

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Объект авторского права
УДК 543.054: 542.61: 543.062

ПОЛОНЕВИЧ
Анна Геннадьевна

**ЭКСТРАКЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ПЕНИЦИЛЛИНОВ КИСЛОТНОГО ТИПА, ХЛОРАМФЕНИКОЛА И
АМИТРАЗА В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Минск, 2025

Работа выполнена в Белорусском государственном университете и в республиканском унитарном предприятии «Научно-практический центр гигиены»

Научный руководитель – **Лещев Сергей Михайлович,**
доктор химических наук, профессор,
профессор кафедры аналитической химии
химического факультета Белорусского
государственного университета

Официальные оппоненты: **Гриншпан Дмитрий Давидович,**
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией растворов
целлюлозы и продуктов их переработки
учреждения Белорусского государственного
университета «Научно-исследовательский
институт физико-химических проблем»

Каранкевич Елена Григорьевна,
кандидат химических наук,
заведующий лабораторией
синтеза и исследования свойств
биологически активных веществ
государственного научного учреждения
«Институт физико-органической химии
Национальной академии наук Беларуси»

Оппонирующая организация – Учреждение образования «Белорусский
государственный технологический университет»

Защита состоится 11 февраля 2025 г. в 10:00 на заседании совета по защите диссертации Д 02.01.09 при Белорусском государственном университете по адресу: 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 8 (корпус юридического факультета), ауд. 407.

Телефон ученого секретаря +375 17 209-57-09, e-mail: LoginoNV@bsu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского государственного университета.

Автореферат разослан «10» января 2025 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
доктор химических наук, профессор



Н.В.Логинова

ВВЕДЕНИЕ

Применение антибиотиков в сельском хозяйстве и пищевой промышленности, акарицидов в пчеловодстве приводит к загрязнению пищевой продукции. Поступление с пищей даже микроколичеств таких веществ оказывает негативное воздействие на здоровье человека, в том числе вызывает антибиотикорезистентность. Поэтому постоянный контроль пищевой продукции является обязательным условием для обеспечения продовольственной безопасности, здоровья населения, конкурентоспособности продуктов белорусского производства. В частности, актуальной задачей является контроль остаточного содержания пенициллинов кислотного типа и хлорамфеникола в пищевой продукции животного происхождения, амитраза и его метаболитов в меде. Максимально допустимый уровень остаточного содержания (МДУ) пенициллинов в молочной продукции составляет 4 либо 30 мкг/кг в зависимости от вещества, МДУ хлорамфеникола в пищевой продукции животного происхождения – 0,3 мкг/кг, МДУ амитраза и его метаболитов в меде – 200 мкг/кг.

Наиболее распространенным методом определения остаточного содержания подобных загрязнителей в пищевой продукции является высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с различными типами масс-спектрометрических детекторов. Однако использование масс-спектрометрии не гарантирует достижения требуемых диапазонов измерений, поскольку многочисленные матричные компоненты проб в случае их присутствия в анализируемых растворах способны искажать аналитический сигнал и приводить к падению чувствительности оборудования.

Как следствие, обязательным этапом анализа пищевой продукции является пробоподготовка, для которой широко применяют методы твердофазной экстракции (ТФЭ) и QuEChERS, которые зачастую недостаточно селективны, требуют наличия расходных материалов, сорбентов и готовых наборов. В то же время жидкость-жидкостная экстракция проста и доступна в реализации, обеспечивает количественное извлечение аналитов, их эффективное отделение от компонентов матрицы и концентрирование. Использование жидкость-жидкостной экстракции обеспечивает независимость контроля загрязнителей пищевой продукции от наличия импортируемых расходных материалов и увеличение срока службы дорогостоящего измерительного оборудования. Разработка эффективных методик экстракционной пробоподготовки требует предварительного систематического изучения экстракции аналитов.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 гг., утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190 (п. 12. Безопасность человека, общества и государства) и приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг., утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2021 № 156 (п. 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства (управление здоровьем и средой обитания человека, его здоровое и безопасное питание, активное долголетие; антибиотикорезистентность)).

Результаты, полученные в диссертационной работе, связаны с выполнением научно-исследовательских работ: задания 02.05 «Разработать и внедрить метрологически аттестованную методику выполнения измерений остаточного содержания инсектицида амитраз и его метаболитов в продукции животноводства и меде для обеспечения их гигиенической безопасности» отраслевой научно-технической программы «Гигиеническая безопасность» (2019–2023 гг., № ГР 20192085 от 16.08.2019); задания 02.04 «Разработать и внедрить методы оценки и управления риском здоровью, ассоциированным с остаточными количествами антибактериальных препаратов в пищевой продукции» (2019–2023 гг., № ГР 20190396 от 29.03.2019).

Цель и задачи исследования. *Цель исследования* – разработка методик экстракционной пробоподготовки пищевой продукции животного происхождения для определения остаточного содержания пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) на основе систематического изучения экстракции аналитов.

Для достижения цели поставлены и решены следующие *задачи*:

- определить константы и коэффициенты распределения пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов в экстракционных системах органический растворитель – водная фаза;

- установить влияние химического строения молекул аналитов, природы растворителя и концентрации неорганической соли в случае применения высаливания на рассчитанные на основании экспериментальных данных константы и коэффициенты распределения;

- предложить подходы к извлечению пенициллинов кислотного типа,

хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов из проб пищевой продукции на основе установленных констант и коэффициентов распределения и выявленных закономерностей экстракции;

– разработать методики экстракционной пробоподготовки пищевой продукции для определения в ней остаточного содержания пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов.

Объекты исследования:

– пенициллины кислотного типа: пенициллин G, пенициллин V, оксациллин, клоксациллин, нафциллин, диклоксациллин;

– хлорамфеникол;

– амитраз;

– метаболиты амитраза: N-(2,4-диметилфенил)-N'-метилимидоформамид (ДМФФ), N-(2,4-диметилфенил)формамид (ДМФ), 2,4-диметиланилин (ДМА);

– пищевая продукция: молоко, сливки, сухая молочная смесь для питания детей, молочный коктейль, масло сливочное, сыр, свинина, мясные консервы для детского питания, гематоген, мед.

Предмет исследования – экстракция пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов органическими растворителями из водных фаз; методики экстракционной пробоподготовки пищевой продукции животного происхождения для ВЭЖХ-МС/МС определения остаточного содержания пенициллинов, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов.

Научная новизна:

Впервые определены константы и коэффициенты распределения пенициллинов кислотного типа (пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина), хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов (ДМФФ, ДМФ и ДМА) для различных экстракционных систем органический растворитель – вода.

