

УДК 543

НОВЫЙ ДЕРИВАТИЗИРУЮЩИЙ АГЕНТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ НИТРОФУРАНОВ В КУРИНЫХ ЯЙЦАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ–ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2021 г. А. О. Мелехин^{a, b}, В. В. Толмачева^{a, *}, Е. Г. Шубина^b, С. Г. Дмитриенко^a, В. В. Апяри^a, А. И. Грудев^b, Ю. А. Золотов^a

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, Москва, 119991 Россия

^bЦентральная научно-методическая ветеринарная лаборатория
ул. Оранжевая, 23, Москва, 111622 Россия

*e-mail: nikatolm@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2021 г.

После доработки 14.05.2021 г.

Принята к публикации 14.05.2021 г.

5-Нитро-2-фуральдегид предложен в качестве нового дериватизирующего агента при определении четырех метаболитов нитрофуранов – 3-амино-2-оксазолидинона, 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинона, 1-аминогидантоина и семикарбазида в куриных яйцах методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Идентифицированы продукты реакции дериватизации. Показано, что ими являются исходные нитрофураны – фуразолидон, фуралтадон, нитрофурантоин и нитрофуразон соответственно. Пробоподготовка включает кислотный гидролиз и дериватизацию, удаление жиров экстракцией гексаном и дальнейшую очистку экстрактов на картриджах, заполненных сверхсшитым полистиролом Диапак П-3. Способ обеспечивает количественное выделение метаболитов (степени выделения составляют от 95 до 106%) и хорошую воспроизводимость ($s_r \leq 0.13$).

Ключевые слова: метаболиты нитрофуранов, 5-нитро-2-фуральдегид, сверхсшитый полистирол, твердофазная экстракция, яйца, ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

DOI: 10.31857/S0044450221110086

Нитрофураны представляют собой класс синтетических антибактериальных препаратов, которые используют в практической медицине с середины 20 века. Препараты нитрофурановой группы обладают широким спектром антимикробного действия и активны в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также трихомонад, лямблий, трипаносом и ряда других микроорганизмов, включая и те их штаммы, которые устойчивы к антибиотикам и сульфаниламидным препаратам [1]. До недавнего времени эти антимикробные препараты широко применяли в животноводстве в качестве стимуляторов роста, а также в ветеринарной практике для профилактики и лечения некоторых бактериальных инфекций у сельскохозяйственных животных, рыб, пчел и для уничтожения или замедления роста бактерий в аквакультурной промышленности [2].

В животноводстве чаще всего используют фуразолидон, фуралтадон, нитрофурантоин и нитрофуразон (фурацилин). Характерной чертой

этих нитрофуранов является быстрый метаболизм, приводящий к образованию основных метаболитов – 3-амино-2-оксазолидинона, 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинона, 1-аминогидантоина и семикарбазида соответственно [3]. Эти метаболиты 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 [4], во многих странах, включая Россию, их использование в ветеринарии было полностью запрещено [5, 6]. В Европейском и Таможенном союзах установлены максимально допустимые уровни (МДУ) остаточных количеств метаболитов нитрофуранов в продуктах питания (1 мкг/кг). Однако мониторинг качества пищевых продуктов, проводимый в разных странах, указывает на то, что, несмотря на установленный законом запрет, их продолжают использовать по причине высокой антибактериальной активности и низкой стоимости [7–10]. Таким образом, зада-

ча определения метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах животного происхождения на уровне МДУ по-прежнему остается актуальной.

В настоящее время идентификацию и определение метаболитов нитрофуранов в пищевых продуктах (в мясе [11–14], в том числе курином [15–17], яйцах [13, 15, 17–20], меде [13, 16, 20], молоке [13, 16, 21, 22], морепродуктах [23–26]) чаще всего проводят методом ВЭЖХ–танDEMной масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС). Проблемы, возникающие при их определении, в основном связаны с пробоподготовкой: необходимо проведение кислотного гидролиза – для освобождения метаболитов, связанных с белками, дериватизации – для получения более гидрофобных производных, дополнительных методов очистки – для удаления мешающих компонентов и минимизации матричных эффектов. И, наконец, еще одна проблема связана с высокой стоимостью 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 экстракции (ТФЭ).

Во всех официальных методиках [27–29] и работах, перечисленных выше, кислотный гидролиз и дериватизацию проводят в одну стадию путем длительного нагревания (не менее 16 ч при 37–40°C) анализируемых образцов с 0.1–0.2 М соляной кислотой и дериватирующим агентом, в качестве которого чаще всего используют 2-нитробензальдегид (2-НБА). В большинстве исследований гидролизат, содержащий производные метаболитов, дополнительно очищают с помощью ТФЭ [11, 13, 19–21, 23, 26] или жидкостно-жидкостной экстракции [12, 14–18, 22, 24, 25, 27].

