

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

**ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:  
к.х.н. Толмачева В. В.  
д.х.н., проф. Дмитриенко С.Г.

Москва – 2023

## Содержание

Сокращения и обозначения .....	4
Введение .....	6
Глава 1. Метаболиты нитрофуранов: свойства и хроматографическое определение в пищевых продуктах (обзор литературы) .....	12
1.1. Общие сведения о нитрофуранах и их метаболитах .....	12
1.2. Основные тенденции в определении метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах.....	18
1.3. Пробоподготовка образцов пищевых продуктов: методы гидролиза, дериватизации и очистки.....	20
1.4. Хроматографические методы определения метаболитов нитрофуранов .....	32
1.5. Многокомпонентные методы определения метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами .....	35
1.6. Формулирование задач исследования .....	41
Глава 2. Экспериментальная часть .....	43
2.1. Объекты исследования .....	43
2.2. Реагенты.....	46
2.3. Анализируемые образцы.....	47
2.4. Аппаратура .....	47
2.5. Условия хроматографического разделения, детектирования и идентификации .....	48
2.6. Методика синтеза магнитного сверхсшитого полистирола .....	48
2.7. Методика изучения сорбции нитрофуранов .....	49
Результаты и их обсуждение .....	51
Глава 3. Выбор условий дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом и идентификация продуктов дериватизации.....	51
3.1. Выбор условий дериватизации.....	51
3.2. Идентификация продуктов дериватизации .....	53
3.3. Выбор условий ускоренного гидролиза-дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом на примере образцов куриного мяса.....	56
Глава 4. Особенности сорбции нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах.....	63

4.1. Сорбция нитрофуранов на сверхсшитом полистироле в статическом режиме .....	63
4.2. Сорбция нитрофуранов на сверхсшитом полистироле в динамическом режиме .....	68
4.3. Сорбция нитрофуранов на магнитном сверхсшитом полистироле .....	69
4.4. Сравнение сорбционного поведения нитрофуранов на ССПС и магнитном ССПС .....	74
Глава 5. Определение метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-МС/МС .....	75
5.1. Применение 5-нитро-2-фуральдегида и магнитного сверхсшитого полистирола для определения метаболитов нитрофуранов в меде .....	75
5.2. Применение 5-нитро-2-фуральдегида и сверхсшитого полистирола для определения метаболитов нитрофуранов в куриных яйцах .....	80
5.3. Применение 5-нитро-2-фуральдегида и сверхсшитого полистирола для определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе и субпродуктах после проведения гидролиза и дериватизации при повышенной температуре .....	85
Глава 6. Многокомпонентное ВЭЖХ-МС/МС определение нитрофуранов и их метаболитов совместно с другими лекарственными веществами.....	89
6.1. ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами в меде, основанное на применении 5-нитро-2-фуральдегида и магнитного сверхсшитого полистирола .....	90
6.2. Применение магнитного сверхсшитого полистирола для многокомпонентной твердофазной экстракции нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами при их ВЭЖХ–МС/МС определении в молоке .....	100
Заключение.....	126
Выводы .....	131
Благодарности.....	133
Литература .....	134

## Сокращения и обозначения

$c_{\min}$  — предел обнаружения

$c_{\text{опр}}$  — предел определения

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

УВЭЖХ-МС/МС — ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-ФЛ — высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным детектированием

ВЭЖХ-УФ — высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

ВЭЖХ-ДАД — высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием

ДОС — диапазон определяемых содержаний

ССПС — сверхсшитый полистирол

СФЛ — спектрофлуориметрия

МДУ — максимально допустимые уровни

ТФЭ — твердофазная экстракция

ЖЖЭ — жидкость-жидкостная экстракция

МТФЭ — магнитная твердофазная экстракция

2-НБА — 2-нитробензальдегид

5-НФА — 5-нитро-2-фуральдегид

УЗП — ультразвуковая пробоподготовка

МВП — микроволновая пробоподготовка

ММР — мониторинг множественных реакций

### **Нитрофураны (НФ):**

ФЗД — фуразолидон

ФТД — фуралтадон

НФТ — нитрофурантоин

НФЗ — нитрофуразон (фурацилин)

НФС — нифурсол

НВ — нитровин

НОЗ — нифуроксазид

НФД — нифуралдезон

НПИР — нифурпиринол

НСТЛ — нифурстиренат натрия

**Метаболиты НФ:**

АОЗ — 3-амино-2-оксазолидинон

АМОЗ — 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон

АГД — 1-аминогидантоин,

СЕМ — семикарбазид

ДНСК — гидразид 3,5-динитросалициловой кислоты

АГН — аминогуанидина

ГБГ — 4-гидроксибензгидразид

ГОК — гидразид оксаминовой кислоты

**Другие ветеринарные лекарства**

ХАФ — хлорамфеникол

ФФ — флорфеникол

## Введение

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-фуральдегидом и с применением ВЭЖХ-МС/МС идентифицировать продукты дериватизации.

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

3. Исследовать особенности сорбции нитрофуранов на сверхшитом и магнитном сверхшитом 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 мёда 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-фуральдегид 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 мёде, 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 мёде 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 руководителем дипломной и курсовых работ. Синтез магнитного сорбента на основе ССПС и наночастиц  $Fe_3O_4$  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.

# Глава 1. Метаболиты нитрофуранов: свойства и хроматографическое определение в пищевых продуктах (обзор литературы)<sup>1</sup>

## 1.1. Общие сведения о нитрофуранах и их метаболитах

Проблеме безопасности пищевых продуктов в настоящее время уделяется большое внимание [1]. Среди потенциально вредных веществ, которые необходимо контролировать в пищевых продуктах, значительное место занимают ветеринарные препараты [2 – 4]. Лекарственные вещества обычно применяются в животноводстве для лечения и профилактики заболеваний, а также в качестве стимуляторов роста. Широкое и неправильное их использование в ветеринарной практике может привести к наличию остатков этих веществ в пищевых продуктах, что представляет потенциальную опасность для здоровья потребителей, так как они могут вызывать аллергические реакции, индуцировать устойчивость патогенов к антибиотикам, оказывать токсическое микробиологическое действие, вызывать канцерогенные или тератогенные эффекты [5 – 7]. По этой причине мониторинг лекарственных веществ в тканях животных необходим для обеспечения безопасности пищевых продуктов [8 – 11]. Среди более чем 200 лекарственных веществ, нашедших применение в животноводстве и аквакультуре и включающих сульфаниламиды, тетрациклины, фторхинолоны, амфениколы и некоторые другие антибиотики, особое место занимают нитрофураны.

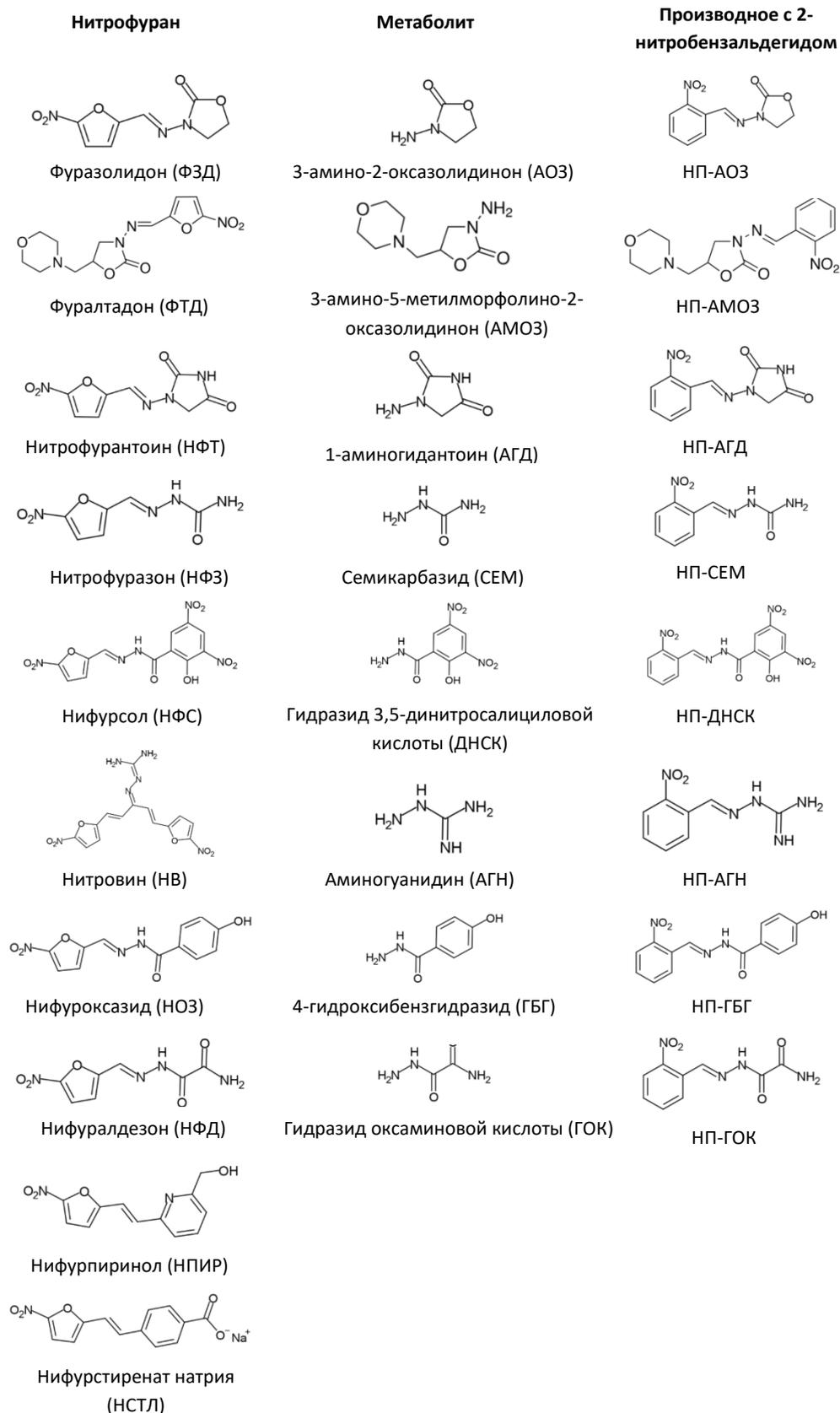
Нитрофураны (**НФ**) – производные 5-нитрофурана – класс синтетических антибактериальных и противопаразитарных лекарств, которые используют в практической медицине с середины 20 века [12]. Они активны в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий (стрептококков, стафилококков, кишечной палочки, сальмонелл, протей, спорообразующих анаэробов и др.), а также трихомонады, трихомонады, лямбды и ряда других микроорганизмов [13, 14]. До недавнего времени НФ широко использовались в ветеринарной практике для профилактики и лечения некоторых бактериальных инфекций у сельскохозяйственных животных, рыб, пчел, а также в животноводстве в качестве стимуляторов роста [15].

---

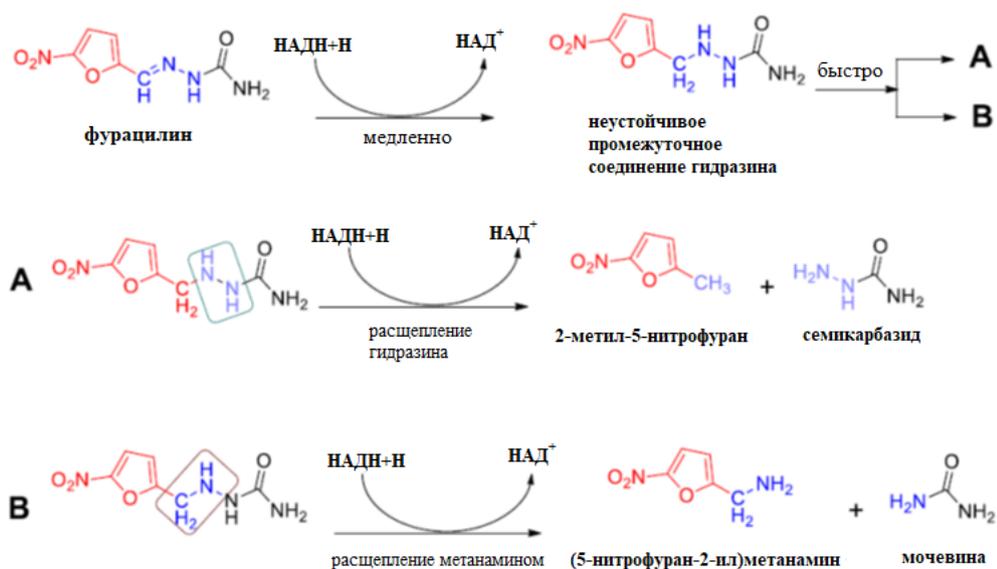
<sup>1</sup>При подготовке данной главы диссертации использована следующая публикация, выполненная автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G. Current trends in analytical strategies for the chromatographic determination of nitrofurans 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%.

В животноводстве чаще всего используют фуразолидон (**ФЗД**), фуралтадон (**ФТД**), нитрофурантоин (**НФТ**), нитрофуразон или фурацилин (**НФЗ**) и в меньшей степени нифурсол (**НФС**). Характерной чертой этих нитрофуранов является быстрый метаболизм *in vivo*, приводящий к образованию таких основных метаболитов как 3-амино-2-оксазолидинон (**АОЗ**), 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (**АМОЗ**), 1-аминогидантоин (**АГД**), семикарбазид (**СЕМ**) и гидразид 3,5-динитросалициловой кислоты (**ДНСК**), соответственно [16]. Структурные формулы нитрофуранов и их метаболитов приведены на рис. 1. Метаболиты НФ могут оставаться в организме животного в течение недель, возможно, даже месяцев в виде связанных с белками соединений. После того как было установлено, что метаболиты нитрофуранов обладают мутагенными и канцерогенными свойствами [17], во многих странах, включая Россию, их использование в ветеринарии полностью запрещено [18, 19]. В Европейском и Таможенном союзах установлены максимально допустимые уровни (**МДУ**) остаточных количеств метаболитов нитрофуранов в продуктах питания (1 мкг/кг). Однако благодаря высокой антибактериальной активности, дешевизне и доступности использование НФ в животноводстве и аквакультуре продолжается не только в большинстве развивающихся стран, но и в Европейском союзе, несмотря на установленные законом запреты [20]. На это указывают данные мониторинга качества пищевых продуктов, проводимого в разных странах [21 – 24], а также тот факт, что НФ и их метаболиты все чаще обнаруживают в объектах окружающей среды [25 – 31]. Согласно базе данных Системы быстрого оповещения для пищевых продуктов и кормов (RASFF) в течение 2002–2017 г.г. было зарегистрировано 854 случая загрязнения пищевых продуктов нитрофуранами [33].

Из сравнения структурных формул нитрофуранов (рис.1) видно, что все они имеют в своем составе нитрофурановое кольцо, которое связано с боковой цепью через азометиновую связь. По химическому строению они относятся к 5-нитро-2-фурфулиденгидрозолам или 5-нитро-2-фурил ( $\beta$ -акрилиден) гидрозолам. Считают, что основной фармакофорной группой, обеспечивающей их антимикробное действие является нитрогруппа. В ряде исследований было показано, что замена нитрогруппы приводит к резкому снижению или полному исчезновению



**Рис. 1.** Молекулярные структуры нитрофуранов, их метаболитов и производных 2-нитробензальдегида, где НП означает нитрофенильную функциональную группу.



**Рис. 2.** Схема метаболизма нитрофуранов под действием азоредуктаз на примере нитрофуразона [13].

противомикробных свойств [13]. В клетках микроорганизмов нитрогруппа восстанавливается до аминогруппы, что приводит к повреждению мембран микробной клетки, влияет на некоторые ферментативные процессы клеточного дыхания, снижает продукцию токсинов и опасность интоксикации. Кроме того, нитрофураны снижают активность некоторых ферментов, устойчивость к фагоцитозу, а также нарушают синтез ДНК микроорганизмов [12]. Второй фармакофорной группой является гидразоновый фрагмент, который обладает не только антибактериальной, но и противотуберкулезной и противоопухолевой фармакологической активностью [13]. Несмотря на более чем 60 лет применения устойчивость к нитрофуранам у патогенных микроорганизмов развивается медленно, вероятно, из-за разнообразия путей их превращения в организме, а также их эффективности как в аэробных, так и в анаэробных условиях [13].

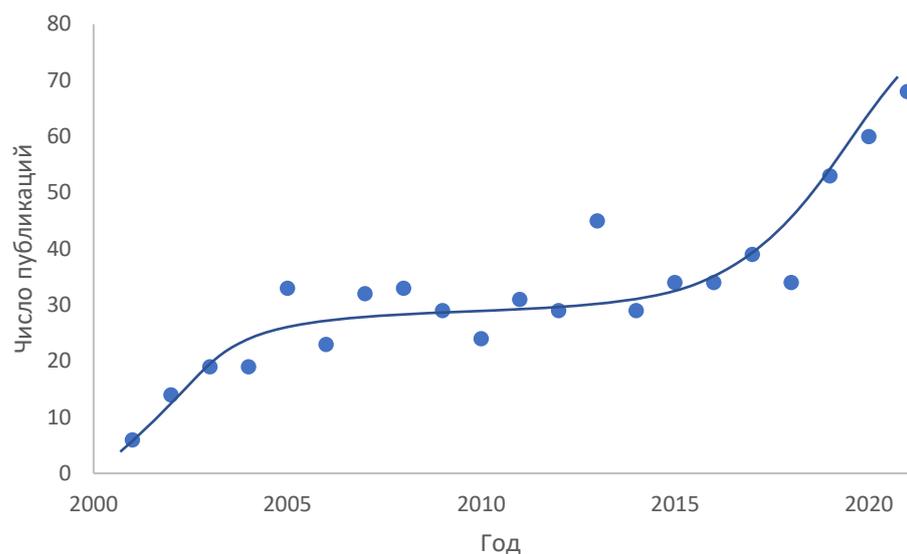
Как уже было сказано выше, при поступлении нитрофуранов в организм человека или животных под влиянием двух ферментных систем азоредуктаз (*azoreduction*) и нитроредуктаз (*nitroreduction*) они быстро метаболизируются. Схема метаболизма нитрофуранов под действием азоредуктаз на примере нитрофуразона приведена на рис. 2 [13]. На первом медленном этапе образуются неустойчивое промежуточное соединение гидразина, которое быстро подвергается ферментативному восстановительному расщеплению, что приводит к образованию семикарбазида (СЕМ) (путь А), либо к мочевины в качестве побочного продукта

расщепления метанамина (путь В). Метаболитами других нитрофуранов, которые образуются под действием азоредуктаз в результате кислотного гидролиза и разрыва азометиновой связи ( $C = N$ ), являются соединения, представленные на рис. 1.

Несмотря на то, что ряд образующихся метаболитов нитрофуранов отвечают за их химиотерапевтическое действие, большинство из них в живом организме проявляют мутагенные и канцерогенные свойства. Метаболиты нитрофуранов нарушают водно-солевой баланс организма, подавляют активность ферментов печени, вызывают кардиомиопатию, что приводит к сердечной недостаточности, понижают уровень белка в плазме, вызывают анемию и обладают канцерогенным действием. Исследования показали, что СЕМ и АОЗ способствуют образованию опухолей сосудов и легких, а АГД связывают с новообразованиями в почках, костях и яичниках [13, 16].

Ряд работ посвящено образованию и накоплению метаболитов НФ в различных тканях животных, получавших лечебный корм, содержащий нитрофураны [34 – 45]. Метаболиты НФ обнаруживаются в тканях свиней [34 – 36], кур [37 – 39] и рыб [40], глазах бройлеров [41], белке, желтке и скорлупе яиц [42] спустя несколько часов после прекращения лечения и сохраняются в тканях животных в течение многих недель после отмены лечения. Метаболит АОЗ был обнаружен в печени, почках и мышцах крыс, которых кормили мясом свиней, получавших в виде лечения фуразолидон [43]. Более того, содержание этого метаболита в тканях крыс не уменьшилось после того, как свиное мясо было подвергнуто тепловой обработке [44]. Исследования, проведенные в работе [45], показали, что метаболиты НФ устойчивы к обычным бытовым кулинарным процедурам (жарка, гриль, микроволновая печь) и не разлагаются в пищевых тканях животных при хранении в течение 8 месяцев в морозильной камере. Высокая химическая устойчивость метаболитов НФ и их биодоступность несомненно наносят ущерб здоровью потребителей продуктов, содержащих эти метаболиты, и объясняет неослабевающий интерес к разработке новых способов их определения.

Динамику ежегодного числа публикаций по определению НФ и их основных метаболитов за последние 20 лет, рассчитанную по базе данных Scopus, иллюстрирует рис. 3. Общее количество опубликованных за этот период работ составило почти 700. Наиболее активно исследования проводились в Китае, Индии, США, Великобритании и Франции. С 2001 года статьи по обсуждаемой



**Рис. 3.** Динамика количества публикаций за год по определению нитрофуранов и их основных метаболитов в период с 2001 по 2021 г. по данным базы данных Scopus.

теме публиковались в основном в таких журналах, как *Analytica Chimica Acta*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *Food Chemistry*, *Food Additives and Contaminants: Part A*, *Journal of Chromatography B* и других. Высокая доля журналов, связанных с пищевыми продуктами, в этом списке указывает на важность определения метаболитов НФ в образцах этого типа. Из диаграммы видно, что с 2018 года количество статей существенно увеличивается. Более 30% всех статей, датированных периодом с 2001 по 2021 год, были опубликованы за последние 4 года. Это, вероятно, указывает на заметную современную тенденцию в этой области.

С 2008 по 2021 год было опубликовано несколько обзоров, касающихся различных методов предварительной обработки и определения метаболитов НФ. В обзорах [15, 16] представлена информация об общих свойствах нитрофуранов, их мутагенном и токсическом действии, метаболизме, конкретных аспектах законодательства, связанных с их запретом, а также валидационных требованиях и аналитических методах скрининга и подтверждения их присутствия в различных пищевых продуктах в соответствии с правилами ЕС. В кратких обзорах [46] (34 цитирования), [47] (52 цитирования) и [48] (50 цитирований) приведены примеры определения метаболитов НФ в пищевых продуктах различными методами,

включая жидкостную хроматографию – тандемную масс-спектрографию (ЖХ-МС/МС), опубликованные в основном до 2012 – 2013 гг. В обзоре [49] рассмотрены особенности определения метаболитов НФ в куриных яйцах. Основным принципам и применению иммуноанализа для обнаружения метаболитов НФ, включая иммуноферментный анализ, флюороиммуноанализ, иммунохемилюминесцентный анализ, иммунохроматографию и иммуносенсорный анализ, посвящен обзор [50]. И наконец, обзор Тиана и др. [51] посвящен основным источникам поступления, токсичности и методам обнаружения семикарбазида.

В настоящем обзоре обобщены основные методы пробоподготовки и определения метаболитов нитрофуранов в продуктах питания, опубликованные преимущественно за последние десять лет. Основное внимание мы уделили хроматографическим методам определения метаболитов НФ, включающим высокоэффективную жидкостную хроматографию с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), ВЭЖХ в сочетании с флуоресцентным (ВЭЖХ-ФЛ) или ультрафиолетовым (ВЭЖХ-УФ) детектированием, поскольку такие методы получили наиболее интенсивное развитие в последнее десятилетие.

## **1.2. Основные тенденции в определении метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах**

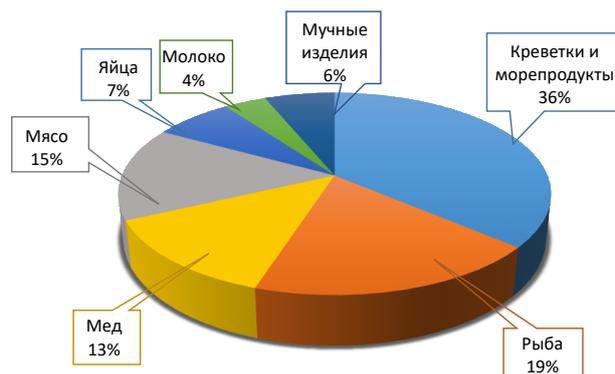
Так как нитрофураны запрещены к применению в ветеринарии, мониторингу остатков этих препаратов в пищевых продуктах уделяется большое внимание. Быстрый метаболизм исходных НФ в организме животных изменил существовавшую ранее аналитическую методологию скрининга: если в ранних работах в пищевых продуктах пытались определять исходные НФ, то в настоящее время определяют их метаболиты. Поскольку в организм животных нитрофураны попадают с пищей и водой, то в отличие от пищевых продуктов, в этих объектах по-прежнему определяют исходные нитрофураны [52 – 58], в том числе и вместе с другими лекарственными веществами [59 – 61].

В рамках финансируемого ЕС проекта FoodBRAND (обнаружение связанных остатков и нитрофуранов) был разработан подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС для определения в пище четырех запрещенных нитрофуранов, а именно фуралтадона, фуразолидона, нитрофурантоина и нитрофуразона, в форме их

соответствующих метаболитов: аминорфолонометил-2-оксазолидинона, 3-амино-2-оксазолидинона, 1-аминогидантоина и семикарбазида [62]. Количественное определение основано на проведении кислотного гидролиза для выделения связанных с белками метаболитов этих нитрофуранов с последующей дериватизацией *in situ* 2-нитробензальдегидом (**2-НБА**). Контроль за содержанием метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах существенно не изменился с момента внедрения методологии FoodBRAND; во многих странах эта методика с небольшими модификациями используется в качестве официальной [63 – 65].

За время, прошедшее с момента внедрения этой методики, произошли изменения, касающиеся прежде всего расширения числа определяемых остатков нитрофуранов. Так, например, в список запрещенных нитрофуранов был добавлен нифурсол (**НФС**), который используется в качестве кормовой добавки, применяемой для профилактики гистомоноза у домашней птицы. Содержание нифурсола в пищевых продуктах контролируют, определяя его метаболит – 3,5-динитро-салицилгидразид [39]. В дополнение к этим пяти нитрофуранам, появились сообщения о необходимости определения в пищевых продуктах и других препаратов нитрофуранового ряда, таких как нитровин (**НВ**) [66, 67], нифуроксазид (**НОЗ**) [67 – 69], нифуралдезон (**НФД**) [67], нифурпиринол (**НПИР**) и нифурстиренат натрия (**НСТЛ**) [69] (рис. 1). Согласно данным, приведенным в этих работах, нитровин, нифуроксазид и нифуралдезон определяли в виде их метаболитов – аминогуанидина (**АГН**), 4-гидроксибензгидразида (**ГБГ**) и гидразид оксаминовой кислоты (**ГОК**), соответственно, а нифурпиринол и нифурстиренат натрия – в виде исходных соединений. Еще одно изменение относится к ужесточению требований по их содержанию в пищевых продуктах: в странах ЕС МДУ остатков нитрофуранов снижены с 1.0 до 0.5 мкг/кг [70].

В последнее десятилетие метаболиты нитрофуранов определяли в различных видах пищевых продуктов, включая креветки и другие морепродукты, рыбу, мед, мясо, яйца, молоко и мучные изделия (рис. 4) с использованием различных, преимущественно хроматографических методов. Согласно опубликованным работам, усилия исследователей были направлены на разработку новых методов



**Рис. 4.** Перечень пищевых продуктов, в которых за период с 2012 по 2022 г. определяли метаболиты нитрофуранов. Данные были получены из базы данных Scopus.

подготовки образцов, позволяющих сократить время гидролиза и дериватизации, на поиск новых дериватирующих агентов, а также на разработку многокомпонентных, многоклассовых методов, позволяющих определять метаболиты нитрофуранов вместе с другими лекарственными веществами.

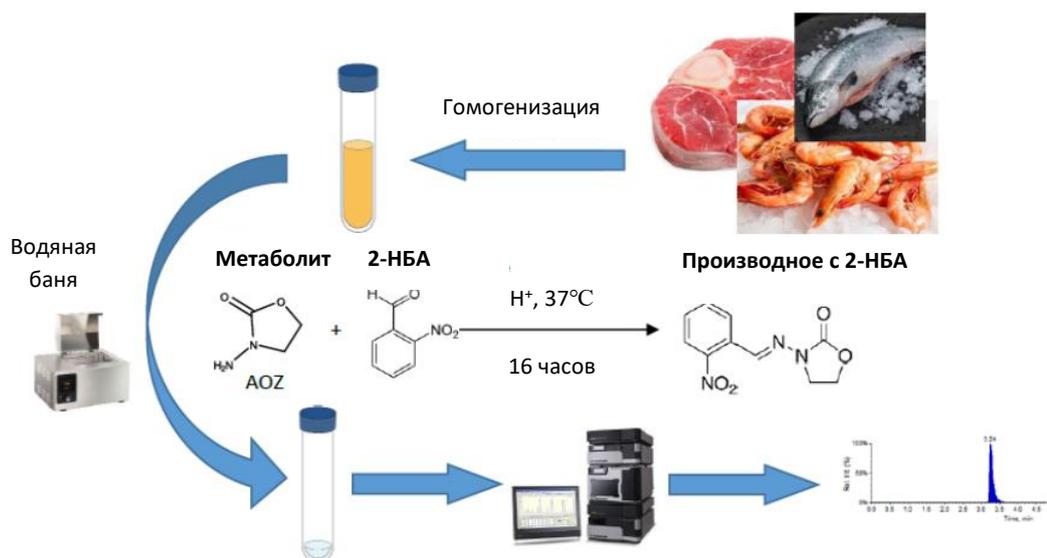
### **1.3. Пробоподготовка образцов пищевых продуктов: методы гидролиза, дериватизации и очистки**

Обнаружение и определение метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах связано с рядом проблем. Во-первых, в продуктах животного происхождения они прочно связаны с белками, поэтому их определение возможно только после проведения кислотного гидролиза. Во-вторых, метаболиты нитрофуранов являются очень гидрофильными веществами, что затрудняет не только их концентрирование методами жидкость-жидкостной (ЖЖЭ) или твердофазной (ТФЭ) экстракции, но и разделение на обращенно-фазовых хроматографических колонках. В-третьих, из-за низкой молекулярной массы и отсутствия хромофоров в их составе чувствительность определения этих соединений невелика с использованием не только УФ-, но и масс-спектроскопического-детекторов, поэтому перед определением метаболитов НФ необходима их предварительная дериватизация. Еще одной проблемой, является то, что нитрофураны могут быть не единственным источником веществ, которые считаются их метаболитами. Например, доказано, что семикарбазид, метаболит нитрофуразона (фурацилина), образуется в процессе

хранения сухих молочных продуктов, при разложении азодикарбонамида в муке (вспениватель, который улучшает качество муки, запрещен в ЕС), при действии гипохлорита на некоторые пищевые добавки.

Естественным источником семикарбазида являются панцири ракообразных (креветок, раков, крабов) [51]. Все это может приводить к ложноположительным результатам при определении этого метаболита. И, наконец, еще одна проблема связана с высокой стоимостью стандартных образцов метаболитов и продуктов их дериватизации. В большинстве опубликованных статей, включая официальные методики, пробоподготовка образцов перед определением метаболитов нитрофуранов с помощью ВЭЖХ-МС/МС обычно проводится в несколько этапов. На первом этапе образцы тщательно промывают органическим растворителем для удаления соединений, не связанных с белками, что особенно важно в случае семикарбазида. Затем проводят кислотный гидролиз и дериватизацию 2-нитробензальдегидом, в результате чего образуются соответствующие производные 5-нитрофенилгидразона, структурные формулы которых приведены на рис. 1. В большинстве случаев кислотный гидролиз и дериватизацию проводят в одну стадию при 37-40°C в течение не менее 16 часов. Для этого к гомогенизированному образцу добавляют 0.1 – 0.2 М соляной кислоты и раствор 2-НБА в метаноле или диметилсульфоксиде. На следующем этапе экстракты очищают ЖЖЭ этилацетатом или ТФЭ, иногда дополнительно обезжиривают гексаном.

Схема стандартной процедуры определения метаболитов нитрофуранов на примере метаболита фуразолидона – 3-амино-2-оксазолидинона – приведена на рис. 5, а в табл. 1 систематизированы условия пробоподготовки различных пищевых продуктов перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов в виде производных с 2-нитробензальдегидом. Стандартную процедуру гидролиза-дериватизации с 2-НБА в качестве дериватирующего агента перед ВЭЖХ-МС/МС определением использовали для определения АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ в мясе [71 – 74]; рыбе [64,71, 74, 75]; креветках и других морепродуктах [64, 74, 76 – 79]; яйцах [49, 74, 80]; молоке [68, 80]; меде и продуктах пчеловодства [71, 80, 81]; пищевых добавках из порошка черепахи с мягкой скорлупой [82]; АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ и ДНСК в мясе и продуктах



**Рис. 5.** Схема стандартной процедуры определения метаболитов нитрофуранов на примере метаболита фуразолидона – 3-амино-2-оксазолидинона (АОЗ).

аквакультуры [65]; АОЗ, АМОЗ, АГД в пчелиной пыльце [83]; АОЗ, АМОЗ в мясе [84]; АМОЗ и ДНСК в яйцах [85]; ДНСК в мясе, рыбе, креветках, меде [86, 87]; СЕМ в креветках и крабах [88, 89]. Пробоподготовка является самым длительным и трудоемким этапом анализа, поэтому не удивительно, что в последнее десятилетие были предложены альтернативные подходы к оптимизации условий кислотного гидролиза-derivатизации за счет повышения температуры [90, 91], изменения концентрации HCl [92], применения ультразвукового [93] или микроволнового [67, 94] излучения. Традиционную длительную пробоподготовку образцов пищевых продуктов при определении в них метаболитов нитрофуранов (инкубация в водяной бане 16 ч, 37 °С), как показано в нескольких работах, можно сократить до 4 [90] и 2 [91] часов за счет повышения температуры до 55 и 60 °С соответственно. При этом, как отмечается в работе [91], повышение температуры приводит не только к сокращению времени, но и к повышению выхода продуктов derivатизации. Еще более эффективным оказалось одновременное воздействие температуры и ультразвукового или микроволнового излучения. При проведении термостатического ультразвукового гидролиза-derivатизации это время удалось снизить с 16 ч до 2 ч (45 кГц, 60 °С) [93]. При проведении процедуры в микроволновой печи это время сокращается до 6 мин (95 °С) [94], но при этом уменьшается выход продуктов derivатизации за счет разложения нитрофенильных

**Таблица 1.** Примеры ВЭЖХ–МС/МС и УВЭЖХ-МС/МС определения метаболитов нитрофуранов в различных пищевых продуктах в виде их производных с 2-нитробензальдегидом

Аналиты	Объект анализа	Пробоподготовка (гидролиз, дериватизация; очистка)	Метод, МС/МС режим	Хроматографическая колонка	Подвижная фаза	Степень выделения, % $C_{min}$ , мкг/кг	Литера тура
1	2	3	4	5	6	7	8
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК, ГБГ, ГОК, АГН	Мясо птицы	0.1 М НСІ, МВП 4 мин, 60°C; QuEChERS	УВЭЖХ-МС/М С ESI(+)-МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Eclipse Plus Phenyl- Hexyl RRHD (50× 2.1 мм, 1.8 мкм),	А: 5 мМ NH <sub>4</sub> FA:MeOH (90:10, v/v) Б:5 мМ NH <sub>4</sub> FA в H <sub>2</sub> O:MeOH (10:90, v/v)	н. у. 0.013 – 0.200	[67]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Молоко, мед, мясо птицы, рыба	0.1 М НСІ, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Phenomenex Synergy Hydro RP (150x2.00 мм, 4 мкм),	А: H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20, v/v) Б: 0.1% НАс в MeOH	70–110 0.24–0.61	[71]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Мясо	0.1 М НСІ, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Agilent XDB-C18 (50 × 4.6 мм, 1.8 мкм)	А: 1% FA в H <sub>2</sub> O Б: ACN:MeOH (50:50, v/v).	65–73 0.2–1	[72]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Курица	0.125 М НСІ, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом; ТФЭ МСХ картридж	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	XBridge™ Phenyl (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм)	А: 10 мМ NH <sub>4</sub> FA Б: MeOH:ACN, (80:20, v/v).	97.0–102.0 0.03–0.2	[73]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Свинина, курица, рыба, утка, крабы, креветки, яйца	0.2 М НСІ, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	УВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2.1 мм, 1.8 мкм)	А: 0.1% FA, 0.5 мМ NH <sub>4</sub> Ac Б: ACN	80.3–119.0 0.1–0.5	[74]

1	2	3	4	5	6	7	8
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Рыба	0.2 М НСІ, ночь при 37 °С; ТФЭ Oasis HLB картридж	УВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Acclaim <sup>o</sup> R RSLC C18 (100 × 2.1 мм, 2.2 мкм)	А: АСN Б: 5 мМ NH <sub>4</sub> Ас:0.1% НАс (25:75, v/v)	88–112 0.5	[75]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Рыба, креветки	0.2 М НСІ, ночь при 37 °С; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 2.1 мм, 1.8 мкм)	А: 0.1% НАс:АСN: (90:10, v/v) Б: 0.1% НАс в Н <sub>2</sub> О	84–115 0.1–0.3	[64]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	0.125 М НСІ, 16 ч, 37°С; ЖЖЭ этилацетатом;	ВЭЖХ -МС/МС АРСІ (+)- МС/МС	Inertsil ODS-3, (50 × 2.1 мм, 5 мкм)	А: 42.5% MeOH:8.5 мМ NH <sub>4</sub> Ас (42.5:57.5, v/v) Б: MeOH	100.2–104.0 0.052 –0.108	[76]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	0.2 М НСІ, 16 ч, 37°С; ЖЖЭ этилацетатом	ID-ВЭЖХ – МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Symmetry C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм)	А: АСN Б: 0.1% НАс в Н <sub>2</sub> О	н. у. 0.08 – 0.36	[77]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	0.2 М НСІ, ночь при 37°С; ЖЖЭ этилацетатом;	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	н. у.	А: 0.5 мМ NH <sub>4</sub> Ас Б: MeOH	88–110 0.12 – 0.23	[78]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	0.2 М НСІ, ночь при 37 °С; ТФЭ Oasis HLB картридж	УВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Kinetex C18 (50 × 2.1 мм, 2.6 мкм)	А: MeOH Б: 10 мМ NH <sub>4</sub> FA	73–103 1.5 – 2.6	[79]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Яйца, молоко, мед	0.2 М НСІ, ночь при 40°С; ТФЭ SDB-L картридж	УВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС	C8(2) (75 × 2 мм, 3 мкм)	А: 5 мМ NH <sub>4</sub> FA Б: MeOH	88.9–107.3 0.50	[80]

1	2	3	4	5	6	7	8
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Мед	0.2 М HCl, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом;	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Zorbax Eclipse Plus C18 (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм)	А: ACN Б: 0.1% FA	69.9–91.8 0.16	[81]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Мясо черепахи	0.125 М HCl, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Aegispak C18-L (100 × 2 мм, 5 мкм)	А: ACN Б: 0.1% FA	82.2–108.1 0.028–0.182	[82]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК	Мясо, морепродкты	0.1 М HCl, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Symmetry C18 (100 × 2.1 мм, 3.5 мкм)	А: 2 мМ NH <sub>4</sub> Ac и 0.01% HAc в H <sub>2</sub> O Б: MeOH	86.5–103.7% 0.05–0.09	[65]
АОЗ, АМОЗ, АГД,	Пчелиная пыльца	0.125 М HCl, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Capcell Pak C18 (150 × 2 мм, 5 мкм)	А: 10 мМ NH <sub>4</sub> FA Б: MeOH	94.1–104.0 0.18–0.30	[83]
АОЗ, АМОЗ	Мясо	0.1 М HCl, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 4.6мм, 3.5 мкм)	А: 0.05мМ NH <sub>4</sub> Ac: MeOH (80:20 v/v) Б: MeOH	н. у. н. у.	[84]
АМОЗ, ДНСК	Яйца	0.2 М HCl, ночь при 37 °C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(–)-МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Agilent Zorbax XDB C18, (150 × 2.1мм, 3.5 мкм)	А: 10 мМ NH <sub>4</sub> FA(pH 4): MeOH (90:10, v/v) Б: 10 мМ NH <sub>4</sub> FA(pH 4):MeOH (10:90, v/v)	94.1–104.0 0.1–0.3	[85]
ДНСК	Мясо, рыба, креветки, мед и т.д.	0.05 М HCl, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС ESI(–)-МС/МС ММР режим	Thermo Aquasil C18 (150 × 2.1 мм, 5 мкм)	А: ACN Б: 5 мМ NH <sub>4</sub> Ac	75.8–108.4 0.5	[86]

1	2	3	4	5	6	7	8
СЕМ	Креветки	н. у.	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Columbus C18, (150 × 2 мм, 5 мкм)	н. у.	н. у. н. у.	[88]
СЕМ	Креветки, крабы	0.2 М HCl, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	УВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	ACQUITY UHPLC BEH C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм)	А: MeOH Б: 2 мМ NH <sub>4</sub> Ac 0.1% FA	н. у. н. у.	[89]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Рыба	0.05 М HCl, метанол, 30 мин, 37 °С	УВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Agilent Eclipse Plus C18 (50 × 2.1 мм, 5 мкм)	А: 0.04% FA в ACN:H <sub>2</sub> O (1:99, v/v) Б: ACN:H <sub>2</sub> O (99:1, v/v)	55.0–75.8 н. у.	[92]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	0.1 М HCl, FA (0.1% w/v) МВП, 6 мин; ТФЭ Agilent C18 картридж	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Phenomenex Luna C18 (150 × 2 мм, 2 мкм)	А: 0.02% HAc в H <sub>2</sub> O Б: 0.02% HAc в ACN	74–99 1.2–1.9	[94]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Рыба	УЗП, 1 ч, 40°C; ЖЖЭ этилацетатом; ТФЭ Oasis HLB картридж	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Thermo Hypersil Gold C18 (100 × 2.1 мм, 5 мкм)	А: 0.1% FA в H <sub>2</sub> O Б: MeOH	77.2–97.4 0.07–0.13	[95]

Сокращения: МВП: микроволновая пробоподготовка; УЗП: ультразвуковая пробоподготовка; FA: муравьиная кислота; HAc: уксусная кислота; MeOH: метанол; ACN: ацетонитрил; н. у. не указан

производных некоторых нитрофуранов. В работе [92] сообщается о значительном снижении времени гидролиза-derivатизации (до 5 мин) при комнатной температуре за счет повышения концентрации соляной кислоты и количества метанола в реакционной смеси. От цитируемых выше работ отличается работа [95], в которой для извлечения метаболитов нитрофуранов из образцов рыб использовали ускоренную экстракцию водно-метанольным раствором, а derivатизацию проводили в УЗ-ванне в течение 1 ч.

