

На правах рукописи

**КРЕХОВА Фируза Миратовна**

**ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ КАК ЭКСТРАГЕНТЫ  
И СРЕДА ДЛЯ ДЕРИВАТИЗАЦИИ  
В АНАЛИЗЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ  
И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ**

1.4.2. Аналитическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Саратов – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Научный руководитель:** **Булатов Андрей Васильевич**  
доктор химических наук, профессор РАН

**Официальные оппоненты:** **Апери Владимир Владимирович**  
доктор химических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», главный научный сотрудник кафедры аналитической химии

**Маркин Алексей Викторович**  
кандидат химических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», доцент кафедры общей и неорганической химии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань

Защита состоится «25» декабря 2023 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.03, созданного на базе Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ, корп. 1, Институт химии.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке им. В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского (410601, Саратов, ул. Университетская, 42) и на сайте: <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-03/kandidatskaya-dissertaciya-krehovoy-firuziy-miratovny>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор химических наук

Русанова Т.Ю.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В современной аналитической химии особое внимание уделяют разработке новых методов пробоподготовки, обеспечивающих возможность выполнения экспрессного, высокочувствительного и селективного определения целевых аналитов в объектах со сложным составом, к числу которых относят пищевые продукты и биологические жидкости. Как правило, при выполнении молекулярного и вещественного анализа пробоподготовка включает процедуры разделения и концентрирования. Одним из эффективных методов разделения и концентрирования является жидкостная микроэкстракция (ЖМЭ), которая позволяет обеспечить высокую степень концентрирования и скорость установления межфазного равновесия, возможность миниатюризации, автоматизации и экологическую безопасность пробоподготовки. ЖМЭ предполагает массоперенос целевых аналитов из пробы в минимальный объем экстрагента (уровень десятка микролитров), достаточный для последующего анализа. В области развития методов пробоподготовки актуальной задачей является поиск и изучение новых избирательных и экологически безопасных экстракционных систем для ЖМЭ и разработка на их основе способов подготовки объектов сложного состава. К таким растворителям относят (глубокие) эвтектические растворители (ЭР). Они представляют собой смеси доноров и акцепторов водородной связи, при смешивании которых образуются жидкости с более низкими температурами плавления, чем у исходных компонентов. По сравнению с традиционными органическими экстрагентами ЭР имеют такие преимущества как низкая летучесть и нетоксичность, высокая стабильность, возможность получения в лаборатории, регулирование экстракционных свойств при изменении природы прекурсоров и их соотношения.

При выполнении ЖМЭ исходные компоненты проб можно применять в качестве прекурсоров для *in situ* образования ЭР, а сами экстрагенты могут быть средой для дериватизации целевых аналитов. Такие подходы открывают новые возможности для извлечения как неполярных аналитов в гидрофобные ЭР, так и полярных аналитов после их дериватизации. При этом они позволяют сократить время пробоподготовки, расход реагентов, стоимость анализа. Кроме того, повысить эффективность анализа можно при его автоматизации на принципах проточных методов, которые обеспечивают его высокую прецизионность и снижение трудозатрат. Автоматизация ЖМЭ с применением ЭР до наших исследований оставалась практически нерешенной задачей.

**Цель работы** состояла в разработке комплексных подходов для повышения эффективности жидкостной микроэкстракции при анализе объектов со сложным составом, основанных на *in situ* образовании эвтектических растворителей или дериватизации аналитов с участием прекурсоров экстракционных систем.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

– изучить возможность *in situ* образования ЭР для ЖМЭ неполярных анализов при щелочном гидролизе триглицеридов жирных кислот, входящих в состав проб сухого молока и арахисовой пасты, и взаимодействии образующихся жирных кислот с природными терпеноидами;

– для миниатюризации ЖМЭ неполярных анализов показать возможность *in situ* образования ЭР на гидрофобной мембране;

– экспериментально оценить экстрагирующую способность ЭР на основе жирных кислот и природных терпеноидов по отношению к неполярным анализам (полициклическим ароматическим углеводородам (ПАУ) и хлорорганическим пестицидам) и оптимизировать условия их микроэкстракционного выделения из проб сухого молока и арахисовой пасты для последующего хроматографического определения;

– оптимизировать условия хроматографического разделения и детектирования ПАУ и хлорорганических пестицидов для их определения в экстрактах;

– изучить возможность дериватизации полярных анализов (сульфаниламидов и мочевины) при взаимодействии с компонентами ЭР (на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида/ванилина) для ЖМЭ их производных (оснований Шиффа) из объектов сложного состава (моча, сухое молоко);

– оптимизировать условия дериватизации сульфаниламидов и мочевины с участием компонентов ЭР, идентифицировать их производные (основания Шиффа) с помощью метода масс-спектропии;

– разработать гидравлическую схему для автоматизации способа спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче, включающего дериватизацию анализов и микроэкстракцию производных в ЭР;

– выполнить валидацию разработанных способов.

#### **Научная новизна:**

– для ЖМЭ неполярных анализов показана возможность *in situ* образования ЭР в результате щелочного гидролиза триглицеридов жирных кислот, входящих в состав пищевых продуктов, и последующего взаимодействия образующихся жирных кислот с природными терпеноидами;

– реализован способ ЖМЭ неполярных анализов, основанный на *in situ* образовании ЭР на импрегнированной мембране, позволяющий сократить расход прекурсоров и исключить стадию центрифугирования для разделения фаз;

– установлено образование окрашенных оснований Шиффа при взаимодействии сульфаниламидов и мочевины с компонентами ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида/ванилина, которые нашли применение для спектрофотометрического анализа;

– для автоматизированного спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче разработана гидравлическая схема, обеспечивающая

выполнение процедур образования оснований Шиффа и их микроэкстракции в ЭР.

**Практическая значимость** состоит в том, что предложены новые эффективные и экологически безопасные экстракционные системы на основе терпеноидов и жирных кислот природного происхождения; разработаны и валидированы новые способы определения ПАУ и хлорорганических пестицидов, сульфаниламидов и мочевины в пищевых продуктах (сухое молоко, арахисовая паста) и биологических жидкостях (моча) методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД), газовой хроматографии с электронно-захватным детектированием (ГХ-ЭЗД) и спектрофотометрии, включающие микроэкстракционное выделение аналитов в ЭР. Разработан автоматизированный способ спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче. Предложен методический подход для миниатюризации ЖМЭ в ЭР с применением импрегнированных мембран. Разработанные способы могут найти применение для контроля качества пищевых продуктов, а также для определения лекарственных веществ в биологических жидкостях. Полученные результаты представлены в патенте на изобретение (№ 2774814).

**Методология и методы исследований.** Для определения ПАУ в экстрактах использовали метод ВЭЖХ-ФЛД; для определения хлорорганических пестицидов в экстрактах применяли метод ГХ-ЭЗД; сульфаниламиды и мочевины определяли с помощью спектральных методов. Автоматизация микроэкстракционного выделения сульфаниламидов выполнялась на принципах проточного анализа. Для подтверждения образования ЭР применяли методы ИК-спектрометрии с Фурье-преобразованием, газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрии.

