
ZOC-2020

Молекулярно імпринтовані полімери модифіковані іонними рідинами для селективного концентрування та визначення антибіотиків у водних розчинах

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	5
1.1. Методи визначення антибіотиків	5
1.2. Пробопідготовка для аналізу проб на вміст антибактеріальних препаратів	10
1.3. Молекулярно імпринтовані полімери в аналітичній практиці: досвід та перспективи.	12
1.4. Висновки з літературного огляду та обґрунтування мети роботи	13
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	14
2.1. Реагенти	14
2.2. Апаратура:	15
2.3. Синтез іонної рідини	16
2.4. Методика синтезу зразків МІП різного складу	16
2.5. Методика синтезу зразків МІП функціоналізованих ІЛ	17
2.6. Методи характеристики та ідентифікації одержаних зразків МІП	18
2.7. Дослідження сорбції метиленового синього на поверхні одержаних МІП у статичних умовах	18
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	20
3.1. Синтез молекулярно імпринтованих полімерів	20
3.2. Характеризація та ідентифікація одержаних адсорбентів.	20
3.3. Дослідження адсорбції метиленового синього на поверхні одержаних МІП	24
3.4. Дослідження адсорбції антибіотиків тетрациклінового ряду на поверхні одержаних МІП	25
3.5. МІП для твердофазної екстракції з хроматографічним детектуванням	27
3.6. Умови десорбції тетрацикліну на поверхні одержаних МІП у статичних та динамічних умовах	29
ВИСНОВКИ:	30
ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ЗАПРОПОНОВАНОГО ПІДХОДУ:	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	31

ВСТУП

Антибіотики-речовини синтетичного та природного походження, які знайшли широке застосування в медицині. Також вони використовуються для боротьби з багатьма інфекційними захворюваннями, у ветеринарії, рослинництві та тваринництві для лікування та профілактики бактеріальних і грибкових захворювань, у харчовій промисловості задля подовження строку придатності продуктів та ін.

При неконтрольованому застосуванні антибіотиків у тваринництві можливі їх накопичення у продуктах тваринного походження, зокрема у м'ясі, яйцях, молоці, меді, тощо. Присутність антибактеріальних речовин у продуктах харчування може зашкодити здоров'ю людини. Тривале споживання продуктів з підвищеним вмістом антибіотиків призводить до різноманітних відхилень у функціонуванні організму: пригнічує діяльність нервової системи, сприяє розвитку некрозу печінки, подразнює слизові оболонки та шкірний епітелій, зумовлює розвиток резистентності до даних препаратів. Можливі також виникнення хвороб очей, органів кровотворення, що може викликати анемію та ін.

Враховуючи можливий негативний вплив надлишкової кількості антибіотиків на організм людини, національні комісії та міжнародні організації із охорони здоров'я розробили відповідні нормативні документи, в яких визначено гранично допустимі концентрації для різних класів сполук, що суттєво обмежує їх вміст в продуктах харчування. Тому задля належного контролю якості продукції виникає потреба у проведенні високоточного аналізу, який забезпечуватиме достатній рівень чутливості визначення. Молекулярно імпринтовані полімери (МІП) отримують співполімеризацією функціонального і зшиваючого мономерів в присутності темплату. Функціональні мономери під час синтезу утворюють комплекс з молекулою темплатом і при полімеризації функціональні групи цих мономерів фіксуються зшиваючим агентом в положенні, що відповідає будові

перед полімеризаційного комплексу. Далі темплат вимивають і в полімерній 3D матриці залишаються центри зв'язування, які схожі на форму і розмір молекул аналіту. Внаслідок чого МІПи мають молекулярну пам'ять по відношенню до цільового аналіту, а завдяки високій ступені зшивання МІП є жорсткими і стабільними.

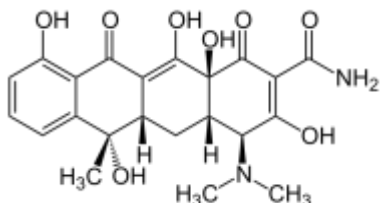
Метою даної роботи є синтез нових МІП на основі функціональних мономерів різної гідрофобності та модифікованих іонними рідинами, що дозволить регулювати селективність матеріалу по відношенню до цільових аналітів. Дослідити можливість застосування синтезованих МІП для селективного сорбційного концентрування слідових кількостей барвників (на прикладі метиленового синього) та антибактеріальних препаратів з водних розчинів.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні задачі:

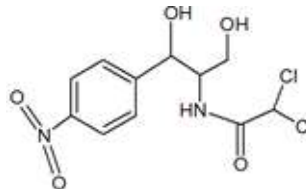
- Одержати ряд МІП з різною гідрофобністю та дослідити можливість їх модифікування іонними рідинами (ІЛ). Розробити методику синтезу ІЛ.
- Дослідити одержані нові матеріали інструментальними методами й отримати вичерпну інформацію щодо їх структурно-сорбційних властивостей;
- Провести скринінгові дослідження сорбційних властивостей одержаних адсорбентів з аналітами різної природи (барвники, тощо);
- Дослідити адсорбцію суміші антибіотиків тетрациклінового ряду та лівоміцетину на поверхні отриманих адсорбентів;
- Оптимізувати умови хроматографічного розділення тетрациклінових антибактеріальних препаратів в присутності лівоміцетину;
- Визначити оптимальні умови десорбції антибіотиків з одержаних МІП;
- Провести апробацію найбільш перспективних зразків МІП для вилучення суміші антибактеріальних препаратів в умовах твердофазної мікроекстракції та класичної твердофазної екстракції.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

Перше місце по виробництву у Китаї [1] та друге місце у світі по застосуванню у тваринництві та харчовій промисловості посідають антибіотики тетрациклінової (окситетрациклін, доксициклін, і т.д.) та левоміцетинової груп [2] через їх високу ефективність, дешевизну та доступність:



тетрациклін



хлорамфенікол(левоміцетин)

Антибіотики тетрациклінової групи ефективно застосовуються у м'ясо-молочній промисловості для подовження терміну зберігання свіжого молока. Наприклад, при концентрації окситетрацикліну всього 100 мкг/л молоко здатне зберігатись до 4 діб при температурі 30°C [3]. Окрім молочних продуктів, тетрациклін широко використовується для подовження строку придатності м'яса. Найбільше пониження хвороботворних клітин спостерігається при введенні у лімфовузли (з 5050 до 3550 мікробних клітин/г продукту) [4]. Для збільшення терміну придатності свіжої риби її опускають розчин антибіотиків (50 мг/л) або зберігають у льодові з антибіотиками [5]. Встановлено гранично допустимі концентрації даних антибіотиків у продуктах харчування: 0,01 мкг/кг хлорамфеніколу для всіх продуктів [6] та 10, 100, 500 мкг/кг антибіотиків тетрациклінової групи у медові, молоці, м'ясі, відповідно. Однак, вони є забороненими до застосування у тваринництві та харчовій промисловості в США, країнах Європейського Союзу, а у 2002 році й в Україні [7].

1.1. Методи визначення антибіотиків

У зв'язку з необхідністю контролювати вміст антибіотиків у продуктах харчування до сучасних аналітичних методів висувається ряд вимог- перш за все,

необхідно забезпечити експресне визначення цих речовин у слідових кількостях з високою чутливістю та в присутності значного заважаючого впливу складної матриці. Для контролю вмісту антибактеріальних препаратів застосовуються:

Імунологічні та мікробіологічні методи знайшли застосування для експрес контролю якості молочної продукції на вміст антибіотиків, наприклад [8], тести «Beta Star» (чутливий до бета-лактамових антибіотиків в основному від 2 до 20 мкг/кг), «Тетра Star» (аналіз тетрациклінових антибіотиків з чутливістю на рівні 60-80 мкг/кг). Ці методи дозволяють проводити первинний скринінг вмісту антибіотиків різних груп на рівні 10-20 мкг/кг без проведення трудомісткої пробопідготовки.

Найбільш широке використання при визначенні низьких концентрацій антибіотиків в усіх галузях промисловості, в т.ч. й харчовій знайшли хроматографічні методи [9]. Найбільш ефективним при цьому є висоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) з УФ-, флуоресцентним та МС-детектуванням.