В большинстве исследований гидролизат, содержащий производные метаболитов НФ с 2-НБА, подвергают дальнейшей очистке с помощью ЖЖЭ или ТФЭ. Чаще всего для этой цели используют ЖЖЭ с этилацетатом. Так, например, этот способ очистки использовали для очистки гидролизатов, полученных при определении метаболитов НФ в мясе [65, 71, 72, 73, 74, 84 85 86], рыбе [64, 65, 71, 74, 86], креветках и других морепродуктах [64, 65, 74, 76, 77, 78, 82, 85, 89], яйцах [74, 85], молоке [71], меде и продуктах пчеловодства [71, 81, 83, 86]. К раствору, полученному после кислотного гидролиза-derivатизации, добавляют фосфат натрия и доводят рН примерно до 7, после чего производные метаболитов экстрагируют несколькими порциями этилацетата. Органические экстракты собирают, упаривают, повторно растворяют в подвижной фазе и анализируют. Дополнительную очистку экстрактов от жиров, пчелиного воска и избытка derivатизирующего агента проводят экстракцией гексаном [72, 76, 82, 83].

Гораздо реже очистку гидролизата, содержащего производные метаболитов НФ с 2-НБА, выполняют только ТФЭ с использованием таких картриджей как Oasis MCX [73], Oasis HLB [75, 79, 93, 100], SDB-L [80], C18 [79, 95]. Сравнение ТФЭ на картриджах, заполненных сорбентами Oasis HLB и Sep-Pak Plus C18 [79], показывает, что Oasis HLB является лучшим с точки зрения эффективности. Среди современных методов очистки можно отметить метод QuEChERS [67] и использование полимеров с молекулярными отпечатками [97]. В ряде исследований экстракт, полученный после кислотного гидролиза-derivатизации, использовался для определения метаболитов без дополнительной очистки [88, 92].

Помимо 2-нитробензальдегида для derivатизации используют, хотя и значительно реже, и другие derivатизирующие агенты, условия пробоподготовки с которыми систематизированы в табл. 2. Так, например, 2-нафтальдегид [96],

**Таблица 2.** Примеры хроматографического определения метаболитов нитрофуранов в различных пищевых продуктах в виде их производных с различными дериватизирующими реагентами

Дериватизирующий реагент	Аналиты	Объект анализа	Пробоподготовка (гидролиз, дериватизация, очистка)	Метод, МС/МС режим	Хроматографическая колонка	Подвижная фаза	Степень выделения, % C <sub>min</sub> , мкг/кг	Литература
1	2	3	4	5	6	7	8	9
2-Фенилбензальдегид	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Желатин	0.2 М НСl, 12 ч, 37°C; ТФЭ, Oasis PRiME HLB	УВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС	ACQUITY UHPLC BEH C18 column (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм )	А: ACN Б: 5 мМ NH <sub>4</sub> Ac	85.6–95.6 0.2 – 0.3	[101]
2,4-Динитрофенилгидразин	СЕМ	Крабы, креветки	0.2 М НСl, УЗП, 30 мин; ЖЖЭ, этилацетатом	УВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС	ACQUITY CSH™C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм )	ACN:H <sub>2</sub> O (90:10; v/v)	н. у. 1	[99]
2,4-Динитрофенилгидразин	СЕМ	Креветки, крабы, рыба, мясо черепахи	0.2 М НСl, 20 мин, 60°C; ТФЭ, Oasis PRiME HLB	УВЭЖХ–МС/МС QTOF-HRMS ESI(+)-МС/МС	Athena C18 (150 × 2.1 мм, 1.8 мкм)	ACN:H <sub>2</sub> O (70:30; v/v)	80.9 –110.5 0.1	[100]
2-Нафталальдегид	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–ДАД (308 нм)	ChromSpher 5 Pesticide (250 x 4.6мм, 5 мкм)	ACN:5 мМ NH <sub>4</sub> Ac pH 7.5	86 1–2	[96]

1	2	3	4	5	6	7	8	9
2-Хлорбензальдегид	СЕМ	Рыба	30 мин, 25°C. MI-SBE	ВЭЖХ–УФ (281 нм)	BDS HYPERSIL C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм)	MeOH:25 мМ фосфатны й буфер (60:40; v/v)	96.2 –105.1 0.59 мкг/л	[97]
4-Нитробензоилхлорид	СЕМ	Мучные изделия	1 мин, 25°C.	ВЭЖХ–УФ (261 нм.)	Diamonsil C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм)	А: 10 мМ HAc Б: ACN	76.6–119 1.8 мкг/л	[98]
2-Гидрокси-1- нафталальдегид	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Свинина	0.45 М HCl/ MeOH (3:7, v/v), УЗП, 60 мин, дериватизация 60°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–ФЛ λ <sub>ex</sub> = 395 нм λ <sub>em</sub> =463 нм	YMC-Pack Polymer C18 column (250 × 4.6 мм, 6 мкм)	А: 10 мМ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /Na OH (pH 10.3)  Б: фаза А:ACN (50:50; v/v)	92.3–103 0.19–0.22	[102]
2-Гидрокси-1- нафталальдегид	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	0.5 М HCl/ MeOH (3:7, v/v), УЗП, 40 мин, дериватизация 60°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–ФЛ λ <sub>ex</sub> = 395 нм λ <sub>em</sub> =463 нм	YMC-Pack Polymer C18 (250 × 4.6 мм, 6 мкм)	А: 10 мМ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /Na OH (pH 10.3)  Б: фаза А:ACN (50:50; v/v)	87.4–107 0.20–0.26	[103]

1	2	3	4	5	6	7	8	9
2-(11Н-Бензо[а]карбазол-11-ил)-этилхлороформиат	СЕМ	Хлеб, свинина, курица, рыба и т.д.	0.2 М НСl, УЗП, 20 мин, дериватизация 10 мин, 40°C	ВЭЖХ–ФЛ λex= 279 нм, λem=380 нм	Eclipse XDB-C8 (н. у.)	A: H <sub>2</sub> O:ACN (95:5; v/v) B: ACN	89.5–100.4 0.4	[104]
Фторенилметилокси-карбонилхлорид	СЕМ	Рыба, хлеб	1% НСl, 3 ч; 50°C, дериватизация 5 мин, 25°C	ВЭЖХ–ФЛ λex= 260 нм, λem=320 нм	GraceSmart C18 (150×2.0 мм, 5 мкм)	0.1% FA в ACN	96.4–100.4 1.5	[105]
4-(Карбазол-9-ил)бензилхлороформиат	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Хлеб, свинина, креветки, курица	1% НСl, УЗП, 20 мин, дериватизация 5 мин, 25°C.	ВЭЖХ–ФЛ λex= 375 нм, λem=410 нм	Eclipse XDB-C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм)	A: 0.1% FA: ACN (95:5; v/v) B: 0.1% FA в ACN	92.5–98 0.20–0.30	[106]
7-(Диэтиламино)-2-оксохромен-3-карбальдегид	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Морепродкты	0.2 М НСl, МВП 3 ч; 50°C, дериватизация, 20 мин,	ВЭЖХ–ФЛ λex= 450 нм, λem=510 нм	Eclipse XDB-C18 (н. у.)	A: 0.1% FA в ACN B: ACN	91.4–104.9 0.22–0.29	[107]
4-(Акридон-10-ил)бензальдегид	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Креветки	0.3 М НСl, УЗП, 40 мин, дериватизация 7.2 мин, 75 °С, микроволна	ВЭЖХ–ФЛ λex= 300 нм, λem=425 нм	Eclipse XDB-C18 (н. у.)	A: 0.1% FA: ACN (95:5; v/v) B: ACN	90.5–103.6 0.40–0.56	[108]

1	2	3	4	5	6	7	8	9
2- Формилфенилбороно- вая кислота	СЕМ	Хлеб, креветки	0.2 М HCl, УЗП, 30 мин, дериватизация 7 мин; 25°C	ВЭЖХ–ФЛ $\lambda_{ex}$ = 265 нм, $\lambda_{em}$ =320 нм	Eclipse XDB- C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм)	A: 0.1% FA:ACN (95:5; v/v) B: ACN .	86.7–96.4 0.36 мкг/л	[109]
4-(N,N Дифенил - амино)бензальдегид	АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Рыба, креветки, кураца	0.2 М HCl, УЗП, 20 мин, 40 °С, дериватизация: 20 мин, 50°C	УВЭЖХ– ФЛ $\lambda_{ex}$ = 260 нм $\lambda_{em}$ = 500 нм	Synchronis C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм)	A: ACN:H <sub>2</sub> O : HAc (95:5:0.5, v/v/v) B: H <sub>2</sub> O	91.6–104.0 0.21–0.28	[110]

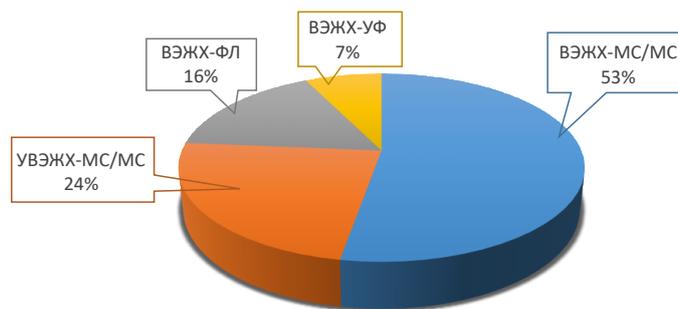
Сокращения: МВП: микроволновая пробоподготовка; УЗП: ультразвуковая пробоподготовка; FA: муравьиная кислота; HAc: уксусная кислота; MeOH: метанол; ACN: ацетонитрил; н. у. не указано

2-хлорбензальдегид [97] и 4-нитробензоилхлорид [98] использовали в сочетании с УФ-и детектированием; 2,4-динитрофенилгидразин [99] и *n*-диметиламинобензальдегид [100] и 2-фенилбензальдегид [101] – с масс-спектрометрическим детектированием; 2-гидрокси-1-нафталальдегид [102, 103], 2-(11Н-бензо [а] карбазол-11-ил) этилхлорформиат [104], флуоренилметилоксикарбонил хлорид [105], 4-(карбазол-9-ил)бензилхлорформиат [106], 7-(диэтиламино)-2-оксохромен-3-карбальдегид [107], 4-(акридон-10-ил) бензальдегид [108], 2-формилфенилборная кислота [109] и 4-(N,N-дифениламино)бензальдегид [110], – с флуоресцентным детектированием. Чтобы сократить время анализа с этими реагентами, в ряде работ предлагается проводить гидролиз-дериватизацию при более высоких температурах [100, 104], под воздействием ультразвука (ультразвуковая пробоподготовка, УЗП) [98, 99, 102, 103, 104, 108, 110] или микроволнового излучения (микроволновая пробоподготовка, МВП) [107, 108].

#### **1.4. Хроматографические методы определения метаболитов нитрофуранов**

Согласно базе данных Scopus в последнее десятилетие в пищевых продуктах метаболиты нитрофуранов чаще всего определяли методами ВЭЖХ-МС/МС (53 %) и УВЭЖХ-МС/МС (24%), и значительно реже хроматографическими методами в сочетании с флуоресцентным (16%) или УФ-детекторами (7%) (рис. 6). Преимущество масс-спектрометрического детектирования заключается не только в более высокой селективности и чувствительности определения, но и в возможности проводить идентификацию соединений. В большинстве случаев ВЭЖХ–МС/МС и УВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов НФ в различных пищевых продуктах проводят в виде производных с 2-нитробензальдегидом после предварительной пробоподготовки (табл. 1).

Анализ данных, приведенных в табл. 1, указывает на то, что чаще всего для разделения производных метаболитов НФ с 2-НБА применяют обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. В большинстве случаев используют различные коммерчески доступные колонки C18 со сферическими частицами диаметром 1.8–5 мкм, примеры которых приведены в табл. 1. В ряде случаев используются короткие ВЭЖХ-колонки, что значительно ускоряет анализ [67, 72, 76, 79, 81, 89].



**Рис. 6.** Перечень хроматографических методов, используемых для определения метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах с 2012 по 2022 год. Данные были получены из Scopus.

В качестве подвижных фаз для разделения используют смеси ацетонитрил:вода [64, 72, 74, 75, 77, 81, 82, 86, 92, 94] или метанол:вода [65, 67, 71, 73, 76, 78, 79, 80, 83,84, 85, 89, 95] с добавлением летучих органических модификаторов. В качестве модификаторов используют уксусную [64, 65, 71, 77, 94] или муравьиную [72, 81, 82, 92, 95] кислоты, ацетат [65, 74, 75, 76, 78, 84, 86, 89] или формиат [67, 73, 79, 80, 83, 85] аммония.

ВЭЖХ-МС/МС и УВЭЖХ-МС/МС определение производных АОЗ, АМОЗ, АГД и СЭМ с 2-НБА обычно проводят с помощью тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, работающей в режиме положительной ионизации [64, 71, 72, 74 –77, 79 – 82, 85, 89], в то время как отрицательный режим используют при определении ДНСК [67, 73, 83 85, 86]. Идентификацию метаболитов НФ проводят методом мониторинга множественных реакций (ММР) [65, 71–79, 81–86, 88, 94, 95]. Хотя тандемная масс-спектрометрия в положительном и отрицательном режиме с ионизацией электрораспылением стала основным методом масс-спектрометрического определения метаболитов НФ, в некоторых случаях применяют и другие варианты тандемной масс-спектрометрии: с изотопным разбавлением (ID-ВЭЖХ-МС/МС) [64, 73], с химической ионизацией при атмосферном давлении (APCI) [76] и ионизацией электрораспылением с подогревом (H-ESI- ВЭЖХ-МС/МС) [65].

Помимо 2-нитробензальдегида ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов НФ проводят, хотя и значительно реже, и с другими дериватирующими агентами.

Так, 2-фенилбензальдегид был предложен для определения АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ в желатине [101], а 2,4-динитрофенилгидразин – для определения СЕМ в морских продуктах [99, 100] (табл. 2).

Несмотря на неоспоримые преимущества метода ВЭЖХ-МС/МС, он имеет определенные ограничения, связанные с высокой стоимостью приборов и сложностью выполняемых операций, для осуществления которых требуется высококвалифицированный персонал. Этим недостатком лишен метод ВЭЖХ с чувствительным флуоресцентным детектированием (ВЭЖХ-ФЛ).

Поскольку метаболиты НФ не имеют флуорофорных групп их определение методом ВЭЖХ-ФЛ проводят после перевода в флуоресцентные производные. За последнее десятилетие для этой цели был предложен ряд новых дериватизирующих агентов (табл. 2). ВЭЖХ-ФЛ определения метаболитов АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ в свинине [102], креветках [103], курином мясе, свинине, креветках и других продуктах [106], морепродуктах [107], креветках [108], рыбе, креветках и курином мясе [110] были предложены специально синтезированные дериватизирующие агенты: 2-гидрокси-1-нафталальдегид, [102, 103], 2-(11Н-бензо [а] карбазол-11-ил) этилхлорформиат [104], 4- (карбазол-9-ил)бензилхлорформиат [106], 7-(диэтиламино) -2-оксохромен-3-карбальдегид [107], 4-(акридон-10-ил)бензальдегид [108] и 4-(N,N-дифениламино)бензальдегид [110]. ВЭЖХ-ФЛ определение метаболита СЕМ в хлебе и креветках [109] проводили после перевода в флуоресцирующее производное с 2-формилфенилборной кислотой [109]. Несмотря на то, что метрологические характеристики ВЭЖХ-ФЛ определения метаболитов НФ в пищевых продуктах (табл. 2) сопоставимы с характеристиками ВЭЖХ-МС/МС определения (табл. 1) этот метод также не лишен недостатков. Прежде всего метод ВЭЖХ-ФЛ не является подтверждающим методом, позволяющим наряду с количественным определением судить о структуре определяемых аналитов. Кроме того, все предложенные дериватизирующие агенты были синтезированы авторами, то есть они не являются коммерчески доступными.

Как уже упоминалось выше, вследствие низкой чувствительности, классический вариант ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДАД) крайне редко используют для определения метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах. В работе 2009 г. 2-нафталальдегид

использовали для определения АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ в креветках [96] методом ВЭЖХ-ДАД. Еще несколько работ посвящено определению семикарбазида в рыбе [97] и мучных изделиях [98] с дериватизирующими агентами 2-хлорбензальдегидом [97] и 4-нитробензоилхлоридом [98] соответственно (табл. 2). Метод ВЭЖХ-ДАД использовали для определения АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ в свинине после дериватизации метаболитов с 2-нитробензальдегидом [111].

### **1.5. Многокомпонентные методы определения метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами**

В последнее время наметившейся тенденцией в анализе пищевых продуктов на предмет определения в них различных ветеринарных лекарств являются многокомпонентные методы анализа (*Multiresidue methods*) [112]. Перечень лекарственных веществ, которые необходимо контролировать в продуктах животного происхождения, включает сульфаниламиды, тетрациклины, фторхинолоны, амфениколы,  $\beta$ -лактамы, аминогликозиды, макролиды и некоторые другие антибиотики [113, 114]. Анализ литературы указывает на то, что многокомпонентное определение чаще всего проводят методами ВЭЖХ в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ–МС/МС) [115, 116, 117]. Несмотря на высокую селективность масс-спектрометрического детектирования, в большинстве случаев такое определение проводят после сложной пробоподготовки, направленной на выделение целевых аналитов из пищевых продуктов с использованием различных растворителей, с последующим разбавлением или очисткой полученных экстрактов для минимизации матричных эффектов [118 – 123]. В процессе проведения многокомпонентной пробоподготовки пищевых продуктов решается задача одновременного выделения, очистки и концентрирования ветеринарных препаратов, принадлежащих к разным классам и обладающих совершенно разными физико-химическими свойствами. Разработаны методики многокомпонентного ВЭЖХ-МС/МС определения остатков ветеринарных лекарств разных классов в молоке [124 – 133], яйцах [128 – 132, 134 – 137], мясе [130, 131, 138– 141, 16, 20], рыбе [132, 133, 140], меде [137]. В нескольких работах [142, 143] приведены примеры многокомпонентного определения нитрофуранов совместно с другими ветеринарными препаратами. Метод QuEChERS использовали на стадии

пробоподготовки образцов молока [142] и маточного молочка [143] при определении в этих образцах 90 ветеринарных препаратов, включая нитрофураны, линкомицины, макролиды, сульфаниламиды, хинолоны, тетрациклины,  $\beta$ -агонисты,  $\beta$ -лактамы, седативные средства, антагонисты  $\beta$ -рецепторов, половые гормоны, глюкокортикоиды, нитроимидазолы, бензимидазолы, и некоторые другие.

Многокомпонентное определение метаболитов нитрофуранов совместно с исходными нитрофуранами и другими запрещенными ветеринарными препаратами отличается особой сложностью, в связи с необходимостью проведения операций гидролиза-derivатизации. Работ в этом направлении выполнено немного, они систематизированы в табл. 3.

В работах [69, 144] приведены примеры одновременного определения метаболитов нитрофуранов совместно с исходными нитрофуранами. Метод УВЭЖХ-МС/МС был разработан для количественного определения шести метаболитов нитрофуранов (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК и ГБГ) и двух нитрофуранов (НПИР и НСТЛ) в моллюсках [69]. Авторы показали, что не только первые четыре метаболита, но и метаболиты нифурсола (ДНСК) и нифуроксазида (ГБГ) реагируют с 2-НБА, в отличие от нифурпиринола (НПИР) и нифурстирената натрия (НСТЛ). В работе [144] разработали быстрый и простой метод ВЭЖХ-МС/МС для обнаружения пяти нитрофуранов (НФЗ, НФТ, ФЗД, ФТД, НВ) и четырех метаболитов (АОЗ, АМОЗ, СЕМ, АГД) в образцах рыб и креветок.

В нескольких работах [145 – 151] приведены примеры одновременного определения метаболитов нитрофуранов совместно с запрещенными лекарственными веществами хлорамфениколом (ХАФ) и флорфениколом (ФФ). А. Kaufmann и др. разработали метод УВЭЖХ-МС/МС для одновременного определения семи метаболитов (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК, ГБГ, АГН), нифурпиринола (НПИР) и ХАФ [145]. После гидролиза-derivатизации экстракты последовательно очищали ЖЖЭ с гексаном и этилацетатом, а затем ТФЭ с анионообменным картриджом МАХ. Установлено, что хлорамфеникол устойчив на стадии derivатизации метаболитов НФ; кроме того, наблюдается его количественная сорбция и десорбция в процессе дальнейшей очистки образцов методом ТФЭ. Метод прошел валидацию при

**Таблица 3.** Примеры многокомпонентного ВЭЖХ–МС/МС и УВЭЖХ-МС/МС определения метаболитов нитрофуранов совместно с другими запрещенными ветеринарными лекарствами в различных пищевых продуктах

Аналиты	Объект анализа	Пробоподготовка (гидролиз, дериватизация; очистка)	Метод, МС/МС режим	Хроматографическая колонка	Подвижная фаза	Степень выделения, % <i>C</i> <sub>min</sub> , мкг/кг	Литература
1	2	3	4	5	6	7	8
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК, ГБГ, НПИР, НСТЛ	Рыба	0.2 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом и гексаном	УВЭЖХ-МС/МС ESI(+)-МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Atlantis® dC18 (150×2.1 мм, 5 мкм) при 35 °С	А: NH <sub>4</sub> Ac (10 ммол·L <sup>-1</sup> ): ACN (80:20, v/v) В: ACN	91.6–107.3 0.01–0.2	[69]
АОЗ, АМОЗ, СЕМ, АГД, НФЗ, НФТ, ФЗД, ФТД, НВ	Рыба, креветки	0.125 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом и гексаном	ВЭЖХ-МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	Aegispak C18-L (100 × 2.0 мм, 5 мкм) при 30 °С	А: 10 мМ NH <sub>4</sub> Ac и 0.1% FA в смеси с ACN/MeOH (1:1 v/v) В: 10 мМ NH <sub>4</sub> Ac and 0.1% FA in ACN/MeOH (1:1 v/v)	70–97 0.04–0.09	[144]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК, ГБГ, АГН, НПИР, ХАФ	Мясо, печень, почки, рыба, мед, яйца и молоко	0.1 М HCl, 2-НБА, 14 ч, 37°C; ЖЖЭ с этилацетатом и гексаном ТФЭ с анионообменным картриджем МАХ	УВЭЖХ-МС/МС ESI(+)-МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Acquity UHPLC VEN C18 (50×2.1мм, 1.7 мкм) при 25 °С	А: 10 мМ NH <sub>4</sub> Ac и 0.1% FA в MeOH (80:20, v/v) В: MeOH	н. у. 0.05–1.00	[145]

1	2	3	4	5	6	7	8
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ	Креветки	0.125 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; Высаливание с экстракцией в ацетонитрил	ВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Inertsil ODS-3 (50 × 2 мм, 5 мкм) при 30 °С	А: 10 мМ NH <sub>4</sub> Ac : MeOH (70:30, v/v) В: MeOH : H <sub>2</sub> O (95:5)	98.6– 109.2 н. у.	[146]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ	Креветки	0.125 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ с гексаном, ТФЭ Oasis HLB картридж	ВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Inertsil ODS-3 (150 × 2 мм, 5 мкм)	А: 4 мМ NH <sub>4</sub> FA и 0.05% FA в H <sub>2</sub> O В: 4 мМ NH <sub>4</sub> FA и 0.05% FA в MeOH	93–120; 0.016– 0.069	[147]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ	Креветки, рыба, раки	0.125 М HCl, 2-НБА, МВП 6 мин, 95°C; ТФЭ Oasis HLB картридж	ВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС ESI(-)- МС/МС ММР режим	XDB-C18 RP (50 × 4.6 мм, 1.8 мкм)	А: 8.5 мМ NH <sub>4</sub> Ac и 0.1% FA в MeOH (80:20, v/v) В: MeOH	95.1–106; 0.009– 0.067	[148]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ	Рыба, креветки	0.125 М HCl, 2-НБА, МВП 6 мин, 95°C; ТФЭ Oasis HLB картридж	ВЭЖХ– МС/МС ESI(+)-МС/МС and ESI(-)-МС/МС ММР режим	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 × 4.6 мм, 1.8 мкм)	А: 8.5 мМ NH <sub>4</sub> Ac и 0.1% FA в MeOH (80:20, v/v) В: MeOH	>90%, н. у.	[149]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ, ФФ	Мед	0.125 М HCl; 2-НБА, 16 ч; 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ– МС/МС APCI (+)- МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Eclipse XDB-C18 (50 × 4.6 мм, 1.8 мкм)	А: 8.5 мМ NH <sub>4</sub> Ac и 0.1% FA в MeOH (80:20, v/v) В: MeOH	92 – 105. 0.059– 0.739	[150]

1	2	3	4	5	6	7	8
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ, ФФ	Морепродукты	0.125 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	УВЭЖХ-МС/МС ESI(+)-МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Acquity C18 (150 × 2.1 мм, 1.7 мкм)	А: 0.1% FA в H <sub>2</sub> O (80:20, v/v) В: 0.1% FA в ACN	85–110. 0.1–1.0	[151]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ и 4 нитроимидазола	Курица, яйца	0.125 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; d-ТФЭ C18	УВЭЖХ-МС/МС ESI(+)-МС/МС and ESI(-)-МС/МС ММР режим	Acquity BEH C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм)	А: 0.1% FA в H <sub>2</sub> O (80:20, v/v) В: 0.1% FA в ACN	86.4– 116.7 0.05–0.2	[152]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, и 2 нитроимидазола	Мед	0.125 М HCl, 2-НБА, 4 ч, 55°C; QuEChERS	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ММР режим	ZORBAX Eclipse XDB C-18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм) at 40 °C	А: 5 мМ аммонийно-форматный буфер в MeOH/H <sub>2</sub> O (1:9 v/v) В: MeOH	90.96- 104.8 0.12–0.74	[153]
14 веществ: АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, 3 амфениколов, 5 хинолонов и 2 красителя	Креветки	0.125 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС (н. у.)	Chromolith Performance RP-18, (100 × 3 мм, 1.8 мкм)	А: 5 мМ NH <sub>4</sub> Ac в 0.1% FA В: 5 мМ NH <sub>4</sub> Ac in MeOH	н. у.	[154]
21 вещество: АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК, ГБГ, АГН, НПИР, ХАФ, 7 нитроимидазолов и 5 красителей	Морепродукты	0.1 М HCl, 2-НБА, 2 ч, 60°C; QuEChERS	ВЭЖХ–МС/МС ESI(+)-МС/МС ESI(-)-МС/МС ММР режим	Symmetry C18 (100 × 2.1 мм, 5 мкм)	А: 20 мМ NH <sub>4</sub> FA в 0.02% FA В: MeOH	77.2- 107.6. 0.12–0.74	[155]

МВП: микроволновая пробоподготовка; УЗП: ультразвуковая пробоподготовка;

определении перечисленных выше аналитов в различных пищевых продуктах: мясе, печени, почках, рыбе, меде, яйцах и молоке. Определение АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ и ХАФ в образцах креветок [146, 147], креветок, сомов и раков [148], кобии, горбыля и креветок [149], АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ХАФ и ФФ в меде [150] и морепродуктах [151] проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. Основное различие этих работ заключается в различной пробоподготовке, предшествующей ВЭЖХ-МС/МС определению. Так, например, после проведения в течение 16 часов гидролиза-derivатизации, очистка экстрактов включала высаливание и ЖЖЭ экстракцию ацетонитрилом [146], ТФЭ с помощью картриджа Oasis HLB [147] или ЖЖЭ с этилацетатом [150, 151]. Напротив, в работах [148, 149] гидролиз-derivатизацию образцов проводили в микроволновой печи в течение 6 мин, после чего экстракты очищали методом ТФЭ на картридже Oasis HLB. После очистки экстракты анализировали с применением источника высокотемпературной электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных (метаболиты НФ) или отрицательных (ХАФ, ФФ) ионов.

Определению метаболитов нитрофуранов совместно с хлорамфеноколом и препаратами из класса нитроимидазолов посвящены работы [152, 153]. На примере одновременного определения четырех метаболитов нитрофуранов (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ), хлорамфеникола и четырех нитроимидазолов (метронидазол, ронидазол, диметридазол, ипронидазол) в образцах яиц и курином мясе методом УВЭЖХ-МС/МС авторы работы [152] подтвердили, что хлорамфеникол и перечисленные выше нитроимидазолы устойчивы на этапе проведения гидролиза-derivатизации. В этой работе очистку экстрактов проводили методом дисперсионной твердофазной экстракции с использованием сорбента С18 и диатомита. Напротив, в работе [153] при ВЭЖХ-МС/МС определении четырех метаболитов нитрофуранов (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ) и двух нитроимидазолов (ронидазол, диметридазол) в образцах меда пробоподготовку проводили методом QuEChERS без дополнительной очистки образцов.

В работе [154] разработана методика одновременного ВЭЖХ-МС/МС определения 14 ветеринарных препаратов, включая четыре метаболита нитрофурана (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ), три амфеникола (хлорамфеникол, флорфеникол и тиамфеникол), пять хинолонов (данофлоксацин, дифлоксацин,

энрофлоксацин, флумехин и сарафлоксацин), малахитовый зеленый и лейкомалахитовый зеленый в 52 образцах креветок, собранных в районах аквакультуры на Тайване.

Для повышения экспрессности анализа при одновременном ВЭЖХ-МС/МС определении в образцах рыб и креветках 21 запрещенного вещества, включая 7 метаболитов нитрофуранов (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДНСК, ГБГ, АГН), нифурпиринол, 7 нитроимидазолов (диметридазол, метронидазол, ронидазол, ипронидазол, гидроксиметронидазол, 2-гидроксиметил-1-метил-5-нитроимидазол, гидрокси-ипронидазол), 5 красителей (малахитовый зеленый, лейкомалахитовый зеленый, лейкокристаллический фиолетовый, бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый) и хлорамфеникол авторы работы [155] предложили проводить кислотный гидролиз-дериватизацию при 60°C в течение двух часов, а затем очищать полученные экстракты методом QuEChERS. Установлено, что этого времени достаточно для количественной дериватизации метаболитов НФ 2-НФД, тогда как при увеличении времени до 4 часов наблюдается частичное разрушение красителей.

Таким образом, анализ литературных данных указывает на перспективность применения ВЭЖХ-МС/МС и УВЭЖХ-МС/МС методов для одновременного определения метаболитов нитрофуранов совместно с другими запрещенными ветеринарными препаратами в пищевых продуктах.

### **1.6. Формулирование задач исследования**

Анализ литературных данных, приведенных в обзоре литературы и систематизированных в табл. 1 – 3, указывает на то, что задача определения метаболитов нитрофуранов в продуктах питания по-прежнему остается актуальной. Анализ публикаций указывает на то, что основным хроматографическим методом для определения остатков метаболитов НФ в пищевых продуктах животного происхождения является ВЭЖХ-МС/МС. Прослеживается четкая тенденция – значительно возросло число публикаций по УВЭЖХ-МС/МС, начали появляться работы по одновременному определению метаболитов НФ совместно с другими антибиотиками и ветеринарными лекарственными веществами.

Несмотря на значительное число существующих подходов и методик к определению метаболитов нитрофуранов в продуктах питания, разработанных за

последние десять лет, задачу все еще нельзя считать решенной. Из-за высокой полярности, низкой молекулярной массы и отсутствия хромофоров определение метаболитов НФ в пищевых продуктах сопровождается рядом проблем как на этапах пробоподготовки, так и на этапах определения. В большинстве опубликованных работ определение проводят после длительной пробоподготовки (16 часов при 37–40°C), включающей кислотный гидролиз-derivатизацию, чаще всего 2-нитробензальдегидом. Можно прогнозировать, что в будущем усилия химиков-аналитиков, работающих в этой области, будут направлены как на поиск новых derivатизирующих агентов, так и на повышение эффективности и сокращения времени проведения кислотного гидролиза за счет повышения температуры и применения ультразвуковой или микроволновой пробоподготовки. Что касается очистки полученных гидролизатов, направленной на снижение матричных эффектов, которая в большинстве описанных работ проводилась методом ЖЖЭ, то можно предположить, что количество работ, использующих экономичные, малотоннажные и экологически безопасные альтернативные методы, такие как QuEChERS [156, 157], твердофазная микроэкстракция [158], ТФЭ или МТФЭ с использованием новых сорбентов [159, 160] в ближайшем будущем должно увеличиться.

В настоящей работе для derivатизации метаболитов нитрофуранов мы предлагаем использовать новый derivатизирующий агент 5-нитро-2-фуральдегид (**5-НФА**). Мы предположили и доказали, что метаболиты нитрофуранов взаимодействуют с 5-НФА с образованием соответствующих нитрофуранов. Таким образом при использовании этого derivатизирующего агента становится возможным заранее выбрать условия пробоподготовки и определения с помощью нитрофуранов, а не более дорогостоящих нитропроизводных метаболитов с 2-нитробензальдегидом. Очистку гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки реальных пищевых продуктов, мы предлагаем проводить с помощью сверхшитога (ССПС) и магнитного сверхшитога полистиролов (ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), которые ранее для этих целей не применяли. Ранее в нашей научной группе было показано, что эти сорбенты эффективно сорбируют такие полярные органические соединения как метилксантины, сульфаниламиды, тетрациклины и катехоламины [161 – 163].

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили нитрофураны: фуразолидон (98%, «Alfa Aesar»), нитрофуразон (97%, «abcГ GmbH»), нитрофурантоин (98%, «Acros Organics»), фуралтодон (98%, «Sigma-Aldrich»); и метаболиты нитрофуранов: 3-амино-2-оксазолидинон (98%, «Sigma-Aldrich»), 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (98%, «Sigma-Aldrich»), 1-амино-гидантоин гидрохлорид (98%, «Acros Organics») и семикарбазид гидрохлорид (99+%, «Witega»). Названия, структурные формулы и некоторые справочные сведения об исследованных в работе соединениях приведены в табл. 4.

В качестве внутренних стандартов метаболитов нитрофуранов использовали  $D_5$ -3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (АМОЗ- $D_5$ ) (99+%, «Witega»),  $^{13}C_3$ -аминогидантоин (АГД- $^{13}C_3$ ) (99+%, «Witega»),  $D_4$ -3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ- $D_4$ ) (99+%, «Witega»),  $^{15}N_2, ^{13}C$ -семикарбазид (СЕМ- $^{15}N_2, ^{13}C$ ) (99+%, «Witega»).

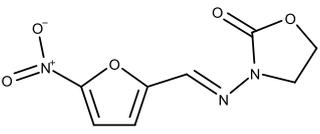
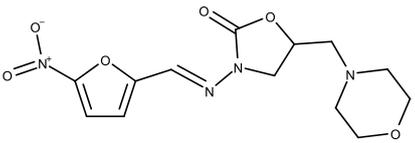
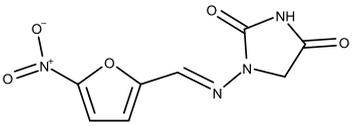
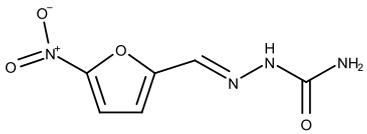
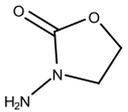
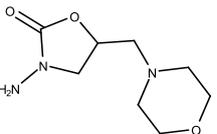
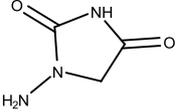
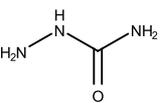
Исходные растворы нитрофуранов и их метаболитов с концентрацией 200 мкг/мл готовили растворением соответствующей навески в метаноле. Растворы хранили при  $-20^{\circ}C$  не более шести месяцев. Растворы смеси нитрофуранов и метаболитов нитрофуранов с концентрацией 1000 нг/мл готовили путем разбавления исходных в метаноле. Аналогичным образом готовили раствор смеси внутренних стандартов с концентрацией 1000 нг/мл. Срок хранения смесей составлял 1 месяц. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных метанолом в день использования.

Использовали стандартные образцы следующих лекарственных веществ: сульфатуанидин, сульфаниламид, сульфадиазин, сульфатиазол, сульфапиридин, сульфамеразин, сульфамоксол, сульфаметазин, сульфаметоксипиридазин, сульфаклорпиридазин, сульфаметоксазол, сульфоксиэтоксипиридазин, сульфадиметоксин, сульфахиноксалин, триметоприм, окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин, флорфеникол амин, тиамфеникол, флорфеникол, хлорамфеникол, гидроксиметронидазол, метронидазол, гидроксиметилметронидазол, диметридазол, тернидазол, ронидазол, тинидазол, гидроксипронидазол, ипронидазол, амоксициллин, ампициллин,

бензилпенициллин, феноксиметилпенициллин, оксациллин, клоксацеллин, нафциллин, диклоксацеллин, марбофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, данофлоксацин, дифлоксацин, цiproфлоксацин, ломефлоксацин, энрофлоксацин, сарафлоксацин, пипемидовая кислота, оксолиновая кислота, налидиксовая кислота, флюмеквин, спирамицин, тилмикозин, эритромицин, тилозин, кларитромицин, тилвалозин, тиамулин, валнемулин, линкомицин, пирлимицин, цефалониум, цефоперазон, цефапирин, цефотаксим, цефподоксим, цефахлор, цефетамет, цефтиофур, пefлоксацин, азитромицин, орнидазол, эмамектин, моксидектин, эприномектин, ивермектин, хиноксалин-2-карбоновая кислота, 1,4-бисдезоксикарбадокс, 3-метилхиноксалин-2-карбоновая кислота, альбендазола аминосульфид, гидрокситиабендазол, тиабендазол, аминомебендазол, оксбендазол-amine, гидроксимебендазол, аминифлюбендазол, альбендазола сульфид, камбендазол, оксбендазол, альбендазол сульфид, оксбендазол, оксбендазола сульфид, парбендазол, альбендазол, мебендазол, флюбендазол, фенбендазол, аминотриклабендазол, триклабендазол, триклабендазола сульфид, оксиклозанид, никлозамид, рафоксанид, клозантел, нетомибин, клорсулон, нитроксирил, празиквантел, морантел, левамизол, пирантел, фебантел, ампролиум, клопидол, этопабат, галофугинон, робенидин, декоквинат, монезин, салиномицин, наразин, арпиноцид, динитрокарбанилид, диклазурил, триметоприм, бацитрацин А, виржинамицин М1, виржинамицин S1, новобиоцин.

В качестве внутренних стандартов использовали: сульфадиазин-D<sub>4</sub>, сульфатиазол-D<sub>4</sub>, сульфаметазин-D<sub>4</sub>, сульфаметоксазол-D<sub>4</sub>, триметоприм-D<sub>9</sub>, диметридазол-D<sub>3</sub>, ронидазол-D<sub>3</sub>, ипронидазол-D<sub>3</sub>, гидроксиметронидазол-D<sub>2</sub>, гидроксиметилметронидазол-D<sub>3</sub>, гидроксипронидазол-D<sub>3</sub>, бензилпенициллин-D<sub>7</sub>, хлорамфеникол-D<sub>5</sub>, дифлоксацин-D<sub>3</sub>, налидиксовая кислота-D<sub>5</sub>, норфлоксацин-D<sub>5</sub>, оксолиновая кислота-D<sub>5</sub>, сарафлоксацин-D<sub>8</sub>, цiproфлоксацин-D<sub>8</sub>, рокситромицин-D<sub>7</sub>, азитромицин-D<sub>3</sub>, клиндамицин-D<sub>3</sub>, валнемулин-D<sub>6</sub>, энрофлоксацин-D<sub>5</sub>, демеклоциклин, цефетамет-D<sub>3</sub>, иономицин, тетраимизол-D<sub>3</sub>, тиабендазол-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, гидроксимебендазол-D<sub>3</sub>, оксбендазола амин-D<sub>7</sub>, флюбендазол-D<sub>3</sub>, альбендазола сульфид-D<sub>3</sub>, камбендазол-D<sub>7</sub>, оксбендазол-D<sub>7</sub>, альбендазола сульфид-D<sub>3</sub>, фенбендазол-D<sub>3</sub>, фенбендазол сульфид-D<sub>3</sub>, альбендазол-D<sub>3</sub>, фебантел-D<sub>6</sub>,

**Таблица 4.** Изученные в работе нитрофураны и их метаболиты

Вещество	Формула	$M_r$	lgP*
Фуразолидон (ФЗД)		225.16	0.87
Фуралтадон (ФТД)		324.29	0.73
Нитрофурантоин (НФТ)		238.16	-0.22
Нитрофуразон (НФЗ)		198.14	-0.14
3-Амино-2-оксазолидинон (АОЗ)		102.09	-0.66
3-Амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (АМОЗ)		201.22	-0.80
1-Амино-гидантоин гидрохлорид (АГД)		115.09	-1.75
Семикарбазид (СЕМ)		75.07	-1.66

\*Значения lgP взяты с базы данных MarvinSketch

фуразолидон-D<sub>4</sub>, актиномицин D, хиноксалин-2-карбоновая кислота-D<sub>4</sub>, 1,4-бисдезоксикарбадокс-D<sub>3</sub>, динитрокарбанилид-D<sub>8</sub>, клорсулон-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, нитроксинил-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, триклабендазол-D<sub>3</sub>, оксиклозанид-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, никлозамид-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, рафоксанид-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, нитрофурантион-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, нитрофуразон-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>, клозантел-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>. Все стандартные образцы с высокой степенью чистоты ( $\geq 95,0\%$ ) были получены от Sigma-Aldrich (США), Ehrenstorfer GmbH (Германия), European Pharmacopoeia (Франция), Toronto Research Chemicals (Канада) и Witega (Германия).

