

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

*На правах рукописи*



МЕЛЕХИН АРТЕМ ОЛЕГОВИЧ

**ВЭЖХ-МС/МС ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ  
НИТРОФУРАНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО ДЕРИВАТИЗИРУЮЩЕГО  
АГЕНТА, СВЕРХСШИТОГО И МАГНИТНОГО  
СВЕРХСШИТОГО ПОЛИСТИРОЛОВ**

Специальность –1.4.2 – Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

**Толмачева Вероника Владимировна**

*кандидат химических наук*

**Дмитриенко Станислава Григорьевна**

*доктор химических наук, профессор*

Официальные оппоненты:

**Нестеренко Павел Николаевич**

*доктор химических наук, профессор,*

*ФГБОУ ВО «Московский*

*государственный университет имени*

*М.В. Ломоносова», химический*

*факультет, кафедра физической химии,*

*ведущий научный сотрудник*

**Амелин Василий Григорьевич**

*доктор химических наук, профессор,*

*ФГБОУ ВО «Владимирский*

*государственный университет имени*

*Александра Григорьевича и Николая*

*Григорьевича Столетовых», профессор*

**Доронин Сергей Юрьевич**

*доктор химических наук, профессор,*

*ФГБОУ ВО «Саратовский*

*государственный университет имени Н.*

*Г. Чернышевского», профессор*

Защита диссертации состоится «22» марта 2023 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: [dissovet02.00.02@mail.ru](mailto:dissovet02.00.02@mail.ru).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/520784431>

Автореферат разослан «01» февраля 2023 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Ананьева И.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Нитрофураны (НФ) представляют собой класс синтетических антибактериальных средств, которые до середины 90-х годов прошлого столетия широко применялись для лечения животных, а также в качестве кормовых добавок в животноводстве и аквакультуре. В отличие от большинства других лекарственных веществ, при попадании в организм животных НФ в течение нескольких часов быстро метаболизируются. Метаболиты НФ остаются в продуктах животного происхождения в течение длительного времени в виде связанных с белками соединений. После того как было установлено, что метаболиты НФ обладают мутагенными и канцерогенными свойствами, во многих странах, включая Россию, использование НФ в ветеринарии было полностью запрещено. В Европейском и Таможенном союзах установлены максимально допустимые уровни (МДУ) остаточных количеств метаболитов НФ в продуктах питания (1 мкг/кг). Однако данные мониторинга качества пищевых продуктов свидетельствуют о том, что, несмотря на установленные законодательством запреты, их продолжают использовать не только в развивающихся странах, но и в Европейском союзе, что обусловлено их высокой антибактериальной активностью, дешевизной и доступностью. В связи с этим задача определения метаболитов НФ в пищевых продуктах животного происхождения на уровне МДУ по-прежнему остается актуальной.

Проблемы, возникающие при определении метаболитов НФ, в основном связаны с пробоподготовкой: необходимостью проведения кислотного гидролиза для выделения метаболитов, связанных с белками, дериватизацией – для получения более гидрофобных производных и дополнительными методами очистки – для удаления мешающих компонентов и минимизации матричных эффектов. И, наконец, еще одна проблема связана с дороговизной стандартных образцов метаболитов и продуктов их дериватизации. На этом фоне перспективен поиск как новых дериватирующих агентов, так и новых вариантов пробоподготовки, в том числе основанных на твердофазной (ТФЭ) и магнитной твердофазной экстракции (МТФЭ).

В настоящей работе для дериватизации метаболитов нитрофуранов мы предлагаем использовать 5-нитро-2-фуральдегид (5-НФА), а для очистки гидролизата – сверхшитый полистирол (ССПС) и магнитный ССПС, которые ранее для этих целей не применяли. Важно отметить, что метаболиты нитрофуранов взаимодействуют с 5-НФА с образованием соответствующих нитрофуранов. Таким образом при использовании этого дериватирующего агента становится возможным заранее выбрать условия пробоподготовки и определения с помощью нитрофуранов, что ускоряет анализ и снижает его стоимость.

**Цель работы** состояла в разработке ВЭЖХ-МС/МС способов определения метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах, основанных на использовании 5-нитро-2-фуральдегида, сверхшитого и магнитного сверхшитого полистиролов, а

также в поиске новых подходов к многокомпонентному выделению и определению лекарственных веществ в этих объектах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выбрать условия дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фууральдегидом и с применением ВЭЖХ-МС/МС идентифицировать продукты дериватизации.

2. Сократить времена кислотного гидролиза и дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фууральдегидом; сравнить полученные результаты с результатами, полученными по официальной методике, регламентированной действующим ГОСТ 32014-2012.

3. Исследовать особенности сорбции нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах в зависимости от условий извлечения (статический и динамический режимы) и природы сорбатов; выявить факторы, влияющие на степень извлечения; оценить возможность применения этих сорбентов для группового выделения и концентрирования нитрофуранов методами ТФЭ и МТФЭ.

4. Разработать способы определения метаболитов нитрофуранов в различных пищевых продуктах с использованием 5-НФА в качестве дериватизационного агента и ССПС или магнитного ССПС в качестве сорбентов для очистки гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки пищевых продуктов, методами ТФЭ или МТФЭ соответственно; валидировать разработанные методики.

5. Применить магнитный ССПС для многокомпонентного выделения метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами из меда методом МТФЭ перед их определением методом ВЭЖХ-МС/МС.

6. Применить магнитный ССПС для многокомпонентного выделения нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами из молока методом МТФЭ перед их определением методом ВЭЖХ-МС/МС.

**Научная новизна.** Предложено использовать 5-нитро-2-фууральдегид для дериватизации метаболитов нитрофуранов при их определении в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложен способ быстрой пробоподготовки образцов пищевых продуктов при определении в них метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС. Выявлены и обсуждены особенности сорбционного поведения нитрофуранов на ССПС и магнитном ССПС. Предложено использовать ССПС и магнитный ССПС для группового выделения нитрофуранов из гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки пищевых продуктов, в том числе совместно с другими лекарственными веществами, перед их определением методом ВЭЖХ-МС/МС.

**Практическая значимость.** Продемонстрированы возможности использования 5-НФА для дериватизации метаболитов нитрофуранов, а ССПС и магнитного ССПС для сорбционной очистки гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки пищевых продуктов. Разработаны и валидированы методики ВЭЖХ-МС/МС

определения четырёх метаболитов нитрофуранов (3-амино-2-оксазолидинон, 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон, 1-аминогидантоин, семикарбазид) в меде, куриных яйцах, курином мясе и субпродуктах включающие очистку гидролизатов методом ТФЭ или МТФЭ. Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС определения четырёх нитрофуранов (фуразолидон, нитрофуразон, нитрофурантоин, фуралтодон) в молоке одновременно с 128 другими лекарственными веществами, включающая многокомпонентное выделение лекарств методом МТФЭ на магнитном ССПС. Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС определения четырёх метаболитов нитрофуранов в меде одновременно с 27 другими лекарственными веществами, после быстрого гидролиза-дериватизации и очистки гидролизатов методом МТФЭ. Разработанные методики могут найти применение в практике лабораторий, занимающихся анализом пищевых продуктов.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. 5-Нитро-2-фуральдегид можно использовать в качестве дериватирующего агента при ВЭЖХ-МС/МС определении метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах.

2. Проведение гидролиза-дериватизации при повышенной температуре в ультразвуковой ванне является эффективным приемом, позволяющим значительно сократить время пробоподготовки пищевых продуктов и повысить выход продуктов дериватизации.

3. Сверхсшитый и магнитный сверхсшитый полистиролы обеспечивают количественное выделение нитрофуранов из гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки пищевых продуктов, в том числе совместно с другими лекарственными веществами, перед их ВЭЖХ-МС/МС определением.

4. Метод ВЭЖХ-МС/МС со стадией дериватизации 5-нитро-2-фуральдегидом и последующей очисткой на сверхсшитом или магнитном сверхсшитом полистиролах методами твердофазной или магнитной твердофазной экстракции применим для определения метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах.

5. Способ быстрой пробоподготовки образцов пищевых продуктов со стадией дериватизации 5-нитро-2-фуральдегидом и последующей очисткой на сверхсшитом или магнитном сверхсшитом полистиролах методами твердофазной или магнитной твердофазной экстракции применим для ВЭЖХ-МС/МС определения в пищевых продуктах метаболитов нитрофуранов, в том числе совместно с другими лекарственными веществами, относящимися к классам амфениколов, хинолонов и нитроимидазолов.

6. Подход к одновременному ВЭЖХ-МС/МС определению 132 лекарственных веществ, принадлежащих к 16 классам, основанный на многокомпонентной магнитной твердофазной экстракции магнитным сверхсшитым полистиролом, обеспечивает их высокочувствительное определение в молоке на уровне сотых и десятых долей мкг/кг.