Рідинна хроматографія забезпечує достатню селективність для визначення антибіотиків тетрациклінового ряду [10], наприклад, тетрациклін та окситетрацикліну в медові при флуоресцентному детектуванні при 335 нм дозволяє визначати з межею визначення 20 нг/г [11]. Використання УФ-детекторів є одним із найпоширеніших методів реєстрації тетрациклінів. Можна окремо визначити вміст тетрацикліну, окситетрацикліну, хлортетрацикліну та доксицикліну [20]. Він є відносно не дорогим та швидким. Недоліком є їх недостатня чутливість, для її підвищення слід застосовувати сучасні методи сорбційного та міцелярного концентрування. Для визначення антибіотиків у зразках, попередньо проводять концентрування аналітів. Ефективність екстракції впливає на якість подальшого визначення препаратів. В якості сорбентів використовують кремній оксид з прикріпленими групами C8 [12] та C18 [13, 14], полімерні картриджі типу Oasis HLB, [15] молекулярно імпринтовані полімери

,отримані полімеризацією 2-диетиламіноетилакрилату [16, 17] полімери на основі стиролу і дивініл бензолу [18]. ВЕРХ з УФ - детектором при визначенні хлорамфеніколу має межу виявлення 10мкг/кг, що є на порядок більшим за газову хроматографію. Люмінесцентні детектори є більш чутливими порівняно з УФ – детекторами для антибіотиків ТС ряду. Вони дозволяють не лише визначити вміст індивідуальних сполук тетрацикліну та окситерацекліну, а й детектувати їх епімери [19]. Масс-детектори є найкращим для визначення таких аналітів й дозволяють визначити широкий спектр антибіотиків на рівні 1 мкг/кг [20]. Так, автори роботи [21] розробили методику визначення дев'яти цефалоспоринових антибіотиків у яловичині за допомогою ультра ВЕРХ з МС-детектором. Розділення здійснювали протягом 10 хв, а межа кількісного визначення для цефуроксиму, цефтіофору та цефалоніуму становили 10, 0.5 та 0.5 мкг/кг, а для інших цефалоспаримів – близько 1.0 мкг/кг при відносному стандартному відхиленні 2.9-15 %.

Газова хроматографія використовується для визначення антибіотиків левоміцетинової групи, зокрема хлорамфеніколу [22]. Газова хроматографія з використанням детектору типу електронна пастка дає можливість визначити антибіотик на рівні 1-5мкг/кг з капілярною колонкою на основі біфенілу-диметилполісилоксану [23]. Перед визначенням антибіотику обов'язково проводиться попереднє концентрування проби. Для цього використовують капілярні колонки на основі біфеніл-диметилполісилоксану [16, 24, 25, 26]. В якості газів-носіїв використовують азот чи гелій [16]. Для розділення антибіотиків встановлюється температура колонки не менше 280°C. Перевагою даного методу над ВЕРХ є можливість одночасного визначення хлорамфеніколу, тріамфеніколу, флорфеніколу зі збільшеним співвідношенням сигнал/шум, а для підвищення чутливості при визначенні антибіотиків левоміцетинової групи застосовують ГХ-МС [27].

Тонкошарова хроматографія (ТШХ). Використання ТШХ для визначення тетрациклінового класу антибіотиків просте та не вимагає дорогого обладнання . Метод є універсальним за рахунок можливості варіювання нерухомої фази відповідно до визначуваних аналітів. В якості нерухомої фази можливе застосування силікагелю [28,29, 30, 31], поверхня якого модифікована ЕДТА [32] целюлози [33, 34]. Як рухомих фаз зазвичай використовують суміші розчинників: н-бутанол-вода[12] хлороформ-метанол[10], ацетон-етилацетат-вода [14]. Детектування здійснюють флуоресценцією реагенту при 370 нм [12, 35].

В залежності від умов експерименту можна розділяти та визначати різні типи тетрациклінових антибіотиків. Так, нерухомою фазою обирають силікагель, модифікований ЕДТА, як рухомих фаз – суміші розчинників н-бутанол –етанол-вода (4:7:4), визначають окситетрацеклін та тетрациклін [12]. Натомість, застосовуючи н-бутиловий спирт з водою , можливо визначити окситетрацеклін, тетрациклін та хлортетрацеклін [12].

Однак, визначення антибіотиків тетрациклінової групи методом ТШХ не набуло широкого поширення через ряд недоліків. Зокрема це складність підготовки експерименту , де заважаючий вплив здійснюють катіони металів , які здатні утворювати комплексні сполуки з тетрациклінами . Для нівелювання цього впливу використовують буферні розчини , які містять ЕДТА [12].

Люмінесцентні методи досить чутливими та експресними методами визначення ТС є люмінесцентні, і першу чергу – із використанням явища сенсibilізації. Сенсibilізована люмінесценція відбувається внаслідок переносу енергії з органічного ліганду на резонансні рівні f – елементів, що призводить до появи інтенсивного випромінювання [36]. Флуоресцентне визначення ТС з використанням системи $Eu(III)$ -ТС успішно використовується для різноманітних матриць, таких як біологічні рідини [37] та вода [38].

Велика кількість досліджень присвячена методам, заснованим на сенсibilізованій люмінесценції Eu(III) або Tb(III) в розчині [39] або в твердій фазі [40]. Методики відзначаються високою чутливістю, простотою реалізації та селективністю, особливо по відношенню до антибіотиків тетрациклінового та хінолінового рядів, з межею визначення на рівні 1,0–2,0 мкг/л [41].

У роботі [42] ТС визначали за появою люмінесцентного випромінювання внаслідок фотохімічної реакції. Межа виявлення сягає 3 нмоль/л при відносному стандартному відхиленні $RSD=1.8\%$. Реакція розрахована на визначення будь-якої сполуки, яка містить нітрогрупу. За рахунок низької селективності дана методика не може застосовуватись у забруднених зразках в яких можлива присутність нітрогрупи у компонентах матриці чи супутніх домішках.

Описано [43] титриметричне визначення ТС за гасінням люмінесценції його комплексної сполуки, яка не має люмінесцентних властивостей. В цій методиці як люмінофор обрано альбумін. Вимірювання спектру емісії проводять при довжині хвилі збудження 295 нм у межах 290-500 нм. Недоліком цього методу є природне гасіння люмінесценції, яке може накладатися на ефект його гасіння викликаного проходженням хімічної реакції й таким чином заважати визначенню ТС.

Електрохімічні методи. Вольтамперометричні методи визначення тетрацикліну базуються на окисно-відновній реакції у кислому середовищі з переносом чотирьох електронів. За вищого значення кислотності розчину шість електронів приймають участь у реакції [44]. У буферних розчинах також можливо визначити даний клас антибіотиків за використання диференціальної імпульсної полярографії [45].

У роботі [46] проводили визначення окситетрацикліну та тетрацикліну з модельного розчину. Як електрод порівняння використовували хлор–срібний електрод. Аналіз проводили у ацетатному буфері при рН 5.89. Перед кожним

виміром зразок продували азотом для видалення електрохімічно активного кисню. Межі виявлення антибіотиків складають відповідно $6 \cdot 10^{-8} \text{М}$ для класичної полярографії (час концентрування 2 хвилини) та $1 \cdot 10^{-7} \text{М}$ для імпульсної (час концентрування 10 секунд). Відносне стандартне відхилення складає (RSD) 1.4 %.

Визначення левоміцетину вольтамперометричним методом було показано у [47]. Метод, придатний для визначення левоміцетину у молоці, технічно не викликає труднощів, є простим, швидким та доступним. Він дозволяє визначити антибіотик на рівні 15мкг/л зі збереженням лінійності градувального графіку в межах двох порядків. Вольтамперометричне визначення левоміцетину у зразках молока з використанням електроду, модифікованого молекулярно імпринтованим полімером, описане в [48][49].

1.2. Пробопідготовка для аналізу проб на вміст антибактеріальних препаратів

Твердофазна екстракція (ТФЕ). ТФЕ застосовують для екстракції аналітів та видалення інтерферуєючих компонентів з комплексних зразків, зміни розчинників з водних на органічні та транспортування. Інтерес до ТФЕ зумовлений тим, що аналіз токсичних речовин за допомогою як традиційних інструментальних, так і біосенсорних методів аналізу в реальних зразках часто неможливий без їхньої попередньої обробки. Ця процедура займає до 90% часу аналізу, становить до 85% його вартості, а також залишається головним джерелом помилок при аналітичній ідентифікації токсичних молекул. Як сорбенти для проведення ТФЕ найчастіше використовують SiO_2 з прикріпленими групами C8 [20] та C18 [21].

Дослідження статті [50] показали, що для концентрування тетрациклінів можна успішно використовувати зшитий полістирол (ЗПС), сополімер стиролу та дивініл бензолу N-вініл-2-піроліденом, вуглеводневий наноматеріал Тауніт (ВНТ), діетиламіноетилцелюлозу.

У статистичному та динамічному режимах визначили ступінь сорбції, яку фіксували за зменшенням поглинання реагенту в максимумі поглинання $\lambda=350\text{nm}$. Патрон промивали ацетонітрилом та дистильованою водою. Сорбційна рівновага встановлюється протягом 20 хвилин. Кислотність середовища суттєво впливає на проходження сорбції. Було визначено, що за $\text{pH}<3$ окситетрацеклін перебуває у катіонній формі, в межах pH 4.5-6 у нейтральній формі, за pH 8-12 у монодепротонованій аніонній формі, а при $\text{pH}>10$ окситетрацеклін повністю депротонований. Таким чином, найбільш придатним для виявились ЗПС та ВНТ, ступінь сорбції яких відповідно складає 99 % та 98 %.

Для концентрування левоміцетину із коров'ячого молока та маргарину [51] застосували цеоліт, цеоліт модифікований хітозаном, активоване вугілля, вермікуліт, ДІАПАК – силікагель та суміш сорбентів активоване вугілля – вермікуліт, взяті у співвідношенні 1:1. Найбільш доцільним виявилось використання бінарного сорбенту, який забезпечує ступінь вилучення до 96,75 % у молочних продуктах з масовою часткою жиру 3,8 %. Він дозволяє не лише сконцентрувати ТС у кількостях, необхідних для хроматографічного визначення, а ще й провести очистку розчину від домішок матриці.

