

Шифр «Робенідин»

Вольтаперометричне визначення кокцидіостатика робенідину в кормі для
тварин та м'ясі птиці

2020/2021

Зміст

АНОТАЦІЯ	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	7
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ	10
2.1. Обладнання	10
2.2. Стандартні розчини, реагенти й об'єкти дослідження	11
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	12
3.1. Вплив рН і фонового електроліту	13
3.2. Вибір інструментальних параметрів одержання вольтамперограм	15
3.3. Механізм відновлення РОБ	18
3.4. Використання результатів дослідження в аналізі	19
3.4.1. Методика одержання градуювальних графіків	19
3.4.2. Методика одержання градуювального графіку для визначення РОБ у кормі для тварин	22
3.4.3. Методика одержання градуювального графіку для визначення РОБ у м'ясі птиці	23
3.5. Результати аналізу реальних зразків	26
ВИСНОВКИ	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	31

АНОТАЦІЯ

Робенідин належить до класу кокцидіостатиків. Кокцидіостатики – це фармакологічно активні речовини, які вводять як добавки у корм для тварин, щоб запобігти паразитарній хворобі – кокцидіозу. У промисловому тваринництві робенідин особливо популярний, зокрема, його використовують для вирощування 70 % бройлерів. Забруднення кормів і неправильні схеми вигодовування є джерелом залишків кокцидіостатиків у продуктах птахівництва. Сьогодні відома невелика кількість методів визначення робенідину, здебільшого це хроматографічні методи з різними детекторами.

Ми розробили нові вольтамперометричні методики для визначення робенідину в кормі для тварин і м'ясі птиці, які відрізняються простотою і експресністю, достатньою точністю і селективністю, не потребують дорогого обладнання, мають широкі межі лінійності. Методики характеризуються межами визначення для м'яса і корму 0,51 мг/кг і 2,52 мг/кг відповідно, в той час, як Директива Ради ЄС 2020/148 дозволяє вводити у корми 30-36 мг/кг робенідину.

Методики апробовані під час аналізу реальних зразків корму і м'яса птиці.

Предмет дослідження: робенідин як аналіт для вольтамперометрії.

Методи дослідження: вольтамперометрія (циклічна, з лінійною швидкою розгорткою, диференційна імпульсна, квадратно-хвильова) з використанням ртутного краплинного і твердих амальгамних електродів в якості робочих електродів, рН-метрія, екстракція.

Обсяг і структура роботи: робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, переліку посилань. Її викладено на 30 сторінках тексту без додатків, список використаної літератури займає 8 сторінок. Рукопис містить 10 рисунків та 7 таблиць.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВА – вольтамперометрія;

ВАЛШ – вольтамперометрія з лінійною швидкою розгорткою потенціалу;

ДІВ – диференційна імпульсна вольтамперометрія;

ДМФА – диметилформамід;

КОКЦ – кокцидіостатик(и);

КХВ – квадратно-хвильова вольтамперометрія;

МДР – максимально допустимі рівні залишків;

н.к.е. – каломелевий електрод порівняння;

р.к.е. – ртутний краплинний електрод;

РОБ – робенідин;

УБС – універсальна буферна суміш;

E_{acc} – потенціал акумуляції;

t_{aac} – час акумуляції;

MeCN – ацетонітрил;

MeOH – метанол.

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. З розвитком сільськогосподарської діяльності зросла потреба у захисті великих скупчень свійських тварин від бактеріальних, вірусних чи паразитарних інфекцій. Одним із поширених захворювань свійських тварин є кокцидіоз – паразитарна хвороба, спричинена зараженням найпростішими організмами роду *Eimeria*, дуже швидко поширюється. Хвороба вражає свиней [1], велику рогату худобу [2], овець [3], кролів [4], але найбільше хворіє птиця [5, 6] (наприклад, курей вражає дев'ять різновидів кокцидій – *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. praecox* та *E. Tenella*). Більшість паразитів вражає шлунково-кишковий тракт, але деякі можуть вражати й інші органи, такі як нирки чи печінку. Захворювання може проявлятися у двох формах: хронічна форма спричиняє швидку втрату ваги, погану конверсію корму та недостатню несучість яєць у птиці; гостра форма кокцидіозу призводить до високої смертності тварин. Оскільки фермери зацікавлені у здорових тваринах, швидкому відгодовуванні і малих конверсіях корму, то широкого застосування набули спеціальні добавки – кокцидіостатики. Кокцидіостатики (КОКЦ) – фармакологічно активні речовини, які вводять у корми з профілактичною або лікувальною метою. Значно ефективніше постійно годувати тварин кормом з КОКЦ, тобто профілактика, аніж лікувати вже хворобу, бо лікування значно дорожче коштує і тільки зрідка є вдалим. Згідно з даними Міжнародної федерації охорони здоров'я тварин, з 40,7 млн тонн кормів, які щорічно виробляють у ЄС для птиці та кролів, приблизно 18,3 млн тонн (45 %) містять КОКЦ. КОКЦ як кормові добавки дозволені Регламентом ЄС 1831/2003.

