

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ВЕРХ-МС/МС ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІТІВ НІТРОФУРАНІВ У ЗРАЗКАХ МЕДУ

*Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
О. І. Федякова, канд. біол. наук,
С. М. Кіслова, науковий співробітник*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті представлено результати розробки та впровадження методу ВЕРХ-МС/МС для одночасного визначення залишків метаболітів нітрофуранів у меді. Пробопідготовка включає кислотний гідроліз, дериватизацію, екстракцію етилацетатом, концентрування, знежирення та перерозчинення у мобільній фазі. Основною перевагою розробленої методики є додаткова очистка етилацетатного екстракту зразка меду водою замість використання твердофазної екстракції, завдяки чому вдалося досягнути межі кількісного визначення аналітів на рівні десятих часток мкг/кг (CV ~ 20 %). Методику апробовано при аналізі реальних та фортифікованих зразків меду.

Ключові слова: НІТРОФУРАНИ, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ, ВЕРХ-МС/МС, МЕД.

Нітрофурани (фуразолідон, фуралтадон, нітрофурантоїн, нітрофуразон) – це синтетичні антибіотики широкого спектру дії, які раніше застосовувались у тваринництві, у тому числі, бджолярстві, при лікуванні інфекційних хвороб, викликаних бактеріями, зокрема, *Escherichia coli* та *Salmonella*. Тривале вивчення впливу цієї групи антибіотиків на експериментальних тварин виявило канцерогенні та мутагенні властивості їх метаболітів [1, 2], що привело до заборони використання нітрофуранів для лікування продуктивних тварин. Враховуючи рекомендації комітетів ВООЗ, законодавством ЄС було заборонено застосування нітрофуранів: фуралтадону, нітрофурантоїну і нітрофуразону для використання в тваринництві з 1993 року, а фуразолідону – з 1995. Згідно з 2003/181/ЕС, мінімально необхідна межа визначення (MRPL) метаболітів нітрофуранів у продукції тваринного походження становить 1 мкг/кг [3, 4].

Нітрофурани швидко метаболізують, і тому їх практично неможливо визначити навіть через кілька годин після застосування. Натомість, залишки метаболітів нітрофуранів, зв'язані з білками тканин, можна виявити навіть через кілька місяців. Встановлено, що за звичайних способів термічної обробки продуктів харчування зв'язані тканинами метаболіти нітрофуранів залишаються практично стабільними і розкладаються незначно. Тому при визначенні залишкових кількостей нітрофуранів виявляють метаболіти цих препаратів в тканинах і на основі цих маркерів встановлюють їх незаконне використання. Так, після застосування фуразолідону в тканинах виявляють його метаболіт: 3-аміно-2-оксазолідінон (АОЗ); фуралтадону – 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідінон (АМОЗ); нітрофурантоїну – 1-аміногідантоїн (АНД) і нітрофуразону – семікарбазид (SEM) [1].

Залишкові кількості нітрофуранів у продуктах тваринного походження, зазвичай, визначають скринінг-методом імуоферментного аналізу [1, 5], методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з УФ-детектуванням [6, 7], а також методом ВЕРХ з тандем-

мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС/МС) [8-12]. Оскільки метаболіти нітрофуранів мають невеликі молекулярні маси та слабо поглинають в УФ-області спектру, то аналіз проводять після їх дериватизації 2-нітробензальдегідом. Отже, фактичними аналітичними формами є відповідні нітрофеніл-похідні метаболітів нітрофуранів (NP-AOZ, NP-AMOZ, NP-AHD та NP-SEM), які володіють інтенсивною УФ-абсорбцією. Для аналізу методом ВЕРХ-МС/МС така ж процедура дериватизації застосовується для кращого хроматографічного розділення сполук та для збільшення молекулярної маси аналітів, і, як наслідок, отримання мас-спектру із більш характеристичними іонами для ідентифікації аналітів (рис. 1) [11].

