

УДК 543.054.2, 543.544.5.068.7

## ЖИДКОСТНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ТЕТРАЦИКЛИНОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ДЛЯ ИХ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2020 г. К. Д. Черкашина<sup>а, \*</sup>, А. И. Сумина<sup>а</sup>, К. С. Вах<sup>а</sup>, А. В. Булатов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии Университетский просп., 26, Петергоф, Санкт-Петербург, 198504 Россия

\*e-mail: ksenya\_cherkashina@list.ru

Поступила в редакцию 03.12.2019 г.

После доработки 18.02.2020 г.

Принята к публикации 17.03.2020 г.

Предложена схема жидкостной микроэкстракции для выделения и концентрирования антибиотиков тетрациклинового ряда из биологических жидкостей. Схема предполагает образование *in situ* мицеллярной фазы первичного амина из водного раствора пробы при введении полярного органического растворителя. Возможности разработанной схемы продемонстрированы на примере определения тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина в плазме, сыворотке крови и моче человека методом ВЭЖХ-УФ. Достигнуты пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) для окситетрациклина и доксициклина 0.03 мг/л, для тетрациклина 0.08 мг/л. Время микроэкстракции не превышает 5 мин.

**Ключевые слова:** жидкостная микроэкстракция, тетрациклины, биологические жидкости, высокоэффективная жидкостная хроматография.

**DOI:** 10.31857/S0044450220090078

Одним из эффективных методов разделения и концентрирования является жидкостная микроэкстракция из гомогенного раствора (ЖМЭГР), которая предполагает образование *in situ* фазы экстрагента непосредственно в растворе пробы [1, 2]. В качестве экстрагентов в ЖМЭГР используют полярные органические растворители (одноатомные спирты [3, 4], ацетонитрил [5, 6]), способные неограниченно смешиваться с водным раствором пробы. Для образования фазы экстрагента и последующего фазового разделения требуется снижение энергии гидратации органического растворителя, которое может достигаться за счет эффектов “высаливания” [7] или “высахаривания” [8] при растворении в водной фазе “высаливающих” или “высахаривающих” агентов [9–12]. Метод обеспечивает большую площадь контакта водной и органической фаз и, как следствие, высокую скорость массопереноса аналитов [1, 2]. Основным ограничением метода является низкая эффективность с точки зрения достигаемых коэффициентов концентрирования. Как правило, разделение фаз наблюдается при их объемном соотношении 1 : 1.

Для повышения эффективности ЖМЭГР предложены растворители с “переключаемой по-

лярностью”. Установлено, что жидкие высшие вторичные и третичные амины (гидрофобная форма) в присутствии диоксида углерода образуют водорастворимые гидрокарбонаты (гидрофильная форма). При введении в гомогенный раствор гидрокарбоната амина сильной минеральной кислоты или щелочи протекают реакции ионного обмена и выделяется гидрофобная форма амина во всем объеме раствора с последующим разделением фаз [13–15]. При растворении высшей карбоновой кислоты в водном щелочном растворе также наблюдается образование гомогенного раствора за счет ионизации экстрагента (образуется гидрофильная форма). Последующее подкисление пробы инициирует протонирование гидрофильной формы и образование фазы высшей карбоновой кислоты. Низкая растворимость растворителей с “переключаемой полярностью” в водной фазе обеспечивает возможность достижения высоких коэффициентов концентрирования в схемах ЖМЭГР (объем экстрагента меньше 100 мкл) [13, 16].

Антибиотики тетрациклинового ряда находят широкое применение для лечения различных заболеваний дыхательных путей, мочевыделительной системы, кожи и слизистых оболочек [17].

Важной задачей является разработка экспрессных и простых схем определения тетрациклинов в биологических жидкостях для регулирования режимов приема лекарственных препаратов в процессе лечения. В схемах хроматографического определения тетрациклинов в сложных матрицах в первую очередь внимание уделяют пробоподготовке для устранения матричных эффектов [18].

Поиск и изучение новых экстракционных систем – важные задачи современной аналитической химии [19–21]. В данной работе для реализации ЖМЭГР антибиотиков тетрациклинового ряда изучены высшие первичные амины. При их выборе опирались на явление образования гидратов аминов в водном растворе [22]. В работе [23] установлено, что при введении неорганической соли в водный раствор гидрата первичного амина происходит быстрое выделение фазы амина, однако этот вариант ЖМЭГР реализован только в схеме выделения тетрациклина из водных растворов мочи, другие антибиотики тетрациклинового ряда (окситетрациклин и доксициклин) эффективно не извлекались в образующуюся фазу амина.