Исходные растворы лекарственных веществ с концентрацией 200 мкг/мл готовили растворением соответствующей навески в метаноле, смеси ацетонитрил:вода (1:1) ( $\beta$ -лактамы), смеси метанол:уксусная кислота (9:1) (данофлоксацин, энрофлоксацин, марбофлоксацин, ломефлоксацин, сарафлоксацин, дифлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин) смеси метанол:раствор аммиака (9:1) (налидиксовая кислота, оксолиновая кислота, пипемидовая кислота) раствор метанол:ДМСО (1:1) (динитрокарбанилид, наразин, альбендазола сульфен, мебендазол, оксibenдазол, оксфендазол, флюбендазол, клозантел, никлозамид, триклабендазола сульфен, триклабендазола сульфоксид, триклабендазол, оксиклозанид, рафоксанид, кетотриклабендазоол, фенбендазол, клорсулон, нитроксинил). Растворы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более шести месяцев. Рабочий раствор смеси лекарственных веществ с концентрацией 1000 нг/мл готовили путем разбавления исходных в метаноле. Аналогичным образом готовили раствор смеси внутренних стандартов с концентрацией 1000 нг/мл. Срок хранения смесей составлял 1 месяц. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных метанолом в день использования.

## 2.2. Реагенты

Использовали метанол для ВЭЖХ, ацетонитрил для ВЭЖХ, муравьиную кислоту, *n*-гексан (Fisher Scientific Inc., США), моногидрат лимонной кислоты (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>•H<sub>2</sub>O), гидрофосфат натрия (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O), ЭДТА (этилендиаминтетраацетат натрия, Na<sub>2</sub>EDTA) (Across organic, Бельгия). Коммерчески доступный сверхсшитый полистирол (Диапак П-3, Био-ХимМак, Россия). ССПС перед использованием активировали ацетонитрилом. Кроме того,

использовали соляную кислоту, дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия, гидроксид натрия (Sigma-Aldrich, США).

Буферный раствор Макилвейна получали растворением 12.9 г  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , 10.9 г  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  и 37.2 г  $Na_2EDTA$  в мерной колбе емк. 1000 мл примерно в 800 мл воды, далее добавляли 1 М NaOH до pH ~ 5.0 и доводили до метки водой.

Дериватизацию метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом проводили в кислой среде. Для этого к раствору метаболитов НФ добавляли 5 мл 0.1М HCl, 75 мкл 0.1М 5-нитро-2-фуральдегида, полученную смесь тщательно перемешивали в течение 30 мин.

### **2.3. Анализируемые образцы**

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  $-20^{\circ}C$  в холодильнике. Перед анализом замороженные продукты гомогенизировали с использованием бытового миксера.

### **2.4. Аппаратура**

Использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф ExionLC (Shimadzu, Япония) в сочетании с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором SCIEX Triple Quad™ 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.

Применяли аналитические весы Sartorius AC 121S (Sartorius, Германия), систему подготовки деионизированной воды Milli-Q Synthesis (Millipore, США), центрифугу лабораторную Thermo Scientific SL40R (Thermo Scientific, США), систему упаривания закрытого типа TurboVapII.CaliperLifeSciences (Caliper Life Sciences, США), вакуумную установку для ТФЭ М6 (Манифолд, Россия), шейкер для пробирок MultiReax (Heidolph, Германия). Спектры поглощения и оптические плотности растворов регистрировали на спектрофотометре СФ-103 («Аквилон», Россия). Значения pH растворов контролировали на pH-метре-иономере «Эксперт 001» («Эконикс-Эксперт», Россия).

## **2.5. Условия хроматографического разделения, детектирования и идентификации**

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. Температура колонки и автосемплера поддерживалась во время работы на уровне 40 и 15°C, соответственно, объем вводимой пробы 10 мкл.

Тройной квадрупольный масс-спектрометр (SCIEX 5500 Triple Quad™ 5500) был настроен на сбор данных в режиме мониторинга множественных реакций. Установлены следующие оптимальные значения параметров: напряжение на распыляющем капилляре – 4500 В; температура испарителя – 550°C; в качестве газа завесы и газа в ячейке использовали азот; давление газа соударений 10 фунтов на квадратный дюйм; давление газа завесы – 35 фунтов на квадратный дюйм; давление осушающего газа и давление распыляющего газа – 50 фунтов на квадратный дюйм; входной потенциал – 10 В.

Продукты дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-НФА идентифицировали по полученным хроматограммам с использованием программного продукта Analyst 1.6.3. (AB Sciex, Сингапур). Неизвестную концентрацию аналита в пробе определяли методом градуировочного графика (матричная градуировка). Аналитическим сигналом служило отношение площади пика аналита к площади пика соответствующего внутреннего стандарта.

## **2.6. Методика синтеза магнитного сверхсшитого полистирола**

Магнитный сорбент на основе ССПС был синтезирован по методике, предложенной в нашей лаборатории ранее [162, 163]. Для синтеза наночастиц магнитного сверхсшитого полистирола использовали сверхсшитый полистирол (ССПС) Диапак П-3 (БиоХимМак, Россия),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ч.д.а.), соль Мора  $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ч.д.а.) и  $\text{NH}_3$  (ос.ч.). Синтез проводили в два этапа.

На первом этапе получали наночастицы магнетита (НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) химическим соосаждением  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ . В раствор аммиака (40 мл, 0.5 М) добавляли смесь  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 мл, 1 М, в 2 М  $\text{HCl}$ ) и  $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 мл, 0.5 М, в

деионизированной воде). Смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, что приводило к образованию черного осадка НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Затем НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> собирали из 2 мл суспензии с помощью магнита Nd–Fe–В (20 мм × 20 мм × 20 мм), несколько раз промывали деионизированной водой до pH 6–7.

На втором этапе НЧ ресуспендировали в 10 мл метанола и добавляли к 100 мг ССПС, диспергированного в 1 мл метанола. После объединения двух растворов смесь встряхивали в течение 40 мин, чтобы гомогенно диспергировать ССПС и НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Во время смешивания ССПС и НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> самоорганизуются с образованием магнитного адсорбента ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Его извлекали из раствора магнитом, несколько раз промывали деионизированной водой, сушили и использовали для дальнейших исследований.

## 2.7. Методика изучения сорбции нитрофуранов

Для изучения сорбции нитрофуранов в статических условиях к навеске сорбентов (0.020 ± 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 ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и МНЧ магнитной сепарацией. Концентрацию нитрофуранов в равновесной фазе определяли методом ВЭЖХ или спектрофотометрически по собственному поглощению в случае построения изотерм сорбции. Перед проведением десорбции сорбент промывали 1 мл деионизированной воды.

Значения степеней извлечения ( $R$ , %) и коэффициентов распределения ( $D$ ) рассчитывали по следующим формулам:

$$R, \% = \frac{c_0 - c}{c_0} \cdot 100,$$

$$D = \frac{R, \%}{(100 - R, \%)} \cdot \frac{V}{m},$$

где  $c_0$  – концентрация определяемого соединения в исходном растворе до сорбции,  $c$  – концентрация в растворе после сорбции,  $V$  – объем анализируемого раствора (мл),  $m$  – масса навески сорбента (г).

Удельную адсорбцию рассчитывали по формуле:

$$a = \frac{(c_0 - c) \cdot V}{m_c},$$

где  $a$  – удельная адсорбция вещества (ммоль/г),  $c_0$  и  $c$  – соответственно исходная и равновесная концентрации исследуемого вещества в растворе (ммоль/л),  $V$  – объем анализируемого раствора (л),  $m$  – масса навески сорбента (г).

Соответствие полученных изотерм сорбции уравнению Ленгмюра

$$a = a_m \frac{Kc}{1 + Kc},$$

где  $a$  – удельная сорбция вещества, ммоль/г;  $c$  – его равновесная концентрация в растворе, ммоль/л;  $K$  – константа Ленгмюра, ммоль<sup>-1</sup>;  $a_m$  – сорбционная емкость сорбента, ммоль/г; подтверждали линейностью зависимостей, построенных в координатах  $c/a - c$  соответственно линейной форме уравнения Ленгмюра

$$\frac{c}{a} = \frac{1}{a_m K} + \frac{c}{a_m}.$$

Из уравнений линейных зависимостей рассчитывали такие физико-химические параметры, как: сорбционные емкости сорбентов по отношению к нитрофуранам  $a_m$ , их коэффициенты распределения  $D$  как котангенсы углов наклона прямых, константы сорбционного равновесия  $K$  и изменения свободной энергии Гиббса  $\Delta G_{298}$ .

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, элюировали аналиты 2 мл ацетонитрила.

## Результаты и их обсуждение

### Глава 3. Выбор условий дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом и идентификация продуктов дериватизации

#### 3.1. Выбор условий дериватизации<sup>2</sup>

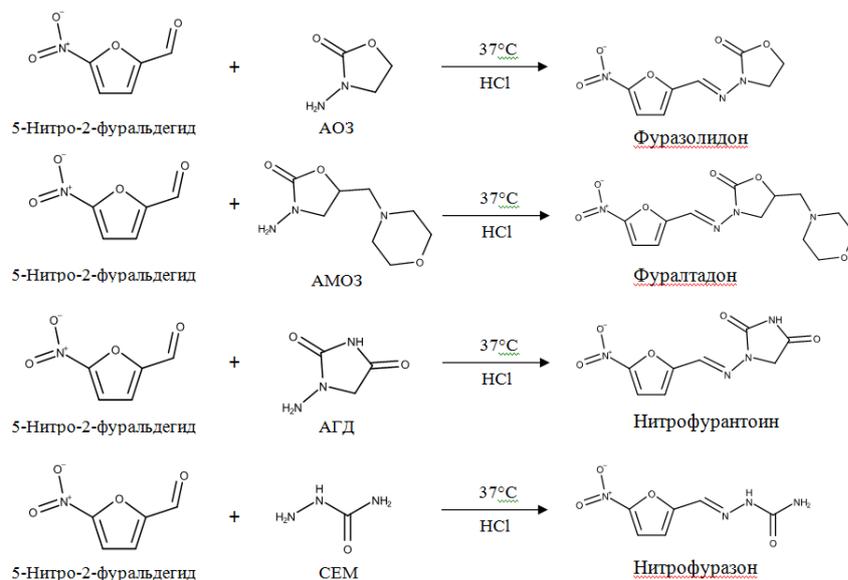
Согласно литературным данным, приведенным в обзоре литературы, основным дериватирующим агентом для перевода метаболитов нитрофуранов в более гидрофобные производные является 2-нитробензальдегид. В кислых растворах метаболиты нитрофуранов вступают в реакцию конденсации с 2-нитробензальдегидом с образованием 2-нитрофенильных производных – оснований Шиффа (рис. 1). В настоящей работе для дериватизации метаболитов нитрофуранов мы предлагаем использовать 5-нитро-2-фуральдегид, который ранее для этой цели не использовался. По аналогии с литературными данными 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. 7.

При выборе условий дериватизации варьировали время, температуру, концентрацию 5-НФА и значение pH в реакционной смеси (рис. 8). О выходе продуктов судили, сравнивая значения площадей хроматографических пиков. Как видно из данных, приведенных на рис. 8а, 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.

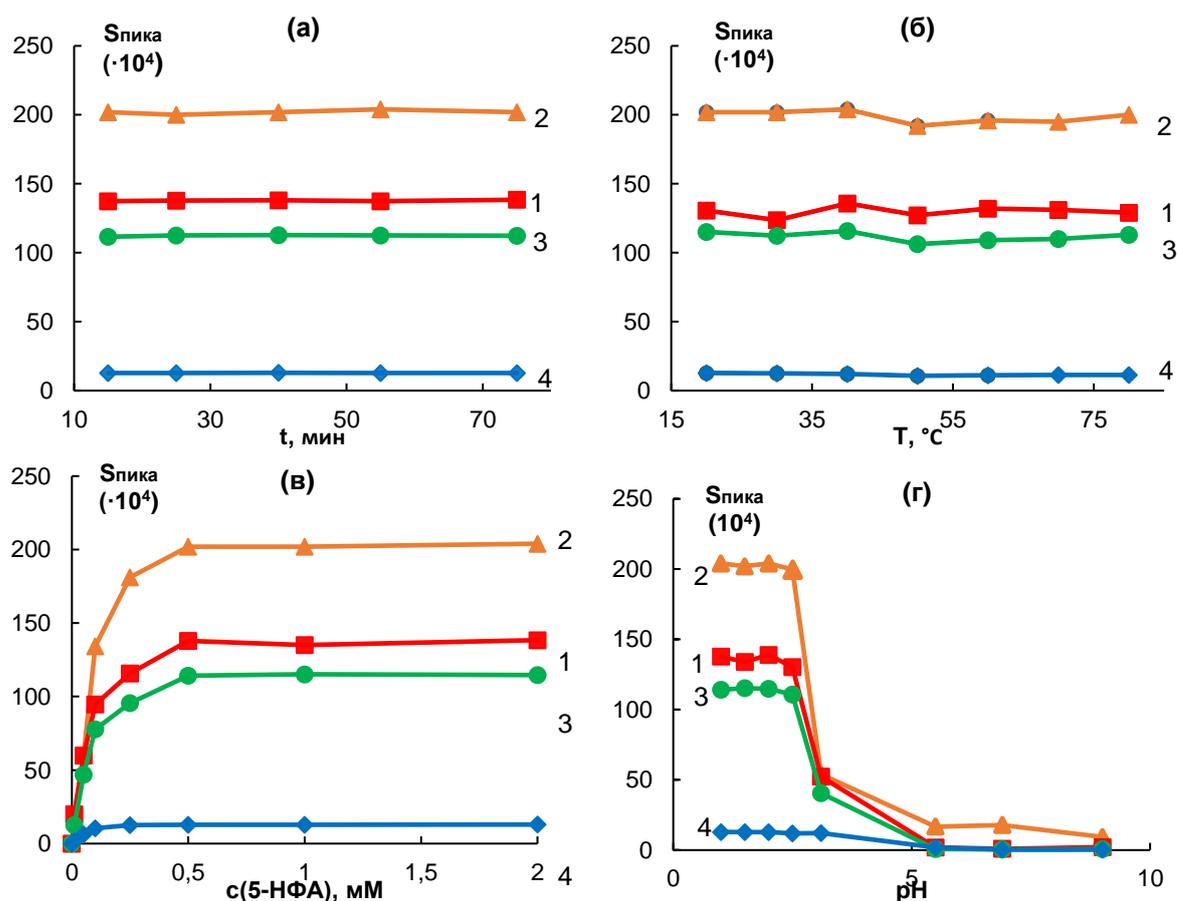
Установлено, что максимальный выход продуктов практически не зависит от температуры в диапазоне 20 – 80°C (рис. 8б). Выход продуктов увеличивается при увеличении концентрации 5-НФА в реакционной смеси от 0.1 до 1 мМ, и не изменяется при дальнейшем увеличении концентрации до 8 мМ (рис. 8в). Данные,

---

<sup>2</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: *Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Shubina E.G., Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Grudev A.I.* Determination of nitrofurans metabolites in honey using a new derivatization reagent, magnetic solid-phase extraction and LC-MS/MS // *Talanta* 2021. V. 230. Article 122310. (Импакт-фактор Web of Science – 6.556, Q1) 60%; *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–тандемной масс-спектрометрии // *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. №. 11. С. 1012-1021. (Импакт-фактор RSCI – 1.127, Q4), 70%.



**Рис. 7.** Предполагаемая схема взаимодействия 5-нитро-2-фуральдегида с метаболитами нитрофуранов.



**Рис. 8.** Влияние времени (а), температуры (б), концентрации 5-НФА (в) и pH (г) на выход продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов ( $c = 40$  нг/мл) с 5-нитро-2-фуральдегидом; 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон;  $c_{5-НФА} = 2$  мМ (а, б, г); pH  $\sim 1$  (а, б, в);  $t = 15$  мин (б, в, г);  $T = 40^{\circ}C$  (а, в, г).

приведенные на рис. 8г, 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.

### 3.2. Идентификация продуктов дериватизации

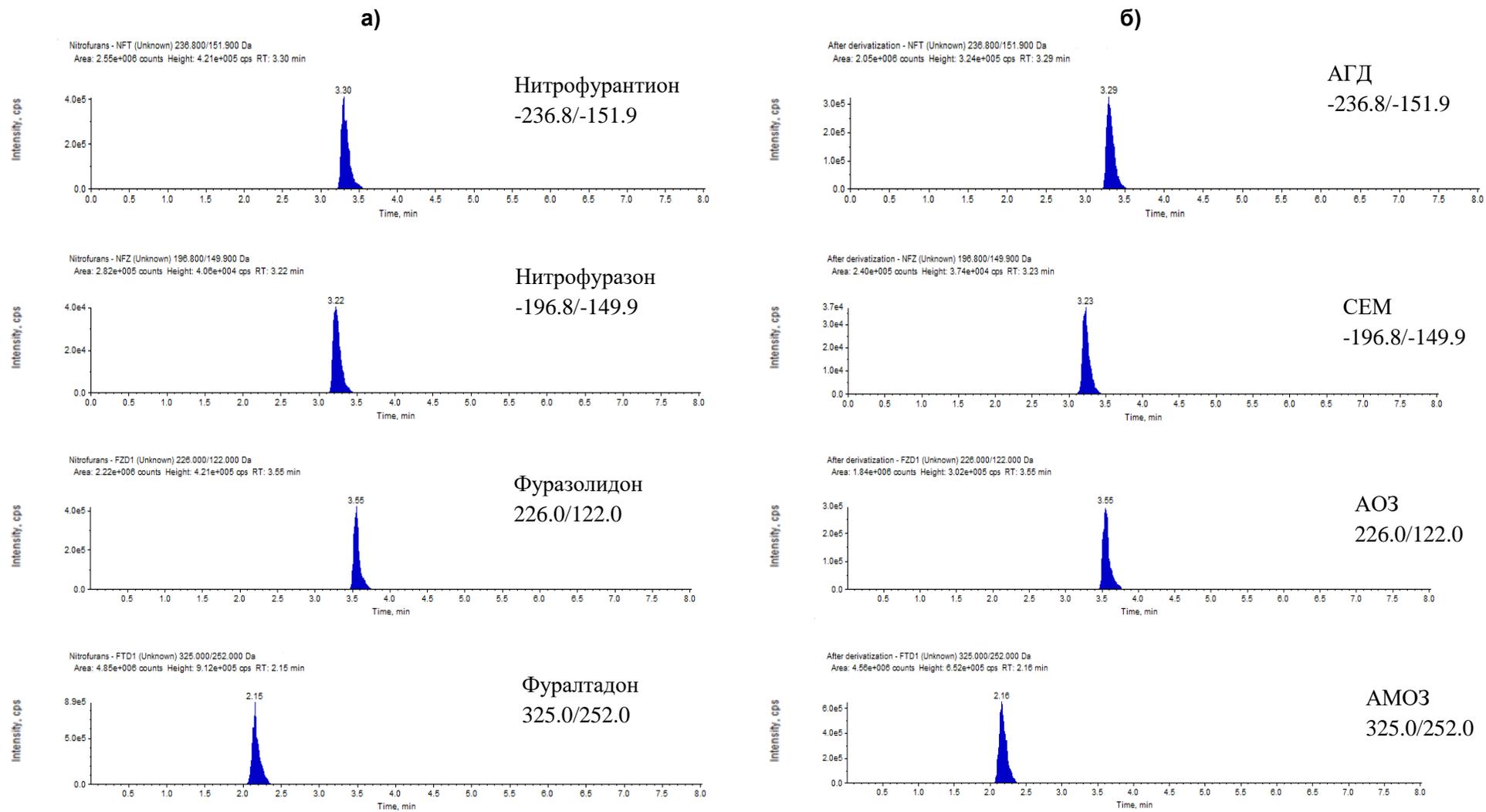
Идентификацию продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом, которыми, согласно высказанным нами предположением, могут быть исходные нитрофураны, проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС, использовали метод мониторинга множественных реакций. Стандартные растворы нитрофуранов (0.1 мкг/мл) 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  $[M - H]^-$ .

Наилучшие условия ионизации были получены при использовании муравьиной кислоты в качестве добавки. Параметры ММР для нитрофуранов и внутренних стандартов приведены в табл. 5. Продукты взаимодействия метаболитов нитрофуранов с 5-НФА идентифицировали по абсолютному времени удерживания хроматографических пиков целевых веществ, регистрируемых в режиме мониторинга множественных реакций. Полученные данные, представленные в табл. 5 и на рис. 9, подтверждают, что в результате взаимодействия метаболитов нитрофуранов с 5-НФА образуются соответствующие нитрофураны. Основные характеристики совпадают с соответствующими значениями для нитрофуранов, приведенными в работах [164, 165]. Выход продуктов реакции дериватизации составил 95 – 100%.

**Таблица 5.** 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



**Рис 9.** Хроматограммы по выделенным ионам нитрофуранов (а) и соответствующих им метаболитов после дериватизации с 5-нитро-2-фуральдегидом

### 3.3. Выбор условий ускоренного гидролиза-derivатизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом на примере образцов куриного мяса<sup>3</sup>

Самыми длительными и трудоемкими этапами в процессе пробоподготовки пищевых продуктов являются этапы гидролиза-derivатизации. В соответствии с действующим в России ГОСТ 32014-2012 [166], derivатизацию метаболитов нитрофуранов 2-нитробензальдегидом проводят одновременно с кислотным гидролизом в 0.1 М соляной кислоте при 37–40°C (инкубация в водяной бане) в течение 16 ч. Аналогичные нормативные документы, как следует из обзора литературы, приняты во всем мире. Такое длительное время необходимо для выделения метаболитов, связанных с белками.

Традиционную длительную пробоподготовку образцов пищевых продуктов при определении в них метаболитов нитрофуранов (инкубация в водяной бане 16 ч, 37°C), как показано в нескольких работах, можно сократить до 4 ч [90] и 2 ч [91, 155] за счет повышения температуры до 55 и 60°C соответственно. При этом, как отмечается в работах [91, 155], повышение температуры приводит не только к сокращению времени, но и к повышению выхода продуктов derivатизации. Еще более эффективным оказалось одновременное воздействие температуры и ультразвукового или микроволнового излучения. При проведении термостатического ультразвукового гидролиза-derivатизации это время удалось снизить с 16 ч до 2 ч (45 кГц, 60°C) [93] и даже до 20 мин (45 кГц, 50°C) [110]. При проведении процедуры в микроволновой печи это время составляет 4 (65°C) [67], (95°C) [94, 148], 7.2 (90°C) [108, 110] и 20 (70°C) мин [93, 107], но при этом часто уменьшается выход продуктов derivатизации за счет разложения нитрофенильных производных некоторых нитрофуранов [67]. Напротив, в работе [92] сообщается о значительном снижении времени гидролиза-derivатизации (до 5 мин) при комнатной температуре за счет повышения концентрации соляной кислоты и количества метанола в реакционной смеси.

---

<sup>3</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Мелехин А.О., Толмачева В.В., Холявская Ю.Н., Седых Е.С., Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Баиров А.Л. Быстрый гидролиз и derivатизация метаболитов нитрофуранов с новым derivатизирующим агентом 5-нитро-2-фуральдегидом 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%.

Столь неоднозначные и зачастую противоречивые сведения о влиянии температуры на процесс гидролиза-derivатизации, по-видимому, связаны с тем, что при выборе условий не всегда использовали образцы пищевых продуктов, полученные после воздействия на животных нитрофуранами, как это было сделано в работах [67, 90, 91, 93], а использовали модельные образцы, приготовленные путем добавления метаболитов нитрофуранов к анализируемым пищевым продуктам [90, 92, 94, 107, 108, 110, 148, 155]. Очевидно, что гидролиз метаболитов нитрофуранов из образцов, полученных естественным путем в процессе воздействия на животных, будет отличаться от гидролиза в модельных образцах. Кроме того, в качестве derivатизирующего агента в цитируемых выше работах использовали не только 2-НБА [67, 90, 91, 93, 94, 148, 155, 26–28], но и другие derivатизирующие агенты [107, 108, 110], что также могло повлиять на время derivатизации, при этом исследования проводили при разных концентрациях соляной кислоты.

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 достижения поставленной цели нам понадобились образцы, содержащие метаболиты нитрофуранов. В качестве объектов исследования использовали куриное мясо и субпродукты кур-бройлеров, которые в течение 10 дней получали нитрофураны. Очистку гидролизатов перед ВЭЖХ-МС/МС определением проводили методом ТФЭ с использованием ССПС.

**Анализируемые образцы.** Для изучения влияния различных факторов на гидролиз и derivатизацию связанных с белками метаболитов нитрофуранов использовали образцы от четырех циплят-бройлеров, которые в течение 10 дней в виде инъекций получали тот или иной нитрофуран. Общее количество нитрофуранов, которые получили бройлеры, составило 345, 125, 267 и 222 мкг/кг живого веса бройлеров для фуралтадона, фуразолидона, нитрофурантоина и нитрофуразона, соответственно. Забой проводили спустя день после введения последней дозы. Образцы мышц, печени, желудков и сердца от каждого животного собирали отдельно, замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  в холодильнике. Для

построения градуировочных зависимостей использовали образцы “чистого” куриного мяса, собранные Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (Москва, Россия) в 2021 г. в процессе государственного мониторинга пищевой продукции. Образцы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  в холодильнике.

Методом ВЭЖХ-МС/МС проведена оценка содержания разных форм нитрофуранов в курином мясе спустя сутки после введения последней дозы. Нативную форму нитрофуранов определяли после экстракции НФ из 1 г гомогенизированной пробы мяса ацетонитрилом, упаривания экстрактов в токе азота, перерастворения в подвижной фазе и обезжиривания гексаном. Для определения содержания не связанных с белками метаболитов 1 г гомогенизированной пробы дважды промывали ацетонитрилом. С полученным экстрактом проводили дериватизацию с 2-НБА.

Определение связанных с белками метаболитов проводили в соответствии с действующим ГОСТ 32014-2012. Для этого к 1 г гомогенизированной пробы добавляли 5 мл 0.1М HCl и 100 мкл 0.2 М раствора 2-НБА в метаноле, перемешивали и помещали в водяную баню с температурой  $37^{\circ}\text{C}$  на 16 ч. После проведения кислотного гидролиза и дериватизации образцы охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, перемешивали на шейкере в течение 10 мин. Затем добавляли 10 мл деионизованной воды и доводили pH до 4 раствором  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 М раствор). Для обезжиривания пробы к смеси добавляли 3 мл гексана, перемешивали на шейкере в течение 10 мин и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Гексан удаляли, а водный слой очищали методом ТФЭ с помощью картриджа шприцевого типа, заполненного 30 мг ССПС.

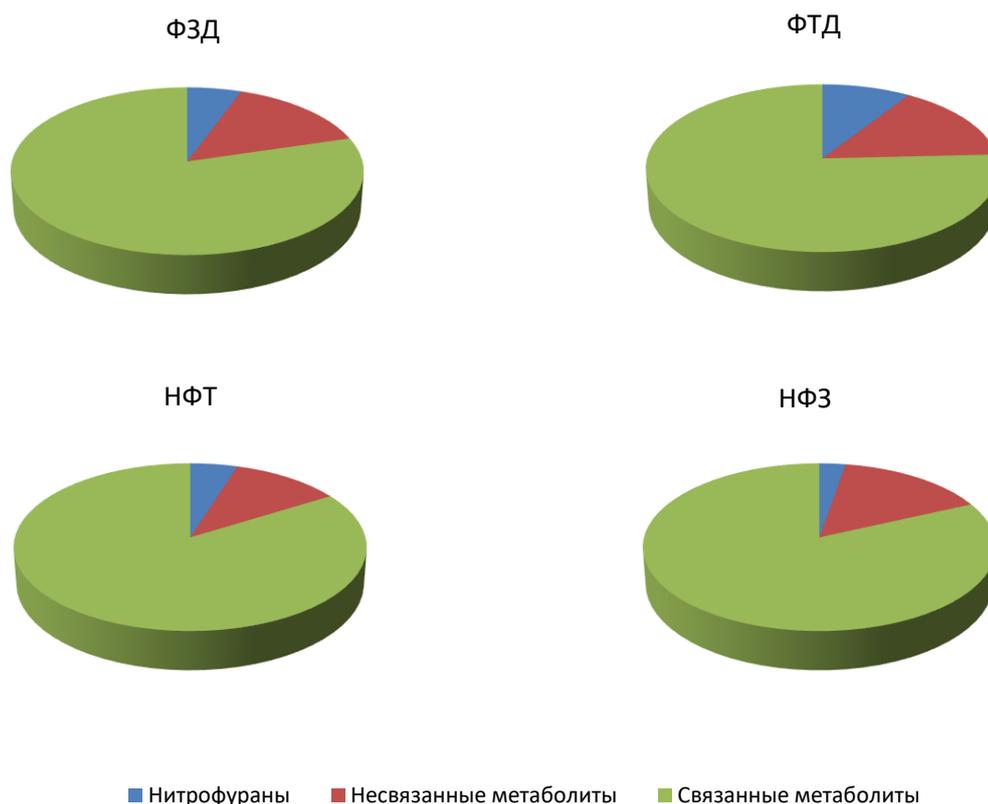
Из данных, приведенных в табл. 6 и на рис. 10, видно, что уже спустя сутки после введения последней дозы нитрофуранов, содержание их в курином мясе крайне мало 3 – 8%; содержание не связанных с белками метаболитов нитрофуранов составляет 11 – 16%, а основной формой являются метаболиты связанные с белками.

Для оценки содержания метаболитов нитрофуранов в образцах мяса кур-бройлеров, получавших в течение 10 дней нитрофураны, провели их определение в виде нитрофенилпроизводных по официальной методике, регламентированной

**Таблица 6.** Содержание различных форм нитрофуранов в курином мясе спустя день после введения последней дозы

Нитрофуран/метаболит	Концентрация нитрофурана/метаболита, мкг/кг			
	АОЗ(ФЗД)	АМОЗ(ФТД)	АГД(НФТ)	СЕМ(НФЗ)
В форме нитрофурана	3*	6*	6*	4*
В форме несвязанного с белками метаболита	8	10	14	23
В форме связанного с белками метаболита	43	104	122	

\*В пересчете на метаболит



**Рис. 10.** Содержание различных форм нитрофуранов в курином мясе спустя сутки после введения последней дозы нитрофуранов.

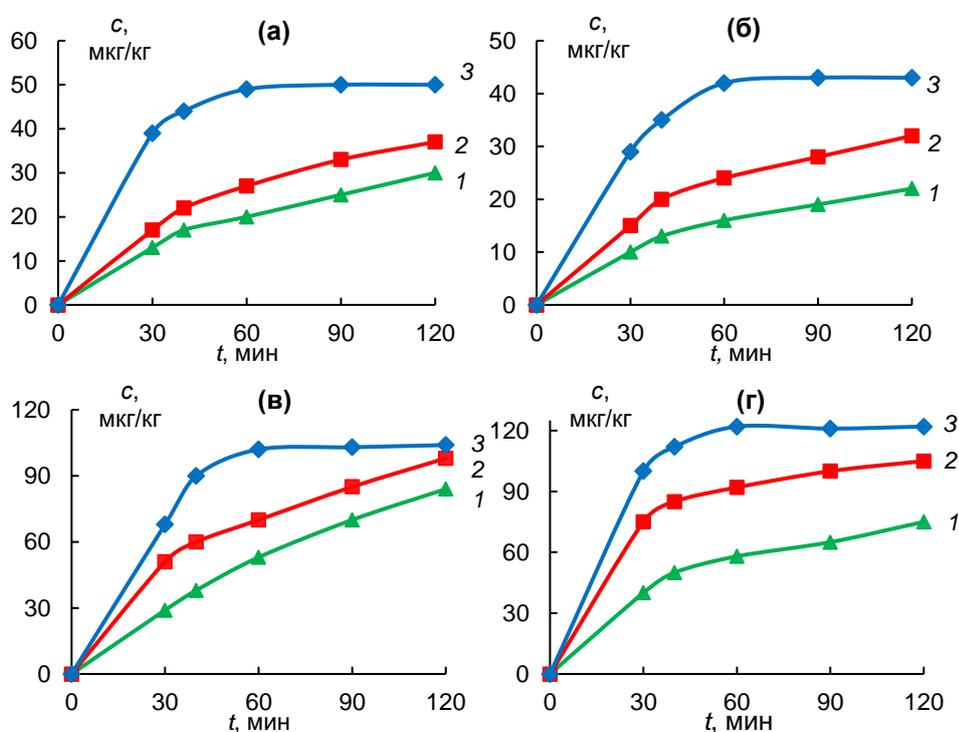
действующим ГОСТ 32014-2012 [166], с использованием в качестве дериватирующего агента 2-НБА и по описанной выше методике с использованием в качестве дериватирующего агента 5-НФА. Гидролиз и дериватизацию в этой серии экспериментов проводили одновременно в соответствии с официальной методикой путем нагревания образцов на водяной бане (40°C) в присутствии 0.1 М HCl в течение 16 ч. Установлено, что результаты, полученные с использованием разных дериватирующих агентов (табл. 7), не различаются между собой. Следует отметить, что найденные количества метаболитов нитрофуранов не коррелируют с введенным бройлерам количеством, что может указывать на разные пути метаболизма нитрофуранов в организме животных, о чем сообщалось ранее [37, 42].

Кроме того, с учетом дальнейших исследований оценили термостабильность 5-НФА и четырех нитрофуранов в 0.1, 0.2 и 0.5 М растворах HCl и установили, что повышение температуры от 40 до 80°C при нагревании образцов в термостатированной ультразвуковой бане не приводит к разрушению этих соединений.

**Таблица 7.** 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-дериватизации	Найдено, мкг/кг ( $s_r$ )			
	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)

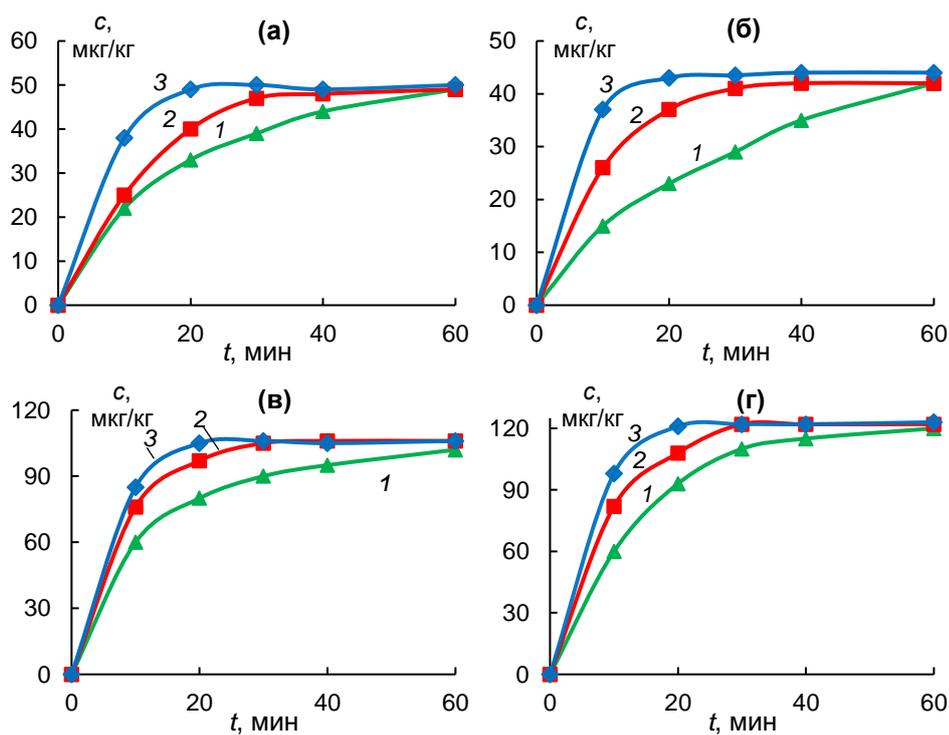
**Влияние температуры и времени** изучено на примере четырех образцов куриного мяса, содержащих известные количества метаболитов АОЗ, АМОЗ, АГД и СЕМ. В этой серии экспериментов гидролиз-derivатизацию проводили в термостатированной ультразвуковой бане (37 кГц) в присутствии 0.1М НСl при 40, 60 и 80°C в течение 30, 60, 90 и 120 мин. Как видно из данных, приведенных на рис. 11, максимальный выход продуктов derivатизации, коррелирующий с содержанием этих метаболитов в анализируемых образцах (табл. 7), наблюдается при 80°C. Полученные результаты указывают на то, что повышение температуры от 40 до 80 °C позволяет снизить время гидролиза-derivатизации в 0.1 М НСl до 60 мин (рис 11).



**Рис. 11.** Влияние температуры на выход продуктов derivатизации метаболитов нитрофуранов АМОЗ (а), АОЗ (б), АГД (в) и СЕМ (г) с 5-нитро-2-фуральдегидом в зависимости от времени проведения гидролиза-derivатизации в термостатированной ультразвуковой бане.  $c_{\text{НСl}} = 0.1\text{M}$ ; 40°C (1); 60°C (2); 80°C (3).

**Влияние концентрации соляной кислоты и времени.** В этой серии экспериментов гидролиз-derivатизацию проводили в термостатированной ультразвуковой бане (37 кГц) при 80°C в присутствии 0.1, 0.2 и 0.5М HCl в течение 10, 20, 30, 40 и 60 мин. Данные, приведенные на рис. 11, 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. Полученные результаты указывают на то, что в присутствии 0.5 М HCl и 80 °С время гидролиза-derivатизации можно снизить до 20 мин (рис 12).

Таким образом установлено, что при проведении гидролиза-derivатизации в термостатированной УЗ-ванне, повышении температуры до 80°C и концентрации соляной кислоты до 0.5 М удается не только значительно сократить время гидролиза-derivатизации с 16 ч до 20 мин.



**Рис. 12.** Влияние концентрации соляной кислоты на выход продуктов derivатизации метаболитов нитрофуранов АМОЗ (а), АОЗ (б), АГД (в) и СЕМ (г) с 5-нитро-2-фуральдегидом в зависимости от времени проведения гидролиза-derivатизации в термостатированной ультразвуковой бане при 80°C.  $c_{HCl} = 0.1M$  (1); 0.2M (2); 0.3M (3).

## Глава 4. Особенности сорбции нитрофуранов на сверхсшитом и магнитном сверхсшитом полистиролах

### 4.1. Сорбция нитрофуранов на сверхсшитом полистироле в статическом режиме

**Характеристика сорбента.** Как показали исследования последних лет, в том числе и проводимые в нашей научной группе, весьма перспективными сорбентами для твердофазной экстракции полярных органических соединений из водных растворов оказались сверхсшитые полистиролы (ССПС) [161]. Эти сорбенты отличаются высокоразвитой удельной поверхностью в сочетании с аномально высоким значением площади поверхности, приходящейся на микропоры, а также существенно большим, чем у остальных сорбентов, сродством к полярным органическим соединениям и лёгкостью регенерации [167, 168]. Еще одно уникальное свойство сверхсшитого полистирола заключается в том, что он представляет собой так называемый «материал ограниченного доступа» (restricted access material) [169]. Его поры диаметром 1.5–3 нм доступны большинству низкомолекулярных веществ, но недоступны для таких крупных молекул, как белки, гликопротеины или полисахариды.

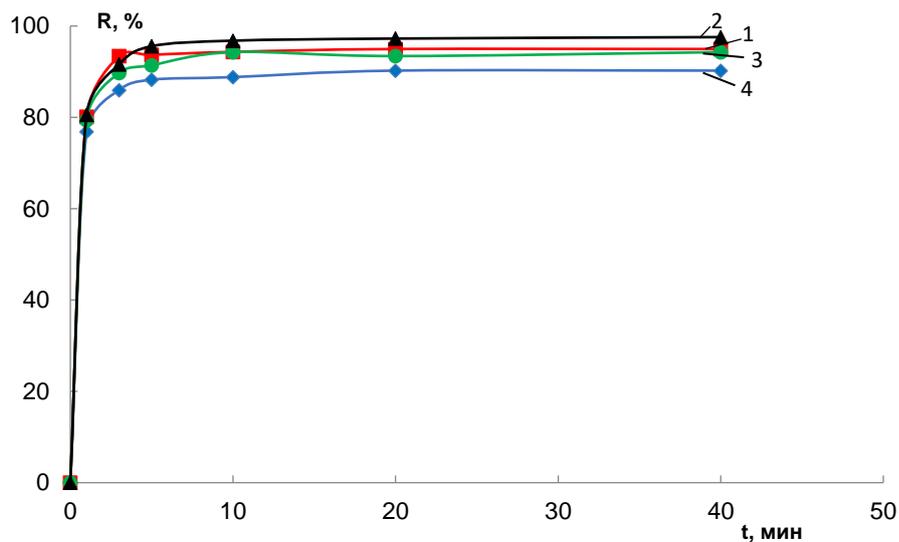
Первые работы по изучению сорбционных свойств сверхсшитых полистиролов, выполненные на кафедре аналитической химии в 90-годах прошлого столетия, показали перспективность применения сверхсшитых полистиролов в качестве сорбентов не только для сорбционного концентрирования таких полярных соединений как амины и фенолы [170, 171], но и в качестве новых неподвижных фаз в методе обращенно-фазовой ВЭЖХ [172, 173]. В этих работах впервые было высказано предположение, что значительный вклад в механизм удерживания органических соединений на сверхсшитых полимерах вносят не только гидрофобные, но и  $\pi$ - $\pi$  и электростатические взаимодействия.

В настоящей работе в качестве сорбента был использован коммерчески доступный ССПС Диапак П-3, морфология поверхности и структурные характеристики которого были исследованы в нашей научной группе ранее [174]. По данным сканирующей электронной микроскопии установлено, что частицы ССПС имеют правильную сферическую форму с диаметром  $\sim 60$  мкм.