Найширше застосовуваний формат ТФЕ – це скляні або поліпропіленові картриджі заповненні відповідним сорбентом, розташованим між двома пористими фритами з поліетилену, тефлону чи нержавіючої сталі. Основним недоліком використання сорбентів у такому форматі є незначний поперечний переріз картриджів, що зумовлює відносно невелику ефективність при прокачуванні великих об'ємів. З цієї точки зору перспективною є мінюатиризований варіант ТФЕ, як твердофазна мікроекстракція [52].

Твердофазна мікроекстракція (ТФМЕ). Мікроекстракцією зазвичай називають екстракцію аналіту невеликим об'ємом (до 0,1 мл) рідини або невеликою масою (зазвичай до 5мг) адсорбенту із рідкої або газоподібної проби об'ємом до 5-10 мл. Рідинну і ТФМЕ приміняють для аналізу біологічних проб, об'єктів навколишнього середовища, харчових продуктів, лікарських препаратів. На відміну від класичної твердофазної екстракції ТФМЕ більш дешева, при її використанні є значне виключення або повне виключення токсичних розчинників, високі коефіцієнти концентрування, простота поєднання з інструментальними методами аналізу, можливість автоматизації.

1.3. Молекулярно імпринтовані полімери в аналітичній практиці: досвід та перспективи.

Через зростаючу необхідність розробки ефективних методів попереднього концентрування та очищення зразків в аналітичній хімії, біотехнології, медицині харчовій промисловості та екологічному моніторингу використання МІП у цих галузях привертає значну увагу [53, 54]. ТФЕ є найперспективнішою галуззю з точки зору практичного застосування МІП за їхньої комерціалізації. МІП мають низку переваг порівняно з традиційними сорбентами ТФЕ [55, 56]. Основна проблема ТФЕ з використанням традиційних абсорбентів – недостатня селективність останніх. Поряд з високо специфічними імуноадсорбентами МІП забезпечують селективну абсорбцію матричних молекул або групи подібних за структурою речовин, що дає змогу отримати екстракти без інтерферуючих компонентів, а сама процедура складається з одного етапу навіть при роботі з реальними зразками. Порівняно з імуноадсорбентами МІП забезпечують селективну адсорбцію матричних молекул або групи подібних за структурою речовин, що дає змогу отримати екстракти без інтерферуючих компонентів а сама процедура складається з одного етапу. Порівняно з імуноадсорбентами методи

синтезу МІП дуже прості та швидкі, а сама процедура може бути легко відтворена, вартість значно нижча, при цьому МІП мають набагато більшу адсорбційну ємність [57, 58], та стабільність при зберіганні. Стабільність МІП за присутності кислот, лугів та органічних розчинників дозволяє на відміну від імуноадсорбентів застосовувати картриджі або колонки на основі цих матеріалів безпосередньо (on-line) у процесі ВЕРХ. Більшість МІП застосованих у ТФЕ, синтезовано згідно методу не ковалентного імпринтингу полімеризацією в масі. [59, 60, 61, 62, 63].

1.4. Висновки з літературного огляду та обґрунтування мети роботи

Аналіз літературних джерел показав, що для експрес-визначення та контролю концентрації антибіотиків тетрациклінового ряду в водних розчинах значного поширення набули імунологічні та мікробіологічні тести, що є специфічними до кожної окремої групи речовин; наприклад, “Tetra Star” (чутливість до ТС ряду 60-80 мкг/кг, тривалість аналізу 10 хв.), “Beta Star Combo” (чутливість 2-50 мкг/кг, тривалість аналізу 5 хв.) тощо. Найпотужнішим методом контролю та селективного визначення антибактеріальних препаратів на рівні ГДК в питній воді і об’єктах навколишнього середовища є ВЕРХ із УФ-флуоресцентним та мас-спектрометричним детектуванням.

Один зі шляхів вирішення проблеми вилучення та визначення слідових кількостей суміші антибіотиків у водних розчинах та в складних матрицях, наприклад, продукти харчування – це розробка методів селективного вилучення аналітів із розчинів, що включають концентрування аналіту з подальшим хроматографічним [47, 48] визначенням. Комбінація сорбційного концентрування із подальшим визначенням в рідкій фазі після стадії елюювання сприяє підвищенню чутливості інструментальних методів.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Реагенти.

Табл.. 2.1. Розчинники, реагенти, що використані у дослідженнях та їх чистота

Реагенти	Кваліфікація	
DMSO(HPLC)	Sigma-Aldrich	99%
Метанол(HPLC)		
Ацетонітрил(HPLC)		
Етилацетат	хч	90%
Діетиловий ефір		
Тетрагідрофуран		
Діазобіциклоундецен	чда	95%
Алілбромід		
Гідрофосфат калію		
Хлорамфенікол		
Біс акриламід		
Метилметакрилат		
Гідроксіетилметакрилат		
Азобисизобутиронитрил	хч	90%
1-аліл-1,8-діазобіциклоундец-7-ен бромід		
Метиленовий синій	Sigma-Aldrich	95%
Тетрацеклін		
Хлортетрацеклін		
Доксициклін		
Соляна кислота	Sigma-Aldrich	37%
H ₃ PO ₃		85%
CH ₃ COOH		99%
H ₂ SO ₄		99%

Кислоти та луги. Розчин HCl концентрацією 0,1 моль/л готували з фіксаналу. Розчини кислоти більш високих концентрацій одержані при розведенні ізопієстичної (очищеної) HCl_{конц} (36,5 %). Очистку від іонів заліза проводили ізотермічною перегонкою за методикою [64].

Методика спектрофотометричного визначення барвника. Для побудови градувального графіка(ГГ) готували розчин з концентрацією метиленового синього: 80 мг/л, 8 мг/л, 4 мг/л, 2 мг/л, 1 мг/л. Оптичну густину розчинів барвнику вимірювали за допомогою спектрофотометра *Spekol 11* при довжині хвилі 660 нм в кюветі на 1 см. За результатами вимірювань будували ГГ в координатах $A=f(C)$, рис. 2.1.

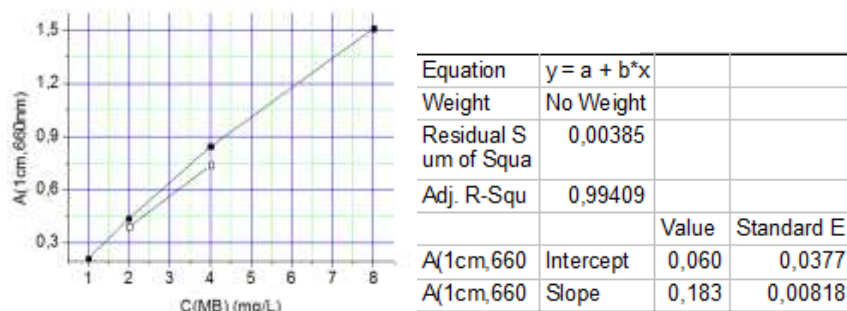


Рис. 2.1. Градувальна залежність та її апроксимаційні параметри для визначення концентрації МС у розчині.

Буферні розчини. Для хроматографічного визначення антибіотиків використовували буфер на основі KH_2PO_4 . Для цього 3,40 г калія дигідрофосфату розчиняють в 900 мл води. Доводять рН до 3,0 потенціометрично за допомогою H_3PO_4 концентрованої ($\approx 1,5$ мл) і доводять об'єм розчину водою до 1000.0 мл.

2.2. Апаратура:



2.3. Синтез іонної рідини

Йонну рідину (IL) 1-аліл-1,8-діазобіциклоундец-7-ен бромід (схема 2.1) отримували наступним чином: в круглодонну колбу оснащену магнітною мішалкою добавляли етилацетат потім DBU (діазобіциклоундецен) 1екв. до якого прикапували 5 екв. аліл броміду ($\text{CH}_2=\text{CHBr}$). Одержану суміш залишали при постійному перемішуванні на 12 годин при кімнатній температурі. Продукти реакції заливаємо діетиловим ефіром та фільтруємо на скляному фільтрі. Осад на фільтрі зтирали в ТГФ.