Помимо 2-НБА для дериватизации используют, хотя и значительно реже, другие дериватирующие агенты. Так, например, 2-нафталальдегид [30], 2,4-динитрофенилгидразин [31] и *n*-диметиламинобензальдегид [32] использовали в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием, а 2-гидрокси-1-нафталальдегид [33, 34], 2-(11Н-бензо-[а]-карбазол-11-ил)этилхлорформиат [35], флуоренилметилоксикарбонил хлорид [36], 4-(карбазол-9-ил)бензилхлорформиат [37], 7-(диэтиламино)-2-оксохромен-3-карбальдегид [38] и 4-(акридон-10-ил)бензальдегид [39] – с флуоресцентным детектированием.

В настоящей работе для дериватизации метаболитов нитрофуранов предложено использовать новый дериватирующий агент 5-нитро-2-фуральдегид (5-НФА), а для очистки гидролизата – сверхшитый полистирол (ССПС), которые ранее для этих целей не применяли. Важно отметить, что метаболиты нитрофуранов взаимодействуют с 5-НФА с образованием соответствующих ис-

ходных нитрофуранов. Таким образом, при использовании этого дериватирующего агента становится возможным заранее выбрать условия пробоподготовки и определения с помощью нитрофуранов, а не продуктов дериватизации метаболитов, что ускоряет анализ и снижает его стоимость.

Цель настоящей работы состояла в изучении особенностей дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-НФА, идентификации полученных продуктов и оценке возможности использования ССПС Диапак П-3 для очистки гидролизата, полученного в процессе пробоподготовки куриных яиц перед ВЭЖХ–МС/МС-определением.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Использовали метанол для ВЭЖХ, ацетонитрил для ВЭЖХ, муравьиную кислоту, *n*-гексан (Fisher Scientific Inc., США), 5-нитро-2-фуральдегид (Sigma-Aldrich, США), соляную кислоту ч. д. а., гидрофосфат калия ч. д. а., трихлоруксусную кислоту ч. д. а., сверхшитый полистирол Диапак П-3 (БиоХимМак, Россия). Последний перед использованием активировали ацетонитрилом. Очищенную воду получали с помощью системы Milli-Q Synthesis (Millipore, США).

В качестве стандартных образцов использовали фуразолидон (ФЗ), фуралтадон (ФД), нитрофурантоин (НФТ), нитрофуразон (НФ), 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ), 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (АМОЗ), 1-аминогидантоина (АГД) гидрохлорид, семикарбазид (СЕМ) гидрохлорид с содержанием основного вещества не менее 95.0% (Sigma-Aldrich, США). В качестве внутренних стандартов метаболитов нитрофуранов использовали D5-3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (D5-АМОЗ), 13С3-аминогидантоин (13С3-АГД), D4-3-амино-2-оксазолидинон (D4-АОЗ), 15N,13С-семикарбазид (15N,13С-СЕМ) с содержанием основного вещества не менее 99.0% (Witega, Германия).

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

Анализируемые образцы. Использовали образцы яиц, собранные Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (Москва,

Россия) в 2021 г. в процессе государственного мониторинга пищевой продукции. Образцы хранили при -4°C в холодильнике.

Аппаратура. Использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф ExionLC (Shimadzu, Япония) в сочетании с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором SCIEX Triple QuadTM 5500 (AB Sciex, Сингапур), оснащенный бинарным насосом и автосамплером. Разделение проводили на колонке AcclaimTM 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).

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: 20–80% В (0–7 мин), 80% В (7–7.5 мин), 80–20% В (7.5–8 мин). Скорость потока составляла 0.3 мл/мин. Температуру колонки и автосамплера поддерживали во время работы на уровне 40 и 15°C соответственно, объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

Тройной квадрупольный масс-спектрометр (SCIEX 5500 Triple QuadTM 5500) настраивали на сбор данных в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). 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 составляло 10 фунтов на квадратный дюйм (psi), давление газа завесы – 35 psi, давление осушающего и распыляющего газов – 50 psi; входной потенциал 10 В.

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

Пробоподготовка. В центрифужную пробирку емк. 50 мл вносили (2.00 ± 0.02) г тщательно из-

мельченной 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 дериватизации. Содержимое пробирки перемешивали на шейкере в течение 20 мин и помещали в термостат на 16 ч при 37°C . После 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 деионизированной воды, доводили значение pH до 4 добавлением раствора K_2HPO_4 (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°C досуха, вновь растворяли в 0.5 мл смеси подвижных фаз А и Б (80 : 20) и использовали для дальнейшего ВЭЖХ–МС/МС-анализа.