Определены коэффициенты распределения пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина в экстракционных системах хлороформ – водные растворы сульфата аммония и константы распределения хлорамфеникола в системах дихлорметан – водные растворы сульфата аммония.

Установлены зависимости констант и коэффициентов распределения от химического строения аналитов, природы фаз экстракционных систем, концентрации сульфата аммония. Установленные константы и коэффициенты могут быть использованы для прогнозирования экстракции родственных по строению веществ с помощью инкрементного метода.

Разработаны новые методики экстракционной подготовки пищевой продукции для последующего чувствительного и селективного

ВЭЖХ-МС/МС определения остаточного содержания пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина; хлорамфеникола; амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА, отличающиеся доступностью и простой, позволяющие достичь нижней границы диапазона измерений от 0,1 до 25 мкг/кг и снизить расширенную неопределенность результатов до 9 % – 29 % (в зависимости от вещества).

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментально установленные значения констант распределения пенициллинов кислотного типа (пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина) в экстракционных системах органический растворитель (*n*-гексан, толуол, хлороформ, изоамиловый спирт) – вода, хлорамфеникола в системах органический растворитель (*n*-гексан, толуол, хлороформ, дихлорэтан, дихлорметан, *n*-бутанол, этилацетат) – вода, амитраза и его метаболитов (ДМФФ, ДМФ и ДМА) в экстракционных системах органический растворитель (*n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ) – вода и их зависимость от химического строения аналитов и природы органических растворителей.

2. Зависимости установленных коэффициентов распределения пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина в экстракционных системах хлороформ – водные растворы сульфата аммония и константы распределения хлорамфеникола в экстракционных системах дихлорметан – водные растворы сульфата аммония от концентрации сульфата аммония.

3. Разработанные методики экстракционно-хроматографического определения остаточного содержания пенициллинов, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов в пищевой продукции животного происхождения, отличающиеся простотой исполнения, не требующие для пробоподготовки импортируемых расходных материалов, обеспечивающие продление срока службы ВЭЖХ-МС/МС оборудования, уменьшение расширенной неопределенности результатов измерений. Методика определения пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина и диклоксациллина в молоке характеризуется диапазоном измерений пенициллинов от 2 до 100 мкг/кг и максимальной относительной расширенной неопределенностью результатов от 25 % до 29 %. Методики определения хлорамфеникола в молочной и мясной продукции характеризуются диапазоном измерений от 0,1 до 1,0 мкг/кг и расширенной неопределенностью не более 18 %. Методика определения амитраза в меде характеризуется диапазоном измерений от 5 до 250 мкг/кг и максимальной расширенной неопределенностью от 12 % до 16 %. Диапазон измерений методики совместного определения амитраза, ДМФФ,

ДМФ и ДМА в меде составляет от 25 до 250 мкг/кг; максимальная расширенная неопределенность – от 9 % до 22 %.

Личный вклад соискателя. Экспериментальные данные получены лично соискателем. Научный руководитель (д. х. н., профессор Лещев С. М.) осуществлял консультативную помощь в планировании исследований, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке научных публикаций. Вклад авторов совместных публикаций по теме диссертационной работы заключался в обсуждении условий постановки эксперимента и полученных результатов исследований.

Апробация диссертации. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих международных научных и научно-практических конференциях, республиканских семинарах: «Молодежь в науке» (Минск, 2020), «Ломоносов-2020» (Москва, 2020), «Здоровье и окружающая среда (Минск, 2021, 2022, 2023), «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2023), «Новые методы в практике государственного санитарного надзора» (Минск, 2020, 2023), научной сессии Белорусского государственного медицинского университета (Минск, 2023).

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертационной работы отражены в 13 научных публикациях, включающих 7 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий (5,7 авт. л.); 4 публикации в сборниках материалов научных конференций; 1 тезисы докладов; 1 патент.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из перечня сокращений и обозначений, введения, общей характеристики работы, 4 глав, заключения, списка использованных источников и приложения. Работа изложена на 229 страницах; включает 21 рисунок, 24 таблицы и 27 формул на 20 страницах, 6 приложений на 114 страницах. Список использованных источников содержит 137 наименований на 14 страницах, включая 13 публикаций соискателя на 2 страницах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Первая глава посвящена обобщению методик определения пенициллинов, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов (рисунок 1) в пищевой продукции и методам, лежащим в их основе. Показано, что большинство методик пробоподготовки основаны на применении неселективных вариантов ТФЭ и QuEChERS и разработаны эмпирически; данные по экстракции аналитов практически отсутствуют. Показано, что

предпочтительным методом извлечения аналитов, разделения и концентрирования является жидкость-жидкостная экстракция, обеспечивающая независимость контроля загрязнителей пищевой продукции от наличия импортируемых расходных материалов и продление срока службы измерительного оборудования.