**Положения, выносимые на защиту:**

– обоснование возможности *in situ* образования ЭР на основе терпеноидов и жирных кислот, образующихся в результате щелочного гидролиза триглицеридов жирных кислот пищевых продуктов, для повышения экспрессности пробоподготовки, включающей ЖМЭ неполярных аналитов;

– подход миниатюризации ЖМЭ неполярных аналитов в ЭР с применением импрегнированных мембран, обеспечивающий снижение расхода экстрагента;

– способы микроэкстракционного выделения ПАУ и хлорорганических пестицидов из пищевых продуктов в ЭР на основе природных жирных кислот и терпеноидов для их последующего хроматографического определения, обеспечивающий повышение производительности анализа;

– обоснование возможности применения ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида в качестве реагента и экстрагента для дериватизации мочевины и микроэкстракции ее производного;

– способ фотометрического определения мочевины в сухом молоке, основанный на образовании окрашенного производного в среде ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида, обеспечивающий выполнение анализа без дорогостоящего аналитического оборудования;

– обоснование возможности применения ЭР на основе тимола и ванилина для дериватизации сульфаниламидов (сульфапиридина, сульфаметоксазола, сульфаметазина) и микроэкстракции их производных (оснований Шиффа);

– автоматизированный способ спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче, предполагающий образование оснований Шиффа и их микроэкстракцию в ЭР на основе ванилина и тимола, обеспечивающий снижение трудозатрат и повышение экологической безопасности процедур пробоподготовки;

– результаты валидации разработанных способов и подтверждение их аналитических возможностей при анализе реальных объектов.

#### **Степень достоверности и апробация результатов работы.**

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов ВЭЖХ-ФЛД, ГХ-ЭЗД, ГХ-МС, ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием, ДСК, ЯМР, масс-спектрометрии, обработкой полученных результатов исследований методами математической статистики. Правильность полученных результатов подтверждалась методом «введено-найдено» и независимыми методами. Результаты работы и основные положения диссертации были представлены и обсуждены на следующих конференциях: «Science SPbU-2020» (Санкт-Петербург, 2020), «Ломоносов-2021» (Москва, 2021), «Mendeleev-2021» (Санкт-Петербург, 2021), «Science SPbU-2021» (Санкт-Петербург, 2021), «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2021), «Молодая Фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2022), «Ломоносов-2022» (Москва, 2022), «IV Съезд аналитиков России» (Москва, 2022), «XXVI Всероссийская конференция молодых ученых-химиков» (Нижний Новгород, 2023).

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 1.4.2 – аналитическая химия по областям исследований: методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.); теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии; методы маскирования, разделения и концентрирования; анализ пищевых продуктов.

**Гранты.** Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (21-13-00020, 20-73-00043, 22-73-10039).

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 12 печатных изданиях, включая 3 статьи (Q1) в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, РИНЦ), а также 9 тезисов докладов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 205 источников. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирована 66 рисунками и 19 таблицами.

**Личный вклад автора** состоит в обсуждении цели и задач исследования, выборе и обосновании методик эксперимента, непосредственном его проведении, в участии во всех процедурах анализа. Автор активно участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, установлении закономерностей и формулировке выводов, написании статей и заявке на патент, подготовке и представлении докладов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** аргументируется актуальность работы в области разработки способов ЖМЭ и эффективных экстракционных систем на принципах образования ЭР. Формулируются цель и задачи исследования.

### Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлен обзор литературы, в котором обсуждаются современные достижения в области развития ЖМЭ и возможности ее применения для анализа объектов со сложным составом. Рассматриваются подходы для автоматизации микроэкстракции. Представлена общая характеристика ЭР, их применение в качестве экстрагентов и среды для дериватизации определяемых веществ. В заключении обосновывается актуальность разработки новых способов ЖМЭ, основанных на *in situ* образовании ЭР или дериватизации аналитов с участием прекурсоров экстракционных систем для анализа пищевых продуктов и биологических жидкостей.

### Глава 2. Методика экспериментальных исследований

Во второй главе приведено описание объектов анализа (сухое молоко, арахисовая паста, моча), средств измерения и методик проведения экспериментов, оборудования, стандартных образцов, реактивов и материалов, применяющихся в работе. Описаны процедуры приготовления растворов реагентов, аналитов и ЭР, схемы пробоотбора и предварительной подготовки проб пищевых продуктов и биологических жидкостей, обработка результатов измерений и оценка метрологических характеристик разработанных способов анализа.

### Глава 3. Обсуждение результатов

*In situ* образование ЭР для ЖМЭ неполярных аналитов. Такие растворители, как правило, получают при нагревании смеси двух прекурсоров: донора и акцептора водородной связи. В качестве акцепторов водородной связи могут выступать природные терпеноиды, а в качестве доноров – высшие карбоновые (жирные) кислоты. Жирные кислоты, входящие в состав многих пищевых продуктов, могут рассматриваться в качестве потенциальных прекурсоров ЭР. В данном исследовании для ЖМЭ неполярных аналитов была изучена и обоснована возможность *in situ* образования ЭР в процессе пробоподготовки при щелочном гидролизе триглицеридов, входящих в состав пищевых продуктов. Аналитические возможности способа были показаны в настоящей работе при определении неполярных аналитов – ПАУ (антрацен, бенз[*a*]антрацен, бензо[*ghi*]перилен, бенз[*a*]пирен, бензо[*b*]флуорантен, бензо[*k*]флуорантен, дибенз[*a,h*]антрацен, нафталин, пирен, фенантрен, флуорантен, флуорен, хризен) (log P 3,3-6,6) в сухом молоке методом ВЭЖХ-ФЛД.

Первый этап пробоподготовки включал щелочной гидролиз триглицеридов жирных кислот. В присутствии избытка щелочи при нагревании наблюдалось образование водорастворимых солей высших карбоновых кислот. При подкислении водной фазы происходило выделение гидрофобных карбоновых кислот, которые в присутствии терпеноидов образовывали новую фазу ЭР.

Для доказательства образования ЭР проводили пробоподготовку сухого молока (содержание жиров – 26 %) с добавкой ПАУ. В качестве акцепторов водородной связи были изучены терпеноиды – тимол и ментол. Во всех случаях выделялась органическая фаза. Однако предварительно было установлено, что тимол оказывает мешающее влияние на ВЭЖХ-ФЛД определение нафталина (коалюция пиков на хроматограмме). Поэтому в качестве акцептора водородной связи для образования ЭР был выбран ментол. Методом ГХ-МС установлено, что в фазе ЭР присутствуют ментол, а также гексановая, додекановая, тетрадекановая, пентадекановая, цис-9-октаценовая и октадекановая кислоты, которые типично входят в состав молочных жиров. Температура плавления органической фазы (–8 °С) была существенно меньше, чем температура плавления исходных прекурсоров (ментол (38 °С), жирные кислоты (43 °С-69 °С)). Для подтверждения образования водородной связи между донорами и акцептором водородной связи были получены ИК-Фурье и 1H-1H NOESY ЯМР-спектры ментола, жирных кислот, выделенных из сухого молока и ЭР на их основе. На ИК-Фурье спектре ментола наблюдался пик, соответствующий частоте валентного колебания гидроксильной группы, при 3264 см<sup>-1</sup>, а в ИК-Фурье спектре жирных кислот пик валентного колебания гидроксильной группы в карбоксильной группе находился при 3471 см<sup>-1</sup>. В спектре ЭР пик валентного колебания гидроксильной группы наблюдался при 3382 см<sup>-1</sup> и был шире. Также в спектре ЭР пик, соответствующий частоте

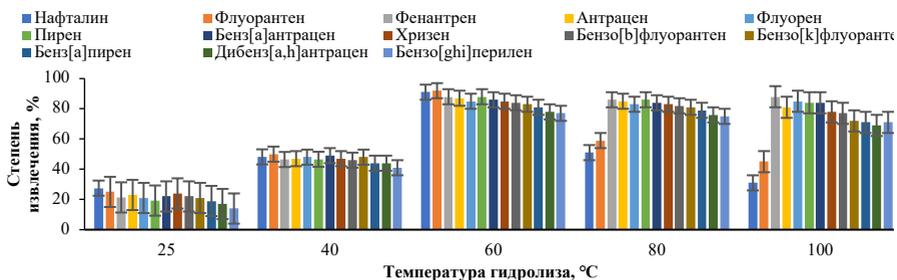
валентного колебания карбонильной группы в карбоксильных группах жирных кислот смещался от 1711 до 1716 см<sup>-1</sup>. В 1H-1H NOESY ЯМР-спектре ЭР присутствовал кросс-пик (4,26; 11,94 м.д.), обусловленный взаимодействием протонов карбоксильных групп жирных кислот (11,94 м.д.) и протона гидроксильной группы ментола (4,26 м.д.), что подтверждало образование водородных связей между компонентами.

