

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Мелехина Артема Олеговича
на тему: «ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов нитрофуранов в
пищевых продуктах с использованием нового дериватирующего
агента, сверхсшитого и магнитного сверхсшитого полистиролов»
по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия»

Актуальность темы. Контроль качества пищевых продуктов для оценки их безопасности применения - одна из **важнейших и актуальных задач** современной аналитической химии. Так, присутствие в таких объектах остатков ветеринарных препаратов, которые применяют для профилактики и лечения заболеваний, а также в качестве стимуляторов роста, не только снижают качество соответствующих пищевых продуктов, но и могут быть причиной различных заболеваний. Среди лекарственных веществ *особое место* занимают *нитрофураны*. Они подвергаются быстрому гидролизу в организме и остаются в продуктах животного происхождения в виде связанных с белками метаболитов в течение длительного времени. Последние могут оказывать на человека *мутагенное и канцерогенное* действие. Поэтому применение таких препаратов запрещено в ветеринарии во многих странах, включая Россию. Однако их продолжают применять и в настоящее время, что требует определения следовых количеств метаболитов нитрофуранов и остается **актуальной задачей** аналитической химии.

Основные трудности, связанные с определением метаболитов нитрофуранов, возникают на стадии пробоподготовки. С одной стороны, необходимо проведение их кислотного гидролиза для разрыва связей белок-метаболит. С другой стороны, требуется их обязательная дериватизация для получения гидрофобных производных, пригодных для хроматографического анализа. Кроме того, для снижения влияния матричных эффектов

необходима очистка соответствующих экстрактов. Решению перечисленных задач и посвящена диссертация Мелехина Артема Олеговича.

В диссертации показана возможность ускорения кислотного гидролиза нитрофуранов увеличением температуры и концентрации HCl. Предложен новый дериватирующий агент, 5-нитро-2-фуральдегид, и показаны экономическая целесообразность и перспективность его использования при ВЭЖХ-МС/МС определении метаболитов нитрофуранов. Для очистки гидролизатов предложен сверхсшитый и магнитный сверхсшитый полистиролы (ССПС), которые ранее для этой цели не применялись. Также в работе затронута проблема определения нитрофуранов, их метаболитов совместно с другими лекарственными веществами, применяемыми в ветеринарии.

Научная новизна диссертационной работы Мелехина А.О. заключается в:

- применении 5-нитро-2-фуральдегида в качестве нового дериватирующего агента для определения метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС;
- разработке способа ускоренной пробоподготовки образцов пищевых продуктов при определении в них метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС;
- изучении сорбции нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах и применении этих сорбентов для очистки гидролизатов, полученных в процессе пробоподготовки пищевых продуктов;
- использовании магнитного сверхсшитого полистирола для многокомпонентного выделения нитрофуранов и их метаболитов совместно с другими лекарственными веществами, относящимися к различным классам.

Практическая значимость диссертационного исследования состоит в:

- демонстрации возможностей применения 5-нитро-2-фуральдегида в качестве дериватирующего агента при модификации метаболитов

нитрофуранов, а сверхсшитого и магнитного сверхсшитого полистиролов в качестве сорбентов для очистки гидролизатов, получаемых в процессе кислотного гидролиза пищевых продуктов;

- разработке и валидации методики определения метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС в меде после очистки гидролизатов методом магнитной твердофазной экстракции на магнитном ССПС;

- разработке и валидации методик определения метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС в яйцах, курином мясе и субпродуктах после очистки гидролизатов методом твердофазной экстракции;

- разработке и валидации методик многокомпонентного определения нитрофуранов в молоке совместно с 128 другими лекарственными веществами и метаболитов нитрофуранов в меде совместно с 27 другими лекарственными веществами, включающие многокомпонентное выделение лекарств методом магнитной твердофазной экстракции.

Все предложенные автором методики апробированы на *реальных объектах*, загрязненных остатками лекарственных веществ. Полученные результаты сопоставимы с результатами официальных ГОСТовских методик.

Диссертационная работа Мелехина А.О. построена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), состоящей из описания используемых реагентов, аппаратуры и техники экспериментов, полученных результатов исследования и их обсуждения (главы 3–6), заключения и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 157 страницах машинописного текста и содержит 32 рисунка и 30 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 198 наименований.