**Степень достоверности.** Достоверность полученных результатов подтверждается применением современного хроматографического и масс-спектрометрического оборудования, осуществлением обработки полученных результатов методами математической статистики, хорошей воспроизводимостью и

правильностью результатов, их согласованностью с данными независимых методов анализа.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту 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; - математическое обеспечение химического анализа; - анализ пищевых продуктов.

**Апробация результатов исследования.** Основные результаты работы представлены на следующих конференциях:

**2022 год:** IV Съезд аналитиков России, Москва, Россия, 25 сентября – 1 октября.

**2021 год:** VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, Россия, 26 сентября – 2 октября 2021.

**2021 год:** XXXI Российская молодежная научная конференция с международным участием «Проблемы теоретической и экспериментальной химии», Екатеринбург, Россия, 20–23 апреля 2021.

**2020 год:** Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», Москва, Россия, 10–27 ноября 2020.

**Гранты.** Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант №18-73-10001.

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных Диссертационным советом МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия», и 4 тезиса докладов на российских и международных конференциях.

**Личный вклад автора** заключается в поиске, систематизации и анализе литературных данных по теме работы, постановке цели и задач исследования, непосредственном проведении экспериментальной работы, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке к публикации результатов проведенных исследований, формулировании научных положений, выносимых на защиту, и выводов. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. В выполнении отдельных разделов работы принимали участие студенты Сердюк О.Н., Титов Е.А., Борейко Е.И., у которых автор был соруководителем дипломной и курсовых работ. Синтез магнитного сорбента на основе ССПС и наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> проводили по методике, разработанной к.х.н. Толмачевой В.В.

**Структура и объем работы.** Представленная диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 157 страницах машинописного текста и содержит 32 рисунка и 30 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 198 наименований.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** описана актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и поставленные задачи, раскрыта научная новизна работы, показана ее научно-практическая значимость, обозначены степень достоверности, апробация работы, структура и объем, публикации.

### Обзор литературы

**Первая глава** представляет собой обзор литературы, в котором обобщены основные методы пробоподготовки и хроматографического определения метаболитов нитрофуранов в продуктах питания, опубликованные преимущественно за последние десять лет. В первом разделе обзора литературы приведены общие сведения о нитрофуранах и их метаболитах. Во втором разделе проанализированы основные тенденции в определении метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах. В третьем разделе рассмотрены особенности пробоподготовки пищевых продуктов при определении в них метаболитов НФ, включающие гидролиз, дериватизацию и очистку. В четвертом разделе рассмотрены хроматографические методы определения метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах. И, наконец, пятый раздел посвящен многокомпонентным ВЭЖХ-МС/МС методам определения метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами. На основании обзора литературы сделаны выводы, которые подтверждают актуальность выбранной темы исследования и способов решения поставленных задач.

### Экспериментальная часть

**Во второй главе** перечислены объекты исследования, реагенты и аппаратура, использованные в работе, описаны техника и методики экспериментов.

Объектами исследования служили нитрофураны и их метаболиты (табл. 1). В качестве сорбентов использовали ССПС Диапак П-3 (ЗАО “БиоХимМак СТ”) и магнитный ССПС (табл. 2). В качестве внутренних стандартов метаболитов нитрофуранов использовали D<sub>5</sub>-3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (D<sub>5</sub>-АМОЗ), <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-аминогидантоин (<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-АГД), D<sub>4</sub>-3-амино-2-оксазолидинон (D<sub>4</sub>-АОЗ), <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, <sup>13</sup>C-семикарбазид (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>, <sup>13</sup>C-СЕМ). Исходные растворы НФ и их метаболитов (200 мкг/мл) готовили растворением соответствующих навесок в метаноле. Растворы хранили при –20°С не более шести месяцев. Растворы смеси НФ и метаболитов НФ (1000 нг/мл) готовили путем разбавления исходных в метаноле. Срок хранения смесей составлял 1 месяц. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных метанолом в день использования. Дериватизацию метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом проводили в кислой среде. Кроме того, использовали стандартные образцы 132 лекарственных веществ и их внутренних стандартов, перечень которых приведен в диссертации.

**Таблица 1.** Перечень изученных в работе нитрофуранов и их метаболитов

Нитрофураны	Структурная формула	Метаболиты нитрофуранов	Структурная формула
Фуразолидон (ФЗД)		3-Амино-2-оксазолидинон (АОЗ)	
Фуралтадон (ФТД)		3-Амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (АМОЗ)	
Нитрофурантоин (НФТ)		1-Амино-гидантоин гидрохлорид (АГД)	
Нитрофуразон (НФЗ)		Семикарбазид (СЕМ)	

**Таблица 2.** Структурные характеристики изученных в работе ССПС и магнитного ССПС (ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

Сорбент	$S_{BET}$ , м <sup>2</sup> /г	$S_{mic}$ , м <sup>2</sup> /г	$S_{mes}$ , м <sup>2</sup> /г	$V_t$ , см <sup>3</sup> /г	$V_{mic}$ , см <sup>3</sup> /г	$V_{mes}$ , см <sup>3</sup> /г	$D_h$ , нм
ССПС	1132	707	219	0.60	0.32	0.25	2.11
ССПС/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (5%)	1080	685	202	0.58	0.30	0.25	2.14

$S_{BET}$  – удельная поверхность, м<sup>2</sup>/г,  $S_{mic}$  – площадь микропор,  $S_{mes}$  – площадь мезопор,  $V_t$  – объем пор, см<sup>3</sup>/г,  $V_{mic}$  – объем микропор, см<sup>3</sup>/г,  $V_{mes}$  – объем мезопор, см<sup>3</sup>/г,  $D_h$  – средний диаметр пор, нм

Использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф ExionLC (Shimadzu, Япония) в сочетании с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором SCIEX Triple QuadTM 5500 (AB Sciex, Сингапур), оснащенный бинарным насосом и автосамплером. Разделение проводили на колонке Acclaim™ 120 C18 (100 × 2.1 мм) с диаметром зерна сорбента 3.0 мкм (Thermo Scientific, США) в режиме градиентного элюирования. Использовали подвижные фазы, состоящие из 0.5%-ной муравьиной кислоты в воде (А) и 0.5%-ной муравьиной кислоты в смеси ацетонитрила и метанола (50:50) (Б). Разделение проводили, применяя следующую программу градиентного элюирования: 20–80% Б (0–7 мин), 80% Б (7–7.5 мин), 80–20% Б (7.5–8 мин). Скорость потока составляла 0.3 мл/мин. Температуру колонки и автосамплера поддерживали во время работы на уровне 40 и 15°C соответственно, объем вводимой пробы составлял 10 мкл. Продукты дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-НФА идентифицировали

по полученным хроматограммам с использованием программного продукта Analyst 1.6.3. (AB Sciex, Сингапур).

Спектры поглощения и оптические плотности растворов регистрировали на спектрофотометре СФ-103 («Аквилон», Россия). Значения рН контролировали на рН-метре-иономере «Эксперт 001» («Эконикс-Эксперт», Россия). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы очистки воды Millipore («Millipore», Германия).

Для изучения сорбции НФ в статическом режиме к навеске ССПС или магнитного ССПС ( $0.020 \pm 0.001$  г) добавляли раствор исследуемого соединения и встряхивали до установления сорбционного равновесия на электромеханическом вибросмесителе. Далее сорбент отделяли от раствора в случае ССПС центрифугированием, а в случае магнитного ССПС – с помощью магнита Nd-Fe-B ( $20 \text{ мм} \times 20 \text{ мм} \times 20 \text{ мм}$ ).

Для изучения сорбции нитрофуранов в динамическом режиме (ТФЭ) использовали картридж ( $0.030$  г ССПС,  $l = 6$  мм,  $d = 10$  мм) и вакуумную установку для ТФЭ М6, Манифолд (Россия). Картридж перед использованием активировали 1 мл ацетонитрила, после сорбции его промывали 1 мл воды, аналиты элюировали 2 мл ацетонитрила.