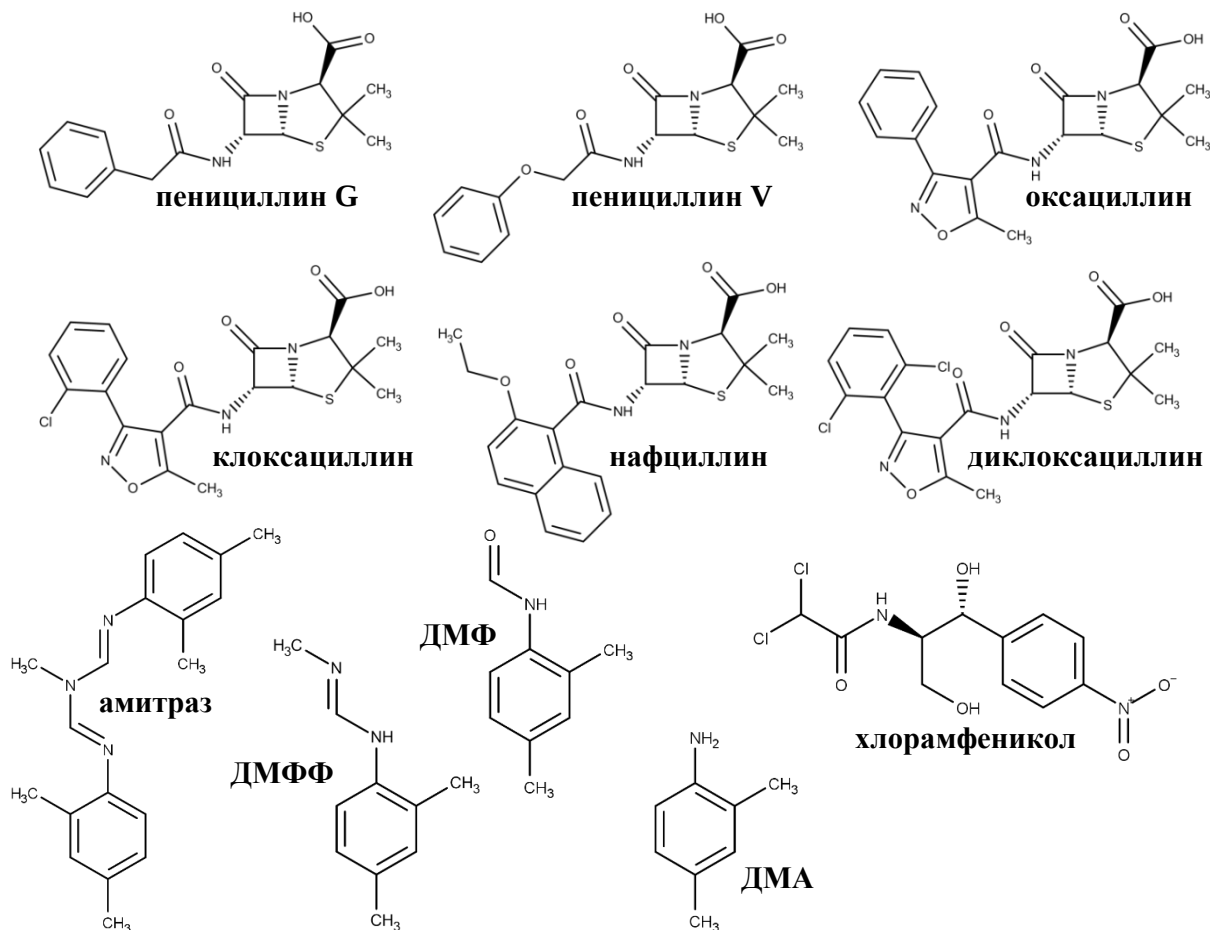


Рисунок 1 – Структурные формулы пенициллинов, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов

Во второй главе перечислены использованные реактивы, материалы и оборудование; описано приготовление растворов аналитов. Описаны разработанные условия ВЭЖХ-МС/МС определения аналитов и условия экспериментального определения констант P и коэффициентов D распределения.

В третьей главе рассмотрено распределение шести пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов в экстракционных системах органический растворитель – водная фаза.

Изученные пенициллины имеют кислотную природу ($pK_a = 2,7$), вследствие наличия в составе непланарной бициклической β -лактамно-тиазолидиновой структуры лабильны в водных растворах, в особенности в кислых и щелочных, что обуславливает важность значения рН водной фазы при экстрагировании.

Значения логарифмов экспериментально установленных констант распределения P пенициллинов в экстракционных системах органический растворитель – вода приведены в таблице 1. Значения относительного стандартного отклонения среднего арифметического констант распределения $s(\bar{P})$ составляют от 1 % до 7 %.

Таблица 1 – Логарифмы констант распределения пенициллинов в экстракционных системах органический растворитель – вода

Название вещества	Органический растворитель			
	<i>n</i> -гексан	толуол	хлороформ	изоамиловый спирт
	$\lg P$			
Пенициллин G	–4,04	–0,61	1,01	2,25
Пенициллин V	–3,26	0,19	1,75	2,39
Оксациллин	–2,80	0,58	2,26	2,69
Клоксациллин	–2,51	0,94	2,63	2,82
Нафциллин	–2,30	1,01	2,78	3,17
Диклоксациллин	–1,77	1,53	3,13	3,21

Значения констант распределения пенициллинов очень сильно зависят как от строения экстрагируемого вещества, так и от природы используемого растворителя.

Значения $\lg P$ выстраиваются в ряд, не зависящий от природы растворителя: пенициллин G < пенициллин V < оксациллин < клоксациллин < < нафциллин < диклоксациллин. Последовательность изменения значений $\lg P$ обусловлена увеличением степени гидрофобности боковой цепи пенициллинов, связанной с общим бициклическим ядром: бензил- < феноксиметил- < 3-фенил-5-метил-изоксазолил- < 3-(2-хлорфенил)-5-метил-изоксазолил- < 2-этоксинафтил- < < 3-(2, 6-дихлорфенил)-5-метил-изоксазолил-.

Растворители в порядке увеличения экстрагирующей способности выстраиваются следующим образом: *n*-гексан < толуол < хлороформ < < изоамиловый спирт. С уменьшением полярности и сольватационной способности органического растворителя усиливается его дифференцирующее действие: по мере увеличения гидрофобности боковой цепи пенициллинов наибольшее увеличение констант распределения происходит в экстракционной системе *n*-гексан – вода, наименьшее – в системе изоамиловый спирт – вода.

n-Гексан применим для очистки проб от липидов, поскольку не извлекает пенициллины: при pH 2,7 (50 % аналитов в водной фазе находится в молекулярной форме) и отношении объемов водной и органической фаз $r = 1$ рассчитанные значения степени извлечения R составляют от < 0,01 % до 0,84 %. Использование толуола для извлечения пенициллинов из водных растворов не

представляет практического интереса, т. к. для 95 % извлечения пенициллина G из водных растворов подкисленных до pH 2,7 необходимо соблюдать условие $r < 1/155$ или применять несколько последовательных экстракций. Наиболее эффективным экстрагентом изученных пенициллинов является изоамиловый спирт, который малоселективен, извлекает многочисленные сопутствующие компоненты пищевых матриц, имеет высокую температуру кипения.

Хлороформ более селективен и обеспечивает получение экстрактов, не содержащих белковых компонентов, сахаров, электролитов и не требующих дополнительной очистки. Хлороформные экстракты быстро концентрируются упариванием досуха для последующего восстановления в воде для ВЭЖХ-МС/МС анализа. Однако хлороформ недостаточно эффективен для одновременного извлечения всех пенициллинов: однократная экстракция при $r = 1$ и подкислении водной фазы до pH 2,7 позволяет экстрагировать лишь 84 % пенициллина G и не менее 97 % других пенициллинов. Для достижения количественного извлечения всех пенициллинов хлороформом предложено использование высаливания сульфатом аммония, выбранного среди ряда солей с учетом кислотно-основных свойств пенициллинов и их нестабильности при низких и высоких значениях pH.