В данной работе установлено явление образования *in situ* мицеллярной фазы при введении полярного органического растворителя в водный раствор гидрата первичного амина. С целью подтверждения эффективности предложенного варианта ЖМЭГР изучена возможность выделения и концентрирования различных тетрациклинов (тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина) из биологических жидкостей (плазма, сыворотка крови и моча человека) для последующего их определения методом ВЭЖХ-УФ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы окситетрациклина (10 г/л), тетрациклина (10 г/л) и доксициклина (1 г/л) готовили путем растворения точных навесок антибиотиков в метаноле. Приготовленные растворы тетрациклинов хранили при +4°C в темном месте. Рабочие растворы тетрациклинов готовили непосредственно перед экспериментом разбавлением исходного раствора деионизованной водой. В работе использовали тетрациклин, окситетрациклин, доксициклин, *n*-октиламин, *n*-гептиламин, *n*-дециламин, *n*-нониламид, трилон Б, ацетат натрия, хлорид кальция, муравьиную, уксусную и трихлоруксусную кислоты, этанол и изопропанол (Sigma-Aldrich, Германия). Для приготовления подвижных фаз применяли ацетонитрил и (J.T. Baker Chemical Company, США).

Для определения тетрациклинов использовали систему ВЭЖХ LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором. Хроматографическое разделение тетрациклинов выполняли на колонке SUPELCO C18 (250 мм × 4.6 мм × 5 мкм) в соот-

ветствии с рекомендациями [23]. Подвижную фазу, состоящую из раствора А (0.5%-ная HCOOH) и раствора Б (смесь ацетонитрила с метанолом в соотношении 2 : 1), подавали со скоростью 0.75 мл/мин. Элюирование осуществляли в градиентном режиме: с 0 по 9 мин 80% А, с 9 по 16 мин линейное уменьшение до 20% А, с 16 по 19 мин 20% А, с 19 по 21 мин линейное увеличение до 80% А, с 21 по 23 мин 80% А. Детектирование выполняли при длине волны 355 нм.

Многоугольный спектрометр динамического и статического рассеяния света Photocor Complex (Photocor Instruments Inc., Россия), оснащенный оптическим коррелятором реального времени (угол рассеяния  $\theta$  диапазон 40°–100°, температура  $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , длина волны лазерных источников света 445 и 654 нм), использовали для установления коэффициентов трансляционной диффузии.

Для определения содержания изопропанола и *n*-октиламина применяли газовый хроматограф Хроматэк-Кристал 5000 (Хроматек, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярные колонки ВРХ 1 (10 м × 0.53 мм × 2.65 мкм) и ОРТМА WAXplus (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм) соответственно. Режимы программирования температуры для изопропанола: 40°C в течение 5 мин, нагрев до 200°C со скоростью 40 град./мин, 250°C в течение 5 мин; для *n*-октиламина: 120°C в течение 8 мин. Расход газа-носителя (азота) составлял 2.3 и 1.0 мл/мин для колонок ВРХ 1 и ОРТМА WAXplus соответственно.

Концентрацию воды в экстрактах определяли методом Фишера с использованием кулонометрического титратора 831 КФ (Metrohm, Швейцария).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью оптимизации условий выделения тетрациклинов из водной фазы изучали возможность их экстракции различными первичными аминами (*n*-гептиламин, *n*-октиламин, *n*-нониламид и *n*-дециламид). Для этого 100 мкл первичного амина смешивали с 1 мл водного раствора тетрациклинов, смесь встряхивали до образования гомогенного раствора гидрата амина (2 мин). При введении полярного органического растворителя (200 мкл ацетонитрила) в растворы гидратов *n*-гептиламина, *n*-октиламина и *n*-нониламина происходило разделение фаз при центрифугировании (1 мин, 9788 × g) и экстракция тетрациклинов. Результаты анализа образующихся фаз методом ВЭЖХ-УФ показали, что в присутствии *n*-гептиламина хроматографическое разделение тетрациклина и окситетрациклина не достигается, а *n*-октиламин обеспечивает более эффективное извлечение аналитов по сравнению с *n*-нониламином (рис. 1а). Для дальнейших исследований выбрали *n*-октиламин.