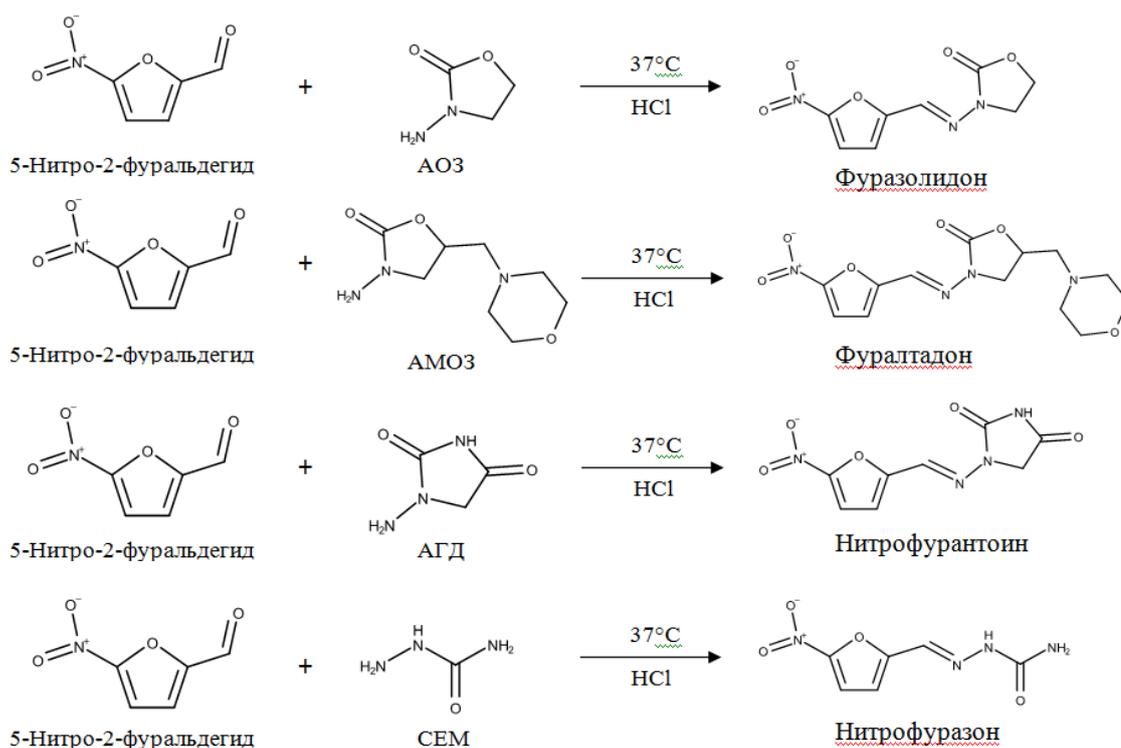
Использовали образцы меда, яиц, куриного мяса и молока собранные Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (Москва, Россия) в 2020 – 2022 гг. в процессе государственного мониторинга пищевой продукции. Образцы хранили при температуре  $-4^{\circ}\text{C}$  в холодильнике. Перед анализом замороженные продукты гомогенизировали с использованием бытового миксера.

### **Результаты и их обсуждение**

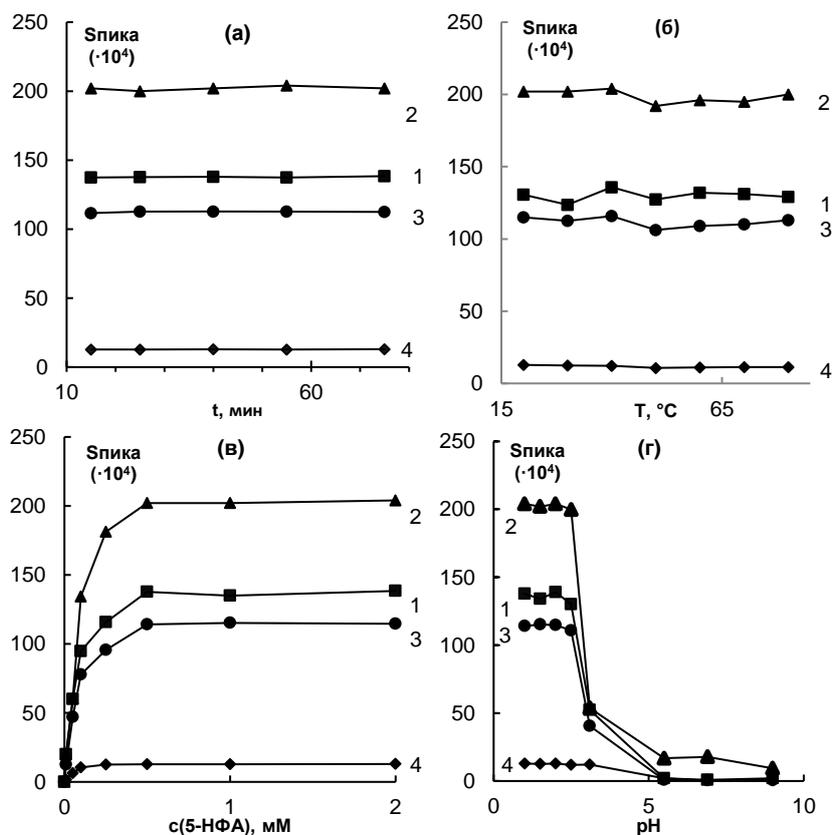
Результаты и их обсуждение представлены в главах 3–6 диссертации.

**Третья глава** посвящена выбору условий дериватизации метаболитов НФ с 5-нитро-2-фуральдегидом и идентификация продуктов дериватизации. Известно, что метаболиты НФ в кислых растворах вступают в реакцию конденсации с 2-нитробензальдегидом с образованием 2-нитрофенильных производных – оснований Шиффа. По аналогии можно предположить, что в случае 5-нитро-2-фуральдегида продуктами такого взаимодействия будут соответствующие нитрофураны, образующиеся в процессе протекания реакции конденсации в соответствии со схемой, приведенной на рис. 1. При выборе условий дериватизации варьировали время, температуру, концентрацию 5-НФА и значение рН в реакционной смеси (рис. 2).

О выходе продуктов судили, сравнивая значения площадей хроматографических пиков. Как видно из данных, приведенных на рис. 2а, реакция между 5-НФА и метаболитами протекает быстро даже при комнатной температуре, максимальный отклик детектора достигается спустя 15 мин и остается неизменным в течение 75 мин. Установлено, что максимальный выход продуктов практически не зависит от температуры в диапазоне  $20 - 80^{\circ}\text{C}$  (рис. 2б). Выход продуктов увеличивается при увеличении концентрации 5-НФА в реакционной смеси от  $0.1$  до  $1$  мМ, и не изменяется при дальнейшем увеличении концентрации до  $8$  мМ (рис. 2в).



**Рис. 1.** Предполагаемая схема взаимодействия 5-нитро-2-фуральдегида с метаболитами нитрофуранов.



**Рис. 2.** Влияние времени (а), температуры (б), концентрации 5-НФА (в) и рН (г) на выход продуктов дериватизации метаболитов НФ ( $c = 40$  нг/мл) с 5-нитро-2-фуральдегидом; 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон;  $c_{5\text{-НФА}} = 2$  mM (а, б, г); рН~1 (а, б, в);  $t = 15$  мин (б, в, г);  $T = 40^{\circ}C$  (а, в, г).

Данные, приведенные на рис. 2г, указывают на то, что реакция нуклеофильного присоединения 5-НФА к метаболитам нитрофуранов сильно зависит от рН: максимальный выход продуктов наблюдается в интервале рН 1.0 – 2.5. Учитывая условия проведения кислотного гидролиза, во всех дальнейших исследованиях дериватизацию метаболитов НФ проводили при рН ~ 1.0.

Идентификацию продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом, которыми, согласно высказанным нами предположением, могут быть соответствующие нитрофураны, проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС, использовали метод мониторинга множественных реакций (ММР). Стандартные растворы нитрофуранов (0.1 мкг/мл) вводили непосредственно в масс-спектрометр для получения ионов-предшественников и характерных дочерних ионов. В качестве ионов-предшественников были выбраны характерные молекулярные ионы; для каждого соединения контролировали два иона продукта. Для количественной оценки отслеживался наиболее интенсивный переход ММР, а также второй переход для подтверждения. Потенциал декластеризации (ПД) и энергия соударений (ЭС) двух наиболее распространенных переходов были оптимизированы в режимах положительных или отрицательных ионов. Фуразолидон и фуралтадон образуют протонированные формы  $[M + H]^+$ , нитрофурантоин и нитрофуразон образуют ион молекулы  $[M - H]^-$ .

Метаболиты нитрофуранов идентифицировали по абсолютному времени удерживания хроматографических пиков целевых веществ, регистрируемых в режиме мониторинга множественных реакций. Полученные данные, представленные в табл. 3, подтверждают, что в результате взаимодействия метаболитов нитрофуранов с 5-НФА образуются соответствующие нитрофураны. Основные характеристики совпадают с литературными данными. Выход продуктов реакции дериватизации составил 95 – 100%.

Самыми длительными и трудоемкими этапами в процессе пробоподготовки пищевых продуктов являются этапы гидролиза/дериватизации. В соответствии с действующим в России ГОСТ 32014-2012, дериватизацию метаболитов НФ 2-нитробензальдегидом (**2-НБА**) проводят одновременно с кислотным гидролизом в 0.1 М HCl при 37–40°C (инкубация в водяной бане) в течение 16 ч. Аналогичные нормативные документы приняты во всем мире. Такое длительное время необходимо для выделения метаболитов, связанных с белками.

В настоящей работе с целью снижения времени анализа изучено влияние температуры и концентрации соляной кислоты на ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов нитрофуранов в курином мясе с использованием 5-нитро-2-фуральдегида при проведении пробоподготовки в термостатированной ультразвуковой ванне.