Значения $\lg D$ пенициллинов для экстракционных систем хлороформ – водные растворы сульфата аммония ($s(\bar{D})$ – от 1 % до 13 %) и рассчитанные константы Сеченова $K_{сеч}$ (коэффициенты детерминации R^2 для полученных уравнений Сеченова – от 0,998 до 1,000) представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Логарифмы коэффициентов распределения пенициллинов в экстракционных системах хлороформ – водные растворы сульфата аммония

Название вещества	Концентрация сульфата аммония, моль/л						$K_{сеч}$
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,4	3,2	
	$\lg D$						
Пенициллин G	−1,61	−1,07	−0,56	−0,03	0,46	1,39	1,11
Пенициллин V	−0,71	−0,24	0,27	0,75	1,19	2,00	1,01
Оксациллин	−0,16	0,35	0,91	1,45	1,83	—	1,06
Клоксациллин	0,20	0,71	1,29	1,74	—	—	1,04
Нафциллин	0,36	0,87	1,46	—	—	—	1,10
Диклоксациллин	0,69	1,19	1,70	—	—	—	1,01

Согласно значениям $K_{сеч}$ увеличение концентрации сульфата аммония на 1 моль/л приводит к росту коэффициента распределения каждого пенициллина на один порядок. Использование сульфата аммония позволяет извлечь не менее 95 % пенициллина G хлороформом из водного раствора с концентрацией соли

3,2 М ($\lg D = 1,39$) при $r = 1$ однократной экстракцией. Степень извлечения более гидрофобных пенициллинов в данных условиях составляет выше 95 %.

Значения логарифмов экспериментально определенных констант распределения хлорамфеникола ($s(\bar{P})$ – от 3 % до 8 %) и соответствующие значения степени извлечения R , %, для отношения фаз $r = 1$ представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Логарифмы констант распределения хлорамфеникола в экстракционных системах органический растворитель – вода и степень извлечения при однократной экстракции и $r = 1$

Органический растворитель	$\lg P$	R , %
<i>n</i> -Гексан	-1,82	1,5
Толуол	-1,49	3,2
Хлороформ	-0,58	21
Дихлорэтан	-0,27	35
Дихлорметан	-0,26	36
<i>n</i> -Бутанол	0,83	87
Этилацетат	1,62	98

Растворители в порядке увеличения $\lg P$ выстраиваются следующим образом: *n*-гексан < толуол < хлороформ < дихлорэтан $\approx$ дихлорметан < *n*-бутанол < этилацетат.

Установлено, что этилацетат является наиболее эффективным экстрагентом и обеспечивает 95 % извлечение хлорамфеникола из водных растворов даже при $r = 2$. При этом переход в органическую фазу белковых компонентов, сахаров и электролитов из водных растворов проб пищевой продукции не должен быть значительным, однако высокая взаимная растворимость воды и этилацетата обуславливает извлечение сопутствующих компонентов матрицы и необходимость последующей очистки экстрактов методом ТФЭ на гидрофобно-гидрофильном полимерном сорбенте. Необходимость очистки методом ТФЭ, высокая химическая активность этилацетата и его относительно высокая температура кипения определяют целесообразность выбора альтернативного экстрагента для хлорамфеникола.

Дихлорметан в отличие от этилацетата обеспечивает получение более чистых экстрактов, которые быстро концентрируются упариванием благодаря низкой температуре кипения растворителя, наименьшей среди трех изученных хлоралканов. Для увеличения эффективности извлечения хлорамфеникола дихлорметаном обосновано высаливание сульфатом аммония.

Значения $\lg P$ хлорамфеникола для экстракционных систем дихлорметан – водные растворы сульфата аммония ($s(\bar{P})$ – от 4 % до 8 %) представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Значения логарифма константы распределения хлорамфеникола в экстракционных системах дихлорметан – водные растворы сульфата аммония

Концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, моль/л	$\lg P$
0,5	–0,14
1,0	–0,04
2,0	0,43
3,0	0,79
4,0	1,09

Значения константы распределения хлорамфеникола увеличиваются более чем в 2 раза при увеличении концентрации соли на 1 моль/л ($K_{\text{сеч}} = 0,37$; $R^2 = 0,993$). Таким образом, использование 3 М сульфата аммония на порядок увеличивает константу распределения хлорамфеникола и позволяет извлечь 95 % антибиотика дихлорметаном из водной фазы однократной экстракцией при $r = 0,3$.

Значения логарифмов установленных констант распределения *амитраза и его метаболитов* в системах органический растворитель – вода ($s(\bar{P})$ – от 1 % до 9 %) представлены в таблице 5. Константы распределения амитраза для толуола, дихлорметана и хлороформа не устанавливали, поскольку их ожидаемые значения крайне высоки и намного превышают полученное значение для *n*-гексана.

Таблица 5 – Логарифмы констант распределения амитраза и его метаболитов в экстракционных системах органический растворитель – вода

Название вещества	Органический растворитель			
	<i>n</i> -гексан	толуол	дихлорметан	хлороформ
	$\lg P$			
Амитраз	> 4	–	–	–
ДМФФ	0,94	2,00	2,40	2,48
ДМА	1,03	1,84	2,24	2,26
ДМФ	–0,36	1,04	1,74	1,87

Последовательность изученных растворителей в порядке увеличения их экстрагирующей способности следующая: *n*-гексан < толуол < дихлорметан $\approx$ $\approx$ хлороформ. Наибольший рост P с увеличением экстракционной способности растворителей наблюдается для наиболее гидрофильного соединения – ДМФ.

Для извлечения амитраза *n*-гексан является эффективным и наиболее селективным экстрагентом. Для количественного выделения амитраза *n*-гексаном из водной фазы достаточно однократной экстракции при высоком значении отношения r (более 100). Таким образом, извлечение амитраза *n*-гексаном из меда позволяет многократно концентрировать аналит, отделять компоненты матрицы и не требует дополнительной очистки. Однако для извлечения метаболитов *n*-гексан недостаточно эффективен: в частности, данным растворителем невозможно количественно извлечь ДМФ ($R = 31\%$ при $r = 1$).

Следующим по эффективности извлечения является толуол, который может быть использован и как экстрагент метаболитов амитраза, в том числе ДМФ ($R = 92\%$ для $r = 1$), однако высокая температура (более $100\text{ }^{\circ}\text{C}$), необходимая для упаривания толуольных экстрактов, не приемлема из-за нестабильности амитраза и летучести ДМА.

Наиболее высокими значениями констант распределения амитраза и его метаболитов характеризуются экстракционные системы дихлорметан – вода и хлороформ – вода. Хлороформ и дихлорметан могут быть успешно применены для извлечения амитраза и трех его метаболитов из водных растворов меда: R метаболитов амитраза дихлорметаном и хлороформом при $r = 1$ составляет не менее 98% . Данные растворители не извлекают из меда моносахариды, дисахариды и другие сопутствующие компоненты, что позволяет получать экстракты, не требующие дополнительной очистки. Использование дихлорметана предпочтительнее, поскольку он может быть удален уже при температуре окружающей среды вследствие своей низкой температуры кипения.