Однак, відомі випадки перехресного забруднення кормів кокцидіостатиками – ненавмисний перехід цих речовин з цільового у нецільовий корм, для якого використання КОКЦ заборонено. Таке забруднення відбувається переважно під час виробництва кормів, транспортування та зберігання, але також можливе на фермі [7-14]. Як результат, це може потенційно викликати токсичні ефекти у нецільових тварин і призводить до

небажаних рівнів залишків КОКЦ у продуктах харчування тваринного походження. Тому рівень КОКЦ у кормах слід особливо контролювати.

Щодо негативного впливу КОКЦ на здоров'я людини, то в разі гострого отруєння спостерігались м'язова слабкість та недостатність міокарда [15]. Однак особливу увагу приділяють хронічній токсичності, що виникає внаслідок тривалого впливу низьких рівнів КОКЦ [16]. Оскільки КОКЦ є антибіотиками, то дуже актуальним є питання розвитку резистентності. Тому встановлено карентні періоди перед забоєм тварин. Наприклад, для кокцидіостатика робенідину (РОБ) карентний період перед забоєм птиці становить 5 днів [15, 17]. Для контролю КОКЦ у продуктах харчування законодавчі органи встановили певні максимально допустимі рівні залишків (МДР).

Отже, для контролю кормів на вміст КОКЦ та для визначення залишків КОКЦ у продуктах тваринного походження потрібні доступні, прості, але водночас надійні методики. Наразі кількість методів визначення КОКЦ обмежена. Зазвичай використовують хроматографію з різними детекторами. Хорошою альтернативою для визначення КОКЦ є вольтамперометрія (ВА), яка поєднує в собі високу селективність, чутливість, порівняно недороге обладнання, короткий час аналізу та можливість автоматизації. Більш того, вольтамперометричні детектори використовують у хроматографічних методах аналізу [18-20]. Тому розроблення нових вольтамперометричних методик визначення кокцидіостатика робенідину є **актуальною** проблемою.

Мета роботи: Розробити методики вольтамперометричного визначення кокцидіостатика робенідину в об'єктах різної природи, таких як корм і м'ясо птиці. Для реалізації мети треба було вирішити такі **завдання**:

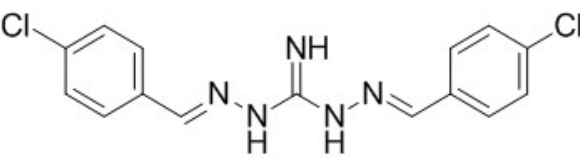
- підібрати оптимальні умови для відновлення РОБ в умовах ВА аналізу;
- перевірити можливість використання стаціонарних амальгамних електродів для визначення РОБ;
- обрати ефективні екстрагенти для вилучення РОБ з комплексних матриць;
- розробити методики ВА визначення РОБ у складних об'єктах і перевірити розроблені методики на реальних об'єктах (кормі для птиці і м'ясі птиці).

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

КОКЦ класифікують на природні поліетерні іонофори (лазалоцид, мадураміцин, монензин, наразін, саліноміцин, семдураміцин) та хімічні або синтетичні (ампроліум, клопідол, декоквінат, диклазурил, галофугінон, неквінат, робенідин, толтраузил) відповідно до їхньої хімічної природи та біологічної активності. Багато синтетичних КОКЦ існує у формі гідрохлориду [21].

Робенідин (РОБ) [1,3-біс(п-хлоробензиліденаміно)гуанідин гідрохлорид] синтезовано у 1970 році [22]. Це високоефективний профілактичний засіб проти восьми видів курячих кокцидій. Зараз його активно використовують у птахівництві, зокрема, для профілактики у 70 % вигодовуваних бройлерів [7]. Директивами Ради ЄС 1455/2004 та 2020/148 дозволено використовувати корми з кількістю РОБ 30-36 мг/кг. Окремі фізико-хімічні характеристики сполуки подано у табл. 1.