Обзор литературы (глава 1) объективно отражает основные данные по методам пробоподготовки и хроматографического определения метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах, в том числе совместно с другими

лекарственными веществами. Автором проведено обобщение данных литературы по применению различных дериватирующих агентов, отражены тенденции в определении метаболитов нитрофуранов. В целом, обзор написан в хорошем литературном стиле и, несомненно, носит аналитический характер.

В экспериментальной части (глава 2) описаны используемые в работе реактивы, оборудование, физико-химические свойства сорбентов, методики экспериментов и условия хроматографического разделения, детектирования и идентификации.

Третья глава диссертации посвящена выбору условий дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом и изучению влияния различных факторов на гидролиз и дериватизацию связанных с белками метаболитов. Систематическое изучение влияния времени, температуры, концентрации 5-нитро-2-фуральдегида и pH реакционной смеси позволило диссертанту выбрать оптимальные условия дериватизации. Продукты дериватизации идентифицированы, они представляют собой соответствующие метаболитам нитрофураны, что позволило в дальнейшей работе выбирать условия пробоподготовки и определения с помощью нитрофуранов, более дешевых, чем нитропроизводные метаболитов, полученные реакцией с 2-нитробензальдегидом.

Самым длительным этапом, который в подавляющем большинстве методик занимает 16 ч, является этап одновременного гидролиза/дериватизации. С целью снижения этого времени автором изучено влияние температуры и концентрации HCl на ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов нитрофуранов в курином мясе с использованием 5-нитро-2-фуральдегида при проведении пробоподготовки в термостатированной ультразвуковой ванне. Автором установлено, что при повышении температуры до 80°C и $c(\text{HCl})$ до 0.5 М удается значительно сократить время гидролиза-дериватизации с 16 часов до 20 минут и увеличить выход

продуктов дериватизации. Выбранные условия ускоренного гидролиза/дериватизации важны для снижения времени анализа при определении метаболитов нитрофуранов в продуктах питания. Достоверность данных при этом не вызывает сомнений, т.к. в экспериментах использовали мясо и субпродукты со связанными с белками метаболитами кур-бройлеров, которые получали инъекции препаратов нитрофуранов.

Четвертая глава диссертации посвящена изучению сорбции нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах. Установлено, что предложенные сорбенты можно применять для группового выделения и концентрирования этих веществ методами твердофазной и магнитной твердофазной экстракции, соответственно.

Пятая глава диссертации посвящена разработке новых способов определения метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС в реальных пищевых продуктах: меде, куриных яйцах, курином мясе и субпродуктах. Определения проводили после кислотного гидролиза и дериватизации метаболитов с 5-нитро-2-фуральдегидом и очистки полученных гидролизатов с применением магнитного сверхсшитого полистирола (мед) или сверхсшитого полистирола (яйца, мясо). Разработанные Мелехиным А.О. методики позволяют проводить экспрессное определение метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах на уровнях ниже, чем максимально допустимые уровни. Оценена правильность и прецизионность разработанных методик.

В шестой главе диссертации автор продемонстрировал возможности одновременного определения метаболитов нитрофуранов и нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами. В первом разделе показана возможность одновременного ВЭЖХ-МС/МС определения в меде четырех метаболитов нитрофуранов совместно с 27 другими лекарственными веществами, принадлежащими к 3 классам. Показано, что при проведении

ускоренного гидролиза/derivатизации (УЗ, 80°C, 0.5 М НСІ, 20 мин) термостабильны не только продукты derivатизации метаболитов (соответствующие нитрофураны), но и соединения из классов хинолонов, амфениколов и нитроимидазолов. Разработанная методика характеризуется низкими пределами обнаружения аналитов (0.1 – 0.3 мкг/кг), что *на порядок ниже* максимально допустимых уровней.

Во втором разделе обоснована необходимость и показана возможность применения магнитного ССПС для выделения из молока четырех нитрофуранов совместно с 128 другими лекарственными веществами, принадлежащими к 16 классам перед их определением методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для демонстрации работоспособности разработанных методик, которые приведены в полной мере для их воспроизведения, применяли положительные пробы меда и молока, в которых при мониторинге пищевых продуктов были обнаружены лекарственные вещества. Проведена сравнительная оценка полученных результатов с результатами определения по соответствующим ГОСТам, которые свидетельствуют о *правильности и хорошей воспроизводимости* разработанных методик.