Установлено, что наиболее приемлемыми для извлечения из проб пищевой продукции пенициллинов является хлороформ; хлорамфеникола – дихлорметан и этилацетат, требующий последующей очистки экстрактов; амитраза – *n*-гексан; для одновременного экстрагирования амитраза и его метаболитов – дихлорметан. Для очистки проб от липидов при определении антимикробных препаратов применим *n*-гексан. Обосновано высаливание сульфатом аммония для извлечения пенициллинов хлороформом и хлорамфеникола дихлорметаном.

В **четвертной главе** изложены методики определения остаточного содержания пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов в пищевой продукции методом ВЭЖХ-МС/МС, разработанные на основе результатов изучения распределения аналитов в экстракционных системах. Пригодность методик подтверждена валидационными исследованиями.

Экстракционная пробоподготовка для определения *пенициллинов* в молоке представлена на рисунке 2. При экстрагировании хлороформом обеспечивают значение концентрации сульфата аммония в водной фазе от 2,2 до 2,7 моль/л,

после добавления хлороформа подкисляют водную фазу до значений pH от 3,0 до 3,6. Данная пробоподготовка применима для молочной продукции с высоким содержанием жира (сливочного масла, спредов) с тем отличием, что образец изначально следует растворить в *n*-гексане. Количественное определение проводят методом внутреннего стандарта с использованием матричных градуировочных растворов. Диапазон измерений каждого из пенициллинов составляет от 2 до 100 мкг/кг, значение максимальной относительной расширенной неопределенности – 29 % (уровень доверия $P = 0,95$; коэффициент охвата $k = 2$).

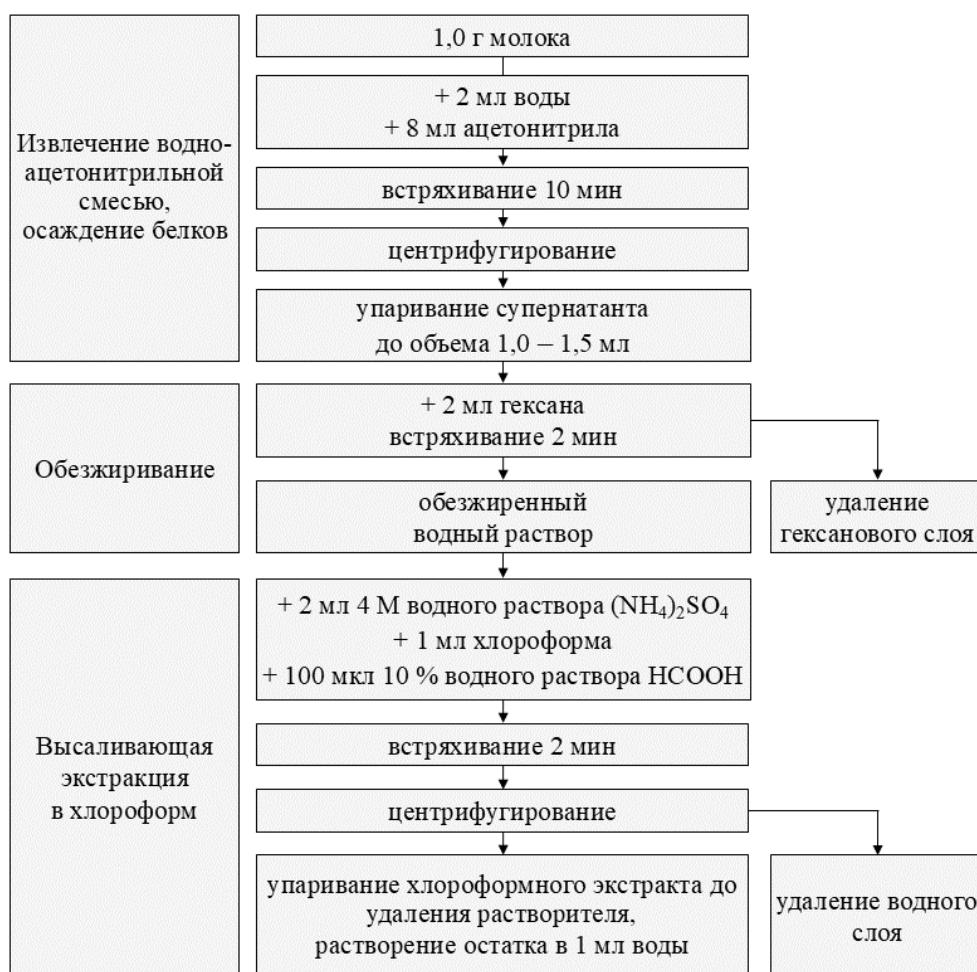


Рисунок 2 – Схема экстракционной пробоподготовки молока для определения пенициллинов

Разработано две методики определения *хлорамфеникола* в молочной и мясной продукции (в молоке, сливках, сухих молочных смесях для питания детей, молочных коктейлях, сырах, свинине, мясных консервах, гематогене и в аналогичных продуктах): методика, основанная на извлечении *хлорамфеникола* этилацетатом, включающая обезжиривание *n*-гексаном и очистку методом ТФЭ на полимерном гидрофобно-гидрофильном сорбенте, и методика, основанная на извлечении дихлорметаном и обезжиривании *n*-гексаном. При извлечении

хлорамфеникола дихлорметаном (рисунок 3) концентрация сульфата аммония в водной фазе должна составлять не менее 3 моль/л. Количественный расчет содержания хлорамфеникола проводят методом внутреннего стандарта с использованием градуировочных растворов в чистом растворителе. Диапазон измерений методик составляет от 0,1 до 1,0 мкг/кг, значение максимальной расширенной неопределенности – 18 % ($P = 0,95$; $k = 2$).