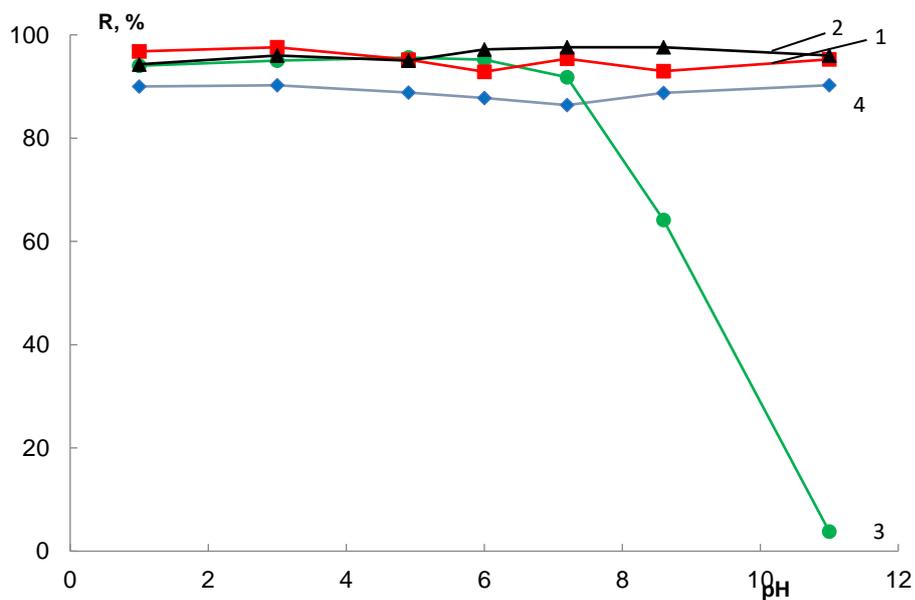
Исследование пористой структуры указывает на то, что ССПС Диапак П-3 является микропористым сорбентом с большой удельной поверхностью ( $1132 \text{ м}^2/\text{г}$ ) и бимодальным распределением пор, причем на долю микро- и мезо- пор приходится 53 и 42% площади поверхности соответственно. Наличие в структуре сорбента такого большого количества микропор обуславливает так называемую структурную селективность сорбента, влияющую на удерживание молекул сорбата, размеры которых сопоставимы с размерами пор. На этом сорбенте значительный вклад в механизм удерживания органических соединений вносят не только гидрофобные, но и  $\pi$ - $\pi$  [175] и электростатические взаимодействия. Нами было показано, что поверхность ССПС Диапак П-3 заряжена положительно при  $\text{pH} < 3.3$  и отрицательно при более высоких  $\text{pH}$ , причем наибольшего отрицательного значения  $\zeta$ -потенциал достигает при  $\text{pH} \sim 8$  [174]. Все сказанное позволяет рассматривать ССПС в качестве перспективного сорбента для сорбционного концентрирования таких полярных органических соединений как нитрофураны, значения параметров Ханша ( $\text{lgP}$ ) которых изменяются от  $-0.22$  до  $0.87$  (табл. 4). При выборе условий сорбционного концентрирования варьировали время контакта фаз,  $\text{pH}$  раствора, концентрацию сорбатов и объем раствора.

**Влияние времени контакта фаз.** Для определения времени, затрачиваемого для достижения сорбционного равновесия, изучено распределение нитрофуранов между сорбентом и водной фазой от времени контакта фаз в статистическом режиме. Установлено, что для всех изученных нитрофуранов при концентрации  $5 \text{ мкг/мл}$  и  $\text{pH} \sim 4$  сорбционное равновесие устанавливается за  $5 - 10$  мин (рис. 13). Во всех дальнейших экспериментах при сорбции в статическом режиме время контакта фаз составляло  $10$  мин.

**Влияние  $\text{pH}$  водной фазы.** Полученные в ходе работы экспериментальные данные (рис. 14) указывают на то, что сорбция фуралтадона, фуразолидона и нитрофуразона не зависит от  $\text{pH}$  раствора; в широкой области значений  $\text{pH}$  от  $1$  до  $10$  эти нитрофураны сорбируются на ССПС на  $97$ ,  $95$  и  $90$  % соответственно. В случае нитрофурантоина сорбция практически не зависит от  $\text{pH}$  в интервале  $3 - 8$  и составляет  $96\%$ , а при  $\text{pH} > 8$  наблюдается резкое уменьшение сорбции, что может быть связано с протеканием гидролиза по связи  $\text{C}=\text{N}$  в щелочных средах. Для дальнейших исследований было выбрано  $\text{pH} \sim 4$ .



**Рис. 13.** Зависимости степеней извлечения нитрофуранов на ССПС от времени контакта фаз. Условия:  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $V = 25$  мл,  $c_{\text{НФ}} = 5$  мкг/мл,  $\text{pH} \sim 4$ . 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон.



**Рис. 14.** Зависимости степеней извлечения нитрофуранов на ССПС от pH водной фазы. Условия:  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $V = 25$  мл,  $c_{\text{НФ}} = 5$  мкг/мл,  $t = 10$  мин. 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон

**Изотермы сорбции.** Для построения изотерм сорбции нитрофуранов в растворы (25 мл) с их различной концентрацией (от  $1 \cdot 10^{-5}$  до  $1.5 \cdot 10^{-4}$  М) помещали навеску сорбента ССПС ( $0.020 \pm 0.001$  г) и далее в течение 10 мин встряхивали на электромеханическом вибросмесителе. Равновесную концентрацию нитрофуранов определяли спектрофотометрически.

Изотермы сорбции нитрофуранов (рис. 15), описываются уравнением Ленгмюра, что подтверждается линейностью зависимостей,  $c/a$  (y) от  $c$  (x) для различных нитрофуранов:

$$\text{Нитрофурантоин: } y = 16.9x + 46.8 (R^2 = 0.996);$$

$$\text{Фуразолидон: } y = 10.9x + 39.4 (R^2 = 0.992);$$

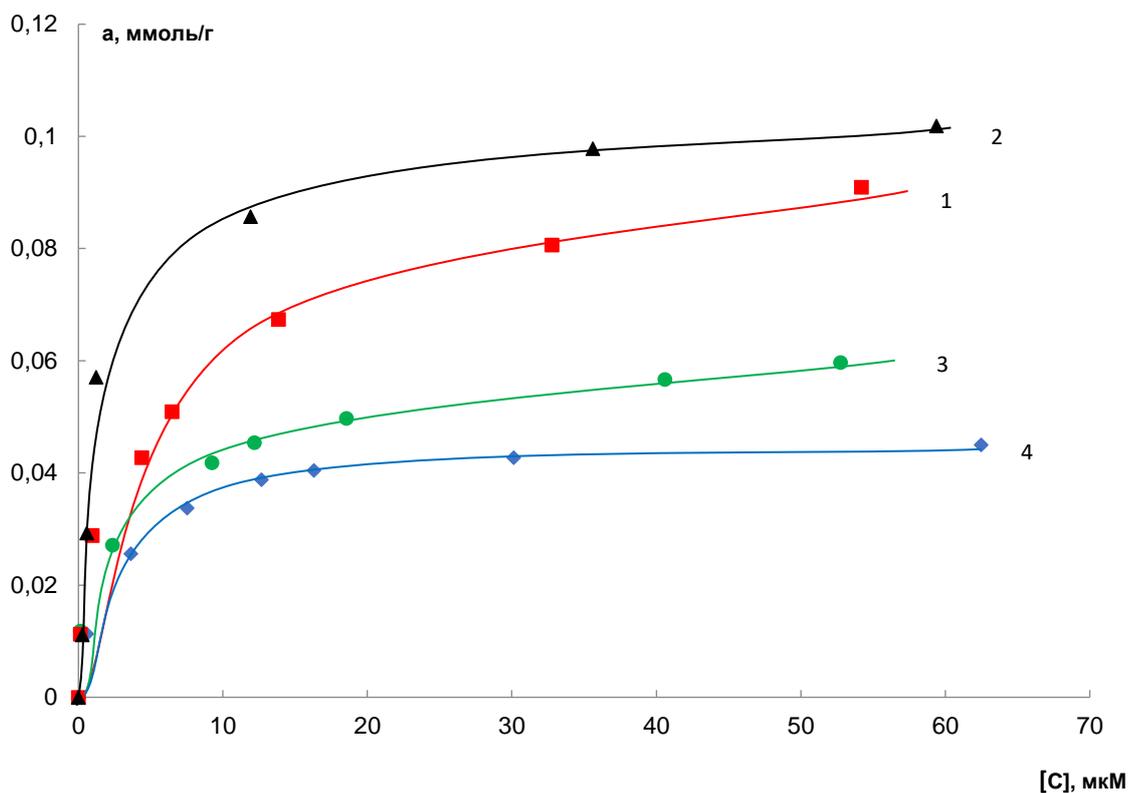
$$\text{Нитрофуразон: } y = 21.3x + 55.1 (R^2 = 0.999);$$

$$\text{Фуралтадон: } y = 9.7x + 20.7 (R^2 = 0.999).$$

Ранее такой тип изотерм наблюдали при сорбции на ССПС пирокатехина, резорцина и гидрохинона [176], сульфаниламидов [177], метилксантинов [175], тетрациклинов [178] и некоторых других полярных органических соединений [161].

Значения предельной сорбции возрастают в ряду: нитрофуразон (0.047 ммоль/г) < нитрофурантоин (0.059 ммоль/г) < фуразолидон (0.095 ммоль/г) < фуралтадон (0.103 ммоль/г).

**Десорбция нитрофуранов.** Одним из главных этапов при разработке методики группового концентрирования любых соединений является выбор элюента для их количественной десорбции. При выборе условий десорбции нитрофуранов, сорбированных на ССПС, 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. 8, все элюенты количественно десорбируют нитрофураны со ССПС. Для дальнейшего исследования в качестве элюента был выбран ацетонитрил.



**Рис. 15.** Изотермы сорбции нитрофуранов на ССПС. Условия:  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $V = 25$  мл,  $t = 10$  мин,  $pH \sim 4$ . 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон.

**Таблица 8.** Степени десорбции нитрофуранов со ССПС в статическом режиме ( $C_{\text{НФ}} = 5$  мкг/мл,  $t_{\text{дес}} = 5$  мин)

Элюент	Объем элюента, мл	$R_{\text{дес}}, \%$			
		Фуразолидон	Нитрофурантоин	Нитрофуразон	Фуралтадон
Ацетонитрил	1	97	94	90	91
	2	100	100	100	100
Метанол	1	74	79	79	75
	2	100	100	100	100
Этанол	1	72	78	81	77
	2	99	100	100	100

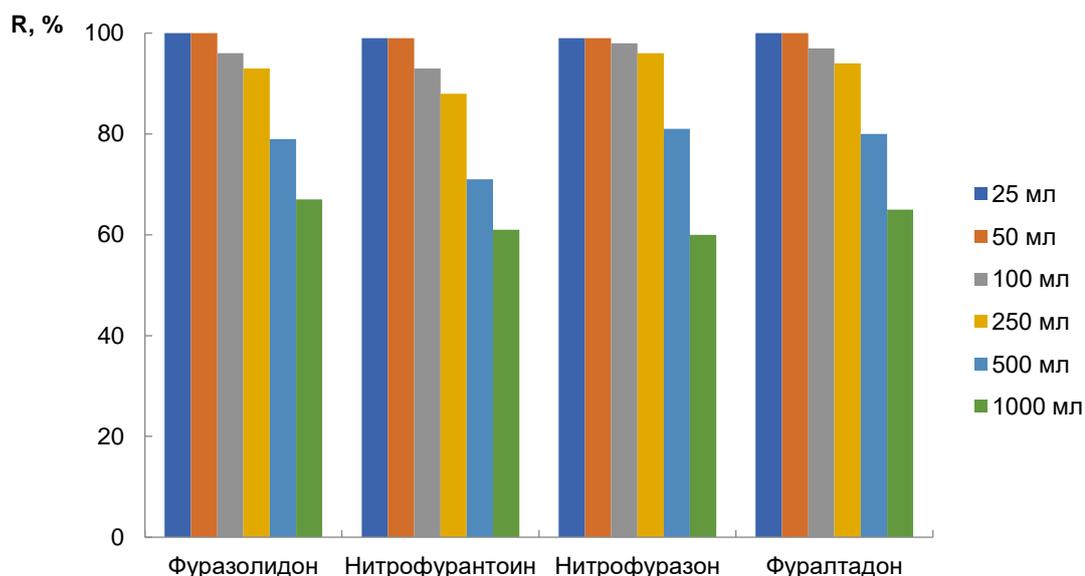
## 4.2. Сорбция нитрофуранов на сверхсшитом полистироле в динамическом режиме

Для изучения сорбции нитрофуранов в динамическом режиме (твердофазная экстракция) использовали концентрирующий картридж, заполненный  $0.030 \pm 0.001$  г ССПС ( $l = 6$  мм,  $d = 10$  мм). 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  $pH \sim 4$ . Было установлено, что при увеличении объема анализируемого раствора от 25 мл до 250 мл нитрофураны извлекаются количественно, их степени извлечения составляют 88 – 96% (рис. 16). 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. 9, ацетонитрил количественно десорбирует нитрофураны при десорбции 2 мл, степени десорбции достигают 98 – 99%. Перед ВЭЖХ анализом элюат упаривали и перерастворяли в подвижной фазе.

**Таблица 9.** Степени десорбции нитрофуранов ( $R_{дес}, \%$ ) с картриджа, заполненного 0.030 г ССПС ( $C_{НФ} = 1 \cdot 10^{-5}$  М,  $t_{дес} = 5$  мин)

Элюент	Объем элюента, мл	$R_{дес}, \%$			
		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. 16.** Степени извлечения нитрофуранов методом ТФЭ от объёма раствора на картриджах, заполненных  $0.030 \pm 0.001$  г ССПС ( $l = 6$  мм,  $d = 10$  мм),  $pH \sim 4$

### 4.3. Сорбция нитрофуранов на магнитном сверхсшитом полистироле

**Характеристика сорбента.** В последнее время в процессе пробоподготовки пищевых продуктов при определении в них различных лекарственных веществ наряду с ТФЭ все чаще применяют магнитную твердофазную экстракцию (МТФЭ) [177 –182]. В качестве сорбентов в этом методе применяют сорбенты, которым разными способами придают магнитные свойства. По сравнению с ТФЭ МТФЭ обладает рядом преимуществ, таких как исключение стадий фильтрования и центрифугирования, ускорение процесса пробоподготовки и уменьшение потерь аналитов. Однако, насколько нам известно МТФЭ ранее не применяли в процессе пробоподготовки пищевых продуктов при определении в них метаболитов нитрофуранов.

В настоящей работе в качестве магнитного сорбента мы предлагаем использовать магнитный ССПС (ССПС/ $Fe_3O_4$ ), который ранее хорошо зарекомендовал себя в процессе пробоподготовки молока при определении в нем сульфаниламидов [163, 183]. Морфология поверхности, структурные и магнитные характеристики ССПС/ $Fe_3O_4$  были исследованы в нашей научной группе ранее [162, 163].

**Таблица 10.** Структурные характеристики ССПС и ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (5%)

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>	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

Синтез магнитного ССПС проводили в два этапа, по методике, описанной в экспериментальной части. На первом этапе получали наночастицы магнетита, которые по данным просвечивающей электронной микроскопии имеют размер 10–20 нм. Площадь поверхности сухого образца синтезированных НЧ составляет 70 м<sup>2</sup>/г, что близко к ожидаемому значению для идеально сферических наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> диаметром 17 нм. Магнитные измерения показывают, что наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> являются суперпарамагнитными, поскольку на кривой намагничивания образцов отсутствует петля магнитного гистерезиса, характерная для магнитных частиц в наноразмерном состоянии. Намагниченность насыщения наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> составляет 72 э.м.е./г. На втором этапе наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> сорбировали на ССПС Диапак П-3 из метанольного раствора. Использовали магнитный ССПС, содержащий 5% наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Сопоставление структурных характеристик ССПС и ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, представленных в табл. 10, указывает на то, что введение наночастиц магнетита в матрицу ССПС, приводит к незначительному снижению удельной поверхности и объема пор, но эти значения все же остаются достаточно высокими для использования полученного композита в качестве сорбента. Магнитный ССПС остается суперпарамагнитным, на кривой намагничивания образцов отсутствует петля магнитного гистерезиса, но намагниченность насыщения снижается до 1.69 э.м.е./г, что связано с присутствием диамагнитного ССПС в составе композита. Представляло интерес изучить сорбцию нитрофуранов на этом сорбенте и сравнить полученные данные с результатами, полученным для ССПС.

**Влияние времени контакта фаз.** Из данных рис. 17 видно, что, как и в случае ССПС, на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> сорбционное равновесие устанавливается быстро, в течение 5 мин.

**Влияние pH водной фазы.** Экспериментальные зависимости сорбции нитрофуранов на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> от pH водной фазы представлены на рис. 18. Характер зависимостей степеней извлечения от pH на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и ССПС идентичен: сорбция фуралтадона, фуразолидона и нитрофуразона не зависит от pH раствора; в широкой области значений pH от 1 до 10 эти нитрофураны сорбируются на ССПС на 96, 95 и 90 % соответственно. В случае нитрофурантоина сорбция практически не зависит от pH в интервале 3 – 8 и составляет 95%, а при pH>8 наблюдается резкое уменьшение сорбции, что может быть связано с протеканием гидролиза по связи C=N в щелочных средах. Во всех дальнейших исследованиях сорбцию на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> проводили из растворов с pH~4.

**Изотермы сорбции нитрофуранов.** Для построения изотерм сорбции нитрофуранов навеску ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (0.020 ± 0.001 г) помещали в растворы исследуемых веществ (25 мл) разной концентрации (от 1·10<sup>-5</sup> до 1.5·10<sup>-4</sup> М), после чего в течение 10 мин встряхивали на электромеханическом вибросмесителе. На рис. 19 приведены изотермы сорбции нитрофуранов на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

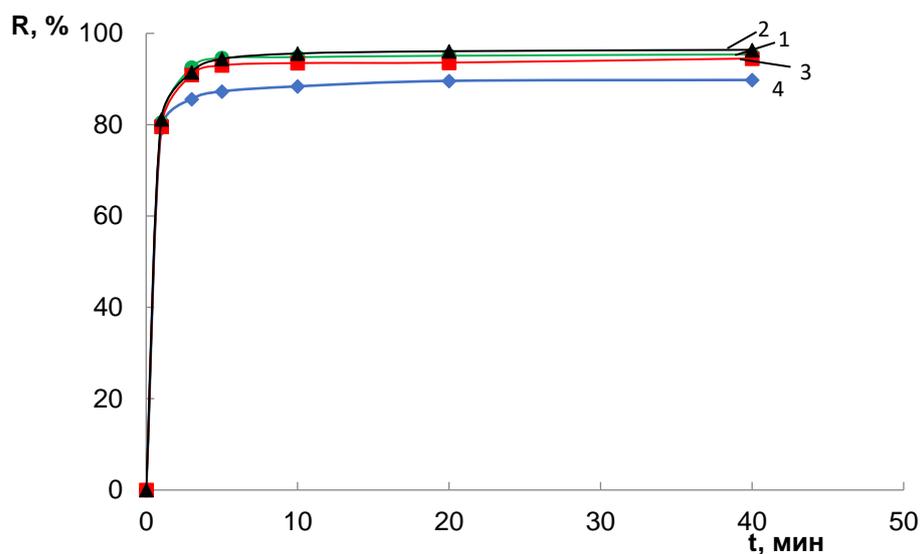
Зависимости  $c/a$  (y) от  $c$  (x) для различных нитрофуранов линейны и описываются уравнениями:

$$\text{Нитрофурантоин: } y = 17.6x + 87.9 (R^2 = 0.999);$$

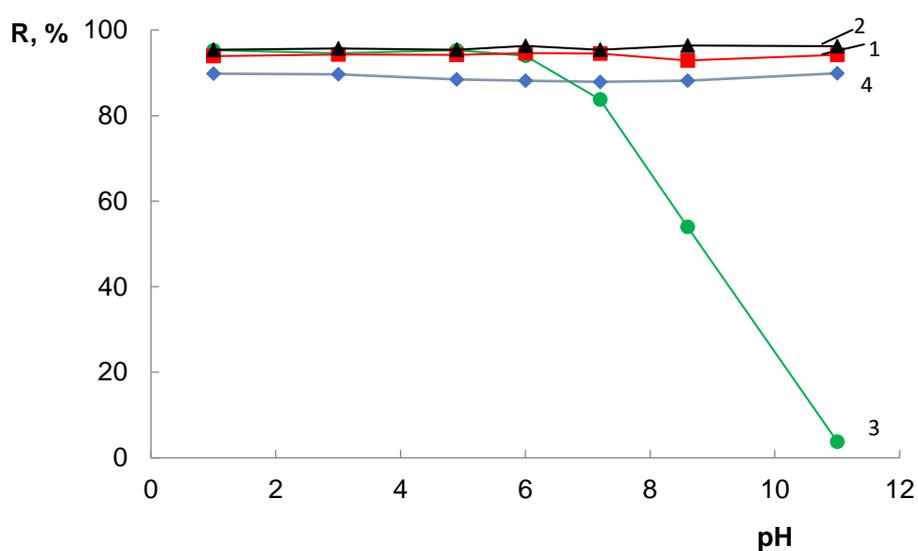
$$\text{Фуразолидон: } y = 11.6x + 43.5 (R^2 = 0.999);$$

$$\text{Нитрофуразон: } y = 26,7x + 102,6 (R^2 = 0.999);$$

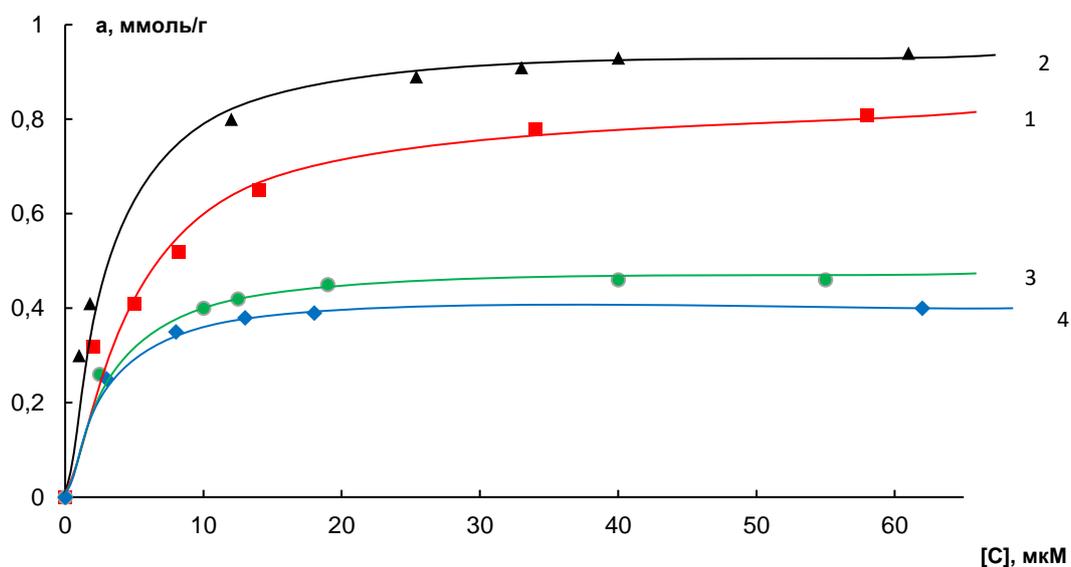
$$\text{Фуралтадон: } y = 11.0x + 26.1 (R^2 = 0.998).$$



**Рис. 17.** Зависимости степеней извлечения нитрофуранов на магнитном ССПС от времени контакта фаз. Условия:  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $V = 25$  мл,  $C_{\text{НФ}} = 5$  мкг/мл, рН  $\sim 4$ . 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон



**Рис. 18.** Зависимости степеней извлечения нитрофуранов на магнитном ССПС от рН водной фазы. Условия:  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $V = 25$  мл,  $C_{\text{НФ}} = 5$  мкг/мл,  $t = 10$  мин. 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон



**Рис. 19.** Изотермы сорбции нитрофуранов на магнитном ССПС. Условия:  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $V = 25$  мл,  $t = 10$  мин,  $\text{pH} = 4$ . 1 – фуразолидон; 2 – фуралтадон; 3 – нитрофурантоин; 4 – нитрофуразон

Как и в случае со сверхсшитым полистиролом эти изотермы описываются уравнениями Ленгмюра. Значения предельной сорбции возрастают в ряду: нитрофуразон (0.037 ммоль/г) < нитрофурантоин (0.057 ммоль/г) < фуразолидон (0.086 ммоль/г) < фуралтадон (0.091 ммоль/г).

**Выбор условий десорбции.** В качестве элюента при выборе условий десорбции использовали ацетонитрил, который показал лучшую эффективность в случае ССПС. Десорбцию проводили последовательно двумя порциями элюента по 1 мл в течение 5 мин в ультразвуковой ванне. Результаты экспериментов приведены в табл. 11. Ацетонитрил количественно десорбирует нитрофураны и не влияет на структурную целостность магнитного сорбента, поэтому он был выбран в качестве элюента.

**Таблица 11.** Степени десорбции нитрофуранов с магнитного ССПС ( $C_{\text{НФ}} = 5$  мкг/мл,  $t_{\text{дес}} = 5$  мин)

Элюент	Объем элюента, мл	$R_{\text{дес}}, \%$			
		Фуразолидон	Нитрофурантоин	Нитрофуразон	Фуралтадон
Ацетонитрил	1	90	86	89	89
	2	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

#### 4.4. Сравнение сорбционного поведения нитрофуранов на ССПС и магнитном ССПС

Было проведено сравнение сорбционного поведения нитрофуранов на ССПС, ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и магнитных наночастицах Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в одинаковых условиях, при которых, согласно данным, приведенным выше, обеспечивалась максимальная степень извлечения (время контакта фаз – 10 мин, pH ~ 4.0,  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г). В табл. 12 приведены степени извлечения, величины предельной сорбции ( $a_m$ , мкмоль/г) на сверхсшитом полистироле, магнитном сверхсшитом полистироле и магнитных наночастицах Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в статических условиях. 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 ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> имеет много общего, характер зависимостей степени извлечения от времени, pH и концентрации сорбатов одинаковый: время достижения равновесия составляет 5 мин, максимальная сорбция наблюдается в интервале pH 3 – 6.

Таким образом, проведенное исследование показало, что ССПС и ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> проявляют высокое сродство к молекулам нитрофуранов и могут быть использованы для группового сорбционного выделения и концентрирования соединений этого класса из водных растворов.

**Таблица 12.** Степени извлечения ( $R$ , %) и величины предельной сорбции ( $a_m$ , мкмоль/г) на ССПС и магнитном ССПС в статических условиях. ( $C_{\text{НФ}} = 1 \cdot 10^{-5}$  М, pH ~ 4.0,  $V = 25$  мл,  $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$  г,  $t = 10$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Вещество	ССПС		ССПС/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
	$R$ , %	$a_m$	$R$ , %	$a_m$	$R$ , %
Фуралтадон	97 ± 2	103	96 ± 3	91	0
Фуразолидон	95 ± 2	95	95 ± 2	86	0
Нитрофурантоин	96 ± 2	59	95 ± 3	57	0
Нитрофуразон	90 ± 2	47	90 ± 3	37	0

## **Глава 5. Определение метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-МС/МС**

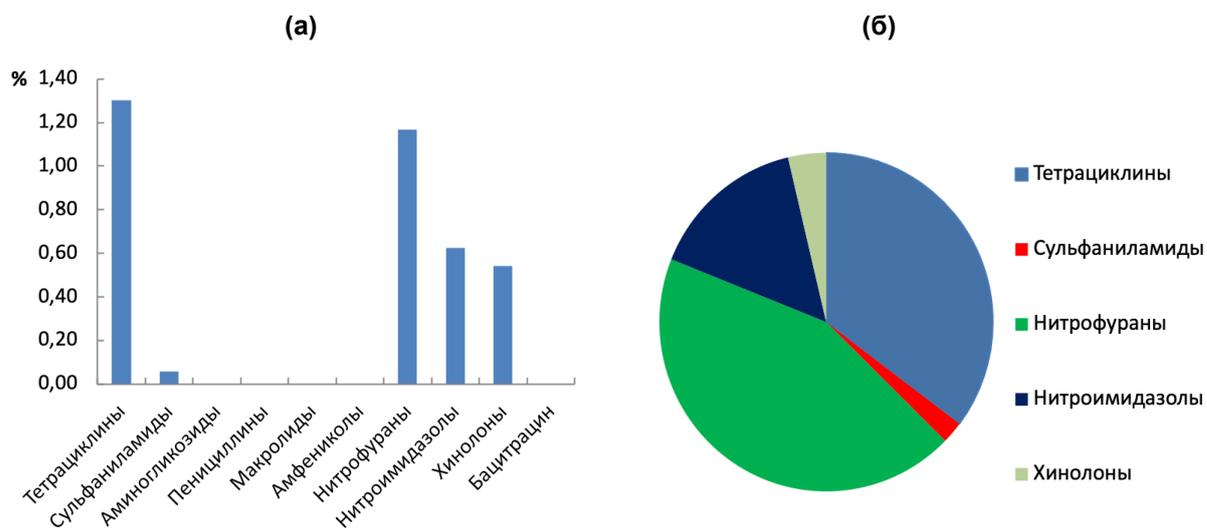
Как следует из обзора литературы, определение метаболитов НФ в пищевых продуктах чаще всего проводят методом ВЭЖХ-МС/МС после кислотного гидролиза-derivatизации образцов с 2-нитробензальдегидом. Несмотря на высокую чувствительность и селективность масс-спектрометрического детектирования, перед определением гидролизаты очищают методом ЖЖЭ или ТФЭ для минимизации помех и матричных эффектов. С целью расширения derivatизирующих агентов и сорбентов для ТФЭ, позволяющих проводить масс-спектрометрическое определение метаболитов НФ, в настоящей работе мы предложили использовать 5-нитро-2-фуральдегид, сверхсшитый и магнитный сверхсшитый полистиролы, которые ранее для этих целей не применяли. Для достижения поставленной цели представляло интерес подтвердить возможность их применения на примере анализа реальных пищевых продуктов.

### **5.1. Применение 5-нитро-2-фуральдегида и магнитного сверхсшитого полистирола для определения метаболитов нитрофуранов в меде<sup>4</sup>**

Несмотря на то, что применение нитрофуранов в пчеловодстве запрещено во многих странах, включая Россию, их продолжают использовать из-за высокой эффективности и низкой стоимости. Поэтому мониторинг за содержанием остаточных количеств метаболиты нитрофуранов в меде является актуальной задачей. На рис. 20 показан процент «положительных» проб содержащих остаточные количества ветеринарных лекарств от общего количества проб, выявленных за 2019 г в процессе мониторинга образцов меда в лаборатории ФГБУ ЦНМВЛ (а) и распределение «положительных» проб по различным группам ветеринарных лекарств, применяемым в пчеловодстве (б). Из рисунка видно, что метаболиты НФ находили в каждой сотой пробе, а их доля среди других выявленных лекарств составила около 40 %.

---

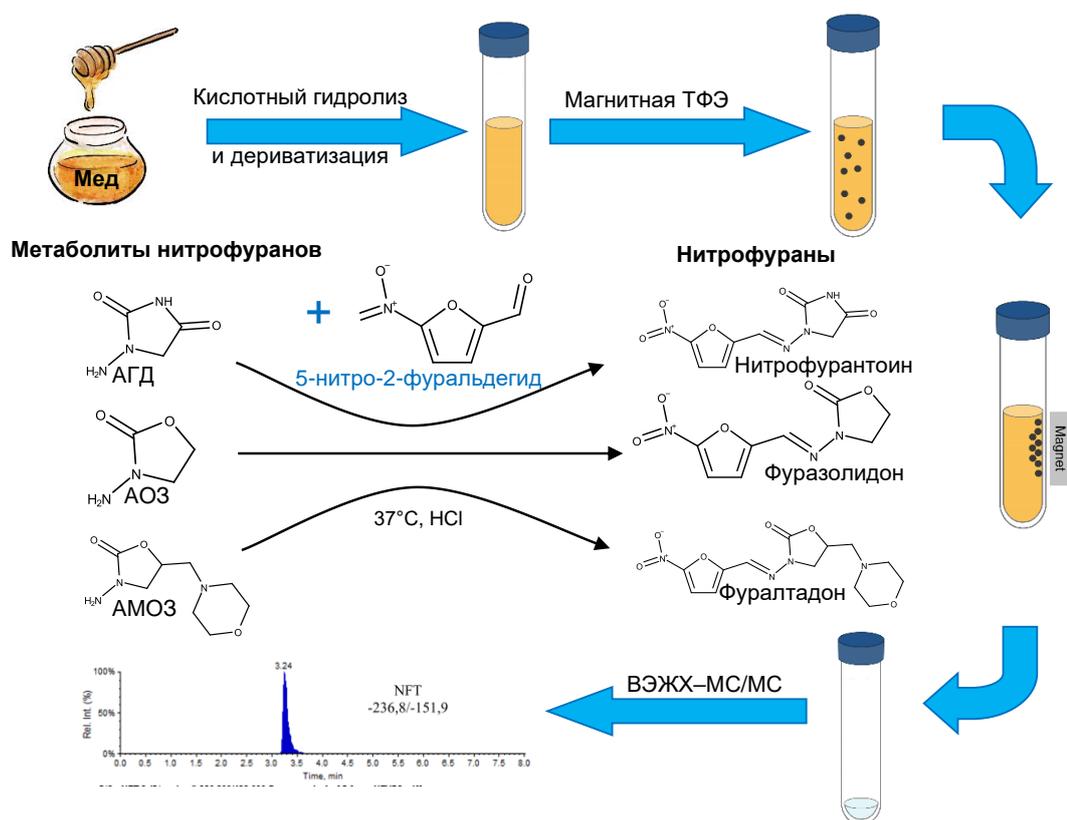
<sup>4</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: *Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Shubina E.G., Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Grudev A.I.* Determination of nitrofurans 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%.



**Рис. 20.** Процент «положительных» проб, содержащих в меде различные лекарства, от общего количества проб, проанализированных в лаборатории ФГБУ ЦНМВЛ в 2019 г. (а) и распределение «положительных» проб по различным группам ветеринарных лекарств, применяемым в пчеловодстве.

**Анализируемые образцы.** Использовали «чистые» и «загрязненные» образцы меда, собранные Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (Москва, Россия) в 2020 г. в процессе государственного мониторинга пищевой продукции. Образцы хранили при температуре 4°C в холодильнике.

**Пробоподготовка.** Схема пробоподготовки образцов меда с 5-нитро-2-фуральдегидом и ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов приведена на рис. 21. Гомогенизированные контрольные образцы меда (1,00 ± 0,02 г) взвешивали в полипропиленовых центрифужных пробирках объемом 15 мл и добавляли к ним по 200 мкл соответствующих стандартных растворов, содержащих 1, 2, 10, 50, 100 и 200 мкг/кг смеси метаболитов (для построения градуировочных зависимостей) или 200 мкл метанола (для анализируемых образцов). Затем во все пробы добавляли по 100 мкл рабочей смеси внутренних стандартов до получения эквивалентных концентраций в меде (100 мкг/кг), 5 мл 0,1 М HCl и 200 мкл 0,2 М 5-НФА в метаноле. Полученную смесь тщательно перемешивали на шейкере в течение 20 мин и помещали в термостат на 16 ч при 37°C. После кислотного гидролиза-derivатизации образцы охлаждали при комнатной температуре, в каждую пробирку добавляли по 20 мг ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> активированного ацетонитрилом и проводили МТФЭ в течение 15 мин. Магнитный сорбент отделяли магнитной



**Рис. 21.** Схема пробоподготовки образцов меда с 5-нитро-2-фуральдегидом и магнитным сверхсшитым полистиролом перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов.

сепарацией и дважды промывали 2 мл дистиллированной воды. Десорбцию проводили последовательно двумя порциями ацетонитрила по 1 мл в течение 5 мин в ультразвуковой ванне. Элюат упаривали в атмосфере азота досуха при 40°C, перерастворяли в 1.0 мл смеси подвижных фаз А и Б (80:20) и использовали для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

**Валидация.** Достоверность методики проверяли в соответствии с Регламентом Комиссии ЕС 2002/657. Для этого оценивали специфичность, линейность, правильность (степень выделения), пределы обнаружения ( $c_{\min}$ ) и определения ( $c_{\text{опр}}$ ). Степени выделения оценивали с использованием образцов меда, не содержащих остаточных количеств определяемых аналитов, с добавками метаболитов нитрофуранов в количестве 1, 2 и 200 мкг/кг. Для определения внутридневной и междневной повторяемости готовили по 5 и 15 образцов для каждого уровня концентрации соответственно. Предварительно установили, что во всех образцах до внесения добавок отсутствовали хроматографические пики,

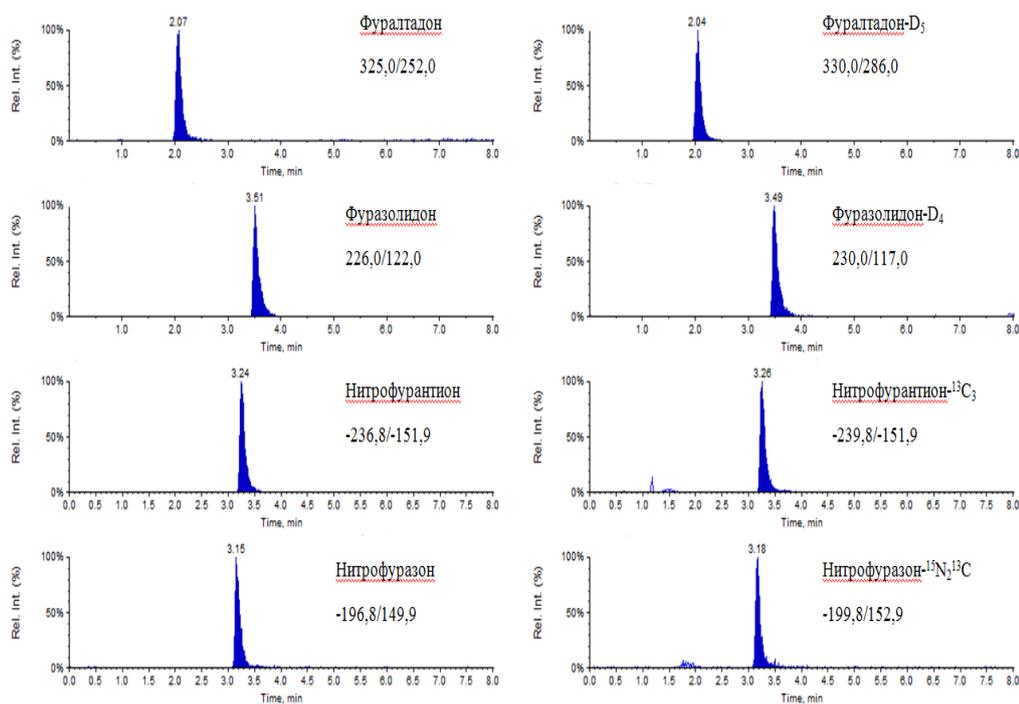
**Таблица 13.** Основные характеристики определения метаболитов нитрофуранов в меде после очистки экстрактов методом магнитной твердофазной экстракции с применением магнитного ССПС

Метабо- -лит	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

мешающие определению нитрофуранов – продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-НФА. Как видно из табл. 13, предлагаемый метод обеспечивает не только количественное выделение аналитов из анализируемых проб (степени выделения продуктов дериватизации составляют от 85 до 96%), но и отличается хорошей воспроизводимостью ( $s_r \leq 0.15$ ).

Для оценки абсолютного матричного эффекта (МЭ) использовали коэффициенты матричных градуировок в условиях анализа образцов меда, не содержащих исследуемых соединений, с добавками метаболитов нитрофуранов и коэффициенты градуировки соответствующих водных растворов с добавками метаболитов нитрофуранов. Расчет проводили по формуле:  $МЭ (\%) = (A/B) \times 100$ , где А – коэффициент в матричной градуировке, а В – коэффициент в водной градуировке. Как видно из данных, приведенных в табл. 13, в большинстве случаев относительный МЭ ниже 5%, что может быть следствием не только использования метода внутреннего стандарта, но и эффективной очистки экстрактов методом МТФЭ.

Количественный анализ проводили с использованием матричной градуировки. Линейность градуировочных графиков оценивали на модельных образцах меда, не



**Рис. 22.** Хроматограммы по выделенным ионам, для образца меда с добавлением метаболитов нитрофуранов в концентрации 100 мкг/кг и внутренних стандартов в концентрации 100 мкг/кг.

содержащих остаточных количеств определяемых аналитов, с добавками метаболитов нитрофуранов на уровнях концентраций 1, 2, 10, 50, 100 и 200 мкг/кг. Коэффициенты линейной зависимости площадей хроматографических пиков препаратов от их концентрации в анализируемом образце составили 0.995 – 0.998. На рис. 22 представлены хроматограммы по выделенным ионам для образца меда с добавлением 100 мкг/кг метаболитов нитрофуранов. Пределы обнаружения ( $c_{\min}$ ) и определения ( $c_{\text{опр}}$ ) рассчитывали по отношению аналитического сигнала (интенсивности пика) к шуму, равному 3 и 10 соответственно. Пределы обнаружения и определения составили 0.1 – 0.3 и 0.3 – 1 мкг/кг, соответственно (табл. 13), что позволяет определять метаболиты нитрофуранов в меде на уровне, меньшем МДУ (1 мкг/кг).

**Анализ реальных объектов** Разработанная методика был применена к трем положительным пробам меда, в которых при мониторинге пищевых продуктов были обнаружены метаболиты нитрофуранов. Результаты определения приведены в табл. 14. Сравнение полученных результатов с результатами, полученными с использованием официальной методики пробоподготовки (2-НБА, 0.1М HCl; 40°C; водяная баня; 16 ч) указывает на хорошую правильность разработанной методики.