С целью выбора условий микроэкстракционного выделения ПАУ из сухого молока было исследовано влияние массы пробы и ментола, концентрации щелочи, температуры и времени щелочного гидролиза на степени извлечения аналитов.

При увеличении массы пробы возрастало содержание жирных кислот в экстракционной системе, как следствие возрастал объем фазы экстракта и наблюдался нежелательный эффект разбавления. При массе пробы меньше 100 мг наблюдалась низкая прецизионность. Минимальные значения относительного среднего квадратического отклонения (ОСКО) (4-7 %) и максимальные значения степени извлечения (70-91 %) были достигнуты при гидролизе 100 мг сухого молока (содержание жиров – 26%).

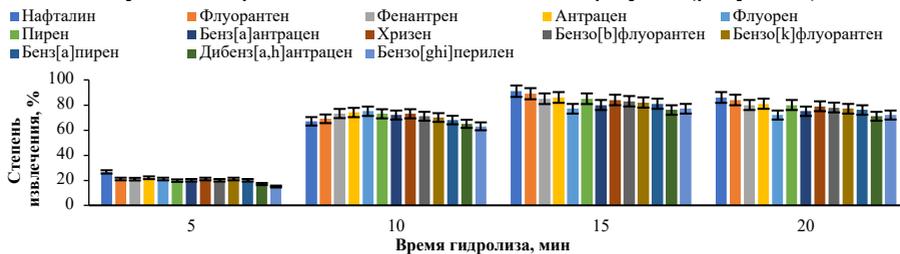
Проведение гидролиза в сильнощелочном растворе может приводить к образованию сложной смеси продуктов разложения белков, способных удерживать ПАУ. Поэтому было изучено влияние концентрации NaOH на выделение аналитов из проб сухого молока. Концентрация NaOH – 3 моль/л обеспечила эффективный гидролиз триглицеридов и удовлетворительное извлечение аналитов (более 70 %) со значениями ОСКО 5-10 %.

Гидролиз жиров проводят при нагревании, однако в таких условиях возможна потеря ПАУ. При изучении влияния температуры установлено, что максимальные степени извлечения достигаются при температуре гидролиза 60 °С (рисунок 1). При дальнейшем повышении температуры наблюдалась потеря нафталина и флуорантена.



**Рисунок 1** – Влияние температуры гидролиза на эффективность микроэкстракции ПАУ (масса пробы – 100 мг, C<sub>NaOH</sub> – 3 моль/л, V<sub>NaOH</sub> – 2,5 мл, время гидролиза – 20 мин, масса ментола – 500 мг, C<sub>аналитов</sub> = 100 мкг/кг, n=3)

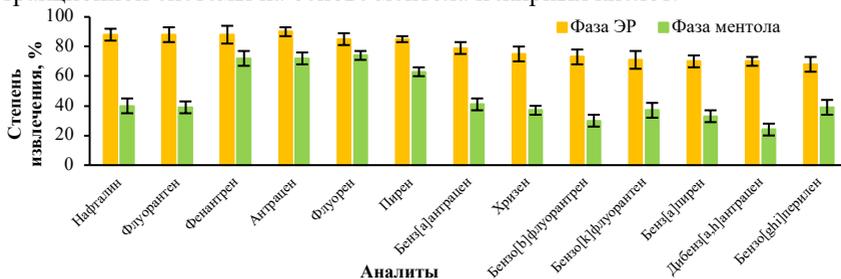
С целью сокращения времени пробоподготовки было изучено влияние времени гидролиза при выбранной температуре. 15 мин было достаточно для достижения удовлетворительного выделения ПАУ в фазу ЭР (рисунок 2).



**Рисунок 2** – Влияние времени гидролиза на эффективность микроэкстракции ПАУ (масса пробы – 100 мг,  $C_{NaOH}$  – 3 моль/л,  $V_{NaOH}$  – 2,5 мл, температура гидролиза – 60 °С, масса ментола – 500 мг,  $C_{аналитов}$  – 100 мкг/кг, n=3)

При выборе массы ментола учитывались следующие критерии: минимальный расход прекурсора, возможность отбора фазы экстракта. При введении 50 мг ментола наблюдалось образование фазы в виде пленки, которую не удалось отобрать. Масса ментола 100 мг обеспечивала достижение перечисленных выше требований.

Для сравнения экстрагирующей способности ЭР с его прекурсором (ментолом) выполняли выделение ПАУ из сухого молока, содержащего триглицериды (26 %), а также из обезжиренного сухого молока. В последнем случае экстракция анализов происходила в фазу ментола, поскольку проба не содержала жиры. Было показано (рисунок 3), что ЭР обеспечивал более эффективную экстракцию по сравнению с ментолом. Степени извлечения ПАУ в фазу ментола составили 24-74 %, в фазу ЭР – 71-91 %. Эта закономерность может быть объяснена наличием выраженного синергетического эффекта для экстракционной системы на основе ментола и жирных кислот.



**Рисунок 3** – Влияние состава экстракционной системы на эффективность микроэкстракции ПАУ (масса пробы – 100 мг,  $C_{NaOH}$  – 3 моль/л,  $V_{NaOH}$  – 2,5 мл, температура гидролиза – 60 °С, время гидролиза – 15 мин, масса ментола – 100 мг,  $C_{аналитов}$  – 100 мкг/кг, n=3)

Для валидации разработанного способа ВЭЖХ-ФЛД определения ПАУ в сухом молоке были установлены диапазоны определяемых концентраций (ДОК), пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) и определения ( $10\sigma$ ), характеристики прецизионности (таблица 1). Метрологическая прослеживаемость обеспечивалась применением стандартного образца состава раствора ПАУ при построении градуировочных зависимостей. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. Достигнутые пределы обнаружения (0,002-0,03 мкг/кг) позволяют выполнять определение ПАУ в сухом молоке ниже ПДК (1 мкг/кг), установленного техническим регламентом Таможенного Союза (ТРТС 021/2011). Различие пределов обнаружения связано с разной способностью аналитов к флуоресценции при их определении методом ВЭЖХ-ФЛД. Время пробоподготовки не превышает 20 мин, а время хроматографического анализа экстракта – 40 мин. Для одновременного выделения и концентрирования аналитов требуется 100 мкл прекурсора ЭР (ментола). Так, для определения ПАУ в пищевых продуктах в соответствии с национальным стандартом ГОСТ 31745-2012 выполняют щелочной гидролиз в течение 3 ч, фильтрацию раствора пробы и экстракцию целевых аналитов в *n*-гексан (90 мл на один анализ). Разработанный способ позволил увеличить экспрессность анализа (с 3 ч до 20 мин), исключить большой расход органических растворителей на стадии пробоподготовки.