Таблиця 1. Деякі фізико-хімічні характеристики робенідину [23].

Структурна формула	М, г/моль	S_w , мг/л	pK_a	$\log K_{ow}$
	334,2	<1	3,3	3,8

Деякі КОКЦ, у тім числі РОБ, заборонено використовувати для курей-несучок, оскільки існує серйозний ризик виведення РОБ з яйцями.

Для контролю РОБ у продуктах харчування законодавчі органи встановили максимально допустимі рівні залишків (МДР). Оскільки у різних тканинах тварин хімічні речовини затримуються по-різному, то МДР залежить від виду тканини. В Європейському Союзі встановлено такі МДР для курячих тканин: 0,80 мг/кг для печінки, 0,35 мг/кг для нирок, 0,20 мг/кг для м'язів та 1,30 мг/кг для шкіри або жиру [24]. Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) встановило МДР 0,20 мг/кг для шкіри та жиру та 0,10 мг/кг для інших харчових тканин [25].

Наразі кількість методів визначення РОБ обмежена. Для ідентифікації РОБ у субстанції чи у простих матрицях описані тонкошарова хроматографія [26] та фотометрія [27]. Селективність фотометричного визначення РОБ дуже низька, бо смуга поглинання РОБ широка і перекривається зі смугами інших КОКЦ, а також багатьох інших речовин.

В аналізі складних об'єктів зазвичай використовують хроматографію з різними детекторами. Коротку характеристику методів визначення РОБ подано у табл. 2.

Таблиця 2. Коротка характеристика методів визначення РОБ.

Метод	Межі лінійності	LOQ	LOD	Об'єкти аналізу	Автори
1	2	3	4	5	6
ВЕРХ	10-1000 мкг/л	15 мкг/кг	10 мкг/л	куряче м'ясо і яйця	[28]
-//-	0,01-1,00 мг/л	30 мкг/кг	10 мкг/кг	риба	[29]
-//-	5~500 нг/мл	-	10 нг/г	куряче і кроляче м'ясо	[30]
ВЕРХ-УФ	-	-	400 мкг/кг	корм для тварин	[31]
-//-	0,05-0,5 мкг/г	0,05 мкг/г	-	куряче м'ясо	[32]
УЕРХ-МС/МС	-	10 мкг/кг	5 мкг/кг	куряче м'ясо	[33]
ВЕРХ-ДАД УФ	-	2 мг/кг	0,2 мг/кг	корм для тварин	[34]
ВЕРХ-Фл	-	-	0,4 мкг/мл	стандартні розчини	[35]
РХ-УФ	0-2000 нг/мл	17 мкг/кг	10 мкг/кг	яйця	[36]
РХ-ДАД УФ	-	0,1 мг/кг	-	корм для тварин	[37]

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5	6
РХ-МС	-	0,02 мг/кг	-	корм для тварин	[37]
Обернено фазова	-	5 мг/кг	-	корм для тварин	[17]
ВЕРХ-УФ					
РХ-МС/МС	-	5 мкг/кг	3 мкг/кг	корм для тварин	[11]
-//-	-	1 мкг/кг	1 мкг/кг	кроляче м'ясо і яйця	[11]

Скорочення у таблиці 2: ВЕРХ – вискоєфективна рідинна хроматографія; УЕРХ – ультраєфективна рідинна хроматографія; РХ – рідинна хроматографія; УФ – з ультрафіолетовим детектором; ДАД УФ – з УФ діодно-матричним детектором; МС/МС – з тандем мас-спектрометричним детектором; Фл – з флуоресцентним детектором.

Недоліки відомих методів очевидні: тривалість пробопідготовки, потреба дорогих реагентів і обладнання.

У роботах [38-39] досліджували полярографічне відновлення РОБ. Автори [38] екстрагували етилацетатом РОБ із курячого жиру, шкіри, м'язів, печінки і яєць; ацетоном – із крові; підкисленим ацетоном – з нирок. Екстракт очищали випаровуванням та твердофазною екстракцією з використанням іонообмінної смоли CG-50. У роботі [39] з концентратів вилучали РОБ за допомогою диметилформаміду, з продуктів тваринного походження – хлороформом. Ці роботи 1977-1978 років, механізму електрохімічного процесу не досліджували, метрологічних характеристик не наведено.