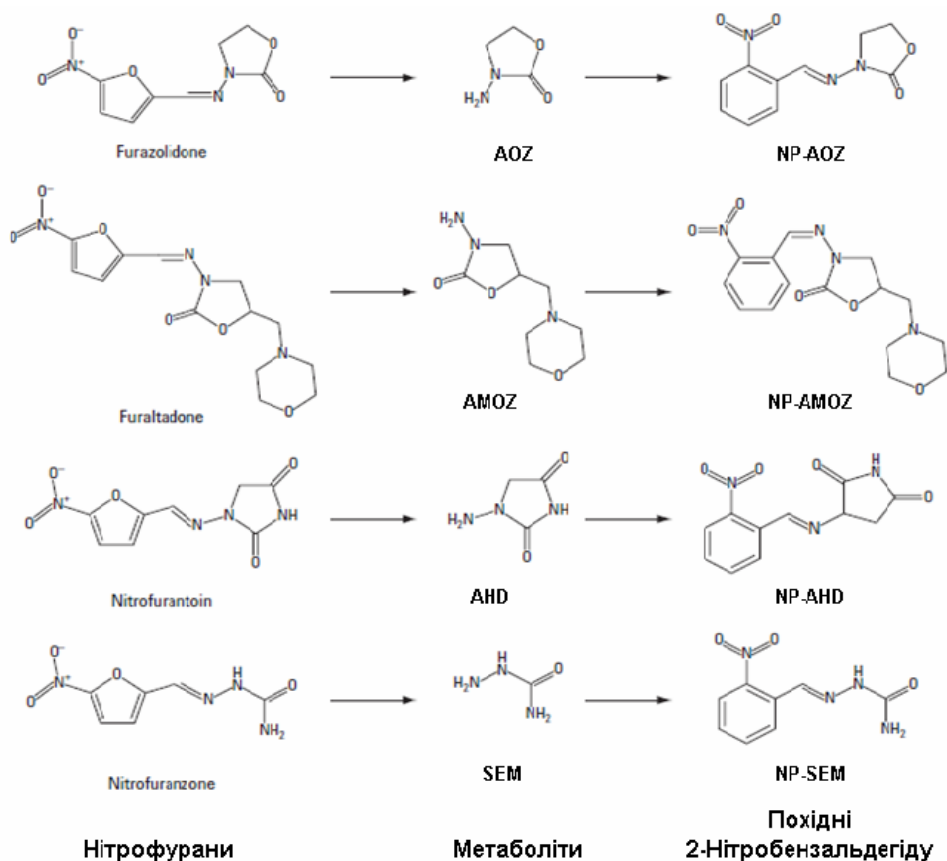


Рис. 1. Хімічна структура нітрофуранів, метаболітів нітрофуранів та відповідних дериватизованих метаболітів.

Мед віддавна є важливим та цінним продуктом для споживачів, тому питання його безпечності щодо присутності залишків антибіотиків є особливо актуальним. Згідно з повідомленнями європейської системи RASFF щодо випадків виявлення заборонених антибіотиків у зразках меду, у 13 % випадків інформація стосувалася нітрофуранів [13]. У країнах ЄС MRPL для метаболітів нітрофуранів у продукції тваринного становить 1 мкг/кг, хоча у деяких європейських лабораторіях проводять дослідження з межею визначення 0,3 мкг/кг [14].

Тому, у зв'язку з підвищенням вимог до контролю безпечності зразків меду, нами запропоновано та впроваджено метод одночасного визначення залишків метаболітів нітрофуранів (AOZ, AMOZ, AHD та SEM) у меді високочутливим та високоселективним методом ВЕРХ-МС/МС.

Матеріали і методи. *Реактиви.* Метанол (for HPLC, Sigma-Aldrich), вода високоочищена бідистильована (система Milli-Q, Millipore), формиатна кислота (Riedel-de-

Haën), хлоридна кислота (Riedel-de-Haën), 2-нітробензальдегід (Sigma-Aldrich), диметилсульфоксид (HPLC, Lab-scan), калій гідрофосфат (Riedel-de-Haën), натрій гідроксид (Fluka Analytical), етилацетат (for HPLC, Sigma-Aldrich), гексан (HPLC, Lab-scan), тетрахлорметан (Pestiscan, Lab-scan).

Стандарти. Стандарти метаболітів AOZ, AMOZ, AHD, SEM (Sigma-Aldrich, Vetranal analytic standart); стандарти дериватизованих метаболітів NP-AOZ, NP-AMOZ, NP-AHD, NP-SEM (Sigma-Aldrich, Vetranal analytic standart).

Основні стандартні розчини метаболітів нітрофуранів та дериватизованих метаболітів готували з первинною концентрацією 1 мг/мл у метанолі кожного. Розчини зберігали впродовж двох місяців у щільно закритому посуді в темному місці за температури 2-8 °С. Наступні розчини стандартів готували послідовними розведеннями 30 % розчином метанолу.

Обладнання. Рідинний хроматограф Waters e2695 Separation Module з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором Quattro Premier XE фірми Waters (США), обладнаний колонкою SunFire™ C18 (3.5 µm, 2.1 × 100 mm) із передколонкою SunFire™ C18 (3.5 µm, 2.1 × 10 mm) фірми Waters (США).