Для изучения влияния различных факторов на гидролиз и дериватизацию связанных с белками метаболитов НФ использовали образцы мяса от четырех цыплят-бройлеров, которые в течение 10 дней в виде инъекций получали тот или

**Таблица 3.** Основные характеристики продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом, определяемых методом ВЭЖХ-МС/МС с применением метода мониторинга множественных реакций

Метаболит	Нитрофуран (продукт дериватизации)	$t_R$ , мин	$Q_1$ m/z	$Q_3$ m/z	ПД*, В	ЭС**, эВ
АМОЗ	Фуралдатон	2.18	325.0(+)	252.0/281.0	60/60	25/19
АОЗ	Фуразолидон	3.67	226.0(+)	122.0/113.0	60/60	18/19
АГД	Нитрофурантоин	3.43	236.8(-)	151.9/123.8	-100/-100	-17/-21
СЕМ	Нитрофуразон	3.32	196.8(-)	149.9/123.8	-100/-100	-13/-14
АМОЗ -D <sub>5</sub>	ФТД -D <sub>5</sub>	2.18	330.0(+)	286.0	60	19
АОЗ -D <sub>4</sub>	ФЗД -D <sub>4</sub>	3.67	230.0(+)	117.0	60	19
АГД - <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	НФТ - <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	3.43	239.8(-)	151.9	-100	-17
СЕМ - <sup>15</sup> N <sub>2</sub> <sup>13</sup> C	НФЗ - <sup>15</sup> N <sub>2</sub> <sup>13</sup> C	3.32	199.8(-)	152.9	-100	-13

\*Потенциал декластеризации; \*\*Энергия соударений

иной нитрофуран. Общее количество нитрофуранов, которые получили бройлеры, составило 345, 125, 267 и 222 мкг/кг живого веса бройлеров для фуралдатона, фуразолидона, нитрофурантоина и нитрофуразона, соответственно. Забой проводили спустя день после введения последней дозы. Установлено, что уже спустя сутки после введения последней дозы нитрофуранов, их содержание в курином мясе крайне мало 3 – 8%; содержание несвязанных с белками метаболитов нитрофуранов составляет 11 – 16%, а основной формой являются метаболиты связанные с белками.

Для оценки содержания метаболитов нитрофуранов в образцах мяса кур-бройлеров, получавших в течение 10 дней нитрофураны, провели их определение, используя официальную методику пробоподготовки, регламентированную действующим ГОСТ 32014-2012, и два дериватирующих агента: 2-нитробензальдегид и 5-нитро-2-фуральдегид. Гидролиз и дериватизацию в этой серии экспериментов проводили одновременно путем нагревания образцов на водяной бане в присутствии 0.1 М HCl в течение 16 ч. Установлено, что результаты, полученные с использованием разных дериватирующих агентов (табл. 4), не различаются между собой.

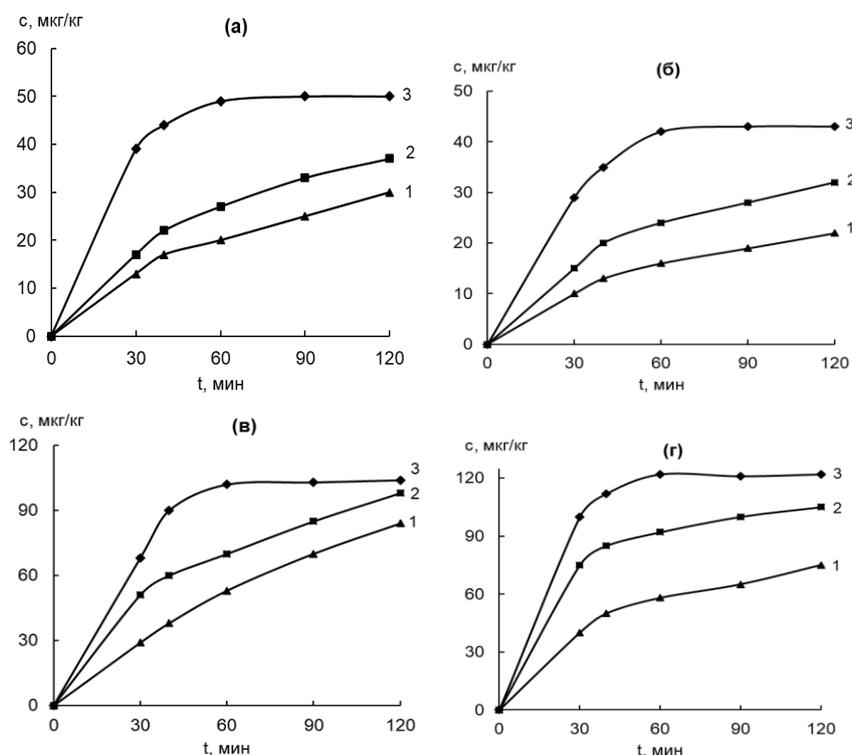
На примере четырех образцов куриного мяса, содержащих известные количества метаболитов АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ изучено влияние температуры на выход продуктов дериватизации. В этой серии экспериментов гидролиз-дериватизацию проводили в термостатированной ультразвуковой бане (37 кГц) в присутствии 0.1М HCl при 40, 60 и 80°C в течение 30, 60, 90 и 120 мин. Как видно из данных, приведенных на рис. 3, максимальный выход продуктов дериватизации, коррелирующий с содержанием этих метаболитов в анализируемых образцах (табл. 4), наблюдается при 80°C.

**Таблица 4.** Результаты определения метаболитов нитрофуранов в образцах куриного мяса кур-бройлеров, получавших в течение 10 дней нитрофураны ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

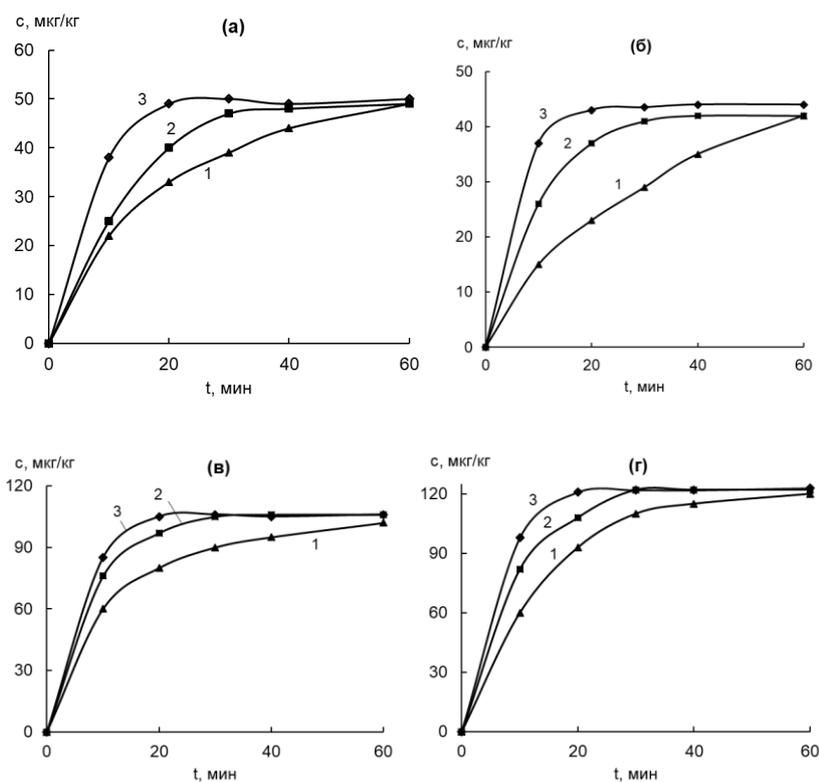
Дериватирующий агент, условия проведения гидролиза и дериватизации	Найдено, мкг/кг ( $s_T$ )			
	АМОЗ	АОЗ	АГД	СЕМ
2-Нитробензальдегид, 0.1 М HCl, 40°C, водяная баня, 16 ч (ГОСТ 32014-2012)	40±6 (0.06)	31±4 (0.05)	88±11 (0.05)	110±10 (0.04)
5-Нитро-2-фуральдегид, 0.1 М HCl, 40°C, водяная баня, 16 ч	41±5 (0.05)	30±3 (0.04)	91±9 (0.04)	105±13 (0.05)

Полученные результаты указывают на то, что повышение температуры от 40 до 80 °С позволяет снизить время гидролиза-дериватизации в 0.1 М HCl до 60 мин.

Во второй серии экспериментов для изучения влияния концентрации соляной кислоты гидролиз-дериватизацию проводили в термостатированной ультразвуковой бане (37 кГц) при 80°C в присутствии 0.1, 0.2 и 0.5 М HCl в течение 10, 20, 30, 40 и 60 мин. Данные, приведенные на рис. 4, указывают на то, что увеличение концентрации соляной кислоты от 0.1 до 0.2 и далее до 0.5 М приводит к сокращению времени от 60, до 30 и далее до 20 мин, соответственно.



**Рис. 3.** Влияние температуры на выход продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов АМОЗ (а), АОЗ (б), НФТ (в) и СЕМ (г) с 5-нитро-2-фуральдегидом в зависимости от времени проведения гидролиза-дериватизации в термостатированной ультразвуковой бане.  $c_{HCl} = 0.1M$ ; 40°C (1); 60°C (2); 80°C (3).