Степень извлечения. Степени извлечения метаболитов нитрофуранов из яиц определяли, вводя в образцы яиц, не содержащих исследуемых соединений, известные количества добавок метаболитов: 0.5, 1 и 20 нг/г. Степени выделения (R , %) рассчитывали по формуле:

$$R (\%) = (c/c_0) \times 100,$$

где c – найденное значение концентрации аналита в образце, нг/г; c_0 – значение концентрации добавки, нг/г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дериватизация и идентификация продуктов дериватизации. Известно, что метаболиты нитрофуранов в кислых растворах вступают в реакцию конденсации с 2-нитробензальдегидом с образованием 2-нитрофенильных производных – оснований Шиффа. По аналогии можно предположить, что в случае 5-нитро-2-фуральдегида продуктами такого взаимодействия будут исходные нитрофураны, образующиеся в процессе протекания реакции конденсации в соответствии со схемой, приведенной на рис. 1.

Для ВЭЖХ–МС/МС-идентификации продуктов дериватизации, которыми, как отмечено выше, являются исходные нитрофураны, использовали метод ММР. Стандартные растворы нитро-

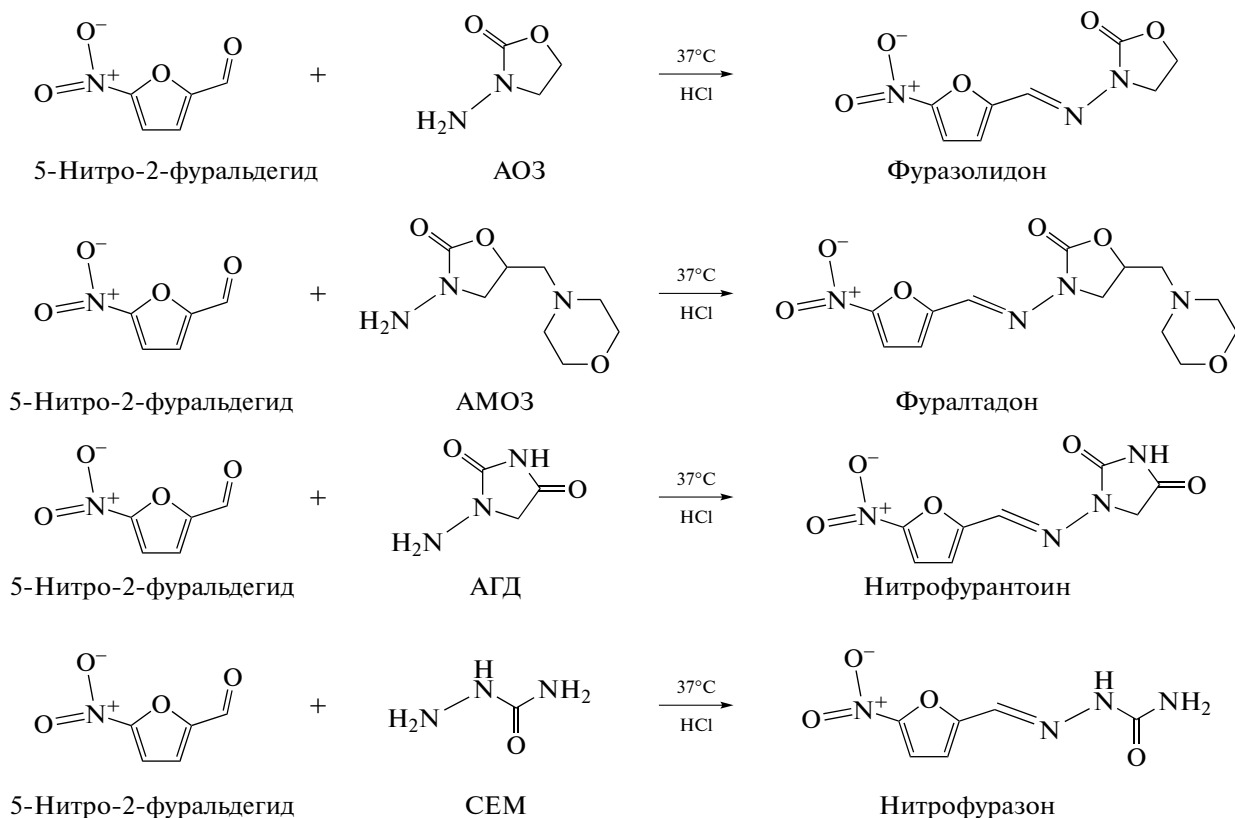


Рис. 1. Предполагаемая схема взаимодействия 5-нитро-2-фуральдегида с метаболитами нитрофуранов.