Приготування зразків. Для проведення кислотного гідролізу до 2 г меду додавали 8 мл бідистильованої води і 1 мл 1 М розчину хлоридної кислоти і нагрівали на водяній бані при 40 °С впродовж 5 хв. Перемішували на вортексі до повного розчинення меду та додавали 0,4 мл свіжоприготованого 10 мМ розчину 2-нітробензальдегіду в диметилсульфоксиді, перемішували на вортексі. Дериватизацію проводили у термостаті за температури 50 °С впродовж 3 год. Після охолодження зразків до кімнатної температури розчини нейтралізували за допомогою 10 мл 0,1 М розчину K₂HPO₄ і 0,8 мл 1 М розчину NaOH та ретельно перемішували. Аналіти екстрагували 12 мл етилацетату струшуванням на шейкері в горизонтальній площині впродовж 15 хв 220 rpm. Розділення фаз проводили центрифугуванням упродовж 10 хв за 4700 rpm і температури 10°C. Відбирали 8 мл етилацетатної фракції у 15 мл центрифужну поліпропіленову пробірку і струшували вміст пробірок на роторному шейкері впродовж 10 хв (програма С3 85 rpm) з 2 мл бідистильованої води. Центрифугували 10 хв за 4700 rpm і температури 10 °С. Відбирали 6 мл етилацетатної фракції (верхньої), що відповідає 1,0 г меду, і висушували за температури 40 °С на ротаційному випарювачі. Сухий залишок відновлювали 500 мкл 30 % розчину метанолу. Знежирювали 500 мкл розчину гексан/тетрахлорметан (1:1) і струшували на вортексі впродовж 20 с. Зразок кількісно переносили у мікропробірки типу «епендорф» і центрифугували 5 хв за 15000 g та кімнатної температури. Верхню фракцію переносили у віали для хроматографічного аналізу. Фактор концентрування – 2.

Побудова калібрувального графіка. Для побудови калібрувального графіка на матриці меду наважували по 2 г меду (контрольний мед, що не містить аналітів) у шість 50 мл центрифужних поліпропіленових пробірок та вносили відповідні об'єми стандартного розчину суміші AOZ, AMOZ, AHD, SEM із концентрацією кожного аналіту 10 нг/мл у 30 % водному розчині метанолу (табл. 1) та проводили пробопідготовку за описаною вище схемою.

Таблиця 1

Схема побудови калібрувального графіка на матриці меду для визначення метаболітів нітрофуранів

Об'єм стандартного розчину AOZ, AMOZ, AHD, SEM 10 нг/мл, мкл	Концентрація AOZ, AMOZ, AHD, SEM у меді, мкг/кг
0	0
20	0,1
50	0,25
100	0,5
200	1,0
400	2,0

Хроматографічний аналіз.

Параметри хроматографічної системи:

Мобільна фаза А – 0,1% розчин форміатної кислоти у воді;

Мобільна фаза В – 0,1% розчин форміатної кислоти у метанолі.

Швидкість потоку – 0,2 мл/хв.

Об'єм зразка – 20 мкл.

Промивна рідина – метанол : вода 70 % : 30 % (об./об.).

Температура колонки – 40 °С.

Час проведення розділення – 25 хв.

Розділення проводять за таким градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А (% об./об.)	Мобільна фаза В (% об./об.)
0:00	90	10
1:50	90	10
7:00	10	90
8:00	10	90
12:00	10	90
13:00	90	10
20:00	90	10
25:00	90	10

Час виходу АОЗ – 7,9 хв; АМОЗ – 4,4 хв; АНД – 7,9 хв; SEM – 8,0 хв.

Параметри мас-спектрометричного детектора.

Час інтегрування – 20 хв.

Іонне джерело – електророзпилювач (ESI).

Температура джерела (Source Temperature) – 120°С.

Температура висушування (Desolvation Temperature) – 300°С.

Газ зіткнення (Collision Gas) – аргон.

Тиск аргону – $4,0 \times 10^{-3}$ mbar.

Газ висушування (Desolvation Gas) – азот.

Потік газу висушування – 900 L/hr

Газ розпилення (Nebulisation Gas) – азот.

Потік газу розпилення – 50 L/hr

Час сканування (Dwell) – 0,3 с.

Напруга капіляра (Capillary) – 3.8 kV

Іонізація – ES+ (позитивна)

Режим сканування мас – MRM (режим моніторингу множинних реакцій) (табл. 2)

Таблиця 2

Параметри сканування мас (MRM) для ВЕРХ-МС/МС визначення метаболітів нітрофуранів у меді

Аналіт	Прекурсор-іон, m/z	Продукт-іон, m/z	Напруга конуса (Cone), V	Енергія зіткнення (Collision), V
АОЗ	236,1	104,0	24	22
		134,0		12
АМО Z	335,2	128,2	23	22
		291,3		12
АНД	294,0	103,9	28	23
		133,9		13
SEM	209,0	165,9	21	10
		191,9		11

Визначення вмісту АОЗ, АМОЗ, АНД, SEM в досліджуваних зразках меду (мкг/кг) проводили згідно з калібрувальним графіком, використовуючи програмне забезпечення MassLynx V4.1.