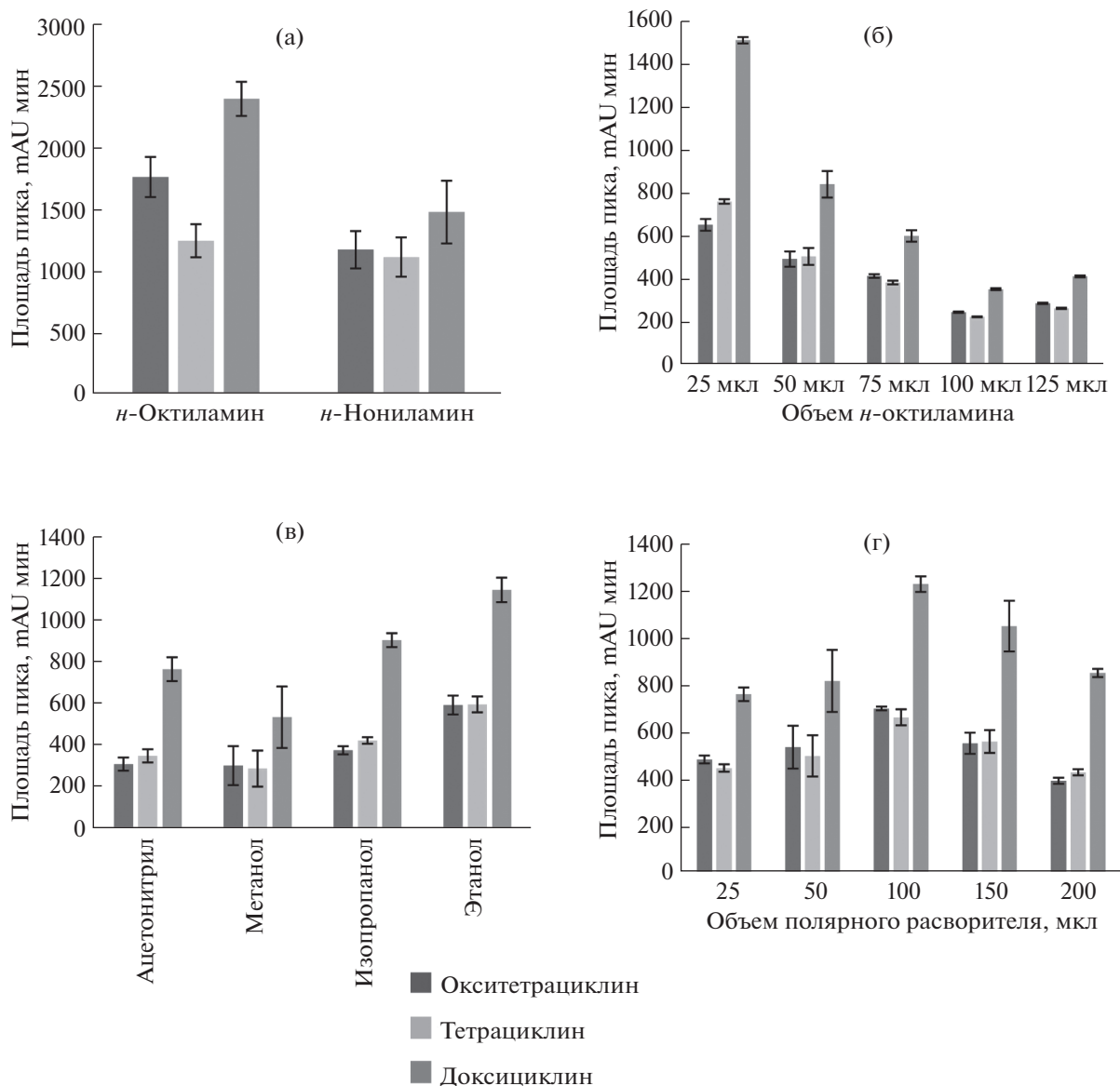


Рис. 1. Влияние типа амина (а), объема *n*-октиламина (б), типа полярного растворителя (в) и объема полярного растворителя (г) на эффективность микроэкстракции тетрациклинов ( $c_{\text{ТЦ}} = 25$  мг/л,  $n = 3$ ).