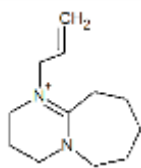


Схема 2.1. Будова 1-аліл-1,8-діазобіциклоундец-7-ен броміду

^1H NMR (DMSO) 1.64ppm (t,6H) 2.0ppm (s,2H) 2.80ppm(s,2H) 3.42ppm(s,2H) 3.52ppm(s,2H) 3.66ppm(s,2H) 4.2ppm(s,2H) 5.24ppm(t,2H) 5.86ppm(m,1H)

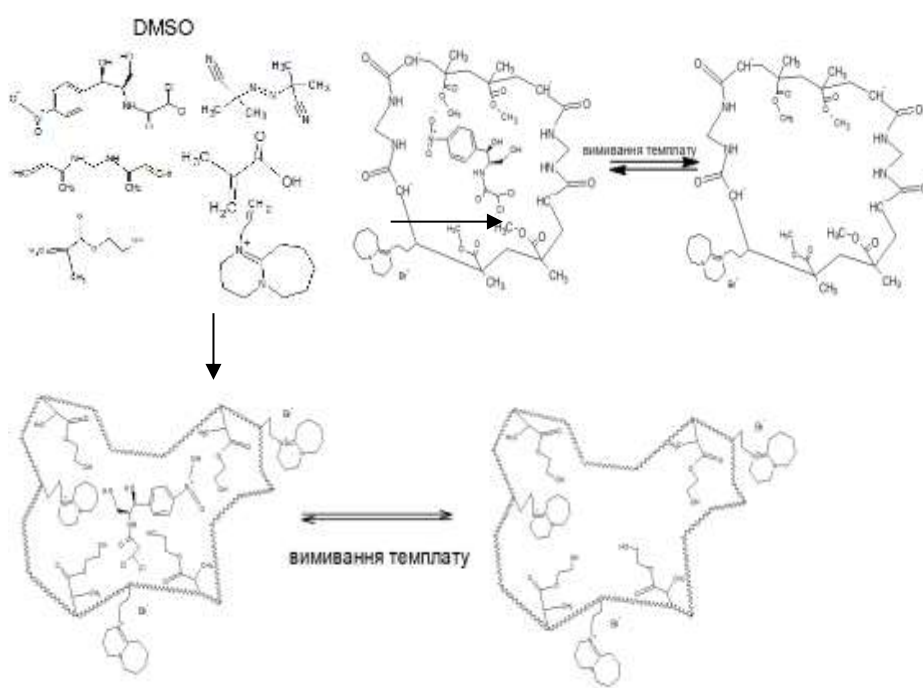
2.4. Методика синтезу зразків МІП різного складу

Синтез проводився за наступних умов: в трьохгорлий реактор на 50 мл в продували аргоном. Додавали хлорамфенікол (ХФ) 60мг (0,185 ммоль) потім біс акриламід (БАА) 291,8 мг (1,857 ммоль) функціонального мономеру метилметакрилату (ММК) або гідроксиетилметакрилату (HEMA) 74,3мг (0,743 ммоль), та додавали азобисізобутиронитрил (AIBN) 91.3 мг (0,555ммоль). В DMSO об'ємом 25 мл при постійному тоці аргону. Реакційну суміш (РС) нагрівали до 60°C і витримували 12-16 годин при постійному перемішуванні. Отримуємо білий драглистий осад. Суміш заливали розбавленим розчином соляної кислоти потім фільтрували і промивали водою з метою видалення темплату.

Табл. 2.2. Співвідношення компонентів РС при одержанні зразків МІП

Зразок	ХФ, МОЛЬ	БАА, МОЛЬ	ММК, МОЛЬ	AIBN, МОЛЬ	HEMA, МОЛЬ	S, м ² /г
MIP-HEMA	1	5	3	3	-	200
MIP-MMK	1	3	3	4	-	350
MIP-HEMA-IL	1	4,5	-	3	2	450
MIP-MMK-IL	1	6	3	3,5	-	480

Узагальнену схему синтезу МІП можна представити наступним чином:



2.5. Методика синтезу зразків МІП функціоналізованих ІЛ

Синтез проводився за наступних умов: в трьохгорлий реактор на 50мл продували аргоном. Додавали 1-аліл-1,8-діазобіциклоундец-7-ен бромід хлорамфенікол 60мг (0,185 ммоль) потім бісакриламід 291,8 мг (1,857 ммоль) функціонального мономеру 74,3 мг (0,743 ммоль).

AIBN 91.3 мг. (0,555 ммоль) DMSO в постійному тоці аргону. Реакційну суміш нагрівали до 70°C і витримували 7-8 годин . Отримуємо білий драглистий

осад. Суміш заливали розбавленим розчином соляної кислоти потім фільтрували і промивали водою з метою видалення темплату та промивали розчином броміду калію для переведення в бромідну форму ІР.

2.6. Методи характеристики та ідентифікації одержаних зразків МІП

Для ІЧ-спектроскопічних досліджень зразки пресували у вигляді таблеток з KBr (1:100) та знімали спектри на спектрометр Nicolet Nexus 470 в режимі пропускання. Ідентифікацію отриманої іонної рідини проводили методом ^1H NMR спектроскопії. Для цього зразок аналіту завантажували в стандартні ампули з борсилікатного скла діаметром 5 мм і розчиняли в DMSO. Вимірювання проводили на спектрометрі ^1H NMR Bruker з частотою 400 MHz. Термогравіметричний аналіз проводили на дериватографі Shimadzu DTG-60H в межах температурного діапазону 20-550°C в кюветі з алюмінію. Наважку зразку (3,5-10 мг) нагрівали зі швидкістю 10°C/мин в тоці Ar. Як еталон використовували $\text{Al}_2\text{O}_3 = 8.93 \text{ mg}$. Низькотемпературну ад/десорбцію азоту досліджували на приладі Sorptometer KELVIN 1042. Морфологію зразків вивчали за допомогою скануючий електронний мікроскоп JSM-6610LV (JEOL, Японія).

2.7. Дослідження сорбції метиленового синього на поверхні одержаних МІП у статичних умовах

Сорбцію проводили наступним чином: бралась однакова наважка для всіх зразків 0,058 г. До кожної з них додавали по 5мл розчину раніше приготовленого розчину барвника Метиленовий синій ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ та $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$). Одержані суспензії перемішували на магнітних мішалках протягом 1 год для встановлення рівноваги у системі. Сорбенти відокремлювали від розчинів фільтруванням через паперовий фільтр «синя стрічка».

Концентрацію метиленового синього в твердому стані визначали спектроскопією дифузійного відбиття на приладі Thermo Scientific Evolution 600.

Максимальну сорбційну ємність (q , ммоль/г) одержаних сорбентів по відношенню до визначуваних аналітів встановлювали за формулами:

$$q = (C_0 - C_q) \times V/m$$

де m - наважка сорбенту, г; V - об'єм розчину, л; C_0 , та C_q - початкова та рівноважна концентрації розчинів аналіту, відповідно, моль/л.

2.8. Дослідження сорбції тетрацикліну на поверхні одержаних МПІ у статичних та динамічних умовах

Вивчення сорбційних характеристик МПІ по відношенню до антибіотиків проводили у динамічних умовах при оптимальному рН їх сорбції. Для цього в картридж заповнений адсорбентом масою 0,1 г. пропускали 10 мл $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л розчину суміші антибіотиків зі швидкістю 0,2 мл/хв. Залишкову концентрацію дослідженої речовини визначали методом рідинної хроматографії.

Розділення проводили в обернено-фазовому варіанті ВЕРХ. Використовували хроматографічну колонку Discovery C18, 15cm·4,6mm. Сорбент: RP. C18. В якості рухомої фази використовували розчини на основі : фаза (А) KH_2PO_4 рН=3 фаза (В) Acetonitrile. Детектор UV: 260nm. Для приготування елюенту використовували деіонізовану воду (Milli Q).

Ізотерма адсорбції ТС. Сорбцію вивчали в статичних умовах на прикладі ТС наступним чином: бралась однакова наважка для всіх зразків 0,05 г. До кожної з них додавали по 5мл розчину раніше приготовленого розчину тетрацикліну ($1,0 \cdot 10^{-3}\text{M}$ та $1,0 \cdot 10^{-6}\text{M}$). Одержані суспензії перемішували на магнітних мішалках протягом 1 год для встановлення рівноваги у системі. Сорбенти відокремлювали від розчинів фільтруванням через паперовий фільтр «синя стрічка» з наступним пропусканням через мембранний фільтр. Одержані розчини аналізували на вміст антибіотику хроматографічно.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Синтез молекулярно імпринтованих полімерів

МІП отримували співполімеризацією функціонального і зшиваючого мономерів в присутності темплату(левоміцитину). Функціональні мономери під час синтезу утворюють комплекс з молекулою темплатом і при полімеризації функціональні групи цих мономерів фіксуються зшиваючим агентом в положенні, що відповідає будові перед полімеризаційного комплексу.

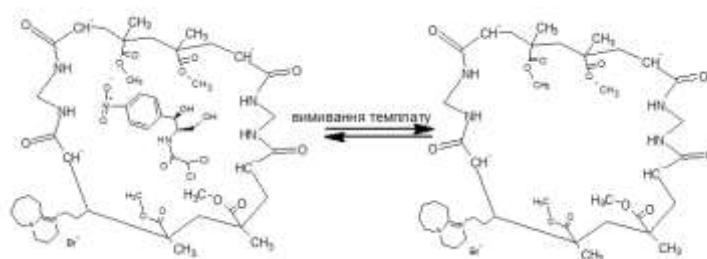


Схема 3.1. Схема вимивання темплатної молекули з продукту полімеризації МІП.

Одержані за такою схемою зразки МІП на основі двох функціональних мономерів метилметакрилату та гідроксиетилметакрилату (МІР-ММК МІР-НЕМА) та модифіковані іонною рідиною (IL) було використано для селективної твердофазної екстракції та попереднього концентрування слідових кількостей антибактеріальних препаратів тетрациклінового ряду з водних розчинів.