Результати й обговорення. У цьому дослідженні за основу нами було взято типову схему прободготовки продуктів тваринного походження, зокрема, меду, для визначення залишкових кількостей метаболітів нітрофуранів, а саме: кислотний гідроліз зв'язаних білками тканин метаболітів, дериватизація 2-нітробензальдегідом для отримання нітрофеніл-похідних та нейтралізація реакційного середовища до рН ~ 7, яке є оптимальним для наступної екстракції аналітів етилацетатом [2, 14–17]. Зазвичай, для аналізу залишків метаболітів нітрофуранів зі зразків меду проводять концентрування екстракту, щоб досягнути вищої чутливості методики. Хоча у випадку такого складного об'єкту, як бджолиний мед, це призводить до значного посилення матричного ефекту. Тому рядом авторів запропоновано додаткову очистку екстракту методом твердофазного екстрагування (ТФЕ) з використанням, наприклад, колонок Oasis HLB (Waters) [15, 17]. Як відомо, процедура ТФЕ є вартісною та досить тривалою в часі, що відчутно підвищує вартість аналізу. Тому нами було запропоновано додатковий етап очистки етилацетатного екстракту зразка водою за струшування на роторному шейкері. Це дозволяє легко позбутися негативного впливу на аналітичний сигнал полярних органічних та неорганічних компонентів матриці зразка, які викликають пригнічення іонізації чи зниження співвідношення «сигнал / шум» на хроматограмі зразка меду. Таким чином, нам вдалося покращити аналітичні характеристики методики практично без додаткових затрат часу та ресурсів.

Розроблену методику ВЕРХ-МС/МС визначення залишків метаболітів нітрофуранів у меді апробовано при аналізі реальних та фортифікованих зразків меду. Так, на рис. 2–5 наведено калібрувальні графіки, побудовані на матриці меду, для визначення кожного метаболіту нітрофурану в діапазоні концентрацій від 0 до 2,0 мкг/кг.

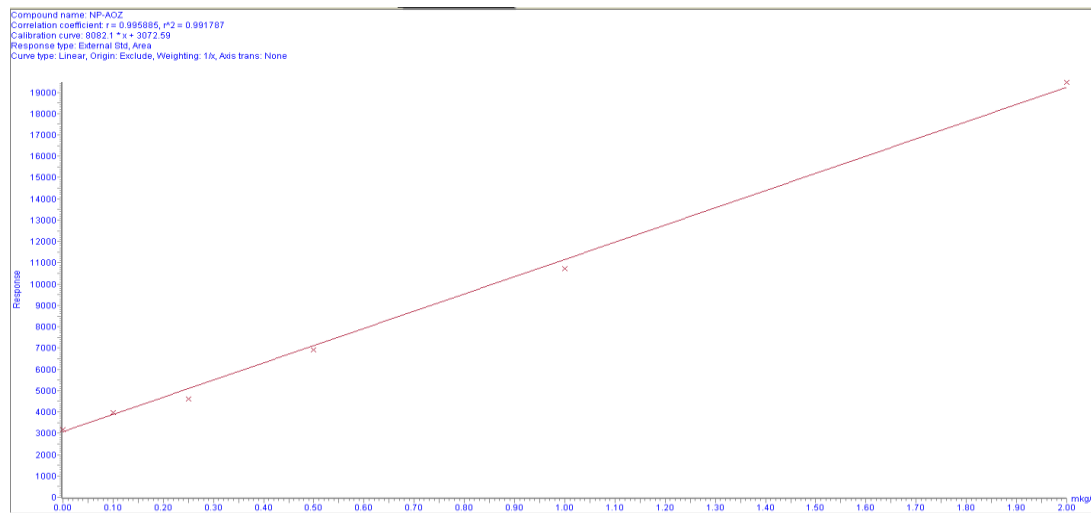


Рис. 2. Калібрувальний графік для визначення метаболіту нітрофурану АОЗ в діапазоні концентрацій 0-2 мкг/мл.

Оцінку придатності запропонованої методики для аналізу зразків меду проводили за критерієм “додано-отримано” за результатами дослідження 5 контрольних (чистих) зразків меду та навантажених сумішшю стандартних розчинів метаболітів нітрофуранів (АОЗ, АМОЗ, АНД, SEM) на рівні 0,2, 0,5, 1,0 мкг/кг (табл. 3).