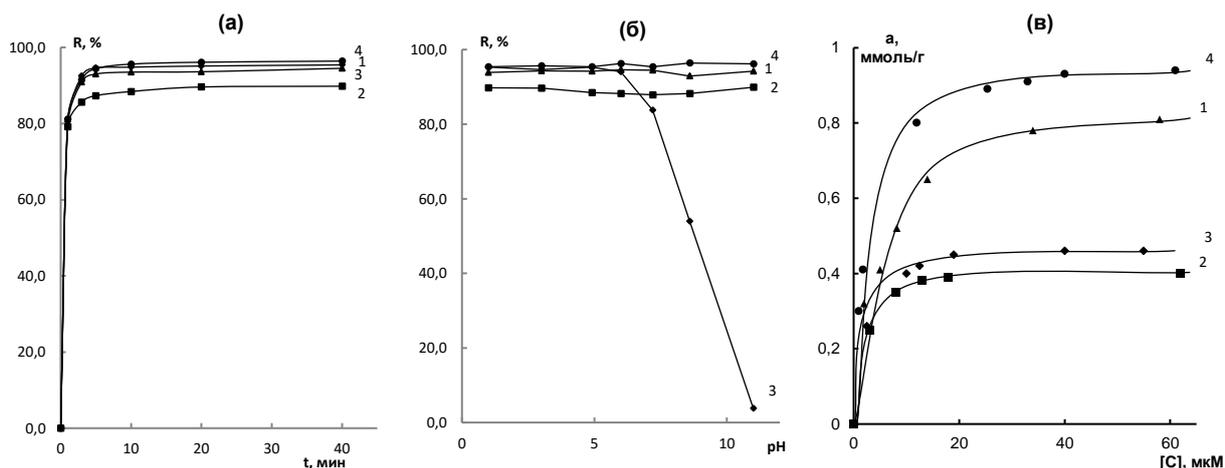


**Рис. 4.** Влияние концентрации соляной кислоты на выход продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов АМОЗ (а), АОЗ (б), НФТ (в) и СЕМ (г) с 5-нитро-2-фуральдегидом в зависимости от времени проведения гидролиза-дериватизации в термостатированной ультразвуковой бане при 80°C.  $c_{\text{HCl}} = 0.1 \text{ M}$  (1); 0.2 M (2); 0.5 M (3).

Полученные результаты указывают на то, что в присутствии 0.5 M HCl и 80 °C время гидролиза-дериватизации можно снизить до 20 мин.

Таким образом установлено, что при повышении температуры до 80°C и концентрации соляной кислоты до 0.5 M удается значительно сократить время гидролиза-дериватизации с 16 ч до 20 мин. В отличие от продуктов дериватизации метаболитов НФ с 2-НБА продукты дериватизации с 5-НФА – нитрофураны, не разлагаются при повышении концентрации HCl от 0.1 до 0.5 M и температуры от 40 до 80°C.

**В четвертой главе** рассмотрены особенности сорбции нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах. В статическом режиме проведено сравнение сорбционного поведения нитрофуранов на ССПС, магнитном ССПС и магнитных наночастицах  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в зависимости от времени контакта фаз, pH раствора и концентрации сорбатов. Установлено, что нитрофураны не сорбируются на магнитных наночастицах, следовательно наличие их в составе магнитного ССПС не оказывает влияния на его сорбционные свойства. Сорбция нитрофуранов на ССПС и магнитном ССПС имеет много общего, характер зависимостей степени извлечения от времени, pH и концентрации сорбатов одинаковый: время достижения равновесия составляет 5 – 10 мин, максимальная сорбция наблюдается в интервале pH 3 – 6, изотермы сорбции описываются изотермами Ленгмюра. В качестве примера на рис. 5 приведены экспериментальные зависимости для магнитного ССПС; для ССПС они аналогичны.



**Рис. 5.** Зависимости степеней извлечения нитрофуранов на магнитном ССПС от времени контакта фаз (а), рН раствора (б) и концентрации нитрофуранов (в). Условия:  $m_{\text{ССПС}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $V = 25$  мл,  $C_{\text{НФ}} = 5$  мкг/мл,  $t = 10$  мин, рН  $\sim 4$ . 1 – фуразолидон, 2 – нитрофурантоин, 3 – нитрофуразон, 4 – фуралтадон.

Значения степеней извлечения и величин предельной сорбции для этих сорбентов (табл. 5) указывают на то, что и ССПС, и магнитный ССПС могут быть использованы для группового сорбционного выделения и концентрирования нитрофуранов из водных растворов.

При выборе условий десорбции нитрофуранов, сорбированных на ССПС и МССПС из растворов с концентрацией НФ 5 мкг/мл, в качестве элюентов использовали ацетонитрил, метанол и этанол. Десорбцию проводили в УЗ-ванне последовательно два раза порциями элюента по 1 мл, время десорбции 5 мин.

Как видно из данных, приведенных в табл. 6, все элюенты количественно десорбируют нитрофураны с этих сорбентов. Для дальнейшего исследования в качестве элюента был выбран ацетонитрил.

**Таблица 5.** Степени извлечения ( $R, \%$ ) и величины предельной сорбции ( $a_m, \text{ммоль/г}$ ) на сверхсшитом полистироле и магнитном сверхсшитом полистироле в статических условиях. ( $C_{\text{НФ}} = 1 \cdot 10^{-5}$  М, рН  $\sim 4.0$ ,  $V = 25$  мл,  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $t = 10$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Нитрофуран	ССПС		ССПС/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$		$\text{Fe}_3\text{O}_4$
	$R, \%$	$a_m$	$R, \%$	$a_m$	$R, \%$
Фуралтадон	$97 \pm 2$	103	$96 \pm 3$	91	0
Фуразолидон	$95 \pm 2$	95	$95 \pm 2$	86	0
Нитрофурантоин	$96 \pm 2$	59	$95 \pm 3$	57	0
Нитрофуразон	$90 \pm 2$	47	$90 \pm 3$	37	0

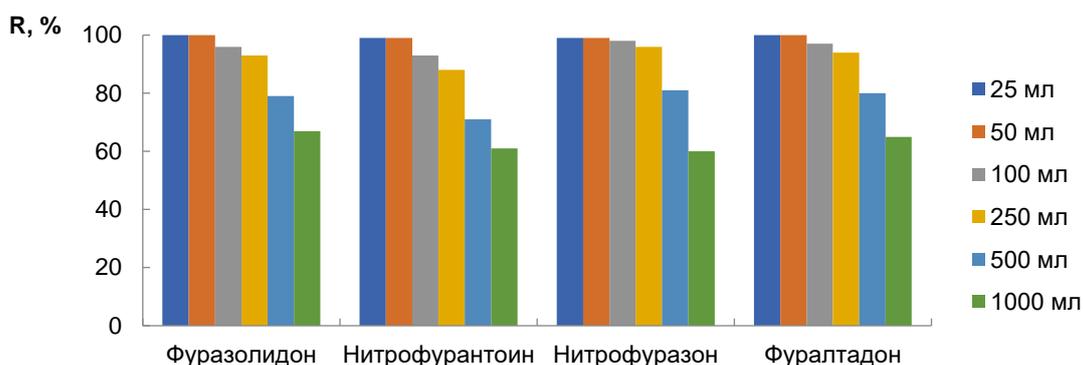
**Таблица 6.** Степени десорбции нитрофуранов со ССПС и магнитного ССПС

Элюент	Объем элюента, мл	$R_{\text{дес}}, \%$			
		Фуразолидон	Нитрофурантоин	Нитрофуразон	Фуралтадон
ССПС					
Ацетонитрил	1	97	94	90	91
	2	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Метанол	1	74	79	79	75
	2	100	100	100	100
Этанол	1	72	78	81	77
	2	99	100	100	100
ССПС/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$					
Ацетонитрил	1	90	86	89	89
	2	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

При выборе условий ТФЭ нитрофуранов варьировали объем анализируемого раствора, природу и объем элюента. Сорбцию проводили из 25, 50, 100, 250, 500 и 1000 мл водных растворов нитрофуранов с  $\text{pH} \sim 4$  на картриджах, заполненных  $0.030 \pm 0.001$  г ССПС ( $l = 6$  мм,  $d = 10$  мм). Было установлено, что при увеличении объема анализируемого раствора от 25 мл до 250 мл нитрофураны извлекаются количественно, их степени извлечения составляют 88 – 96% (рис. 6). При дальнейшем увеличении объема раствора до одного литра степени извлечения падают до 60 – 67%, а время анализа заметно увеличивается. В качестве элюентов при выборе условий десорбции использовали ацетонитрил. Перед элюированием картридж промывали 3 мл дистиллированной воды. Элюент пропускали через картридж со скоростью 0.3 мл/мин. Проводили десорбцию последовательно 3 раза по 1 мл элюентов, давая элюенту проходить через слой сорбента под действием силы тяжести. Как видно из табл. 7, ацетонитрил количественно десорбирует нитрофураны при десорбции 2 мл, степени десорбции достигают 98 – 99%. Перед ВЭЖХ анализом элюат упаривали и перерастворяли в подвижной фазе.

