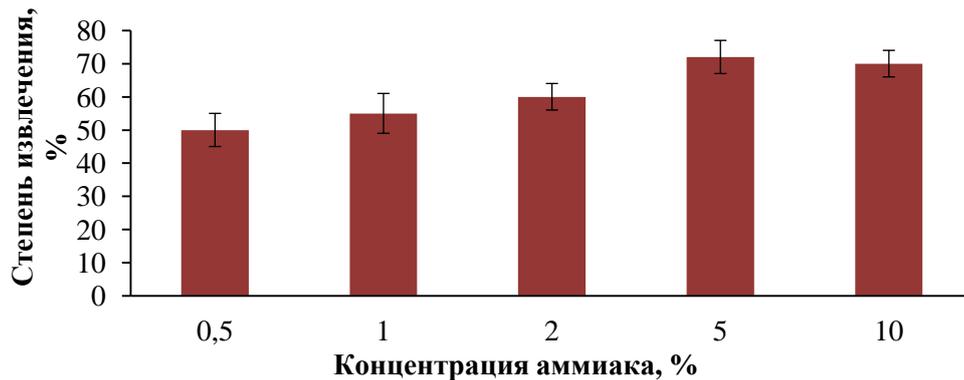
Выделение  
наночастиц из  
элюата

Удаление  
растворителя

Раствор  
сухого  
остатка в  
воде

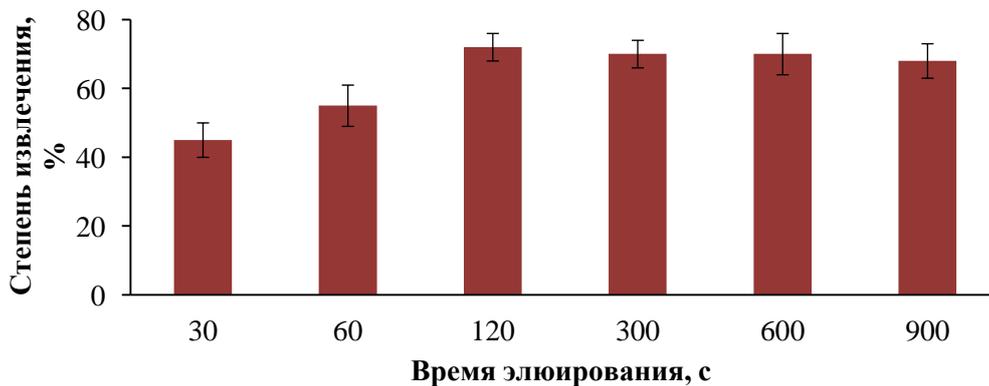
Рисунок 74 – Схема магнитной дисперсионной микроэкстракции

Для подбора оптимальной концентрации аммиака данный параметр варьировали в диапазоне от 0,5 до 10 об. % (рисунок 75). В ходе исследований было обнаружено, что 5% раствор аммиака в метаноле обеспечивает наибольшую эффективность элюирования. Объем элюента изучали в интервале от 0,3 до 0,8 мл. Увеличение объема элюента приводило к постепенному уменьшению аналитического сигнала вследствие разбавления, поэтому при дальнейших исследованиях элюирование проводили 0,3 мл 5% раствора аммиака.



**Рисунок 75** – Влияние концентрации аммиака в элюенте на степень извлечения (объем элюента – 300 мкл; время элюирования – 5 мин;  $C_{\text{аналита}} = 10^{-6}$  моль/л;  $n=3$ )

Время элюирования, которое определяется природой сорбента, характером связи аналитов с сорбционными центрами и составом элюента, варьировали в диапазоне от 30 до 900 с (рисунок 76). Наибольший аналитический сигнал за наименьшее время был получен при элюировании в течение 120 с (2 мин).



**Рисунок 76** – Влияние времени элюирования на степень извлечения (объем элюента – 300 мкл; концентрация аммиака – 5 %;  $C_{\text{аналита}} = 10^{-6}$  моль/л;  $n=3$ )

Представленная в данной работе схема пробоподготовки включала следующие стадии. К 4 мл раствора пробы добавляли 5 мг магнитных наночастиц и 0,1 мл ацетонитрила, после чего перемешивали в течение 10 минут на

орбитальном шейкере. Наночастицы с сорбированными аналитами отделяли от раствора с помощью внешнего магнита, промывали двумя порциями воды по 2 мл и проводили элюирование с помощью 300 мкл 5% раствора аммиака в метаноле при перемешивания в течение 2 минут. Затем наночастицы отделяли с помощью внешнего магнита, а элюат упаривали при 65 °С. Полученный сухой остаток растворяли в 250 мкл воды и анализировали с помощью предложенной скрининг-системы.

В найденных условиях была получена линейная градуировочная зависимость в диапазоне от 0,1 до 15 мг/кг ( $r=0,996$ ) в пересчете на флероксацин. Предел обнаружения составил 0,03 мг/кг в пересчете на флероксацин. Повторяемость ( $n=5$ ) для верхней и нижней границы диапазона определяемых концентраций варьировалась от 1 до 8%, а внутрилабораторная воспроизводимость ( $n=5$ ) – от 3 до 12%. Извлечение аналитов и элюирование в совокупности занимают 7 минут. Степени извлечения равны  $75\pm 5\%$  для флероксацина,  $70\pm 8\%$  для ломефлоксацина и норфлоксацина и  $72\pm 6\%$  для офлоксацина.

Для демонстрации аналитических возможностей скрининг-метода проводили определение суммарного содержания фторхинолонов в пробах молока. Референтный метод предполагал ВЭЖХ-ФЛ определение [366]. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и фосфатного буферного раствора (рН 3,0). Пробоподготовка включала следующие этапы [367]: 1 мл пробы молока смешивали с 100 мкл раствора ортофосфорной кислоты с концентрацией 16 моль/л и 2 мл ацетонитрила. После перемешивания в течение 30 с и центрифугирования в течение 5 мин при 4000 об./мин 2 мл надосадочной жидкости было отобрано и смешано с 4 мл дихлорметана. Процедура перемешивания и центрифугирования была повторена. Затем 0,5 мл водной фазы было перенесено в виалу для последующего ВЭЖХ-ФЛ анализа.

Пробы молока различной жирности (0,5, 2 и 3,2%) с введенными добавками растворов аналитов были проанализированы с помощью разработанной схемы и референтной методики (таблица 18). Как видно из представленных данных,

фторхинолоны были обнаружены в каждой из проб при скрининг-анализе. Дальнейший ВЭЖХ-ФЛ анализ с помощью референтной методики показал, что во всех пробах присутствуют фторхинолоны в определенных концентрациях. Значения суммарного содержания фторхинолонов коррелируют с результатами ВЭЖХ-ФЛ анализа. Таким образом, разработанная схема была успешно применена для скрининг-анализа молока для подтверждения наличия в них примесей фторхинолонов и полуколичественной оценки общего содержания аналитов.

**Таблица 18** – Результаты определения общего содержания фторхинолонов в пробах молока различной жирности (n=3, P = 0,95)

Жирность, %	Аналит	Найдено, мг/кг	
		Мультинасосный проточный анализ с хемиллюминесцентным детектированием	ВЭЖХ-ФЛ [366]
0,5 %	Ломефлоксацин	13,94±0,69 (в пересчете на флероксацин)	8,21±0,74
	Норфлоксацин		5,56±0,44
	Флероксацин		6,34±0,57
	Офлоксацин		6,57±0,53
2,0 %	Ломефлоксацин	2,66±0,13 (в пересчете на флероксацин)	0,67±0,08
	Норфлоксацин		0,71±0,08
	Флероксацин		0,75±0,08
	Офлоксацин		0,88±0,08
3,2 %	Ломефлоксацин	23,46±1,17 (в пересчете на флероксацин)	12,08±0,97
	Норфлоксацин		10,39±0,94
	Флероксацин		11,88±0,95
	Офлоксацин		10,90±0,88

В таблице 19 приведены аналитические характеристики представленных в литературе методик определения фторхинолонов в пробах молока. В целом, методики скрининг-анализа являются менее чувствительными по сравнению с методами ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ФЛ, ВЭЖХ-МС/МС и флуориметрии, однако не требуют дорогого аналитического оборудования и большого расхода органических растворителей. **Преимуществом разработанной схемы по сравнению с другими методами скрининг-анализа является отсутствие необходимости работы с бактериальными средами и более высокая экспрессность и чувствительность.**

Таким образом, в рамках настоящей работы была разработана схема проточного хемиллюминесцентного определения общего содержания

фторхинолонов в молоке. Для предварительного концентрирования аналитов в схему анализа включали дисперсионную твердофазную микроэкстракцию на ферромагнитных частицах. Предложенная схема была успешно апробирована при анализе проб молока. Исследования проводились в Варминьско-Мазурском университете (University of Warmia and Mazury, Ольштын, Польша) с сентября по ноябрь 2017 года в научной группе Dr. S. Koronkiewicz. По результатам работы была опубликована статья в Food Chemistry [368].

**Таблица 19** – Аналитические характеристики методик определения фторхинолонов в пробах молока

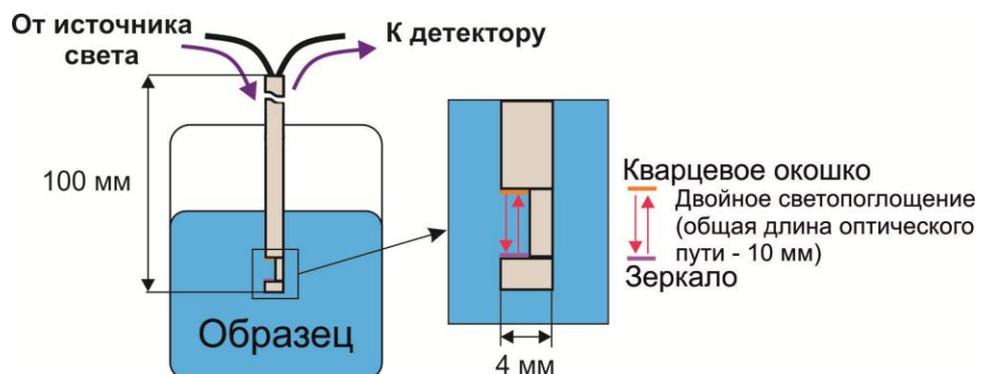
Метод	Пробоподготовка	Предел обнаружения, мкг/л	Линейный диапазон, мг/л	Повторяемость, %	Масса (объем) пробы	Ссылка
ВЭЖХ-ФЛ	Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция	0,05–0,3 мкг/л	0,2–2000 мкг/л	2-3	2 г	[165]
ВЭЖХ-МС/МС	Твердофазная экстракция	0,2 мкг/кг	0,5–200 мкг/кг	2-10	1 г	[369]
ВЭЖХ-УФ	Мицеллярная микроэкстракция	0,3–1,4 мкг/л	5–200 мкг/л	-	5 мл	[370]
Флуориметрия	Экстракция из гомогенного раствора в полярный органический растворитель	9–16 мкг/л	0,015–2,25 мг/л	1-3	10 мл	[371]
ВЭЖХ-УФ	Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция	1,8–3,2 мкг/кг	5–500 мкг/кг	10-13	10 г	[372]
Иммунологический скрининг-анализ	-	100 мкг/кг	100–2000 мкг/кг	-	-	[373]
Микробиологический скрининг-анализ	-	100 мкг/кг	100–4000 мкг/кг	-	-	[374]
Хемилюминесцентный скрининг-анализ	Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция	30 мкг/кг*	100–15000 мкг/кг*	1-8	1 г	Данная работа

\*в пересчете на содержание флероксацина

## Глава 5 Проточное экстракционно-фотометрическое определение диклофенака в лекарственных препаратах и слюне

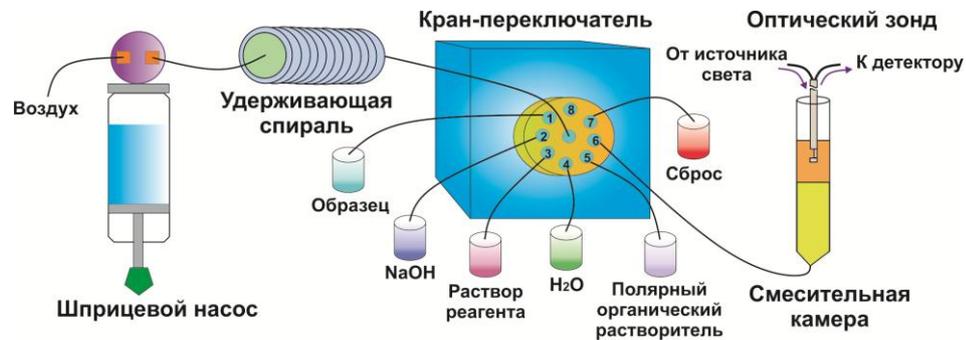
В проточном анализе можно выделить два подхода к измерению аналитического сигнала после выделения аналита в фазу экстрагента методом жидкостной микроэкстракции. Первый подход заключается в продвижении органической фазы по гидравлическим трассам к проточной ячейке детектора [375], а второй – в непосредственном детектировании аналита или его дериватива в смесительной камере [376].

В данной работе впервые было предложено регистрировать оптическую плотность органической фазы с помощью оптоволоконного зонда, который позволяет проводить детектирование сразу после фазового разделения, что особенно важно в случае нестабильных аналитических форм. Конструкция зонда позволяет свободно перемещать его внутри смесительной камеры (рисунок 77), что делает его универсальным решением. Зонд включает в себя два оптоволоконных кабеля: один предназначен для подачи электромагнитного излучения от источника к анализируемой среде, а другой – для передачи ослабленного светового потока в спектрометр после его двойного прохождения через анализируемую среду благодаря зеркалу, установленному в измерительной ячейке зонда. Ранее оптоволоконный зонд нашел применение для парофазной капельной микроэкстракции в стационарном варианте: каплю помещали в ячейку зонда и осуществляли мониторинг извлечения аналита в режиме реального времени [377]. Этот подход был впервые реализован в группе Prof. V. Andruch.



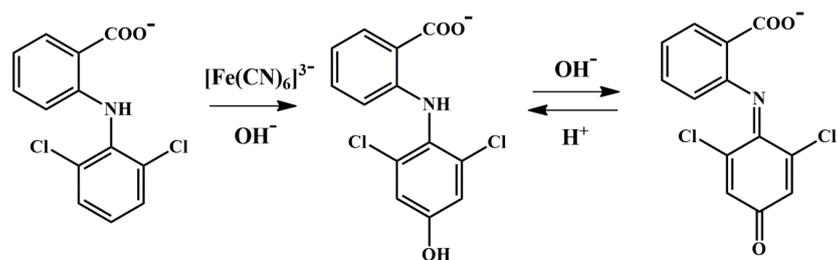
**Рисунок 77** – Схема измерения аналитического сигнала оптическим зондом

Для экстракционно-фотометрического определения диклофенака в лекарственных препаратах и слюне была разработана гидравлическая схема на принципах циклического инъекционного анализа (рисунок 78). Для дозирования растворов и растворителей шприцевой насос коммутировали с удерживающей спиралью и многоходовым краном-переключателем, к которому в свою очередь была подсоединена смесительная камера. Смесительная камера предназначалась для проведения полного цикла анализа, включающего перемешивание пробы и реагентов, дериватизацию аналита и образование фазы экстрагента, разделение фаз и регистрацию аналитического сигнала с помощью оптического зонда, установленного в смесительной камере на определенном уровне, соответствующем расположению органической фазы.



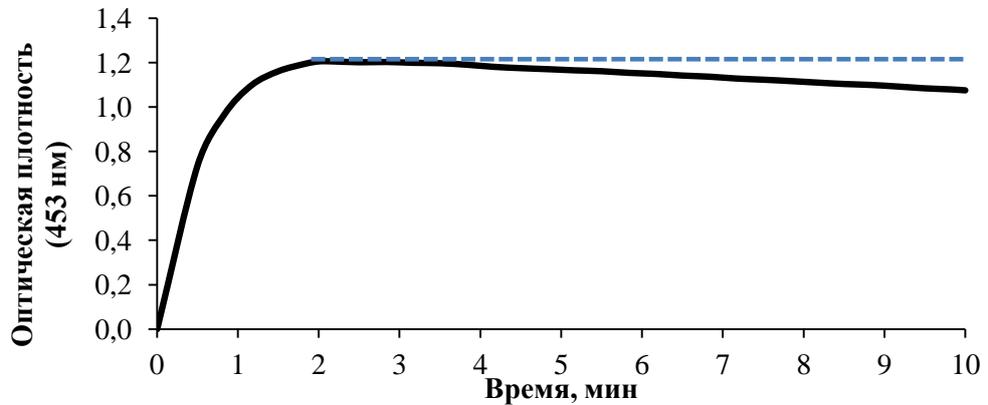
**Рисунок 78** – Гидравлическая схема для экстракционно-фотометрического определения диклофенака в лекарственных препаратах и слюне

Для дериватизации была выбрана реакция окисления диклофенака в щелочной среде в присутствии гексацианоферрата(III) калия с образованием аналитической формы, содержащей хиноидную группу [378] (молярный коэффициент светопоглощения составил  $1,6 \times 10^4$  л/моль·см при 453 нм) и имеющей оранжевую окраску. Предполагаемый механизм реакции следующий:



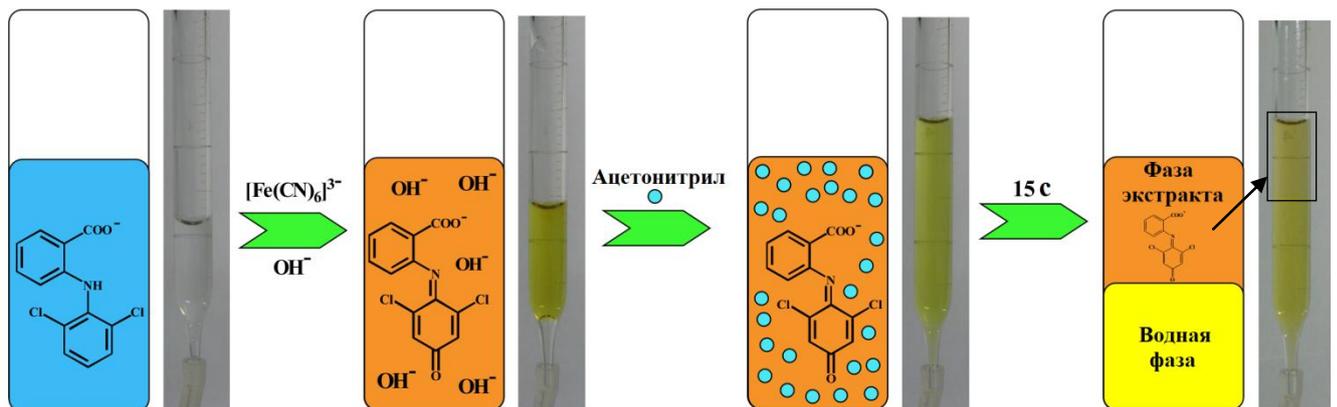
Как видно из кинетической кривой (рисунок 79), полученной при смешении водных растворов диклофенака (500 мкл, 15 мг/л), гидроксида натрия (50 мкл, 7

моль/л) и гексацианоферрата(III) калия (50 мкл, 0,05 моль/л), наибольшая оптическая плотность наблюдается после протекания реакции в течение двух минут. Далее аналитическая форма постепенно разрушается.