3.2. Характеризація та ідентифікація одержаних адсорбентів.

3.2.1. Скануюча електронна мікроскопія. Морфологію, структуру та дисперсність одержаних адсорбентів досліджували на електронному мікроскопі (рис. 3.2).

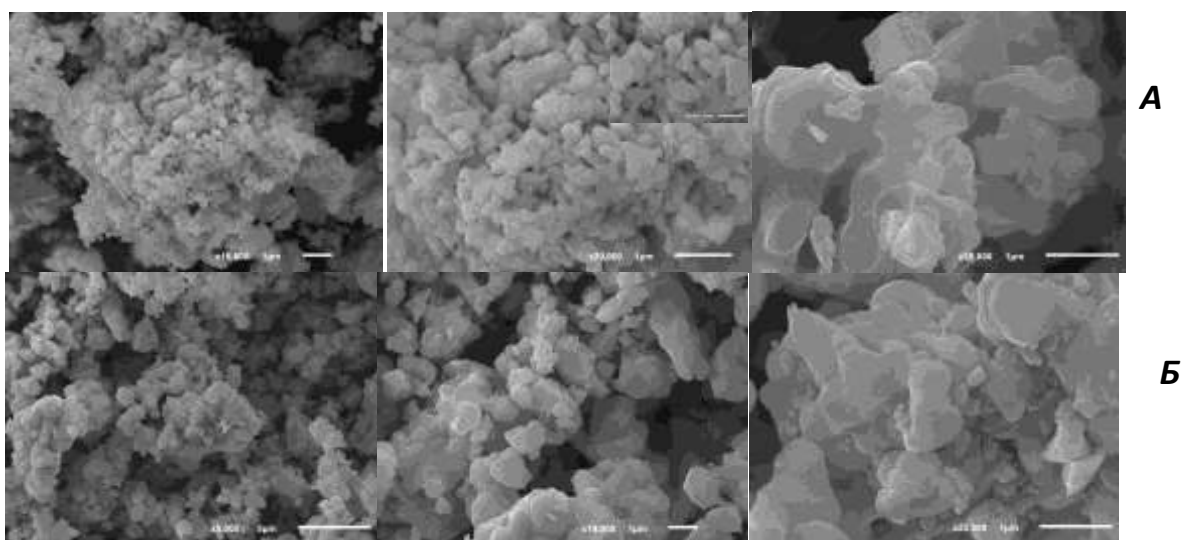


Рис. 3.2. СЕМ мікрофотографії синтезованих МІП: МІП-НЕМА(А) та МІП-ММК(Б)

Морфологія одержаних матеріалів згідно результатів скануючої електронної мікроскопії є впорядкованою з близькою до сферичної 3D-структурою з середнім розміром часток 70 нм до кількох мкм. Крім того, отримані МІП мають різну морфологію в залежності від використаного функціонального мономеру: МІП-НЕМА- більш сферичної будови, тоді як ММК- ближче до слоїстої структури, що свідчить про можливість гнучкого регулювання їх морфології в широкому діапазоні в залежності від області їх застосування.

3.2.2. Термогравіметрія (ТГА). Термогравіметричний аналіз застосовували для визначення співвідношення функціональних фрагментів МІП та їх термічної стабільності. Метод є універсальним та одним з найпростіших для кількісного аналізу речовини будь-якої природи. Значна втрата маси на ТГ-кривій і присутність теплового ефекту на ДТА – кривих для отриманих МІП в середньотемпературному інтервалі до 150 °С дозволяє зробити висновок, що в цьому температурному інтервалі відбувається дегідратація фізично зв'язаної води з втратою маси близько 20 %. Практично не спостерігається втрата маси в діапазоні темп 120-320°С. Тобто за даних умов проведення досліджень не вдалося зафіксувати процесів пов'язаних з деструкцією полімерної матриці в цьому

температурному інтервалі. Крива ТГА зразку гідроксиетилметакрилату на відміну від метилметакрилату має перегин близько 15 % і втрату маси 1,75 мг. Такий ефект може бути пов'язаний з різним механізмом видалення функціонального мономеру з полімерної матриці (рис. 3.3).

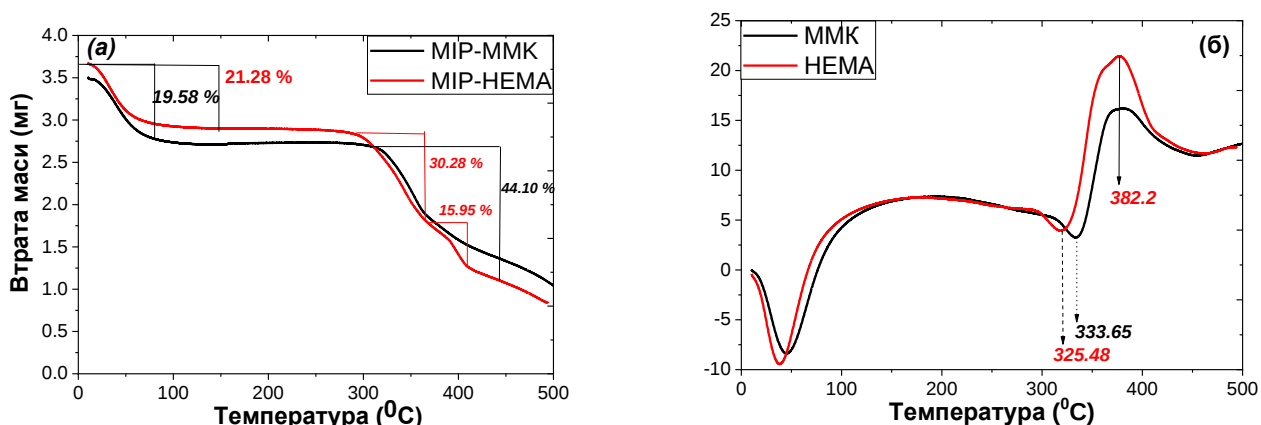


Рис. 3.3. ТГА(а) та ДТА (б) криві синтезованих зразків MIP-MMK та MIP-HEMA.

Таким чином, одержані полімерні матеріали є термічно стабільними до 300 °C.

3.2.3. Ізотерми низько-температурної ад/десорбції N_2 . З метою дослідження структурно-сорбційних характеристик одержаних зразків проведені низько-температурні вимірювання на сорбції малих молекул (рис. 3.4).

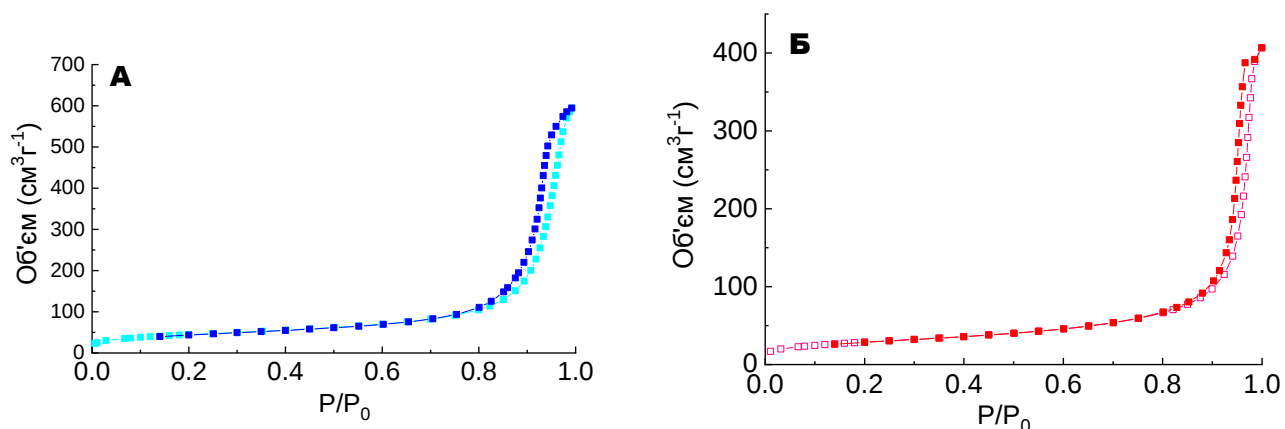


Рис. 3.4. Ізотерми ад/десорбції N_2 для MIP-HEMA (А) и MIP-MHEMA

Одержані матеріали мають розвинену питому площу поверхні до 480 м²/г та розміром пор до 10 нм (детальніше див. табл. 2.2). Ї можуть бути використані як твердофазні реагенти у методах розділення та концентрування.

3.2.4. ІЧ-спектроскопія. Для доведення хімічної структури отриманих зразків МІП були проведені ІЧ спектроскопічні дослідження (рис. 3.5).