Для уточнения природы процессов, протекающих в экстракционной системе, исследовали фазу экстракта методом динамического рассеяния света. Цилиндрическую стеклянную ячейку (внутренний диаметр 10 мм) с исследуемым образцом погружали в иммерсионную жидкость (*n*-декан). Автокорреляционные функции интенсивности получали с использованием обратного преобразования Лапласа с помощью программного обеспечения DynaLS. Установленные значения коэффициентов трансляционной диффузии раствора гидрата *n*-октиламина в воде ( $20 \times 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с) и образующейся фазы ( $85 \times 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с) оказались значительно более низкими, чем значения тех же коэффициентов для *n*-октиламина ( $3.7 \times 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с

[24]) и воды ( $2.3 \times 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с [25]). Низкие значения коэффициентов трансляционной диффузии можно объяснить образованием супрамолекулярных структур. При растворении *n*-октиламина в водной фазе образуется мицеллярный раствор (гидрат амина играет роль поверхностно-активного вещества), а при введении полярного органического растворителя происходит коацервация с выделением насыщенной мицеллярной фазы (рис. 2).

Методами Фишера и газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием установили, что мицеллярная фаза экстракта содержит воду (39%), *n*-октиламин (34%) и полярный органический растворитель (26%). В водной фазе пробы

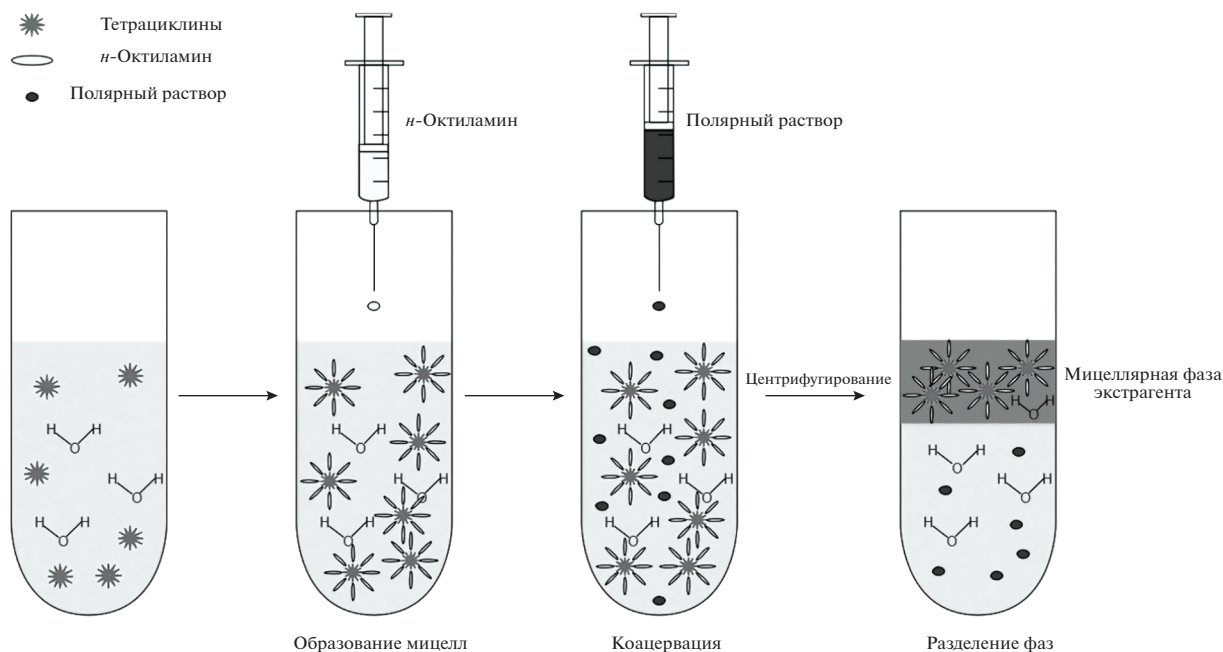


Рис. 2. Схема жидкостной микроэкстракции тетрациклинов.

присутствуют также полярный органический растворитель (10%) и *n*-октиламин (0.7%), но в более низких концентрациях, чем в фазе экстракта. Полученные результаты подтвердили факт образования мицеллярной фазы, насыщенной мицеллами *n*-октиламина.