**Рисунок 79** – Кинетическая кривая протекания реакции дериватизации

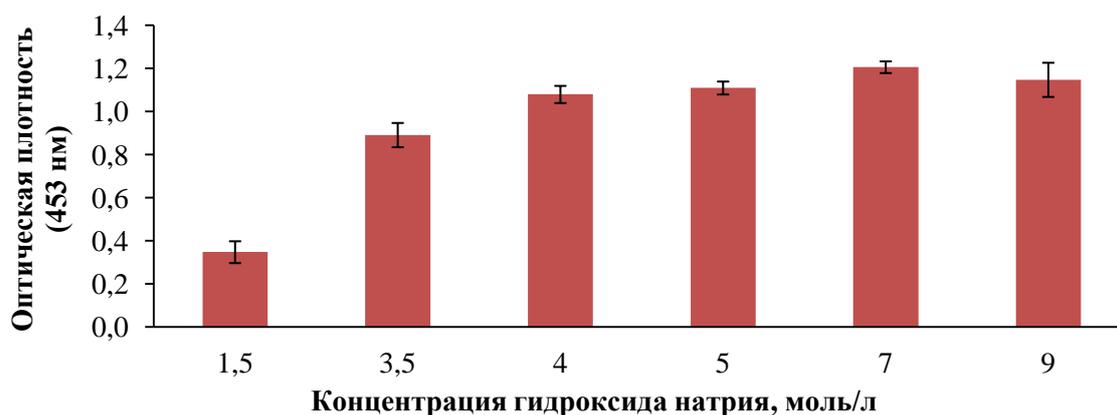
Извлечение аналитической формы проводили методом жидкостной микроэкстракции из гомогенного раствора (рисунок 80). Было отмечено, что концентрация гидроксида натрия является достаточной для образования фазы ацетонитрила при его смешивании с пробой в соотношении 1:1 за счет эффекта высаливания при увеличении ионной силы водной фазы. Разделение фаз происходило в течение 20 с, после чего измеряли оптическую плотность экстракта оптоволоконным зондом, что нивелировало влияние процесса разрушения аналитической формы.



**Рисунок 80** – Схема дериватизации диклофенака и жидкостной микроэкстракции дериватива из гомогенного раствора

Гидроксид натрия способствует протеканию реакции, усиливая окислительные свойства гексацианоферрата(III) калия, и стабилизирует окрашенную аналитическую форму, как видно из механизма реакции.

Концентрацию гидроксида натрия варьировали в диапазоне от 1,5 до 9 моль/л (рисунок 81). Значения оптической плотности возрастали с увеличением концентрации реагента. Наибольшее значение аналитического сигнала было получено при концентрации NaOH равной 7 моль/л. Более того, данная концентрация была достаточна для высаливания ацетонитрила, что позволило избежать применения дополнительных высаливающих агентов.

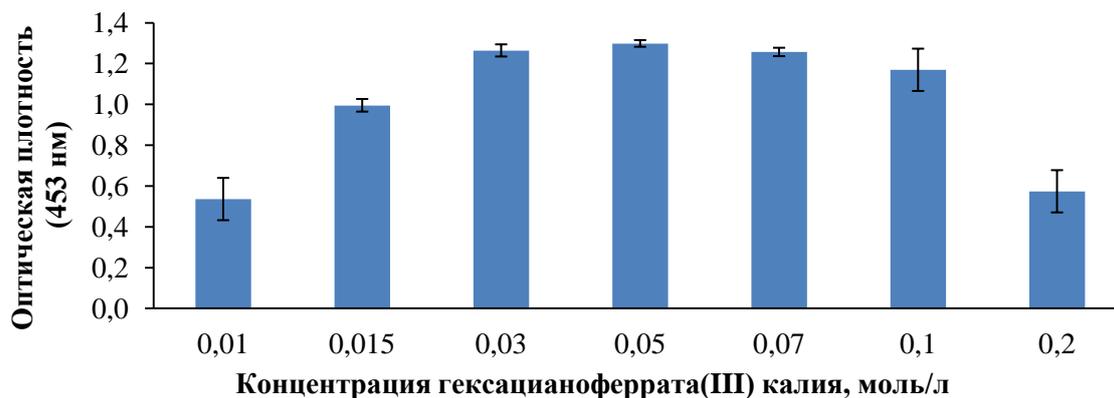


**Рисунок 81** – Влияние концентрации гидроксида натрия на оптическую плотность экстракта (время дериватизации – 2 мин; концентрация гексацианоферрата(III) калия – 0,05 моль/л;  $C_{\text{аналита}}$  – 15 мг/л;  $n=3$ )

Гексацианоферрат(III) калия выступает в данной реакции дериватизации в качестве окислителя в щелочной среде. Концентрацию  $K_3[Fe(CN)_6]$  изменяли в интервале от 0,01 до 0,2 моль/л (рисунок 82). По мере увеличения концентрации реагента аналитический сигнал возрастал, выходил на плато, после чего уменьшался. Наибольшая оптическая плотность при наименьшем СКО наблюдалась при концентрации гексацианоферрата(III) калия равной 0,05 моль/л, которая была выбрана в качестве оптимальной.

В качестве экстрагентов было исследовано три полярных, смешивающихся с водой растворителей – ацетонитрил, ацетон и изопропанол. Каждый растворитель был смешан в соотношении 1:1 с раствором аналитической формы. В случае ацетона и изопропанола не наблюдалось образования органической фазы. Кроме того, ацетон окислялся гексацианоферратом(III) калия. Двухфазная система наблюдалась только в случае ацетонитрила. Разделение фаз происходило в течение 20 с в сильнощелочной среде. Объемы органической и водной фаз после

установления равновесия в системе составили  $407 \pm 19$  мкл и  $737 \pm 17$  мкл соответственно.



**Рисунок 82** – Влияние концентрации гексацианоферрата(III) калия на оптическую плотность экстракта (время дериватизации – 2 мин; концентрация гидроксида натрия – 7 моль/л;  $C_{\text{аналита}}$  – 15 мг/л;  $n=3$ )

Длительность перемешивания ацетонитрила с раствором аналитической формы может оказывать влияние на эффективность экстракции, поэтому данный параметр был изучен в диапазоне от 5 до 20 с при скорости потока воздуха 200 мкл/с. Наименьшее время, необходимое для получения воспроизводимого сигнала, составило 10 с.

Температура экстракционной системы варьировалась в интервале от 20 до 45 °С с помощью водяной бани. Было обнаружено, что при температуре выше 35 °С система становится гомогенной и фазового разделения не происходит. В связи с этим, все эксперименты проводили при комнатной температуре.

В выбранных условиях определение содержания диклофенака в образцах слюны или лекарственных препаратах осуществлялось следующим образом. Сначала 500 мкл пробы (50 мкл/с), 50 мкл 7 моль/л гидроксида натрия (10 мкл/с) и 50 мкл 0,05 моль/л гексацианоферрата(III) калия (10 мкл/с) последовательно отбирались в удерживающую спираль и направлялись в смесительную камеру с помощью шприцевого насоса (рисунок 78). Для перемешивания в течение 10 с (200 мкл/с) происходила подача воздуха. Далее в течение 90 с протекала реакция дериватизации, после чего 600 мкл ацетонитрила (100 мкл/с) отбиралось в удерживающую спираль и подавалось в смесительную камеру посредством шприцевого насоса. После перемешивания смеси воздухом (10 с, 200 мкл/с)

происходило образование капель органической фазы и их гомогенное распределение по объему смесительной камеры. Спустя 20 с достигалось практически полное фазовое разделение и начиналось измерение оптической плотности (453 нм) в течение 30 с интервалом в 1 с. В качестве аналитического сигнала выступало среднее арифметическое значений, полученных с 15-ой по 30-ую с. Затем содержимое смесительной камеры направлялось на сброс и система дважды промывалась дистиллированной водой.

Для оценки возможных матричных эффектов при анализе реальных объектов было изучено мешающее влияние основных компонентов слюны и лекарственных препаратов (таблица 20). Была приготовлена и проанализирована серия водных растворов диклофенака (15 мг/л) с различным содержанием следующих веществ -  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaN}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , мочевины, глюкозы, мочевины, кофеина, ЭДТА и додецилсульфата натрия. Критерием наличия мешающего влияния являлось отклонение аналитического сигнала более чем на 5%.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что содержание мешающих компонентов в слюне и лекарственных препаратах (с учетом разбавления) не превышает допустимых избытков. Содержание мочевины в слюне обычно колеблется в пределах 12–50 мг/л [379] и ее мешающее влияние устраняется разбавлением. Додецилсульфат натрия в лекарственных препаратах содержится в концентрациях меньших, чем диклофенака.

**Таблица 20** – Изучение мешающего влияния компонентов слюны и лекарственных препаратов ( $C_{\text{аналита}} = 15$  мг/л)

Посторонний компонент	Допустимый избыток
$\text{K}^+$ , $\text{HCO}_3^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Na}^+$ , $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , мочевины, глюкоза, кофеин	1000
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{SCN}^-$ , ЭДТА	100
додецилсульфат натрия, мочевины	10

В найденных условиях градуировочная зависимость была линейна в интервале от 0,75 до 18 мг/л ( $r=0,999$ ). Предел обнаружения составил 0,24 мг/л. Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность для верхней и нижней

границы диапазона определяемых концентраций составили от 5 до 8 % и от 7 до 10 % (n=5) соответственно. Производительность схемы составляет 12 определений в час.

Правильность получаемых результатов подтверждали методом «введено-найденно», а также проводили анализ в соответствии с референтным методом ВЭЖХ-УФ [200]. Подвижная фаза состояла из метанола и 0,1 % раствора муравьиной кислоты. Длина волны детектирования составляла 280 нм. Пробоподготовка проб слюны [380] включала разбавление образцов в 50 раз деионизованной водой, после чего 0,5 мл разбавленной пробы смешивали с 1,5 мл метанола для осаждения белков. Для экстракции аналитов из твердых лекарственных форм [381] навеску пробы (200 мг) смешивали с 5 мл метанола и проводили извлечение в ультразвуковом поле в течение 30 минут при 30°C. В обоих случаях центрифугировали в течение 10 минут при 5000 об./мин, надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) и анализировали. Растворы для инъекций разбавляли в 2000 раз дистиллированной водой.

Полученные результаты были сравнены с помощью *F*- и *t*-тестов. Полученные *F*-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные *t*-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи валидируемой и референтной схем (таблица 21).

**Таблица 21** – Результаты определения диклофенака в пробах слюны и лекарственных препаратах (n=3, P = 0,95, F<sub>кр</sub> = 19,00, t<sub>кр</sub> = 2,78)

Проба (содержание диклофенака)	Единица измерения	Введено	Найдено		F- критерий	t- критерий
			ЦИА-ФД	ВЭЖХ-УФ [200]		
Слюна (<ПО)	10 <sup>-3</sup> моль/л	0,50	0,47±0,04	0,50±0,05	1,56	2,03
		1,00	0,91±0,04	0,94±0,07	3,06	1,07
		2,50	2,44±0,08	2,45±0,19	5,64	0,21
Таблетки «Диклофенак» (47 мг)	мг	–	44±3	43±3	1,00	1,02
Раствор для инъекций «Диклофенак» (23 мг/мл)	мг/мл		24±2	25±3	2,25	1,20

ЦИА-ФД - циклический инъекционный анализ с фотометрическим детектированием

Представленные в литературе схемы определения диклофенака в биологических жидкостях и лекарственных препаратах указаны в таблице 22. *Разработанная схема по сравнению со стационарными методиками определения диклофенака в биологических жидкостях позволяет автоматизировать стадию пробоподготовки и дериватизацию, повысить экспрессность и существенно снизить требуемые объемы органических растворителей. Более низкая производительность относительно проточных систем для анализа лекарственных препаратов связана со сложностью матрицы (биологические жидкости), так как в данном случае требуется включение в схему анализа стадии жидкостной экстракции для большей селективности. Предложенная схема сопоставима по чувствительности с аналогами.*

**Таблица 22** – Аналитические характеристики методов определения диклофенака в слюне и лекарственных препаратах

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Объем пробы, мл	Предел обнаружения, мг/л	Производительность, проб в час	Ссылка
ВЭЖХ-УФ	Слюна	Трехфазная мембранная жидкостная микроэкстракция с применением микрофлюидной платформы	0,005	0,08	-	[200]
ВЭТСХ-УФ	Сыворотка крови	Осаждение белков ацетонитрилом, жидкостно-жидкостная экстракция в этилацетат	0,5	0,12	-	[382]
КЭ-УФ	Плазма крови	Осаждение белков ацетонитрилом	0,2	0,03	-	[383]
ВЭЖХ-УФ	Лекарственные препараты	Жидкостная экстракция в полярные органические растворители или водные растворы кислот и оснований	-	0,29	-	[384]
Вольтамперометрия			0,1	0,6	-	[385]
MSFIA-BA			1,0	4,3	90	[386]
SIA-ПД		0,4	1,3	32	[387]	
ПИА-ФД		Экстракция в сегментированных потоках	0,16	0,38	40	[388]
ПИА-ФД		Автоматизированная твердофазная экстракция	1,2	0,12	9	[389]
ЦИА-ФД	Слюна, лекарственные препараты	Автоматизированная дериватизация и микроэкстракция из гомогенного раствора в ацетонитрил	0,5	0,24	12	Данная работа

ВЭТСХ-УФ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

MSFIA-BA – мультишприцевой проточно-инжекционный анализ с вольтамперометрическим детектированием

SIA-ПД – последовательный инжекционный анализ с потенциометрическим детектированием

ПИА-ФД – проточно-инжекционный анализ с фотометрическим детектированием

ЦИА-ФД – циклический инжекционный анализ с фотометрическим детектированием

В ходе исследований была впервые разработана схема экстракционно-фотометрического определения диклофенака в слюне и лекарственных препаратах на принципах проточного анализа. Оптоволоконный зонд оказался удобным решением для регистрации оптической плотности органической фазы в смесительной камере проточного анализатора. Данная работа выполнялась в рамках стажировки по программе Международного фонда Вышеград в Университете Павла Йозефа Шафарика (Кошице, Словакия) в группе Dr. Prof. V. Andruch. По итогам работы опубликована статья в журнале *Talanta* [390].

## Заключение

По результатам экспериментальной работы могут быть сделаны следующие выводы:

1. Оптимизированы условия хроматографического разделения и детектирования фторхинолонов, сульфаниламидов и тетрациклинов в варианте обращено-фазовой жидкостной хроматографии со спектрофотрическим и флуориметрическим детектированием с учетом растворимости экстрактов в подвижных фазах и чувствительности определения. Общее время ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ФЛ анализа не превышает 25 мин;

2. Разработана гидравлическая схема, включающая жидкостную микроэкстракцию офлоксацина из гомогенного раствора пробы (лекарственные препараты, моча) в высшие карбоновые кислоты для его ВЭЖХ-ФЛ определения. Для быстрого фазового разделения в условиях проточного анализа успешно реализована идея разрушения эмульсий пузырьками углекислого газа, которые образуются *in situ* в экстракционной системе. Достигнута высокая эффективность выделения офлоксацина (степень извлечения –  $90 \pm 5\%$  ( $n=3$ )). Предел обнаружения составил 4 мкг/л.

3. Предложен эффективный подход к микроэкстракционному выделению фторхинолонов из суспендированных проб (лекарственные препараты, ткани животного происхождения) на мембранах, импрегнированных экстрагентами с «переключаемой гидрофильностью» для их последующего ВЭЖХ-ФЛ определения. Степени извлечения достигают 83-87 %. Пределы обнаружения находятся в диапазоне от 1 до 5 мкг/л.