фуранов (0.1 мкг/мл) вводили непосредственно в масс-спектрометр для получения ионов-предшественников и характерных дочерних ионов. В качестве ионов-предшественников выбрали характерные молекулярные ионы; для каждого соединения контролировали два иона-продукта. Для количественной оценки отслеживали наиболее интенсивный переход ММР, а также второй переход для подтверждения. Потенциал декластеризации и энергия соударений двух наиболее распространенных переходов оптимизировали в режимах положительных или отрицательных ионов. Фуразолидон и фуралтадон образуют протонированные формы $[M + H]^+$, нитрофурантоин и нитрофуразон образуют ионы $[M - H]^-$. Наилучшие условия ионизации получили при использовании муравьиной кислоты в качестве добавки. Параметры ММР для нитрофуранов и внутренних стандартов приведены в табл. 1.

При выборе условий дериватизации варьировали время, температуру, концентрацию 5-НФА и значение pH реакционной смеси (рис. 2). О выходе продуктов судили, сравнивая значения площадей хроматографических пиков. Как видно из рис. 2а, реакция между 5-НФА и метаболитами протекает быстро даже при комнатной температуре, максимальный отклик детектора достигается

спустя 15 мин и остается неизменным в течение 75 мин. Максимальный выход продуктов практически не зависит от температуры в диапазоне 20–40°C (рис. 2б). Выход продуктов увеличивается при увеличении концентрации 5-НФА в реакционной смеси от 0.1 до 1 мМ и не изменяется при дальнейшем увеличении концентрации до 8 мМ (рис. 2в). Данные, приведенные на рис. 2г, указывают на то, что реакция нуклеофильного присоединения 5-НФА к метаболитам нитрофуранов сильно зависит от pH: максимальный выход продуктов наблюдается в интервале pH 1.0–2.5. Учитывая условия кислотного гидролиза, во всех дальнейших исследованиях дериватизацию проводили при pH 1.0.

Для оценки возможности проведения дериватизации метаболитов нитрофуранов одновременно с кислотным гидролизом моделировали условия, регламентированные действующим ГОСТ [29], в котором в качестве дериватизирующего агента используют 2-НБА. Для этого к 40 мкл раствора смеси метаболитов (1 мкг/мл) добавляли 5 мл 0.1 М HCl и 100 мкл 0.2 М раствора 5-НФА в метаноле, перемешивали и помещали в водяную баню с температурой 37°C на 16 ч. Гидролизат охлаждали, полученные продукты выделяли на картридже, заполненном ССПС, и проводили

Таблица 1. Основные характеристики продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-нитро-2-фураальдегидом, определяемых методом ВЭЖХ–МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций

Метаболит	Нитрофуран (продукт дериватизации)	t_R , мин	Q_1 m/z	Q_3 m/z	ПД*, В	ЭС**, эВ	ЕР***, В
АМОЗ	ФД	2.18	325.0(+)	252.0/281.0	60/60	25/19	10/10
АОЗ	ФЗ	3.67	226.0(+)	122.0/113.0	60/60	18/19	10/10
АГД	НФТ	3.43	236.8(–)	151.9/123.8	–100/–100	–17/–21	–10/–10
СЕМ	НФ	3.32	196.8(–)	149.9/123.8	–100/–100	–13/–14	–10/–10
D5-АМОЗ	D ₅ -ФД-D ₅	2.18	330.0(+)	286.0	60	19	10
D4-АОЗ	D ₄ -ФЗ	3.67	230.0(+)	117.0	60	19	10
13С3-АГД	13С3-НФТ	3.43	239.8(–)	151.9	–100	–17	–10
15N13С-СЕМ	15N13С-НФ	3.32	199.8(–)	152.9	–100	–13	–10

* Потенциал декластеризации, ** энергия соударений, *** входной потенциал.

ВЭЖХ–МС/МС-определение. Метаболиты нитрофуранов идентифицировали по абсолютному времени удерживания для хроматографических пиков целевых веществ, регистрируемых в режиме мониторинга множественных реакций. Данные, представленные в табл. 1, подтверждают, что в результате взаимодействия метаболитов нитрофуранов с 5-НФА образуются исходные нитрофураны. Основные характеристики совпадают с соответствующими значениями для нитрофуранов, приведенными в работах [40, 41]. Выход продуктов реакции дериватизации составляет 95–100%.