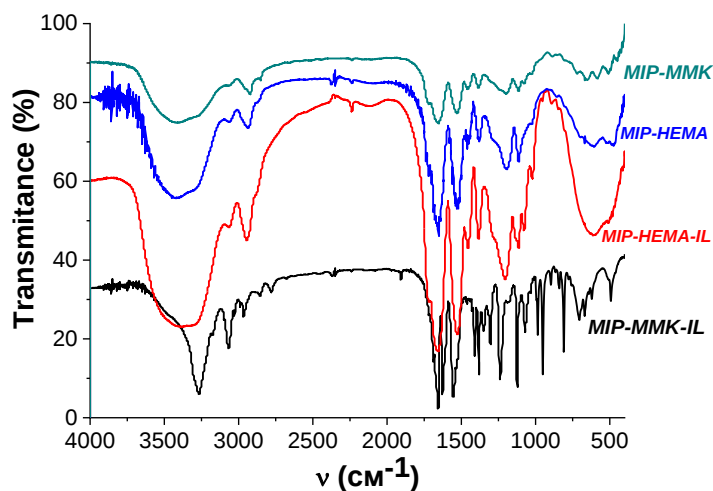


Рис 3.5. ІЧ-спектри синтезованих МІП.

Спільною особливістю чотирьох одержаних сорбентів є характеристична смуга амідного зв'язку (-CONH₂); при частоті 1720 см⁻¹, уширена смуга поглинання в районі 3500 см⁻¹ яка відноситься до валентних коливань (OH) та (NH) інтенсивність яких змінюється від вмісту крос-лінкера. В спектрі МІП-ММК спостерігається смуга високої інтенсивності яка відноситься до валентних коливань C=C 1635 см⁻¹ що є свідченням присутності непрореагованого мномеру. Поглинання з частотами близько 1640 і 940 см⁻¹ мають дуже низьку інтенсивність, що свідчить про високу конверсію мономерів і підтверджує успішну конверсію. У спектрах відсутні смуги поглинання левоміцетину, тобто молекули темплату були повністю видалені при відмиванні зразків. Остаточний контроль вимивання антибіотику-темплату аналізували хроматографічно.

3.3. Дослідження адсорбції метиленового синього на поверхні одержаних МІП

Для одержання даних щодо можливих механізмів сорбції аналітів на поверхні одержаних зразків була досліджена сорбція метиленового синього, як прийнято в літературі модельного аналіту при дослідження сорбційних параметрів нового матеріалу [65]. Для визначення оптимальної кількості абсорбуючого матеріалу, в 150 мг/л розчину МС додавали різну кількість зразків (5-100 мг). Сорбційна ємність барвника на поверхні адсорбенту зменшується з 957,1 мг/г до 69,6 мг/г, оскільки доза наближається до 100 мг, після чого стає постійною. Зменшення адсорбційної здатності відбувається через збільшення наважки адсорбента.

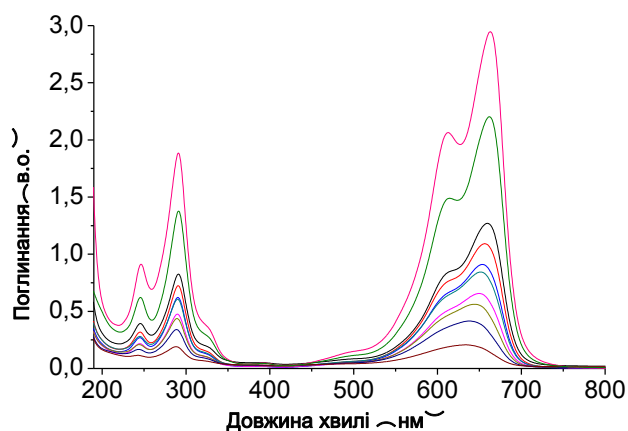
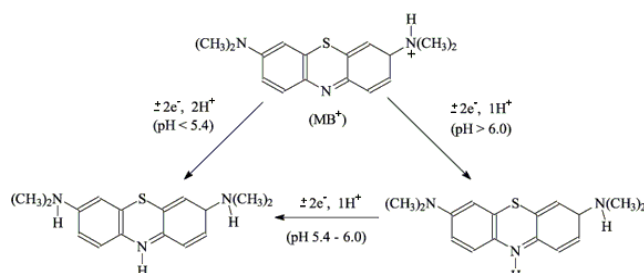


Рис. 3.6. Спектри дифузійного відбиття зразків МІП-ММК після контакту розчином МС при різних наважках адсорбенту (5-100 мг)

Як показано на рис. 3.6, максимальна адсорбція виникла при 100 мг наважки. Це можна пояснити збільшенням площі поверхні адсорбенту та наявністю більшої кількості адсорбційних ділянок. Проте подальше збільшення кількості абсорбуючого матеріалу спричиняло зменшення здатності до видалення адсорбенту при постійній концентрації та вмісту барвника через насичення адсорбційних ділянок адсорбенту.

Найкраще сорбція метиленового синього на поверхні МІП відбувається при рН 6,5-7,0. При рН 7.1 спостерігається найбільша інтенсивність поглинання МІП-

ММК. Оскільки метиленовий синій в нейтральному середовищі проявляє основні властивості тобто має позитивно заряджений іон, який адсорбується переважно на електронейтральних (кислого характеру сорбентах) то і сорбція його зростає при зростанні рН:



Показано, що СОЄ зразків МІР-ММК-ІІІ по відношенню до барвника удвічі більша, ніж для МІР-ММК

3.4. Дослідження адсорбції антибіотиків тетрациклінового ряду на поверхні одержаних МІІІ

Попереднє вилучення та концентрування – невід’ємна частина процесу визначення слідових кількостей антибіотиків у різних об’єктах. В наш час для визначення антибіотиків широко розповсюдженні всі види екстракції, в том числі мікроекстракція. Однак, за рахунок дешевизни, простоти та доступності твердо фазна екстракція залишається найпоширенішим. Для швидкого вилучення використовують твердофазну екстракцію або її мініатюризований варіант – “Pipette –tip” твердофазна мікроекстракція з можливістю онлайн концентрування та визначення.

Залежність сорбції ТС від рН. Для тетрацикліну процес зв’язування з адсорбентами суттєво залежить від рН середовища (схема 3.2)

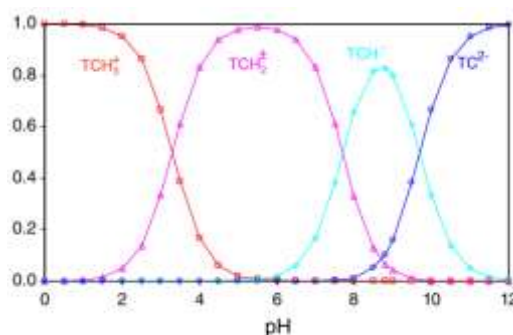


Схема 3.2. Розподіл форм ТС від рН середовища.

Молекула ТС має різні форми залежно від рН розчину, коли рН дорівнює 4, ТС існує як катіон (TCH_3^+), через протонізацію групи диметиламмонію. При рН між 3,5 та 7,5 ТС існує як цвіттеріон (TCH_2^0). При рН вище 7, ТС існує як аніон (TCH^- або TC^{2-}) через втрату протонів з трикарбонільної системи та фенольного дикетонного фрагменту.

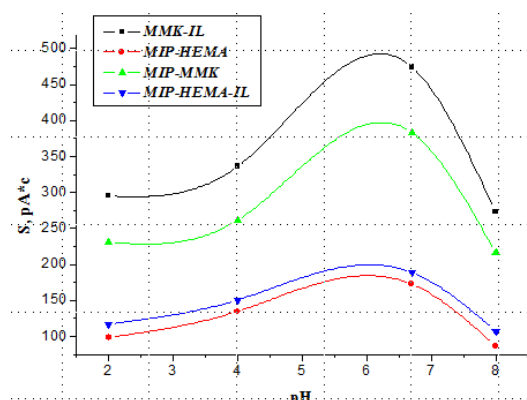


Рис. 3.7. Ефект рН на адсорбцію ТС на поверхні одержаних МІП

Збільшуючи рН від 4 до 7, адсорбція ТС на одержаних МІП зростає (рис. 3.7). Процес адсорбції ТС можливо обумовлений неелектростатично-дисперсійною взаємодією між насипними системами на поверхні МІП і молекулами ТС, що містять як бензольні кільця, так і подвійні смуги ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$), або гідрофобні та π - π електронні донорно-акцепторних взаємодій між групами одержаних МІП і ТС. Взаємодія може відбуватися між протонованою аміногрупою кільця молекули ТС

та ІІ або гідроксильними групами поверхні МІІ. Максимальна адсорбція відбувається при рН близько 6,0. Для одержання інформації щодо механізму сорбції ТС та сорбційних властивостей одержаних сорбентів для них були побудовані ізотерми адсорбції. За оптимальних умов вилучення максимальна сорбційна ємність адсорбентів по відношенню до тетрацикліну: для зразка МІІ-ММК–ІІ становить - 0,75 ммоль/г, а для МІІ-ММК - 0.35 ммоль/г. Подальше збільшення сорбції ТС може бути викликане агрегацією молекул антибіотику на поверхні полімерів.