4. Установлено, что предложенный принцип микроэкстракционного концентрирования, основанный на *in situ* образовании дисперсной фазы экстрагента с «переключаемой гидрофильностью» с ее одновременным выделением на вращающемся пористом гидрофобном диске, позволяет существенно повысить экспрессность пробоподготовки по сравнению с мембранной микроэкстракцией, сокращая время извлечения с 30 до 5 мин. Возможности предложенного подхода были продемонстрированы для ВЭЖХ-УФ

определения тетрациклинов в лекарственных препаратах и моче с пределом обнаружения 30 мкг/л.

5. Подтверждена возможность применения ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоты и ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью» для проведения жидкостной микроэкстракции из гомогенного раствора. Установлено, что в случае ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислоты разделение фаз протекает относительно быстро и самопроизвольно, что позволило реализовать автоматизированный экстракционный процесс в смесительной камере проточного анализатора с высокой экспрессностью (длительность пробоподготовки – 5 мин) для извлечения сульфаниламидов из лекарственных препаратов и мочи. В свою очередь, ГЭР на основе тимола и высших карбоновых кислот обеспечивают более высокие коэффициенты концентрирования сульфаниламидов, и как следствие более низкие пределы их обнаружения (от 1 до 5 мкг/л).

6. Оптимизированы условия скрининг-анализа биологических жидкостей в условиях проточной мультинасосной системы с предварительным сорбционным выделением на ферромагнитных наночастицах для автоматизированного хемилюминесцентного определения общего содержания фторхинолонов. Раствор аммиака в метаноле был предложен и обоснован в качестве эффективного элюента для последующего хемилюминесцентного детектирования аналитов. В оптимизированных условиях сорбционного выделения и детектирования фторхинолонов предел обнаружения в пересчете на содержание флероксацина составил 30 мкг/кг.

7. Установлены условия дериватизации диклофенака в присутствии гексацианоферрата(III) калия в щелочной среде для его последующего автоматизированного экстракционно-фотометрического определения в лекарственных препаратах и слюне. Полный цикл анализа автоматизирован в условиях проточной системы и занимает 3 мин. Продемонстрированы возможности оптоволоконного зонда при регистрации оптической плотности органической фазы сразу после фазового разделения в случае образования

неустойчивой аналитической формы. Предел обнаружения диклофенака составил 0,24 мг/л.

8. Разработанные подходы были успешно апробированы при анализе лекарственных препаратов, биологических жидкостей и тканей животного происхождения с подтверждением правильности получаемых результатов референтными методами флуориметрии, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ФЛ и ВЭЖХ-МС/МС.

Предложенные принципы осуществления микроэкстракционного выделения и концентрирования, в том числе в автоматизированных системах, показали высокую эффективность и экспрессность при проведении пробоподготовки. Несмотря на то, что возможности разработанных методов показаны на примере конкретных аналитов или их групп, каждый из них может найти применение в фармацевтическом анализе для определения широкого круга ЛВ. Необходимо отметить, что предложенные экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью» обладают хорошей экстрагирующей способностью по отношению ко всем рассмотренным классам антибактериальных агентов и их область применения не ограничивается выбранными для иллюстрации аналитами.

На основании полученных результатов, можно сделать вывод, что в рамках диссертационной работы разработан комплекс методов фармацевтического анализа, пригодный для решения разнообразных задач. В целом выбор метода микроэкстракции зависит от анализируемого объекта и концентраций целевых аналитов в нем. Среди разработанных способов определения ЛВ автоматизированные схемы наиболее совместимы с жидкими пробами. Для твердофазных и суспендированных проб предпочтительным является метод мембранной микроэкстракции, так как при этом предварительное переведение аналитов в раствор не требуется, а мембрана минимизирует контакт между органической фазой и твердыми компонентами пробы. Предложенные подходы также различаются по коэффициентам концентрирования, что следует учитывать при определении низких концентраций аналитов.

### Список сокращений и условных обозначений

- ВТФМЭ – волоконная твердофазная микроэкстракция
- ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
- ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
- ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием
- ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием
- ВЭТСХ-УФ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ГЖМЭ – жидкостная микроэкстракция из гомогенного раствора
- ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
- ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором
- ДЖМЭ – дисперсионная жидкостная микроэкстракция
- ДТФМЭ – дисперсионная твердофазная микроэкстракция
- КМЭ – капельная микроэкстракция
- КЭ-УФ – капиллярный электрофорез с фотометрическим детектированием
- ЛВ – лекарственное вещество
- ЛС – лекарственное средство
- М-ДТФМЭ – магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция
- МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция
- ММЭ – мицеллярная микроэкстракция
- МЭ – микроэкстракция
- НПВС – нестероидные противовоспалительные лекарственные средства
- ПИА-УФ – проточно-инжекционный анализ с фотометрическим детектированием
- СМЭ-ВМ – сорбционная микроэкстракция на вкладыше магнитной мешалки

СФХ-УФ – высокоэффективная сверхкритическая флюидная хроматография со спектрофотометрическим детектированием

ТТФМЭ – тонкослойная твердофазная микроэкстракция

ТФМЭ-НП – твердофазная микроэкстракция в набивном патроне

ТФМЭ-УМ – твердофазная микроэкстракция с упаковкой сорбента внутрь мембраны

ЦИА-ФД – циклический инъекционный анализ с фотометрическим детектированием

MSFIA-ВА – мультишприцевой проточно-инжекционный анализ с вольтамперометрическим детектированием

SIA-ПД – последовательный инъекционный анализ с потенциометрическим детектированием

### Список литературы

1. Новиков В.Е. Фармакология хинолонов и фторхинолонов / В.Е. Новиков // *Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии.* – 2008. – Т. 6. – №3. – С. 57–61.
2. Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (дата обращения 15.06.2020 г.).
3. Turnidge J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones / J. Turnidge // *Drugs.* – 1999. – V. 58. – P. 29-36.
4. Ross D.L. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. II. Acid ionization constants and their relationship to structure / D.L. Ross, C.M. Riley // *Int. J. Pharm.* – 1992. – V. 83. – P. 267-272.
5. Şanlı S. Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and LC methods in water and acetonitrile-water binary mixtures / S. Şanlı, N. Şanlı, G. Alsancak // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2009. – V. 20. – I. 5. – P. 939-946.
6. Szczepaniak W. Relationship between hydrophobic properties of amphoteric sulfonamides and their retention in micellar reversed phase liquid chromatography / W. Szczepaniak, A. Szymański // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2000. – V. 23. – I. 8. – P. 1217-1231.
7. Şanlı S. Solvent effects on pKa values of some substituted sulfonamides in acetonitrile-water binary mixtures by the UV-spectroscopy method / S. Şanlı, Y. Altun, N. Şanlı, G. Alsancak, J.L. Beltran // *J. Chem. Eng. Data.* – 2009. – V. 54. – I. 11. – P. 3014-3021.
8. Babić S. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients / S. Babić, A.J.M. Horvat, D. Mutavdžić Pavlović, M. Kaštelan-Macan // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2007. – V. 26. – I. 11. – P. 1043-1061.
9. ФС.2.1.0152.18. Офлоксацин. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.
10. ФС.2.1.0215.18. Ципрофлоксацин. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.
11. ФС.2.1.0216.18. Ципрофлоксацина гидрохлорид. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

12. Tacic A. Antimicrobial sulfonamide drugs / A. Tacic, V. Nikolic, L. Nikolic, I. Savic // *Adv. Technol.* – 2017. – V. 6. – I. 1. – P. 58-71.

13. Нгуен Ч.З. Биофармацевтический анализ месалазина и сульфаниламидов для оценки фенотипа ацетилирования человека: дис. ...канд. хим. наук: 14.04.02 / Нгуен Чунг Зунг. Казань, 2012. – 185 с.

14. ФС.2.1.0181.18. Сульфадимидин. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

15. Ian C. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance / C. Ian, R. Marilyn // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2001. – V. 65. – I. 3. – P. 232-260.

16. Agwuh K.N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines / K.N. Agwuh, A. MacGowan // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – V. 58. – I. 2. – P. 256-265.

17. ФС.2.1.0186.18. Тетрациклин. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

18. ФС.2.1.0094.18. Диклофенак натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

19. Марцо А. Фармакокинетика калиевой соли диклофенака после перорального приема саше и таблеток / А. Марцо, Л.Д. Бо, Ф. Верга, Н.Ц. Монти, Г. Аббондати, Р.А. Теттаманти, Ф. Кривелли, М.Р. Ур, Ш. Исмаили // *Современная ревматология.* – 2008. – Т. 2. – №. 3. – С. 59-63.

20. Ocaña-González J.A. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review / J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M.Á. Bello-López, M. Ramos-Payán // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 905. – P. 8-23.

21. Jalili V. Bioanalytical applications of microextraction techniques: A review of reviews / V. Jalili, A. Barkhordari, A. Ghiasvand // *Chromatographia.* – 2020. – V. 83. – I. 5. – P. 567-577.

22. Kabir A. Recent trends in microextraction techniques employed in analytical and bioanalytical sample preparation / A. Kabir, M. Locatelli, H.I. Ulusoy // *Separations.* – 2017. – V. 4. – I. 4. – P. 1-15.

23. He Y. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology / Y. He, M. Concheiro-Guisan // *Biomed. Chromatogr.* – 2019. – V. 33. – I. 1. – P. 1-12.

24. Rutkowska M. Liquid–phase microextraction: A review of reviews / M. Rutkowska, J. Płotka-Wasyłka, M. Sajid, V. Andruch // *Microchem. J.* – 2019. – V. 149. – 103989.

25. Prosen H. Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples / H. Prosen // *Molecules.* – 2014. – V. 19. – I. 5. – P. 6776-6808.

26. Hashemi B. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants / B. Hashemi, P. Zohrabi, K.H. Kim, M. Shamsipur, A. Deep, J. Hong // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2017. – V. 97. – P. 83–95.

27. Крылов В.А. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей / В.А. Крылов, А.В. Крылов, П.В. Мосягин, Ю.О. Маткивская // *ЖАХ.* – 2011. – Т. 66. – № 4. – С. 341-360.

28. Jain A. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review / A. Jain, K.K. Verma // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 706. – I. 1. – P. 37-65.

29. Tang S. Single-drop microextraction / S. Tang, T. Qi, P.D. Ansah, J.C. Nalouzebi Fouemina, W. Shen, C. Basheer, H.K. Lee // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2018. – V. 108. – P. 306-313.

30. Kocúrová L. A glance at achievements in the coupling of headspace and direct immersion single-drop microextraction with chromatographic techniques / L. Kocúrová, I.S. Balogh, V. Andruch // *J. Sep. Sci.* – 2013. – V. 36. – I. 23. – P. 3758-3768.

31. Barfi B. Dispersive suspended-solidified floating organic droplet microextraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Comparison of suspended droplet-based and dispersive-based liquid-phase microextraction methods / B. Barfi, A. Asghari, M. Rajabi, N. Mirkhani // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – I. 129. – P. 106574-106588.

32. Gao W. Application of single drop liquid – liquid – liquid microextraction for

the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis / W. Gao, G. Chen, Y. Chen, X. Zhang, Y. Yin, Z. Hu // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – V. 879. – I. 3–4. – P. 291-295.

33. García-Vázquez A. Single-drop microextraction combined in-line with capillary electrophoresis for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine samples / A. García-Vázquez, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar // *Electrophoresis.* – 2016. – V. 37. – I. 2. – P. 274-281.

34. Su R. Headspace microextraction of sulfonamides from honey by hollow fibers coupled with ultrasonic nebulization / R. Su, X. Li, W. Liu, X. Wang, H. Yang // *J. Agric. Food Chem.* – 2016. – V. 64. – I. 7. – P. 1627-1634.

35. Shariati S. Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC –UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics / S. Shariati, Y. Yamini, A. Esrafilii // *J. Chromatogr. B.* – 2009. – V. 877. – P. 393-400.

36. Esrafilii A. Measurement of fluoroquinolone antibiotics from human plasma using hollow fiber liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport / A. Esrafilii, Y. Yamini, M. Ghambarian, S. Shariati, M. Moradi // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2012. – V. 35. – I. 3. – P. 343-354.

37. Tajabadi F. Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin / F. Tajabadi, M. Ghambarian, Y. Yamini, N. Yazdanfar // *Talanta.* – 2016. – V. 160. – P. 400-409.

38. Villar Navarro M. Hollow fiber liquid-phase microextraction and determination of nonsteroidal anti-inflammatories by capillary electrophoresis and sulfonamides by HPLC in human urine / M. Villar Navarro, M. Ramos Payán, R. Fernández-Torres, M.A. Bello López // *Biomed. Chromatogr.* – 2013. – V. 27. – I. 2. – P. 246-253.

39. Han D. Ionic liquid as hollow fibre membrane carrier for extraction of fluoroquinolone antibiotics in milk coupled with high-performance liquid chromatography quantification / D. Han, M. Tian, K.H. Row // *Int. J. Environ. Anal.*

Chem. – 2012. – V. 92. – I. 9. – P. 1036-1045.

40. Boström M.L. A specific, highly enriching and green method for hollow fiber liquid phase microextraction of ionizable pharmaceuticals from fish tissue / M.L. Boström, C. Huang, H. Engström, E. Larsson, O. Berglund, J.Å. Jönsson // *Anal. Methods*. – 2014. – V. 6. – I. 15. – P. 6031-6037.

41. Saraji M. Electrospray ionization-ion mobility spectrometry in the negative mode combined with hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction for the determination of diclofenac in urine and plasma samples / M. Saraji, B. Maleki, T. Khayamian, N. Mehrafza // *Chromatographia*. – 2017. – V. 80. – I. 6. – P. 951-959.

42. Wu L. Determination of sulfonamides in butter samples by ionic liquid magnetic bar liquid-phase microextraction high-performance liquid chromatography / L. Wu, Y. Song, M. Hu, X. Xu, H. Zhang, A. Yu, Q. Ma, Z. Wang // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – V. 407. – I. 2. – P. 569-580.

43. Zhang H. Simultaneous trace determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in purified water, tap water, juice, soda and energy drink by hollow fiber-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry / H. Zhang, Z. Du, Y. Ji, M. Mei // *Talanta*. – 2013. – V. 109. – P. 177-184.

44. Atarodi A. Introduction of fullerene as a new carrier in electromembrane extraction for the determination of ibuprofen and sodium diclofenac as model acidic drugs in real urine samples / A. Atarodi, M. Chamsaz, A.Z. Moghaddam, H. Tabani // *Chromatographia*. – 2017. – V. 80. – I. 6. – P. 881-890.

45. Payán M.R. HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) / M.R. Payán, M.Á.B. López, R. Fernández-Torres, J.L.P. Bernal, M.C. Mochón // *Anal. Chim. Acta*. – 2009. – V. 653. – I. 2. – P. 184-190.

46. Seidi S. Low-voltage electrically-enhanced microextraction as a novel technique for simultaneous extraction of acidic and basic drugs from biological fluids / S. Seidi, Y. Yamini, M. Rezazadeh, A. Esrafilii // *J. Chromatogr. A*. – 2012. – V. 1243. – P. 6-13.

47. Román-Hidalgo C. Direct capillary electrophoresis analysis of basic and acidic drugs from microliter volume of human body fluids after liquid-phase microextraction through nano-fibrous membrane / C. Román-Hidalgo, M. Dvořák, P. Kubáň, M.J. Martín-Valero, M.Á. Bello-López // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2020. – V. 412. – I. 1. – P. 181-191.

48. Xu H. Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction / H. Xu, H.Y. Mi, M.M. Guan, H.Y. Shan, Q. Fei, Y.F. Huan, Z.Q. Zhang, G.D. Feng // *Food Chem.* – 2017. – V. 232. – P. 198-202.

49. Worawit C. In-line carbon nanofiber reinforced hollow fiber-mediated liquid phase microextraction using a 3D printed extraction platform as a front end to liquid chromatography for automatic sample preparation and analysis: A proof of concept study / C. Worawit, D.J. Cocovi-Solberg, P. Varanusupakul, M. Miró // *Talanta.* – 2018. – V. 185. – P. 611-619.

50. Es'haghi Z. Sol-gel-derived magnetic SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> nanocomposite reinforced hollow fiber-solid phase microextraction for enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human hair prior to high performance liquid chromatography / Z. Es'haghi, E. Esmaeili-Shahri // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2014. – V. 973. – P. 142-151.

51. Davarani S.S.H. Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography / S.S.H. Davarani, A. Pourahadi, S. Nojavan, M.H. Banitaba, M. Nasiri-Aghdam // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 722. – P. 55-62.

52. Fotouhi L. Evaluation of pulsed electromembrane extraction for the analysis of diclofenac and mefenamic acid in biological fluids / L. Fotouhi, S. Seidi, Y. Yamini, E. Hosseini // *Anal. Methods.* – 2015. – V. 7. – I. 6. – P. 2848-2854.

53. Rodríguez M.P. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of tetracycline drugs from egg supplements before flow injection analysis coupled to a liquid waveguide capillary cell / M.P. Rodríguez, H.R. Pezza, L. Pezza // *Anal. Bioanal.*

Chem. – 2016. – V. 408. – I. 22. – P. 6201-6211.

54. Gao S. Ultrasound-assisted ionic liquid/ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in infant formula milk powder using high-performance liquid chromatography / S. Gao, X. Yang, W. Yu, Z. Liu, H. Zhang // *Talanta*. – 2012. – V. 99. – P. 875-882.