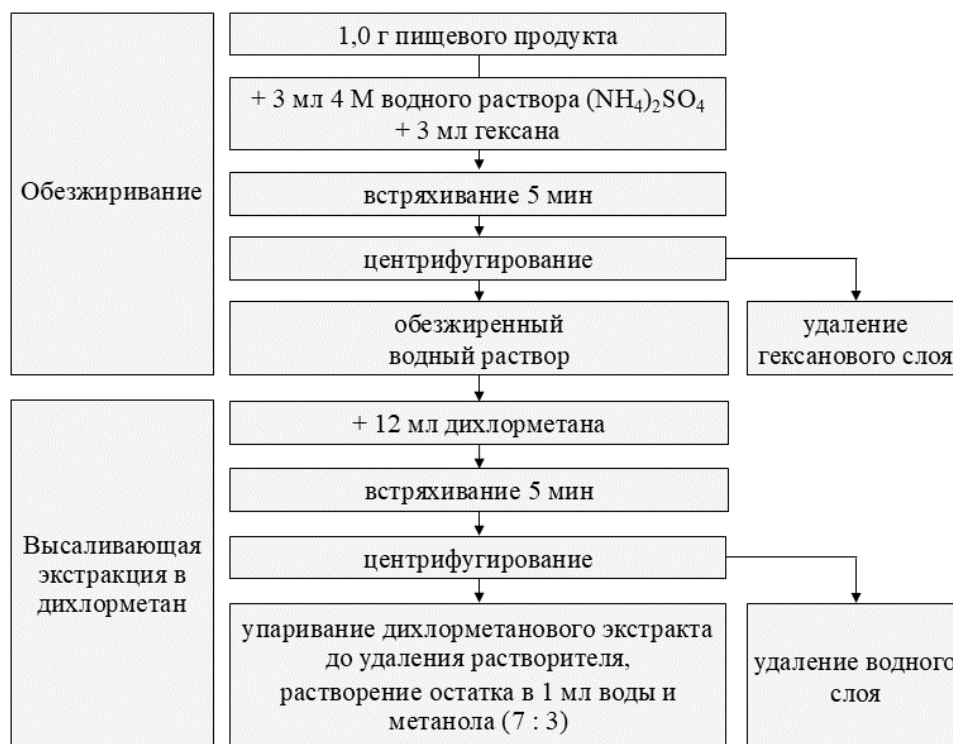


Рисунок 3 – Схема экстракционной пробоподготовки пищевой продукции для определения хлорамфеникола

Методика определения *амитраза* в меде основана на селективном извлечении амитраза из навески меда (рисунок 4), изначально растворенной в водном растворе аммиака во избежание разрушения инсектицида в процессе исследования из-за его нестабильности в водных растворах с низкими значениями pH. В качестве определяющего pH реагента выбран аммиак, поскольку он летуч и не приводит к загрязнению интерфейса ионизации масс-детектора даже при случайном «захвате» водной фазы при отборе органического слоя. Количественное определение проводят методом внутреннего стандарта с использованием градуировочных растворов в чистом растворителе. Диапазон измерений методики составляет от 5 до 250 мкг/кг, максимальная расширенная неопределенность – 16 % ($P = 0,95$; $k = 2$).



Рисунок 4 – Схема экстракционной пробоподготовки меда для определения амитраза

Методика одновременного определения *амитраза и его метаболитов* в меде основана на экстракции дихлорметаном (рисунок 5). Расчет содержания амитраза осуществляют методом внутреннего стандарта или методом абсолютной градуировки, метаболитов – методом абсолютной градуировки; используют матричные градуировочные растворы. Диапазон измерений составляет от 25 до 250 мкг/кг для индивидуального соединения, максимальная расширенная неопределенность – 22 % ($P = 0,95$; $k = 2$).



Рисунок 5 – Схема экстракционной пробоподготовки меда для одновременного определения амитраза и его метаболитов

Разработанные методики высокочувствительны, соответствуют установленным МДУ (значения нижних границ диапазонов измерений меньше МДУ в 2 – 15 раз), позволяют получать достоверные результаты. Значения относительной расширенной неопределенности результатов измерений для всех

разработанных методик значительно меньше (в 1,3 – 5,2 раза) наименьших значений соответствующих межгосударственных стандартов (37 % и 68 % – для пенициллинов, 93 % – для хлорамфеникола, 29 % и 51 % – для амитраза). Предложенные методики просты в исполнении, требуют наличия только доступных реактивов и материалов, отличаются от межгосударственных стандартов отсутствием необходимости использовать импортируемые материалы для пробоподготовки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Впервые экспериментально определены константы распределения пенициллинов кислотного типа (пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина) в экстракционных системах органический растворитель (*n*-гексан, толуол, хлороформ, изоамиловый спирт) – вода, хлорамфеникола в системах органический растворитель (*n*-гексан, толуол, хлороформ, дихлорэтан, дихлорметан, *n*-бутанол, этилацетат) – вода, амитраза и его метаболитов (ДМФФ, ДМФ и ДМА) в экстракционных системах органический растворитель (*n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ) – вода. Установлена сильная зависимость их значений от химического строения аналитов и природы органических растворителей: размах значений констант распределения составляет от 0,6 до 2,3 порядка в зависимости от структуры вещества и от 1,2 до 6,3 порядка в зависимости от природы растворителя. Показано, что для экстракционного выделения из пищевой продукции пенициллинов необходимо использовать хлороформ, хлорамфеникола – дихлорметан, амитраза – *n*-гексан, амитраза и его метаболитов – дихлорметан. Для извлечения пенициллинов и хлорамфеникола обосновано применение высаливания сульфатом аммония. Очистку проб от липидов при определении антибиотиков необходимо осуществлять *n*-гексаном. Для извлечения хлорамфеникола возможно использование этилацетата с последующей очисткой методом ТФЭ. Установленные константы распределения могут быть использованы для прогнозирования экстракции родственных по строению веществ [1–А; 2–А; 5–А; 6–А; 8–А; 10–А; 11–А; 12–А].

2. Экспериментально определены коэффициенты распределения пенициллинов (пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина) в экстракционных системах хлороформ – водные растворы сульфата аммония и константы распределения хлорамфеникола в экстракционных системах дихлорметан – водные растворы сульфата аммония. Установлено, что увеличение концентрации сульфата аммония на 1 моль/л

приводит к росту коэффициентов распределения каждого пенициллина на один порядок, константы распределения хлорамфеникола – более чем в два раза, что позволяет количественно извлечь пенициллины хлороформом и хлорамфеникол дихлорметаном из водных растворов проб пищевой продукции [3–А; 6–А; 10–А].

3. На основе систематического изучения экстракционного процесса разработаны новые методики экстракционно-хроматографического определения остаточного содержания пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов в пищевой продукции животного происхождения, отличающиеся простотой исполнения, не требующие для пробоподготовки импортных расходных материалов, обеспечивающие продление срока службы дорогостоящего ВЭЖХ-МС/МС оборудования. Методика определения пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина и диклоксациллина в молоке основана на экстракции хлороформом, характеризуется диапазоном измерений от 2 до 100 мкг/кг и максимальной относительной расширенной неопределенностью результатов от 25 % до 29 % (уровень доверия 0,95, коэффициент охвата $k = 2$). Предложено определение хлорамфеникола в молочной и мясной продукции, основанное на экстракции дихлорметаном и основанное на экстракции этилацетатом с последующей очисткой методом ТФЭ; диапазон измерений методик составляет от 0,1 до 1,0 мкг/кг, максимальная расширенная неопределенность не превышает 18 %. Методика определения амитраза в меде основана на извлечении *n*-гексаном, характеризуется диапазоном измерений от 5 до 250 мкг/кг и максимальной расширенной неопределенностью от 12 % до 16 %. Методика совместного определения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА в меде основана на экстракции дихлорметаном; диапазон измерений составляет от 25 до 250 мкг/кг, максимальная расширенная неопределенность – от 9 % до 22 %. Работоспособность методик подтверждена валидационными исследованиями. Диапазоны измерений удовлетворяют значениям МДУ, установленные значения расширенной неопределенности свидетельствуют о возможности получения воспроизводимых и достоверных результатов [1–А; 3–А; 4–А; 6–А; 7–А; 9–А; 10–А; 13–А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Разработанные методики определения остаточного содержания пенициллинов, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов используются в республиканском унитарном предприятии «Научно-практический центр гигиены» (далее – государственное предприятие «НПЦГ»). Описание выполнения измерений согласно разработанным методикам приведено в утвержденных стандартных операционных процедурах (СОП) государственного предприятия «НПЦГ»: «СОП 10-04/03/100-2023 Определение массовой доли хлорамфеникола