Выбор условий твердофазной экстракции нитрофуранов на сверхшитом полистироле. Как показали исследования последних лет, в том числе и проводимые в нашей научной группе, весьма перспективными сорбентами для ТФЭ органических соединений из водных растворов оказались сверхшитые полистиролы и, в частности, ССПС Диапак П-3 [42]. Этот сорбент отличается нанопористой структурой, высокоразвитой удельной поверхностью в сочетании с аномально высоким значением площади поверхности, приходящейся на микропоры, сочетанием гидрофобности и смачиваемости водой поверхности частиц сорбентов, выраженным сродством к полярным органическим соединениям, высокой химической и механической устойчивостью и хорошей регенерируемостью. При выборе условий ТФЭ нитрофуранов – продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов с 5-НФА на ССПС Диапак П-3 варьировали массу сорбента, рН раствора, природу и объем элюента. Для минимизации объема элюента оказалось целесообразным использование картриджа (10 × 6 мм), заполненного 0.030 г ССПС. Установлено, что нитрофураны количественно сорбируются на ССПС в интервале рН 1–7.5, значения степеней извлечения (%) фуразолидона, фуралтадона, нитрофурантоина и

нитрофуразона равны 99 ± 3 , 98 ± 3 , 96 ± 2 и 86 ± 4 соответственно ($n = 3$).

Эффективность сорбционного концентрирования методом ТФЭ в значительной степени зависит от выбора элюента. В данной работе в качестве элюентов использовали ацетонитрил, метанол и этанол. Перед элюированием картридж промывали 3 мл дистиллированной воды. Элюент пропускали через картридж со скоростью 0.3 мл/мин. Установлено, что количественная десорбция нитрофуранов достигается при использовании 2 мл ацетонитрила (табл. 2).

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 нг/г. Для определения внутрисуточных 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. 3, 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 (МЭ) использовали коэффициенты матричных градуировок в условиях анализа экстрактов яиц, не содержащих исследуемых соединений, с добавками метабо-