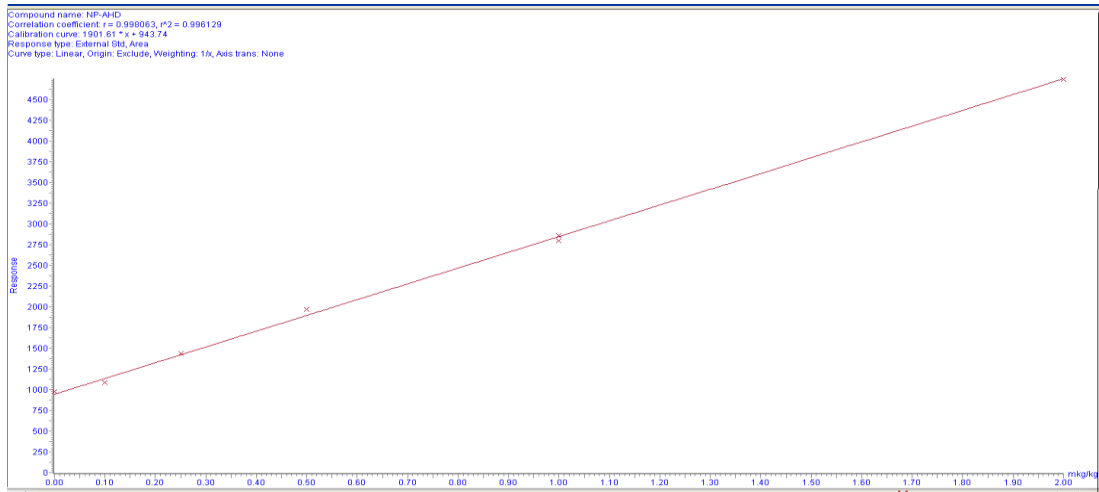


Рис. 3. Калібрувальний графік для визначення метаболіту нітрофурану AHD в діапазоні концентрацій 0-2 мкг/мл.

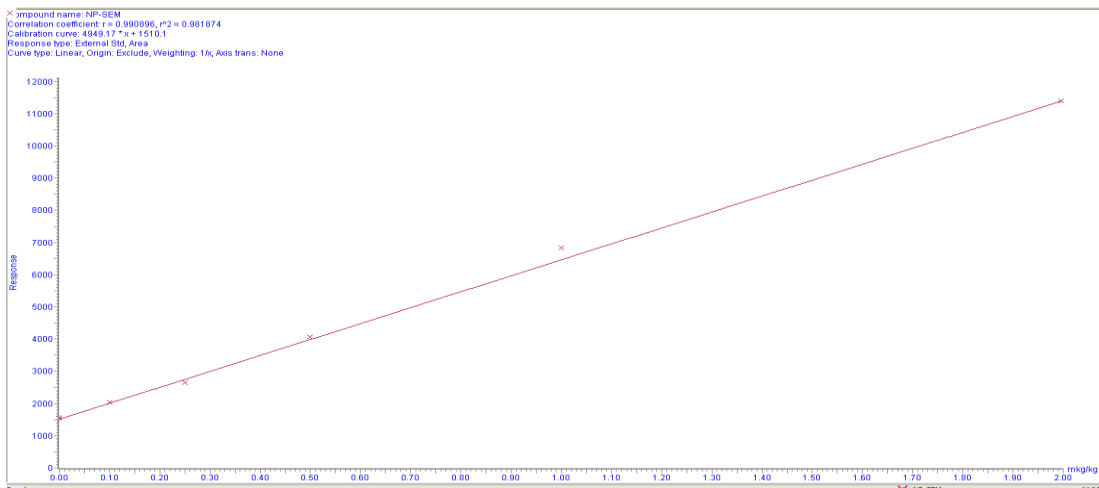


Рис. 4. Калібрувальний графік для визначення метаболіту нітрофурану SEM в діапазоні концентрацій 0-2 мкг/мл.

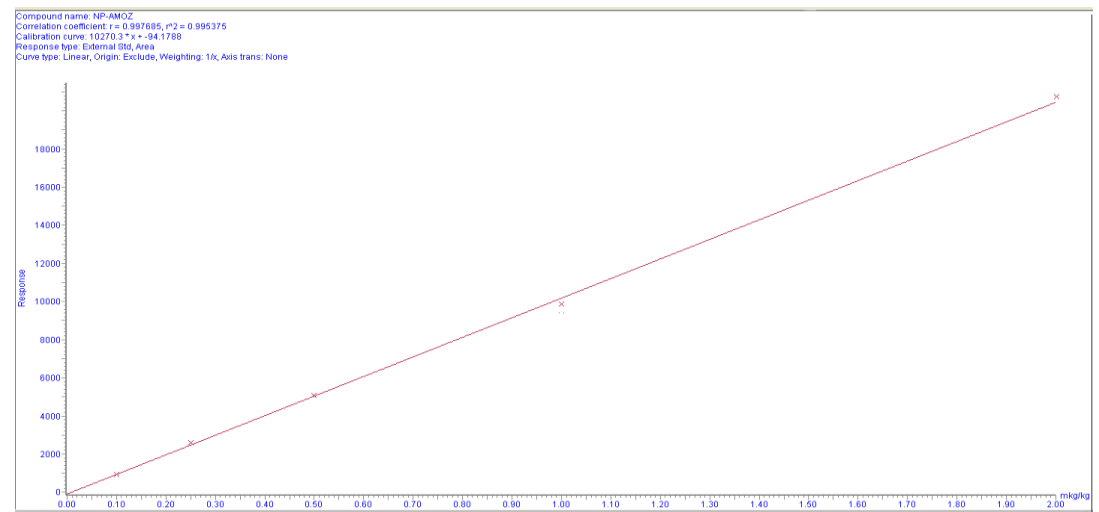


Рис. 5. Калібрувальний графік для визначення метаболіту нітрофурану AMOZ в діапазоні концентрацій 0-2 мкг/мл.