Отож ми дослідили процес відновлення РОБ на ртутному краплинному електроді і твердих амальгамних (полірованому і модифікованому ртутним меніском) електродах. На цій підставі пропонуємо методики визначення РОБ у кормі для тварин і м'ясі птиці.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Обладнання

Для вольтамперометричних досліджень використовували цифрові вольтамперометричні установки MTech OVA-410 [40] з трьохелектродною електролітичною коміркою (робочий ртутний краплинний електрод (р.к.е.), насичений каломелевий електрод порівняння (н.к.е.), платиновий допоміжний електрод); MTech UVA-410 і MTech POL-20 [40] з трьохелектродною електролітичною коміркою (робочий стаціонарний твердий електрод на основі амальгами срібла (полірований р-AgSAE або модифікований ртутним меніском m-AgSAE), аргентумхлоридний електрод порівняння і платиновий допоміжний електрод). У дослідженнях використовували циклічну ВА і метод ВА зі швидкою лінійною розгорткою потенціалу (ВАЛШ) (OVA-410 і UVA-410), які можна розглядати як методи скринінгу. Для розроблення аналітичних методик також використовували методи диференційної імпульсної ВА (ДІВ) і квадратно-хвильової ВА (КХВ) (POL-20).

Характеристики р.к.е.: $m = 5,9 \cdot 10^{-4}$ г/с, $\tau_k = 10$ с у 0,2 М розчині NH_4Cl без накладання напруги поляризації. Струм вимірювали у фіксований момент життя каплі – 8 с.

Тверді амальгамні електроди (AgSAE) є нетоксичною альтернативою традиційним ртутним електродам. Для них також характерні широкий катодний діапазон робочих потенціалів, низький фоновий сигнал, висока відтворюваність результатів, проста конструкція та порівняно легка регенерація поверхні електрода. Крім того, AgSAE механічно стійкі, тому їх можна використовувати для безперервного контролю у потоці [41-44]. Проте щоразу перед вимірюваннями (на початку робочого дня, або коли перерва між вимірюваннями була довшою, ніж одна година) AgSAE треба попередньо підготувати. Полірований р-AgSAE активували механічно: полірували протягом однієї хв дрібнодисперсним оксидом алюмінію. Менісковий m-AgSAE активували електрохімічно шляхом накладання напруги -2,2 В протягом 300 с у розчині 0,20 М KCl. Перед кожним вимірюванням поверхню m-AgSAE і

p-AgSAE треба електрохімічно регенерувати безпосередньо в робочому розчині: $E_{\text{reg}} = -1,1$ В, $t_{\text{reg}} = 60$ с. За допомогою цієї процедури поверхня амальгамних електродів очищається від речовин, які можуть адсорбуватися на поверхні електрода і пасивувати її.

Значення рН розчинів вимірювали потенціометрично рН-метром рН-150 МІ (Росія) з комбінованим скляним електродом.

Для особливо точного зважування використовували аналітичну вагу UYA 6.4Y PLUS Ultra-Microbalance (RADWAG BALANCES AND SCALES, Польща): максимальна маса 6,1 г, мінімальне навантаження 10 мкг, читабельність 0,1 мкг, OIML клас I.

2.2. Стандартні розчини, реагенти й об'єкти дослідження

Субстанція РОБ (Zhejiang K-Sheng Bio-Pharm Co., LTD, Lanxi, Zhejiang KHP), містить згідно паспорта 98,3 % основної речовини. Стандартний розчин з концентрацією РОБ $1,0 \cdot 10^{-3}$ М готували розчиненням точної наважки у метанолі у мірній колбі місткістю 10,0 мл. Для пришвидшення розчинення РОБ метанол підігрівали до 27-30 °С (на водяній електричній бані). Тоді розчин охолоджували до кімнатної температури (приблизно 20 °С) і доводили об'єм до позначки метанолом. Розчин РОБ у метанолі погано зберігається (аналітичний сигнал РОБ зменшується на 25 % впродовж тижня), тож свіжий стандартний розчин готували на початку кожного робочого дня.

Стандартний розчин HCl готували з фіксаналу.