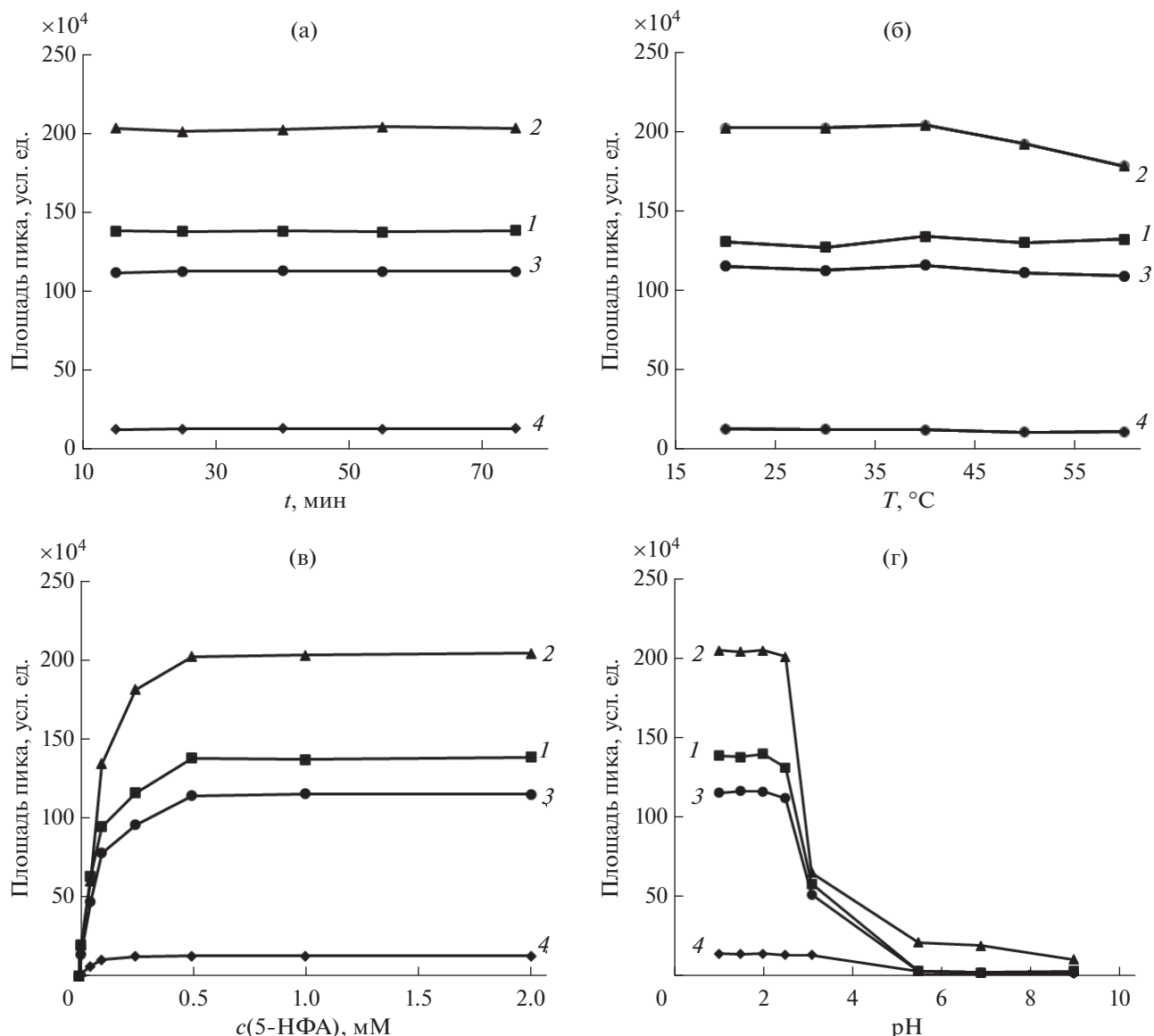


Рис. 2. Влияние времени (а), температуры (б), концентрации 5-НФА (в) и pH (г) на выход продуктов дериватизации метаболитов нитрофуранов ($c = 40$ нг/мл) с 5-нитро-2-фуральдегидом: 1 – фуразолидон, 2 – фуралтадон, 3 – нитрофурантоин, 4 – нитрофуразон; $c_{5\text{-НФА}} = 2$ mM (а), (б), (г); pH ~ 1 (а), (б), (в); время 15 мин (б), (в), (г); 20°C (а), (в), (г).

литов нитрофуранов и коэффициенты градуировки соответствующих водных растворов с добавками метаболитов нитрофуранов. Расчет проводили по формуле:

$$\text{МЭ (\%)} = (A/B - 1) \times 100,$$

где A – коэффициент в матричной градуировке, а B – коэффициент в водной градуировке. Как видно из табл. 3, в большинстве случаев МЭ ниже 10%, что может быть следствием не только использования метода внутреннего стандарта, но и эффективной очистки экстрактов.

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 нг/г. Коэффициенты детерминации линейной зависимости площадей хроматографических пиков препаратов от их концентрации в анализируемом образце составили не менее 0.99. На рис. 3 представлены масс-хроматограммы экстракта яиц с добавлением 1 нг/г метаболитов нитрофуранов. Пределы обнаружения ($c_{\text{мин}}$) и определения ($c_{\text{н}}$) рассчитывали по отношению аналитического сигнала (интенсивности пика) к шуму, равному 3 и 10 соответственно.

Таблица 2. Степени десорбции ($R_{\text{дес}}$, %) нитрофуранов с микроколоники, заполненной 0.030 г сверхсшитого полистирола, различными элюентами

Элюент	Объем элюента, мл	Фуразолидон	Фуралтадон	Нитрофурантоин	Нитрофуразон
Ацетонитрил	1	94	91	94	90
	2	99	98	98	99
Метанол	1	74	79	75	79
	2	95	96	95	98
Этанол	1	72	70	72	73
	2	90	89	92	92

Таблица 3. Основные характеристики определения метаболитов нитрофуранов в яйцах после очистки экстрактов методом твердофазной экстракции с применением сверхсшитого полистирола Диапак П-3

Метаболит	Содержание, нг/г	Степень выделения, %	Внутридневная повторяемость (s_r , $n = 5$)	Междневная повторяемость (s_r , $n = 15$)	$c_{\text{мин}}$, нг/г	c_n , нг/г	МЭ, %
АМОЗ	0.5/1/20	106/101/99	0.12/0.07/0.07	0.11/0.08/0.06	0.04	0.1	8.7
АОЗ	0.5/1/20	104/103/98	0.09/0.11/0.07	0.10/0.09/0.08	0.02	0.5	2.5
АГД	0.5/1/20	103/104/100	0.06/0.05/0.06	0.07/0.05/0.05	0.04	0.1	4.7
СЕМ	0.5/1/20	95/102/97	0.13/0.10/0.08	0.12/0.13/0.08	0.2	0.5	7.3

Пределы обнаружения и определения составили 0.04–0.2 и 0.1–0.5 нг/г соответственно (табл. 3), что позволяет определять метаболиты нитрофуранов на уровне, меньшем, чем МДУ (1 нг/г).

носительное стандартное отклонение не превышает 0.15.

В табл. 4 представлены результаты оценки правильности и воспроизводимости предлагаемой методики. Установлено, что относительная погрешность анализа составляет не более 20%, от-

Таким образом, проведенное исследование показало, что 5-нитро-2-фуральдегид можно использовать в качестве дериватизирующего агента при определении метаболитов нитрофуранов в

Таблица 4. Оценка правильности и воспроизводимости определения метаболитов нитрофуранов в яйцах методом введено-найденно ($n = 3$, $P = 0.95$)

Метаболит	Переход для количественного анализа	Введено, нг/г	Найдено, нг/г	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