**Таблица 14.** Результаты определения метаболитов нитрофуранов в меде с использованием разработанной нами и официальной методики пробоподготовки с использованием 2-нитробензальдегида ( $n = 3, P = 0.95$ )

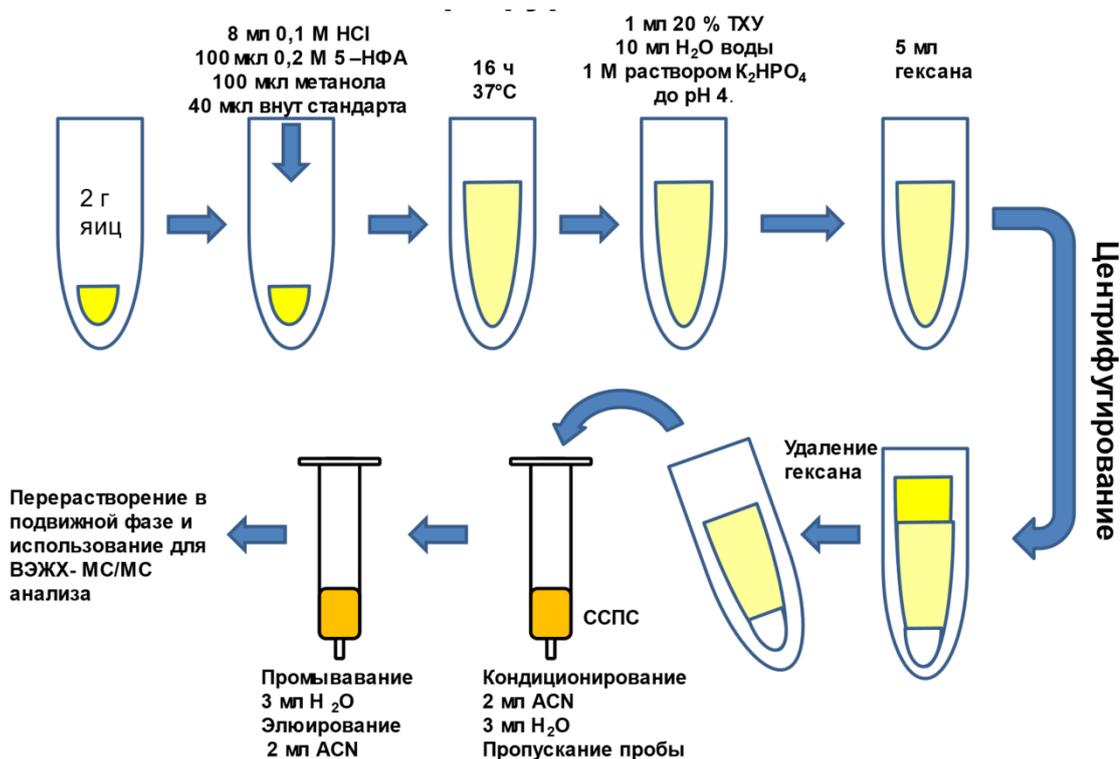
Проба	Метаболит нитрофуранов	Найдено по разработанной методике, мкг/кг	Найдено по официальной методике, мкг/кг
Мед 1	АОЗ	2.1±0.2	2.3±0.6
Мед 2	АГД	6.1±0.3	6.0±1.5
Мед 3	СЕМ	3.2±0.4	3.2±0.8

## 5.2. Применение 5-нитро-2-фуральдегида и сверхсшитого полистирола для определения метаболитов нитрофуранов в куриных яйцах<sup>5</sup>

**Анализируемые образцы.** Для разработки методики определения метаболитов нитрофуранов в куриных яйцах с применением 5-нитро-2-фуральдегида и сверхсшитого полистирола использовали образцы яиц, собранные Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией в 2021 г. в процессе государственного мониторинга пищевой продукции. Образцы хранили при 4°C в холодильнике.

**Пробоподготовка.** Схема пробоподготовки образцов яиц с 5-нитро-2-фуральдегидом и сверхсшитым полистиролом перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов приведена на рис. 23. В центрифужную пробирку емк. 50 мл вносили ( $2.00 \pm 0.02$ ) г тщательно измельченной пробы куриных яиц, добавляли 40 мкл раствора внутреннего стандарта (1000 нг/мл), 100 мкл метанола, 8 мл 0.1 М соляной кислоты и 100 мкл 0.2 М 5-НФА в метаноле для проведения гидролиза-дериватизации. Содержимое пробирки перемешивали на шейкере в течение 20 мин и помещали в термостат на 16 ч при 37°C.

<sup>5</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Мелехин А.О., Толмачева В.В., Шубина Е.Г., Дмитриенко С.Г., Аняри 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%.

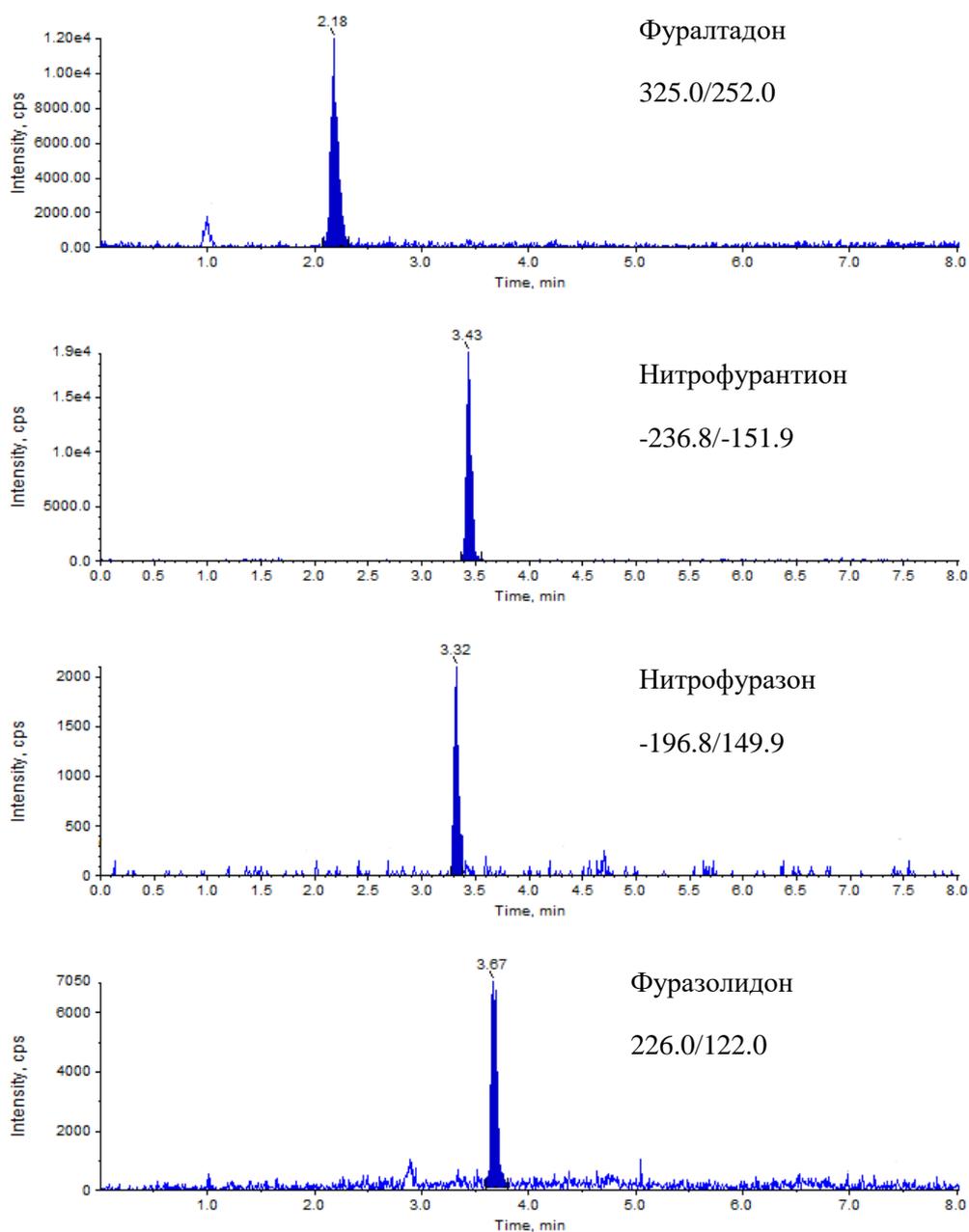


**Рис. 23.** Схема пробоподготовки образцов яиц с 5-нитро-2-фуральдегидом и сверхсшитым полистиролом перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов.

После кислотного гидролиза-derivатизации образцы охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, перемешивали на шейкере в течение 10 мин. Затем добавляли 10 мл деионизированной воды, доводили значение рН до 4 добавлением раствора К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> (1 М раствор), добавляли 5 мл гексана для обезжиривания пробы, перемешивали на шейкере в течение 10 мин и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Гексан удаляли, а водный слой очищали методом ТФЭ с помощью картриджа шприцевого типа, заполненного 30 мг ССПС (30 × 10 мм или 10 × 6 мм). Твердофазную экстракцию проводили на вакуумной установке для ТФЭ (Манифолд М6, Россия). Картридж кондиционировали 2 мл ацетонитрила и 3 мл деионизированной воды. Перед элюированием картридж промывали 3 мл деионизированной воды, а затем элюировали аналиты 2 мл ацетонитрила. Элюаты упаривали в атмосфере азота при 40°С досуха, вновь растворяли в 0.5 мл смеси подвижных фаз А и Б (80:20) и использовали для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС-анализа.

**Валидация.** Достоверность методики проверяли в соответствии с Регламентом Комиссии ЕС 2002/657. Для этого оценивали специфичность, линейность, правильность (степень выделения), пределы обнаружения и определения. Степени выделения ветеринарных препаратов оценивали с использованием образцов яиц, не содержащих остаточных количеств определяемых аналитов, с добавками метаболитов нитрофуранов в количестве 0.5, 1 и 20 мкг/кг. Для определения внутрисуточной и междневной повторяемости готовили по 5 и 15 образцов для каждого уровня концентрации, соответственно. Предварительно установили, что во всех образцах до внесения добавок отсутствовали хроматографические пики, мешающие определению нитрофуранов – продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-НФА. Как видно из табл. 15, предлагаемый метод обеспечивает не только количественное выделение аналитов из анализируемых проб (степени выделения продуктов дериватизации составляют от 95 до 106%), но и отличается хорошей воспроизводимостью ( $s_r \leq 0.13$ ). Для оценки матричного эффекта использовали коэффициенты матричных градуировок в условиях анализа экстрактов яиц, не содержащих исследуемых соединений, с добавками метаболитов нитрофуранов и коэффициенты градуировки соответствующих водных растворов с добавками метаболитов нитрофуранов.

Количественный анализ проводили с использованием матричной градуировки. Линейность градуировочных графиков оценивали на модельных образцах яиц, не содержащих остаточных количеств определяемых аналитов, с добавками метаболитов нитрофуранов на уровнях концентраций 0.5, 1, 2.5, 5, 10 и 20 мкг/кг. Коэффициенты детерминации линейной зависимости площадей хроматографических пиков препаратов от их концентрации в анализируемом образце составили не менее 0.99. На рис. 24 представлены хроматограммы по выделенным ионам, полученные для экстракта яиц с добавлением 1 мкг/кг метаболитов нитрофуранов, а в табл. 15 – основные характеристики определения метаболитов нитрофуранов в яйцах после очистки экстрактов методом ТФЭ с применением ССПС Диапак П-3. Пределы обнаружения и определения, рассчитанные по отношению аналитического сигнала (интенсивности пика) к шуму, равному 3 и 10, составили 0.04–0.2 и 0.1–0.5 мкг/кг, соответственно



**Рис. 24.** Хроматограммы по выделенным ионам, полученные для экстракта яиц с добавлением 1 мкг/кг четырех метаболитов нитрофуранов после дериватизации и очистки методом ТФЭ на ССПС Диапак П-3.

(табл. 15), что позволяет определять метаболиты нитрофуранов в яйцах на уровне, меньшем МДУ (1 мкг/кг). Показано, что дополнительная очистка гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки яиц, методом ТФЭ с использованием ССПС позволяет уменьшить матричные эффекты, для всех метаболитов они оказались ниже 10%. Правильность и воспроизводимость методики оценена методом «введено – найдено» (табл. 16).

**Таблица 15.** Основные характеристики определения метаболитов нитрофуранов в яйцах после очистки экстрактов методом ТФЭ с применением ССПС Диапак П-3

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 16.** Правильность и воспроизводимость определения метаболитов нитрофуранов в яйцах методом введено–найдено ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Метаболит	Переход для количественного анализа	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	$s_r$
АМОЗ	325.0/252.0	0	0	–
		1	1.1±0.3	0.10
		20	21±4	0.06
АОЗ	226.0/122.0	0	0	–
		1	1.1±0.3	0.11
		20	20±4	0.07
АГД	-236.8/-151.9	0	0	–
		1	1.0±0.2	0.08
		20	20±3	0.05
СЕМ	-196.8/149.9	0	0	–
		1	0.9±0.3	0.12
		20	19±4	0.07

### **5.3. Применение 5-нитро-2-фуральдегида и сверхсшитого полистирола для определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе и субпродуктах после проведения гидролиза и дериватизации при повышенной температуре<sup>6</sup>**

В основу определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе и субпродуктах положен разработанный нами способ быстрой пробоподготовки образцов куриного мяса (см. раздел 3.3). На примере образцов мяса кур-бройлеров, получавших в течение 10 дней нитрофураны, показано, что в термостатированной ультразвуковой бане время гидролиза-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 разработанного способа и официальной методики.

**Анализируемые образцы.** Для построения градуировочных зависимостей использовали образцы «чистого» куриного мяса, собранные Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (Москва, Россия) в 2021 г. в процессе государственного мониторинга пищевой продукции. Образцы хранили при температуре –20°C в холодильнике. Метаболиты нитрофуранов определяли в мясе, печени, желудках и сердце бройлеров, которые в течение 10 дней в виде инъекций получили 345, 125, 267 и 222 мкг/кг живого веса фуралтадона, фуразолидона, нитрофурантоина и нитрофуразона, соответственно. Забой проводили спустя день после введения последней дозы. Образцы мышц, печени, желудков и сердца от каждого животного собирали отдельно, замораживали и хранили при –20°C в холодильнике.

**Пробоподготовка.** Схема пробоподготовки образцов куриного мяса и субпродуктов с 5-нитро-2-фуральдегидом и сверхсшитым полистиролом перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов приведена на рис. 25.

---

<sup>6</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Мелехин А.О., Толмачева В.В., Холявская Ю.Н., Седых Е.С., Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Баиров А.Л. Быстрый гидролиз и дериватизация метаболитов нитрофуранов с новым дериватирующим агентом 5-нитро-2-фуральдегидом 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%.



**Рис. 25.** Схема пробоподготовки куриного мяса и субпродуктов с 5-нитро-2-фураляльдегидом и сверхсшитым полистиролом перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов.

В центрифужную пробирку емк. 50 мл вносили  $1.00 \pm 0.01$  г тщательно измельченной пробы куриного мяса и промывали 2 раза по 5 мл этилацетата для удаления несвязанных с белками метаболитов. После центрифугирования и удаления этилацетатной фазы к пробе добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта (1000 нг/мл), 100 мкл метанола, 5 мл 0.5 М соляной кислоты и 400 мкл 0.2 М 5-НФА в метаноле для проведения гидролиза-дериватизации. Содержимое пробирки перемешивали на шейкере в течение 20 мин и помещали в ультразвуковую баню на 20 мин при  $80^{\circ}\text{C}$ . После проведения кислотного гидролиза-дериватизации образцы охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, перемешивали на шейкере в течение 10 мин. Затем добавляли 10 мл деионизированной воды и доводили pH до 4 раствором  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . (1 М раствор). Для обезжиривания пробы к смеси добавляли 3 мл гексана, перемешивали на шейкере в течение 10 мин и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Гексан

удаляли, а водный слой очищали методом ТФЭ с помощью картриджа шприцевого типа, заполненного 30 мг ССПС (30 × 10 мм). Твердофазную экстракцию проводили на вакуумной установке для ТФЭ (Манифолд М6, Россия). Картридж кондиционировали 2 мл ацетонитрила и 3 мл деионизированной воды. Перед элюированием картридж промывали 3 мл деионизированной воды, а затем элюировали аналиты 2 мл ацетонитрила. Элюаты упаривали в атмосфере азота при 40°C досуха, перерастворяли в 0.5 мл смеси подвижных фаз А и Б (80:20) и использовали для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа. Пробоподготовку куриных печени, сердца и желудков проводили аналогичным образом.

**Сравнение результатов определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе и субпродуктах.** В выбранных условиях (0.5 М HCl; 80°C; термостатированная ультразвуковая баня, 37 кГц; 20 мин) проведено определение метаболитов нитрофуранов в четырех образцах куриного мяса и субпродуктов (печень, желудки, сердце). Полученные результаты, приведены в табл. 17. Там же представлены результаты анализа этих образцов с использованием официальной методики пробоподготовки (0.1М HCl; 40°C; водяная баня; 16 ч) и двух дериватирующих агентов – 2-НБА [166] и 5-НФА. Установлено, что результаты, полученные с использованием официальной методики пробоподготовки, не различаются между собой для двух вышеуказанных дериватирующих агентов, тогда как при использовании ускоренного метода гидролиза-дериватизации для всех типов анализируемых образцов получены более высокие значения.

Таким образом установлено, что при повышении температуры до 80°C и концентрации соляной кислоты до 0.5 М удается не только значительно сократить время гидролиза-дериватизации с 16 ч до 20 мин, но и повысить выход продуктов дериватизации на 11 – 49 %.

**Таблица 17.** Результаты определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе и субпродуктах ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Дериватизирующий агент, условия проведения гидролиза и дериватизации	Найдено, мкг/кг ( $s_T$ )			
	АМОЗ	АОЗ	АГД	СЕМ
<b>Мясо</b>				
М1: 2-НБА, 0.1 М НСl, 40°C, водяная баня, 16 ч [166]	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, 20 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, [166]	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, 20 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 [166]	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, 20 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 [166]	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)

## Глава 6. Многокомпонентное ВЭЖХ-МС/МС определение нитрофуранов и их метаболитов совместно с другими лекарственными веществами <sup>7</sup>

Одним из актуальных направлений современной аналитической химии являются многокомпонентные методы анализа (*Multiresidue methods*) позволяющие одновременно выделять, а с применением ВЭЖХ–МС/МС и определять в пищевых продуктах остатки большого количества лекарственных веществ. Несмотря на высокую селективность масс-спектрометрического детектирования, в большинстве случаев такое определение проводят после сложной пробоподготовки, направленной на выделение целевых аналитов из пищевых продуктов с использованием различных растворителей, с последующим разбавлением или очисткой полученных экстрактов для минимизации матричных эффектов [120]. Классическим методом очистки таких экстрактов является твердофазная экстракция [122]. Многокомпонентная ТФЭ большого числа лекарственных веществ различных классов, различающихся по физико-химическим свойствам, является сложной задачей. Проблемы связаны как с низкой удерживающей способностью обычно используемых обращенно-фазовых сорбентов по отношению к полярным соединениям, к которым относятся многие лекарства, так и с неколичественной десорбцией гидрофобных аналитов [117]. В связи с этим круг используемых сорбентов невелик; в последнее время в этом варианте пробоподготовки все чаще используют гидрофильно-липофильный сбалансированный обращенно-фазовый сорбент Oasis HLB [124, 125, 130, 134, 135, 140, 141]. Другие сорбенты, такие как C18 [131, 138, 139] или Strata X [184], применяют реже.

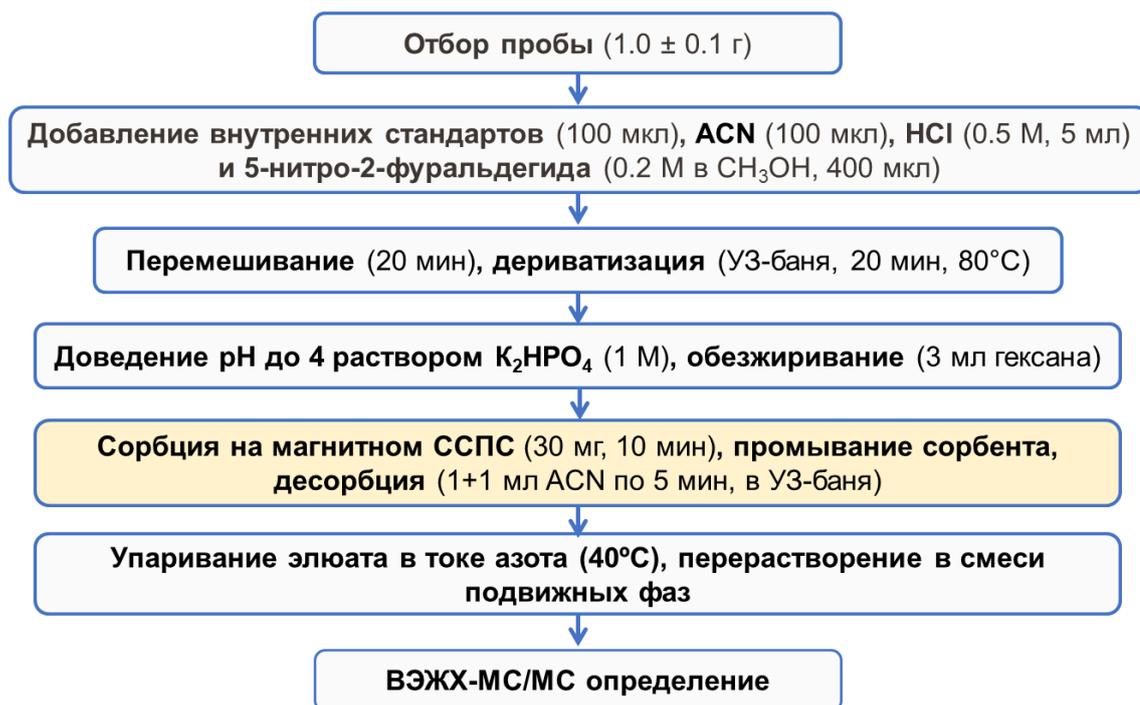
---

<sup>7</sup> При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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–тандемной масс-спектрометрии // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. №. 8. С. 708-722. (Импакт-фактор RSCI – 1.127, Q4), 60%; 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%.

Ранее нами впервые была показана возможность использования ССПС Диапак П-3 для многокомпонентного выделения 63 лекарственных веществ различных классов (сульфаниламиды, тетрациклины, хинолоны, нитроимидазолы, макролиды, нитроимидазолы,  $\beta$ -лактамы, линкозамиды и плевромутилины) из жидких экстрактов, получаемых в процессе пробоподготовки куриного мяса, перед их определением методом ВЭЖХ–МС/МС [185]. Пробоподготовка включала экстракцию аналитов буфером Макилвейна, удаление жиров экстракцией гексаном и дальнейшую очистку экстрактов на картриджах, заполненных сверхсшитым полистиролом. Полученные данные указывают на то, что по эффективности ССПС Диапак П-3 не уступает такому сорбенту как Oasis HLB; степени извлечения 63 лекарственных веществ, принадлежащих к 9 классам, составили 83 – 117% ( $s_r \leq 0.12$ ). Применение этого сорбента в процессе очистки позволило уменьшить матричные эффекты, для всех соединений они оказались ниже 20%. Экспериментальные данные, представленные в этой работе, создали основу для дальнейшего исследования аналитических возможностей ССПС и ССПС/ $Fe_3O_4$  в качестве сорбентов для многокомпонентной ТФЭ нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами в процессе пробоподготовки пищевых продуктов перед определением в них остатков этих аналитов методом ВЭЖХ–МС/МС.

### **6.1. ВЭЖХ-МС/МС определение метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами в меде, основанное на применении 5-нитро-2-фуральдегида и магнитного сверхсшитого полистирола**

В этом разделе приведены экспериментальные данные, указывающие на 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). Определение проводили после ускоренного гидролиза-derivатизации метаболитов НФ в ультразвуковой ванне при 80°C (5-НФА, 0.5М HCl, 20 мин) и очистки гидролизатов методом МТФЭ на магнитном ССПС (ССПС/ $Fe_3O_4$ ). Установлено, что в этих условиях термостабильны не только метаболиты нитрофуранов и продукты их derivатизации (соответствующие нитрофураны), но и соединения из



**Рис. 26.** Схема пробоподготовки образцов меда с 5-нитро-2-фуральдегидом и магнитным сверхсшитым полистиролом перед ВЭЖХ-МС/МС определением в них метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами.

классов хинолонов, амфениколов и нитроимидазолов. Напротив, соединения из классов сульфаниламидов, тетрациклинов и  $\beta$ -лактамов в процессе такой пробоподготовки частично разрушаются.

**Анализируемые образцы.** Все использованные пробы меда были собраны Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (Москва, Россия) осенью 2021 года.

**Аналиты.** В качестве аналитов выбраны лекарственные вещества, принадлежащие к разным классам, такие как метаболиты нитрофуранов (4), хинолоны (14), амфениколы (3) и нитроимидазолы (10).

**Пробоподготовка.** Схема пробоподготовки образцов меда перед ВЭЖХ-МС/МС определением в нем метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами приведена на рис. 26. В центрифужные пробирки емкостью 15 мл вносили  $1.00 \pm 0.01$  г тщательно гомогенизированной пробе добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта (1000 нг/мл), 100 мкл метанола,

5 мл 0.5 М соляной кислоты и 400 мкл 0.2 М 5-НФА в метаноле для проведения гидролиза-derivатизации. Содержимое пробирки перемешивали на шейкере в течение 20 мин и помещали в ультразвуковую баню на 20 мин при 80°C. После проведения кислотного гидролиза-derivатизации образцы охлаждали до комнатной температуры и перемешивали на шейкере в течение 10 мин. Затем добавляли 10 мл деионизованной воды, доводили рН до 4 раствором  $K_2HPO_4$  (1 М раствор), добавляли ССПС/ $Fe_3O_4$ , активированный ацетонитрилом, и проводили МТФЭ в течение 20 мин. Магнитный сорбент отделяли магнитной сепарацией и дважды промывали 5 мл дистиллированной воды. Десорбцию проводили последовательно двумя порциями ацетонитрила по 1 мл в течение 5 мин в ультразвуковой ванне. Элюат упаривали в атмосфере азота досуха, перерастворяли в 1.0 мл смеси подвижных фаз А и Б (95:5) и использовали для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

**Условия хроматографического разделения и детектирования.** 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: 0–10.5 мин линейное увеличение от 5 до 95% Б; 10.5–11.5 мин 95% Б; 11.5–11.7 мин линейное уменьшение до 5% Б; 11.7–12.0 мин 5% Б. Скорость потока составляла 0.4 мл/мин. Температура колонки и автосамплера поддерживалась во время работы на уровне 40 и 15°C, соответственно, объем вводимой пробы составлял 5 мкл. Тройной квадрупольный масс-спектрометр (SCIEX Triple Quad™ 5500) был настроен на сбор данных в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). Установлены следующие оптимальные значения параметров: напряжение на распыляющем капилляре – 5500 В; температура испарителя – 550°C; в качестве газа завесы и газа в ячейке использовали азот; давление газа соударений 10 фунтов на квадратный дюйм, давление газа завесы – 35 фунтов на квадратный дюйм; давление осушающего и распыляющего газов – 50 фунтов на квадратный дюйм; входной потенциал – 10 В.

Время удерживания и параметры ММР при определении метаболитов нитрофуранов и других ветеринарных лекарств методом ВЭЖХ-МС/МС приведены в табл. 18. Параметры ММР для внутренних стандартов приведены в табл. 19.

**Таблица 18.** Время удерживания и параметры ММР при определении нитрофуранов и других лекарственных веществ методом ВЭЖХ-МС/МС

Аналит	Внутренний стандарт	$t_R$ , мин	$Q_1 m/z$	$Q_3 m/z$	ПД, В*	ЭС, ЭВ**
Метаболиты нитрофуранов						
АОЗ (Фуразолидон)	АОЗ-D <sub>4</sub> (Фуразолидон-D <sub>4</sub> )	4.96	226.0(+)	122.0/113.0	60/60	31/18
АМОЗ (Фуралтадон)	АМОЗ-D <sub>5</sub> (Фуралтадон-D <sub>5</sub> )	3.36	325.0(+)	252.0/281.0	60/60	25/19
АГД (Нитрофурантион)	АГД- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> (Нитрофурантион- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> )	4.32	236.8(-)	151.9/123.6	-100/-100	-16/-21
СЕМ (Нитрофуразон)	СЕМ <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub> (Нитрофуразон- <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )	4.63	196.8(-)	149.9/123.8	-100/-100	-13/-14
Амфениколы						
Хлорамфеникол	Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	6.33	321.0(-)	152.0/257.0	-100/-100	-23/-15
Флорфеникол	Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	5.63	356.1(-)	185.1/119.1	-100/-100	-27/-45
Тиамфеникол	Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	4.60	353.9(-)	290.0/184.9	-100/-100	-19/-30
Хинолоны						
Ципрофлоксацин	Ципрофлоксацин-D <sub>8</sub>	4.57	332.1(+)	231.0/314.2	81/40	49/35
Данолоксацин	Дифлоксацин-D <sub>3</sub>	4.72	358.0(+)	340.2/82.1	42/42	35/67
Дифлоксацин	Дифлоксацин-D <sub>3</sub>	5.10	400.3(+)	356.2/299.1	121/121	29/41
Ломефлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	4.72	352.0(+)	265.1/308.1	86/86	33/25
Энрофлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	4.80	360.1(+)	342.2/316.1	45/45	31/27
Марбофлоксацин	Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	4.26	362.9(+)	345.1/320.1	21/21	29/23
Налидиксовая кислота	Налидиксовая кислота-D <sub>5</sub>	7.39	233.1(+)	214.9/187.0	40/40	19/33
Норфлоксацин	Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	4.47	320.1(+)	301.9/276.2	66/66	27/23
Офлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	4.45	362.1(+)	318.1/261.0	86/86	27/37
Оксалиновая кислота	Оксалиновая кислота-D <sub>5</sub>	6.36	261.9(+)	216.0/160.0	51/51	39/51
Пефлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	4.48	334.0(+)	233.0/290.0	100/100	46/12
Пипемидовая кислота	Оксалиновая кислота-D <sub>5</sub>	3.96	304.0(+)	286.0/217.0	61/61	25/29
Флюмеквин	Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	7.66	262.0(+)	202.0/174.1	61/61	45/55

Сарафлоксацин	Сарафлоксацин-D <sub>8</sub>	5.12	386.1(+)	342.1/299.1	96/96	27/37
Нитроимидазолы						
Метронидазол	Гидрокси метронидазол-D <sub>2</sub>	3.16	172.1(+)	128.1/82.0	100/100	20/30
Ипронидазол	Ипронидазол-D <sub>3</sub>	5.77	170.1(+)	124.1/109.1	103/66	25/33
Гидрокси метилметилнитроимидазол	Гидрокси метилметилнитроимидазол-D <sub>3</sub>	3.27	158.1(+)	140.1/55.0	100/80	20/29
Гидрокси метронидазол	Гидрокси метронидазол-D <sub>2</sub>	2.92	188.1(+)	126.1/123.1	90/60	19/17
Орнидазол	Ипронидазол-D <sub>3</sub>	4.96	220.2(+)	128.2/82.1	100/100	23/39
Ронидазол	Ронидазол-D <sub>3</sub>	3.69	201.1(+)	140.1/110.1	40/50	15/21
Тернидазол	Ронидазол-D <sub>3</sub>	3.66	186.1(+)	128.1/82.1	90/90	27/35
Диметронидазол	Диметридазол-D <sub>3</sub>	3.36	142.1(+)	81.1/96.1	50/90	30/22
Тинидазол	Ронидазол-D <sub>3</sub>	4.35	248.1(+)	121.1/93.0	90/100	22/25
Гидрокси ипронидазол	Гидрокси ипронидазол-D <sub>3</sub>	5.02	186.1(+)	168.1/122.1	100/70	17/27

\*Потенциал декластеризации; \*\*Энергия соударений

**Таблица 19.** Основные характеристики внутренних стандартов, используемых для определения лекарственных веществ с применением метода мониторинга множественных реакций

Внутренний стандарт	$t_R$ , мин	$Q_1 m/z$	$Q_3 m/z$	ПД, В*	ЭС, эВ**
АОЗ-D <sub>4</sub> (Фуразолидон-D <sub>4</sub> )	4.94	230.0(+)	117.0	60	19
АМОЗ-D <sub>5</sub> (Фуралгадон-D <sub>5</sub> )	3.39	330.0(+)	286.0	60	19
АГД- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> (Нитрофурантион- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> )	4.38	239.8(-)	151.9	-100	-16
СЕМ <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub> (Нитрофуразон- <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )	4.68	199.8(-)	152.9	-100	-14
Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	6.36	326.0(-)	157.0	-100	-23
Ципрофлоксацин-D <sub>8</sub>	4.62	339.9(+)	296.1	91	25
Дифлоксацин-D <sub>3</sub>	4.79	403.0(+)	359.0	86	27
Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	4.74	364.9(+)	245.0	30	37
Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	4.22	325.0(+)	281.1	76	23
Налидиксовая кислота-D <sub>5</sub>	7.45	237.9(+)	220.0	36	21
Оксолиновая кислота-D <sub>5</sub>	6.43	266.9(+)	249.0	46	23
Сарафлоксацин-D <sub>8</sub>	5.14	394.0(+)	350.0	81	27
Гидроксиметронидазол-D <sub>2</sub>	2.95	190.1(+)	125.1	90	19
Ипронидазол-D <sub>3</sub>	5.82	173.1(+)	127.1	110	25
Гидроксиметилметилнитроимидазол-D <sub>3</sub>	3.29	161.1(+)	143.1	70	20
Ронидазол-D <sub>3</sub>	3.72	204.0(+)	143.1	45	15
Диметридазол-D <sub>3</sub>	3.37	145.1(+)	99.1	70	23
Гидроксиипронидазол-D <sub>3</sub>	5.03	189.1(+)	171.1	70	18

\*Потенциал декластеризации; \*\*Энергия соударений

**Валидация.** Количественный анализ проводили с использованием матричной градуировки. Основные характеристики определения метаболитов нитрофуранов совместно с другими лекарственными соединениями в меде после очистки гидролизатов методом МТФЭ с применением ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> приведены в табл. 20.

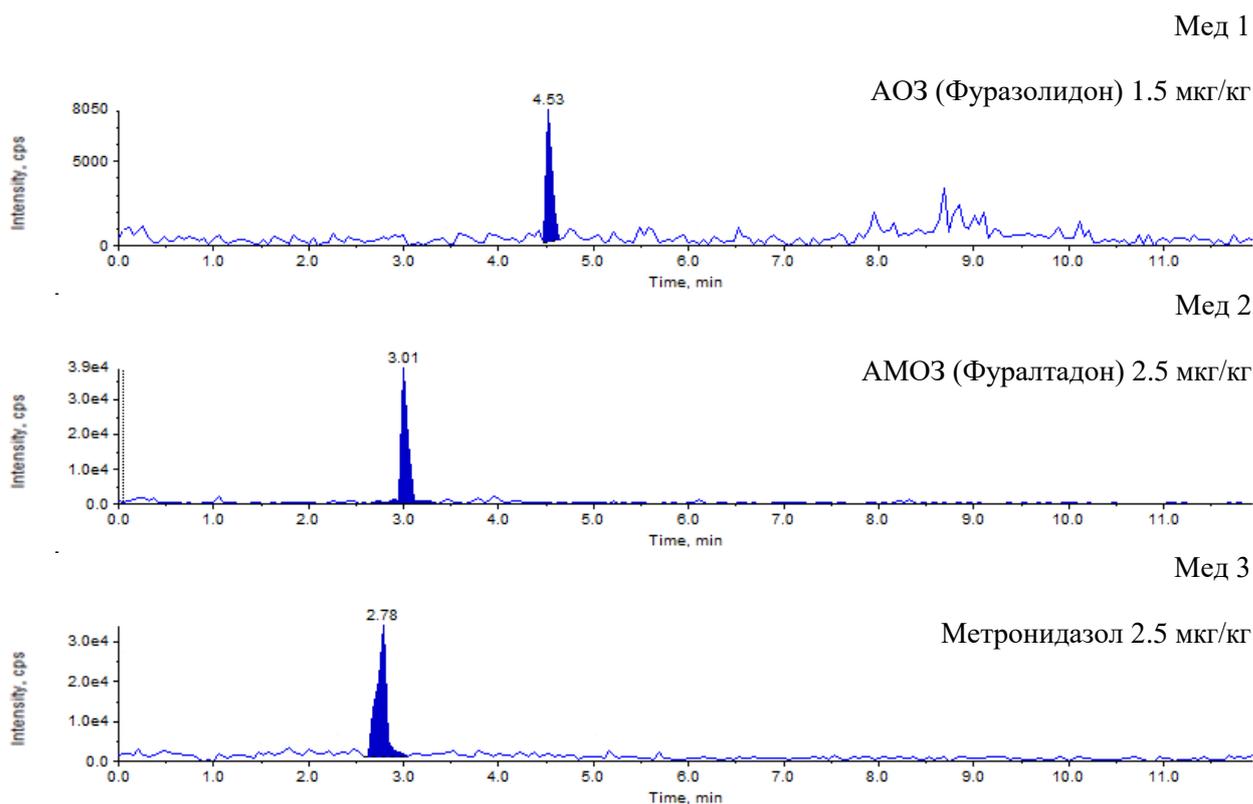
На трех уровнях концентраций (1, 5 и 200 мкг/кг) показано, что методом МТФЭ при использовании 50 мг ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> можно извлечь из 1 г меда: 98–103% метаболитов нитрофуранов (4), 83–111% хинолонов (14), 86–103% амфениколов (3), 97–118% нитроимидазолов (10) (в скобках указано число соединений). Значения относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ) 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.

**Анализ реальных объектов.** Для демонстрации работоспособности разработанной методики использовали три положительные пробы меда, в которых при мониторинге пищевых продуктов были обнаружены лекарственные вещества. Хроматограммы положительных образцов меда, приведены на рис. 27. Результаты определения лекарственных веществ в меде приведены в табл. 21. Сравнение полученных результатов с результатами, полученными по официальным методикам для определения различных групп веществ, подтверждает правильность разработанной методики.

**Таблица 20.** Основные характеристики определения лекарственных веществ в образцах меда после очистки экстрактов методом МТФЭ с ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Аналит	Содержание, мкг/кг	Степень выделения, %	Внутридневная повторяемость ( <i>s<sub>r</sub></i> , <i>n</i> = 5)	Междневная повторяемость ( <i>s<sub>r</sub></i> , <i>n</i> = 15)	МЭ, %	<i>s</i> <sub>опр</sub> , мкг/кг
<b>Метаболиты нитрофуранов</b>						
АГД (Нитрофурантион)	1/5/200	101/100/102	0.09/0.07/0.06	0.08/0.07/0.06	101	0.3
АМОЗ (Фуралтадон)	1/5/200	98/99/100	0.10/0.08/0.05	0.09/0.08/0.04	100	0.3
АОЗ (Фуразолидон)	1/5/200	99/98/101	0.14/0.09/0.06	0.12/0.08/0.05	101	0.3
СЕМ (Нитрофуразон)	1/5/200	103/102/103	0.15/0.14/0.09	0.13/0.12/0.08	101	1
<b>Амфениколы</b>						
Хлорамфеникол	1/5/200	101/102/100	0.08/0.07/0.05	0.08/0.05/0.04	100	0.3
Флорфеникол	1/5/200	103/102/101	0.11/0.08/0.07	0.09/0.07/0.06	97	0.3
Тиамфеникол	1/5/200	86/88/87	0.15/0.12/0.08	0.13/0.13/0.07	83	1
<b>Хинолоны</b>						
Ципрофлоксацин	1/5/200	102/101/102	0.09/0.07/0.04	0.09/0.06/0.04	98	1
Данофлоксацин	1/5/200	105/104/106	0.14/0.15/0.06	0.12/0.11/0.05	105	1
Дифлоксацин	1/5/200	100/101/99	0.07/0.07/0.05	0.08/0.06/0.04	99	0.3
Ломефлоксацин	1/5/200	102/103/104	0.11/0.08/0.06	0.10/0.09/0.05	100	1
Энрофлоксацин	1/5/200	102/100/99	0.11/0.09/0.06	0.09/0.09/0.05	98	1
Марбофлоксацин	1/5/200	105/106/108	0.14/0.13/0.08	0.12/0.09/0.07	86	1
Налидиксовая кислота	1/5/200	98/100/99	0.09/0.08/0.05	0.08/0.06/0.04	101	1
Норфлоксацин	1/5/200	99/99/99	0.13/0.08/0.05	0.11/0.08/0.06	98	1
Офлоксацин	1/5/200	105/106/105	0.12/0.08/0.06	0.11/0.06/0.04	93	0.3
Оксалиновая кислота	1/5/200	99/98/100	0.15/0.11/0.08	0.13/0.10/0.07	101	1
Пефлоксацин	1/5/200	110/108/111	0.14/0.13/0.09	0.12/0.11/0.06	94	1

Пипемидовая кислота	1/5/200	86/83/84	0.16/0.15/0.12	0.15/0.12/0.09	110	1
Флюмеквин	1/5/200	105/103/104	0.12/0.09/0.05	0.09/0.08/0.06	88	1
Сарафлоксацин	1/5/200	98/99/98	0.09/0.08/0.05	0.08/0.06/0.04	99	1
Нитроимидазолы						
Метронидазол	1/5/200	117/115/118	0.10/0.07/0.06	0.09/0.07/0.06	89	1
Ипронидазол	1/5/200	98/102/100	0.10/0.08/0.04	0.09/0.08/0.04	101	0.3
Гидроксиметилметилнитроимидазол	1/5/200	100/101/102	0.16/0.15/0.07	0.15/0.13/0.07	98	1
Гидроксиметронидазол	1/5/200	101/100/98	0.15/0.13/0.08	0.14/0.12/0.07	100	1
Орнидазол	1/5/200	105/108/106	0.09/0.08/0.05	0.08/0.06/0.04	104	0.3
Ронидазол	1/5/200	97/98/100	0.10/0.08/0.05	0.10/0.09/0.05	98	1
Тернидазол	1/5/200	108/110/111	0.09/0.06/0.04	0.08/0.05/0.04	102	1
Диметронидазол	1/5/200	101/100/99	0.15/0.12/0.07	0.14/0.15/0.05	99	0.3
Тинидазол	1/5/200	105/108/109	0.09/0.08/0.05	0.08/0.05/0.05	103	0.3
Гидроксиипронидазол	1/5/200	100/101/101	0.09/0.07/0.04	0.09/0.06/0.04	99	1



**Рис. 27.** Хроматограммы по выделенным ионам для загрязненных проб меда после ускоренной дериватизации и очистки методом МТФЭ на магнитном сверхсшитом полистироле.