55. Teglia C.M. Determination of six veterinary pharmaceuticals in egg by liquid chromatography: Chemometric optimization of a novel air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction by solid floating organic drop / C.M. Teglia, L. Gonzalo, M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea // *Food Chem.* – 2019. – V. 273. – P. 194-202.

56. Shukri D.S.M. Liquid chromatographic determination of NSAIDs in urine after dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets / D.S.M. Shukri, M.M. Sanagi, W.A.W. Ibrahim, N.N.Z. Abidin, H.Y. Aboul-Enein // *Chromatographia*. – 2015. – V. 78. – P. 987-994.

57. Moema D. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography / D. Moema, M.M. Nindi, S. Dube // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 730. – P. 80-86.

58. Santana A.C.B.A. Development of a method based on DLLME and UFLC-DAD for the determination of antibiotics in honey samples and the study of their degradation kinetics / A.C.B.A. Santana, M.V.A. Santana, P.A.P. Pereira // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2018. – V. 29. – I. 7. – P. 1538-1550.

59. Teglia C.M. Dispersive liquid-liquid microextraction of quinolones in porcine blood: Validation of a CE method using univariate calibration or multivariate curve resolution-alternating least squares for overlapped peaks / C.M. Teglia, M.S. Cámara, L. Vera-Candioti // *Electrophoresis*. – 2017. – V. 38. – I. 8. – P. 1122-1129.

60. Mookantsa S.O.S. Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry / S.O.S. Mookantsa, S. Dube, M.M. Nindi // *Talanta*. – 2016. – V. 148. – P. 321-328.

61. Deng K. Determination of Sulfonamide Residues in Chicken Liver Using

High-Performance Liquid Chromatography / K. Deng, X. Lan, G. Sun, L.Y. Ji, X. Zheng // *Food Anal. Methods.* – 2016. – V. 9. – I. 12. – P. 3337-3344.

62. Chi X. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography / X. Chi, G. Zhang, Y. Xiao, Q. Dong, F. Hu // *Asian J. Chem.* – 2014. – V. 26. – I. 7. – P. 1905-1909.

63. Wang G.N. Determination of fluoroquinolone drugs in meat by ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography / G.N. Wang, C. Feng, H.C. Zhang, Y.Q. Zhang, L. Zhang, J.P. Wang // *Anal. Methods.* – 2015. – V. 7. – I. 3. – P. 1046-1052.

64. Wang H. Determination of fluoroquinolone antibiotics via ionic-liquid-based, salt-induced, dual microextraction in swine feed / H. Wang, M. Gao, J. Gao, N. Yu, H. Huang, Q. Yu, X. Wang // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – V. 408. – I. 22. – P. 6105-6114.

65. Song J. Ionic liquid dispersive liquid – liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for determination of tetracycline drugs in eggs / J. Song, H. Zhang, Q. Zhang, C. Feng, N. Wang // *Analyt. Methods.* – 2014. – V. 6. – P. 6459-6466.

66. Xu X. Ionic liquid-based microwave-assisted dispersive liquid – liquid microextraction and derivatization of sulfonamides in river water, honey, milk, and animal plasma / X. Xu, R. Su, X. Zhao, Z. Liu, Y. Zhang, D. Li, X. Li, H. Zhang, Z. Wang // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 707. – P. 92-99.

67. Ji Y. Rapid analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in tap water and drinks by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled to ultra-high performance supercritical fluid chromatography / Y. Ji, Z. Du, H. Zhang, Y. Zhang // *Analyt. Methods.* – 2014. – V. 6. – P. 7294-7304.

68. Junza A. Multiclass method for the determination of quinolones and  $\beta$ -lactams, in raw cow milk using dispersive liquid–liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / A. Junza, N. Dorivalgarcía, A. Zafra-gómez, D. Barrón, O. Ballesteros, J. Barbosa, A. Navalón // *J.*

Chromatogr. A. – 2014. – V. 1356. – P. 10-22.

69. Santana A.C.B.A. Development of a method based on DLLME and UFLC-DAD for the determination of antibiotics in honey samples and the study of their degradation kinetics / A.C.B.A. Santana, M.V.A. Santana, P.A.P. Pereira // J. Braz. Chem. Soc. – 2018. – V. 29. – I. 7. – P. 1538-1550.

70. Gao J. Development and optimization of a naphthoic acid-based ionic liquid as a “non-organic solvent microextraction” for the determination of tetracycline antibiotics in milk and chicken eggs / J. Gao, H. Wang, J. Qu, H. Wang, X. Wang // Food Chem. – 2017. – V. 215. – P. 138-148.

71. Assadian F. Application of response surface modeling and chemometrics methods for the determination of ofloxacin in human urine using dispersive liquid-liquid microextraction combined with spectrofluorimetry / F. Assadian, A. Niazi // J. Braz. Chem. Soc. – 2017. – V. 28. – I. 12. – P. 2291-2300.

72. Zeeb M. Modified ionic liquid cold-induced aggregation dispersive liquid-liquid microextraction combined with spectrofluorimetry for trace determination of ofloxacin in pharmaceutical and biological samples / M. Zeeb, M.R. Ganjali, P. Norouzi // Daru. – 2011. – V. 19. – I. 6. – P. 446-454.

73. Gao M. Salting-out-enhanced ionic liquid microextraction with a dual-role solvent for simultaneous determination of trace pollutants with a wide polarity range in aqueous samples / M. Gao, J. Qu, K. Chen, L. Jin, R.A. Dahlgren, H. Wang, C. Tan, X. Wang // Anal. Bioanal. Chem. – 2017. – V. 409. – P. 6287-6303.

74. Ebrahimpour B. Application of ionic surfactant as a carrier and emulsifier agent for the microextraction of fluoroquinolones / B. Ebrahimpour, Y. Yamini, M. Moradi // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2012. – V. 66. – P. 264-270.

75. Ji Y. Eco-friendly ultrasonic assisted liquid – liquid microextraction method based on hydrophobic deep eutectic solvent for the determination of sulfonamides in fruit juices / Y. Ji, Z. Meng, J. Zhao, H. Zhao, L. Zhao // J. Chromatogr. A. – 2020. – V. 1609. – 460520.

76. Shishov A. An effervescence-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent decomposition: Determination of

ketoprofen and diclofenac in liver / A. Shishov, A. Gerasimov, D. Nechaeva, N. Volodina, E. Bessonova, A. Bulatov // *Microchem. J.* – 2020. – V. 156. – 104837.

77. Bazregar M. Tandem air-agitated liquid-liquid microextraction as an efficient method for determination of acidic drugs in complicated matrices / M. Bazregar, M. Rajabi, Y. Yamini, A. Asghari // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 917. – P. 44-52.

78. Ali M. Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids using simultaneous derivatization and air-assisted liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection / M. Ali, F. Hassan // *J. Iran. Chem. Soc.* – 2016. – V. 13. – I. 2. – P. 289-298.

79. Wang L. Application of air-assisted liquid-liquid microextraction for determination of some fluoroquinolones in milk powder and egg samples : comparison with conventional dispersive liquid-liquid microextraction / L. Wang, T. Huang, H.X. Cao, Q.X. Yuan, Z.P. Liang, G.X. Liang // *Food Anal. Methods.* – 2016. – V. 9. – P. 2223-2230.

80. Moradi P. Determination of acidic drugs in biological and environmental matrices by membrane-based dual emulsification liquid-phase microextraction followed by high-performance liquid chromatography / P. Moradi, A. Asghari // *J. Sep. Sci.* – 2019. – V. 42. – P. 897-905.

81. Sereshti H. Miniaturized salting-out liquid – liquid extraction in a coupled-syringe system combined with HPLC–UV for extraction and determination of sulfanilamide / H. Sereshti, M. Khosraviani, M.S. Amini-fazl // *Talanta.* – 2014. – V. 121. – P. 199-204.

82. Gao M. Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid–liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food / M. Gao, H. Wang, M. Ma, Y. Zhang, X. Yin, R.A. Dahlgren, D. Du, X. Wang // *Food Chem.* – 2015. – V. 175. – P. 181-188.

83. Feng X. Ionic liquid-based microwave-assisted liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography determination of sulfonamides from animal oils / X. Feng, F. Liang, R. Sui, L. Wu, X. Li, X. Wang, H. Zhang, A. Yu // *Chem. Res. Chin. Univ.* – 2013. – V. 29. – I. 4. – P. 647-652.

84. Wang Z. Matrix solid-phase dispersion coupled with homogeneous ionic liquid microextraction for the determination of sulfonamides in animal tissues using high-performance liquid chromatography / Z. Wang, M. He, C. Jiang, F. Zhang, S. Du, W. Feng, H. Zhang // *J. Sep. Sci.* – 2015. – V. 38. – P. 4127-4135.

85. Han J. Ionic liquid-salt aqueous two-phase extraction based on salting-out coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in water and food / J. Han, Y. Wang, Y. Liu, Y. Li, Y. Lu // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 405. – P. 1245-1255.

86. Liu J. Miniaturized salting-out liquid – liquid extraction of sulfonamides from different matrices / J. Liu, M. Jiang, G. Li, L. Xu, M. Xie // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – V. 679. – P. 74-80.

87. Wang H. A phase separation method for analyses of fluoroquinones in meats based on ultrasound-assisted salt-induced liquid–liquid microextraction and a new integrated device / H. Wang, M. Gao, Y. Xu, W. Wang, L. Zheng, R.A. Dahlgren, X. Wang // *Meat Sci.* – 2015. – V. 106. – P. 61-68.

88. Du D. Salting-out induced liquid-liquid microextraction based on the system of acetonitrile/magnesium sulfate for trace-level quantitative analysis of fluoroquinolones in water, food and biological matrices by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector / D. Du, G. Dong, Y. Wu, J. Wang, M. Gao, X. Wang, Y. Li // *Anal. Methods.* – 2014. – V. 6. – P. 6973-6980.

89. Gao S. Ionic liquid-based homogeneous liquid–liquid microextraction for the determination of antibiotics in milk by high-performance liquid chromatography / S. Gao, H. Jin, J. You, Y. Ding, N. Zhang, Y. Wang, R. Ren, R. Zhang, H. Zhang // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – I. 41. – P. 7254-7263.

90. Kaynaker M. Determination of tetracyclines in milk, eggs and honey using in-situ ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction / M. Kaynaker, M. Antep, M. Merdivan. // *J. Anal. Chem.* – 2018. – V. 73. – I. 1. – P. 23-29.

91. Fotouhi L. Optimization of temperature-controlled ionic liquid homogenous liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for analysis of diclofenac and mefenamic acid in urine sample / L. Fotouhi, S. Seidi, F.

Shahsavari // J. Iran. Chem. Soc. – 2016. – V. 13. – P. 1289-1299.

92. Hassan M. Switchable-hydrophilicity solvent liquid–liquid microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids prior to HPLC-DAD determination / M. Hassan, U. Alshana // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2019. – V. 174. – P. 509-517.

93. Tsai W. Determination of sulfonamides in swine muscle after salting-out assisted liquid extraction with acetonitrile coupled with back-extraction by a water/acetonitrile/dichloromethane ternary component system prior to high-performance liquid chromatography / W. Tsai, T. Huang, H. Chen, Y. Wu // J. Chromatogr. A. – 2010. – V. 1217. – P. 250-255.

94. Yu F. Ultrasound-assisted cloud point extraction for determination of sulfonamides in honey samples by fluorescence spectrophotometry / F. Yu, C. Liu, Y. Guo, Y. Yang. – 2013. – V. 5. – P. 3920-3926.

95. Supharoek S. A new spectrophotometric method based on peroxidase enzymatic reaction to determine tetracycline in pharmaceutical and water samples / S. Supharoek, K. Ponghong, B. Weerasuk, W. Siriangkawut, K. Grudpan // J. Iran. Chem. Soc. – 2020. *In press*.

96. Nong C. Dual-cloud point extraction coupled to high performance liquid chromatography for simultaneous determination of trace sulfonamide antimicrobials in urine and water samples / C. Nong, Z. Niu, P. Li, C. Wang, W. Li, Y. Wen // J. Chromatogr. B. – 2017. – V. 1051. – P. 9-16.

97. Wu H. Determination of ofloxacin and gatifloxacin by mixed micelle-mediated cloud point extraction-fluorimetry combined methodology / H. Wu, G. Zhao, L. Du // Spectrochim. Acta, Part A. – 2010. – V. 75. – I. 5. – P. 1624-1628.

98. Bogdanova P. Supramolecular solvents formation in aqueous solutions containing primary amine and monoterpenoid compound: Liquid phase microextraction of sulfonamides / P. Bogdanova, A. Pochivalov, C. Vakh, A. Bulatov // Talanta. – 2020. – V. 216. – P. 120992.

99. Cherkashina K. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in

urine samples followed by HPLC-UV determination / K. Cherkashina, C. Vakh, S. Lebedinets, A. Pochivalov, L. Moskvina, A. Lezov, A. Bulatov // *Talanta*. – 2018. – V. 184. – P. 122-127.

100. Carasek E. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry : A review / E. Carasek, J. Merib // *Anal. Chim. Acta*. – 2015. – V. 880. – P. 8-25.

101. Alexovic M. Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction . Part 2 : Approaches based on impregnated membranes and porous supports / M. Alexovic, B. Horstkotte, P. Solich, J. Sabo // *Anal. Chim. Acta*. – 2016. – V. 907. – P. 18-30.

102. Bello-lópez M.Á. Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): A Review / M.Á. Bello-lópez, M. Ramos-Payán, J.A. Ocana-Gonzalez, R. Fernández-Torres, M. Callejon-Mochon // *Anal. Lett.* – 2012. – V. 45. – P. 804-830.

103. Lee J. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review / J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard // *Anal. Chim. Acta*. – 2008. – V. 624. – I. 2. – P. 253-268.

104. Campillo N. Ten years of dispersive liquid-liquid microextraction and derived techniques / N. Campillo, P. Viñas, J. Šandrejová, V. Andruch // *Appl. Spectrosc. Rev.* – 2016. – V. 52. – I. 4. – P. 267-415.

105. Rykowska I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review / I. Rykowska, J. Ziemblińska, I. Nowak // *J. Mol. Liq.* – 2018. – V. 259. – P. 319-339.

106. Kocúrová L. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water . A review / L. Kocúrová, I.S. Balogh, Š. Jana, V. Andruch . // *Microchem. J.* – 2012. – V. 102. – P. 11-17.

107. Pavón J.L.P. Determination of trihalomethanes in water samples: A review / J.L.P. Pavón, S.H. Martín, C.G. Pinto, B.M. Cordero // *Anal. Chim. Acta*. – 2008. – V. 629. – P. 6-23.

108. Shishov A.Y. A new approach for microextraction of non-steroidal anti-

inflammatory drugs from human urine samples based on in-situ deep eutectic mixture formation / A.Y. Shishov, M. V Chislov, D. V Nechaeva, L.N. Moskvina, A. V Bulatov // *J. Mol. Liq.* – 2018. – V. 272. – P. 738-745.

109. Tang B. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples / B. Tang, H. Zhang, K.H. Row // *J. Sep. Sci.* – 2015. – V. 38. – P. 1053-1064.

110. Smith E.L. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications / E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder // *Chem. Rev.* – 2014. – V. 114. – P. 11060-11082.

111. Shishov A. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review / A. Shishov, A. Bulatov, M. Locatelli, S. Carradori, V. Andruch // *Microchem. J.* – 2017. – V. 135. – P. 33-38.

112. Dwamena A.K. Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction / A.K. Dwamena // *Separations.* – 2019. – V. 6. – I.1 – 9.

113. Shishov A. Deep eutectic solvents are not only effective extractants / A. Shishov, A. Pochivalov, L. Nugbienyo, V. Andruch, A. Bulatov // *Trends Anal. Chem.* – 2020. – 115956. *In press.*

114. Shishov A. HPLC-MS/MS determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk based on simultaneous deep eutectic solvents formation and its solidification / A. Shishov, D. Nechaeva, A. Bulatov // *Microchem. J.* – 2019. – V. 150. – 104080.

115. Anthemidis A.N. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review / A.N. Anthemidis, K.G. Ioannou // *Talanta.* – 2009. – V. 80. – P. 413-421.

116. Tang Y.Q. Salting-out assisted liquid–liquid extraction for bioanalysis / Y.Q. Tang, N. Weng // *Bioanal.* – 2013. – V. 5. – I. 12. – P. 1583-1598.

117. Bazel Y. Switchable hydrophilicity solvents in analytical chemistry / Y. Bazel, M. Rečlo, Y. Chubirka // *Microchem. J.* – 2020. – V. 127. – 105115.

118. Sadaghiana A.S. Clouding of a nonionic surfactant: the effect of added surfactants on the cloud point / A.S. Sadaghiana, A. Khan // *J. Colloid Interface Sci.* – 1991. – V. 144. – I. 1. – P. 191-200.

119. Paleologos E.K. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction / E.K. Paleologos, D.L. Giokas, M.I. Karayannis // Trends Anal. Chem. – 2005. – V. 24. – I. 5. – P. 426-436.

120. Ballesteros-Gómez A. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds . A review / A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio // Anal. Chim. Acta. – 2010. – V. 677. – P. 108-130.

121. Yazdi A.S. Surfactant-based extraction methods / A.S. Yazdi // Trends Anal. Chem. – 2011. – V. 30. – I. 6. – P. 918-929.

122. Зайцев В.Н. Твердофазное микроэкстракционное концентрирование / В.Н. Зайцев, М.Ф. Зуй // ЖАХ. – 2014. – Т. 69. – № 8. – С. 1-14.