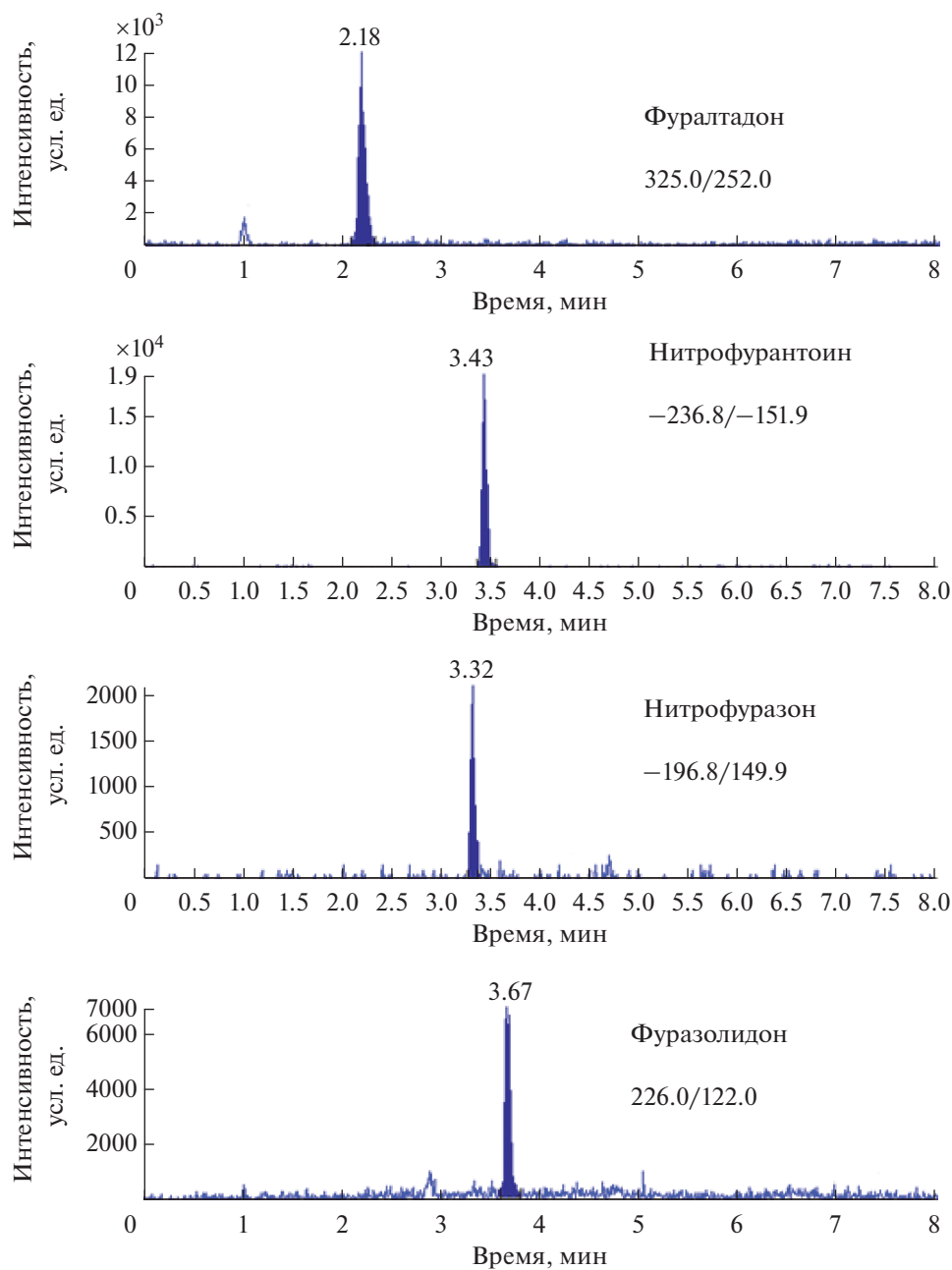


Рис. 3. Масс-хроматограммы экстракта яйца с добавлением 1 нг/г четырех метаболитов нитрофуранов после дериватизации и очистки методом твердофазной экстракции на сверхсшитом полистироле Диапак П-3.

яйцах методом ВЭЖХ–МС/МС. Полученные данные указывают на то, что продуктами дериватизации являются исходные нитрофураны, что облегчает предварительный выбор условий пробоподготовки образцов, уменьшает продолжительность анализа и снижает его стоимость. Показано, что дополнительная очистка гидролизатов, получаемых в процессе пробоподготовки яиц, методом ТФЭ с использованием коммерчески доступного сорбента ССПС Диапак П-3 поз-

воляет уменьшить матричные эффекты: для всех метаболитов они оказались ниже 10%.

Работа выполнена в рамках темы по госзаданию АААА-А21-121011990021-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zuma N.H., Aucamp J., N'Da D.D. An update on derivatization and repurposing of clinical nitrofurans drugs // Eur. J. Pharm. Sci. 2019. V. 140. P. 105.