3.5. МІІ для твердофазної екстракції з хроматографічним детектуванням

Розділення та визначення п'яти антибіотиків тетрациклінової групи в присутності хлорамфеніколу проводили на модульному рідинному хроматографі Agilent 1280 з діодноматричним детектором (колонка Eclipse XDB-C-18, 4.6 мм x 150 мм). Як елюент використовували метанол(або 1% мурашину кислоту, або 3,0 М фосфатний буфер) і ацетонітрил (Sigma-Aldrich). Елюювання проводили в режимі лінійного градієнту, швидкість потоку 2 мл/хв. Левоміцетин характеризувався максимумом при поглинання в ближній УФ-області при 278 нм. УФ-детектування проводили при довжині хвилі 278 нм (чутливіше детектування) та 215 нм, а для тетрацикліну -290 нм. Як аналітичний сигнал використовували висоту піку (відн. одн). При оптимізації умов для динамічної ТФЕ у поліетиленовому картриджі заповненому одержаними зразками МІІ змінювали масу сорбенту, об'єм аналізованого розчину, концентрацію аналізу, природу та об'єм елюенту. Для мінімізації об'єму елюенту та часу екстракції виявилось оптимальним використання сорбенту з масою 0,2-0,25 г. Перед пропусканням розчину аналізу необхідно промити колонку неменше, ніж 2 мл дистильованої води для рівномірного ущільнення шару адсорбенту. Оптимізовано умови

хроматографічного розділення суміші антибіотиків на рівні 10^{-7} - 10^{-6} моль/л (рис. 3.10).

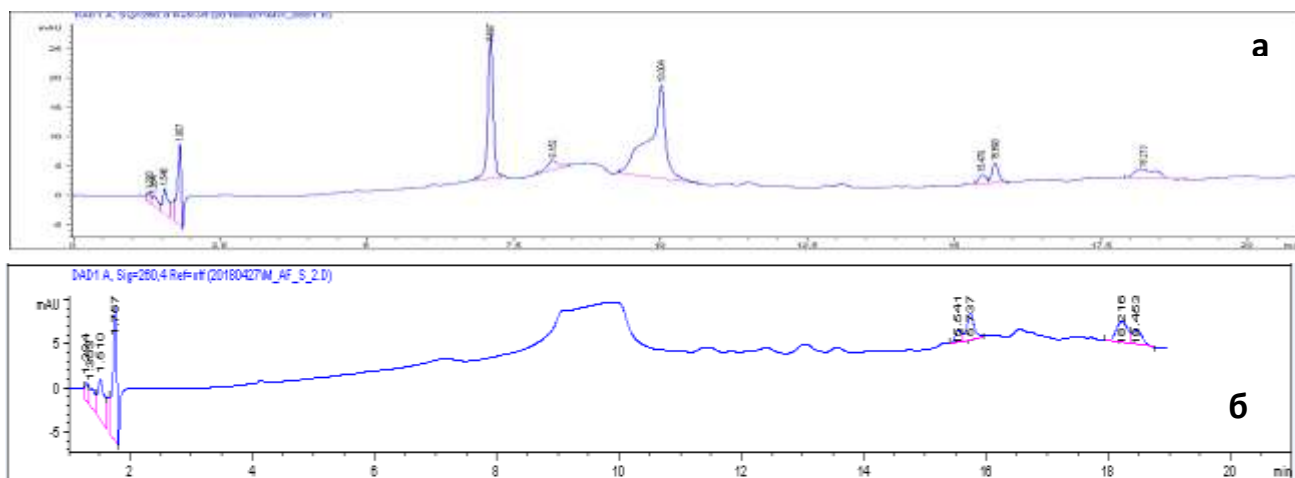


Рис. 3.10. Хроматограми суміші антибактеріальних препаратів (а) та після ТФЕ на картриджах з МІР-ММК-ІІІ (б).

Хроматограма модельної суміші антибактеріальних препаратів тетрациклінового ряду та левоміцетину характеризується 5 піками. Для віднесення піків на хроматограмах суміші аналітів, попередньо отримували хроматограми 10^{-7} - 10^{-8} моль/л водних розчинів індивідуальних антибіотиків. Вміст антибіотиків у пробі знаходили з градувального графіку. Тобто за прийнятний час аналізу (20 хв) можливе розділення п'ятикомпонентної суміші антибактеріальних препаратів: тетрациклін (7.4 хв), окситетрациклін (8,4 хв), хлортетрациклін (10 хв), та хлорамфенікол (16,7 хв), доксіциклін (18,4 хв). Сорбційне вилучення аналітів на синтезованих матеріалах в порівнянні з класичною ТФЕ вивчали з модельних сумішей антибактеріальних препаратів тетрациклінового ряду в присутності левоміцетину (рис. 3.10), спостерігається майже селективне вилучення всіх зазначених антибіотиків з їх суміші.

Показано, імпринтинг-ефект для синтезованих МІП спостерігається при порівнянні хроматограм суміші препаратів на імпринтованих та модифікованих ІЛ зразках МІП.

3.6. Умови десорбції тетрацикліну на поверхні одержаних МІП у статичних та динамічних умовах

Десорбцію тетрацикліну з поверхні одержаних МІП у статичному режимі проводили з використанням наступних елюентів: HCl (0.5 М, 1 М, 2 М, 5 М), H₃PO₄ (1 М, 15%), HCOOH, CaCl₂, KCl (3 М), H₂SO₄ (0.5 М; 2 М).

Найкраща десорбція ТС з поверхні МІР-ММК відбувається в соляній кислоті. Зі зростанням концентрації соляної кислоти десорбція проходить швидше так при концентрації HCl 0,5 М десорбція відбувається протягом 12 год коли 5 М за 20 хв. Також була проведена десорбція в оцтовій, сірчаній та фосфатній кислотах яка відбувається повільно на відміну від HCl, можлива десорбція в динамічному режимі.

ВИСНОВКИ:

- Синтезовано ряд молекулярно імпринтованих полімерів на основі хлорамфеніколу, як темплатної молекули, які різняться гідрофільними властивостями, природою закріплених функціональних груп (МІР-НЕМА та МІР-ММК) та сорбційно-структурними характеристиками. Склад та будова одержаних нових полімерних адсорбентів комплексно охарактеризована фізико-хімічними методами.
- Оптимізовано умови хроматографічного розділення сумішей антибактеріальних препаратів тетрациклінового ряду в присутності хлорамфеніколу(левоміцетину) на рівні 10^{-8} - 10^{-7} моль/л. Методика апробована для аналізу модельних сумішей антибактеріальних препаратів й може бути використана в рутинному хроматографічному аналізі при аналізі харчових продуктів на вміст антибіотиків з попередньою пробопідготовкою відповідної проби.
- Показано можливість застосування одержаних адсорбентів (МІР-ММК, та МІР-НЕМА) для сорбційного концентрування та вилучення антибіотиків тетрациклінового ряду з водних розчинів. Встановлено, що тетрациклін кількісно вилучається в інтервалі рН 6.0-7.0, а максимальна сорбційна ємність по тетрацикліну досягається - 0,75 ммоль/г.

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ЗАПРОПОНОВАНОГО ПІДХОДУ:

- Методологія проста у виконанні, має гнучкий механізм регулювання властивостей отриманих матеріалів і може бути використана для вилучення інших аналітів, наприклад, інших класів антибактеріальних препаратів в м'ясних продуктах, медові, молочних продуктах і т.д.
- Одержані полімерні адсорбенти можуть бути використані для створення нових картриджів у кулерах питної води для вилучення токсичних антибіотиків, що додають у бутильовану воду з метою збереження її мікробіологічної чистоти. Такі фільтри можуть поєднувати у собі високу чутливість та селективність до антибіотиків зі стабільністю, простотою використання та невисокою вартістю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Alekshum M.N., Levy S.B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2067-2075.
2. Наказ Міністерства охорони здоров'я №629 від 19.09.2006 «Про державну реєстрацію (перереєстрації) лікарських засобів та внесення змін у реєстраційні матеріали»
3. Товстенко Ю.В., Деркач Т.М., Ткач В.І., Аналітичний моніторинг вмісту окситетрацекліну гідро хлориду в молочних продуктах електрохімічними методами. *Методы и объекты химического анализа* 2008. 3(2), С.192.
4. Кальницкая О.И. Ветеринарно-санитарная оценка мяса животных и птицы, содержащего антибиотиков. *Аграрный вестник Урала.* 2008. 7(49).С.-50-53.
5. Пономарев П.Х., Сирохман І.В. Безпека харчових продуктів та продовольчої сировини// Київ. Наукова думка. 1998. С.435.
6. Головка А.М., Пінчук Н.Г., Дмитрієва Г.В., Кісельова Т.Ф., Розробка засобу контролювання залишкових кількостей протимікробних препаратів в продукції тваринництва біологічним методом. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України.* 2013. (3)..
7. Янович Д.В., Засадна З.С. Оцінка придатності методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів у продуктах тваринного походження. *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок.* 2014. 15(2-3), С. 310-319.
8. Кальницкая О.И. Методы определения антибиотиков. *Молочная промышленность.* 2008. 6. С.82-83.
9. Schenck F., Callery P. Chromatographic methods of analysis in milk. *J. Chrom. A,* 1998, 812. P.99-109

-
10. Fritz J.W., Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by HPLC. *Food Chemistry*, 2007, 105. P.1297-1301.
 11. Pena A., Pelantova N. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *J.Agric Food Chem.*, 2005, 53. P.3784-3788.
 12. Cinquina A.L., Longo F. Validation of a HPLC method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chrom. B*, 2003, 987. P.227-233.
 13. Pena A., Pelantova N. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *J. Agric Food Chem.*, 2005, 53. P.3784-3788.
 14. Fritz J.W., Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by HPLC. *Food Chemistry*, 2007, 105. P.1297-1301.
 15. HO C., Della W.M. Sin, Determination and on-line clean-up of (fluoro) quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *J. Chrom. A*, 2004, 1061. P.123-131.
 16. Mena M.L., Agui L. Molecularly imprinted polymers for on-line clean-up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination. *Anal. Bioanal. Chem*, 2003, 376. P. 18-25.
 17. Levi R., McNiven Sc., Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Anal.Chem*, 1997. 69.-P.2017-2021.
 18. Schenck F., Callery P. Chromatographic methods of analysis in milk. *J. Chrom. A*, 1998, 812. P.99-109.
 19. Cinquina A.L., Longo F. Validation of a HPLC method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chrom. B*, 2003, 987.-P.227-233.