**Таблица 7.** Степени десорбции нитрофуранов ( $R_{\text{дес}}, \%$ ) с картриджа, заполненного  $0.030 \pm 0.001$  г ССПС

Элюент	Объем элюента, мл	$R_{\text{дес}}, \%$			
		Фуразолидон	Нитрофурантоин	Нитрофуразон	Фуралтадон
Ацетонитрил	1	94	94	93	94
	2	<b>99</b>	<b>98</b>	<b>98</b>	<b>99</b>
	3	100	99	99	100

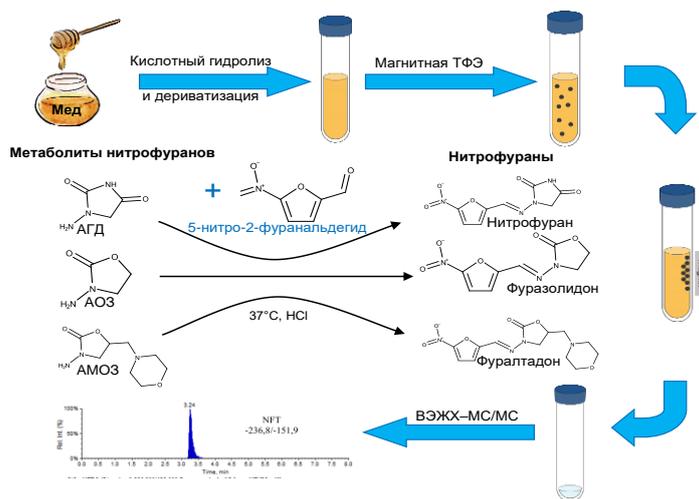


**Рис. 6.** Степени извлечения нитрофуранов методом ТФЭ в зависимости от объёма раствора на картриджах, заполненных  $0.030 \pm 0.001$  г ССПС ( $l = 6$  мм,  $d = 10$  мм), рН  $\sim 4$ .

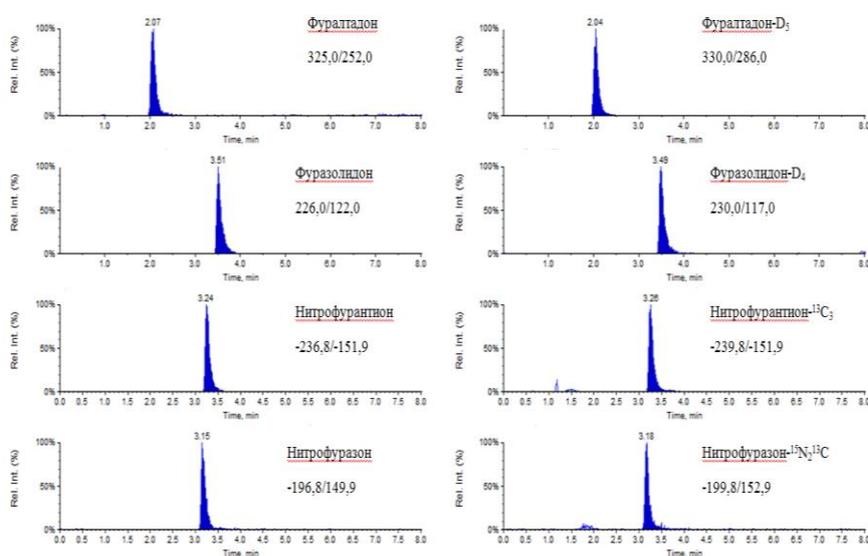
**Пятая глава** диссертации посвящена разработке новых способов определения метаболитов НФ методом ВЭЖХ-МС/МС в реальных пищевых продуктах: меде, куриных яйцах, курином мясе и субпродуктах. Во всех случаях определение проводили после кислотного гидролиза и дериватизации метаболитов с 5-нитро-2-фуральдегидом и очистки полученных гидролизатов с применением магнитного ССПС (мед) или ССПС (яйца, мясо).

Для идентификации продуктов дериватизации, которыми, как было сказано выше, являются соответствующие нитрофураны, с помощью ВЭЖХ-МС/МС использовали метод мониторинга множественных реакций (ММР). Валидацию методик проверяли в соответствии с Регламентом Комиссии ЕС 2002/657. Степени выделения метаболитов оценивали с использованием образцов пищевых продуктов, не содержащих остаточных количеств определяемых аналитов, с добавками метаболитов НФ в количестве 1, 2 и 200 (мед) и 0.5, 1 и 20 мкг/кг (яйца). Для определения внутрисуточной и междневной повторяемости готовили по 5 и 15 образцов для каждого уровня концентрации соответственно. Для оценки абсолютного матричного эффекта (МЭ) использовали коэффициенты матричных градуировок в условиях анализа образцов, не содержащих исследуемых соединений, с добавками метаболитов НФ и коэффициенты градуировки соответствующих водных растворов с добавками метаболитов НФ. Расчет проводили по формуле:  $МЭ (\%) = (A/B) \times 100$ , где А – коэффициент в матричной градуировке, а В – коэффициент в водной градуировке. Количественный анализ проводили с использованием матричной градуировки. Полученные результаты сравнивали с результатами, полученными при использовании официальной методики пробоподготовки с использованием 2-нитробензальдегида.

Схема пробоподготовки образцов меда с 5-НФА и магнитным ССПС перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов приведена на рис. 7. На рис. 8 приведены хроматограммы по выделенным ионам, полученные для образца меда с добавлением метаболитов НФ и внутренних стандартов (100 мкг/кг).



**Рис. 7.** Схема пробоподготовки образцов меда с 5-НФА и магнитным ССПС перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов.



**Рис. 8.** Хроматограммы по выделенным ионам, для образца меда с добавлением метаболитов НФ и внутренних стандартов ( $c_{НФ} = 100$  мкг/кг).

Основные характеристики определения метаболитов нитрофуранов в меде после очистки экстрактов методом МТФЭ с применением магнитного ССПС и в яйцах – после очистки экстрактов методом ТФЭ, приведены в табл. 8 и 9. Представленные результаты указывают на то, что 5-нитро-2-фуранальдегид можно использовать в качестве дериватизирующего агента при определении метаболитов нитрофуранов в меде и яйцах методом ВЭЖХ-МС/МС. Показано, что дополнительная очистка гидролизатов методом МТФЭ и ТФЭ с использованием магнитного ССПС и ССПС позволяет уменьшить матричные эффекты, для всех метаболитов относительные МЭ оказались ниже 10%. Разработанный способ был применен к анализу 20 проб меда. Среди них три пробы оказались положительными, в них были обнаружены метаболиты АОЗ, АГД и СЕМ (табл. 10). Сравнение полученных результатов с результатами, полученными по официальной методике, подтверждает правильность разработанной методики.

В основу определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе и субпродуктах положен разработанный нами способ быстрой пробоподготовки. На примере образцов мяса кур-бройлеров, получавших в течение 10 дней нитрофураны,

**Таблица 8.** Основные характеристики ВЭЖХ-МС/МС определения метаболитов нитрофуранов в меде после очистки экстрактов методом МТФЭ с применением магнитного ССПС

Метаболит	Степень выделения, % (1/2/200 мкг/кг)	Внутридневная повторяемость ( $s_r, n = 5$ )	Междневная повторяемость ( $s_r, n = 15$ )	$C_{min}$ , мкг/кг	$C_{опр}$ , мкг/кг	МЭ, %
АМОЗ	88/91/89	0.07/0.05/0.05	0.05/0.05/0.04	0.1	0.3	99
АОЗ	94/91/93	0.11/0.09/0.05	0.12/0.08/0.07	0.1	0.3	104
АГД	96/92/93	0.05/0.07/0.05	0.04/0.06/0.06	0.2	0.5	105
СЕМ	85/88/86	0.12/0.11/0.06	0.15/0.12/0.10	0.3	1	102

**Таблица 9.** Основные характеристики ВЭЖХ-МС/МС определения метаболитов нитрофуранов в яйцах после очистки экстрактов методом ТФЭ с применением ССПС

Метаболит	Степень выделения, % (0.5/1/20 мкг/кг)	Внутридневная повторяемость ( $s_r, n = 5$ )	Междневная повторяемость ( $s_r, n = 15$ )	$C_{min}$ , мкг/кг	$C_{опр}$ , мкг/кг	МЭ, %
АМОЗ	106/101/99	0.12/0.07/0.07	0.11/0.08/0.06	0.04	0.1	108
АОЗ	104/103/98	0.09/0.11/0.07	0.10/0.09/0.08	0.2	0.5	102
АГД	103/104/100	0.06/0.05/0.06	0.07/0.05/0.05	0.04	0.1	104
СЕМ	95/102/97	0.13/0.10/0.08	0.12/0.13/0.08	0.2	0.5	107