Для достижения максимальной эффективности микроэкстракции анализов изучено влияние объема *n*-октиламина в диапазоне от 25 до 200 мкл при постоянном объеме водного раствора тетрациклинов (1 мл). С увеличением объема *n*-октиламина площади хроматографических пиков уменьшаются (рис. 1б). Максимальные аналитические сигналы наблюдаются при минимальном объеме *n*-октиламина (25 мкл), который выбрали в качестве оптимального.

Мицеллярная фаза образуется при введении полярного растворителя. Природа полярного растворителя влияет на процессы разделения фаз и массопереноса аналитов. Исследовали влияние различных полярных растворителей (ацетонитрил, метанол, этанол и изопропанол) на экстракцию тетрациклинов. При введении в экстракционную систему этанола объем фазы экстракта (30 мкл) был минимальным, при этом получены максимальные площади пиков (рис. 1в). Однако в этом случае объем отбираемой фазы оказался невоспроизводимым. Удовлетворительную эффективность экстракции и высокую прецизионность анализа обеспечил изопропанол.

Объем полярного растворителя влияет на эффективность концентрирования. Варьировали

объем изопропанола в диапазоне от 25 до 200 мкл. С одной стороны, при увеличении содержания изопропанола в водной фазе уменьшается количество свободных молекул воды, доступных для взаимодействия с амином и, как следствие, происходит коацервация. С другой стороны, изопропанол увеличивает растворимость полярных аналитов в водной фазе и снижает степень их извлечения. Установлено, что максимальные площади пиков достигаются при введении в водную фазу 100 мкл изопропанола (рис. 1г).

На основании полученных результатов разработана следующая схема ЖМЭГР. 1 мл водного раствора пробы и 25 мкл *n*-октиламина помещают в пластиковую пробирку и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После этого добавляют 100 мкл изопропанола, перемешивают смесь в течение 1 мин и центрифугируют (1 мин, 9788 × g). После центрифугирования мицеллярную фазу отбирают с помощью шприца и разбавляют метанолом в соотношении 1 : 1 для последующего определения тетрациклинов методом ВЭЖХ-УФ.

Для построения градуировочных графиков использовали водные растворы тетрациклинов. Градуировочные графики для определения окситетрациклина и доксициклина линейны в диапазоне от 0.1 до 10.0 мг/л ( $y = 273878x - 14331$ ,  $y = 471441x - 19328$  соответственно), для тетрациклина — в диапазоне от 0.25 до 10.0 мг/л ( $y = 273860x + 8892.7$ ). Достигнуты пределы обнаружения (3σ-критерий) для окситетрациклина и доксициклина составили 0.03 мг/л, для тетрацик-

Таблица 1. Результаты (мг/л) определения тетрациклинов в образцах мочи, сыворотки и плазмы крови ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ,  $F_{кр} = 19$ ,  $t_{кр} = 2.78$ )