За відсутності контрольних (чистих) референтних матриць, використовували зразки, які були попередньо проаналізовані методом імуноферментного аналізу на чотирьох тест-наборах фірми R-Biopharm та отримали найнижчі значення вмісту цільового аналіту (матричний вплив). Як видно з наведених даних, здатність витягу методики для зразків меду, фортифікованих сумішшю метаболітів нітрофуранів на різних концентраційних рівнях, становить від 90 до 120 %.

Таблиця 3

Здатність запропонованої ВЕРХ-МС/МС методики до витягу метаболітів нітрофуранів з меду

Аналіт	Фортифіковано 0,2 мкг/кг	CV, %	Фортифіковано 0,5 мкг/кг	CV, %	Фортифіковано 1,0 мкг/кг	CV, %
	одержано %		одержано %		одержано %	
AOZ	105	14	92	10	104	12
AMOZ	101	9	96	7	98	11
AHD	110	18	103	16	102	15
SEM	107	20	121	19	107	14

Метрологічні характеристики методики визначення залишкових кількостей метаболітів нітрофуранів у зразках меду наведено у Табл. 4. Як видно з представлених даних, впроваджена нами методика за чутливістю суттєво перевищує вимоги встановлених MRPL за достатнього рівня прецизійності методики та відсотке витягу, що узгоджується з вимогами Рішення 2002/657/ЕС.

Таблиця 4

Метрологічні характеристики ВЕРХ-МС/МС визначення залишкових кількостей метаболітів нітрофуранів з меду

Аналіт	Межа виявлення, мкг/кг	Межа кількісного визначення, мкг/кг	Витяг, %
AHD	0,15	0,3	100-110
SEM	0,2	0,45	100-120
AOZ	0,1	0,2	90-110
AMOZ	0,1	0,2	90-110

Результати порівняльних досліджень методами імуноферментного скринінг-аналізу (ІФА) на тест-наборах фірми R-Biopharm Ridascreen AOZ, Ridascreen AMOZ, Ridascreen SEM, Ridascreen AHD (Німеччина) [18-21] та методом підтвердження ВЕРХ-МС/МС, представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

Порівняння результатів визначення метаболітів нітрофуранів у зразках меду, отриманих методами ВЕРХ-МС/МС та ІФА ($CV_{\text{ВЕРХ-МС/МС}} \sim 20\%$; $CV_{\text{ІФА}} \sim 25\%$)

Зразки	AHD, мкг/кг		SEM, мкг/кг		AOZ, мкг/кг		AMOZ, мкг/кг	
	ВЕРХ-МС/МС	ІФА	ВЕРХ-МС/МС	ІФА	ВЕРХ-МС/МС	ІФА	ВЕРХ-МС/МС	ІФА
11592	0,365	0,440	0,574	0,588	0,575	0,576	0	0,301
11381	0,489	0,403	0,210	0,489	0,347	0,189	0	0,452
11694	0	0,307	0,559	0,458	0	0,138	0	0,32
11732	0,064	0,156	0,429	0,599	0	0,163	0	0,365
11734	0	0,175	0,293	0,514	0	0,173	0	0,405
11912	0,043	0,129	0,434	0,458	0	0,178	0	0,378
11931	0,212	0,258	0,394	0,558	0,322	0,393	0	0,386
11932	0,169	0,274	0,431	0,43	0,022	0,251	0	0,332
11933	0,284	0,359	0,340	0,467	0,109	0,210	0	0,340
11934	0,111	0,236	0,411	0,446	0,093	0,251	0	0,361
200516	0,334	0,144	0,123	0,435	0	0,253	0	0,398
11735	0	0,356	0,287	0,423	0	0,165	0	0,411
3968	0,350	0,409	0	0,441	0	0,189	0	0,347
3969	0,347	0,421	0,421	0,477	0,162	0,229	0	0,373

При порівнянні результатів визначення метаболітів нітрофуранів у зразках меду з використанням методів ВЕРХ-МС/МС та ІФА виявилось, що значення, одержані імуноферментним методом, переважно є дещо вищими. Особливо це яскраво виражено у випадку дослідження метаболітів АМОЗ та АНД. Так, для метаболіту АМОЗ величини, отримані методом ІФА, знаходились у діапазоні 0,301-0,452 мкг/кг, а у випадку дослідження методом ВЕРХ-МС/МС – аналіту не виявлено. За дослідження зразків меду на наявність залишків метаболіту АНД різними методами дані відносно співпадали лише у 57 % випадків (0,212 мкг/кг для методу ВЕРХ-МС/МС і 0,394 мкг/кг – для методу ІФА; 0,284 мкг/кг – для ВЕРХ-МС/МС і 0,359 мкг/кг – для методу ІФА). Дані розбіжності можуть бути очевидно, може бути пов'язано із неспецифічним зв'язуванням матриці з антитілами планшета. У випадку дослідження метаболітів АОЗ і SEM двома методами (ВЕРХ-МС/МС та ІФА) отримані результати мало різнились між собою.