**Таблица 1** – Аналитические характеристики способа ВЭЖХ-ФЛД определения ПАУ в сухом молоке

Аналиты	Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг	R <sup>2</sup>	Предел обнаружения (3σ), мкг/кг	Предел определения (10σ), мкг/кг	Повторяемость (ОСКО, n=3), % (C = C <sub>мин</sub> */1 мкг/кг)	Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, n=3), % (C = C <sub>мин</sub> */1 мкг/кг)
Нафталин	0,01-100	0,9985	0,003	0,01	9/5	11/6
Флуорантен	0,01-100	0,9952	0,003	0,01	8/5	14/8
Фенантрин	0,01-100	0,9962	0,003	0,01	9/5	13/8
Антрацен	0,005-100	0,9967	0,002	0,005	9/5	14/8
Флуорен	0,1-100	0,9955	0,03	0,1	8/5	11/6
Пирен	0,005-100	0,9996	0,002	0,005	5/3	14/8
Бенз[а]антрацен	0,01-100	0,9985	0,003	0,01	6/4	13/7
Хризен	0,01-100	0,9979	0,003	0,01	9/5	13/7
Бензо[б]флуорантен	0,05-100	0,9979	0,02	0,05	8/5	13/7
Бензо[к]флуорантен	0,005-100	0,9984	0,002	0,005	5/3	14/8
Бенз[а]пирен	0,01-100	0,9979	0,003	0,01	9/5	12/10
Дибенз[а, h]антрацен	0,05-100	0,9993	0,02	0,05	9/5	12/9
Бензо[ghi]перилен	0,05-100	0,9992	0,02	0,05	5/3	9/5

\* C<sub>мин</sub> – нижняя граница диапазона определяемых концентраций.

Разработанный способ был использован для определения ПАУ в пробах сухого молока. Во всех пробах ПАУ не были обнаружены. Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» и выполнили определение ПАУ независимым методом. Для всех проб установленное относительное смещение было незначимым и не превышало 13 % (таблица 2). Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов. Установленные F-значения ≤ 19,00 указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения ≤ 2,78 указывают

на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами.

**Таблица 2** – Результаты определения ПАУ в сухом молоке (n=3, P=0,95, F<sub>кр</sub> = 19,00, t<sub>кр</sub> = 2,78)

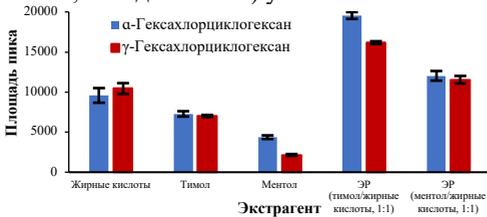
Аналиты	Сухое молоко (проба 1)						Сухое молоко (проба 2)					
	Введено, мкг/кг	Найдено ВЭЖХ-ФД, мкг/кг	Найдено ГХ-МС, мкг/кг	F-тест	t-тест	Относительное смещение, %	Введено, мкг/кг	Найдено ВЭЖХ-ФД, мкг/кг	Найдено ГХ-МС, мкг/кг	F-тест	t-тест	Относительное смещение, %
Нафталин	1	0,89±0,04	0,88±0,03	1,02	0,69	11	100	88±6	83±6	1,05	2,51	12
Флуорантен	1	0,92±0,05	0,94±0,04	1,04	0,66	8	100	88±6	93±6	1,16	2,64	12
Фенантрен	1	0,98±0,05	0,97±0,05	1,02	0,63	2	100	88±6	92±5	1,09	2,72	12
Антрацен	1	0,89±0,04	1,02±0,05	1,70	2,72	11	100	112±6	107±6	1,15	2,63	12
Флуорен	1	1,02±0,05	0,98±0,06	1,83	2,45	2	100	105±5	101±5	1,08	2,37	5
Пирен	1	1,01±0,06	0,98±0,04	1,66	2,39	1	100	99±3	95±7	5,01	2,38	1
Бенз[а]антрацен	1	0,96±0,04	0,95±0,04	1,95	0,71	4	100	95±4	96±4	1,02	0,80	5
Хризен	1	0,98±0,05	0,96±0,04	1,87	1,26	2	100	96±5	92±6	1,56	2,25	4
Бензо[б]флуорантен	1	1,02±0,05	0,95±0,05	1,96	2,02	2	100	87±4	91±5	2,50	2,48	13
Бензо[к]флуорантен	1	1,01±0,06	0,98±0,03	1,78	2,23	1	100	89±3	92±5	2,97	2,44	11
Бенз[а]пирен	1	0,91±0,05	0,96±0,05	2,03	2,63	9	100	91±5	87±4	1,09	2,75	9
Дибенз[а, h]антрацен	1	0,91±0,05	0,92±0,05	1,92	0,67	9	100	95±5	91±6	3,03	2,26	5
Бензо[ghi]перилен	1	0,87±0,03	0,86±0,04	1,92	0,86	13	100	95±3	93±5	2,66	1,59	5

Таким образом, показано, что жирные кислоты, образующиеся при щелочном гидролизе триглицеридов, могут выступать в качестве прекурсоров для *in situ* образования ЭР и ЖМЭ неполярных аналитов. В разработанном способе для образования экстракционного растворителя требуется добавление только одного прекурсора (терпеноида). Новый способ открывает возможность выполнять ЖМЭ устойчивых к щелочному гидролизу неполярных аналитов из сложных матриц пищевых продуктов с высоким содержанием жиров без предварительного удаления последних.

**Образование ЭР на мембране для ЖМЭ неполярных аналитов.** ЖМЭ с применением мембран позволяет сократить расход экстрагентов (миниатюризация). Для миниатюризации ЖМЭ неполярных аналитов в ЭР был разработан методический прием с применением импрегнированных мембран. В этом случае терпеноид как акцептор водородной связи для образования ЭР предварительно наносили на гидрофобную мембрану. В процессе щелочного гидролиза триглицеридов жирных кислот и изменения кислотности водной фазы происходило выделение высших карбоновых кислот, которые удерживались на импрегнированной мембране за счет образования ЭР. Предложенный способ был применен для микроэкстракционного выделения неполярных аналитов – хлорорганических пестицидов ( $\alpha$ -гексахлорциклогексан ( $\alpha$ -ГХЦГ),  $\gamma$ -гексахлорциклогексан ( $\gamma$ -ГХЦГ)) из арахисовой пасты.

Предварительно проводили оценку экстрагирующей способности терпеноидов (тимол и ментол), жирных кислот (выделенных из арахисовой пасты) и ЭР (ментол/тимол–жирные кислоты) по отношению к аналитам без применения мембран. Для получения жирных кислот пробу арахисовой пасты растворяли в *n*-гексане, экстракт отделяли, упаривали растворитель и

подвергали полученную фазу жиров щелочному гидролизу. Предварительно состав фаз жирных кислот (гексадекановая, октадека-9,12-диеновая, октадек-9-еновая, октадекановая) устанавливали методом ГХ-МС.