Образец	Введено			Разработанная схема			Референтная методика			F-тест			t-тест		
	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ
Моча 1	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	35	35	35	37 ± 2	34 ± 1	30 ± 2	37.5 ± 0.8	35.8 ± 0.9	34 ± 2	3.81	2.09	1.38	0.47	1.44	2.61
	75	75	75	76 ± 1	60 ± 4	83 ± 3	74 ± 1	59 ± 4	85 ± 4	2.30	1.14	1.74	2.15	0.27	0.72
Моча 2	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	35	35	35	36 ± 1	30 ± 2	37 ± 1	34 ± 1	30.0 ± 0.4	36 ± 0.7	1.12	15.58	2.50	2.63	0.06	1.08
	75	75	75	74 ± 1	65 ± 4	78 ± 4	76 ± 1	63 ± 4	80 ± 3	1.38	1.14	3.50	2.77	0.52	1.18
Моча 3	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	35	35	35	38 ± 2	28 ± 2	37 ± 2	35 ± 2	30 ± 1	32 ± 3	1.68	1.35	4.69	2.03	1.79	2.38
	75	75	75	73 ± 1	55 ± 2	74 ± 1	71 ± 2	55 ± 4	76 ± 1	3.00	4.89	1.03	1.94	0.11	2.00
Сыворотка крови 1	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	3.5	3.5	3.5	3.1 ± 0.5	2.7 ± 0.6	3.59 ± 0.08	3.2 ± 0.6	2.8 ± 0.4	3.6 ± 0.8	1.21	2.76	2.83	0.80	1.00	2.65
	7.5	7.5	7.5	6.4 ± 0.7	6.6 ± 0.3	5.7 ± 0.7	6.1 ± 0.4	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.9	3.65	3.19	6.37	1.58	1.67	2.05
Сыворотка крови 2	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	3.5	3.5	3.5	3.1 ± 0.6	2.7 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.7	2.7 ± 0.3	3.6 ± 0.9	1.29	3.30	2.20	2.49	0.46	2.53
	7.5	7.5	7.5	5.4 ± 0.9	5.8 ± 0.4	5.1 ± 0.5	6.1 ± 0.8	6.2 ± 0.9	5.8 ± 0.9	1.33	5.40	3.53	2.38	2.02	2.50
Сыворотка крови 3	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	3.5	3.5	3.5	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.5	4.1 ± 0.5	3.7 ± 0.6	2.8 ± 0.5	3.8 ± 0.6	1.62	1.04	1.44	2.65	0.21	2.48
	7.5	7.5	7.5	5.9 ± 0.6	5.7 ± 0.9	5.6 ± 0.5	5.7 ± 0.6	5.7 ± 0.2	5.8 ± 0.8	1.09	16.16	2.82	1.38	0.26	0.91
Плазма крови 1	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	3.5	3.5	3.5	3.2 ± 0.6	3.2 ± 0.4	2.8 ± 0.5	3.2 ± 0.2	2.9 ± 0.7	3.3 ± 0.8	10.72	2.93	3.45	0.32	1.38	1.85
	7.5	7.5	7.5	6.7 ± 1.5	6.6 ± 0.7	7.2 ± 0.8	6.1 ± 0.4	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.6	17.9	1.59	1.43	2.74	2.25	2.06
Плазма крови 2	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	3.5	3.5	3.5	3.1	3.0 ± 0.4	3.0 ± 0.6	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.7	3.6 ± 0.7	9.92	6.40	1.84	1.25	1.04	2.61
	7.5	7.5	7.5	5.4 ± 0.5	6.1 ± 0.7	6 ± 1	6.1 ± 0.8	6.2 ± 0.9	5.8 ± 0.8	3.77	1.41	2.54	2.47	0.26	2.50
Плазма крови 3	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	—	—	—
	3.5	3.5	3.5	3.7 ± 0.5	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.5	3.2 ± 0.6	3.5 ± 0.8	3.4 ± 0.7	1.47	12.63	1.68	2.33	2.26	2.37
	7.5	7.5	7.5	5.6 ± 0.9	5.9 ± 0.6	5.5 ± 0.8	5.7 ± 0.6	5.7 ± 0.2	5.8 ± 0.7	4.95	7.95	2.82	0.87	1.07	0.91

Обозначения: ОТЦ — окситетрациклин, ТЦ — тетрациклин, ДЦ — доксициклин, ПО — предел обнаружения.

лина – 0.08 мг/л. Относительное стандартное отклонение составило не более 10% ( $n = 5$ ).

Разработанную схему ЖМЭГР использовали для определения окситетрациклина, тетрациклина и доксициклина в пробах мочи, плазмы и сыворотки крови. Правильность результатов подтверждали методом введено–найдено и сравнением с данными референтных методов [26, 27].

Для устранения мешающего влияния мочевины и фосфатов при анализе мочи в пробу (5 мл) последовательно вводили 250 мкл 0.1 М раствора  $ZnSO_4$  и 100 мкл 1.5 М раствора NaOH. После центрифугирования ( $5000 \times g$  в течение 3 мин) супернатант дополнительно отфильтровывали через мембранный фильтр (0.45 мкм), разбавляли в 50 раз деионизованной водой и проводили микроэкстракцию.

Тетрациклины могут связываться с белками крови, а также образовывать хелатные комплексы с ионами металлов [28, 29]. Для устранения матричных эффектов к пробам плазмы и сыворотки крови (0.25 мл) добавляли 100 мкл ацетатного буферного раствора (0.1 М, pH 6.5), содержащего 35 ммоль/л  $CaCl_2$ , 25 ммоль/л трилона Б и 300 мкл изопропанола. После центрифугирования ( $10000 \times g$  в течение 5 мин) супернатант разбавляли в 8 раз и выполняли микроэкстракцию. Концентрации аналитов в пробах мочи, плазмы и сыворотки крови устанавливали с помощью градуировочных графиков с учетом разбавления проб деионизованной водой (в 50 раз).