Концентровані розчини HClO_4 , HCOOH , CH_3COOH , HNO_3 , H_2SO_4 і H_3PO_4 були кваліфікації “ч.д.а”. Використовували розчинники метанол, ацетонітрил, ДМФА класу “для хроматографії”.

У роботі використовували зразки корму для свійської птиці і м'яса птиці (м'язові тканини), у яких не було РОБ, – підтверджено аналізом ВЕРХ-МС/МС, виконаним Національною референс-лабораторією з контролю залишкових кількостей діючих речовин ветеринарних препаратів та кормових добавок Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок (м. Львів).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відновлення РОБ досліджували на трьох робочих електродах (р.к.е., p-AgSAE, m-AgSAE) з різними типами розгортки потенціалу. РОБ відновлюється з утворенням одного чіткого піку на циклічній вольтамперограмі (рис. 1) з потенціалом піку -0,85 В на р.к.е., -0,94 В на p-AgSAE, -0,82 В і -0,92 В на m-AgSAE методами ДІВ і КХВ відповідно [45]. На анодній частині циклічних вольтамперограм не простежували жодних піків зі зміною умов у межах потенціалів від -1,5 до 0 В. Отже, процес відновлення РОБ необоротний.

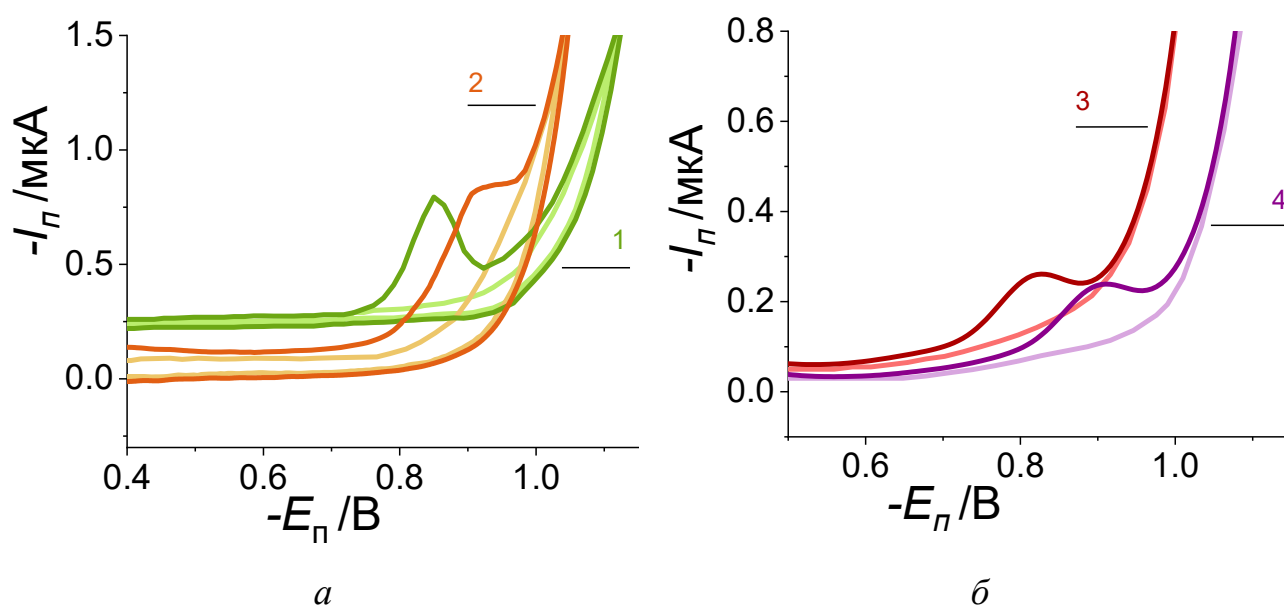


Рис. 1. Вольтамперограми (а) у розчинах РОБ на р.к.е. (1) і p-AgSAE (2) методами циклічної ВА; на m-AgSAE (б) методами ДІВ (3) і КХВ (4); світліші кольори – відповідна лінія фону (розчин HCl + 30% MeOH), $C_{HCl}=0,08$ М; $C_{РОБ}=5,1 \cdot 10^{-6}$ М, для р.к.е. $v=0,5$ В/с, для p-AgSAE і m-AgSAE $E_{acc} = -0,10$ В і $t_{acc}=125$ с.