123. Федотов П.С. Твердофазная экстракция органических веществ: нетрадиционные методы и подходы / П.С. Федотов, Г.И. Малофеева, Е.Ю. Савонина, Б.Я. Спиваков // ЖАХ. – 2019. – Т. 74. – № 3. – P. 163-172.

124. Duan C. Recent developments in solid-phase microextraction for on-site sampling and sample preparation / C. Duan, Z. Shen, D. Wu, Y. Guan // TrAC, Trends Anal. Chem. – 2011. – V. 30. – I. 10. – P. 1568-1574.

125. Vuckovic D. High-throughput solid-phase microextraction in multi-well-plate format / D. Vuckovic // TrAC, Trends Anal. Chem. – 2013. – V. 45. – P. 136-153.

126. Arroyo D. Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry / D. Arroyo, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia // J. Chromatogr. A. – 2011. – V. 1218. – I. 28. – P. 4487-4497.

127. Kumar A. Determination of norfloxacin and enrofloxacin by solid-phase microextraction/high-performance liquid chromatography / A. Kumar, G. Dhingra, A.K. Malik, D.K. Tewary // J. AOAC Int. – 2008. – V. 91. – I. 6. – P. 1339-1343.

128. Lu K.H. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry / K.H. Lu, C.Y. Chen, M.R. Lee // Talanta. – 2007. – V. 72. – I. 3. – P. 1082-1087.

129. Khaled A. Development and validation of a fully automated solid phase microextraction high throughput method for quantitative analysis of multiresidue veterinary drugs in chicken tissue / A. Khaled, E. Gionfriddo, V. Acquaro, V. Singh, J. Pawliszyn // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – V. 1056. – P. 34-46.

130. Zhao T. Preparation of temperature sensitive molecularly imprinted polymer for solid-phase microextraction coatings on stainless steel fiber to measure ofloxacin / T. Zhao, X. Guan, W. Tang, Y. Ma, H. Zhang // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – V. 853. – I. 1. – P. 668-675.

131. Hu X. Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymers for trace analysis of tetracyclines in complicated samples / X. Hu, J. Pan, Y. Hu, Y. Huo, G. Li // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1188. – I. 2. – P. 97-107.

132. Lu Y. Preparation of hydrophilic molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for the selective removal and extraction of trace tetracyclines residues in animal derived foods / Y. Lu, L. Lei, J. He, T. Zhao // *J. Sep. Sci.* – 2020. – V. 43. – I. 11. – P. 2172-2179.

133. Mirzajani R. Fabrication of ciprofloxacin molecular imprinted polymer coating on a stainless steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber for sensitive determination of fluoroquinolones in biological fluids and tablet formulation using HPLC-UV detection / R. Mirzajani, F. Kardani // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 122. – P. 98-109.

134. Mirzajani R. 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 / R. Mirzajani, F. Kardani, Z. Ramezani // *Microchem. J.* – 2019. – V. 144. – P. 270-284.

135. Sarafraz-Yazdi A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by hollow-fiber liquid membrane-protected solid-phase microextraction based on sol-gel fiber coating / A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, G. Rounaghi, H. Eshtiagh-Hosseini // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2012. – V. 908. – P.

67-75.

136. Pei M. Preparation and evaluation of an adsorbent based on poly (muconic acid-co-divinylbenzene/ethylenedimethacrylate) for multiple monolithic fiber solid-phase microextraction of tetracycline antibiotics / M. Pei, X. Huang // *J. Chromatogr. A.* – 2017. – V. 1517. – P. 1-8.

137. Xu Z.G. Polymer monolithic rods microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of trimethoprim, sulfadiazine and sulfamethoxazole in honey samples / Z.G. Xu, L.G. Wang, Y.L. Chen, Z.M. Liu // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2014. – V. 6. – I. 5. – P. 54-58.

138. Wu J. Preparation of a novel monolith-based adsorbent for solid-phase microextraction of sulfonamides in complex samples prior to HPLC-MS/MS analysis / J. Wu, Y. Li, W. Li, Z. Gong, X. Huang // *Anal. Chim. Acta.* – 2020. – V. 1118. – P. 9-17.

139. Liu X. An electrochemically enhanced solid-phase microextraction approach based on molecularly imprinted polypyrrole/multi-walled carbon nanotubes composite coating for selective extraction of fluoroquinolones in aqueous samples / X. Liu, X. Wang, F. Tan, H. Zhao, X. Quan, J. Chen, L. Li // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 727. – P. 26-33.

140. Ghani M. Nanocrystalline cellulose as a biotemplate for preparation of porous titania thin film as a sorbent for thin film microextraction of ketorolac, meloxicam, diclofenac and mefenamic acid / M. Ghani // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2020. – V. 1142. – 122039.

141. Alipour F. In-situ synthesis of flower like  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanorod arrays on anodized aluminum substrate templated from layered double hydroxide as a nanosorbent for thin film microextraction of acidic drugs followed by HPLC-UV quantitation / F. Alipour, J.B. Raouf, M. Ghani // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2020. – V. 1144. – 122090.

142. Ghani M. Electrochemically decorated network-like cobalt oxide nanosheets on nickel oxide nanoworms substrate as a sorbent for the thin film microextraction of diclofenac / M. Ghani, S.M. Ghoreishi, S. Salehinia, N. Mousavi, H. Ansarinejad //

Microchem. J. – 2019. – V. 146. – P. 149-156.

143. Guan X. Preparation of polysulfone materials on nickel foam for solid-phase microextraction of floxacin in water and biological samples / X. Guan, T. Cheng, S. Wang, X. Liu, H. Zhang // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2017. – V. 409. – I. 12. – P. 3127-3133.

144. Ghani M. Magnesium-aluminum-layered double hydroxide-graphene oxide composite mixed-matrix membrane for the thin-film microextraction of diclofenac in biological fluids / M. Ghani, S.M. Ghoreishi, M. Azamati // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1575. – P. 11-17.

145. Ghani M. 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 / M. Ghani, K. Haghdoostnejad // *Anal. Chim. Acta.* – 2020. – V. 1097. – P. 94-102.

146. Ríos-Gómez J. Polymeric ionic liquid immobilized onto paper as sorptive phase in microextraction / J. Ríos-Gómez, M.T. García-Valverde, Á.I. López-Lorente, C. Toledo-Neira, R. Lucena, S. Cárdenas // *Anal. Chim. Acta.* – 2020. – V. 1094. – P. 47-56.

147. Fan W. Graphene oxide/polyethyleneglycol composite coated stir bar for sorptive extraction of fluoroquinolones from chicken muscle and liver / W. Fan, M. He, X. Wu, B. Chen, B. Hu // *J. Chromatogr. A.* – 2015. – V. 1418. – P. 36-44.

148. Georgiadis D.E. Novel capsule phase microextraction in combination with high performance liquid chromatography with diode array detection for rapid monitoring of sulfonamide drugs in milk / D.E. Georgiadis, A. Tsalbouris, A. Kabir, K.G. Furton, V. Samanidou // *J. Sep. Sci.* – 2019. – V. 42. – I. 7. – P. 1440-1450.

149. Salami F.H. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection / F.H. Salami, M.E.C. Queiroz // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2011. – V. 22. – I. 9. – P. 1656-1661.

150. Ferrone V. Development and validation of a MEPS-UHPLC-PDA method for determination of ulifloxacin in human plasma and urine of patients with peripheral

arterial disease / V. Ferrone, M. Carlucci, P. Palumbo, G. Carlucci // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 128. – P. 313-321.

151. Magiera S. Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography / S. Magiera, Ş. Gülmez, A. Michalik, I. Baranowska // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1304. – P. 1-9.

152. Wen Y. Monitoring sulfadiazine and sulfamethazine residues in eggs using polymer monolith microextraction coupled with high performance liquid chromatography / Y. Wen, Y. Wang, Y. Feng // *Chin. J. Chromatogr.* – 2006. – V. 24. – I. 5. – P. 471-474.

153. Zheng M.M. Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry / M.M. Zheng, M.Y. Zhang, G.Y. Peng, Y.Q. Feng // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – V. 625. – I. 2. – P. 160-172.

154. Li T. Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking / T. Li, Z.G. Shi, M.M. Zheng, Y.Q. Feng // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1205. – I. 1–2. – P. 163-170.

155. Maciel E.V.S. Graphene particles supported on silica as sorbent for residue analysis of tetracyclines in milk employing microextraction by packed sorbent / E.V.S. Maciel, B.H. Fumes, A.L. de Toffoli, F.M. Lanças // *Electrophoresis.* – 2018. – V. 39. – I. 15. – P. 2047-2055.

156. Manouchehri M. Porphyrin-functionalized graphene oxide sheets: An efficient nanomaterial for micro solid phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from urine samples / M. Manouchehri, S. Seidi, A. Rouhollahi, M. Shanehsaz // *J. Chromatogr. A.* – 2019. – V. 1607. – P. 460387.

157. Seidi S. Nickel-iron layered double hydroxide nanostructures for micro solid phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, followed by quantitation by HPLC-UV / S. Seidi, S.E. Sanati // *Microchim. Acta.* – 2019. – V. 186. – I. 5. – P. 4-10.

158. Seidi S. Electrospun NiFe layered double hydroxide/Nylon 6 composite

nanofibers as a sorbent for micro solid phase extraction by packed sorbent of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human blood / S. Seidi, M. Doroudian // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – V. 1614. – 460718.

159. Mafra G. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples / G. Mafra, D. Spudeit, R. Brognoli, J. Merib, E. Carasek // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2018. – V. 1102–1103. – P. 159-166.

160. Tsai W.H. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection / W.H. Tsai, T.C. Huang, J.J. Huang, Y.H. Hsue, H.Y. Chuang // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – V. 1216. – I. 12. – P. 2263-2269.

161. Ma N. Determination of tetracyclines in chicken by dispersive solid phase microextraction based on metal-organic frameworks/molecularly imprinted nanopolymer and ultra performance liquid chromatography / N. Ma, C. Feng, P. Qu, G. Wang, J. Liu, J.X. Liu, J.P. Wang // *Food Anal. Methods.* – 2020. – V. 13. – I. 5. – P. 1211-1219.

162. Jia X. A novel metal-organic framework composite MIL-101(Cr)@GO as an efficient sorbent in dispersive micro-solid phase extraction coupling with UHPLC-MS/MS for the determination of sulfonamides in milk samples / X. Jia, P. Zhao, X. Ye, L. Zhang, T. Wang, Q. Chen, X. Hou // *Talanta.* – 2017. – V. 169. – P. 227-238.

163. Arghavani-Beydokhti S. Coupling of two centrifugeless ultrasound-assisted dispersive solid/liquid phase microextractions as a highly selective, clean, and efficient method for determination of ultra-trace amounts of non-steroidal anti-inflammatory drugs in complicated matrices / S. Arghavani-Beydokhti, M. Rajabi, A. Asghari // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 997. – P. 67-79.

164. Mirzajani R. Fabrication of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@nSiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> core-shell mesoporous nanocomposite and its application for highly efficient ultrasound assisted dispersive  $\mu$ SPE-spectrofluorimetric detection of ofloxacin in urine and plasma samples / R. Mirzajani, N. Pourreza, J. Burromandpiroze // *Ultrason. Sonochem.* –

2018. – V. 40. – P. 101-112.

165. He X. Magnetic graphene dispersive solid phase extraction combining high performance liquid chromatography for determination of fluoroquinolones in foods / X. He, G.N. Wang, K. Yang, H.Z. Liu, X.J. Wu, J.P. Wang // *Food Chem.* – 2017. – V. 221. – P. 1226-231.

166. Jin T. Extraction of quinolones from milk samples using bentonite/magnetite nanoparticles before determination by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection / T. Jin, H. Wu, N. Gao, X. Chen, H. Lai, J. Zheng, L. Du // *J. Sep. Sci.* – 2016. – V. 39. – I. 3. – P. 545-551.

167. Hu Y. A ratiometric electrochemiluminescent tetracycline assay based on the combined use of carbon nanodots,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , and magnetic solid phase microextraction / Y. Hu, L. Su, S. Wang, Z. Guo, Y. Hu, H. Xie // *Microchim. Acta.* – 2019. – V. 186. – I. 8. – P. 512.

168. Al-Afy N. Determination of three tetracyclines in bovine milk using magnetic solid phase extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC / N. Al-Afy, H. Sereshti, A. Hijazi, H. Rashidi Nodeh // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2018. – V. 1092. – P. 480-488.

169. Cherkashina K. Effect of surfactant coating of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles on magnetic dispersive micro-solid phase extraction of tetracyclines from human serum / K. Cherkashina, M. Voznesenskiy, O. Osmolovskaya, C. Vakh, A. Bulatov // *Talanta.* – 2020. – V. 214. – P. 120861.

170. Chen Z. Synthesis of MOF@COF hybrid magnetic adsorbent for microextraction of sulfonamides in food and environmental samples / Z. Chen, Z. He, X. Luo, F. Wu, S. Tang, J. Zhang // *Food Anal. Methods.* – 2020. – V. 13. – I. 6. – P. 1346-1356.

171. Nasir A.N.M. Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products / A.N.M. Nasir, N. Yahaya, N.N.M. Zain, V. Lim, S. Kamaruzaman, B. Saad, N. Nishiyama, N. Yoshida, Y. Hirota // *Food Chem.* – 2019. – V. 276. – P. 458-466.

172. Zhao Y.G. Fast determination of 22 sulfonamides from chicken breast muscle using core-shell nanoring amino-functionalized superparamagnetic molecularly imprinted polymer followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Y.G. Zhao, L.X. Zhou, S.D. Pan, P.P. Zhan, X.H. Chen, M.C. Jin // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1345. – P. 17-28.

173. Asgharinezhad A.A. Magnetic nanoparticles based dispersive micro-solid-phase extraction as a novel technique for coextraction of acidic and basic drugs from biological fluids and waste water / A.A. Asgharinezhad, N. Mollazadeh, H. Ebrahimzadeh, F. Mirbabaei, N. Shekari // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1338. – P. 1-8.

174. Huang J. Determination of sulfonamides in food samples by membrane-protected micro-solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography / J. Huang, J. Liu, C. Zhang, J. Wei, L. Mei, S. Yu, G. Li, L. Xu // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1219. – P. 66-74.

175. Pebdani A.A. Solid phase microextraction of diclofenac using molecularly imprinted polymer sorbent in hollow fiber combined with fiber optic-linear array spectrophotometry / A.A. Pebdani, A.M.H. Shabani, S. Dadfarnia, S. Khodadoust // *Spectrochim. Acta, Part A* – 2015. – V. 147. – P. 26-30.

176. Kumar A. A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications / A. Kumar, Gaurav, A.K. Malik, D.K. Tewary, B. Singh // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – V. 610. – I. 1. – P. 1-14.

177. Jalili V. A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews / V. Jalili, A. Barkhordari, A. Ghiasvand // *Microchem. J.* – 2020. – V. 152. – 104319.

178. Bruheim I. Thin-Film Microextraction / I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – I. 4. – P. 1002-1010.

179. Olcer Y.A. Thin film microextraction: Towards faster and more sensitive microextraction / Y.A. Olcer, M. Tascon, A.E. Eroglu, E. Boyacı // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2019. – V. 113. – P. 93-101.

180. Kermani F.R. Sorbent coated glass wool fabric as a thin film microextraction

device / F.R. Kermani, J. Pawliszyn // *Anal. Chem.* – 2012. – V. 84. – I. 21. – P. 8990-8995.

181. Ochiai N. Recent developments of stir bar sorptive extraction for food applications: extension to polar solutes / N. Ochiai, K. Sasamoto, F. David, P. Sandra // *J. Agric. Food Chem.* – 2018. – V. 66. – I. 28. – P. 7249-7255.

182. Lancas F.M. Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction / F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, P. Grossi, I.R.B. Olivares // *J. Sep. Sci.* – 2009. – V. 32. – I. 5–6. – P. 813-824.

183. Fernández-Amado M. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review / M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 906. – P. 41-57.

184. Moliner-Martinez Y. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction / Y. Moliner-Martinez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2015. – V. 71. – P. 205-213.

185. Yang L. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review / L. Yang, R. Said, M. Abdel-Rehim // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2017. – V. 1043. – P. 33-43.

186. Silva C. Microextraction by packed Sorbent (MEPS) and solid-phase microextraction (SPME) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine / C. Silva, C. Cavaco, R. Perestrelo, J. Pereira, J.S. Câmara // *Metabolites.* – 2014. – V. 4. – I. 1. – P. 71-97.

187. Chisvert A. Dispersive micro-solid phase extraction / A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2019. – V. 112. – P. 226-233.

188. Khezeli T. Development of dispersive micro-solid phase extraction based on micro and nano sorbents / T. Khezeli, A. Daneshfar // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2017. – V. 89. – P. 99-118.

189. Heidari N. A review on magnetic field-assisted solid-phase microextraction techniques / N. Heidari, A. Ghiasvand // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2020. – V. 43. – I. 3–4. – P. 75-82.

190. Manousi N. Magnetic solid-phase extraction of organic compounds based on graphene oxide nanocomposites / N. Manousi, E. Rosenberg, E. Deliyanni, G.A. Zachariadis, V. Samanidou // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – 1148.

191. Булатов А.В. Автоматизация и миниатюризация химического анализа на принципах проточных методов (обзор) / А.В. Булатов, А.Л. Москвин, Л.Н. Москвин, К.С. Вах, М.Т. Фалькова, А.Ю. Шишов // *Науч. приборостроение*. – 2015. – Т. 25. – № 2. – С. 3-26.