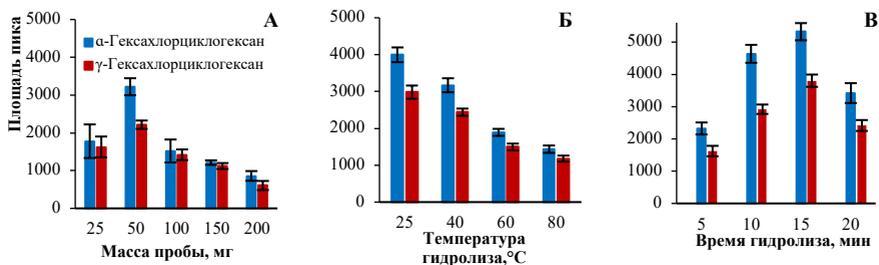
**Рисунок 4** – Влияние состава экстрагента на аналитический сигнал при определении хлорорганических пестицидов ( $C_{\text{аналитов}} = 0,1$  мг/л, соотношение фаз – 1:1,  $n=3$ )

(logP 3,2), что обеспечивает более высокое сродство пестицидов (logP 3,8) к ЭР на основе тимола. Максимальный синергетический эффект наблюдался при соотношении акцептора (тимол) и доноров (жирные кислоты) водородной связи в фазе экстрагента 1:1.

С целью выбора условий микроэкстракционного выделения хлорорганических пестицидов из арахисовой пасты изучено влияние массы пробы и ментола, концентрации щелочи, температуры и времени щелочного гидролиза.

Триглицериды являются макрокомпонентами матрицы арахисовой пасты (содержание до 50 %). В этом случае масса пробы будет влиять на количество выделяемых жирных кислот, соотношение компонентов в фазе экстрагента и степень извлечения аналитов. Массу пробы варьировали от 25 до 200 мг. После щелочного гидролиза при 25 °С в течение 20 мин смесь подкисляли и выполняли ЖМЭ на импрегнированной мембране. После элюирования аналитов *n*-гексаном определяли их содержание методом ГХ-ЭЗД. Масса пробы 50 мг обеспечивает наибольшую степень извлечения аналитов (рисунок 5А). В этих условиях происходило образование ЭР с соотношением тимол : жирные кислоты 1:1. Щелочной гидролиз обычно проводят при нагревании, однако в таких условиях возможно разложение пестицидов. Экспериментально было показано, что концентрация раствора NaOH больше 0,5 моль/л обеспечивала полноту гидролиза жиров при массе пробы 50 мг. Влияние температуры гидролиза изучали в диапазоне от 25 °С до 80 °С при времени гидролиза 20 мин. Повышение температуры приводило к значительному снижению аналитических сигналов (рисунок 5Б) из-за разложения аналитов в щелочной среде при нагревании. Выдерживание реакционной смеси в течение 15 мин при нормальных условиях обеспечивало максимальные аналитические сигналы (рисунок 5В).

Из полученных результатов (рисунок 4) следует, что исходные прекурсоры не обеспечивают эффективное извлечение аналитов. Максимальные степени извлечения пестицидов наблюдались в случае ЭР на основе тимола и жирных кислот. Эта закономерность может быть объяснена более высокой гидрофобностью тимола (logP 3,3) по сравнению с ментолом



**Рисунок 5** – Влияние массы пробы ( $C_{\text{NaOH}} = 1$  моль/л,  $V_{\text{NaOH}} = 1$  мл, температура гидролиза – 25 °С, время гидролиза – 20 мин) (**А**); температуры (масса пробы – 50 мг,  $C_{\text{NaOH}} = 1$  моль/л,  $V_{\text{NaOH}} = 1$  мл, время гидролиза – 20 мин) (**Б**); и времени гидролиза (масса пробы – 50 мг,  $C_{\text{NaOH}} = 1$  моль/л,  $V_{\text{NaOH}} = 1$  мл, температура гидролиза – 25 °С) (**В**) на аналитический сигнал при определении хлорорганических пестицидов в экстрактах ( $C_{\text{аналитов}} = 0,05$  мг/кг,  $n=3$ )

В соответствии с национальным стандартом ГОСТ 32689.2-2014 способ подготовки проб пищевых продуктов для определения в них пестицидов включает стадию жидкостной экстракции (100 мл на один анализ) с последующей очисткой экстракта методом твердофазной экстракции. Разработанный способ позволяет сократить большой расход органических растворителей, исключить дополнительные стадии очистки экстрактов, как следствие уменьшить время пробоподготовки (до 20 мин).

Для построения градуировочной зависимости использовали растворы пестицидов, приготовленные разбавлением стандартных образцов состава раствора  $\alpha$ -гексахлорциклогексана и  $\gamma$ -гексахлорциклогексана. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. Высокие степени извлечения пестицидов в ЭР (более 95 %) позволили добиться низких пределов обнаружения для их определения ниже ПДК (0,5 мг/кг, ГН 1.2.1323-03). Микроэкстракция на импрегнированную мембрану позволила сократить расход тимола для образования ЭР (до 25 мг).

**Таблица 3** – Аналитические характеристики способа ГХ-ЭЗД определения хлорорганических пестицидов в арахисовой пасте

Параметр	Значения	
	$\alpha$ -Гексахлорциклогексан	$\gamma$ -Гексахлорциклогексан
Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	1-1000	1-1000
$R^2$	0,9966	0,9994
Предел обнаружения ( $3\sigma$ ), мг/кг	0,3	0,3
Предел определения ( $10\sigma$ ), мг/кг	1	1
Повторяемость (ОСКО, $n=3$ ), % ( $C = 1$ и 500 мг/кг)	6/3	9/5
Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, $n=3$ ), % ( $C = 1$ и 500 мг/кг)	13/7	12/7

Аналитические возможности разработанного способа были показаны при определении  $\alpha$ -гексахлорциклогексана и  $\gamma$ -гексахлорциклогексана в пробах арахисовой пасты. Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено». Установленное относительное смещение не превышает 12 % (таблица 4). Наблюдаемое смещение является незначимым для такого уровня концентраций аналитов. Полученные результаты сравнивали с помощью t-теста: t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами.

**Таблица 4** – Результаты определения пестицидов в арахисовой пасте (n=3, P=0,95,  $t_{кр} = 2,78$ )

Аналит	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	Относительное смещение, %	t-тест
$\alpha$ -ГХЦГ	0	<ПО	-	-
$\gamma$ -ГХЦГ	0	<ПО	-	-
$\alpha$ -ГХЦГ	25,0	28,0 $\pm$ 3,0	12	2,58
$\gamma$ -ГХЦГ	25,0	22,0 $\pm$ 3,0	12	2,58

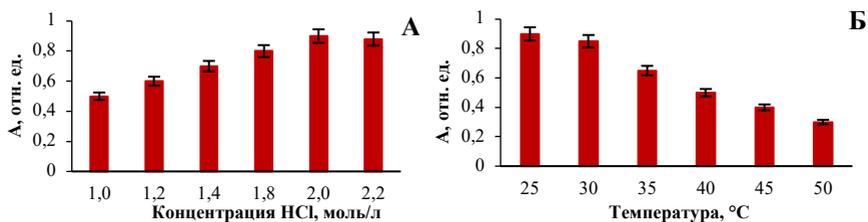
**ЭР как среда для дериватизации в ЖМЭ полярных аналитов.** ЭР, выступая в качестве эффективных экстрагентов, могут применяться также в качестве среды для дериватизации. В методах ЖМЭ дериватизацию полярных аналитов выполняют для получения неполярных производных, имеющих высокое сродство к фазе экстрагента. При этом могут быть реализованы два подхода. Первый подход предполагает растворение реагирующих веществ в фазе ЭР. Второй подход основан на непосредственном участии компонентов ЭР в дериватизации в качестве реагентов.