-
20. Hamscher G., Sczesny S. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem*, 2002, 74. P.1509-1518.
21. Rodrigues E., Moreno-Bondi M.D., Marazuela M.D. Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography. *Food Chem*, 2011, 127(3). P. 1354-1360.
22. Pfenning A. etc. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol in shrimp tissue by GC-ECD. *J. AOAC International*. 2000. 83(1). P.26-30.
23. Shen Hao-Yu, Jiang Hai-liang, Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. *Analyt. Chim. Acta*. 2005, 535. P.33-41.
24. Shen J., Xia Xi. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florhenicol and florfenicole amine in poultry and porcine muscle and liver by GC-NCI-MS. *J. Chrom. B*. 2009, 887. P. 1523-1529.
25. Pfenning A. et. Al, Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol in shrimp tissue by GC-ECD. *J. AOAC International*. 2000, 83(1). P.26-30.
26. Li Peng, Yueming QIU Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in animal tissues by GC-MS. *Chinese journal of chromatography*. 2006. 24(1). P.14-18.
27. Shen J., Xia Xi Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florhenicol and florfenicole amine in poultry and porcine muscle and liver by GC-NCI-MS. *J. Chrom. B*. 2009, 887. P.1523-1529.

-
28. Oka H., Ikai Y., Kawamura N. Improvement of chemical analysis of antibiotics:simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. *J. Chrom.* 1987, 400. P.285
29. Oka H., Ikai Y., Kawamura N. Improvement of chemical analysis of antibiotics:simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. *J. Chrom.* 1987, 400.P.253
30. Oka H., Uno K., Harada KI. Improvement of the chemical analysis of antibiotics I.Simple method for the analysis of tetracycline on silica gel HPLC. *J. Chrom.-* 1983,260.-P.457.
31. Oka H., Suzuki M. Improvement of chemical analysis antibiotics VII. Comparison of analytical methods for determination of impurities in tetracycline pharmaceutical preparations. *J. Chrom.* 1984, 314. P.303.
32. Oka H., Ito Y.,Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chrom. A.* 2000, 882.-P.112.
33. Ryan J.J., Dupont J.A. Chemical analysis of tetracycline residues in animal tissues. *J Assoc Off Anal Chem.* 57(4):828-31.
34. Simmons D.L., Woo H.S.L. Quantative determination by thin-layer chromatography of anhydrotetracyclines in degraded tetracycline tablets. *Pharm.Sci.* 1966, 55. P.1331.
35. Valcavi U., Brandt A. Chemical modifications in the tetracycline series. *J. Antibiotics.* 1981, 34. P.34.
36. Yuan J., Wan G. Lanthanide-based luminescence probes and time-resolved luminescence bioassays. *Trends in Analytical Chemistry.* 2006, 5. p.25
37. Rodrí'guez-Dí'az R.C., Aguilar-Caballos M.P., Gómez-Hens A. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in biological fluids based on dual-lanthanide sensitised luminescence using dry reagent chemical technology. *Analyt. Chim. Acta.* 2003, 494, p. 55–62.

-
38. Chi-Lap Kuong. Tsai-Jung Yu, Yu-Chie Chen Microwave-assisted sensing of tetracycline using europium-sensitized luminescence fibers as probes. *Anal Bioanal. Chem.* 2009. 395:1433–1439.
39. Витюкова Е.О., Егорова А.В., Бельтюкова С.В., Малинка Е.В. Определение цефтриаксона с использованием сенсibilизированной люминесценции европия. *Вісник ОНУ.* 2004. 9(6). с. 97
40. Chen G. Li Q., Liu G., Qin F., Du Y. Lanthanide-Sensitized Luminescence Instrumentation and Methods for Analysis of Tetracycline and Fluoroquinolone Residues in Foods. *Physical Methods in Food Analysis*, Chapter 4, p. 49-63
41. Feng P., Huang Z.C. Li Y.F Total internal reflected resonance light scattering determination of chlortetracycline in body fluid with the complex cation of chlortetracycline-europium-trioctyl phosphine oxide at the water/tetrachloromethane interface *Anal Chem.* 2001, 73. 4307.
42. David V., Marin Saez R.M. Enhanced chemiluminescent determination of chloramphenicol and related nitro compounds by on-line photochemical reaction. *The Analyst.*, 2000, 125. P.1313-1319.
43. Ding F., Zhao G., Chloramphenicol binding to human serum albumin :Determination of binding constants and binding sites by steady-state fluorescence. *J. Molecular Structure*, 2009, 929. P.159-166.
44. M.A. Ghandour, A.M.M. Ali Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Tetracycline and Oxytetracycline. *Analytical Letters.* 2014, 26. P.1039.
45. Doan L., Riedel B.E. Polarographic estimation of Antibiotics. *Can Pharm J* 1963, 96. P. 109.
46. Ghandour M., Ali A. Adsorptive stripping voltammetric determination of tetracycline and oxytetracycline. *Analytical letters*, 1991, 24(12), P. 2171-2186.

-
47. Agui L., Guzman A. Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. *Analyt. Chim. Acta*, 2002, 461. P. 65-73.
48. Alizadeh T., Ganjali M.R. Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode with molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry*. 2012, 130. P.1108-1114.
49. Xiao F., Zhao F. Sensitive determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube-gold nanoparticle-ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. *Analyt. Chim. Acta*. 2007, 596. P.79-85.
50. Удалова А.Ю., Апяри В.В. Выбор сорбента для концентрирования окситетрациклина из растворов. *Вестн. Москв. Ун-та. Сер.2 Химия*. 2013. 54(4). С.221-226.
51. M.E. Lindsey, Thurman E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using SPE and LC-MS. *Anal. Chem*. 2001, 73. P.4640-4646.
52. Koster M.E.H., Crescenzi C., Hoedt W.D., Ensing K., de Jong G. J. Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. *Anal. Chem*. 2001. 73(13). P. 3140–3145.
53. Masque N., Marce R.M., Borrul F. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem*. 2001. 20(9). P. 477–486.
54. Owens P.K., Karlsson L., Lutz E. S.M., Andersson L.I. Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem*. 1999. 18(3), P. 146–154.
55. Masque N., Marce R.M., Borrul F. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem*. 2001. 20(9) P. 477–486.

-
56. Owens P.K., Karlsson L., Lutz E.S.M., Andersson L.I. Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.* 1999. 18(3). P. 146–154.
57. Ferrer I., Barcello D. Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 1999. 18(3). P. 180–192.
58. Poole C.F. New trends in solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* 2003. 22(6). P. 362–373.
59. Sellergren B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. *Anal. Chem.* 1994. 66(9). P. 1578–1582.
60. Suedee R., Seechamnanturakit V., Canyuk B., Ovatiarnporn C., Martin G.P. Temperature sensitive dopamine-imprinted (N,N'-methylene-bis-acrylamide cross-linked) polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine. *J. Chrom. A.* 2006. 1114(2). P. 239–249.
61. Cacho C., Turiel E., Martin-Esteban A., Perez-Conde C., Camara C. Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly- imprinted solid-phase extraction using a propazineimprinted polymer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. 376(4). P. 491–496.
62. Piletsky S., Piletska E., Karim K., Foster G., Legge C., Turner A. Custom synthesis of molecular imprinted polymers for biotechnological application: Preparation of a polymer selective for tylosin. *Anal. Chim. Acta.* 2004. 504(1). P. 123–130.
63. Farrington K., Magner E., Regan F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta.* 2006. 566(1). P. 60–68.
64. Лельчук Ю.Л. Глуховская Р.Д. Очистка соляной кислоты от следов железа. *Известия Томского ордена трудового красного знамени политехнического института имени С.М. Кирова.* 1970, 63. P.134.

65. Elimbi, A., Njouonkou, S., Ndi Nsami, J. *et al.* Adsorption test of methylene blue onto porous powdered ceramics obtained from mixtures of kaolin–bauxite and kaolin–oyster shell. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2019, 16, 1337–1350.