в сырье животного происхождения и пищевых продуктах с использованием жидкость-жидкостной экстракции дихлорметаном и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием», «СОП 10-04/03/093-2023 Определение массовой доли амитраза в меде натуральном с использованием жидкость-жидкостной экстракции гексаном и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием», «СОП 10-04/03/097-2023 Определение массовой доли амитраза и его метаболитов в меде натуральном с использованием жидкость-жидкостной экстракции дихлорметаном и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

Разработанные методики описаны в рационализаторских предложениях государственного предприятия «НПЦГ»: «Способ подготовки проб при определении остаточных количеств пенициллинов кислотного типа в продуктах с высоким содержанием жира» (№ 2301); «Способ определения массовой доли хлорамфеникола в сырье животного происхождения и пищевых продуктах с использованием жидкость-жидкостной экстракции дихлорметаном» (№ 2340); «Способ определения амитраза в меде натуральном с помощью жидкость-жидкостной экстракции *n*-гексаном и метода ВЭЖХ-МС/МС» (№ 2336); «Способ определения амитраза и его метаболитов в меде натуральном с помощью жидкость-жидкостной экстракции дихлорметаном и метода ВЭЖХ-МС/МС» (№ 2337).

Разработанные методики могут быть применены различными органами и учреждениями, осуществляющими государственный санитарный надзор за безопасностью пищевой продукции и другими заинтересованными организациями.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий

1–А. Методика контроля остаточного содержания хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения / Е. И. Полянских, А. Г. Полоневич, Л. Л. Бельшева, Е. М. Рахманько, С. М. Лещев // Журн. аналит. химии. – 2019. – Т. 74, № 6. – С. 455–463.

A Procedure for the control of the residual chloramphenicol (laevomycetin) in food products of animal origin / E. I. Polyanskikh, A. G. Polonevich, L. L. Belysheva, E. M. Rakhman'ko, S. M. Leshchev // J. of Analytical Chemistry. – 2019. – Vol. 74, № 6. – P. 601–608.

2–А. Экстракция пенициллинов кислотного типа органическими растворителями / А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, Е. И. Полянских, Л. Л. Бельшева // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 284–292.

3–А. Экстракционная пробоподготовка при хроматографическом определении остаточных количеств пенициллинов кислотной природы в молоке // А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, Е. И. Полянских, Л. Л. Бельшева // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 3. – С. 286–293.

4–А. Разработка и валидация методики определения амитраза в меде высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием / А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, О. А. Булгакова, Л. Л. Бельшева // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 387–397.

5–А. Экстракция амитраза и его метаболитов органическими растворителями / А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, О. А. Булгакова, Л. Л. Бельшева // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2023. – Т. 59, № 2. – С. 139–149.

6–А. Экстракция хлорамфеникола органическими растворителями / А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, Е. И. Полянских, Л. Л. Бельшева // Журн. Белорус. гос. ун-та. Химия. – 2023. – № 2. – С. 35–41.

7–А. Разработка и валидация методики определения амитраза и его метаболитов в меде методом ВЭЖХ-МС/МС / А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, О. А. Булгакова, Л. Л. Бельшева // Аналитика и контроль. – 2023. – Т. 27, № 3. – С. 180–191.

Материалы конференций

8–А. Полоневич А. Г. Применение экстракции для определения пенициллинов кислотного типа в пищевой продукции // Ломоносов – 2020 [Электронный ресурс] : материалы XXVII Междунар. молодеж. науч. форума,

Москва, 13–17 апр. 2020 г.; редкол.: И. А. Алешковский [и др.]. – М., 2020. – URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2020/data/section_39_19553.htm (дата обращения: 04.02.2024).

9–А. Полоневич А. Г., Лещев С. М., Бельшева Л. Л. Определение инсектицида амитраз в меде с использованием жидкость-жидкостной экстракции и метода тандемной хромато-масс-спектрометрии // Химия и химическая технология в XXI веке : материалы XXIV Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых им. выдающихся химиков Л. П. Кулева и Н. М. Кижнера, посвящ. 85-летию со дня рожд. проф. А. В. Кравцова, Томск, 15–19 мая 2023 г. : в 2 т. / Нац. исслед. Том. политехн. ун-т. – Томск, 2023. – Т. 1. – С. 451–452.

10–А. Способ эффективного извлечения хлорамфеникола из проб пищевой продукции, основанный на жидкость-жидкостной экстракции / А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, Е. И. Полянских, Л. Л. Бельшева // Здоровье и окружающая среда : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23–24 нояб. 2023 г. / Науч.-практ. центр гигиены ; редкол.: С.И. Сычик [и др.]. – Минск, 2023. – С. 568–569.

11–А. Изучение распределения инсектицида амитраз и его метаболитов в экстракционных системах вода – органический растворитель // А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, О. А. Булгакова, Л. Л. Бельшева // Здоровье и окружающая среда : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23–24 нояб. 2023 г. / Науч.-практ. центр гигиены ; редкол.: С.И. Сычик [и др.]. – Минск, 2023. – С. 567–568.

Тезисы докладов

12–А. Полоневич А. Г. Применение экстракции для определения пенициллинов кислотного типа в пищевой продукции // Молодежь в науке – 2020 : тез. докл. XVII Междунар. конф. молодых ученых, Минск, 22–25 сент. 2020 г. : аграр., биол., гуманитар., мед., физ.-матем., физ.-техн., химия и науки о Земле ; редкол.: В. Г. Гусаков [и др.]. – Минск, 2020. – С. 538–539.