В данной работе был впервые реализован способ, основанный на непосредственном участии компонентов ЭР в дериватизации полярных аналитов в качестве реагентов. Был предложен новый ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида. Установлено, что 4-(диметиламино)бензальдегид может выступать в качестве акцептора водородной связи для образования гидрофобного ЭР с тимолом. При этом 4-(диметиламино)бензальдегид может вступать в реакцию с соединениями, содержащими аминогруппу ( $-NH_2$ ), с образованием гидрофобных оснований Шиффа, извлекаемых в фазу ЭР.

Для подтверждения образования ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида (1:1) применяли методы термогравиметрии, ДСК и ЯМР. Полученные данные позволили сделать вывод, что ЭР имеет температуру фазового перехода  $-65$  °С. В ЯМР-спектре ЭР было обнаружено смещение сигнала гидроксильной группы тимола в область слабого поля по сравнению с ее сигналом в спектре тимола (с 4,72 до 6,90 м.д.), при этом сигнал метильных групп третичной аминогруппы 4-(диметиламино)бензальдегида не менял своего положения, что позволяет сделать вывод об образовании водородной связи между гидроксильной группой тимола и альдегидной группой 4-(диметиламино)бензальдегида.

Полученный ЭР использовали для дериватизации мочевины и извлечения основания Шиффа для последующего спектрофотометрического определения аналита в сухом молоке. Мочевина содержит аминогруппу ( $-\text{NH}_2$ ) и может образовывать в кислой среде основания Шиффа. В свою очередь, 4-(диметиламино)бензальдегид содержит альдегидную группу, что позволяет ему, с одной стороны, образовывать основание Шиффа с мочевиной, с другой стороны, образовывать гидрофобный ЭР с тимолом (акцептор водородной связи). При встряхивании подкисленного раствора мочевины с ЭР происходило окрашивание органической фазы. При этом максимум в спектре поглощения наблюдался при 450 нм.

Образование основания Шиффа происходит в кислой среде, поэтому было изучено влияние концентрации соляной кислоты на оптическую плотность экстракта. При увеличении концентрации соляной кислоты до 2,0 моль/л увеличивалась оптическая плотность экстракта (рисунок 6А). В этих условиях для достижения полноты дериватизации требуется перемешивание фаз в течение 1 мин при температуре  $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$  (рисунок 6Б).



**Рисунок 6** – Влияние концентрации соляной кислоты (температура –  $25^\circ\text{C}$ ) (А) и температуры ( $C_{\text{HCl}} = 2,0$  моль/л) (Б) на оптическую плотность экстракта (соотношение фаз 1:50, время – 1 мин,  $C_{\text{аналита}} = 250$  мг/кг,  $n=3$ )

Белки являются макрокомпонентами матрицы сухого молока (содержание достигает 35 %), содержат аминогруппы и оказывают мешающее влияние на определение мочевины. Для осаждения белков в водную фазу вводили сульфат аммония. Концентрацию электролита варьировали в диапазоне от 5 до 25 %. Для исследования мешающего влияния белков использовали восстановленное молоко (холостая проба) без мочевины. Установлено, что при введении сульфата аммония с концентрацией 20 % оптическая плотность экстракта холостой пробы является незначимой.

Результаты валидации разработанного способа представлены в таблице 5. ДОК мочевины в сухом молоке составил от 6 до 100 мг/кг. Пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) и определения ( $10\sigma$ ) составили 2 и 6 мкг/кг соответственно. Достиженная степень извлечения составила 95 %, коэффициент концентрирования – 23. Для оценки прецизионности рассчитывали ОСКО. Значения ОСКО в условиях повторяемости составили 4-7 %, в условиях внутрилабораторной воспроизводимости – 7-12 %.

**Таблица 5** – Аналитические характеристики спектрофотометрического способа определения мочевины в сухом молоке

Параметр	Значения
Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	6-100
$R^2$	0,9991
Предел обнаружения ( $3\sigma$ ), мг/кг	2
Предел определения ( $10\sigma$ ), мг/кг	6
Степень извлечения, %	95
Коэффициент концентрирования	23
Повторяемость (ОСКО, $n=3$ ), % ( $C = 10/50$ мг/кг)	7/4
Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, $n=3$ ), % ( $C = 10/50$ мг/кг)	12/7

Для подтверждения аналитических возможностей способа было проведено определение мочевины в пробах сухого молока различных производителей (таблица 6). Правильность результатов подтверждали методом «введено-найденно» и независимым методом (ВЭЖХ-УФ). Установленное смещение для всех проб не превышало 10 %. Мочевина была обнаружена во всех пробах сухого молока. Содержание мочевины в восстановленном молоке не превышало естественного уровня (150-300 мг/л). Полученные F-значения  $\leq 19,00$  (Таблица 6) указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами. Для оценки правильности результатов использовали сертифицированный стандартный образец состава и свойств сухого молока (ГСО 10891-2017,  $C_{\text{мочевины}} = 50$  мг/кг). Полученное t-значение (1,34)  $< t_{\text{кр}}$  показало отсутствие существенного различия между аттестованным и найденным значениями.

**Таблица 6** – Результаты определения мочевины в сухом молоке ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ,  $F_{\text{кр}} = 19,00$ ,  $t_{\text{кр}} = 2,78$ )

Образец	Введено, мг/кг	Найдено, мг/кг		F-критерий	t-критерий	Относительное смещение, %
		Разработанный способ	Независимый метод (ВЭЖХ-УФ)			
Сухое молоко (проба 1)	0	31,2 $\pm$ 1,2	32,0 $\pm$ 2,0	2,37	1,51	-
	10	42,0 $\pm$ 1,7	41,9 $\pm$ 2,5	2,26	0,14	8
Сухое молоко (проба 2)	0	54,0 $\pm$ 2,2	53 $\pm$ 3	2,17	1,12	-
	10	63,0 $\pm$ 2,5	63 $\pm$ 4	2,22	0,38	10
Сухое молоко (проба 3)	0	22,4 $\pm$ 0,9	23,4 $\pm$ 1,4	2,46	2,60	-
	10	32,0 $\pm$ 1,3	33,2 $\pm$ 2,0	2,42	2,19	0
Сертифицированный стандартный образец состава и свойств сухого молока	50 <sup>1</sup>	50,5 $\pm$ 2,0	50 $\pm$ 3	2,21	0,48	-

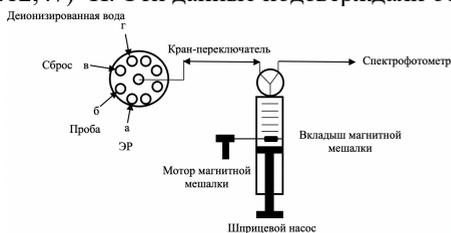
<sup>1</sup> – аттестованное значение массовой доли мочевины (мг/кг)

**Автоматизация дериватизации и ЖМЭ.** Автоматизация позволяет сократить трудозатраты при выполнении анализа и повысить прецизионность. В данной работе для автоматизации дериватизации и ЖМЭ полярных аналитов (сульфаниламидов,  $\log P$  0,4-0,9) в ЭР была разработана гидравлическая схема на принципах проточного метода. Способ нашел применение для

спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче (раздельное определение), которые имеют высокое сродство к водной фазе и плохо извлекаются в неполярные растворители. Для дериватизации сульфаниламидов и образования ЭР был изучен прекурсор – ванилин, который содержит альдегидную и гидроксильную группы. С одной стороны, ванилин может образовывать ЭР с терпеноидами, такими как тимол или ментол за счет наличия гидроксильной группы, с другой стороны, он может образовывать основания Шиффа с сульфаниламидами как альдегид.