Таким чином, за результатами досліджень впроваджений метод ВЕРХ-МС/МС одночасного визначення залишкових кількостей метаболітів АОЗ, АМОЗ, АНД, SEM у зразках меду показав себе як високоспецифічний та чутливий підтверджуючий метод (межа кількісного визначення АНД, SEM, АОЗ, АМОЗ становить відповідно 0,3, 0,45, 0,2, 0,2 мкг/кг; витяг аналіту – 90-120 %; CV ~ 20 %), що значно здешевлює та прискорює проведення контролю зразків меду.

ВИСНОВКИ

Для контролю безпечності зразків меду нами розроблено та впроваджено метод одночасного визначення залишків метаболітів нітрофуранів (АОЗ, АМОЗ, АНД та SEM) у меді високочутливим та високоселективним методом ВЕРХ-МС/МС. Отримані результати щодо оцінки точності та правильності запропонованої методики дозволяють на належному рівні проводити контроль безпечності зразків меду, в тому числі, експортних партій, на вміст метаболітів нітрофуранів, що узгоджується з вимогами Рішення 2002/657/ЕС до підтверджуючих методів.

Перспективи досліджень. Ця методика буде використовуватись як метод підтвердження імуноферментного аналізу зразків меду на вміст залишків метаболітів нітрофуранів. У подальшому отримані результати будуть основою для розробки мультиметоду одночасного визначення залишкових кількостей антибіотиків.

APPLICATION OF HPLC-MS/MS METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION OF NITROFURAN METABOLITES IN HONEY SAMPLES

D. Yanovych, Z. Zasadna, M. Rydchuk, O. Fedyakova, S. Kislova

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The paper presents the results of the development and implementation of HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of nitrofurans metabolites residues in honey. Sample preparation procedure consists of acid hydrolysis, derivatization, extraction with ethyl acetate, concentration, degreasing and reconstitution in mobile phase. The main advantage of the developed technique is an additional purification of ethyl acetate extract of honey sample by means of water instead of using solid-phase extraction. As a result, it became possible to reach the limits of quantification of analytes at the level of tenths mg/kg (CV ~ 20 %). The method was approved in the analysis of real and fortified honey samples.

Keywords: NITROFURANS, DRUG RESIDUES, HPLC-MS/MS, HONEY.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ НИТРОФУРАНОВ В ОБРАЗЦАХ МЕДА

Д. В. Янович, З. С. Засадна, М. В. Ридчук, О. И. Федякова, С. М. Кислова

Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены результаты разработки и внедрения метода ВЭЖХ-МС/МС для одновременного определения остаточных количеств метаболитов нитрофуранов в меде. Пробоподготовка включает кислотный гидролиз, дериватизацию, экстракцию этилацетатом, концентрирование, обезжиривание и перерастворение в мобильной фазе. Основным преимуществом разработанной методики является дополнительная очистка этилацетатного экстракта образца меда водой вместо использования твердофазной экстракции, благодаря чему удалось достичь границы количественного определения аналитов на уровне десятых долей мкг/кг (CV ~ 20 %). Методика апробирована при анализе реальных и фортифицированных образцов меда.

Ключевые слова: НИТРОФУРАНЫ, ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА, ВЭЖХ-МС/МС, МЕД.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Vass M.* Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis / *M. Vass, K. Hruska, M. Franek* // *Veterinari Medicina* – 2008. – V. 82 (9). – P. 469–500.
2. *Alkan F.* Development and validation of confirmatory method for analysis of nitrofurantoin metabolites in milk, honey, poultry meat and fish by liquid chromatography – mass spectrometry / *F. Alkan, A. Kotan, N. Ozdemir* // *Mac. Vet. Rev.* – 2016. – V. 39 (1). – P. 15–22.
3. Commission Decision 1995/1442/EC, 26 June 1995, amending of Annexes I, II, III and IV to Regulation (ECC) No 2377/90, laying down a Community Procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Union*, L143; 26–30.
4. Commission Decision 2003/181/EC, 13 March 2003, amending decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Off. J. Eur. Union*, L71/17, 2003.
5. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurantoin metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation / *I. Diblikova, K. M. Cooper, D. G. Kennedy, M. Franek* // *Anal. Chim. Acta* – 2005 – V. 540. – P. 285–292.
6. Determination of nitrofurantoin in animal feeds by liquid chromatography–UV photodiode array detection and liquid chromatography–ionspray tandem mass-spectrometry / *J. Barbosa, S. Moura, R. Barbosa et al.* // *Anal. Chim. Acta* – 2007. – V. 586. – P. 359–365.
7. Depletion of four nitrofurantoin antibiotics and their tissue-bound metabolites in porcine tissues and determination using LC-MS/MS and HPLC-UV / *K. M. Cooper, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn et al.* // *Food Addit. Contam.* – 2005. – V. 22 (5). – P. 406–414.
8. *Park M. S.* Development of an analytical method for detecting nitrofurantoin in bee pollen by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry / *M. S. Park, K. T. Kim, J. S. Kang* // *J. Chromatography B* – 2017. – V. 1046. – P. 172–176.