**Таблица 21.** 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 разработанной методикой, мкг/кг	Найдено по официальной методике, мкг/кг
Мед №1	АОЗ (Фуразолидон)	$1.5 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.5$ [166]
Мед №2	АМОЗ (Фуралтадон)	$2.5 \pm 0.3$	$2.7 \pm 1.0$ [166]
Мед №3	Метронидазол	$2.5 \pm 0.3$	$2.6 \pm 1.7$ [196]

## **6.2. Применение магнитного сверхсшитого полистирола для многокомпонентной твердофазной экстракции нитрофуранов совместно с другими лекарственными веществами при их ВЭЖХ–МС/МС определении в молоке**

Основные проблемы, возникающие при определении ветеринарных лекарств в молоке, связаны, с одной стороны, с низким содержанием этих соединений, а с другой – со сложным составом молока. В связи с этим поиск новых подходов к определению в молоке большого количества ветеринарных лекарств, относящихся к разным классам и проявляющих различные химические свойства (липофильность, гидрофильность, кислотно-основные характеристики и др.), при сохранении простоты процедуры пробоподготовки является актуальной задачей.

Молоко представляет собой сложную матрицу с высоким содержанием лактозы, белков и жиров, которые могут связывать искомые аналиты и мешать их выделению перед ВЭЖХ–МС/МС определением. Существует несколько подходов к многокомпонентному определению лекарственных соединений в молоке. Самый простой подход, позволяющий проводить экспресс-скрининг молока на содержание ветеринарных лекарств, заключается в разбавлении проб молока такими растворителями, как ацетонитрил или метанол, с последующим центрифугированием и выпариванием полученных экстрактов [126, 132]. К недостаткам такого подхода можно отнести то, что экстракты, полученные таким способом, могут содержать соэкстрагированные матричные соединения, что может вызвать серьезные помехи при последующем масс-спектрометрическом определении. Частично эти недостатки можно устранить, применяя ультрафильтрацию [133, 186] или метод QuEChERS [133, 187]. Согласно данным, приведенным в работах [124, 130, 133, 134], лучшим способом очистки образцов молока при многокомпонентном определении лекарств является ТФЭ.

Литературных данных по многокомпонентной магнитной ТФЭ немного. В основном МТФЭ применяли для выделения из молока отдельных классов лекарств: сульфаниламидов [188, 189], тетрациклинов [190, 191], фторхинолонов [192] и аминогликозидов [193]. Нам известна всего одна работа, в которой магнитную ТФЭ применили для одновременного выделения из молока 19 лекарств, таких как  $\beta$ -лактамы, аминогликозиды и макролиды [127]. Как правило, магнитную ТФЭ проводят после предварительной пробоподготовки молока, включающей

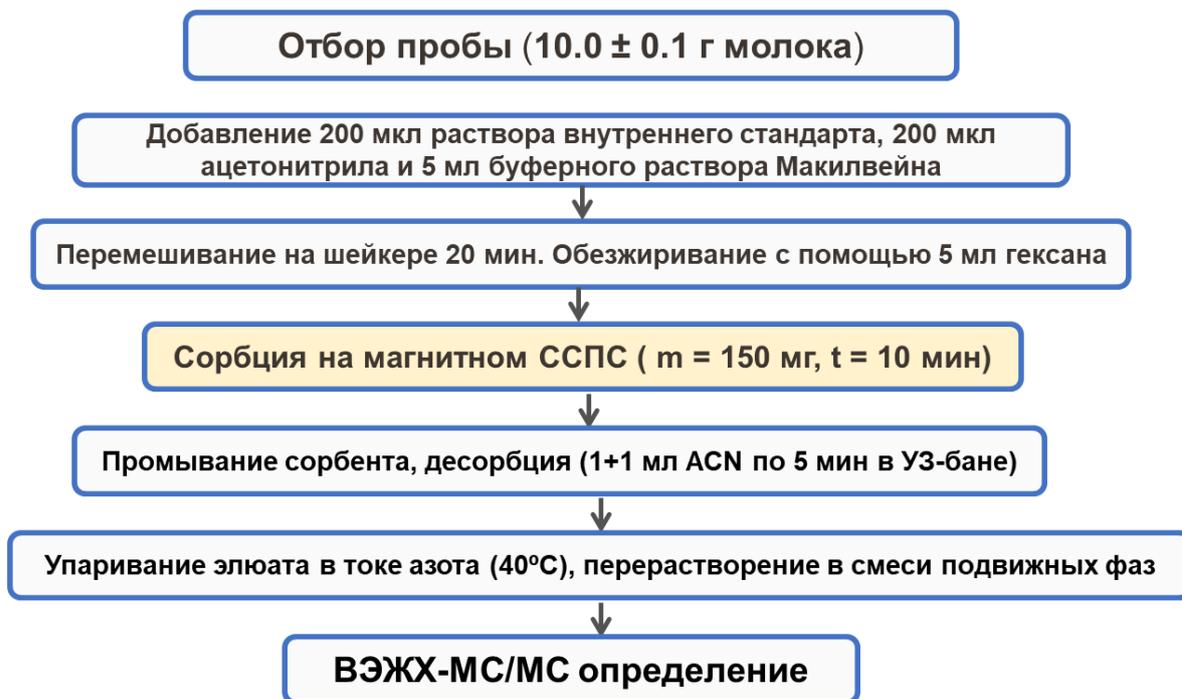
обезжиривание и депротеинизацию. Отсутствуют работы по многокомпонентному определению в молоке нитрофуранов совместно с другими ветеринарными лекарствами. Между тем, согласно данным, приведенным в работе [194] в молоке и молочных продуктах предпочтительней определять нитрофураны, а не их метаболиты. Авторы этой работы доказали, что в молоке коров, которых лечили нитрофуразоном (*фурацилином*), этот нитрофуран не метаболирует, он устойчив к нагреванию при температуре пастеризации жидкого молока и не подвергается никаким превращениям при хранении молока до нескольких месяцев.

В настоящем разделе изучена возможность применения ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> для выделения из молока нитрофуранов совместно с другими лекарственными соединениями, принадлежащими к 16 классам (всего 132 соединения). Ранее в нашей научной группе было показано, что использование ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в методе МТФЭ позволяет значительно упростить пробоподготовку молока при определении в нем сульфаниламидов за счет исключения стадии отделения белков [163, 182].

**Анализируемые образцы.** Все использованные пробы молока были собраны Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (Москва, Россия) весной 2021 года.

**Аналиты.** В качестве аналитов выбраны 132 лекарственных веществ, принадлежащих к разным классам, такие как нитрофураны (4), сульфаниламиды (14), β-лактамы (13), тетрациклины (4), хинолоны (14), макролиды (8), нитроимидазолы (10), амфениколы (3), линкозамиды (3), плевромугилины (2), макроциклические лактоны (4), хиноксалиновые антибиотики (3), бензимидазолы (21), антигельминтные средства (12), кокцидиостатики (12) и 5 соединений, принадлежащих к другим классам (табл. 22).

**Пробоподготовка.** Схема пробоподготовки образцов молока перед одновременным ВЭЖХ-МС/МС определением в нем 132 лекарственных веществ приведена на рис. 28. Гомогенизированные контрольные образцы (10.00 ± 0.01 г) взвешивали в полипропиленовых центрифужных пробирках объемом 50 мл и добавляли к ним по 200 мкл соответствующих стандартных растворов, содержащих 0.05, 0,2, 1, 2,5, 5, 10, 20 мкг/кг смеси лекарств (для построения градуировочных зависимостей) или 200 мкл ацетонитрила для анализируемых образцов.



**Рис. 28.** Схема пробоподготовки образцов молока перед одновременным ВЭЖХ-МС/МС определением в нем 132 лекарственных веществ.

Затем во все пробы добавляли по 100 мкл рабочей смеси внутренних стандартов до получения эквивалентных концентраций в молоке 10 мкг/кг и по 5 мл буферного раствора Макилвейна. Полученную смесь тщательно перемешивали на шейкере в течение 20 мин. После этого образцы обезжиривали с помощью 5 мл гексана, путем встряхивания в течение 1 мин, центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин для удаления гексанового слоя. Экстракты переносили в пробирки, содержащие 150±1 мг ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, активированного 500 мкл ацетонитрила, и проводили МТФЭ в течение 10 мин. Магнитный сорбент отделяли магнитной сепарацией и дважды промывали 5 мл дистиллированной воды. Десорбцию проводили последовательно двумя порциями ацетонитрила по 1 мл в течение 5 мин в ультразвуковой ванне. Элюат упаривали в атмосфере азота досуха, перерастворяли в 1.0 мл смеси подвижных фаз А и Б (95:5) и использовали для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

**ВЭЖХ–МС/МС анализ.** Для хроматографического разделения использовали систему ExionLC, оснащенную бинарным насосом и автоматическим пробоотборником, которое проводили с использованием колонки Acclaim™ 120 C18 (2.1 мм × 100 мм, 3 мкм). 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: 0-1 мин: 5% Б; 1-22 мин: увеличение с 5% до 95% Б; 22-23.5 мин: возврат к 5% Б; 23.5-25 мин: 5% Б. Скорость потока подвижной фазы 0.4 мл/мин. Объем инъекции составлял 10 мкл. Температура колонки и автосемплера поддерживалась во время работы на уровне 40 и 15°C соответственно, объем вводимой пробы 10 мкл.

Тройной квадрупольный масс-спектрометр SCIEX Triple Quad™ 5500 (AB Sciex, Сингапур) был сконфигурирован для сбора данных в режиме мониторинга множественных реакций. Задавались следующие оптимальные параметры: напряжение на распыляющем капилляре 5500 В; температура инжектора 550°C; в качестве газа-завесы и газа столкновений использовался азот; давление газа при столкновении 10 фунтов на квадратный дюйм; давление газа завесы 35 psi; давление газа для сушки и распыления 50 psi; входной потенциал 10 В. Условия мониторинга множественных реакций, потенциал декластеризации (ПД) и энергия столкновения (ЭС) были оптимизированы для каждого аналита путем прямого ввода растворов стандартов ветеринарных лекарств, приготовленных в подвижной фазе.

Для селективного обнаружения и количественного определения ветеринарных лекарств в молоке использовали метод ММР. Результаты показали, что почти все аналиты продуцировали большое количество ионов  $[M+H]^+$  в режиме ESI+. Бацитрацин образует трехзарядный положительный ион с добавлением трех протонов ( $[M+3H]^{3+}$ ). Ивермектин образует положительный ион с добавлением аммония ( $[M+NH_4]^+$ ). Хлорамфеникол, флорфеникол, тиамфеникол, 4,4'-динитрокарбанилид, диклазурил, клорсулон, нитроксинил, аминотриклабендазол, сульфоксид триклабендазола, оксиклозанид, триклабендазол, никлозамид, рафоксанид, нитрофурантоин, нитрофуразон и клозантел образуют отрицательные ионы ( $[M-H]^-$ ) в режиме ESI-. Для каждого аналита были выбраны два интенсивных иона в качестве дочерних ионов, из которых наиболее интенсивный переход ММР был выбран для количественной оценки, а второй - для подтверждения (табл. 22, 23).

**Таблица 22.** Время удерживания и параметры ММР при определении нитрофуранов и других ветеринарных лекарств методом ВЭЖХ-МС/МС

Аналит	Внутренний стандарт	Молекулярный ион	$t_R$ , мин	$Q_1$ m/z	$Q_3$ m/z	ПД*, В	ЭС**, эВ
<b>Нитрофураны(4)</b>							
Фуралтадон	Фуралтадон-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	3.92	325.0(+)	252.0/281.0	60/60	25/19
Фуразолидон	Фуразолидон-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.8	226.0(+)	122.0/113.0	60/60	18/19
Нитрофурантион	Нитрофурантион- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	6.39	236.8(-)	-151.9/-123.8	-100/-100	-17/-21
Нитрофуразон	Нитрофуразон- <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	6.16	196.8(-)	-149.9/-123.8	-100/-100	-13/-14
<b>Сульфаниламиды(14)</b>							
Сульфаклорпиридазин	Сульфаметазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.62	284.9(+)/ 286.9(+)	156.1	50/50	21/21
Сульфаниламид	Сульфаметазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.65	173.1(+)	156.1/92.1	10/60	12/25
Сульфаметоксипиридазин	Сульфаметоксазол-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.81	295.1(+)	156.1/108.1	50/50	25/35
Сульфагуанидин	Сульфадиазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.44	215.1(+)	156.1/92.0	50/50	20/37
Сульфаметоксазол	Сульфаметоксазол-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.03	254.1(+)	156.1/108.1	50/50	21/23
Сульфеэтоксипиридазин	Сульфаметоксазол-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.66	295.1(+)	156.1/140.1	61/61	47/47
Сульфамоксол	Сульфаметазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.18	268.1(+)	156.1/113.1	50/50	21/23
Сульфадиазин	Сульфадиазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.33	251.1(+)	156.1/108.1	50/50	21/29
Сульфамеразин	Сульфадиазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.36	265.1(+)	156.1/172.1	50/50	23/21

Сульфаметазин	Сульфаметазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.39	279.1(+)	186.1/124.1	50/50	23/29
Сульфацидин	Сульфацидин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.95	250.1(+)	156.1/184.1	50/50	21/25
Сульфахиноксалин	Сульфацидин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10.11	301.1(+)	156.1/108.1	66/66	23/35
Сульфадиметоксин	Сульфатиазол- D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.89	311.1(+)	156.1/245.1	50/50	27/27
Сульфатиазол	Сульфатиазол- D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.95	256.1(+)	156.1/108.1	50/50	19/33
<b>β-лактамы(13)</b>							
Оксациллин	Бензилпенициллин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	13.6	400.1(+)	160.1/243.1	71/71	17/17
Клоксациллин	Бензилпенициллин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14.42	390.1(+)	160.0/277.0	81/81	19/19
Бензилпенициллин	Бензилпенициллин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	12.15	333.0(+)	176.0/160.0	60/76	25/17
Диклоксациллин	Бензилпенициллин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	15.27	468.0(+)	160.0/310.9	81/81	25/23
Феноксиметилпенициллин	Бензилпенициллин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	13.2	349.0(+)	160.1/114.0	66/66	21/43
Цефалониум	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.97	458.8(+)	152.2/337.1	40/40	50/19
Цефоперазон	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.65	646.2(+)	143.1/290.1	40/40	46/32
Цефепим	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.96	424.0(+)	292.1/152.2	40/40	23/45
Цефотаксим	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.8	456.0(+)	125.2/277.1	40/40	67/21
Цефподоксим	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.38	428.0(+)	285.0/156.0	40/40	24/37
Цефалор	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.97	368.0(+)	174.1/106.0	131/131	19/41
Цефетамет	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.41	398.4(+)	241.0/126.0	40/60	22/30
Цефтиофул	Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10.09	524.0(+)	241.1/368.0	40/40	25/38

<b>Тетрациклины(4)</b>							
Тетрациклин	Демеклоциклин	[M+H] <sup>+</sup>	6.8	445.1(+)	428.1/410.0	60/60	30/27
Окситетрациклин	Демеклоциклин	[M+H] <sup>+</sup>	6.59	461.1(+)	426.1/444.1	60/60	30/22
Доксициклин	Демеклоциклин	[M+H] <sup>+</sup>	9.66	445.1(+)	428.0/410.0	60/60	26/30
Хлортетрациклин	Демеклоциклин	[M+H] <sup>+</sup>	8.64	479.1(+)	444.1/462.1	60/60	30/25
<b>Хинолоны(14)</b>							
Данофлоксацин	Дифлоксацин-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.21	358.1(+)	340.2/82.1	42/42	35/67
Энрофлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.21	360.2(+)	342.2/316.1	45/45	31/27
Марбофлоксацин	Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.18	363.1(+)	345.1/320.1	21/21	29/23
Флюмеквин	Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	12.36	262.1(+)	202.0/174.1	61/61	45/55
Ломефлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.21	352.2(+)	265.1/308.1	86/86	33/25
Сарафлоксацин	Сарафлоксацин-D <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.83	386.2(+)	342.1/299.1	96/96	27/37
Дифлоксацин	Дифлоксацин-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.84	400.2(+)	356.2/299.1	121/121	29/41
Ципрофлоксацин	Ципрофлоксацин-D <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.81	332.0(+)	231.0/324.2	81/40	49/35
Налидиксовая кислота	Налидиксовая кислота-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.74	233.1(+)	215.0/187.0	40/40	19/33
Норфлоксацин	Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.59	320.1(+)	302.1/276.0	66/66	27/23
Оксолиновая кислота	Оксолиновая кислота-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.89	262.1(+)	216.0/160.0	51/51	39/51
Пипемидовая кислота	Оксолиновая кислота-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.57	304.2(+)	286.1/217.0	61/61	25/29
Офлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.59	362.1(+)	318.1/261.0	86/86	27/37

Пефлоксацин	Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.68	334.0(+)	316.0/290.0	100/100	15/12
<b>Макролиды(8)</b>							
Тилвазолин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	15.45	1042.6(+)	229.1/174.3	86/86	55/47
Тулатромицин	Азитромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.62	806.6(+)	577.4/158	46/46	35/55
Спирамицин	Азитромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.06	422.3(+)	100.9/142.1	60/60	19/27
Кларитромицин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14.01	748.5(+)	158.0/590.4	61/61	41/27
Тилозин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	12.56	916.6(+)	174.2/772.4	39/39	55/41
Тилмикозин	Азитромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10.71	869.6(+)	174.3/696.5	37/37	61/55
Эритромицин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	12.15	734.4(+)	158.1/576.4	60/60	43/25
Азитромицин	Азитромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.27	749.7(+)	591.4/573.5	100/100	43/50
<b>Нитроимидазолы(10)</b>							
Диметридазол	Диметридазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	3.5	142.1(+)	81.1/96.1	50/90	30/22
Ронидазол	Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.33	201.1(+)	140.1/110.1	40/50	15/21
Ипрпонидазол	Ипрпонидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.03	170.1(+)	124.1/109.1	103/66	25/33
Гидроксиипронидазол	Гидроксиипронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.01	186.1(+)	168.1/122.1	100/70	17/28
Гидроксиметронидазол	Гидроксиметронидазол-D <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	2.89	188.1(+)	125.1/123.1	90/60	19/17
Гидроксиметилметилнитроимидазол	Гидроксиметилметилнитроимидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	3.32	158.1(+)	140.1/55	100/80	20/29
Тернидазол	Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.33	186.1(+)	128.1/82.1	90/90	27/35
Тинидазол	Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.77	248.1(+)	121.1/93.0	90/100	22/25

Метронидазол	Гидроксиметронидазол-D <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	3.3	172.1(+)	128.1/82.1	100/100	20/30
Орнидазол	Ипронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.59	220.2(+)	128.2/81.1	100/100	23/39
<b>Амфениколы(3)</b>							
Хлорамфеникол	Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	9.66	321.0(-)	152.0/257.0	-100/-100	-23/-15
Флорфеникол	Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	8.23	356.1(-)	-185.1/-119.1	-100/-100	-27/-45
Тиамфеникол	Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	6.37	353.9(-)	-290.0/-184.9	-100/-100	-19/-30
<b>Линкомицины(3)</b>							
Клиндамицин	Клиндамицин-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.89	425.2(+)	126.1/377.2	60/60	36/27
Линкомицин	Клиндамицин-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.56	407.3(+)	126.1/359.3	35/35	37/25
Пирлимицин	Клиндамицин-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.47	411.2(+)	112.1/363.3	93/93	37/23
<b>Плевомутилины(2)</b>							
Тиамулин	Валнемулин-D <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	12.57	494.3(+)	192.2/119.0	43/43	31/53
Валнемулин	Валнемулин-D <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14.21	565.4(+)	263.1/147.1	37/37	21/53
<b>Макроциклические лактоны(4)</b>							
Эмамектин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	18.54	886.4(+)	158.0/302.0	100/100	44/41
Моксидектин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	22.66	640.5(+)	528.1/498.2	100/100	15/18
Эприномектин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	21.83	914.5(+)	185.9/298.1	100/100	25/30
Ивермектин	Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	23.48	892.5(+)	569.2/551.3	100/100	20/28
<b>Хиноксалиновые антибиотики(3)</b>							

Хиноксалин-2-карбоновая кислота	Хиноксалин-2-карбоновая кислота-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.22	175.2(+)	131.0/129.1	70/70	22/27
1,4-бисдезоксикарбадокс	1,4-бисдезоксикарбадокс -D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.89	231.2(+)	199.2/143.2	75/75	18/31
3-метилхиноксалин-2-карбоновая кислота	Хиноксалин-2-карбоновая кислота-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.05	189.2(+)	145.1/92.0	70/70	22/39
<b>Бензимидазолы(21)</b>							
Альбендазола аминосульфон	Тетрамизол -D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.36	240.1(+)	198.1/133.2	100/100	28/36
Гидрокситиабендазол	Тиабендазол- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.16	218.0(+)	191.0/147.1	100/100	38/46
Тиабендазол	Тиабендазол- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.57	202.1(+)	175.1/131.2	100/100	36/43
Аминомебендазол	Гидроксимебендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.45	238.2(+)	105.1/77.0	100/100	33/45
Оксибендазола амин	Оксибендазола амин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.66	192.2(+)	150.2/108.1	100/100	29/46
Гидроксимебендазол	Гидроксимебендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.24	298.2(+)	220.2/79.2	100/100	60/61
Аминофлюбендазол	Флюбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.06	256.2(+)	123.1/95.1	100/100	40/49
Альбендазола сульфоксид	Альбендазола сульфоксид-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.21	282.2(+)	240.1/208.1	100/100	19/32
Камбендазол	Камбендазол-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.06	303.0(+)	261.1/217.1	100/100	25/34
Оксибендазол	Оксибендазол-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.48	250.2(+)	218.1/176.0	100/100	27/39
Альбендазол сульфон	Альбендазола сульфон-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.67	298.1(+)	224.1/104.1	100/100	38/72
Оксфендазол	Фенбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.06	316.2(+)	191.0/159.2	100/100	29/46
Оксфендазола сульфон	Фенбендазол sulfone-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10.72	332.2(+)	300.2/159.1	100/100	30/48
Парбендазол	Альбендазол -D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.55	248.2(+)	216.1/173.2	100/100	27/45

Альбендазол	Альбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.13	266.1(+)	234.2/191.1	100/100	30/45
Мебендазол	Фенбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.12	296.1(+)	264.1/105.1	100/100	31/45
Флюбендазол	Флюбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.74	314.1(+)	281.1/123.1	100/100	32/49
Фенбендазол	Фенбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	13.18	300.0(+)	286.1/159.2	100/100	30/48
Аминотриклабендазол	Триклабендазол-D <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	16.87	327.1(-)	-128.0/-146.0	-100/-100	-38/-50
Триклабендазол	Триклабендазол-D <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	18.11	357.1(-) /359.1(-)	-342.0/-344.0	-100/-100	14/14
Триклабендазола сульфоксид	Триклабендазол-D <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	17.49	373.1(-) /375.1(-)	-358.0/-360.0	-100/-100	-30/-35
<b>Антигельминтики(12)</b>							
Оксиклозанид	Оксиклозанид- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	18.31	399.9(-)	-175.9/-201.9	-100/-100	-38/-33
Никлозамид	Никлозамид- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	19.14	325.0(-) /327.0(-)	-289.0/-291.0	-100/-100	14/14
Рафоксанид	Рафоксанид- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	23.46	623.8(-)	-344.9/-126.0	-100/-100	-50/-93
Клозантел	Клозантел- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	22.43	661.1(-) /663.1(-)	-315.0/-317.0	-100/-100	-50/-50
Нетомибин	Фебантел-D <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10.92	421.1(+)	389.1/213.2	100/100	24/30
Клорсулон	Клорсулон- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	9.25	377.9(-) /379.9(-)	-341.9/-343.9	-100/-100	-24/-24
Нитроксинил	Нитроксинил- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	12.36	290.1(-)	-162.9/-126.8	-100/-100	-30/-45
Празиквантел	Фебантел-D <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	15.05	313.0(+)	203.1/83.2	100/100	22/29

Морантел	Тиабендазол- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.83	221.1(+)	164.2/123.1	100/100	36/46
Левамизол	Тетрамизол -D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.16	205.2(+)	178.1/123.1	100/100	28/36
Пирантел	Тиабендазол- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.39	207.1(+)	150.2/136.2	100/100	41/44
Фебантел	Фебантел-D <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	17.09	447.1(+)	415.1/383.0	100/100	18/25
<b>Кокцидиостатики(12)</b>							
Ампролиум	Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.24	243.2(+)	150.1/94.0	44/44	18/17
Клопидол	Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.15	192.0(+)	101.0/86.8	85/85	41/45
Этопабат	Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10.5	238.2(+)	206.1/136.0	44/44	17/38
Галофугинон	Иономицин	[M+H] <sup>+</sup>	9.68	414.1(+)	101.1/120.0	65/65	45/31
Робендин	Иономицин	[M+H] <sup>+</sup>	14.42	334.1(+)	155.1/138.0	78/78	30/38
Декоквинат	Иономицин	[M+H] <sup>+</sup>	21.22	418.3(+)	372.3/204.1	50/50	35/58
Монезин	Иономицин	[M+H] <sup>+</sup>	23.07	693.3(+)	675.5/461.3	20/20	52/72
Салиномицин	Иономицин	[M+H] <sup>+</sup>	23.48	773.5(+)	431.3/531.3	20/20	70/60
Наразин	Иономицин	[M+H] <sup>+</sup>	24.1	787.5(+)	431.3/531.4	24/24	72/64
Арпиноцид	Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.24	278.1(+)	143.0/107.1	60/60	38/90
Динитрокарбанилид	Динитрокарбанилид-D <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	16.25	300.9(-)	-137.1/-107.1	-100/-100	-35/-51
Диклазурил	Динитрокарбанилид-D <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	17.49	405.0(-) /407(-)	-333.8/-335.8	-100/-100	-27/-30
<b>Прочие(5)</b>							
Триметоприм	Триметоприм- D <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.98	291.1(+)	230.1/261.0	50/50	31/33

Бацитрацин А	Актиномицин D	[M+3H]3+	11.34	475.1(+)	199.0/227.0	82/82	34/28
Виржинамицин M1	Актиномицин D	[M+H]+	14.42	526.1(+)	355.0/508.2	84/84	25/18
Виржинамицин S1	Актиномицин D	[M+H]+	16.07	824.3(+)	205.0/663.2	63/63	58/36
Новобиоцин	Актиномицин D	[M+H]+	19.37	613.2(+)	189.1/396.1	66/66	33/22

\*Потенциал декластеризации; \*\*Энергия соударений

**Таблица 23.** Время удерживания и параметры ММР для внутренних стандартов

Внутренний стандарт	Молекулярный ион	$t_R$ , мин	$Q_1$ m/z	$Q_3$ m/z	ПД*, В	ЭС**, эВ
Фуралтадон-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	3.91	330.0(+)	286,0	60	19
Фуразолидон-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.80	230.0(+)	117,0	60	19
Нитрофурантион- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	6.39	239.8(-)	151,9	-100	-17
Нитрофуразон- <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	6.17	199.8(-)	152,9	-100	-11
Сульфаметазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.38	283.0(+)	186,0	50	26
Сульфаметоксазол-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.04	258.1(+)	160,1	50	22
Сульфадиазин-D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.33	255.1(+)	160,1	50	23
Триметоприм- D <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.94	300.1(+)	250,1	50	33
Сульфатиазол- D <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.94	260.1(+)	160,1	50	24
Диметридазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	3.50	145.1(+)	99,1	70	23
Ронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.33	204.0(+)	143,1	45	15
Ипронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.04	173.1(+)	127,1	110	25
Гидроксиипронидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.01	189.1(+)	171,1	70	18
Гидроксиметронидазол-D <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	2.88	190.1(+)	125,1	90	19
Гидроксиметилметилнитроимидазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	3.30	161.1(+)	143,1	70	20
Дифлоксацин-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.83	403.0(+)	359,0	86	27
Энрофлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.21	364.9(+)	245,0	30	37
Норфлоксацин-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.59	325.0(+)	281,1	76	23
Сарафлоксацин-D <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.83	394.0(+)	350,0	81	27
Ципрофлоксацин-D <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.80	339.9(+)	296,1	91	25

Налидиксовая кислота-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.74	237.9(+)	220,0	36	21
Оксолиновая кислота-D <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.89	266.9(+)	249,0	46	23
Бензилпенициллин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	12.15	342.0(+)	183,1	76	17
Демеклоциклин	[M+H] <sup>+</sup>	7.63	465.1(+)	448,1	60	25
Клиндамицин-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.89	428.3(+)	129,1	36	39
Рокситромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14.01	844.6(+)	686,5	46	29
Азитромицин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.27	752.5(+)	594,5	39	41
Валнемулин-D <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14.21	571.4(+)	269,2	37	25
Цефетамет-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6.39	401.4(+)	244,0	40	24
Иономицин	[M+H] <sup>+</sup>	22.65	732.5(+)	279,1	10	77
Тетрамизол -D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	4.97	210.1(+)	183,0	100	34
Тиабендазол- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.56	208.1(+)	181,1	100	38
Гидроксимебендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	5.24	301.2(+)	220,2	100	60
Оксибендазола амин-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.62	199.1(+)	151,2	100	32
Флюбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.74	317.1(+)	282,1	100	31
Альбендазола сульфоксид-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	7.21	285.1(+)	243,1	100	20
Камбендазол-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.06	310.0(+)	262,1	100	28
Оксибендазол-D <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9.46	257.1(+)	225,2	100	26
Альбендазола сульфон-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8.65	301.2(+)	224,1	100	15
Фенбендазол-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	13.18	303.0(+)	268,1	100	30
Фенбендазол сульфон-D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10.71	335.1(+)	300,1	100	30
Альбендазол -D <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11.13	269.2(+)	234,1	100	29
Фебантел-D <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	17.10	453.1(+)	383,1	100	28

Актиномицин D	[M+2H]2+	19.77	628.4(+)	300,0	82	23
Хиноксалин-2-карбоновая кислота-D <sub>4</sub>	[M+H]+	7.21	179.2(+)	133,1	70	27
1,4-бисдезоксикарбадокс -D <sub>3</sub>	[M+H]+	9.89	234.2(+)	199,2	75	17
Хлорамфеникол-D <sub>5</sub>	[M-H]-	9.67	326.1(-)	157,0	-100	-23
Динитрокарбанилид-D <sub>8</sub>	[M-H]-	16.26	309.0(-)	141,0	-100	-20
Клорсулон- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H]-	9.25	386.0(-)	350,0	-100	-24
Нитроксинил- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H]-	12.36	295.0(-)	126,4	-100	-35
Триклабендазол-D <sub>3</sub>	[M-H]-	18.11	362.1(-)	344,0	-100	-36
Оксиклозанид- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H]-	18.31	403.9(-)	175,9	-100	-38
Никлозамид- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H]-	19.14	331.0(-)	177,0	-100	-38
Рафоксанид- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H]-	23.46	629.8(-)	351,0	-100	-48
Клозантел- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	[M-H]-	22.43	666.6(-)	126,9	-100	-74

\*Потенциал декластеризации; \*\*Энергия соударений

**Валидация** методики проводилась с использованием контрольных образцов молока с добавками и оценивалась в соответствии с рекомендациями Европейской комиссии 2002/657/2002 (European Commission, 2002) для установления рабочих характеристик метода, обеспечивающих адекватную идентификацию, подтверждение и количественное определение целевых соединений.

Основные характеристики определения нитрофуранов и других лекарственных веществ в молоке после очистки экстрактов методом МТФЭ с применением ССПС/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  приведены в табл. 24. Несмотря на то, что выбранные соединения значительно различаются по гидрофобности (значения параметров Ханша,  $\lg P$ , варьируют от  $-3.81$  до  $9.36$ ), ССПС/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  обеспечивает удовлетворительную степень извлечения большинства соединений. На трех уровнях концентраций ( $1_{\text{сопр}}$ ,  $2_{\text{сопр}}$  и  $20$  мкг/кг) показано, что методом МТФЭ при использовании  $150$  мг ССПС/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  можно извлечь из  $10$  г молока:  $97$ – $109$  % нитрофуранов (4);  $83$ – $107$ % сульфаниламидов (14);  $85$ – $120$ % бета-лактамов (13);  $89$ – $115$ % тетрациклинов (4);  $82$ – $119$ % хинолонов (14);  $82$ – $115$ % макролидов (8);  $84$ – $115$ % нитроимидазолов (10),  $89$ – $114$ % амфениколов (3);  $86$ – $111$ % линкозамидов (3);  $97$ – $102$ % плевомутилинов (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). Данные по распределению значений степеней извлечения среди изученных соединений приведены на рис. 29.

Из данных, приведенных в табл. 24 видно, что пределы обнаружения составили:  $0.05$  мкг/кг для плевомутилинов;  $0.05$ – $0.2$  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  $\beta$ -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  $0.20$  (рис. 30). Абсолютные значения матричного эффекта для большинства соединений варьируют в пределах  $85$ – $120$ % (табл. 24, рис. 31).

**Таблица 24.** Основные характеристики определения нитрофуранов и других лекарственных соединений в молоке после очистки экстрактов методом МТФЭ с применением ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Вещество (lgP <sup>1</sup> )	Линейный диапазон, мкг/кг	R <sup>2</sup> , %	Содержание, мкг/кг	Степень выделения, % (1c <sub>сопр</sub> /2c <sub>сопр</sub> /20 мкг/кг)	Внутридневная повторяемость (s <sub>r</sub> ,%, n = 5)	Междневная повторяемость (s <sub>r</sub> ,%, n = 15)	c <sub>min</sub> , мкг/кг	c <sub>сопр</sub> , мкг/кг	МЭ, %
<b>Нитрофураны(4)</b>									
Фуралтадон (-0.84)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	98/97/99	16/13/6	12/13/6	0.015	0.05	97
Фуразолидон (-0.49)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	103/102/104	12/11/7	11/11/5	0.06	0.2	101
Нитрофурантион (-0.40)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	105/106/102	16/14/6	15/13/5	0.015	0.05	101
Нитрофуразон (-0.63)	1-20	99.4	1/2/20	103/108/109	12/11/8	11/11/7	0.3	1	102
<b>Сульфаниламиды(14)</b>									
Сульфаклорпиридазин (1.02)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	97/96/99	12/11/6	10/10/7	0.06	0.2	92
Сульфаниламид (-0.72)	1-20	99	1/2/20	104/103/106	13/15/11	11/11/6	0.3	1	113
Сульфаметоксипиридазин (0.32)	0.05-20	99.1	0.05/0.1/20	88/87/85	19/16/8	13/14/7	0.015	0.05	93
Сульфагуанидин (-1.22)	1-20	99	1/2/20	105/107/103	16/19/14	13/11/9	0.3	1	90
Сульфаметоксазол (0.89)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	98/99/96	11/10/5	10/10/6	0.015	0.05	97
Сульфаэтоксипиридазин (0.85)	1-20	99.8	1/2/20	87/88/91	15/13/8	12/13/7	0.3	1	115
Сульфамоксол (1.08)	0.05-20	99.3	0.05/0.1/20	85/83/84	17/19/9	12/11/6	0.015	0.05	111
Сульфадиазин (-0.12)	0.2-20	99.3	0.2/0.4/20	97/96/99	12/11/6	10/10/7	0.06	0.2	92
Сульфамеразин (0.34)	0.05-20	99	0.05/0.1/20	104/103/106	13/15/11	11/11/6	0.015	0.05	113
Сульфаметазин(0.80)	0.05-20	99.2	0.05/0.1/20	88/87/85	19/16/8	13/14/7	0.015	0.05	93
Сульфапиридин (0.03)	0.2-20	99	0.2/0.4/20	105/107/103	16/19/14	13/11/9	0.06	0.2	90
Сульфахиноксалин (1.30)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	98/99/96	11/10/5	10/10/6	0.015	0.05	97
Сульфадиметоксин (1.48)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	87/88/91	15/13/8	12/13/7	0.06	0.2	115
Сульфатиазол (0.05)	1-20	99.7	1/2/20	85/83/84	17/19/9	12/11/6	0.3	1	111

<b>β-лактамы(13)</b>									
Оксациллин (2.05)	0.2-20	99.7	0.2/0.4/20	95/99/94	16/17/6	13/14/5	0.06	0.2	115
Клоксациллин (2.53)	1-20	99.9	1/2/20	94/96/92	14/11/8	13/12/6	0.3	1	110
Бензилпенициллин (1.67)	1-20	99.7	1/2/20	99/97/102	11/11/7	11/11/6	0.3	1	98
Диклоксациллин (3.02)	1-20	99.8	1/2/20	107/111/108	16/13/7	11/12/7	0.3	1	105
Феноксиметилпенициллин (1.88)	1-20	99.9	1/2/20	106/102/103	14/13/8	10/11/6	0.3	1	109
Цефалониум (-3.81)	1-20	99.8	1/2/20	112/109/108	19/18/10	13/14/7	0.3	1	87
Цефоперазон (1.43)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	115/120/119	15/16/8	14/14/7	0.06	0.2	91
Цефепим (0.79)	1-20	99.3	1/2/20	110/109/109	19/17/8	14/15/8	0.3	1	90
Цефотаксим (1.20)	0.2-20	99.5	0.2/0.4/20	119/120/120	16/17/8	14/11/6	0.06	0.2	85
Цефподоксим (0.94)	1-20	99.2	1/2/20	106/95/101	14/13/9	12/13/7	0.3	1	81
Цефалор (0.10)	1-20	99.9	1/2/20	85/87/83	11/12/7	11/11/6	0.3	1	115
Цефетамет (1.18)	1-20	99.6	1/2/20	106/105/103	17/16/8	14/15/6	0.3	1	101
Цефтиофурил (2.05)	1-20	99.7	1/2/20	115/117/119	16/17/8	14/13/7	0.3	1	93
<b>Тетрациклины(4)</b>									
Тетрациклин (-1.47)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	93/97/89	11/10/6	9/9/5	0.06	0.2	93
Окситетрациклин (-1.50)	0.2-20	99.2	0.2/0.4/20	113/112/115	16/14/8	11/13/7	0.06	0.2	83
Доксициклин (-0.54)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	89/91/93	12/11/7	11/12/7	0.06	0.2	84
Хлортетрациклин (1.11)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	109/115/113	9/11/5	9/7/5	0.06	0.2	91
<b>Хинолоны(14)</b>									
Данофлоксацин (1.20)	0.2-20	99	0.2/0.4/20	91/92/89	17/18/9	14/14/6	0.06	0.2	112
Энрофлоксацин (1.88)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	97/99/99	11/13/7	10/9/5	0.06	0.2	101
Марбофлоксацин (-0.55)	0.2-20	99.2	0.2/0.4/20	89/91/93	16/17/11	13/13/6	0.06	0.2	103
Флюмеквин (2.41)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	118/115/119	11/10/5	10/10/5	0.06	0.2	85
Ломефлоксацин (1.71)	0.2-20	99.7	0.2/0.4/20	112/115/109	17/11/7	12/13/6	0.06	0.2	91
Сарафлоксацин (2.09)	0.05-20	99.1	0.05/0.1/20	102/101/104	17/18/8	11/11/6	0.015	0.05	99
Дифлоксацин (2.78)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	103/107/106	14/12/5	13/9/5	0.015	0.05	96

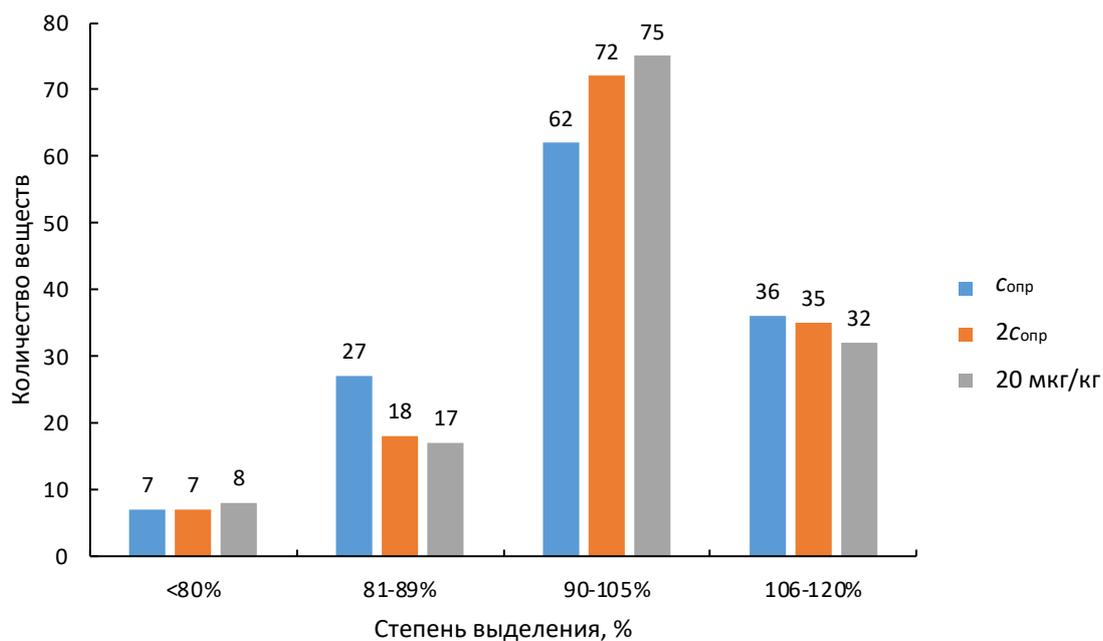
Ципрофлоксацин (0.65)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	102/97/100	11/11/6	10/11/5	0.015	0.05	97
Налидиксовая кислота(1.19)	1-20	99.3	1/2/20	105/94/99	16/13/8	13/13/6	0.3	1	104
Норфлоксацин (0.82)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	103/102/95	17/14/7	13/13/7	0.06	0.2	102
Оксолиновая кислота(1.43)	1-20	99.8	1/2/20	103/99/100	11/10/6	10/8/6	0.3	1	98
Пипемидовая кислота(-0.16)	1-20	99.4	1/2/20	87/82/84	20/20/11	15/14/8	0.3	1	118
Офлоксацин (0.84)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	118/117/116	11/12/8	10/13/6	0.06	0.2	90
Пефлоксацин (1.51)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	93/95/96	11/11/7	12/10/6	0.06	0.2	95
<b>Макролиды(8)</b>									
Тилвазолин (5.28)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	89/92/90	13/11/5	10/9/5	0.06	0.2	117
Тулатромицин (4.07)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	82/85/83	16/17/5	13/12/6	0.015	0.05	82
Спирамицин (3.06)	0.2-20	99.6	0.2/0.4/20	105/108/106	20/16/9	12/14/6	0.06	0.2	110
Кларитромицин (3.16)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	94/92/97	16/12/5	14/11/5	0.015	0.05	96
Тилозин (3.27)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	115/113/113	11/11/7	10/11/6	0.015	0.05	113
Тилмикозин (4.95)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	103/105/102	10/9/5	8/9/5	0.06	0.2	119
Эритромицин (2.83)	0.2-20	99.6	0.2/0.4/20	86/89/88	12/14/6	11/9/6	0.06	0.2	118
Азитромицин (3.33)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	101/97/98	11/11/5	12/11/6	0.015	0.05	98
<b>Нитроимидазолы(10)</b>									
Диметридазол (0.31)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	98/96/99	16/13/7	13/11/6	0.015	0.05	103
Ронидазол (-0.45)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	101/97/100	12/14/7	11/8/6	0.06	0.2	104
Ипронидазол (1.18)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	106/97/101	11/9/6	9/7/5	0.015	0.05	96
Гидроксиипронидазол (0.21)	1-20	99.7	1/2/20	108/101/97	13/12/8	12/11/7	0.3	1	97
Гидроксиметронидазол (-0.81)	1-20	98.7	1/2/20	106/102/98	11/12/9	12/11/6	0.3	1	101
Гидроксиметилметилнитроимидазол(-0.49)	1-20	99.2	1/2/20	96/97/93	19/17/13	13/14/9	0.3	1	101
Тернидазол (-0.10)	1-20	99.2	1/2/20	108/106/112	14/14/8	12/13/7	0.3	1	95
Тинидазол (-0.27)	0.2-20	99	0.2/0.4/20	84/86/88	20/19/9	15/15/9	0.06	0.2	91
Метронидазол (-0.01)	0.2-20	99.1	0.2/0.4/20	110/115/113	18/20/11	12/14/8	0.06	0.2	89
Орнидазол (0.69)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	88/92/93	16/14/6	13/12/5	0.015	0.05	103