Предварительно были приготовлены ЭР ванилин/тимол и ванилин/ментол, которые последовательно смешивали с водными растворами сульфаниламидов (сульфапиридин, сульфаметоксазол, сульфаметазин). Установлено, что основания Шиффа образуются только в среде ЭР на основе тимола и ванилина. В этом случае происходило окрашивание экстрактов. В спектрах поглощения экстрактов наблюдались максимумы при 425, 430 и 435 нм для сульфаметоксазола, сульфаметазина и сульфапиридина соответственно.

Полученные основания Шиффа были изучены методом масс-спектрометрии. Дополнительно проводили образование оснований Шиффа при смешивании растворов ванилина и соответствующего сульфаниламида в метаноле. В масс-спектрах, полученных в среде метанола и ЭР, наблюдались аналогичные пики: 384, 386 и 413 (m/z), что соответствует ионам сульфапиридина ( $C_{19}H_{17}N_3O_4S$ , m/z = 383,43)+H, сульфаметоксазола ( $C_{18}H_{17}N_3O_5S$ , m/z = 387,41)+H и сульфаметазина ( $C_{20}H_{20}N_4O_4S$ , m/z = 412,47)+H. Эти данные подтверждали образование производных в среде ЭР.

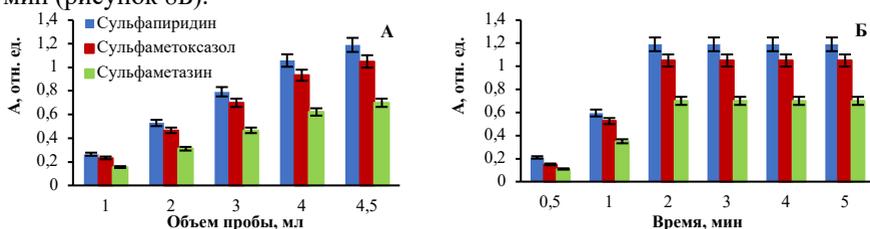


**Рисунок 7** – Гидравлическая схема для микроэкстракционно-спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче

переключили (положение б) и в шприцевой насос отбирали 4,5 мл пробы (моча) со скоростью 15 мл/мин. Двухфазную систему перемешивали в течение 2 мин со скоростью 200 об/мин с помощью магнитной мешалки. Для разделения фаз выдерживали паузу 5 мин. Верхнюю фазу (проба) сбрасывали (положение в), а нижнюю фазу (экстракт), содержащую окрашенное основание Шиффа (300 мкл), направляли в проточную ячейку детектора и измеряли оптическую плотность. На последнем этапе шприцевой насос промывали деионизированной водой (положение г).

Для автоматизации пробоподготовки коммутировали восьмиходовой кран-переключатель; шприцевой насос, оснащенный стеклянным шприцем вместимостью 5 мл с вкладышем магнитной мешалки; приточный спектрофотометрический детектор (рисунок 7). В шприцевой насос через кран-переключатель (положение а) отбирали 0,3 мл ЭР со скоростью 5 мл/мин, затем кран

Для достижения низких пределов обнаружения было изучено влияние соотношения объемов фаз на оптическую плотность. Для заполнения проточной кюветы спектрофотометра было необходимо 300 мкл экстракта. Так как номинальный объем шприцевого насоса составляет 5 мл, объем пробы варьировали в диапазоне от 1,0 до 4,5 мл. Значения оптической плотности возрастали пропорционально увеличению объема пробы (рисунок 8А). Поэтому объем пробы 4,5 мл был выбран для дальнейших исследований. Для достижения полноты образования оснований Шиффа было изучено влияние времени перемешивания фаз. Установлено, что для достижения равновесия достаточно 2 мин (рисунок 8Б).



**Рисунок 8** – Влияние объема пробы (время перемешивания – 5 мин) (А) и времени перемешивания (объем пробы – 4,5 мл) (Б) на оптическую плотность экстракта (объем экстрагента – 300 мкл,  $C_{\text{аналитов}} = 8$  мг/л,  $n=3$ )

Для валидации разработанного способа определяли ДОК, пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) и определения ( $10\sigma$ ), характеристики прецизионности. Пределы обнаружения составили 0,06 мг/л для сульфациридина и сульфаметазина и 0,1 мг/л для сульфаметоксазола. Достигнутые пределы обнаружения позволяют определять сульфаниламиды в моче ниже минимальных терапевтических концентраций (40 мг/л). Для оценки прецизионности выполняли анализ мочи с добавками сульфаниламидов 0,5 и 5 мг/л и рассчитывали ОСКО. ОСКО в условиях повторяемости составляли от 3 до 5 %, ОСКО в условиях внутрилабораторной воспроизводимости – от 5 до 7 %.

**Таблица 7** – Аналитические характеристики способа спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче

Параметр	Аналит		
	Сульфациридин	Сульфаметоксазол	Сульфаметазин
Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	0,2-8	0,3-10	0,2-15
$R^2$	0,9908	0,9932	0,9918
Предел обнаружения ( $3\sigma$ ), мг/л	0,06	0,1	0,06
Предел определения ( $10\sigma$ ), мг/л	0,2	0,3	0,2
Степень извлечения, %	91	93	91
Коэффициент концентрирования	13	14	13
Повторяемость (ОСКО, $n=3$ ), % $C=0,5$ и $5$ мг/л	5/4	5/5	4/3
Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, $n=3$ ), % $C=0,5$ и $5$ мг/л	7/5	7/6	6/5

Разработанный способ применяли для определения сульфациридина, сульфаметазина и сульфаметоксазола в пробах мочи с добавками антибиотиков, которые вводились последовательно. Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» и с помощью независимого способа (ВЭЖХ-УФ). Полученные значения смещения не превышали 10 % и показывали отсутствие существенного влияния матриц проб на результаты анализа (таблица 8). Для сравнения результатов, полученных спектрофотометрическим методом и методом ВЭЖХ-УФ, использовали F- и t-критерии. Полученные результаты сравнивали 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 полученными результатами.

**Таблица 8** – Результаты определения сульфаниламидов в моче (n=3, P=0,95, F<sub>кр</sub>=19,00, t<sub>кр</sub>=2,78)

Образец	Аналиты	Введено, мг/л	Найдено, мг/л		F-критерий	t-критерий	Относительное смещение, %
			Разработанный способ	Независимый метод (ВЭЖХ-УФ)			
Моча (проба 1)	сульфациридин	0,5	0,501±0,025	0,500±0,020	1,57	0,13	0
	сульфаметоксазол	0,5	0,520±0,021	0,51±0,03	2,16	1,17	4
	сульфаметазин	1,0	1,10±0,07	1,05±0,06	1,10	2,46	10
Моча (проба 2)	сульфациридин	1,0	1,06±0,05	1,11±0,06	1,09	2,76	6
	сульфаметоксазол	1,0	1,02±0,04	1,01±0,04	1,02	0,83	2
	сульфаметазин	0,5	0,511±0,015	0,500±0,025	2,66	1,62	2
Моча (проба 3)	сульфациридин	1,0	1,08±0,05	1,04±0,05	1,08	2,42	8
	сульфаметоксазол	0,5	0,511±0,020	0,52±0,03	2,33	1,04	2
	сульфаметазин	1,5	1,48±0,07	1,51±0,08	1,04	1,23	1

## ВЫВОДЫ

По результатам представленных экспериментальных данных сформулированы следующие выводы:

1. Для ЖМЭ неполярных аналитов из пищевых продуктов доказана возможность *in situ* образования гидрофобных ЭР при щелочном гидролизе матричных жиров и взаимодействию образующихся жирных кислот с природными терпеноидами. В этом случае для образования гидрофобного ЭР требуется добавление только одного прекурсора – природного терпеноида. Образование ЭР подтверждено методами ИК- и ЯМР-спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии.