9. *Śniegocki T.* Determination of Nitrofuran Metabolite Residues in Eggs by liquid chromatography – mass spectrometry / T. Śniegocki, A. Posyniak, J. Żmudzki // Bull. Vet. Inst. Pulawy – 2008. – V. 52. – P. 421–425.
10. Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin / C. A. L. de la Torre, J. E. Blanco, J. T. Silva, at al. // Arq. Inst. Biol. São Paulo – 2015. – V. 82. – P. 1–9.
11. *Wüst B.* Quantitation of Nitrofuran Metabolites in Shrimp and Poultry by LC/MS/MS Using the Agilent LC/MSD Trap XCT / B. Wüst, C. Sauber, H. A. Van Rhijn // Agilent Technologies Inc. – 2004. – Application Note 5989-0738EN.
12. Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / X. Xia, X. Li, S. Zhang at al. // J. Chromatography A – 2008. – V. 1208. – P. 101–108.
13. *Kivrak I.* Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS / I. Kivrak, S. Kivrak, M. Harmandar // Food Sci. Technol. – 2016. – V. 36 (1). – P. 90–96.
14. *Matus E.* Highly Selective Detection and Identification of Nitrofuran Metabolites in Honey Using LC-MS/MS / E. Matus, J.-J. Dunyach, A. Albornoz // Thermo Fisher Scientific – 2007. – Application Note 358. – AN62490_E 10/07S.
15. *Jenkins K. M.* LC/MS/MS Determination of Nitrofuran Metabolite Residues in Honey / K. M. Jenkins, M. S. Young // Waters Corporation – 2004. – Application Note 720001034EN.
16. Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey / A. H. Shendy, M. A. Al-Ghobashy, S. A. Gad Alla, H. M. Lotfy // Food Chem. – 2016. – V. 190. – P. 982–989.
17. Determination and Confirmation of Nitrofuran Residues in Honey Using LC-MS/MS / M. I. Lopez, M. F. Feldlaufer, A. D. Williams, P.-S. Chu // J. Agric. Food Chem. – 2007. – V. 55. – P. 1103–1108.
18. *Янович Д. В.* Методичні вказівки по визначенню залишкових кількостей нітрофурану (АОЗ) в зразках м'яса, креветках, печінці, риби, яйцях, молоці і меді тест-системою Рідаскрин® Нітрофуран (АОЗ) (Ridascreen® Nitrofuran (AOZ)) (виробництво фірми Р-Біофарм/R-Biopharm, Німеччина) № R3703 / Д. В. Янович, З. С. Засадна // ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. Вид-во ДНДКІ – 2009. – 11 с.
19. *Янович Д. В.* Методичні вказівки по визначенню залишкових кількостей нітрофурану (АМОЗ) в зразках м'яса, креветках, печінці, риби, яйцях і меді тест-системою Рідаскрин® Нітрофуран (АМОЗ) (Ridascreen® Nitrofuran (AMOZ)) (виробництво фірми Р-Біофарм/R-Biopharm, Німеччина) № R3711 / Д. В. Янович, З. С. Засадна // ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. Вид-во ДНДКІ – 2009. – 10 с.
20. Методичні вказівки по кількісному визначенню метаболіту нітрофурану АГД у зразках креветок, риби, тканин, печінки, молока, яєць, яєчного порошку, меду і сечі конкурентним імуноферментним аналізом (фірми EuroProxima, Нідерланди) № 5091АНД / Д. В. Янович, З. С. Засадна, С. М. Кіслова, М.-М. В. Шимко // ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. Вид-во ДНДКІ – 2016. – 11 с.
21. Методичні вказівки з визначення залишкових кількостей нітрофурану (СЕМ) в зразках м'яса, креветках, печінці, риби, яйцях, молоці і меді тест-системою Рідаскрин® Нітрофуран (СЕМ) (Ridascreen® Nitrofuran (SEM)) (виробництво фірми Р-Біофарм/R-Biopharm, Німеччина) № R3715 / Д. В. Янович, З. С. Засадна, О. М. Паздерська та ін. // ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. Вид-во ДНДКІ – 2011. – 11 с.

Рецензент – І. М. Кушнір, д. вет. н., с. н. с., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.