<b>Амфениколы(3)</b>									
Хлорамфеникол (1.02)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	103/105/102	16/15/6	13/13/5	0.015	0.05	99
Флорфеникол (-0.12)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	114/112/113	11/12/5	12/11/5	0.06	0.2	103
Тиамфеникол (-0.27)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	89/93/91	11/11/5	9/10/5	0.015	0.05	84
<b>Линкомицины(3)</b>									
Клиндамицин (1.83)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	111/105/102	10/9/5	9/10/4	0.015	0.05	102
Линкомицин (0.91)	0.05-20	99	0.05/0.1/20	87/91/88	17/18/9	14/13/6	0.015	0.05	100
Пирлимицин (1.47)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	92/91/86	14/13/8	12/13/8	0.06	0.2	85
<b>Плевромутилины(2)</b>									
Тиамулин (5.93)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	97/100/100	11/8/5	9/8/4	0.015	0.05	85
Валнемулин (4.72)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	99/102/100	12/9/5	9/10/6	0.015	0.05	116
<b>Макроциклические лактоны(4)</b>									
Эмамектин (6.84)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	85/88/87	15/14/7	10/12/7	0.06	0.2	108
Моксидектин (8.43)	1-20	99.9	1/2/20	74/75/77	20/19/11	15/16/9	0.3	1	80
Эприномектин (6.22)	1-20	99.7	1/2/20	76/78/74	16/15/8	13/12/7	0.3	1	88
Ивермектин (6.61)	1-20	99.4	1/2/20	73/72/75	11/12/8	12/12/6	0.3	1	85
<b>Хиноксалиновые антибиотики(4)</b>									
Хиноксалин-2-карбоновая кислота(1.80)	1-20	99	1/2/20	104/103/103	18/19/10	15/16/8	0.3	1	97
1,4-бисдезоксикарбадокс (1.72)	1-20	99.6	1/2/20	99/97/101	11/9/6	10/9/7	0.3	1	100
3-метилхиноксалин-2-карбоновая кислота(2.26)	1-20	99.5	1/2/20	87/88/92	12/11/8	11/10/6	0.3	1	114
<b>Бензимидазолы(21)</b>									
Альбендазола аминосульффон(0.12)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	110/108/104	17/16/6	14/14/5	0.06	0.2	91
Гидрокситиабендазол(1.73)	0.2-20	99.8	0.2/0.4/20	87/88/91	17/17/8	14/13/7	0.06	0.2	97
Тиабендазол (2.47)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	98/102/101	10/8/5	7/8/5	0.015	0.05	100
Аминомебендазол(1.74)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	77/79/79	11/12/5	12/11/6	0.06	0.2	83

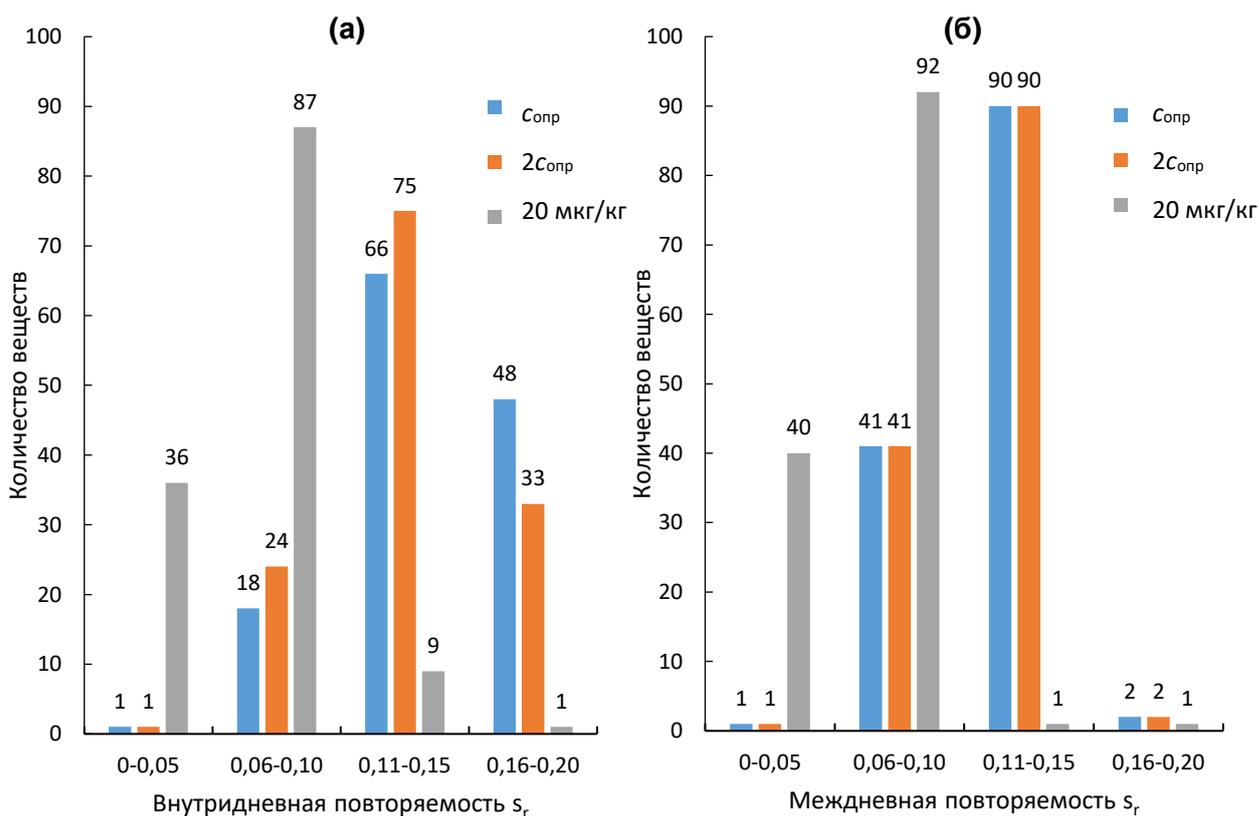
Оксибендазола амин(1.97)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	101/103/98	9/8/5	7/8/5	0.06	0.2	97
Гидроксибендазол(2.04)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	102/99/103	14/14/8	12/11/6	0.06	0.2	98
Аминофлюбендазол(1.96)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	76/77/79	11/9/5	9/10/5	0.015	0.05	120
Альбендазола сульфоксид(0.91)	0.05-20	99.6	0.05/0.1/20	101/103/102	12/11/5	10/10/5	0.015	0.05	99
Камбендазол (2.90)	0.05-20	99.6	0.05/0.1/20	97/99/98	18/16/8	13/12/7	0.015	0.05	101
Оксибендазол (2.50)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	102/104/99	19/17/8	14/13/6	0.015	0.05	96
Альбендазола сульфон(0.86)	0.05-20	99.1	0.05/0.1/20	98/103/102	16/17/10	14/14/7	0.015	0.05	98
Оксфендазол (1.36)	0.05-20	99.1	0.05/0.1/20	118/118/119	19/18/9	15/15/7	0.015	0.05	119
Оксфендазола сульфон (1.70)	0.05-20	99.6	0.05/0.1/20	89/92/91	11/12/5	10/9/5	0.015	0.05	113
Парбендазол (3.57)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	105/104/109	8/8/4	8/7/5	0.015	0.05	81
Альбендазол (3.07)	0.2-20	99.5	0.2/0.4/20	102/103/101	9/8/5	10/9/5	0.06	0.2	99
Мебендазол (2.83)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	116/118/119	11/11/5	10/11/5	0.015	0.05	80
Флюбендазол (3.05)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	97/99/101	12/11/4	8/10/5	0.015	0.05	101
Фенбендазол (3.75)	0.05-20	99.6	0.05/0.1/20	98/99/97	8/9/5	9/9/5	0.015	0.05	99
Аминотриклабендазол(4.62)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	115/114/115	14/13/7	10/11/7	0.015	0.05	97
Триклабендазол (5.97)	0.2-20	99.4	0.2/0.4/20	102/103/97	14/14/8	12/13/6	0.06	0.2	101
Триклабендазола сульфоксид(4.12)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	118/117/119	11/11/7	10/11/6	0.06	0.2	99
<b>Антигельминтики(12)</b>									
Оксиклозанид (8.67)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	99/97/95	11/10/5	10/9/6	0.015	0.05	96
Никлозамид (5.41)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	101/99/98	9/10/4	9/8/5	0.015	0.05	99
Рафоксанид (9.36)	1-20	99.8	1/2/20	103/102/105	11/12/8	10/11/8	0.3	1	97
Клозантел (9.08)	1-20	99.8	1/2/20	102/97/95	12/11/6	11/10/6	0.3	1	98
Нетомибин (2.13)	1-20	99.8	1/2/20	115/112/113	12/12/8	12/11/7	0.3	1	88
Клорсулон (1.04)	1-20	99.8	1/2/20	102/104/102	10/8/4	7/8/5	0.3	1	99
Нитроксинил (2.80)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	97/99/96	11/11/5	11/12/5	0.06	0.2	97
Празиквантел (2.44)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	105/104/100	10/10/5	11/10/5	0.06	0.2	81
Морантел (1.97)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	79/82/83	14/13/7	12/12/7	0.015	0.05	119
Левамизол (1.85)	0.05-20	99.5	0.05/0.1/20	103/102/104	16/14/7	11/12/7	0.015	0.05	96

Пирантел (1.51)	0.05-20	99.8	0.05/0.1/20	81/83/77	17/16/5	11/12/6	0.015	0.05	116
Фебантел (2.36)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	101/97/98	9/8/4	7/8/5	0.015	0.05	99
<b>Кокцидиостатики(12)</b>									
Ампролиум (1.05)	1-20	99.7	1/2/20	81/83/79	13/12/8	11/11/7	0.3	1	87
Клопидол (1.24)	0.2-20	99.5	0.2/0.4/20	110/110/108	15/14/8	14/14/7	0.06	0.2	95
Этопабат (2.42)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	115/115/117	11/11/6	11/11/5	0.06	0.2	93
Галофугинон (1.24)	1-20	99.7	1/2/20	89/92/94	16/13/8	12/11/5	0.3	1	82
Робенидин (4.55)	0.05-20	99.6	0.05/0.1/20	116/115/114	16/14/8	11/13/7	0.015	0.05	87
Декоквинат (8.74)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	115/116/111	17/14/6	14/14/6	0.015	0.05	80
Монезин (3.72)	0.05-20	99.7	0.05/0.1/20	105/108/103	14/14/8	11/12/7	0.015	0.05	81
Салиномицин (6.10)	1-20	99.5	1/2/20	83/82/78	12/11/9	12/10/6	0.3	1	84
Наразин (6.59)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	84/78/82	14/11/7	12/11/7	0.06	0.2	90
Арпиноцид (1.73)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	116/118/118	14/14/5	13/14/6	0.015	0.05	83
Динитрокарбанилид(3.78)	0.05-20	99.9	0.05/0.1/20	102/99/105	8/8/4	7/6/4	0.015	0.05	98
Диклазурил (2.44)	1-20	99.7	1/2/20	82/83/81	11/8/5	9/8/5	0.3	1	83
<b>Другие(5)</b>									
Триметоприм (0.38)	0.2-20	99.4	0.2/0.4/20	111/108/103	14/13/8	13/12/7	0.06	0.2	97
Бацитрацин А (-2.21)	1-20	99.9	1/2/20	78/80/75	12/11/8	13/12/6	0.3	1	81
Виржинамицин М1 (-0.66)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	119/118/119	12/11/5	12/11/5	0.06	0.2	98
Виржинамицин S1 (-0.56)	1-20	99.6	1/2/20	117/119/118	10/11/8	9/10/6	0.3	1	82
Новобиоцин (2.86)	0.2-20	99.9	0.2/0.4/20	98/97/99	19/16/8	15/14/7	0.06	0.2	119

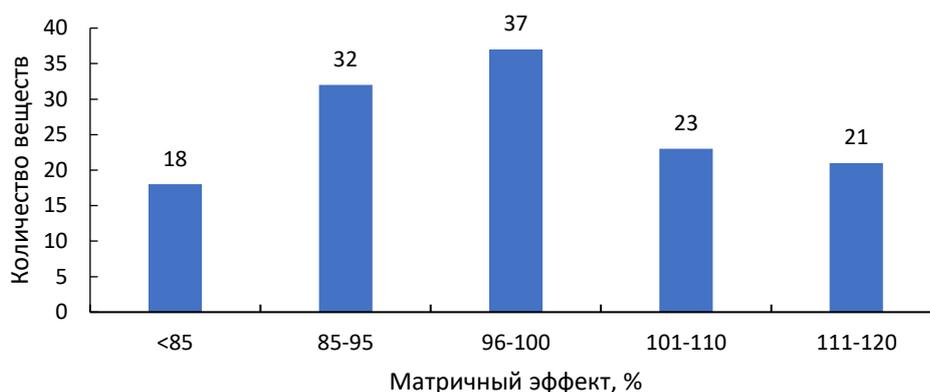
<sup>1</sup> Значения logP взяты с базы данных ChemSpider



**Рис. 29.** Степени выделения ветеринарных лекарств из молока.



**Рис. 30.** Внутридневная и междневная воспроизводимость при определении ветеринарных препаратов в молоке.

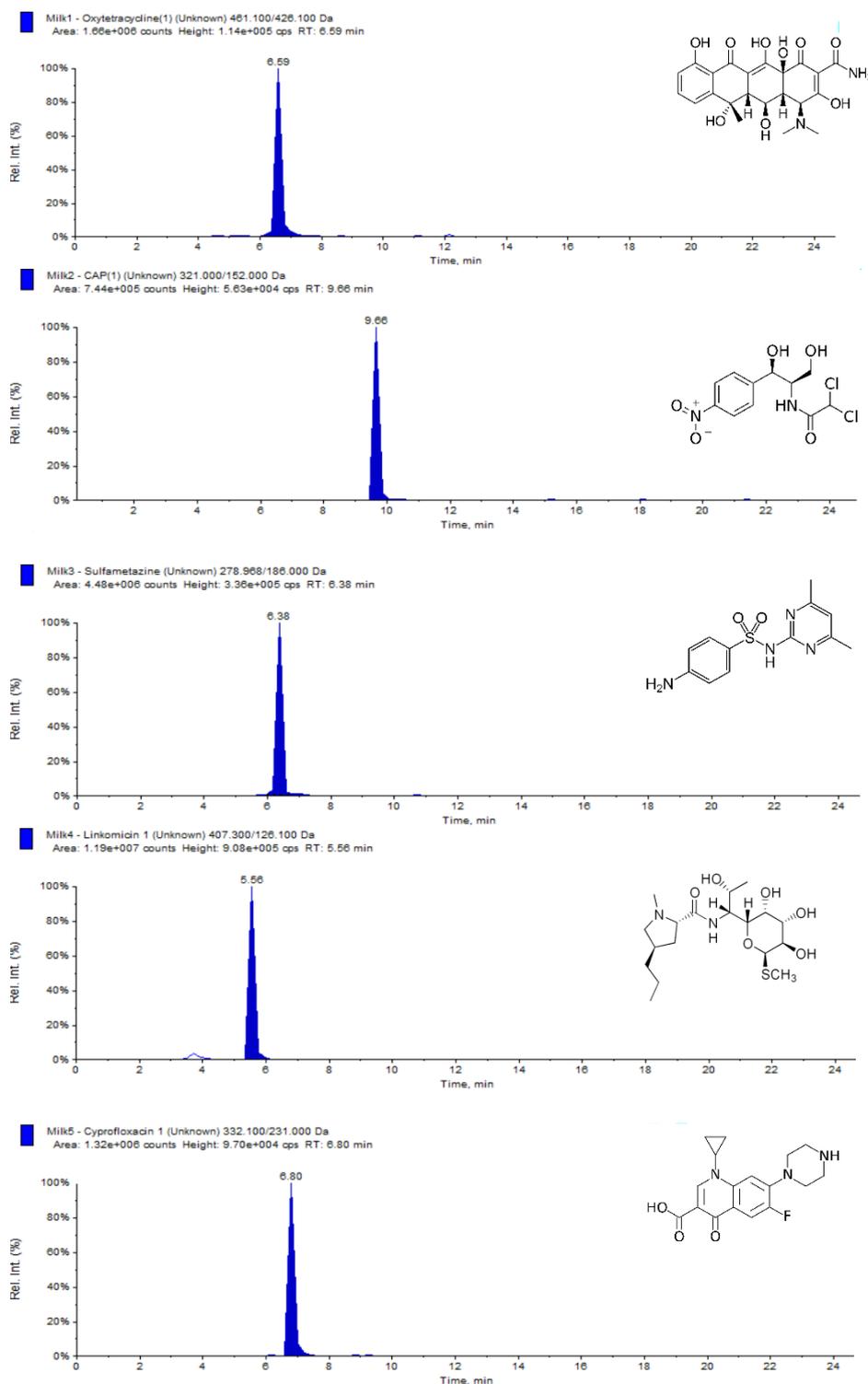


**Рис. 31.** Матричный эффект при определении ветеринарных лекарств в молоке.

**Анализ реальных объектов.** Для демонстрации работоспособности разработанной методики использовали пять положительных проб молока, в которых при мониторинге пищевых продуктов были обнаружены ветеринарные лекарства. Хроматограммы по выделенным ионам для положительных образцов молока приведены на рис. 32. Результаты определения ветеринарных лекарств в молоке с использованием приведены в табл. 25. Сравнение полученных результатов с результатами, полученными по официальным методикам для определения различных групп веществ, подтверждает правильность разработанной методики.

**Таблица 25.** Результаты определения ветеринарных лекарств в молоке с использованием разработанной и официальных (ГОСТовских) методик для определения различных групп веществ ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Номер пробы	Аналит	Найдено разработанной методикой, мкг/кг	Найдено по официальной методике, мкг/кг	ПДК, мкг/кг
Молоко 1	Окситетрациклин	1.5±0.2	1.8±1.2 [195]	10
Молоко 2	Хлорамфеникол	4.1±0.4	4.0±3.2 [196]	0.2
Молоко 3	Сульфаметазин	1.7±0.2	1.9±1.1 [196]	1
Молоко 4	Линкомицин	5.6±0.8	5.9±1.8 [197]	1.5
Молоко 5	Ципрофлоксацин	12.2±1.3	11.4±4.6 [198]	1



**Рис. 32.** Хроматограммы по выделенным ионам для положительных образцов молока, содержащих следы: (а) окситетрациклина:  $t_R = 6.59$  мин, ММП 461.1 Da / 426.1 Da; (б) хлорамфеникола:  $t_R = 9.66$  мин, ММП -321.0 Da / -152.0 Da; (в) сульфаметазина:  $t_R = 6.38$  мин, ММП 279.1 Da / 186.1 Da; (г) линкомицина:  $t_R = 5.56$  мин, ММП 407.3 Da / 126.1 Da; (д) ципрофлоксацина:  $t_R = 6.80$  мин, ММП 332.0 Da / 231.0 Da.

## Заключение

Таким образом, в диссертационной работе представлен ряд разработок автора, которые основаны на использовании: нового дериватирующего реагента – 5-нитро-2-фуральдегида, для дериватизации метаболитов нитрофуранов при их определении методом ВЭЖХ-МС/МС; сверхсшитого и магнитного сверхсшитого полистиролов для очистки гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки пищевых продуктов методами ТФЭ и магнитной ТФЭ; на сокращении времени кислотного гидролиза и дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фуральдегидом за счет проведения этого этапа пробоподготовки в термостатированной ультразвуковой ванне при 80°C в среде 0.5М соляной кислоты. По результатам проведенных исследований разработаны оригинальные методики определения 4 метаболитов нитрофуранов (АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ) в меде, куриных яйцах, курином мясе и субпродуктах, в том числе совместно с 27 другими запрещенными ветеринарными лекарствами. Метод магнитной ТФЭ с использованием магнитного сверхсшитого полистирола применен для очистки проб молока при многокомпонентном ВЭЖХ-МС/МС определении в них 132 ветеринарных лекарств без традиционной стадии депротеинизации. Сверхсшитый полистирол применен для многокомпонентной ТФЭ остатков 63 ветеринарных лекарств при их определении в курином мясе методом ВЭЖХ-МС/МС.

Из литературных данных известно, что в большинстве случаев для определения метаболитов НФ методом ВЭЖХ-МС/МС используют 2-нитробензальдегид. Предложенный нами для этой цели 5-нитро-2-фуральдегид не уступает 2-нитробензальдегиду, а по ряду позиций и превосходит его. Сопоставление некоторых характеристик этих дериватирующих агентов проведено в табл. 26, 27. В результате дериватизации метаболитов с 5-НФА образуются менее гидрофобные продукты, чем с 2-НБА, их разделение на колонке Acclaim™ 120 C18 (100 × 2.1 мм) с диаметром зерна сорбента 3.0 мкм при использовании одной и той же подвижной фазы и последующее определение, происходит быстрее (табл. 27). Кроме того, нитрофураны – продукты дериватизации метаболитов НФ с 5-НФА, более устойчивы при высоких температурах, чем нитропроизводные с 2-НБА, что и позволило разработать ускоренный способ пробоподготовки и сократить время гидролиза-дериватизации с 16 ч до 20 мин.

**Таблица 26.** Некоторые характеристики продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 2-нитробензальдегидом и 5-нитро-2-фуральдегидом

Метаболит	lg P	2-НБА			5-НФА		
		Продукт Дериватизации (нитропроизводное с 2-НБА)	Мол. масса продукта	lg P	Продукт дериватизации (нитрофуран)	Мол. масса продукта	lg P
АМОЗ	-0.80	НП-АМОЗ	334.33	1.58	Фуралдатон	324.29	0.73
АОЗ	-0.66	НП-АОЗ	235.20	1.72	Фуразолидон	225.16	0.87
АГД	-1.75	НП- АГД	248.19	0.63	Нитрофурантоин	238.16	-0.22
СЕМ	-1.66	НП-СЕМ	208.17	0.72	Нитрофуразон	198.14	-0.14

Структурные формулы соединений приведены на рис. 1. Значения lgP взяты из базы данных MarvinSketch

**Таблица 27.** Времена выхода и значения  $c_{min}$ , при ВЭЖХ–МС/МС определении продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 2-нитробензальдегидом и 5-нитро-2-фуральдегидом (подвижные фазы: 0.5%-ной муравьиной кислоты в воде (А) и 0.5%-ной муравьиная кислота в смеси ацетонитрил:метанол, 50:50 (Б); программа градиентного элюирования: 20–80% Б (0–7 мин), 80% Б (7–7,5 мин), 80–20% Б (7,5–8 мин))

Метаболит	2-НБА			5-НФА		
	Продукт дериватизации (нитропроизводное с 2-НБА)	$t_R$ , мин	$c_{min}$ , мкг/л	Продукт дериватизации (нитрофуран)	$t_R$ , мин	$c_{min}$ , мкг/л
АМОЗ	НП- АМОЗ	2.79	0.05	Фуралдатон	2.18	0.04
АОЗ	НП-АОЗ	4.55	0.1	Фуразолидон	3.67	0.06
АГД	НП- АГД	4.00	0.15	Нитрофурантоин	3.43	0.08
СЕМ	НП-СЕМ	4.25	0.8	Нитрофуразон	3.32	0.4

Еще одно преимущество 5-НФА, экономическое, связано со стоимостью необходимых для проведения исследований веществ. Стоимость 10 мг НП-АМОЗ, НП-АОЗ, НП- АГД и НП-СЕМ составляет 173, 165, 184 и 156 \$ соответственно, тогда как стоимость нитрофуранов колеблется от 53 до 92 \$ за 1 г; при этом стоимость 2-НБА и 5-НФА примерно одинаковая.

В табл. 28 – 30 приведены характеристики разработанных и описанных в литературе методик определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе, яйцах, меде и молоке. Из сравнения этих характеристик видно, что разработанные нами методики не уступают, а в ряде случаев превосходят известные по чувствительности и выгодно отличаются от них условиями пробоподготовки. В результате проведенного исследования нам удалось сократить время гидролиза-derivatизации и заменить на стадии очистки проб ЖЖЭ на более эффективные и экологически безопасные ТФЭ и магнитную ТФЭ с использованием ССПС и магнитного ССПС, которые ранее для этой цели не применяли.

**Таблица 28.** Сравнение характеристик разработанных и описанных в литературе методик определения метаболитов нитрофуранов в курином мясе и яйцах

Аналиты	Объект анализа	Пробоподготовка (гидролиз, дериватизация; очистка)	Метод	$C_{\min}$ , мкг/кг	Степень выделения, %	Литература
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Мясо курицы	0.1 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС	0.24 – 0.61	70–110	[71]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Мясо курицы,	0.2 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	УВЭЖХ–МС/МС	0.1–0.5	80.3–119.0	[74]
<b>АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ</b>	<b>Мясо курицы</b>	<b>0.5 М HCl; 5-НФА, 20 мин; 80°C; УЗ ТФЭ на ССПС Диапак П-3</b>	<b>ВЭЖХ–МС/МС</b>	<b>0.1 – 0.3</b>	<b>94–106</b>	<b>Эта работа</b>
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	Яйца	0.2 М HCl, 2-НБА, ночь при 40°C; ТФЭ SDB-L картридж	УВЭЖХ–МС/МС	0.50	88.9–107.3	[80]
АМОЗ, ДНСК	Яйца	0.2 М HCl, 2-НБА, ночь при 37 °C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ–МС/МС	0.1–0.3	94.1–104.0	[85]
<b>АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ</b>	<b>Яйца</b>	<b>0.1 М HCl; 5-НФА, 16 ч; 37°C; ТФЭ на ССПС Диапак П-3</b>	<b>ВЭЖХ–МС/МС</b>	<b>0.04–0.2</b>	<b>95–106</b>	<b>Эта работа</b>

**Таблица 29.** Сравнение характеристик разработанных и описанных в литературе методик определения метаболитов нитрофуранов в меде

Аналиты	Пробоподготовка (гидролиз, дериватизация; очистка)	Метод	$c_{\min}$ , мкг/кг	Степень выделения, %	Литература
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	0.1 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ– МС/МС	0.24–0.61	70–110	[71]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	0.2 М HCl, 2-НБА, ночь при 40°C; ТФЭ SDB-L картридж	УВЭЖХ– МС/МС	0.50	88.9–107.3	[80]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	0.2 М HCl, 2-НБА, 16 ч, 37°C; ЖЖЭ этилацетатом;	ВЭЖХ– МС/МС	0.16	69.9–91.8	[81]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, хлорамфеникол	0.1 М HCl, 2-НБА, 14 ч, 37°C; ЖЖЭ с этилацетатом и гексаном ТФЭ с анионообменным картриджем МАХ	УВЭЖХ– МС/МС	0.05–1.00	н. у.	[145]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, хлорамфеникол, флорфеникол	0.125 М HCl; 2- НБА, 16 ч; 37°C; ЖЖЭ этилацетатом	ВЭЖХ– МС/МС	0.059–0.739	92 – 105	[150]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, и 2 нитроимидазола	0.125 М HCl, 2- НБА, 4 ч, 55°C; QuEChERS	ВЭЖХ– МС/МС	0.12–0.74	90.96- 104.8	[153]
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ	<b>0.1 М HCl; 5- НФА, 16 ч; 37°C; МТФЭ на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>ВЭЖХ– МС/МС</b>	<b>0.1 – 0.3</b>	<b>85– 96%</b>	<b>Эта работа</b>
АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ и еще 27 лекарств	<b>0.5 М HCl; 5- НФА, 20 мин; 80°C; УЗ; МТФЭ на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>ВЭЖХ– МС/МС</b>	<b>0.3 – 1.0</b>	<b>72 – 120</b>	<b>Эта работа</b>

**Таблица 30.** Сравнение характеристик разработанной и описанных в литературе методик многокомпонентного определения ветеринарных лекарств в молоке с использованием магнитной ТФЭ

Аналиты	Пробоподготовка	Метод	$c_{min}$ , мкг/кг	Степень выделения, %	Литература
18 лекарств (β-лактамы, макролиды, аминогликозиды)	Осаждение белков, МТФЭ на Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @C- HLB	УВЭЖХ– МС/МС	0.1– 0.8	70.5 –98	[127]
8 сульфаниламидов	Осаждение белков, МТФЭ на нанокомпозите Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MoS <sub>2</sub>	ВЭЖХ– МС/МС	0.40– 1.5	80.1–107.1	[189]
Хлорамфеникол, тетрациклин	Осаждение белков, МТФЭ на С- нановолкнистом сорбенте	ВЭЖХ– ДАД	3	94.6–105.4	[191]
18 фторхинолонов	Осаждение белков, МТФЭ на магнитных наночастицах на основе оксида графена	ВЭЖХ– МС/МС	3.1– 13.3	82.4–103.9	[192]
Стрептомицин, дигидрострептомицин	Осаждение белков, МТФЭ на магнитном сорбенте графен/ мезопористый диоксид кремния	ВЭЖХ– МС/МС	2–5	94.35– 108.26	[193]
<b>132 ветеринарных лекарств из 15 классов</b>	<b>Прямая МТФЭ на ССПС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> без стадии депротеинизации</b>	<b>ВЭЖХ– МС/МС</b>	<b>0.015– 0.3</b>	<b>72 – 120</b>	<b>Эта работа</b>

## Выводы

1. Предложены новые подходы к ВЭЖХ-МС/МС определению метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах, основанные на дериватизации с 5-нитро-2-фураальдегидом (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, pH и концентрации сорбатов одинаковый для ССПС и магнитного ССПС: время достижения равновесия составляет 5 – 10 мин, максимальная сорбция наблюдается в интервале pH 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.

## Благодарности

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.

## Литература

1. *Hird S.J., Lau B.P.-Y., Schuhmacher R., Krska R.* Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. // *Trends Anal. Chem.* 2014. V. 59 P. 59. DOI: 10.1016/j.trac.2014.04.005.
2. *Wang B., Xie K., Lee K.* Veterinary drug residues in animal-derived foods: sample preparation and analytical methods. // *Foods.* 2021. V.10. № 3. P. 555. DOI: 10.3390/foods10030555.
3. *Sun R., Chen J., Pan C., Sun Y., Mai B., Li Q.X.* Antibiotics and food safety in aquaculture. // *J. Agric. Food Chem.* 2020. V. 68. P. 11908. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c03996.
4. *Guardone L., Tinacci L., Armani A., Trevisani M.* Residues of veterinary drugs in fish and fish products: An analysis of RASFF data over the last 20 years. // *Food. Control.* 2022. V.135. P. 108780. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108780.
5. *Ture M., Fentie T., Regassa B.* Veterinary drug residue: the risk, public health significance and its management college of veterinary medicine and animal science. // *J. Vet. Sci.* 2019. V. 13. №2. P. 555856. DOI: 10.19080/JDVS.2019.13.555856
6. *Baynes R. E., Dedonder K., Kissell L., Mzyk D., Marmulak T., Smith G., Tell L., Gehring R., Davis J., Riviere J.E.* Health concerns and management of select veterinary drug residues. // *Food Chem. Toxicol.* 2016. V. 88. P. 112–122. DOI: 10.1016/j.fct.2015.12.020.
7. *Beyene T.* Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. // *J. Vet. Sci. Technol.* 2016. V.1. № 7. P. 285. DOI: 10.4172/2157-7579.1000285.
8. *Islas G., Ibarra I.S., Hernandez P., Miranda J. M., Cepeda A.* Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: A review. // *Int. J. Anal. Chem.* 2017. V. 2017. P. 8215271. DOI: 10.1155/2017/8215271.
9. *Khatibi S.A., Hamidi S., Siahi-Shadbad M.R.* Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: a review. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021. V. 61. P. 3361–3382. DOI: 10.1080/10408398.2020.1798349.
10. *Masiá A., Suarez-Varela M.M., Llopis-Gonzalez A., Picó Y.* Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography mass

- spectrometry: a review. // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 936 P. 40–61. DOI: 10.1016/j.aca.2016.07.023.
- 11.** *Delatour T, Racault L, Bessaire T, Desmarchelier A*. Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges. // *Food. Addit. Contam.* 2018. V. 35 №. 4. P. 632–645. DOI: 10.1080/19440049.2018.1426890.
- 12.** *Мусеева И.Я., Родина О.П., Кустикова И.Н.* Основы клинической фармакологии противомикробных средств. Учебное пособие. Пенза: 2004, 72 с.
- 13.** *Zuma N.H., Aucamp J., N'Da D.D.* An update on derivatisation and repurposing of clinical nitrofurans. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2019. V. 140. P. 105–112. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105092.
- 14.** *Беляцкая А.В., Кашикова И.М., Елагина А.О., Краснюк (мл.) И.И., Краснюк И.И., Степанова О.И.* Нитрофураны для наружного применения (обзор). // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019. V. 8. № 2. P. 38–47. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-38-47
- 15.** *Vass M., Hruska K., Fránek M.* Nitrofurans antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. // *Vet. Med.* 2008. V. 53. № 9. P. 469–500. DOI: 10.17221/1979-VETMED
- 16.** EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific Opinion on nitrofurans and their metabolites in food. // *EFSA Journal*. 2015. V. 13. № 6. P. 4140. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4140
- 17.** *McCalla D.R.* Mutagenicity of Nitrofurans Derivatives: Review. // *Environ. Mutagen.* 1983. V. 5. P. 5745–5765. DOI: 10.1002/em.2860050512
- 18.** Commission Regulation (EC) 1995/1442/EC // *Off.J.Eur. Commun.* 1995. V. 38. № 143. P. 26–30.
- 19.** Единые санитарно–эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно–эпидемиологическому надзору (контролю). 2010. С. 391.
- 20.** *Points J., Burns D.T., Walker M.J.* Forensic issues in the analysis of trace nitrofurans veterinary residues in food of animal origin. // *Food. Control*. 2015. V. 50. P. 92–103. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.08.037.
- 21.** *Radovnikovic A., Conroy E.-R., Gibney M., O'Mahony J., Danaher M.* Residue analyses and exposure assessment of the Irish population to nitrofurans metabolites from

- different food commodities in 2009-2010. // *Food Addit. Contam. A* 2013. V. 30. P. 1858–1869. DOI: 10.1080/19440049.2013.829925.
- 22.** *Simion G., Damiescu L., Trif A.* Monitoring of the nitrofurans residues in honey bees from Timis County in the period 2007–2009. // *J. Agroaliment. Proc. Technol.* 2012. V. 18. P. 100–102.
- 23.** *Закревский В.В., Лелеко С.Н.* Скрининг нитрофурановых соединений в импортном мясном сырье. // *Гигиена и санитария.* 2014. Т. 5. С. 121–123.
- 24.** *Закревский В.В., Лелеко С.Н.* Загрязненность импортного мясного сырья нитрофуранами. // *Вестник Санкт-Петербургского университета.* 11 серия: Медицина. -2014. №2. С. 66–74.
- 25.** *Hassan M.N., Rahman M., Hossain M.B., Hossain M.M., Mendes R., Nowsad A.A.K.M.* Monitoring the presence of chloramphenicol and nitrofurantoin metabolites in cultured prawn, shrimp and feed in the Southwest coastal region of Bangladesh. // *Egypt J Aqua Res.* 2013. V. 39. P. 51–58. DOI: 10.1016/j.ejar.2013.04.004.
- 26.** *Yu W.-H., Chin T.-S., Lai H.-T.* Detection of nitrofurans and their metabolites in pond water and sediments by liquid chromatography (LC)-photodiode array detection and LC-ion spray tandem mass spectrometry. // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2013. V. 85 P. 517–526. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.03.015.
- 27.** *Hou J., Wan W., Mao D., Wang C., Mu Q., Qin S., Luo Y.* Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. // *Environ. Sci. Pollut. R.* 2015. V. 22. № 6. P. 4545–4554. DOI: 10.1007/s11356-014-3632-y.
- 28.** *Zhao H., Guo W., Quan W., Jiang J., Qu B.* Occurrence and levels of nitrofurantoin metabolites in sea cucumber from Dalian China. // *Food. Addit. Contam. A* 2016. V. 33. P. 1672–1677. DOI: 10.1080/19440049.2016.1217069.
- 29.** *Wang Y., Chan K.K.J., Chan W.* Plant uptake and metabolism of nitrofurantoin antibiotics in spring onion grown in nitrofurantoin-contaminated soil. // *J. Agric. Food Chem.* 2017. V. 65. № 21. P. 4255–4261. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01050.
- 30.** *Chen C., Chen W., Jiang J., Qian L., Zhang X.* Nitrofurantoin determination in aquaculture water by using poly-alizarin red-modified electrode. // *J. Electrochem. Soc.* 2019. V. 166. № 10. P. 425–432. DOI: 10.1149/2.0551910jes.

- 31.** *Chen C., Chen W., Jiang J., Qian L., Qiu F.* Preparation and application of nitrofuran sensor in aquaculture water. // *Int. J. Environ. An. Ch.* 2021. V. 101. № 8. P. 1099–1115. DOI: 10.1080/03067319.2019.1676423.
- 32.** *Leston S., Nunes M., Freitas A., Barbosa J., Ramos F., Pardal M.Á.* A LC–MS/MS methodology to determine furaltadone residues in the macroalgae *Ulva lactuca*. // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. P. 3832–3836. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.10.030.
- 33.** *Sniegocki T., Giergiel M., Sell B., Posyniak A.* New method of analysis of nitrofurans and nitrofuran metabolites in different biological matrices using UHPLC-MS/MS. // *J. Vet. Res.* 2018. V. 62. № 2. P. 161. DOI: 10.2478/jvetres-2018-0025.
- 34.** *McCracken R.J., Blanchflower W.J., Rowan C., McCoy M.A., Kennedy D.G.* Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography–mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues. // *Analyst.* 1995. V. 120. P. 2347–2351. DOI: 10.1039/an9952002347.
- 35.** *Chu P.S., Lopez M.I.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans. // *J. Agric. Food Chem.* 2005 V. 53. P. 8934–8939. DOI: 10.1021/jf051615o.
- 36.** *Barbosa, J.; Freitas, A.; Moura, S.; Mourão, J. L.; Noronha da Silveira, M. I.; Ramos, F.* Detection, accumulation, distribution, and depletion of furaltadone and nifursol residues in poultry muscle, liver, and gizzard. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 11927–11934. DOI: 10.1021/jf2029384.
- 37.** *McCracken, R.J., van Rhijn, J.A., Kennedy, D.G.* The occurrence of nitrofuran metabolites in the tissues of chickens exposed to very low dietary concentrations of the nitrofurans. // *Food Addit. Contam.* 2005. V. 22. № 6. P. 567–572 DOI: 10.1080/02652030500137868.
- 38.** *McCracken, R.J., Kennedy, D.G.* Furazolidone in chicken: Case study of an incident of widespread contamination. // *Br. Poult. Sci.* 2013. V. № 6. P. 704–712 DOI: 10.1080/00071668.2013.850152.
- 39.** *Zuidema T., Mulder P.P.J., van Rhijn J.A., Keestra N.G.M., Hoogenboom L.A.P., Schat B., Kennedy D.G.* Metabolism and depletion of nifursol in broilers. // *Anal. Chim. Acta* 2005. V. 529. P. 339–346. DOI: 10.1016/j.aca.2004.08.044.
- 40.** *Chu P.-S., Lopez M.I., Abraham A., El Said K.R., Plakas S.M.* Residue depletion of nitrofuran drugs and their tissue-bound metabolites in channel catfish (*Ictalurus*

- punctatus) after oral dosing. // *J. Agric. Food. Chem.* 2008. V. 56. № 17. P. 8030–8034. DOI: 10.1021/jf801398p.
- 41.** *McCracken R.J., Buurman M., Kennedy D.G.* Residues of nitrofurantoin antibiotic parent compounds and metabolites in eyes of broiler chickens. // *Food Addit. Contam., Part A* 2008. V. 25. № 5. P. 548–556. DOI: 10.1080/02652030701586657.
- 42.** *McCracken, R.J., Kennedy, D.G.* Detection, accumulation and distribution of nitrofurantoin residues in egg yolk, albumen and shell. // *Food Addit. Contam.* 2007. V. 24 №1. P. 26–33. DOI: 10.1080/02652030600967214.
- 43.** *Vroomen L.H., Berghmans M.C., Van Bladeren P.J., Groten J.P., Wissink C.J., Kuiper H.A.* In Vivo and in Vitro metabolic studies of furazolidone: A risk evaluation. // *Drug Metab. Rev.* 1990. V. 22. № 6–8. P. 663–676. DOI: 10.3109/03602539008991460
- 44.** *McCracken R.J., Kennedy D.G.* The bioavailability of residues of the furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in porcine tissues and the effect of cooking upon residue concentrations. // *Food Addit. Contam.* 1997. V. 14. P. 507–513. DOI: 10.1080/02652039709374558
- 45.** *Cooper K.M., Kennedy D.G.* Stability studies of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics during storage and cooking. // *Food Addit. Contam.* 2007. V. 24 № 9. P. 935–942. DOI: 10.1080/02652030701317301
- 46.** *Lázaro de la Torre C.A., Blanco J.E., Silva J.T, Flosi-Paschoalin V.M., Conte-Júnior C.A.* Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. // *Arq. Inst. Biol.* 2015. V. 82. P. 1–9. DOI: 10.1590/1808-1657000532013.
- 47.** *Zhou Q., Gao Y.-S., Tang M.-J., Zhang J., Zhang X.-Y., Gu R., Lu J.-X., Zhao M., Yang X.-X., Wan Y.* Progress on determination methods of nitrofurantoin metabolites in foods. // *J. Food Saf. Qual.* 2016. V. 7. P. 3285–3290.
- 48.** *Li F., Chen Y., Li X.-G., Li X.-M., Yu F.-J.* Progress on determination of nitrofurantoin and their metabolites in animal-derived food. // *J. Food Saf. Qual.* 2016. V. 7. P. 2320–2327.
- 49.** *Ramos F., Santos L., Barbosa J.* Chapter 43 – Nitrofurantoin veterinary drug residues in chicken eggs. // *Egg Innovations and Strategies for Improvements* 2017. P. 457–464. DOI: 10.1016/B978-0-12-800879-9.00043-3.