**Таблица 10.** Результаты определения метаболитов нитрофуранов в меде с использованием разработанной нами и официальной методики пробоподготовки с использованием 2-нитробензальдегида ( $n = 3, P = 0.95$ )

Проба	Метаболит	Найдено по разработанной методике, мкг/кг	Найдено по официальной методике, мкг/кг (ГОСТ 32014-2012)
Мед 1	АОЗ	$2.1 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.6$
Мед 2	АГД	$6.1 \pm 0.3$	$6.0 \pm 1.5$
Мед 3	СЕМ	$3.2 \pm 0.4$	$3.2 \pm 0.8$

показано, что в термостатированной ультразвуковой бане время гидролиз-дериватизации можно уменьшить с 16 часов до 20 мин за счет повышения температуры до 80°C и концентрации соляной кислоты до 0.5 М. Проведено определение метаболитов фуралтадона, фуразолидона, нитрофурантоина и нитрофуразона в курином мясе, печени, желудках и сердце кур с использованием разработанной нами и официальной методик (табл. 11). Установлено, что при повышении температуры до 80°C и концентрации соляной кислоты до 0.5 М удается

**Таблица 11** Результаты ВЭЖХ-МС/МС определения метаболитов НФ в «загрязненном» курином мясе и субпродуктах с использованием официальной методики пробоподготовки и 2-нитробензальдегида (М1); официальной методики пробоподготовки и 5-нитро-2-фуральдегида (М2); ускоренной методики пробоподготовки и 5-нитро-2-фуральдегида (М3); ( $n = 3, P = 0.95$ )

Дериватизирующий агент, условия проведения гидролиза и дериватизации	Найдено, мкг/кг ( $s_r$ )			
	АМОЗ	АОЗ	АГД	СЕМ
<b>Мясо</b>				
М1: 2-НБА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч (ГОСТ 32014)	40±6 (0.06)	31±4 (0.05)	88±11 (0.05)	110±10 (0.04)
М2: 5-НФА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч	41±5 (0.05)	30±3 (0.04)	91±9 (0.04)	105± 13 (0.05)
М3: 5-НФА, 0.5 М НСl, 80°C, УЗ-баня, 30 мин	50±6 (0.05)	43±5 (0.05)	104±13 (0.05)	122±21 (0.05)
<b>Печень</b>				
М1: 2-НБА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч, (ГОСТ 32014)	149±30 (0.08)	62±10 (0.07)	120±24 (0.08)	128±20 (0.06)
М2: 5-НФА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч,	143±21 (0.06)	64±9 (0.06)	125±22 (0.07)	122± 21 (0.07)
М3: 5-НФА, 0.5 М НСl, 80°C, УЗ-баня, 30 мин	216±43 (0.08)	92±16 (0.07)	153±30 (0.08)	147±21 (0.08)
<b>Желудки</b>				
М1: 2-НБА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч (ГОСТ 32014)	96±17 (0.07)	67±10 (0.06)	96±17 (0.06)	115±20 (0.07)
М2: 5-НФА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч,	92±18 (0.08)	64±11 (0.07)	100±18 (0.07)	123± 18 (0.06)
М3: 5-НФА, 0.5 М НСl, 80°C, УЗ-баня, 30 мин	120±21 (0.07)	98±15 (0.06)	126±16 (0.06)	178±31 (0.07)
<b>Сердце</b>				
М1: 2-НБА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч (ГОСТ 32014)	104±21 (0.08)	53±9 (0.07)	125±19 (0.06)	97±17 (0.07)
М2: 5-НФА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч	109±19 (0.07)	52±10 (0.08)	134±27 (0.08)	103± 20 (0.08)
М3: 5-НФА, 0.5 М НСl, 80°C, УЗ-баня, 20 мин	126±22 (0.07)	75±15 (0.08)	152±26 (0.07)	143±25 (0.07)

не только значительно сократить время гидролиза-дериватизации с 16 ч до 20 мин, но и повысить выход продуктов дериватизации на 11 – 49 %.

**В шестой главе** диссертации (первый раздел) показана возможность одновременного ВЭЖХ-МС/МС определения в меде четырех метаболитов нитрофуранов (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ) совместно с другими лекарственными веществами, принадлежащими к 3 классам (всего 31 соединение; полный перечень соединений приведен в тексте диссертации). Определение проводили после ускоренного гидролиза-дериватизации метаболитов в ультразвуковой ванне при 80°C (0.5М НСl, 20 мин) и очистки гидролизатов методом МТФЭ на магнитном ССПС. Установлено, что в этих условиях термостабильны не только метаболиты

нитрофуранов и продукты их дериватизации (соответствующие нитрофураны), но и соединения из классов хинолонов, амфениколов и нитроимидазолов. Напротив, соединения из классов сульфаниламидов, тетрациклинов и  $\beta$ -лактамов в процессе такой пробоподготовки частично разрушаются. На трех уровнях концентраций (1, 5 и 200 мкг/кг) показано, что методом магнитной ТФЭ при использовании 50 мг магнитного ССПС можно извлечь из 1 г меда: 98–103% метаболитов нитрофуранов (4), 83–111% хинолонов (14), 86–103% амфениколов (3), 97–118% нитроимидазолов (10) (в скобках указано число соединений). Значения относительного стандартного отклонения (*sr*) при определении внутрисуточной и междневной повторяемости для каждого уровня концентрации не превышали 0.16. Абсолютные значения матричного эффекта для большинства соединений варьируют в пределах 83–115%. Пределы обнаружения и определения составили 0.1 – 0.3 и 0.3 – 1 мкг/кг, соответственно. Для демонстрации работоспособности разработанного способа использовали три положительных пробы меда, в которых при мониторинге пищевых продуктов были обнаружены ветеринарные лекарства. Сравнение полученных результатов с результатами, полученными по официальным методикам, подтверждает правильность разработанной методики (табл. 12).

Во втором разделе 6 главы обоснована необходимость и показана возможность применения магнитного ССПС для выделения из молока четырех нитрофуранов (ФЗД, ФТД, НФТ, НФЗ) совместно с другими лекарственными веществами, принадлежащими к 16 классам (всего 132 соединения, полный перечень соединений приведен в тексте диссертации) перед их определением методом ВЭЖХ-МС/МС. Выбранные соединения значительно различаются по гидрофобности, значения параметров Ханша ( $\lg P$ ) варьируют от –3.81 до 9.36.

На трех уровнях концентраций ( $1C_{опр}$ ,  $2C_{опр}$  и 20 мкг/кг) показано, что методом магнитной ТФЭ при использовании 150 мг магнитного ССПС можно извлечь из 10 г молока: 97–109 % нитрофуранов (4); 83–107% сульфаниламидов (14); 85–120%  $\beta$ -лактамов (13); 89–115% тетрациклинов (4); 82–119% хинолонов (14); 82–115% макролидов (8); 84–115% нитроимидазолов (10); 89–114% амфениколов (3);

**Таблица 12.** Результаты определения лекарственных веществ в меде с использованием разработанной и официальных (ГОСТовских) методик для определения различных групп веществ ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Образец	Аналит	Найдено по разработанной методике, мкг/кг	Найдено по официальной методике, мкг/кг (ГОСТ)
Мед №1	АОЗ	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.5 (ГОСТ 32014–2012)
Мед №2	АМОЗ	2.5 ± 0.3	2.7 ± 1.0 (ГОСТ 32014–2012)
Мед №3	Метронидазол	2.5 ± 0.3	2.6 ± 1.7 (ГОСТ 34533–2019)

**Таблица 13.** Результаты определения лекарственных веществ в молоке с использованием разработанной и официальных (ГОСТовских) методик для определения различных групп веществ ( $n = 3, P = 0.95$ )

Номер пробы	Аналит	Найдено по разработанной методике, мкг/кг	Найдено по официальной методике, мкг/кг (ГОСТ)	ПДК, мкг/кг
Молоко 1	Окситетрациклин	1.5±0.2	1.8±1.2 (31694–2012)	10
Молоко 2	Хлорамфеникол	4.1±0.4	4.0±3.2 (34533–2019)	0.2
Молоко 3	Сульфаметазин	1.7±0.2	1.9±1.1 (34136–2017)	1
Молоко 4	Линкомицин	5.6±0.8	5.9±1.8 (34136–2017)	1.5
Молоко 5	Ципрофлоксацин	12.2±1.3	11.4±4.6 (32797–2014)	1

86–111% линкозамидов (3); 97–102% плевромутилинов (2); 72–88% макроциклических лактонов (4); 87–104% хиноксалиновых антибиотиков (4); 76–119% бензимидазолов (21); 79–115% антигельминтных средств (12); 81–118% кокцидиостатиков (12); и 75–119% других (5) лекарственных соединений (*в скобках указано число соединений*). Пределы обнаружения составили: 0.05 мкг/кг для плевромутилинов; 0.05–0.2 мкг/кг для бензимидазолов, линкозамидов, макролидов, амфениколов; 0.05–1 мкг/кг для кокцидиостатиков, антигельминтных средств, хинолонов, нитроимидазолов, нитрофуранов, сульфаниламидов; 0.2 мкг/кг для тетрациклинов; 0.2–1 мкг/кг для β-лактамов, макроциклических лактонов; 1 мкг/кг для хиноксалиновых антибиотиков. Значения относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ) при определении внутрисуточной и междневной повторяемости для каждого уровня концентрации не превышали 0.20. Абсолютные значения матричного эффекта для большинства соединений варьируют в пределах 85–120%. Для демонстрации работоспособности разработанной методики использовали пять положительных проб молока, в которых при мониторинге пищевых продуктов были обнаружены ветеринарные лекарства. Результаты определения лекарственных веществ в молоке с использованием разработанной и официальных (ГОСТовских) методик для определения различных групп веществ удовлетворительно согласуются между собой (табл. 13).