192. Alexovič M. Sabo Automation of dispersive liquid–liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes / M. Alexovič, B. Horstkotte, I. Šrámková, P. Solich, J. Sabo // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2017. – V. 86. – P. 39-55.

193. Liu X.Z. Automation of pharmaceutical analysis using sequential-injection techniques / X.Z. Liu, Z.L. Fang // *Lab. Robot. Autom.* – 2000. – V. 12. – I. 2. – P. 60-66.

194. Проточный химический анализ / Ю.А. Золотов. М.: Наука, 2014. – 428 с.

195. De Jong J. Membranes and microfluidics: A review / J. De Jong, R.G.H. Lammertink, M. Wessling // *Lab Chip*. – 2006. – V. 6. – I. 9. – P. 1125-1139.

196. Cabal L.F.R. Robotic-assisted dynamic large drop microextraction / L.F.R. Cabal, D.A.V. Medina, A.M. Lima, F.M. Lanças, Á.J. Santos-Neto // *J. Chromatogr. A*. – 2019. – V. 1608. – 460416.

197. Timofeeva I. A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat / I. Timofeeva, S. Timofeev, L. Moskvin, A. Bulatov // *Anal. Chim. Acta*. – 2017. – V. 949. – P. 35-42.

198. Santigosa E. Liquid phase microextraction integrated into a microchip device for the extraction of fluoroquinolones from urine samples / E. Santigosa, S. Maspoch, M. Ramos Payán // *Microchem. J.* – 2019. – V. 145. – P. 280-286.

199. Payán M.R. A comprehensive study of a new versatile microchip device based liquid phase microextraction for stopped-flow and double-flow conditions / M.R.

Payán, E.S. Murillo, J. Coello, M.Á.B. López // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1556. – P. 29-36.

200. Ramos-Payan M. An effective microfluidic based liquid-phase microextraction device ( $\mu$ LPME) for extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological and environmental samples / M. Ramos-Payan, S. Maspoch, A. Llobera // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 946. – P. 56-63.

201. Carrasco-Correa E.J. Fully automated electric-field-driven liquid phase microextraction system with renewable organic membrane as a front end to high performance liquid chromatography / E.J. Carrasco-Correa, P. Kubáň, D.J. Cocovi-Solberg, M. Miró // *Anal. Chem.* – 2019. – V. 91. – I. 16. – P. 10808-10815.

202. Wang R. Solid phase microextraction with poly(deep eutectic solvent) monolithic column online coupled to HPLC for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs / R. Wang, W. Li, Z. Chen // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 1018. – P. 111-118.

203. Manbohi A. In-tube magnetic solid phase microextraction of some fluoroquinolones based on the use of sodium dodecyl sulfate coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles packed tube / A. Manbohi, S.H. Ahmadi // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – V. 885. – P. 114-121.

204. Asiabi H. Development of electrochemically controlled packed-in-tube solid phase microextraction method for sensitive analysis of acidic drugs in biological samples / H. Asiabi, Y. Yamini, M. Shamsayei // *Talanta.* – 2018. – V. 185. – P. 80-88.

205. Ling X. Electrochemically modified carbon fiber bundles as selective sorbent for online solid-phase microextraction of sulfonamides / X. Ling, W. Zhang, Z. Chen // *Microchim. Acta.* – 2016. – V. 183. – I. 2. – P. 813-820.

206. Aqda T.G. Porous eco-friendly fibers for on-line micro solid-phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs from urine and plasma samples / T.G. Aqda, S. Behkami, H. Bagheri // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1574. – P. 18-26.

207. Hu Y. Fiber-in-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted coating for sensitive analysis of antibiotic drugs by high performance liquid chromatography / Y. Hu, C. Song, G. Li // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1263. – P.

21-27.

208. Huang J.F. Determination of fluoroquinolones in eggs using in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography / J.F. Huang, B. Lin, Q.W. Yu, Y.Q. Feng // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – V. 384. – I. 5. – P. 1228-1235.

209. Wen Y. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography / Y. Wen, Y. Wang, Y.Q. Feng // *Talanta.* – 2006. – V. 70. – P. 153-159.

210. Zheng M.M. Hybrid organic-inorganic silica monolith with hydrophobic/strong cation-exchange functional groups as a sorbent for micro-solid phase extraction / M.M. Zheng, G.D. Ruan, Y.Q. Feng // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – V. 1216. – I. 45. – P. 7739-7746.

211. Manzo V. Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine / V. Manzo, M. Miró, P. Richter // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1368. – P. 64-69.

212. Vakh C. An automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction in a fluidized reactor for the determination of fluoroquinolones in baby food samples / C. Vakh, M. Alaboud, S. Lebedinets, D. Korolev, V. Postnov, L. Moskvina, O. Osmolovskaya, A. Bulatov // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 1001. – P. 59-69.

213. North N. Robotics and laboratory automation in pharmaceuticals analysis In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* / R.A. Meyers, R.K. Gilpin – New York: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

214. Patel S.N. Automation by laboratory robotics in pharmaceutical research industry: a latest venture in innovative idea / S.N. Patel, K.R. Prajapati, D.J. Sen // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 3. – I. 2. – P. 2098-2105.

215. Teja L.T. Recent trends in the usage of robotics in pharmacy / L.T. Teja, P. Keerthi, D. Datta, N.M. Babu // *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.* – 2014. – V. 2. – I. 1. – P. 1038-1043.

216. Lo S. Automated drug dissolution monitor that uses a UV-visible diode array spectrophotometer / S. Lo, S.M. Donahue, C.W. Brown // *J. Pharm. Sci.* – 1993. – V. 82. – I. 4. – P. 350-354.

217. Aldridge P.K. A robotic dissolution system with on-line fiber-optic UV analysis / P.K. Aldridge, D.W. Melvin, B.A. Williams, K. Bratin, L.J. Kostek, S. Sonja Sekulic // *J. Pharm. Sci.* – 1995. – V. 84. – I. 8. – P. 909-914.

218. Rogers P. Comprehensive and flexible approach to the automated-dissolution testing of pharmaceutical drug products incorporating direct UV-Vis fiber-optic analysis, on-line fluorescence analysis, and off-line storage options / P. Rogers, P.A. Hailey, G.A. Johnson, V.A. Dight, C. Read, A. Shingler, P. Savage, T. Roche, J. Mondry // *Lab. Robot. Autom.* – 2000. – V. 12. – I. 1. – P. 12-22.

219. Han S.M. Transfer from manual to automated sample preparation: A case study / S.M. Han, A. Munro // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1999. – V. 20. – I. 5. – P. 785-790.

220. Lung K.R. Statistical method for the determination of equivalence of automated test procedures / K.R. Lung, M.A. Gorko, J. Llewelyn, N. Wiggins // *J. Autom. Methods Manag. Chem.* – 2003. – V. 25. – I. 6. – P. 123-127.

221. Peng S.X. A 96-well screen filter plate for high-throughput biological sample preparation and LC-MS/MS analysis / S.X. Peng, M. Cousineau, S.J. Juzwin, D.M. Ritchie // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78. – I. 1. – P. 343-348.

222. Nickerson B. Sample preparation of pharmaceutical dosage forms. Challenges and strategies for sample preparation and extraction. / B. Nickerson. – New York: Springer, 2011. – 412 p.

223. Мозжухин А.В. Циклический инъекционный анализ – новый метод проточного анализа / А.В. Мозжухин, А.Л. Москвин, Л.Н. Москвин // *ЖАХ.* – 2007. – Т. 62. – № 5. – С. 527-531.

224. Булатов А.В. Циклический инъекционный анализ – новые возможности проточных методов: дис. ...д-ра хим. наук: 02.00.02 / Булатов Андрей Васильевич. Спб., 2011. – 358 с.

225. Булатов А.В. Концепция равновесных проточных методов.

Циклический инжекционный анализ и его аналитические возможности / А.В. Булатов, А.Ю. Шишов, Л.Н. Москвин // ЖАХ. – 2019. – Т. 74. – № 10. – С. 774-783.

226. Вах К.С. Автоматизация микроэкстракционного концентрирования на принципах циклического инжекционного анализа / К.С. Вах, И.И. Тимофеева, А.В. Булатов // ЖАХ. – 2019. – Т. 74. – № 11. – С. 846-855.

227. Medinskaia K. A fully automated effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a stepwise injection system. Determination of antipyrine in saliva samples / K. Medinskaia, C. Vakh, D. Aseeva, V. Andruch, L. Moskvin, A. Bulatov // Anal. Chim. Acta. – 2016. – V. 902. – P. 129-134.

228. ФС.2.1.0100.18. Ибупрофен. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

229. ФС.2.1.0138.18. Напроксен. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

230. ФС.2.1.0179.18. Сульфагуанидин. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

231. ФС.2.1.0180.18. Сульфадиметоксин. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

232. ФС.2.1.0038.15. Сульфаниламид. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

233. ФС.2.1.0182.18. Сульфацетамид натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

234. ФС.2.1.0022.15. Кеторолака трометамол. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.3. – Москва, 2018.

235. Mannemala S.S. Multiple response optimization of a liquid chromatographic method for determination of fluoroquinolone and nitroimidazole antimicrobials in serum and urine / S.S. Mannemala, V. Kannappan // Clin. Biochem. – 2016. – V. 49. – I. 7–8. – P. 587-595.

236. Stoev G. Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection /

G. Stoev, A. Michailova // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 871. – I. 1–2. – P. 37-42.

237. Wu X. Large volume sample stacking of cationic tetracycline antibiotics toward 10 ppb level analysis by capillary electrophoresis with UV detection / X. Wu, Z. Xu, Z. Huang, C. Shao // *Electrophoresis.* – 2016. – V. 37. – I. 22. – P. 2963-2969.

238. Lachmann B. Rapid determination of diclofenac in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis / B. Lachmann, M. Kratzel, C.R. Noe // *Sci. Pharm.* – 2012. – V. 80. – I. 2. – P. 312-316.

239. De Oliveira H.L. Molecularly imprinted pipette-tip solid phase extraction for selective determination of fluoroquinolones in human urine using HPLC-DAD / H.L. de Oliveira, S. da Silva Anacleto, A.T.M. da Silva, A.C. Pereira, W. de Souza Borges, E.C. Figueiredo, K.B. Borges // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2016. – V. 1033–1034. – P. 27-39.

240. Santos L. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review / L. Santos, F. Ramos // *Trends Food Sci. Technol.* – 2016. – V. 52. – P. 16-30.

241. Zhang H. Simultaneous determination of quinolones in fish by liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Comparison of sub-2  $\mu\text{m}$  particles and conventional C18 columns / H. Zhang, S. Chen, Y. Lu, Z. Dai // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – I. 13. – P. 1959-1967.

242. Yang L. In situ derivatization and hollow-fiber liquid-phase microextraction to determine sulfonamides in water using UHPLC with fluorescence detection / L. Yang, Y. Shi, J. Li, T. Luan // *J. Sep. Sci.* – 2018. – V. 41. – I. 7. – P. 1651-1662.

243. Zou Q.H. Determination of sulphonamides in animal tissues by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate / Q.H. Zou, M.X. Xie, X.F. Wang, Y. Liu, J. Wang, J. Song, H. Gao, J. Han // *J. Sep. Sci.* – 2007. – V. 30. – I. 16. – P. 2647-2655.

244. Viñas P. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization / P. Viñas, C. López Erroz, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba // *J. Chromatogr. A.* – 1996. – V. 726. – I. 1–2. – P. 125-131.

245. Arroyo-Manzanares N. Determination of sulfonamides in serum by on-line

solid-phase extraction coupled to liquid chromatography with photoinduced fluorescence detection / N. Arroyo-Manzanares, F.J. Lara, D. Airado-Rodríguez, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña // *Talanta*. – 2015. – V. 138. – P. 258-262.

246. Schneider M.J. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection / M.J. Schneider, A.M. Darwish, D.W. Freeman // *Anal. Chim. Acta*. – 2007. – V. 586. – P. 269-274.

247. Škrášková K. Fast and sensitive UHPLC methods with fluorescence and tandem mass spectrometry detection for the determination of tetracycline antibiotics in surface waters / K. Škrášková, L.H.M.L.M. Santos, D. Šatínský, A. Pena, M.C.B.S.M. Montenegro, P. Solich, L. Nováková // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2013. – V. 927. – P. 201-208.

248. Chen Y. Planar chromatography mediated screening of tetracycline and fluoroquinolone antibiotics in milk by fluorescence and mass selective detection / Y. Chen, W. Schwack // *J. Chromatogr. A*. – 2013. – V. 1312. – P. 143-151.

249. Gaber M. Spectrophotometric determination of norfloxacin in pure and dosage forms by complexation with Fe(III) and Cu(II) ions / M. Gaber, A.M. Khedr, A.S. El-kady // *Int. Res. J. Pharm.* – 2012. – V. 2. – I. 5. – P. 97-102.

250. Rizk M. Derivative spectrophotometric analysis of 4-quinolone antibacterials in formulations and spiked biological fluids by their Cu(II) complexes / M. Rizk, F. Belal, F. Ibrahim, S. Ahmed, Z.A. Sheribah // *J. AOAC Int.* – 2001. – V. 84. – I. 2. – P. 368-375.

251. Prasad A.R. Spectrophotometric methods for the microdetermination of oxytetracycline and hostacycline / A.R. Prasad, V. Rao // *Sci. World J.* – 2010. – V. 5. – I. 1. – P. 1-4.

252. Fafelelbom K.M.S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation / K.M.S. Fafelelbom // *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* – 2008. – V. 3. – I. 3. – P. 212-218.

253. Amin A.S. Utility of certain  $\pi$ -acceptors for the spectrophotometric determination of norfloxacin / A.S. Amin, G.O. El-Sayed, Y.M. Issa // *Analyst*. – 1995.

– V. 120. – I. 4. – P. 1189-1193.

254. El-brashy A.M. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by binary complex formation with xanthene dyes / A.M. El-brashy, M.E. Metwally, F.A. El-sepai // *Farm.* – 2004. – V. 59. – P. 809-817.

255. Amin A.S. Spectrophotometric determination of gatifloxacin in pure form and in pharmaceutical formulation / A.S. Amin, A.A. El-Fetouh Gouda, R. El-Sheikh, F. Zahran // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2007. – V. 67. – I. 5. – P. 1306-1312.

256. Nagaraja P. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations / P. Nagaraja, S.D. Naik, A.K. Shrestha, A. Shivakumar // *Acta Pharm.* – 2007. – V. 57. – I. 3. – P. 333-342.

257. Mhemeed A.H. Spectrophotometric determination of sulphameter with N-1-(naphthyl)ethylenediamine reagent by using diazotization coupling reaction / A.H. Mhemeed // *J. Glob. Pharma Technol.* – 2019. – V. 11. – I. 3. – P. 309-315.

258. Matin A.A. A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations / A.A. Matin, M.A. Farajzadeh, A. Jouyban // *Farmacol.* – 2005. – V. 60. – I. 10. – P. 855-858.

259. García S. Flow-injection spectrophotometric determination of diclofenac or mefenamic acid in pharmaceuticals / S. García, C. Sánchez-Pedreño, I. Albero, C. García // *Mikrochim. Acta.* – 2001. – V. 136. – I. 1-2. – P. 67-71.

260. Ciapina E.G. Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations assisted by microwave oven / E.G. Ciapina, A.O. Santini, P.L. Weinert, M.A. Gotardo, H.R. Pezza, L. Pezza // *Eclet. Quim.* – 2005. – V. 30. – I. 1. – P. 29-36.

261. Uzochukwu I.C. Visible spectrophotometric and thermodynamic studies of diclofenac: Charge-transfer complexation with 2,3-dichloro-5, 6-dicyano, 1,4-benzoquinone / I.C. Uzochukwu, S.O. Nzegbunam // *Trop. J. Pharm. Res.* – 2015. – V. 14. – I. 3. – P. 519-525.

262. Sastry C.S.P. Extractive spectrophotometric determination of some antihypertensive agents with supracen violet 3B / C.S.P. Sastry, A. Sailaja, R. Thirupathi, D. Murali Krishna // *Indian Drugs.* – 1992. – V. 29. – I. 11. – P. 473-477.

263. Veiopoulou C.J. Application of terbium sensitized fluorescence for the determination of fluoroquinolone antibiotics pefloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in serum / C.J. Veiopoulou, P.C. Ioannou, E.S. Lianidou // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1997. – V. 15. – I. 12. – P. 1839-1844.

264. Ulu S.T. Rapid and sensitive spectrofluorimetric determination of enrofloxacin, levofloxacin and ofloxacin with 2,3,5,6-tetrachloro-p-benzoquinone / S.T. Ulu // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2009. – V. 72. – I. 5. – P. 1038-1042.

265. Штыков С.Н. Флуориметрическое определение тетрациклинов с помощью хелата европия с 1,10-фенантролином в мицеллярных растворах анионных ПАВ / С.Н. Штыков, Т.Д. Смирнова, Ю.Г. Былинкин, Д.А. Жемеричкин // *ЖАХ.* – 2005. – Т. 60. – № 1. – С. 30-34.

266. Castillo M.A. Indirect fluorometric determination of diclofenac sodium / M.A. Castillo, L. Bruzzone // *Anal. Sci.* – 2006. – V. 22. – I. 3. – P. 431-433.

267. Szultka M. Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis / M. Szultka, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski // *J. Sep. Sci.* – 2014. – V. 37. – I. 21. – P. 3094-3105.