В целом, диссертационная работа Мелехина Артема Олеговича «ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах с использованием нового derivатизирующего агента, сверхсшитого и магнитного сверхсшитого полистиролов», производит благоприятное впечатление, представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны новые научные результаты в области определения лекарственных веществ в продуктах питания и развития хроматографического определения метаболитов нитрофуранов.

Полученные результаты отличаются своей *оригинальностью*. Их *достоверность* обеспечена грамотной постановкой эксперимента, применением более десятка современных методов исследования и анализа, в

том числе и гибридных, непротиворечивостью результатов эксперимента по сравнению с известными в литературе данными, а также взаимной корреляцией результатов, их статистической проработкой.

Работа прошла *хорошую апробацию*. Результаты и выводы диссертации доложены и обсуждены на престижных Всероссийских и международных конференциях. Основное содержание диссертации изложено в 10 публикациях, в том числе 6 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в базы цитирования Scopus и Web of Science. Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант №18-73-10001. *Автореферат* и *публикации полностью отражают* содержание диссертации.

Результаты диссертационного исследования могут быть применены в проведении научных исследований в организациях, осуществляющих контроль качества пищевых продуктов, в организациях, занимающихся разработкой способов определения лекарственных веществ в биологических объектах, в МГУ, СПбГУ, Саратовском, Омском, Самарском, Уральском университетах, КубГУ, РХТУ, ГЕОХИ РАН, НИИ питания РАН и др.

По *диссертационной работе* и *автореферату* можно сделать следующие **замечания**:

1. В работе исследованы аналиты различной гидрофобности, так для фуразолидона, фуралтадона и нитрофурантоина, нитрофуразона величины IgP имеют противоположные знаки. Из работы не совсем ясно, как их различные липофильные свойства (учитывая, что дериватизация их метаболитов 5-нитро-2-фуральдегидом приводит к образованию этих же веществ) сказываются на основных характеристиках сорбции и последующего хроматографирования?

2. Для проведения ускоренного гидролиза/дериватизации исследованных нитрофуранов, наряду с УЗ-воздействием, температурой

(80°C), временем проведения пробоподготовки (20 мин) автор варьирует концентрацию достаточно летучей HCl, ее же применяют и другие исследователи. Выбор природы кислоты (HCl) для гидролиза/derivатизации обоснован или возможно применение менее летучей кислоты?

3. Из работы и автореферата не совсем понятно проводились ли параллельные испытания для определения степеней десорбции нитрофуранов различными сорбентами (табл. 6 и 7, стр. 15 автореферата; табл. 8, стр. 67 и табл. 9, стр. 68) или получены единичные данные?

4. Чем обусловлен различный срок хранения, шесть и один месяц соответственно, исходных метанольных растворов нитрофуранов и их метаболитов (200 мкг/мл, температура -20°C) и растворов смесей нитрофуранов и метаболитов нитрофуранов (1000 нг/мл), а также их стандартов?

5. Значащие цифры средних величин, к сожалению, в некоторых таблицах работы и автореферата (например, табл. 11, стр.19; табл. 13, стр.21 автореферата или табл.17, стр.88 диссертации) не соответствуют доверительным границам.

6. Некоторые рисунки автореферата, например, рис. 7 и рис.8, стр.17 и диссертации, например, рис.7, стр. 52 излишне миниатюризированы и плохо читаются. В тексте диссертационной работы встречаются некоторые стилистические неточности и опечатки.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным Положением о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Мелехин Артем Олегович заслуживает

присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности
1.4.2 – «Аналитическая химия».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,

ПРОФЕССОР кафедры аналитической химии и химической экологии
института химии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет имени Н.Г.
Чернышевского»

ДОРОНИН Сергей Юрьевич

20.02.2023 г.

Контактные данные:

DoroninSU@mail.ru, +7 (8452) 26-45-53

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы:

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский
национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.
Чернышевского», кафедра аналитической химии и химической экологии
Института химии.

Тел.: +7 (8452) 51-69-60, E-mail: inchem@info.sgu.ru