Результаты определения тетрациклинов в биологических жидкостях представлены в табл. 1. При определении тетрациклинов в пробах мочи, плазмы и в сыворотке получены заниженные результаты, что связано с образованием водорастворимых устойчивых комплексов аналитов с ионами металлов, которые присутствуют в биологических жидкостях [30]. Результаты оценивали с помощью  $F$ - и  $t$ -тестов. Полученные значения  $F \leq 19.00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а значения  $t \leq 2.78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами разработанной и референтных методик.

\* \* \*

Разработана схема жидкостной микроэкстракции, предполагающая образование *in situ* мицеллярной фазы экстрагента непосредственно в растворе пробы. Схема микроэкстракции успешно применена для выделения тетрациклинов из проб биологических жидкостей для их последующего ВЭЖХ-УФ-определения. Изучена эффективность применения различных первичных аминов для выделения тетрациклинов. Предлагаемый подход исключает необходимость применения

“высаливающих” агентов для разделения фаз и обеспечивает возможность эффективного концентрирования целевых аналитов. Разработанную схему можно использовать в практике персонализированной медицины для определения тетрациклинов в биологических жидкостях. Достигнутые пределы обнаружения тетрациклинов в моче (0.03–0.08 мг/л) лежат в диапазоне терапевтических концентраций (для мочи до 300 мг/л, для сыворотки и плазмы крови 1–10 мг/л [31–33]).

*Авторы выражают благодарность РФФИ (19-33-90007\19) за финансовую поддержку. Научные исследования проводились с использованием оборудования Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, а именно ресурсных центров “Методы анализа состава вещества” и “Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники”.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Çabuk H., Köktürk M., Ata Ş. pH-assisted homogeneous liquid–liquid microextraction using dialkylphosphoric acid as an extraction solvent for the determination of chlorophenols in water samples // *J. Sep. Sci.* 2014. V. 37. P. 1343.
2. Yazdanfar N., Yamini Y., Ghambarian M. Homogeneous liquid–liquid microextraction for determination of organochlorine pesticides in water and fruit samples // *Chromatographia*. 2014. V. 77. P. 329.
3. Gupta M., Pillai A. K., Singh, A., Jain A., Verma K. K. Salt-assisted liquid–liquid microextraction for the determination of iodine in table salt by high-performance liquid chromatography–diode array detection // *Food Chem.* 2011. V. 124. № 4. P. 1741
4. Chen X., Li J., Zhang Y., Hu S., Du Y., Bai X. Double salting-out effect assisted heat-shrinkable tubing liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in human plasma // *J. Chromatogr. A*. 2019. V. 1603. P. 44.
5. Rashidipour M., Heydari R., Maleki A.A., Mohammadi E.A., Davari B. Salt-assisted liquid–liquid extraction coupled with reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction for sensitive HPLC determination of paraquat in environmental and food samples // *J. Food Meas. Charact.* 2019. V. 13. № 1. P. 269.
6. Xu X.-Y.A., Ye J.-Q.A., Nie J.A., Li Z.-G., Lee M.-R. A new liquid-liquid microextraction method by ultrasound assisted salting-out for determination of triazole pesticides in water samples coupled by gas chromatography-mass spectrometry // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. № 3. P. 1194.
7. Hey M.J., Jackson D.P., Yan H. The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly (ethylene glycol) // *Polymer*. 2005. V. 46. № 8. P. 2567.
8. Wang B., Ezejias T., Feng H., Blaschek H. Sugaring-out: A novel phase separation and extraction system // *Chem. Eng. Sci.* 2008. V. 63. № 9. P. 2595.
9. Ahmed S., Mahmoud A.M. A novel salting-out assisted extraction coupled with HPLC–fluorescence detection