268. Jessop P.G. A solvent having switchable hydrophilicity / P.G. Jessop, L. Phan, A. Carrier, S. Robinson, C.J. Dürr, J.R. Harjani // *Green Chem.* – 2010. – V. 12. – I. 5. – P. 809-881.

269. Vanderveen J.R. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents / J.R. Vanderveen, J. Durelle, P.G. Jessop // *Green Chem.* – 2014. – V. 16. – P. 1187-1197.

270. Lasarte-aragonés G. Use of switchable solvents in the microextraction context / G. Lasarte-aragonés, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel // *Talanta.* – 2015. – V. 131. – P. 645-649.

271. Lasarte-aragonés G. Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid–liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples / G. Lasarte-aragonés, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel // *J. Sep. Sci.* – 2015. – V. 00. – P. 1-6.

272. Khan M. Switchable solvent based liquid phase microextraction of mercury

from environmental samples: A green aspect / M. Khan, M. Soylak // RSC Adv. – 2016. – V. 6. – I. 30. – P. 24968-24975.

273. Reçlo M. Switchable solvent based liquid phase microextraction of palladium coupled with determination by flame atomic absorption spectrometry / M. Reçlo, E. Yilmaz, Y. Bazel, M. Soylak // Int. J. Environ. Anal. Chem. – 2017. – V. 97. – I. 14–15. – P. 1315-1327.

274. Di X. Solid-phase extraction coupled with switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid–liquid microextraction for chloramphenicol enrichment in environmental water samples: a novel alternative to classical extraction techniques / X. Di, X. Wang, Y. Liu, X. Guo, X. Di // Anal. Bioanal. Chem. – 2019. – V. 411. – I. 4. – P. 803-812.

275. Oenning A.L. A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography-mass spectrometry detection / A.L. Oenning, L. Birk, S. Eller, T. Franco de Oliveira, J. Merib, E. Carasek // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2020. – V. 1143. – P. 122069.

276. Yilmaz E. Switchable polarity solvent for liquid phase microextraction of Cd(II) as pyrrolidinedithiocarbamate chelates from environmental samples / E. Yilmaz, M. Soylak // Anal. Chim. Acta. – 2015. – V. 886. – P. 75-82.

277. Ezoddin M. Development of air assisted liquid phase microextraction based on switchable-hydrophilicity solvent for the determination of palladium in environmental samples / M. Ezoddin, K. Abdi, N. Lamei // Talanta. – 2016. – V. 153. – P. 247-252.

278. Habibiyani A. Ultrasonic assisted switchable solvent based on liquid phase microextraction combined with micro sample injection flame atomic absorption spectrometry for determination of some heavy metals in water, urine and tea infusion samples / A. Habibiyani, M. Ezoddin, N. Lamei, K. Abdi, M. Amini, M. Ghazi-khansari // J. Mol. Liq. – 2017. – V. 242. – P. 492-496.

279. Kakavandi N.R. Ion-pair switchable-hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid–liquid microextraction for the determination of paraquat in

environmental and biological samples before high-performance liquid chromatography / N. Rahimi Kakavandi, M. Ezoddin, K. Abdi, M. Ghazi-Khansari, M. Amini, S.J. Shahtaheri // *J. Sep. Sci.* – 2017. – V. 40. – I. 18. – P. 3703-3709.

280. Bazel' Y. Using a switchable-hydrophilicity solvent for the extraction–spectrophotometric determination of nickel / Y. Bazel', M. Recló, J. Šandrejová // *J. Anal. Chem.* – 2017. – V. 72. – I. 10. – P. 1018-1023.

281. Hamid Y. A novel cationic surfactant-assisted switchable solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction for determination for Orange II in food samples / Y. Hamid, M.R. Fat'hi // *Food Anal. Methods.* – 2018. – V. 11. – I. 8. – P. 2131-2140.

282. Zhang S. Switchable solvent based liquid phase microextraction of trace lead and cadmium from environmental and biological samples prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry detection / S. Zhang, B. Chen, M. He, B. Hu // *Microchem. J.* – 2018. – V. 139. – P. 380-385.

283. Hu S. Sodium dodecyl sulfate sensitized switchable solvent liquid-phase microextraction for the preconcentration of protoberberine alkaloids in *Rhizoma coptidis* / S. Hu, J. Xue, X. Yang, X. Chen, R.Q. Wang, X.H. Bai // *J. Sep. Sci.* – 2018. – V. 41. – I. 18. – P. 3614-3621.

284. Heydari F. Application of response surface methodology for optimization of conditions for nickel determination in water and vegetables by switchable solvent based liquid phase microextraction / F. Heydari, M. Ramezani // *J. Anal. Chem.* – 2019. – V. 74. – I. 11. – P. 1081-1088.

285. Recló M. Ligandless switchable solvent based liquid phase microextraction of nickel from food and cigarette samples prior to its micro-sampling flame atomic absorption spectrometric determination / M. Recló, E. Yilmaz, M. Soylak, V. Andruch, Y. Bazel // *J. Mol. Liq.* – 2017. – V. 237. – P. 236-241.

286. Memon Z.M. Switchable solvent based green liquid phase microextraction method for cobalt in tobacco and food samples prior to flame atomic absorption spectrometric determination / Z.M. Memon, E. Yilmaz, M. Soylak // *J. Mol. Liq.* – 2017. – V. 229. – P. 459-464.

287. Firat M. Vortex-assisted switchable liquid-liquid microextraction for the

preconcentration of cadmium in environmental samples prior to its determination with flame atomic absorption spectrometry / M. Fırat, S. Bodur, B. Tıışlı, C. Özlü, D.S. Chormey, F. Turak, S. Bakırdere // *Environ. Monit. Assess.* – 2018. – V. 190. – 393.

288. Wang H. Switchable hydrophilicity solvent based and solidification-assisted liquid-phase microextraction combined with GFAAS for quantification of trace soluble lead in raw bovine and derivative milk products / H. Wang, M. Xia, Y. Ling, F. Qian, J. Xu, Z. Wang, J. Li, X. Wang // *Food Addit. Contam., Part A.* – 2019. – V. 36. – I. 11. – P. 1654-1666.

289. Shahvandi S.K. Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine / S.K. Shahvandi, M.H. Banitaba, H. Ahmar // *Talanta.* – 2018. – V. 184. – P. 103-108.

290. Behpour M. Combination of gel-electromembrane extraction with switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography for the extraction and determination of antidepressants in human serum, breast milk and wastewater / M. Behpour, S. Nojavan, S. Asadi, A. Shokri // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – V. 1621. – 461041.

291. Shih H. A novel fatty-acid-based in-tube dispersive liquid – liquid microextraction technique for the rapid determination of nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous samples using high-performance liquid chromatography – ultraviolet detection / H. Shih, T. Shu, V. Kumar, J. Jen // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – V. 854. – P. 70-77.

292. Gao M. An effervescence-assisted switchable fatty acid-based microextraction with solidification of floating organic droplet for determination of fluoroquinolones and tetracyclines in seawater, sediment, and seafood / M. Gao, J. Wang, X. Song, X. He, R.A. Dahlgren, Z. Zhang, S. Ru, X. Wang // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – V. 410. – P. 2671-2687.

293. Di X. Microwave assisted extraction in combination with solid phase purification and switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in chicken meat / X. Di, X.

Wang, Y. Liu, X. Guo // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2019. – V. 1118-1119. – P. 109-115.

294. Naemullah A new portable switchable hydrophilicity microextraction method for determination of vanadium in microsampling micropipette tip syringe system couple with ETAAS / Naemullah, M. Tuzen // *Talanta.* – 2019. – V. 194. – P. 991-996.

295. Wang X. A novel switchable solvent liquid-phase microextraction technique based on the solidification of floating organic droplets: HPLC-FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon monohydroxy metabolites in urine samples / X. Wang, Z. Sun, X. Luo, K. Wang, S. Zhang, Z. Ji, Y. Gao, J. You // *New J. Chem.* – 2020. – V. 44. – I. 7. – P. 3038-3044.

296. Hu L. Centrifuge-less dispersive liquid-liquid microextraction base on the solidification of switchable solvent for rapid on-site extraction of four pyrethroid insecticides in water samples / L. Hu, H. Wang, H. Qian, C. Liu, R. Lu, S. Zhang, W. Zhou, H. Gao, D. Xu // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1472. – P. 1-9.

297. Shishov A. An effervescence tablet-assisted switchable solvent-based microextraction: On-site preconcentration of steroid hormones in water samples followed by HPLC-UV determination / A. Shishov, I. Sviridov, I. Timofeeva, N. Chibisova, L. Moskvina, A. Bulatov // *J. Mol. Liq.* – 2017. – V. 247. – P. 246-253.

298. Jing X. Magnetic effervescence tablet-assisted switchable hydrophilicity solvent-based liquid phase microextraction of triazine herbicides in water samples / X. Jing, X. Cheng, W. Zhao, H. Wang, X. Wang // *J. Mol. Liq.* – 2020. – V. 306. – P. 112934.

299. Jing X. Effervescent tablet-assisted switchable hydrophilicity solvent-based microextraction with solidification of floating organic droplets for HPLC determination of phenolic endocrine disrupting chemicals in bottled beverages / X. Jing, J. He, W. Zhao, X. Huang, X. Wang // *Microchem. J.* – 2020. – V. 155. – P. 104680.

300. Shishov A. An automated continuous homogeneous microextraction for the determination of selenium and arsenic by hydride generation atomic fluorescence spectrometry / A. Shishov, M. Wiczorek, P. Kościelniak, D. Dudek-Adamska, A. Telk,

L. Moskvina, A. Bulatov // *Talanta*. – 2018. – V. 181. – P. 359-365.

301. Haynes W.M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 97-th ed. / Haynes W.M., R.L. David, T.J. Bruno. – Boca Raton: CRC Press, 2017. – 2643 p.

302. Un H.S. Flow-injection chemiluminescence determination of ofloxacin and levofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids / H.S. Un, L.I. Liqing, X.C. Hen // *Anal. Sci.* – 2006. – V. 22. – P. 1145-1149.

303. Yi L. Flow-injection analysis of two fluoroquinolones by the sensitizing effect of terbium (III) on chemiluminescence of the potassium permanganate-sodium sulfite system / L. Yi, H. Zhao, L. Jin, D. Zheng, Z. Wu // *Talanta*. – 2003. – V. 61. – P. 403-409.

304. Sun H. Determination of ofloxacin and levofloxacin in pharmaceutical preparation and human urine using a new flow-injection chemiluminescence system with Cu(III) complex / H. Sun, J. Wang, P. Chen, T. Wang // *Asian J. Pharm. Sci. Res.* – 2011. – I. 5. – P. 21-32.

305. Aly F.A. Chemiluminescence determination of some fluoroquinolone derivatives in pharmaceutical formulations and biological fluids using  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$ –Ce(IV) system / F.A. Aly, S.A. Al-tamimi, A.A. Alwarthan // *Talanta*. – 2001. – V. 53. – P. 885-893.

306. Wang L. A flow injection chemiluminescence method for the determination of fluoroquinolone derivative using the reaction of luminol and hydrogen peroxide catalyzed by gold nanoparticles / L. Wang, P. Yang, Y. Li, H. Chen, M. Li, F. Luo // *Talanta*. – 2007. – V. 72. – P. 1066-1072.

307. Albero M.I. Flow injection spectrophotometric determination of ofloxacin in pharmaceuticals and urine / M.I. Albero, M.S. Abuherba, M.S. Garci // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2005. – V. 61. – P. 87-93.

308. Imenta A.M.P. Ofloxacin determination in urine, serum and pharmaceuticals using an automatic flow potentiometric system / A.M.P. Imenta, M.R.S.S. Outo, R.I.L.C. Atarino, M.F.C.L. Eal, J.L.F.C.L. Ima // *Anal. Sci.* – 2013. – V. 29. – P. 5-8.

309. Vakh C. A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: Liquid chromatographic determination of

ofloxacin in human urine samples / C. Vakh, A. Pochivalov, V. Andruch, L. Moskvina, A. Bulatov // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 907. – P. 54-59.

310. Bahar S. An innovative method for analysis of Pb (II) in rice, milk and water samples based on TiO<sub>2</sub> reinforced caprylic acid hollow fiber solid/liquid phase microextraction / S. Bahar, Z. Es'haghi, A. Nezhadali, A. Banaei, S. Bohlooli // *Food Chem.* – 2017. – V. 221. – P. 1904-1910.

311. Wang P. Vortex-assisted hollow fibre liquid-phase microextraction technique combined with high performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of oestrogens in milk samples / P. Wang, Y. Xiao, W. Liu, J. Wang, Y. Yang // *Food Chem.* – 2015. – V. 172. – P. 385-390.

312. Li Y.L. Rapid determination of 19 quinolone residues in spiked fish and pig muscle by high-performance liquid chromatography (HPLC) tandem mass spectrometry / Y.L. Li, X.L. Hao, B.Q. Ji, C.L. Xu, W. Chen, C.Y. Shen, T. Ding // *Food Addit. Contam., Part A.* – 2009. – V. 26. – I. 3. – P. 306-313.

313. Tao X. Chemiluminescence competitive indirect enzyme immunoassay for 20 fluoroquinolone residues in fish and shrimp based on a single-chain variable fragment / X. Tao, M. Chen, H. Jiang, J. Shen, Z. Wang, X. Wang, X. Wu, K. Wen // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – V. 405. – I. 23. – P. 7477-7484.

314. Pochivalov A. Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in shrimps / A. Pochivalov, I. Timofeeva, C. Vakh, A. Bulatov // *Anal. Chim. Acta.* – 2017. – V. 976. – P. 35-44.

315. Wu S.S. Analysis of ciprofloxacin by a simple high-performance liquid chromatography method / S.S. Wu, C.Y. Chein, Y.H. Wen // *J. Chromatogr. Sci.* – 2008. – V. 46. – I. 6. – P. 490-495.

316. Kassab N.M. Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography / N.M. Kassab, A.K. Singh, E.R.M. Kedor-Hackmam, M.I.R.M. Santoro // *Braz. J. Pharm. Sci.* – 2005. – V. 41. – I. 4. – P. 507-513.

317. Shervington L.A. The simultaneous separation and determination of five

quinolone antibiotics using isocratic reversed-phase HPLC: Application to stability studies on an ofloxacin tablet formulation / L.A. Shervington, M. Abba, B. Hussain, J. Donnelly // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – V. 39. – I. 3–4. – P. 769-775.

318. Chen B. Separation, enrichment and determination of ciprofloxacin using thermoseparating polymer aqueous two-phase system combined with high performance liquid chromatography in milk, egg, and shrimp samples / B. Chen, J. Han, Y. Wang, C. Sheng, Y. Liu, G. Zhang, Y. Yan // *Food Chem.* – 2014. – V. 148. – P. 105-111.

319. Chang C.S. Simultaneous determination of eleven quinolones antibacterial residues in marine products and animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection / C.S. Chang, W.H. Wang, C.E. Tsai // *J. Food Drug Anal.* – 2008. – V. 16. – I. 6. – P. 87-96.

320. Poapolathep A. Dispositions and residue depletion of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in muscle tissue of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) / A. Poapolathep, U. Jermnak, A. Chareonsan, C. Sakulthaew, N. Klangkaew, T. Sukasem, S. Kumagai // *J. Vet. Pharmacol. Ther.* – 2009. – V. 32. – I. 3. – P. 229-234.

321. Takeda N. Rapid screening method for quinolone residues in livestock and fishery products using immobilised metal chelate affinity chromatographic clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. / N. Takeda, M. Gotoh, T. Matsuoka // *Food Addit. Contam., Part A.* – 2011. – V. 28. – I. 9. – P. 1168-1174.

322. Hadjmohammadi M.R. Use of hollow fiber liquid phase microextraction and HPLC for extraction and determination of apigenin in human urine after consumption of *Satureja sahendica Bornm* / M.R. Hadjmohammadi, M. Soltani, V. Sharifi // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – V. 900. – P. 85-88.

323. Alcudia-León M.C. Stir membrane liquid-liquid microextraction / M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – I. 7. – P. 869-874.

324. Schneider M.J. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection / M.J. Schneider, A.M. Darwish, D.W. Freeman // *Anal. Chim.*

Acta. – 2007. – V. 586. – P. 269-274.

325. Fernandez-Torres R. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples / R. Fernandez-Torres, M.O. Consentino, M.A.B. Lopez, M.C. Mochon // *Talanta*. – 2010. – V. 81. – I. 3. – P. 871-880.

326. Morelli B. Spectrophotometric determination of tetracyclines in pure form and in pharmaceutical preparations, by a molybdenum blue method / B. Morelli, P. Peluso // *Anal. Lett.* – 1985. – V. 18. – I. 15. – P. 1865-1886.

327. Riaño S. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by the combination of stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction and liquid chromatography / S. Riaño, M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 403. – I. 9. – P. 2583-2589.

328. Ara K.M. Low-voltage electrochemically stimulated stir membrane liquid-liquid microextraction as a novel technique for the determination of methadone / K.M. Ara, F. Raofie // *Talanta*. – 2017. – V. 168. – P. 105-112.

329. Abdulghani A.J. Determination of tetracycline in pharmaceutical preparation by molecular and atomic absorption spectrophotometry and high performance liquid chromatography via complex formation with Au(III) and Hg(II) ions in solutions / A.J. Abdulghani, H.H. Jasim, A.S. Hassan // *Int. J. Anal. Chem.* – 2013. – V. 2013. – P. 305124.