В **заключении** проведено сопоставление характеристик разработанных и описанных в литературе методик определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе, яйцах, меде и молоке. В результате проведенного исследования удалось не только расширить перечень дериватирующих агентов, пригодных для определения метаболитов нитрофуранов, за счет применения 5-нитро-2-фураальдегида, но и сократить время гидролиза-дериватизации, а также заменить на стадии очистки проб жидкость-жидкостную экстракцию на более эффективные и экологически безопасные ТФЭ и магнитную ТФЭ с использованием ССПС и магнитного ССПС, которые ранее для этой цели не применяли.

## ВЫВОДЫ

1. Предложены новые подходы к ВЭЖХ-МС/МС определению метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах, основанные на дериватизации с 5-нитро-2-фуральдегидом (5-НФА) и пробоподготовке с использованием сверхсшитого и магнитного сверхсшитого полистиролов.
2. С применением ВЭЖХ-МС/МС идентифицированы продукты реакции дериватизации метаболитов нитрофуранов (3-амино-2-оксазолидинона, 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинона, 1-аминогидантоина и семикарбазида) с 5-НФА; показано, что ими являются соответствующие нитрофураны – фуразолидон, фуралтадон, нитрофурантоин и нитрофуразон. Выбраны условия, позволяющие одновременно проводить кислотный гидролиз и дериватизацию.
3. С использованием 5-НФА предложен способ быстрой пробоподготовки образцов пищевых продуктов при определении в них метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС. На примере проб «загрязненного» куриного мяса, содержащего известные количества метаболитов, показано, что за счет повышения температуры до 80°C, концентрации соляной кислоты до 0.5 М и применения ультразвука удается не только значительно сократить время гидролиза-дериватизации с 16 ч до 20 мин, но и повысить выход продуктов дериватизации на 11 – 49 %.
4. Проведено сравнение сорбционного поведения нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах; установлено, что характер зависимостей степеней извлечения аналитов от времени, рН и концентрации сорбатов одинаковый для ССПС и магнитного ССПС: время достижения равновесия составляет 5 – 10 мин, максимальная сорбция наблюдается в интервале рН 3 – 6, изотермы сорбции описываются изотермами Ленгмюра.
5. Обоснована возможность использования ССПС и магнитного ССПС для группового выделения нитрофуранов из гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки пищевых продуктов, в том числе совместно с другими лекарственными веществами, принадлежащими к классам амфениколов, хинолонов и нитроимидазолов, перед их ВЭЖХ-МС/МС определением.
6. Разработаны и валидированы методики определения метаболитов нитрофуранов методом ВЭЖХ-МС/МС в пищевых продуктах (мед, куриные яйца, куриное мясо и субпродукты) с использованием 5-НФА в качестве дериватирующего агента и очистки гидролизатов на ССПС и магнитного ССПС. Достигнуты пределы обнаружения метаболитов нитрофуранов 0.1 – 0.3 мкг/кг.
7. Показана возможность и разработана ВЭЖХ-МС/МС методика определения метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами (31 соединение) в меде после проведения гидролиза-дериватизации в ультразвуковой ванне (80°C, 0.5 М HCl) и очистки гидролизатов методом ТФЭ на сверхсшитом полистироле. Достигнуты пределы обнаружения лекарственных веществ 0.1 – 0.3 мкг/кг.
8. Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС определения нитрофуранов в молоке совместно с другими лекарственными веществами (132 соединения) после выделения соединений методом магнитной ТФЭ с помощью магнитного ССПС. Достигнуты пределы обнаружения лекарственных веществ 0.015–0.3 мкг/кг.

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

**Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – Аналитическая химия:**

**1. Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Goncharov N.O., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Shubina E.G., Grudev A.I.** Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hypercrosslinked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry // Food Chem. 2022. V. 387. P. 132866. (Импакт-фактор Web of Science – 9.231, **Q1**) 70%.

**2. Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Shubina E.G., Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Grudev A.I.** Determination of nitrofuran metabolites in honey using a new derivatization reagent, magnetic solid-phase extraction and LC–MS/MS // Talanta 2021. V. 230. P. 122310. (Импакт-фактор Web of Science – 6.556, **Q1**) 60%.

**3. Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G.** Current trends in analytical strategies for the chromatographic determination of nitrofuran metabolites in food samples. An update since 2012 // J. Chromatogr. A 2022. V. 1685 P. 463620. (Импакт-фактор Web of Science – 4.601, **Q1**), 50%.

**4. Мелехин А.О., Толмачева В.В., Холявская Ю.Н., Седых Е.С., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Баиров А.Л.** Быстрый гидролиз и дериватизация метаболитов нитрофуранов с новым дериватирующим агентом 5-нитро-2-фураальдегидом при их ВЭЖХ-МС/МС-определении в курином мясе // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. №. 10. С. 938-946. (Импакт-фактор RSCI – 1.127, **Q4**), 60%.

**5. Мелехин А.О., Толмачева В.В., Шубина Е.Г., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Грудев А.И., Золотов Ю.А.** Новый дериватирующий агент для определения метаболитов нитрофуранов в куриных яйцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии–танDEMной масс-спектрометрии // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. №. 11. С. 1012-1021. (Импакт-фактор RSCI – 1.127, **Q4**), 70%.

**6. Мелехин А.О., Толмачева В.В., Шубина Е.Г., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Грудев А.И.** Применение сверхсшитого полистирола для многокомпонентной твердофазной экстракции остатков 63 ветеринарных препаратов при их определении в курином мясе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии–танDEMной масс-спектрометрии // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. №. 8. С. 708-722. (Импакт-фактор RSCI – 1.127, **Q4**), 60%.

## **Иные публикации:**

**1. Мелехин А.О., Толмачева В.В., Апяри В.В., Дмитриенко С.Г.** ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов нитрофуранов совместно с другими ветеринарными препаратами в курином мясе: влияние ультразвука, кислотности раствора и температуры // Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России г. Москва, Россия. 2022. С. 471.

**2. Мелехин А.О.,** Толмачева В.В., Апяри В.В. Определение метаболитов нитрофуранов в меде методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием нового дериватизирующего реагента // Тезисы докладов XXXI Российской молодежной научной конференции с международным участием «Проблемы теоретической и экспериментальной химии г. Екатеринбург, Россия. 2021. С. 99.

**3. Мелехин А.О.,** Толмачева В.В., Шубина Е.Г., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Грудев А.И., Золотов Ю.А. Применение сверхсшитого и магнитного сверхсшитого полистиролов при определении метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-МС/МС // Материалы VI Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» г. Краснодар, Россия. 2021. С. 208.

**4. Сердюк О.Н., Мелехин А.О.** Сорбционное концентрирование нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020» г. Москва, Россия С. 120.

*Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своим научным руководителям к.х.н. Толмачевой В.В. и д.х.н. Дмитриенко С.Г. за поддержку в научно-исследовательской деятельности и помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы, акад. Золотову Ю.А. за постоянное внимание к работе, д.х.н. Апяри В.В. за постоянную помощь в работе и обсуждении результатов.*

*Автор выражает благодарность коллективу лаборатории концентрирования к.х.н. Горбуновой М.В., к.х.н. Фурлетову А.А., к.х.н. Торочешниковой И.И., Исаченко А.И., Гончарову Н.О. за помощь и поддержку.*

*Автор выражает благодарность выпускникам и студентам химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова Сердюк О.Н., Титову Е.А., Борейко Е.И. за помощь в проведении экспериментов и анализе литературных данных.*

*Автор выражает благодарность ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» за предоставленное оборудование, материалы и стандартные образцы.*

*Автор выражает искреннюю благодарность коллективу ФГБУ ЦНМВЛ в частности: Шубиной Е.Г., Баирову А.Л., Парфенову М.Ю., Булкатову Д.П., Давиденко А.С., Холявской Ю.Н., Седых Е.С., Грудеву А.И., Унежевой Ф.Х., Друговой О.П., Любимому С.П., Повалихину С.Н., Тищенко В.В., Чекменевой Н.А. за помощь в проведении исследований и обсуждении результатов.*