- for trace determination of vitamin K homologues in human plasma // *Talanta*. 2015. V. 144. P. 480.
10. *Song S., Ediage E.N., Wu A., De Saeger S.* Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1292. P. 111.
  11. *Nugbienyo L., Malinina Y., Garmonov S., Kamencev M., Salahov I., Andruch V., Bulatov A.* Automated sugaring-out liquid-liquid extraction based on flow system coupled with HPLC-UV for the determination of procainamide in urine // *Talanta*. 2017. V. 167. P. 709.
  12. *Zhang J., Myasein F., Wu H., El-Shourbagy T.A.* Sugaring-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for bioanalysis using liquid chromatography–mass spectrometry // *Microchem. J.* 2013. V. 108. P. 198.
  13. *Vakh C., Pochivalov A., Andruch V., Moskvina L., Bulatov A.* A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 907. P. 54.
  14. *Shih H.K., Shu T.Y., Ponnusamy V.K., Jen J.F.* 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 // *Anal. Chim. Acta*. 2015. V. 854. P. 70.
  15. *Jessop P.G., Kozyc L., Rahami Z.G., Schoenmakers D., Boyd A.R., Wechsler D., Holland A.M.* Tertiary amine solvents having switchable hydrophilicity // *Green Chem.* 2011. V. 13. № 3. P. 619.
  16. *Kokosa, J.M.* Advances in solvent-microextraction techniques // *Trends Anal. Chem.* 2013. V. 43. P. 2.
  17. *Klein N. C., Cunha B. A.,* Tetracyclines // *Med. Clin. North Am.* 1995. V. 79. № 4. P. 789.
  18. *Anderson C.R., Rupp H.S., Wu W.H.* Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1075. № 1–2. P. 23.
  19. *Kocúrová L., Balogh I.S., Šandrejová J., Andruch V.* Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review // *Microchem. J.* 2012. V. 102. P. 11.
  20. *Anthemidis A.N., Ioannou K.I.G.* Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review // *Talanta*. V. 80. № 2. P. 413.
  21. *Moradi M., Yamini Y., Ebrahimpour B.* Emulsion-based liquid-phase microextraction: A review // *J. Iran. Chem. Soc.* 2014. V. 11. № 4. P. 1087.
  22. *Pettersson A.B.A., Rosenholm J.B.* A calorimetric investigation of the adsorption of octylamine on titanium dioxide from aqueous solutions // *Prog. Coll. Polym. Sci.* 1990. V. 82. P. 38.
  23. *Cherkashina K., Vakh C., Lebedinets S., Pochivalov A., Moskvina L., Lezov A., Bulatov A.* 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 // *Talanta*. 2018. V. 184. P. 122.
  24. *Winkelmann M., Schneider L., Gerlinger W., Sachweh B., Müller R., Schuchmann H.P.* Mass transport characteristics of alkyl amines in a water/n-decane system // *J. Coll. Interface Sci.* 2012. V. 372 № 1. P. 164.
  25. *Krynicky K., Green C.D., Sawyer D.W.* Pressure and temperature dependence of selfdiffusion in water // *Faraday Disc. Chem. Soc.* 1978. V. 66. P. 199.
  26. *Fernandez-Torres R., Consentino M.O., Lopez M.B., Mochon M.C.* 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 // *Talanta*. 2010. V. 81. № 3. P. 871.
  27. *Kazuo I., Norio O., Mitsuru Y.* Rapid determination of tetracycline antibiotics in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr.* 1993. V. 619. № 2. P. 319.
  28. *Chi Z., Liu R.* Phenotypic characterization of the binding of tetracycline to human serum albumin // *Biomacromolecules*. 2010. V. 12. № 1. P. 203.
  29. *Jezowska-Bojczuk M., Lambs L., Kozłowski H., Berthon G.* Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 10. Structural investigations on copper(II) complexes of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, 4-(dedimethylamino) tetracycline, and 6-desoxy-6-demethyltetracycline and discussion of their binding modes // *Inorg. Chem.* 1993. V. 32. № 4. P. 428.
  30. *Brion M., Berthon G., Fourtillan J.B.* Metal ion–tetracyclines interactions in biological fluids. Potentiometric study of calcium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and minocycline and simulation of their distributions under physiological conditions // *Inorg. Chim. Acta*. 1981. V. 55. P. 47.
  31. *Calixto C.M.F., Cavalheiro E.T.G.,* Determination of tetracyclines in bovine and human urine using a graphite-polyurethane composite electrode // *Anal. Lett.* 2015. V. 48. № 9. P. 1454.
  32. *Sonntag O., Scholer A.,* Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies // *Ann. Clin. Biochem.* 2001. V. 38. № 4. P. 376.
  33. *Regenthal R., Krueger M., Koepfel C., Preiss R.,* Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs // *J. Clin. Monit. Comput.* 1999. V. 15. № 7. P. 529.