- 50.** Wu W., Yang S., Liu J., Mi J., Dou L., Pan Y., Mari G.M., Wang Z. Progress in immunoassays for nitrofurans detection. // *Food Agric. Immunol.* 2020. V. 31. № 1. P. 890–909. DOI: 10.1080/09540105.2020.1786672.
- 51.** Tian X., Li H., Han D., Wen F., Liu H., Liu G., Peng K., Gong X., Liu X., Wang W., Yu H., Xu Y. Sources, toxicity and detection techniques of semicarbazide: a review. // *J. Ocean U. China* 2021. V. 20 № 5 1263–1275. DOI: 10.1007/s11802-021-4688-1.
- 52.** Wang J.R., Zhang L.Y. Simultaneous determination and identification of furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, and nitrovin in feeds by HPLC and LC–MS. // *J. Liq. Chromatogr.* 2006. V. 29. P. 377–390. DOI:10.1080/10826070500451962.
- 53.** Barbosa J., Moura S., Barbosa R., Ramos F. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography–UV photodiode array detection and liquid chromatography–ionspray tandem mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 586. P. 359–365. DOI:10.1016/j.aca.2006.11.053.
- 54.** Hu X.Z., Xu Y., Yediler A. Determinations of residual furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in fish feeds by HPLC–UV and LC–MS/MS, respectively. // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 1144–1149. DOI: 10.1021/jf062902a.
- 55.** Li J., Liu J., Zhang H.-C., Li H., Wang J.-P. Broad specificity indirect competitive immunoassay for determination of nitrofurans in animal feeds. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 678. P. 1–6. DOI: 10.1016/j.aca.2010.07.025.
- 56.** Thongsrisomboon P., Liawruangrath B., Liawruangrath S., Satienerakul S. Determination of nitrofurans residues in animal feeds by flow injection chemiluminescence procedure. // *Food Chem.* 2010. V. 123. P. 834–839. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.018
- 57.** Liu W., Kou J., Jiang X., Zhang Z., Qi H. Determination of nitrofurans in feeds based on silver nanoparticle–catalyzed chemiluminescence. // *J. Lumin.* 2012. V. 132. P. 1048–1054. DOI: 10.1016/j.jlumin.2011.12.004.
- 58.** Wilasinee D., Sutthivaiyakit P., Sutthivaiyakit S. Determination of nitrofurans in chicken feed by High–Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. // *Anal. Lett.* 2015. V. 48. P. 1979–1987. DOI: 0.1080/00032719.2015.1015075.

- 59.** *Ardsoongnearn C., Boonbanlu O., Kittijaruwattana S., Suntornsuk L.* Liquid chromatography and ion trap mass spectrometry for simultaneous and multiclass analysis of antimicrobial residues in feed water. // *J. Chromatogr. B* 2014. V. 945–946. P. 31–38. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.11.034.
- 60.** *Valese A.C., Molognoni L., de Souza N.C., de Sá Ploêncio L.A., Costa A.C.O., Barreto F., Daguer H.* Development, validation and different approaches for the measurement uncertainty of a multi-class veterinary drugs residues LC–MS method for feeds. // *J. Chromatogr. B* 2017. V.1053 P. 48–59. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.03.026.
- 61.** *Hoff R.B., Molognoni L., Deolindo C.T.P., Vargas M.O., Kleemann C.R., Daguer H.* Determination of 62 veterinary drugs in feedingstuffs by novel pressurized liquid extraction methods and LC-MS/MS. // *J. Chromatogr. B* 2020. V. 1152 P. 122232. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122232.
- 62.** *Cooper K.M., Mulder P.P.J., van Rhijn J.A., Kovacsics L., McCracken R.J., Young P.B., Kennedy D.G.* Depletion of four nitrofurantoin antibiotics and their tissue-bound metabolites in porcine tissues and determination using LC-MS/MS and HPLC-UV. // *Food Addit. Contam.* 2005. V. 22. № 5. P. 406–414. DOI: 10.1080/02652030512331385218.
- 63.** ГОСТ 32014–2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс–спектрометрическим детектором (с Изменением N 1, с Поправками). М.: Стандартинформ, 2013.
- 64.** *Øye B.E., Couillard F.D., Valdersnes S.* Complete validation according to current international criteria of a confirmatory quantitative method for the determination of nitrofurantoin metabolites in seafood by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2019. V. 300. P. 125175. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125175
- 65.** *Guichard P., Laurentie M., Hurtaud-Pessel D., Verdon E.* Confirmation of five nitrofurantoin metabolites including nifursol metabolite in meat and aquaculture products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: validation according to european union decision 2002/657/ec. // *Food Chem.* 2021. V. 342. P. 128389. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128389.

- 66.** Yan X.D., Zhang L.J., Wang J.P. Residue depletion of nitrovin in chicken after oral administration. // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59. P. 3414–3419. DOI: 10.1021/jf104771e.
- 67.** Regan G., Moloney M., Di Rocco M. Development and validation of a rapid LC–MS/MS method for the confirmatory analysis of the bound residues of eight nitrofurans in meat using microwave reaction. // Anal. Bioanal. Chem. 2022. V. 414 P. 1375–1388. DOI: 10.1007/s00216-021-03763-0.
- 68.** Gao F., Zhang Q.D., Zhang Z.H., Yan X.D., Zhang H.C., Wang J.P. Residue depletion of nifuroxazide in broiler chicken. // J. Sci. Food Agric. 2013. V. 93 P. 2172–2178. DOI: 10.1002/jsfa.6024.
- 69.** Yuan G., Zhu Z., Yang P. Simultaneous determination of eight nitrofurans residues in shellfish and fish using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // J. Food Compos. Anal. 2020. V. 92 P. 103540. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103540.
- 70.** Regulation C. Commission Regulation (EU) No 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC. // Off J Eur Union. 2019. L289. P. 41–46. DOI: 10.1515/macvetrev-2015-0060.
- 71.** Alkan F., Kotan A., Özdemir N. Development and validation of confirmatory method for analysis of nitrofurans metabolites in milk, honey, poultry meat and fish by liquid chromatography–mass spectrometry. // Maced. Vet. Rev. 2016. V. 39. № 1. P. 15. DOI: 10.1515/macvetrev-2015-0060
- 72.** Куликовский А.В., Горлов И.Ф., Сложеникина М.И., Вострикова Н.Л., Иванкин А.Н., Кузнецова О.А. Определение нитрофуранов в мышечной ткани методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс–спектрометрическим детектированием. // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 75. № 8. С. 703. DOI: 10.1134/S106193481907013X.
- 73.** Kim D., Kim B., Hyung S.–W., Lee C.H., Kim J. An optimized method for the accurate determination of nitrofurans in chicken meat using isotope dilution–liquid chromatography/mass spectrometry. // J. Food Compos. Anal. 2015. V. 40 P. 24–31. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.12.005.

- 74.** Lv Z., Luo Z., Lu J., Xu Z., Zhang W., Chen A. Analysis of metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal-derived food by UPLC-MS/MS. // *Int. Food Res. J.* 2021. V. 28. № 3. P. 467–478.
- 75.** Zhang Y., Qiao H., Chen C., Wang Z., Xia X. Determination of nitrofurantoin metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2016. V. 192 P. 612–617. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.035.
- 76.** An H., Henry M., Cain T., Tran B., Paek H.C., Farley D. Determination of total nitrofurantoin metabolites in shrimp muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the atmospheric pressure chemical ionization mode. // *J. AOAC Int.* 2012. V. 95. № 4. P. 1222–1233. DOI: 10.5740/jaoacint.11-305.
- 77.** Douny C., Widart J., De Pauw E., Silvestre F., Kestemont P., Tu H.T., Phuong N.T., Maghuin-Rogister G., Scippo M.-L. Development of an analytical method to detect metabolites of nitrofurantoin application to the study of furazolidone elimination in Vietnamese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). // *Aquaculture* 2013. V. 376–379. P. 54–58. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.11.001.
- 78.** Hossain M.B., Ahmed S., Rahman M.F., Kamaruzzaman B.Y., Jalal K.C.A., Amin S.M.N. Method development and validation of nitrofurantoin metabolites in shrimp by liquid chromatographic mass spectrometric system. // *J. Biol. Sci.* 2013. V. 13. № 1. P. 33–37. DOI: 10.3923/jbs.2013.33.37.
- 79.** Valera-Tarifa N.M., Plaza-Bolaños P., Romero-González R., Martínez-Vidal J.L., Garrido-Frenich A. Determination of nitrofurantoin metabolites in seafood by ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. // *J. Food Compos. Anal.* 2013. V. 30 P. 86–93. DOI: 10.1016/j.jfca.2013.01.010.
- 80.** Śniegocki T., Giergiel M., Sell B., Posytniak A. New method of analysis of nitrofurantoin and nitrofurantoin metabolites in different biological matrices using UHPLC-MS/MS. // *J. Vet. Res.* 2018. V. 62. P. 161–166. DOI: 10.2478/jvetres-2018-0025.
- 81.** Jia Q., Yu S., Cheng N., Wu L., Jia J., Xue X., Cao W. Stability of nitrofurantoin residues during honey processing and nitrofurantoin removal by macroporous adsorption resins. // *Food Chem.* 2014. V. 162. № 6. P. 110–116. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.046.

- 82.** *Ryu E., Park J.S., Giri S.S., Park S.C.* Development and validation of a LC-MS/MS method for the determination of nitrofuran metabolites in soft-shell turtle powder health food supplement. // *Int. J. Anal. Chem.* 2021. V. 2021. P. 8822448. DOI: 10.1155/2021/8822448.
- 83.** *Park M.S., Kim K.T., Kang J.S.* Development of an analytical method for detecting nitrofurans in bee pollen by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1046 P. 172–176. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.11.042.
- 84.** *Violantea F.G.M., de O. Rosas C., de F. Guimarães E., de C. Vital H., Zúñiga N.O.C., de A. Neto F.R.* Feasibility study for the development of a certified reference material of nitrofuran metabolites in chicken breast muscle from incurred samples. // *Measurement* 2018. V. 129 P. 368–375. DOI: 10.1016/j.measurement.2018.07.027.
- 85.** *Barbosa J., Freitas A., Mourão J.L., Noronha Da Silveira M.I., Ramos F.* Determination of furaltadone and nifursol residues in poultry eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60 № 17. P. 4227–4234. DOI: 10.1021/jf205186y.
- 86.** *Wang C., Qu L., Liu X., Zhao C., Zhao F., Huang F., Zhu Z., Han C.* Determination of a metabolite of nifursol in foodstuffs of animal origin by liquid–liquid extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. // *J. Sep. Sci.* 2017. V. 40. № 3. P. 671–676. DOI: 10.1002/jssc.201600996.
- 87.** *Chen R., Li J., Yang Z.* Determination of 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide in honey by solid-phase extraction-ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. Food Prot.* 2020. V. 83 № 5. P. 910–914. DOI: 10.4315/JFP-19-532.
- 88.** *McCracken R., Hanna B., Ennis D., Cantley L., Faulkner D., Kennedy D.G.* The occurrence of semicarbazide in the meat and shell of Bangladeshi fresh-water shrimp. // *Food Chem.* 2013. V. 136. P. 1562–1567. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.088.
- 89.** *Zhang X., Chen S., Xu H., Zhang S., Yan Z., Wang J.* Identification and occurrence of endogenous semicarbazide in prawns and crabs from Zhejiang province, China. // *Food Addit. Contam. Part A* 2016. V. 33. P. 252–258. DOI: 10.1080/19440049.2015.1131336.
- 90.** *Verdon E, Couedor P, Sanders P.* Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five

major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 586. № 1. P. 336–347. DOI: 10.1016/j.aca.2007.01.024.

**91.** *Johnston L., Croft M., Murby J.* Fortified versus incurred residues: extraction of furazolidinone metabolite from prawn. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. P. 4535–4540. DOI: 10.1007/s00216-015-8653-y.

**92.** *Wu S., Yang B., Yu H.* A rapid derivatization method for analyzing nitrofurans metabolites in fish using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2020. V. 310. P. 125814. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125814.

**93.** *Wang K., Kou Y., Wang M., Ma X., Wang J.* Determination of nitrofurans metabolites in fish by ultraperformance liquid chromatography-photodiode array detection with thermostatic ultrasound-assisted derivatization. // *ACS Omega.* 2020. V. 5. № 30. P. 18887–18893. DOI: 10.1021/acsomega.0c02068.

**94.** *Palaniyappan V., Nagalingam A.K., Ranganathan H.P., Kandhikuppam K. B., Kothandam H.P., Vasu S.* Microwave-assisted derivatisation and LC–MS/MS determination of nitrofurans metabolites in farm-raised prawns (*Penaeus monodon*). // *Addit. Contam. Part A.* 2013. V. 30. № 10. P. 1739–1744. DOI: 10.1080/19440049.2013.816896

**95.** *Tao Y., Chen D., Wei H., Yuanhu P., Liu Z., Huang L., Wang Y., Xie S., Yuan Z.* Development of an accelerated solvent extraction, ultrasonic derivatisation LC–MS/MS method for the determination of the marker residues of nitrofurans in freshwater fish. // *Food Addit. Contam. Part A.* 2012. V. 29. № 5. P. 736–745. DOI: 10.1080/19440049.2011.651629.

**96.** *Chumanee S., Sutthivaiyakit S., Sutthivaiyakit P.* New reagent for trace determination of protein-bound metabolites of nitrofurans in shrimp using liquid chromatography with diode array detector. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. P. 1752–1759. DOI:10.1021/jf803423r

**97.** *Tang T., Wei F., Wang X., Ma Y., Song Y., Ma Y., Song Q., Xu G., Cen Y., Hu Q.* Determination of semicarbazide in fish by molecularly imprinted stir bar sorptive

extraction coupled with high performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B* 2018. V. 1076. P. 8–14. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.01.003.

**98.** *Wei T., Li G., Zhang Z.* Rapid determination of trace semicarbazide in flour products by high-performance liquid chromatography based on a nucleophilic substitution reaction. // *J. Sep. Sci.* 2017. V. 40 № 9. P. 1993–2001. DOI: 10.1002/jssc.201700045.

**99.** *Zhang S., Guo Y., Yan Z., Sun X., Zhang X.* A selective biomarker for confirming nitrofurazone residues in crab and shrimp using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 8971–8977. DOI: 10.1007/s00216-015-9058-7.

**100.** *Zhang S., Li P.P., Yan Z., Long J., Zhang X.* Identification and quantification of nitrofurazone metabolites by ultraperformance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry with precolumn derivatization. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. P. 2255–2260. DOI: 10.1007/s00216-017-0191-3.

**101.** *Gong J., Li J., Yuan H., Chu B., Lin W., Cao Q., Zhao Q., Fang R., Li L., Xiao G.* Determination of four nitrofuran metabolites in gelatin Chinese medicine using dispersive solid phase extraction and pass-through solid phase extraction coupled to ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B* 2020. V. 1146 P. 122018. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122018.

**102.** *Sheng L.–Q., Chen M.–M., Chen S.–S., Du N.–N., Liu Z.–D., Song C.–F., Qiao R.* High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of nitrofuran metabolites in pork muscle. // *Food Addit. Contam. Part A.* 2013. V. 30. № 12. P. 2114–2122. DOI: 10.1080/19440049.2013.849387.

**103.** *Du N.–N., Chen M.–M.* Determination of nitrofuran metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent. // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1327. P. 90–96. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.12.065.

**104.** *Li G., Tang C., Wang Y., Yang J., Wu H., Chen G., Kong X., Kong W., Liu S., You J.* A rapid and sensitive method for semicarbazide screening in foodstuffs by HPLC with fluorescence detection. // *Food Anal. Methods.* 2014. V. 8. № 7. P. 1804–1811. DOI: 10.1007/s12161-014-0063-9.

**105.** *Wang Y., Chan W.* Automated in-injector derivatization combined with high performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of

semicarbazide in fish and bread samples. // *J. Agric. Food Chem.* 2016. V. 64. № 13. P. 2802–2808. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00651.

**106.** *Yu Y., Li N., Jin Q., Ji Z., Sun Z., Li G., Zhang S., You J.* Novel fluorescence labeling reagent 4-(carbazole-9-yl)-benzyl chloroformate and its application in the determination of nitrofurans metabolites compounds in foodstuffs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. // *Microchem. J.* 2019. V. 145. P. 9–17. DOI: 10.1016/j.microc.2018.10.021.

**107.** *Luo X., Sun Z., Wang X., Li G., You J.* Determination of nitrofurans metabolites in marine products by high performance liquid chromatography-fluorescence detection with microwave-assisted derivatization. // *New J. Chem.* 2019. V. 43. P. 2649–2657. DOI: 10.1039/C8NJ05479G.

**108.** *Luo X., Yu Y., Kong X., Wang X., Ji Z., Sun Z., You J.* Rapid microwave assisted derivatization of nitrofurans metabolites for analysis in shrimp by high performance liquid chromatography–fluorescence detector. // *Microchem. J.* 2019. V. 150. P. 139–145. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104189

**109.** *Kong X., Sun Z., Liu S., Luo X., Li G.* Determination of semicarbazide in foodstuffs by HPLC with fluorescence detection using 2-formylphenylboronic acid as derivatization reagent. // *Chromatographia* 2019. V. 82 P. 1051-1058. DOI: 10.1007/s10337-019-03734-9.

**110.** *Wang K., Wang M., Kou Y., Guo C., Ma X., Tian B., Qi Y., Wang W., Wang J.* Determination of nitrofurans metabolites in meat products by UHPLC-fluorescence with ultrasonic-assisted derivatization. // *J. Food Compos. Anal.* 2022. V.107. P. 75. DOI: 10.1016/j.jfca.2021.104375.

**111.** *Fernando R., Munasinghe D.M.S., Gunasena A.R.C., Abeynayake P.* Determination of nitrofurans metabolites in shrimp muscle by liquid chromatography–photo diode array detection. // *Food Control* 2017. V. 72. P. 300–305. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.08.044.

**112.** *Delatour T., Racault L., Bessaire T., Desmarchelier A.* Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges. // *Food Addit. Contam. Part A* 2018. V. 35. P. 633–646. DOI: 10.1080/19440049.2018.1426890.

- 113.** *Stolker A.A.M., Zuidema T., Nielen M.W.F., Nielen M.W.F.* Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. // *Trends Anal. Chem.* 2007. V. 26. P. 967 – 979. DOI: 10.1016/j.trac.2007.09.008.
- 114.** *Bogialli S., Di Corcia A.* Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. №4. P. 947 – 966. DOI: 10.1007/s00216-009-2930-6.
- 115.** *Rocca L.M., Gentili A., Pérez-Fernández V., Tomai P.* Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. // *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 2017. V. 34. P. 766 – 805. DOI: 10.1080/19440049.2017.1298846.
- 116.** *Steiner D., Malachová A., Sulyok M., Krska R.* Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 413 P. 25–34. DOI: 10.1007/s00216-020-03015-7.
- 117.** *Rossi R., Saluti G., Moretti S., Diamanti I., Giusepponi D., Galarini R.* Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: a review. // *Food Addit. Contam. Part A – Chem.* 2018. V. 35. P. 241–258. DOI: 10.1080/19440049.2017.1393107.
- 118.** *Moreno-Bondi M.C., Marazuela M.D., Herranz S., Rodriguez E.* An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. P. 921 – 946. DOI: 10.1007/s00216-009-2920-8.
- 119.** *Kinsella B., O'Mahony J., Malone E., Moloney M., Cantwell H., Furey A., Danaher M.* Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 7977 – 8015. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.005.
- 120.** *Berendsen B.J.A., Stolker L.A.A.M., Nielen M.W.F., Nielen M.W.F.* Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. // *Trends Anal. Chem.* 2013. V. 43. P. 229 – 239. DOI:10.1016/j.trac.2012.09.019.

- 121.** *Vinas P., Campillo N., Lopez-García I., Hernandez-Cordoba M.* Dispersive Liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 406. P. 2067 – 2099. DOI:10.1007/s00216-013-7344-9.
- 122.** *Faraji M., Yamini Y., Gholami M.* Recent Advances and Trends in Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Food and Environmental Analysis. // *Chromatographia.* 2019. V. 82 P. 1207 – 1249. DOI: 10.1007/s10337-019-03726-9.
- 123.** *Zhang C., Deng Y., Zheng J., Zhang Y., Yang L., Liao C., Su L., Zhou Y., Gong D., Chen L., Luo A.* The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019. V. 118 P. 517–537. DOI: 10.1016/j.trac.2019.06.012.
- 124.** *Han R.W., Zheng N., Yu Z.N., Wang J., Xu X.M., Qu X.Y., Li S.L., Zhang Y.D., Wang J.Q.* Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS. // *Food Chem.* 2015. V. 181. P. 119–126. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.041.
- 125.** *Wang J., Leung D., Chow W., Chang J., Wong J.W.* Development and validation of a multiclass method for analysis of veterinary drug residues in milk using ultrahigh performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole orbitrap mass spectrometry. // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. P. 9175–9187. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04096.
- 126.** *Амелин В.Г., Федина Н.М., Подколзин И.В., Коротков А.И.* Быстрый скрининг и определение остаточных количеств ветеринарных препаратов в молоке методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии-квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 6. С. 461–472. DOI: 10.7868/S0044450218060075.
- 127.** *Liu H., Lin T., Lin X., Shao J., Li, Q.* QuEChERS with magnetic hydrophilic–lipophilic balanced adsorbent and its application in multi-class veterinary residues in milk by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Chromatographia* 2018. V. 81. P. 265–275. DOI: 10.1007/S10337-017-3433-9.
- 128.** *Амелин В.Г., Андоралов А.М., Волкова Н.М., Коротков А.И., Никешина Т.Б., Сидоров И.И., Тимофеев А.А.* Идентификация и определение токсикантов с использованием стандартной добавки в пищевых продуктах, продовольственном сырье и кормах методом высокоэффективной жидкостной

хроматографии/времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. № 2. С. 189–207. DOI: 10.15826/analitika.2015.19.2.010.

**129.** *Amelin V., Korotkov A., Andoralov A.* Identification and determination of 492 contaminants of different classes in food and feed by high-resolution mass spectrometry using the standard addition method. // J. AOAC Int. 2016. V. 99. № 6. P. 1600–1618. DOI: 10.5740/jaoacint.16-0069.

**130.** *Chen D., Yu J., Tao Y., Pan Y., Xie S., Huang L., Peng D., Wang X., Wang Y., Liu Z., Yuan Z.* Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 2016. V.1017-1018 P. 82. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.02.037.

**131.** *Kang J., Park S.J., Park H.C., Hossain M.A., Kim M.A., Son S.W., Cho B.H.* Multiresidue screening of veterinary drugs in meat, milk, egg, and fish using liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2017. V. 182. № 2. P. 635–652. DOI: 10.1007/s12010-016-2350-y.

**132.** *Dasenaki, M.E., & Thomaidis, N.S.* Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // Anal. Chim. Acta 2015. V. 880. P. 103–121. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.013.

**133.** *Dasenaki M.E., Bletsou A.A., Koulis G.A., Thomaidis N.S.* Qualitative multiresidue screening method for 143 veterinary drugs and pharmaceuticals in milk and fish tissue using liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. // J. Agric. Food Chem. 2015.V. 63. P. 4493–4508. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00962.

**134.** *Piatkowska M., Gbylik-Sikorska M., Gajda A., Jedziniak P., Bladdek T., Zmudzki J., Posyniak A.* Multiresidue determination of veterinary medicines in lyophilized egg albumen with subsequent consumer exposure evaluation. // Food Chem. 2017. V. 229 P. 646–652. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.147.

**135.** *Wang K., Lin K., Huang X., Chen M.* A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS. // J. Agric. Food Chem. 2018. V. 65 P. 5064–5073. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01777.

- 136.** Wang C., Li X., Yu F., Wang Y., Ye D., Hu X., Zhou L., Du J., Xia X. Multi-class analysis of veterinary drugs in eggs using dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // Food Chem. 2021. V. 334. P. 127598. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127598.
- 137.** Azzouz A, Ballesteros E. Multiresidue method for the determination of pharmacologically active substances in egg and honey using a continuous solid-phase extraction system and gas chromatography-mass spectrometry. // Food Chem. 2015. V. 178. P. 63–69. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.044.
- 138.** Geis-Asteggiante L., Lehotay S.J., Lightfield A.R., Dutko T., Chilton Ng., Bluhm L. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for > 100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. A. 2012. V. 1258 P. 43–54. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.020.
- 139.** Schneider M.J., Lehotay S.J., Lightfield A.R. Validation of a streamlined multiclass, multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. P. 4423–4435. DOI: 10.1007/s00216-014-8386-3.
- 140.** Tang Y.Y., Lu H.F., Lin H.Y., Shin Y.C., Hwang D.F. Development of a quantitative multi-class method for 18 antibiotics in chicken, pig, and fish muscle using UPLC-MS/MS. // Food Anal. Methods. 2012. V. 5. P. 1459–1468. DOI: 10.1007/s12161-012-9388-4.
- 141.** Zhang Z., Li X., Ding S., Jiang H., Shen J., Xia X. Multiresidue analysis of sulfonamides, quinolones, and tetracyclines in animal tissues by ultra-high performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry. // Food Chem. 2016. V. 204, P. 252–262. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.142.
- 142.** Zhang Y., Li X., Liu X., Zhang J., Cao Y., Shi Z., Sun H. Multi–class, multi–residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra–performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. // J. Dairy Sci. 2015. V. 98 № 12. P. 8433–8444. DOI: 10.3168/jds.2015-9826.
- 143.** Zhang Y., Li X., Liu X., Zhang J., Cao Y., Shi Z., Sun H. Rapid screening and quantification of multi–class multi–residue veterinary drugs in royal jelly by ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole time–of–flight mass

spectrometry. // *Food Control* 2016. V. 60. P. 667–676. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.09.010.

**144.** *Ryu E.C., Park J.-S., Giri S.S., Park S.C.* A simplified modification to rapidly determine the residues of nitrofurans and their metabolites in aquatic animals by HPLC triple quadrupole mass spectrometry. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021. V. 28. P. 7551–7563. DOI: 10.1007/s11356-020-11074-7.

**145.** *Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Walker S., Widmer M.* Determination of nitrofurans and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta* 2015. V. 862. P. 41–52. DOI: 10.1016/j.aca.2014.12.036.

**146.** *An H., Parrales L., Wang K., Cain T., Hollins R., Forrest D., Liao B., Paek H.C., Sram J.* Quantitative analysis of nitrofurans metabolites and chloramphenicol in shrimp using acetonitrile extraction and liquid chromatograph-tandem mass spectrometric detection: A single laboratory validation. // *J. AOAC Int.* 2015. V. 98 № 3. P. 602–608. DOI: 10.5740/jaoacint.14-262.

**147.** *El-Demerdash A., Song F., Reel R.K., Hillegas J., Smith R.E.* Simultaneous determination of nitrofurans metabolites and chloramphenicol in shrimp with a single extraction and LC–MS/MS analysis. // *J. AOAC Int.* 2015. V. 98. № 3. P. 595–601. DOI: 10.5740/jaoacint.14-261.

**148.** *Veach B.T., Baker C.A., Kibbey J.H., Fong A., Broadaway B.J., Drake C.P.* Quantitation of chloramphenicol and nitrofurans metabolites in aquaculture products using microwave-assisted derivatization, automated SPE, and LC–MS/MS. // *J. AOAC Int.* 2015. V. 98. № 3. P. 588–594. DOI: 10.5740/jaoacint.14-271.

**149.** *Veach B.T.* Determination of chloramphenicol and nitrofurans metabolites in cobia, croaker, and shrimp using microwave-assisted derivatization, automated SPE, and LC–MS/MS—results from a U.S. food and drug administration level three inter-laboratory study. // *J. AOAC Int.* 2020. V. 103. № 4. P. 1043–1051. DOI: 10.1093/jaoacint/qsaa019.

**150.** *Veach B.T., Anglin R., Mudalige T.K., Barnes P.J.* Quantitation and confirmation of chloramphenicol, florfenicol, and nitrofurans metabolites in honey using LC–MS/MS. // *J. AOAC Int.* 2018. V. 101. № 3. P. 897–903. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0262.

**151.** *Aldeek F., Hsieh K.C., Ugochukwu O.N., Gerard G., Hammack W.* Accurate quantitation and analysis of nitrofurans metabolites, chloramphenicol, and florfenicol in

seafood by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method validation and regulatory samples. // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. № 20. P. 5018–5030. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04360.

**152.** *Zhang Z., Wu Y., Li X., Wang Y., Li H., Fu Q., Shan Y., Liu T., Xia X.* Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2017. V. 217. P. 182–190. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.097.

**153.** *Shendy A.H., Al-Ghobashy M.A., Gad Alla S.A., Lotfy H.M.* Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey. // *Food Chem.* 2016. V. 190. P. 982–989. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.048.

**154.** *Tsai M.-Y., Lin C.-F., Yang W.-C., Lin C.-T., Hung K.-H., Chang G.-R.* Health risk assessment of banned veterinary drugs and quinolone residues in shrimp through liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *Appl. Sci.* .2019. V. 9 P. 245–256. DOI: 10.3390/app9122463.

**155.** *Chen D., Delmas J.-M., Hurtaud-Pessel D., Verdon E.* Development of a multi-class method to determine nitroimidazoles, nitrofurans, pharmacologically active dyes and chloramphenicol in aquaculture products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2020. V. 311 P. 125294. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125924.

**156.** *Yang M., Yi J., Wei C., Lu Y., Yang Y., Yang Z., Zhao L., Jiang X., Tu F.* Rapid determination of nitrofurans metabolites residues in honey by ultrasonic assisted derivatization - QuEChERS - high performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. // *J Food Compost Anal* 2022. V. 114. P. 104812. DOI: 10.1016/j.jfca.2022.104812.

**157.** *Zhang C., Deng Y., Zheng J., Zhang Y., Yang L., Liao C., Su L., Zhou Y., Gong D., Chen L., Luo A.* The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019. V. 118. P. 517–537. DOI: 10.1016/j.trac.2019.06.012.

**158.** *Gong X., Li K., Xu W., Jin L., Liu M., Hua M., Tian G.,* Determination of Nitrofurans Metabolites in Complex Food Matrices Using a Rough, Cheap, Easy-Made

Wooden-Tip-Based Solid-Phase Microextraction Probe and LC-MS/MS. // *J. Inorg. Chem.* V. 2022. P. 1315276. DOI: 10.1155/2022/1315276.

**159.** *Rusen E., Diacon A., Mocanu A., Rizea F., Bucur B., Bucur M.P., Radu G.-L., Bacalum E., Cheregid M., David V.* Synthesis and retention properties of molecularly imprinted polymers for antibiotics containing a 5-nitrofuranyl ring. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 50844–50852. DOI: 10.1039/C7RA10196A.

**160.** *Zhao Z.-Y., Xiong Z.-H.* Removal of four nitrofurans drugs from aqueous solution by magnetic multi-wall carbon nanotubes. // *Fuller. Nanotub. Car. N.* 2014. V. 23. P. 640–648. DOI: 10.1080/1536383X.2014.947646.

**161.** *Дмитриенко С.Г., Тихомирова Т.И., Аняри В.В., Толмачева В.В., Кочук Е.В., Золотов Ю.А.* Применение сверхсшитых полистиролов для концентрирования и разделения органических соединений и ионов элементов. // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 11. С. 830–842. DOI: 10.1134/S004445021811004X.

**162.** *Толмачева В.В., Аняри В.В., Ибрагимова Б.Н., Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А.* Полимерный магнитный сорбент на основе наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и сверхсшитого полистирола для концентрирования антибиотиков тетрациклинового ряда. // *Журн. аналит. химии.* 2015. Т. 70. № 11. С. 1149–1157. DOI: 10.7868/S004445021511016X.

**163.** *Tolmacheva V.V., Apyari V.V., Furlatov A.A., Dmitrienko S.G., Zolotov Yu A.* Facile synthesis of magnetic hypercrosslinked polystyrene and its application in the magnetic solid-phase extraction of sulfonamides from water and milk samples before their HPLC determination. // *Talanta.* 2016. V. 152. P. 203–210. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.02.010.

**164.** *Pearson R.A., Evans C., Bendall J.G.* Nitrofurazone quantification in milk at the European Union minimum required performance limit of 1 ng g<sup>-1</sup>: circumventing the semicarbazide problem. // *Food Addit. Contam. Part A.* 2016. V. 33. P. 1324–1336. DOI: 10.1080/19440049.2016.1209692.

**165.** *Ardsoongnearn C., Boonbanlu O., Kittijaruwattana S., Suntornsuk L.* Liquid chromatography and ion trap mass spectrometry for simultaneous and multiclass analysis of antimicrobial residues in feed water. // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 945–946. P. 31–38. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.11.034.

**166.** ГОСТ 32014–2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью

высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (с Изменением N 1, с Поправками). М.: Стандартиформ, 2013.

**167.** *Даванков В.А., Цюрупа М.П.* Сверхсшитые полистирольные сорбенты. Структура, свойства, применение. Palmarium Academic Publishing, Саарбрукен, Германия, 2012. 76 с.

**168.** *Tsyurupa M.P., Davankov V.A.* Porous structure of hypercrosslinked polystyrene: state-of-art mini-review. // *React. Funct. Polym.* 2006. V. 66. P. 768–779. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2005.11.004

**169.** *Цюрупа М.П., Блинникова З.К., Проскурина Н.А., Пастухов А.В., Павлова Л.А., Даванков В.А.* Сверхсшитый полистирол – первый нанопористый полимерный материал. // *Рос. нанотехнол.* 2009. Т. 4. С. 109–117.

**170.** *Хрящевский А.В., Нестеренко П.Н., Тихомирова Т.И., Фадеева В.И., Шпигун О.А.* Патроны с макропористыми полимерными сорбентами для концентрирования первичных алифатических аминов при их определении методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // *Журн. аналит. химии.* 1997. Т. 52. № 5. С. 485 – 490.

**171.** *Хрящевский А.В., Подловченко М.Б., Нестеренко П.Н., Шпигун О.А.* Применение сверхсшитого макросетчатого полистирола для концентрирования фенолов. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 1998. Т. 39. № 3. С. 196 – 200.

**172.** *Penner N.A., Nesterenko P.N., Kryachevsky A.V., Stranadko T.N., Shpigun O.A.* A novel stationary phase for the high performance liquid chromatographic separation and determination of phenols. // *Mendeleev Commun.* 1998. V. 8. P. 24–26. DOI: 10.1070/MC1998v008n01ABEH000895

**173.** *Penner N.A., Nesterenko P.N., Ilyin M.M., Tsyurupa M.P., Davankov V.A.* Investigation of properties of hypercrosslinked polystyrene as stationary phase for high performance liquid chromatography. // *Chromatographia.* 1999. V. 50. P. 611– 620.

**174.** *Tolmacheva V.V., Yarykin D.I., Serdiuk O.N., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Zolotov Yu.A.* Adsorption of catecholamines from their aqueous solutions on hypercrosslinked polystyrene. // *React. Funct. Polym.* 2018. V. 131. P. 56–63. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2018.07.005.

- 175.** *Дмитриенко С.Г., Андреева Е. Ю., Толмачева В. В., Терентьева Е.А.* Особенности сорбции метилксантинов сорбентами различной природы. // Журн. физ. химии. 2013. Т. 87. № 5. С. 874 – 878. DOI: 10.7868/S0044453713050051.
- 176.** *Пеннер Н.А., Нестеренко П.Н., Рыбалко М.А.* Применение сверхсшитого полистирола для определения пирокатехина, резорцина и гидрохинона методом ОФ ВЭЖХ с предварительным динамическим концентрированием на потоке. // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. № 10. С.1067 – 1075.
- 177.** *Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г.* Сорбция сульфаниламидов на сверхсшитом полистироле. // Ж. физ. химии. 2011. Т. 85. № 1. С. 95 – 98.
- 178.** *Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Натчук С.В., Аняри В.В., Золотов Ю.А.* Концентрирование антибиотиков тетрациклиновой группы на сверхсшитом полистироле и их определение в водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 3. С. 273 – 278. DOI: 10.7868/S0044450215030226
- 179.** *Толмачева В.В., Аняри В.В., Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г.* Магнитные сорбенты на основе наночастиц оксидов железа для выделения и концентрирования органических соединений. // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 4. С. 339 – 356. DOI: 10.7868/S0044450216040071
- 180.** *Киселева М.С., Пряжников Д.В., Кубракова И.В.* Магнитный сорбент с мезопористой оболочкой для одновременного концентрирования экотоксикантов различной природы. // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 1. С. 14 – 21 DOI: 10.7868/S0044450218010024
- 181.** *Jiang H.-L., Li N., Cui L., Wang X., Zhao R.-S.* Recent application of magnetic solid phase extraction for food safety analysis. // TrAC Trends Anal. Chem. 2019. V. 120. P. 115632. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115632.
- 182.** *Li W.-K., Shi Y.-P.* Recent advances of magnetic extractants in food analysis. // TrAC Trends Anal. Chem. 2020. V. 129. P. 115951. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115951
- 183.** *Толмачева В.В., Аняри В.В., Ярыкин Д.И., Дмитриенко С.Г.* Спектрофотометрическое определение суммарного содержания сульфаниламидов в молоке после их сорбционного выделения с помощью магнитного сверхсшитого полистирола. // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 8. С. 867–873. DOI: 10.7868/S0044450216080156.

- 184.** *Peters R.J., Bolck Y.J., Rutgers P., Stolker A.A., Nielen M.W.* Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 46. P. 8206–8216. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.04.027.
- 185.** *Мелехин А.О., Толмачева В.В., Шубина Е.Г., Дмитриенко С.Г., Аняри 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–тандемной масс-спектрометрии. // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. №. 8. С. 708-722. DOI: 10.31857/S0044450221060049.
- 186.** *Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P., & Edder, P.* Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2009. V. 877. № 23. P. 2363–2374. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.006.
- 187.** *Desmarchelier A., Fan K., Tien M. M., Savoy M.-C., Tarres A., Fuger D., Goyon A., Bessaire T., Mottier P.* Determination of 105 antibiotic, anti-inflammatory, antiparasitic agents and tranquilizers by LC-MS/MS based on an acidic QuEChERS-like extraction. // *Food Addit. Contam. Part A* 2018. V. 35. № 4. P. 646–660. DOI: 10.1080/19440049.2018.1429677.
- 188.** *Guo Y., Wei W., Zhang Y., Dai Y., Wang W., Wang, A.* Determination of sulfadimethoxine in milk with aptamer-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/graphene oxide as magnetic solid-phase extraction adsorbent prior to HPLC. // *J. Sep. Sci.* 2020. V. 43. № 17. P. 3499–3508. DOI: 10.1002/jssc.202000277.
- 189.** *Zhao Y., Wu R., Yu H., Li J., Liu L., Wang S., Chen X., Chan T.-W. D.* Magnetic solid-phase extraction of sulfonamide antibiotics in water and animal-derived food samples using core-shell magnetite and molybdenum disulfide nanocomposite adsorbent. // *J. Chromatogr. A.* 2020. V. 1610. P. 460543. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460543.
- 190.** *Zhou Y., Liu H., Li J., Sun Z., Cai T., Wang X., Zhao S., Gong B.* Restricted access magnetic imprinted microspheres for directly selective extraction of tetracycline veterinary drugs from complex samples. // *J. Chromatogr. A.* 2020. V. 1613. P. 460684. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460684.

- 191.** *Vuran B., Ulusoy H. I., Sarp G., Yilmaz E., Morgül U., Kabir A., Soylak M.* Determination of chloramphenicol and tetracycline residues in milk samples by means of nanofiber coated magnetic particles prior to high-performance liquid chromatography-diode array detection. // *Talanta* 2021. V. 230. P. 122307. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122307.
- 192.** *Wei D., Guo M.* Facile preparation of magnetic graphene oxide/nanoscale zerovalent iron adsorbent for magnetic solid-phase extraction of ultra-trace quinolones in milk samples. // *J. Sep. Sci.* 2020. V. 43. № 15. P. 3093–3102. DOI: 10.1002/jssc.202000108.
- 193.** *Feng J., She X., He X., Zhu J., Li Y., Deng C.* Synthesis of magnetic graphene/mesoporous silica composites with boronic acid-functionalized pore-walls for selective and efficient residue analysis of aminoglycosides in milk. // *Food Chem.* 2018. V. 239. P. 612–621. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.052.
- 194.** *Bendall J.G., Crawford R.A., Evers J.M., Smythe B.W., Bessaire T., Mottier P., Mujahid C., Aleksic G., Hutchinson R.* Determination of nitrofurazone in fluid milk and dairy powders. Part 1: An international pilot study. // *Int. Dairy J.* 2019. V. 91. P 185–192.
- 195.** ГОСТ 31694–2012 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. М.: Стандартинформ, 2013.
- 196.** ГОСТ 34533–2019. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. М.: Стандартинформ, 2019.
- 197.** ГОСТ 34136–2017. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. М.: Стандартинформ, 2018.
- 198.** ГОСТ 32797–2014. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной

жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. М.:  
Стандартинформ, 2015.