2. Разработан способ хроматографического определения неполярных аналитов – ПАУ в сухом молоке, включающий микроэкстракционное выделение аналитов в фазу ЭР, образующегося *in situ* при щелочном гидролизе матричных жиров и их взаимодействия с ментолом. Способ обеспечил возможность выполнения селективного и высокочувствительного определения ПАУ в сухом молоке. Способ позволяет определять неполярные устойчивые к гидролизу аналиты в пищевых продуктах

с высоким содержанием жиров, исключить большой расход органических растворителей на стадии пробоподготовки.

3. Для миниатюризации ЖМЭ неполярных аналитов разработан подход, предполагающий образование ЭР *in situ* на поверхности импрегнированной тимолом мембране из пористого ПТФЭ. Предложенный подход позволил сократить расход терпеноида для образования ЭР и исключить стадию центрифугирования для отделения экстракта. Как следствие, реализован способ более экспрессный по сравнению с известными для определения следов хлорорганических пестицидов в арахисовой пасте методом ГХ-ЭЗД.

4. Показана возможность образования окрашенных оснований Шиффа при взаимодействии компонентов ЭР (ванилина/4-(диметиламино)бензальдегида) и полярных целевых аналитов (сульфаниламиды и мочевины) для их последующего микроэкстракционно-спектрофотометрического определения. Предложенные ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида/ванилина могут быть приготовлены в лаборатории при смешении широкодоступных прекурсоров.

5. Предложен способ спектрофотометрического определения мочевины в сухом молоке, основанный на одновременном образовании окрашенного производного с компонентом ЭР (4-(диметиламино)бензальдегидом) и его микроэкстракции. Способ не требует применения дорогостоящего аналитического оборудования, является экспрессным и селективным.

6. Разработана гидравлическая схема для автоматизации микроэкстракционно-спектрофотометрического способа определения сульфаниламидов (сульфапиридина, сульфаметазина, сульфаметоксазола) в моче. Разработанная гидравлическая схема позволяет выполнять рутинные процедуры дериватизации аналитов, микроэкстракции производных в ЭР и измерения оптических плотностей экстрактов без участия исполнителя.

7. Разработанные способы были валидированы и апробированы при анализе пищевых продуктов (сухое молоко, арахисовая паста) и биологических жидкостей (моча).

**Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:**

**Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ и рекомендованных для размещения материалов диссертаций:**

1. Shakirova F. Automated liquid-liquid microextraction and determination of sulfonamides in urine samples based on Schiff bases formation in natural deep eutectic solvent media / Shakirova F., Shishov A., Bulatov A. // Talanta. – 2021. – V. 234. – P. 122660 (Импакт-фактор Web of Science – 6,556, Q1);

2. Shakirova F. Hydrolysis of triglycerides in milk to provide fatty acids as precursors in the formation of deep eutectic solvent for extraction of

polycyclic aromatic hydrocarbons / Shakirova F., Shishov A., Bulatov A. // Talanta. – 2022. – V. 237. – P. 122968 (Импакт-фактор Web of Science – 6,556, Q1);

3. Shakirova F. A new hydrophobic deep eutectic solvent based on thymol and 4-(dimethylamino)benzaldehyde: Derivatization and microextraction of urea // Shishov A., Shakirova F., Markova U., Tolstoy P., Bulatov A. // Journal of Molecular Liquids. – 2022. – V. 353. – P. 118820 (Импакт-фактор Web of Science – 6,633, Q1).

**Патент:**

**Патент РФ № 2774814.** Способ подготовки проб цельного и сухого молока для определения в них химических загрязнителей : **№ 2021120316 : заявл. 09.07.2021 : опублик. 23.06.2022** / Шакирова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В.; заявитель, патентообладатель Санкт-Петербургский государственный университет. – 12 с.

**Иные публикации:**

1. Шакирова Ф. Микроэкстракционное выделение полициклических ароматических углеводородов из сухого молока в глубокие эвтектические растворители / Шакирова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Сборник материалов Международной конференции по естественным и гуманитарным наукам «Science SPbU – 2020». – Санкт-Петербург, 2020. – С. 387;

2. Шакирова Ф. Новый способ микроэкстракционного выделения неполярных аналитов из пищевых продуктов за счет *in situ* образования глубоких эвтектических соединений с компонентами пробы / Шакирова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов- 2021». – Москва, 2021. – С. 105;

3. Shakirova F. Determination of sulfonamides in urine samples based on Schiff bases formation in natural deep eutectic solvent media / Shakirova F., Shishov A., Bulatov A. // Book of abstracts of XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021». – Saint Petersburg, 2021. – P. 109;

4. Шакирова Ф. Микроэкстракционное выделение полициклических ароматических углеводородов из сухого молока в глубокие эвтектические растворители для последующего ВЭЖХ-ФЛ определения / Шакирова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Материалы VI Всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». – Краснодар, 2021. – С. 193;

5. Шакирова Ф. Микроэкстракционное выделение хлорорганических пестицидов из жиросодержащих твердофазных пищевых продуктов в глубокие эвтектические растворители для последующего ГХ-ЭЗД определения / Шакирова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Сборник материалов Всероссийской конференции по естественным и гуманитарным

наукам с международным участием «Наука СПбГУ 2021». – Санкт-Петербург, 2021. – С. 413;

6. Крехова Ф. Автоматизированная жидкостно-жидкостная микроэкстракция и определение сульфаниламидов в пробах мочи за счет образования оснований Шиффа в глубоких эвтектических растворителях / Крехова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург, 2022. – С. 189;

7. Крехова Ф. *In situ* образование глубоких эвтектических растворителей для анализа пищевых продуктов и биологических жидкостей / Крехова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022». – Москва, 2022. – С. 61;

8. Крехова Ф. Микроэкстракционное выделение пестицидов из пищевых продуктов растительного происхождения для последующего хроматографического определения жидкостей / Крехова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Тезисы докладов IV съезда аналитиков России. – Москва, 2022. – С. 99;

9. Крехова Ф. *In situ* образование эвтектических растворителей для инструментального анализа пищевых продуктов и биологических жидкостей / Крехова Ф.М., Шишов А.Ю., Булатов А.В. // Материалы XXVI Всероссийской конференции молодых ученых-химиков с международным участием. – Нижний Новгород, 2023. – С. 288.

*Автор выражает благодарность д.х.н., профессору РАН Булатову А.В., к.х.н., профессору Шишову А.Ю., к.х.н., ассистенту Почивалову А.С., к.х.н. Черкашиной К.Д., Марковой У.О., Мещевой Д.А. за помощь в выполнении диссертационной работы. Также автор выражает благодарность ресурсным центрам Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета «Методы анализа состава вещества», «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования» и «Магнитно-резонансные методы исследования» за помощь в проведении исследований.*