2. *Vass M., Hruska K., Fránek M.* Nitrofurantoin antibiotics: A review on the application, prohibition and residual analysis // *Vet. Med.* 2008. V. 53. № 9. P. 469.
3. EFSA panel on contaminants in the food chain. Scientific opinion on nitrofurans and their metabolites in food // *EFSA J.* 2015. V. 13. № 6. Article 4140.
4. *McCalla D.R.* Mutagenicity of nitrofurantoin derivatives: Review // *Environ. Mutagen.* 1983. V. 5. P. 5745.
5. Commission Regulation (EC) 1995/1442/EC (1995) // *Off. J. Eur. Commun.* 1995. V. 38. № 143. P. 26.
6. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). 2010. С. 391.
7. *Закревский В.В., Лелеко С.Н.* Скрининг нитрофурановых соединений в импортном мясном сырье // *Гигиена и санитария.* 2014. Т. 5. С. 121.
8. *Закревский В.В., Лелеко С.Н.* Загрязненность импортного мясного сырья нитрофуранами // *Вестник СПбГУ. Медицина.* 2014. № 2. С. 66.
9. *Radovnikovic A., Conroy E.-R., Gibney M., O'Mahony J., Danaher M.* Residue analyses and exposure assessment of the Irish population to nitrofurantoin metabolites from different food commodities in 2009–2010 // *Food Addit. Contam. A.* 2013. V. 30. P. 1858.
10. *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.
11. *Conneely A., Nugent A., O'Keeffe M., Mulder P.P.J., van Rhijn J.A., Kovacsics L., Fodor A., McCracken R.J., Kennedy D.G.* Isolation of bound residues of nitrofurantoin drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 483. P. 91.
12. *Xia X., Li X., Zhang S., Ding S., Jiang H., Li J., Shen J.* Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1208. P. 101.
13. *Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Walker S., Widmer M.* Determination of nitrofurantoin and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 862. P. 41.
14. *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.
15. *Finzi J.K., Donato J.L., Sucupira M., De Nucci G.* Determination of nitrofurantoin metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 824. P. 30.
16. *Alkan F., Kotan A., Özdemir N.* Development and validation of confirmatory method for analysis of nitrofurantoin metabolites in milk, honey, poultry meat and fish by liquid chromatography–mass spectrometry // *Mac. Vet. Rev.* 2016. V. 39. P. 15.
17. *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 // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 217. P. 182.
18. *Bock C., Stachel C., Gowik P.* Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with the software InterVal // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 586. P. 348.
19. *Szilagyi S., De La Calle B.* Development and validation of an analytical method for the determination of semicarbazide in fresh egg and in egg powder based on the use of liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 572. P. 113.
20. *Śniegocki T., Giergiel M., Sell B., Posyniak A.* New method of analysis of nitrofurans and nitrofurantoin metabolites in different biological matrices using UHPLC–MS/MS // *J. Vet. Res.* 2018. V. 62. P. 161.
21. *Chu P.-S., Lopez M.I.* Determination of nitrofurantoin residues in milk of dairy cows using liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 2129.
22. *Rodziewicz L.* Determination of nitrofurantoin metabolites in milk by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2008. V. 864 P. 156.
23. *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.
24. *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.
25. *Øye B.E., Couillard F.D., Valdernes 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. Article 125175. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125175>
26. *Veach B.T.* Determination of chloramphenicol and nitrofurantoin 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. P. 1043.
27. *Verdon E., Couedor P., Sanders P.* Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin, 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. P. 336.

28. *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.
29. ГОСТ 32014–2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (с изменением № 1, с поправками). М.: Стандартинформ, 2013.
30. *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.
31. *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.
32. *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.
33. *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 nitrofurans metabolites in pork muscle // *Food Addit. Contam. A.* 2013. V. 30. № 12. P. 2114.
34. *Du N.-N., Chen M.-M.* Determination of nitrofurans 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.
35. *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.
36. *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.
37. *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.
38. *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.
39. *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.
40. *Pearson R.A., Evans C., Bendall J.G.* Nitrofurazone quantification in milk at the European Union minimum required performance limit of 1 ng g⁻¹: circumventing the semicarbazide problem // *Food Addit. Contam. A.* 2016. V. 33. P. 1324.
41. *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.
42. *Дмитриенко С.Г., Тихомирова Т.И., Апяри 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. (*Dmitrienko S.G., Tikhomirova T.I., Apyari V.V., Tolmacheva V.V., Kochuk E.V., Zolotov Yu.A.* Application of hypercrosslinked polystyrenes to the preconcentration and separation of organic compounds and ions of elements: A review // *J. Anal. Chem.* 2018. V. 73. P. 1053.)