330. Hussien E.M. HPLC method validation for modernization of the tetracycline hydrochloride capsule USP monograph / E.M. Hussien // *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* – 2014. – V. 52. – I. 2. – P. 239-244.

331. Oh W.K. Simultaneous determination of tetracycline antibiotics by 3-phase hollow fiber-liquid phase microextraction (HF-LPME) and HPLC-UV/Vis / W.K. Oh, S. Myung // *J. Korean Chem. Soc.* – 2014. – V. 58. – I. 6. – P. 535-542.

332. Lebedinets S. Stir membrane liquid phase microextraction of tetracyclines using switchable hydrophilicity solvents followed by high-performance liquid chromatography / S. Lebedinets, C. Vakh, K. Cherkashina, A. Pochivalov, L. Moskvina,

A. Bulatov // *J. Chromatogr. A.* – 2019. – V. 1615. – 460743.

333. Sihem D. Extraction of copper(II) with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid from perchlorate medium / D. Sihem, B. Djamel // *Anal. Chem. Lett.* – 2015. – V. 5. – I. 4. – P. 198-205.

334. Ncube S. Multivariate optimization of the hollow fibre liquid phase microextraction of muscimol in human urine samples / S. Ncube, A. Poliwoda, H. Tutu, P. Wieczorek, L. Chimuka // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2016. – V. 1033–1034. – P. 372-381.

335. Takeda N. Pre-column derivatization of sulfa drugs with fluorescamine and high-performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products / N. Takeda, Y. Akiyama // *J. Chromatogr. A.* – 1991. – V. 558. – I. 1. – P. 175-180.

336. Taja-Chayeb L. Acetylator status and N-acetyltransferase 2 gene polymorphisms; Phenotype-genotype correlation with the sulfamethazine test / L. Taja-Chayeb, A. González-Fierro, C. Miguez-Muñoz, C. Trejo-Becerril, E.D. La Cruz-Hernandez, D. Cantu, J.A. Agundez, S. Vidal-Millan, O. Gutierrez, A. Dueñas-González // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2011. – V. 21. – I. 12. – P. 894-901.

337. Гармонов С.Ю. Метод косвенного определения активности N-ацетилтрансферазы при использовании в качестве реагента метаванадата аммония для оценки экскреции изониазида с мочой человека / С.Ю. Гармонов, Н.С. Шитова, А.В. Яковлева, Р.А. Юсупов // *Хим.-Фарм. Журн.* – 2008. – Т. 42. – № 8. – С. 49-53.

338. Сатырова Т.В. Ацетиляторный статус: современный взгляд на проблему (обзор литературы) / Т.В. Сатырова // *Проблемы здоровья и экологии.* – 2009. – Т. 22. – № 4. – С. 31-36.

339. Nevado J.J.B. Simultaneous determination of sulfamethoxypyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and their associated compounds by liquid chromatography / J.J.B. Nevado, G.C. Peñalvo, F.J.G. Bernardo // *Anal. Chim. Acta.* – 2001. – V. 442. – I. 2. – P. 241-248.

340. Khalaf H.S. Spectrophotometric determination of sulfamethoxazole in pure

and pharmaceutical preparations based on condensation reaction method / H.S. Khalaf, A.M.A. Al-Haidari, S.B. Dikran, A.K. Mohammed // *J. Babylon Univ. Appl. Sci.* – 2017. – V. 25. – I. 2. – P. 515-524.

341. Simó-Alfonso E.F. Determination of sulphonamides in human urine by azo dye precolumn derivatization and micellar liquid chromatography / E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, M.C. García-Alvarez-Coque, J.S. Esteve-Romero // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1995. – V. 670. – I. 1. – P. 183-187.

342. Pochivalov A. An automated in-syringe switchable hydrophilicity solvent-based microextraction / A. Pochivalov, C. Vakh, S. Garmonov, L. Moskvina, A. Bulatov // *Talanta*. – 2020. – V. 209. – 120587.

343. Balyejjusa S. Spectrophotometric determination of sulphamethoxazole and trimethoprim (co-trimoxazole) in binary mixtures and in tablets. / S. Balyejjusa, R.O. Adome, D. Musoke // *Afr. Health Sci.* – 2002. – V. 2. – I. 2. – P. 56-62.

344. Avgerinos A. Rapid simultaneous determination of trimetoprim, sulphamethoxazole and acetylsulphamethoxazole in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography / A. Avgerinos, G. Athanasiou, S. Malamataris // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1991. – V. 9. – I. 6. – P. 507-510.

345. Vree T.B. Isolation, identification and determination of sulfamethoxazole and its known metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography / T.B. Vree, A.J.A.M. van der Ven, C.P.W.G.M. Verwey-van Wissen, E.W.J. van Ewijk-Beneken Kolmer, A.E.M. Swolfs, P.M. van Galen, H. Amadajais-Groenen // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1994. – V. 658. – I. 2. – P. 327-340.

346. Schaeffer N. Sustainable hydrophobic terpene-based eutectic solvents for the extraction and separation of metals / N. Schaeffer, M.A.R. Martins, C.M.S.S. Neves, S.P. Pinho, J.A.P. Coutinho // *Chem. Commun.* – 2018. – V. 54. – I. 58. – P. 8104-8107.

347. Li K. In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography / K. Li, Y. Jin, D. Jung, K. Park, H. Kim, J. Lee // *J. Chromatogr. A*. – 2020. – V. 1614. – 460730.

348. Abd-alrassol K.S. Spectrophotometric method for the determination of sulfa drug in pharmaceuticals based on charge transfer reaction / K.S. Abd-alrassol // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2017. – V. 9. – I. 2. – P. 244-251.

349. Muñoz-Olivas R. Screening analysis: An overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses / R. Muñoz-Olivas // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2004. – V. 23. – I. 3. – P. 203-216.

350. Forcato D.O. Milk fat content measurement by a simple UV spectrophotometric method: An alternative screening method / D.O. Forcato, M.P. Carmine, G.E. Echeverría, R.P. Pécora, S.C. Kivatinitz // *J. Dairy Sci.* – 2005. – V. 88. – I. 2. – P. 478-481.

351. Gertz C. FT-near infrared (NIR) spectroscopy - Screening analysis of used frying fats and oils for rapid determination of polar compounds, polymerized triacylglycerols, acid value and anisidine value [DGF C-VI 21a (13)] / C. Gertz, H.J. Fiebig, J.N.S. Hancock // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2013. – V. 115. – I. 10. – P. 1193-1197.

352. Nieuwoudt M.K. Raman spectroscopy as an effective screening method for detecting adulteration of milk with small nitrogen-rich molecules and sucrose / M.K. Nieuwoudt, S.E. Holroyd, C.M. McGoverin, M.C. Simpson, D.E. Williams // *J. Dairy Sci.* – 2016. – V. 99. – I. 4. – P. 2520-2536.

353. Andrés F.D. Screening of non-polar heterocyclic amines in urine by microextraction in packed sorbent-fluorimetric detection and confirmation by capillary liquid chromatography / F.D. Andrés, M. Zougagh, G. Castañeda, J.L. Sánchez-Rojas, A. Ríos // *Talanta.* – 2011. – V. 83. – I. 5. – P. 1562-1567.

354. Moscone D. Rapid electrochemical screening methods for food safety and quality / D. Moscone, G. Volpe, F. Arduini, L. Micheli // *Acta IMEKO.* – 2016. – V. 5. – I. 1. – P. 45-50.

355. Franek M. Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: Immunochemical strategy for generic antibodies and competitors / M. Franek, I. Diblikova, I. Cernoch, M. Vass, K. Hruska // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78. – I. 5. – P. 1559-1567.

356. Pikkemaat M.G. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples / M.G. Pikkemaat, M.L.B.A. Rapallini, S.O. van Dijk, J.W.A. Elferink // *Anal. Chim. Acta.* – 2009. – V. 637. – I. 1–2. – P. 298-304.

357. Timofeeva I.I. Flow analysis with chemiluminescence detection: Recent advances and applications / I.I. Timofeeva, C.S. Vakh, A. V. Bulatov, P.J. Worsfold // *Talanta.* – 2018. – V. 179. – P. 246-270.

358. Waseem A. Analytical applications of flow injection chemiluminescence for the determination of pharmaceuticals: A Review / A. Waseem, M. Yaqoob, A. Nabi // *Curr. Pharm. Anal.* – 2013. – V. 9. – I. 4. – P. 363-395.

359. Mervartová K. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals / K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – V. 45. – I. 3. – P. 367-381.

360. Wen Y. Droplet detector for the continuous flow luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence system / Y. Wen, H. Yuan, J. Mao, D. Xiao, M.M.F. Choi // *Analyst.* – 2009. – V. 134. – I. 2. – P. 354-360.

361. Lara-Ortega F.J. Multicommuted flow injection analysis using chemiluminescence detection (MCFIA-CL) for olive oil analysis / F.J. Lara-Ortega, B. Gilbert López, M. Beneito Cambra, A. Molina-Díaz // *Food Anal. Methods.* – 2018. – V. 11. – I. 6. – P. 1804-1814.

362. Koronkiewicz S. A novel direct-injection photometric detector integrated with solenoid pulse-pump flow system / S. Koronkiewicz, S. Kalinowski // *Talanta.* – 2011. – V. 86. – I. 1. – P. 436-441.

363. Nie L.H. Determination of lomefloxacin by terbium sensitized chemiluminescence method / L.H. Nie, H.C. Zhao, X. Wang, L. Yi, Y. Lu, L.P. Jin, H.M. Ma // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – V. 374. – I. 7–8. – P. 1187-1190.

364. Francis P.S. Chemiluminescence methods for the determination of ofloxacin / P.S. Francis, J.L. Adcock // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 541. – I. 1–2. – P. 3-12.

365. Постнов В.Н. Наноструктуры  $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{C}$ -и- $\text{ZrO}_2 \cdot \text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{C}$ : Синтез и

исследование / В.Н. Постнов, Е.Б. Наумышева, М.В. Афонин, Д.В. Королев, И. В. Мурин // Журн. общ. химии. – 2015. – Т. 85. – № 12. – С. 1942-1945.

366. Pascual A. Fluorometric and high-performance liquid chromatographic measurement of quinolone uptake by human neutrophils / A. Pascual, I. García, M.C. Conejo, E.J. Perea // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1991. – V. 10. – I. 11. – P. 969-971.

367. Hassouan M. Simple multiresidue determination of fluoroquinolones in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection / M. Hassouan, O. Ballesteros, J. Vilchez, A. Zafra, A. Navalón // Anal. Lett. – 2007. – V. 40. – I. 4. – P. 779-791.

368. Vakh C. A chemiluminescence method for screening of fluoroquinolones in milk samples based on a multi-pumping flow system / C. Vakh, A. Pochivalov, S. Koronkiewicz, S. Kalinowski, V. Postnov, A. Bulatov // Food Chem. – 2019. – V. 270. – P. 10-16.

369. Tang Q. Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotic residues in milk sample by solid-phase extraction - Liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Q. Tang, T. Yang, X. Tan, J. Luo // J. Agric. Food Chem. – 2009. – V. 57. – I. 11. – P. 4535-4539.

370. Xu J. Hexafluoroisopropanol-induced salt-free catanionic surfactant coacervate extraction method for determination of fluoroquinolones in milk samples / J. Xu, X. Li, C. Li, J. Chen, Y. Xiao // Food Chem. – 2018. – V. 242. – P. 122-130.

371. Xia Q. Aluminium sensitized spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in milk samples coupled with salting-out assisted liquid-liquid ultrasonic extraction / Q. Xia, Y. Yang, M. Liu // Spectrochim. Acta, Part A. – 2012. – V. 96. – P. 358-364.

372. Zheng H. Facile synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers and its application in magnetic solid phase extraction for fluoroquinolones in milk samples / H. Zheng, J. Mo, Y. Zhang, Q. Gao, J. Ding // J. Chromatogr. A. – 2014. – V. 1329. – P. 17-23.

373. Kalunke R.M. Detection of ciprofloxacin residues in cow milk: A novel and

rapid optical  $\beta$ -galactosidase-based screening assay / R.M. Kalunke, G. Grasso, R. D'Ovidio, R. Dragone, C. Frazzoli // *Microchem. J.* – 2018. – V. 136. – P. 128-132.

374. Appicciafuoco B. Microbial screening for quinolones residues in cow milk by bio-optical method / B. Appicciafuoco, R. Dragone, C. Frazzoli, G. Bolzoni, A. Mantovani, A.M. Ferrini // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – V. 106. – P. 179-185.

375. Horstkotte B. Automatic determination of copper by in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction of its bathocuproine-complex using long path-length spectrophotometric detection / B. Horstkotte, M. Alexovič, F. Maya, C.M. Duarte, V. Andruch, V. Cerdà // *Talanta.* – 2012. – V. 99. – P. 349-356.

376. Maya F. Lab in a syringe: Fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection / F. Maya, B. Horstkotte, J.M. Estela, V. Cerdà // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 404. – I. 3. – P. 909-917.

377. Zaruba S. Using an optical probe as the microdrop holder in headspace single drop microextraction: determination of sulfite in food samples / S. Zaruba, A.B. Vishnikin, J. Škrliková, V. Andruch // *Anal. Chem.* – 2016. – V. 88. – I. 20. – P. 10296-10300.

378. García S. Flow-injection spectrophotometric determination of diclofenac or mefenamic acid in pharmaceuticals / S. García, C. Sánchez-Pedreño, I. Albero, C. García // *Microchim. Acta.* – 2001. – V. 136. – I. 1-2. – P. 67-71.

379. Nunes L.A.S. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population / L.A.S. Nunes, R. Brenzikofer, D.V. Macedo // *Clin. Biochem.* – 2011. – V. 44. – I. 17-18. – P. 1440-1444.

380. Avgerinos A. Extractionless high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma and urine / A. Avgerinos, T. Karidas, S. Malamataris // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1993. – V. 619. – I. 2. – P. 324-329.

381. Nayak D.K. Simultaneous estimation of rabeprazole sodium and diclofenac sodium by Rp-Hplc method in combined tablet dosage form / D.K. Nayak, V.K. Kumar, A. Patnaik // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* – 2010. – V. 2. – I. 2. – P. 1488-1492.

382. Lala L.G. HPTLC determination of diclofenac sodium from serum / L.G.

Lala, P.M. D'Mello, S.R. Naik // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – V. 29. – I. 3. – P. 539-544.

383. Zinellu A. Separation of aceclofenac and diclofenac in human plasma by free zone capillary electrophoresis using N-methyl-D-glucamine as an effective electrolyte additive / A. Zinellu, C. Carru, S. Sotgia, E. Porqueddu, P. Enrico, L. Deiana // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2005. – V. 24. – I. 4. – P. 375-380.

384. Elkady E.F. Simultaneous determination of diclofenac potassium and methocarbamol in ternary mixture with guaifenesin by reversed phase liquid chromatography / E.F. Elkady // *Talanta.* – 2010. – V. 82. – I. 4. – P. 1604-1607.

385. Mokhtari A. Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples / A. Mokhtari, H. Karimi-Maleh, A.A. Ensafi, H. Beitollahi // *Sensors Actuators, B: Chem.* – 2012. – V. 169. – P. 96-105.

386. Rodríguez J.A. Validation of a tubular bismuth film amperometric detector. Determination of diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis / J.A. Rodríguez, E. Barrado, Y. Castrillejo, J.R. Santos, J.L.F.C. Lima // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – V. 45. – I. 1. – P. 47-53.

387. Pimenta A.M. Simultaneous potentiometric and fluorimetric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system / A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – V. 470. – I. 2. – P. 185-194.

388. Pérez-Ruiz T. Flow extraction spectrophotometric method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations / T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, M.T. San Miguel // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1997. – V. 16. – I. 2. – P. 249-254.

389. Ortega-Barrales P. Sensitive and simple determination of diclofenac sodium by use of a continuous flow-injection procedure with solid-phase spectroscopic detection / P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Diaz // *Anal. Sci.* – 1999. – V. 15. – I. 10. – P. 985-989.

390. Pochivalov A. Automated alkaline-induced salting-out homogeneous liquid-liquid extraction coupled with in-line organic-phase detection by an optical probe for

the determination of diclofenac / A. Pochivalov, C. Vakh, V. Andruch, L. Moskvina, A. Bulatov // Talanta. – 2017. – V. 169. – P. 156-162.

## Приложение



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ОГРН 1021602841391

НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИКИ  
Кремлевская ул., д. 18, Казань, 420008  
тел. (843)233-78-98, факс (843)233-75-31  
e-mail: farma@kpfu.ru

15.06.2020 № 0.1.2.71-06/18/20

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### АКТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

результатов научно-исследовательских работ

Настоящим актом подтверждается, что результаты кандидатской диссертации Почивалова Алексея Сергеевича «Микроэкстракционное выделение в фармацевтическом анализе антибактериальных и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия могут быть использованы при проведении контроля качества, фармакокинетических исследований и оптимизации доз лекарственных средств.

Автором разработаны новые эффективные подходы по определению фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов и диклофенака натрия в лекарственных препаратах, биологических жидкостях и пищевых продуктах на основе использования жидкостной и твердофазной микроэкстракции. На их основе предложены методики для контроля качества лекарственных препаратов и неинвазивные способы оценки индивидуальной активности метаболической системы ацетилирования организма человека, которые могут быть рекомендованы как лабораторные исследования при персонализированном применении лекарственных препаратов и в процессе фармацевтической разработки новых лекарственных средств.

Директор, доктор химических наук



Ю.Г. Штырлин