Патенты

13–А. Способ определения остаточных количеств пенициллинов кислотного типа в молоке : пат. ВУ 23216 / А. Г. Полоневич, С. М. Лещев, Е. И. Полянских, Л. Л. Бельшева. – Оpubл. 30.12.2020.

РЕЗЮМЕ

Полоневич Анна Геннадьевна

Экстракционно-хроматографическое определение пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола и амитраза в пищевой продукции

Ключевые слова: жидкость-жидкостная экстракция, пенициллины, хлорамфеникол, амитраз

Цель работы: разработка методик экстракционной пробоподготовки пищевой продукции животного происхождения для определения остаточного содержания пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) на основе систематического изучения экстракции аналитов.

Объекты исследования: пенициллин G, пенициллин V, оксациллин, клоксациллин, нафциллин, диклоксациллин; хлорамфеникол; амитраз и его метаболиты (N-(2,4-диметилфенил)-N'-метилимидоформамид, N-(2,4-диметилфенил)формамид, 2,4-диметиланилин).

Методы исследования: ВЭЖХ-МС/МС.

Полученные результаты и их новизна: впервые получены систематические данные по экстракции 6 пенициллинов кислотного типа, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов в экстракционных системах органический растворитель – водная фаза. В качестве органических экстрагентов пенициллинов использовали *n*-гексан, толуол, хлороформ, изоамиловый спирт; хлорамфеникола – *n*-гексан, толуол, хлороформ, дихлорэтан, дихлорметан, *n*-бутанол, этилацетат; амитраза – *n*-гексан; метаболитов амитраза – *n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ. В качестве водной фазы выступала вода и при изучении экстракции пенициллинов хлороформом и хлорамфеникола дихлорметаном водные растворы сульфата аммония. Разработаны новые простые и эффективные методики экстракционной пробоподготовки пищевой продукции, обеспечивающие достоверное ВЭЖХ-МС/МС определение остаточного содержания изученных веществ.

Рекомендации по использованию: разработанные методики могут быть использованы для контроля содержания пенициллинов, хлорамфеникола, амитраза и его метаболитов в пищевой продукции.

Область применения: аналитическая химия, санитарные службы.

РЭЗІЮМЭ

Паланевіч Ганна Генадзьеўна

Экстракцыйна-храматаграфічнае вызначэнне пеніцылінаў кіслотнага тыпу, хлорамфеніколу і амітразу ў харчовай прадукцыі

Ключавыя словы: вадкасць-вадкасная экстракцыя, пеніцыліны, хлорамфенікол, амітраз

Мэта працы: распрацоўка методык экстракцыйнай пробападрыхтоўкі харчовай прадукцыі жывёльнага паходжання для вызначэння рэшткавага ўтрымання пеніцылінаў кіслотнага тыпу, хлорамфеніколу, амітразу і яго метабалітаў метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі з тандэмным мас-спектраметрычным дэтэктаваннем (ВЭВХ-МС/МС) на падставе сістэматычнага вывучэння экстракцыі аналітаў.

Аб'екты даследвання: пеніцылін G, пеніцылін V, оксацылін, клоксацылін, нафцылін, дыклоксацылін; хлорамфенікол; амітраз і яго метабаліты (N-(2,4-дыметылфеніл)-N'-метылімідафармаід, N-(2,4-дыметылфеніл)фармаід, 2,4-дыметыланілін).

Метады даследвання: ВЭВХ-МС/МС.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню атрыманы сістэматычныя дадзеныя па экстракцыі 6 пеніцылінаў кіслотнага тыпу, хлорамфеніколу, амітразу і яго метабалітаў у экстракцыйных сістэмах арганічны растваральнік – водная фаза. У якасці арганічных экстрагентаў пеніцылінаў выкарыстоўвалі *n*-гексан, талуол, хлараформ, ізаамілавы спірт; хлорамфеніколу – *n*-гексан, талуол, хлараформ, дыхлорэтан, дыхлорметан, *n*-бутанол, этилацэтат; амітразу – *n*-гексан; метабалітаў амітразу – *n*-гексан, талуол, дыхлорметан, хлараформ. У якасці воднай фазы выступала вада і пры вывучэнні экстракцыі пеніцылінаў хлараформам і хлорамфеніколу дыхлорметанам водныя растворы сульфату амонію. Распрацаваны новыя простыя і эфектыўныя методыкі экстракцыйнай пробападрыхтоўкі харчовай прадукцыі, якія забяспечваюць дакладнае вызначэнне рэшткавага ўтрымання вивучаных рэчываў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: распрацаваныя методыкі могуць выкарыстоўваць для кантролю ўтрымання пеніцылінаў, хлорамфеніколу, амітразу і яго метабалітаў у харчовай прадукцыі.

Вобласць ужывання: аналітычная хімія, санітарныя службы.

SUMMARY

Polonevich Anna Gennadjevna

Extraction-chromatographic determination of acid-type penicillins, chloramphenicol and amitraz in food products

Key words: liquid-liquid extraction, penicillins, chloramphenicol, amitraz

Aim of the work: development of methods for extraction sample preparation of food products of animal origin to determine the residual content of acid-type penicillins, chloramphenicol, amitraz and its metabolites by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS) based on a systematic study of analyte extraction.

Research methods: HPLC-MS/MS.

Objects of the research: penicillin G, penicillin V, oxacillin, cloxacillin, nafcillin, dicloxacillin; chloramphenicol; amitraz and its metabolites (N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylimidofornamide, N-(2,4-dimethylphenyl)formamide, 2,4-dimethylaniline).

Obtained results and their novelty: for the first time systematic data of the extraction of 6 acid type penicillins, chloramphenicol, amitraz and its metabolites in several extraction systems were obtained. Organic extractants for penicillins were *n*-hexane, toluene, chloroform and isoamyl alcohol; for chloramphenicol – *n*-hexane, toluene, chloroform, dichloroethane, dichloromethane, *n*-butanol, ethyl acetate; for amitraz – *n*-hexane; for amitraz metabolites – *n*-hexane, toluene, dichloromethane, chloroform. The aqueous phase was water, as well as aqueous ammonium sulfate solutions when studying the extraction of penicillins with chloroform and chloramphenicol with dichloromethane. Based on the scientific data obtained, methods for extraction sample preparation of some types of food products have been developed for trace amounts determination of the studied substances. New simple and effective methods for extraction sample preparation of food products have been developed, ensuring reliable HPLC-MS/MS determination of the residual content of the studied substances.

Recommendations for application: the developed methods can be used to control the content of penicillins, chloramphenicol, amitraz and its metabolites in food products.

Application area: analytical chemistry, sanitary services.



Подписано в печать 31.12.2024. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Цифровая печать. Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,5.
Тираж 60 экз. Заказ 295.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика
в республиканском унитарном предприятии
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.