Для вибору оптимальних умов (природа фонового електроліту, рН, час і потенціал акумуляції) ми використали катодну ВА зі швидкою лінійною розгорткою потенціалу.

3.1. Вплив рН і фонового електроліту

Для дослідження впливу рН на відновлення РОБ змінювали значення рН в межах від 0,5 до 10: рН < 3 забезпечували хлоридною, формиатною і ацетатною кислотами, рН > 3 – універсальною буферною сумішшю. Струм піку відновлення досягає найбільшого значення у кислому середовищі за рН < 2,5 (рис. 2а, вставка). За рН ≥ 7 струм піку відновлення РОБ був найменшим, струм і потенціал піку практично не змінювалися зі збільшенням рН і загалом погано відтворювалися, очевидно, через дуже малу розчинність РОБ у лужному середовищі.

Потенціал піку відновлення зміщується у негативну ділянку зі збільшенням рН (рис. 2а, вставка), що свідчить про участь іонів H^+ в електрохімічному процесі. На залежності E_p від рН простежується три лінійні ділянки, які можна описати рівняннями, представленими у табл. 3. Найбільш “строга” лінійна залежність E_p від рН простежується для інтервалу рН 1,0-2,5.

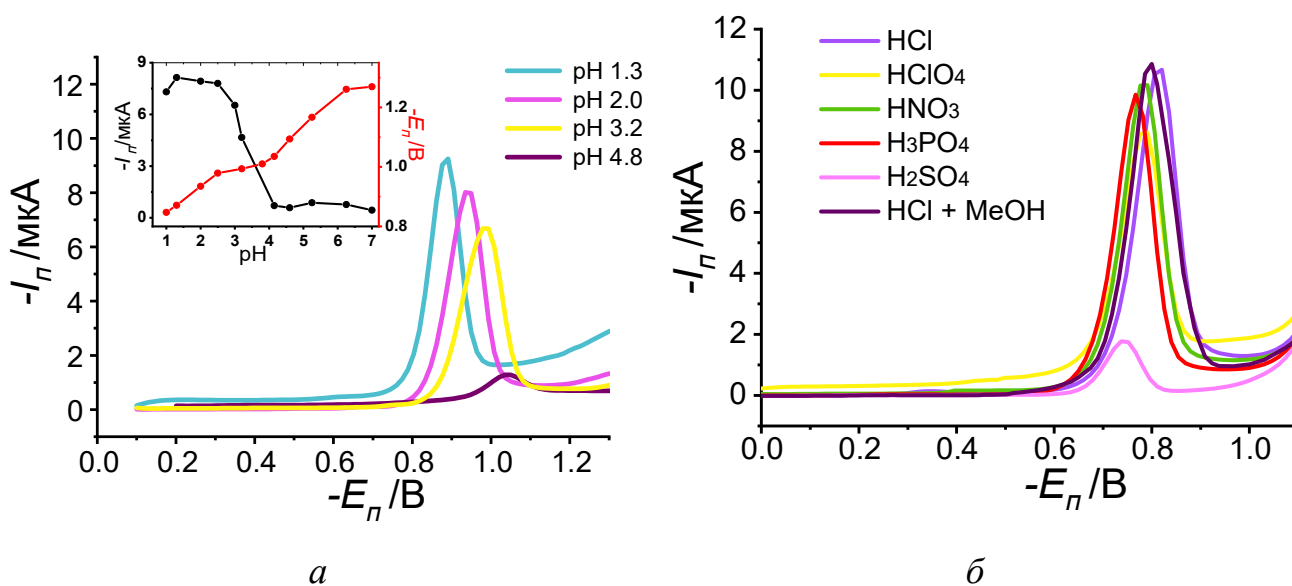


Рис. 2. Вольтамперограми у розчинах РОБ за різних значень рН (а) та графік залежностей струму і потенціалу піку відновлення від рН (вставка); вольтамперограми РОБ за рН 1,3, одержані на різних фонових електролітах (б). Умови: р.к.е., ВАЛШ, $v=0,5$ В/с, $C_{\text{РОБ}}=4,0 \cdot 10^{-5}$ М.

Таблиця 3. Рівняння лінійних ділянок залежності потенціалу піку від рН розчину РОБ.

Межі рН	Рівняння	Коефіцієнт кореляції, R
1,0-2,5	$E=(0,758\pm0,002)+(0,089\pm0,001)\cdot\text{pH}$	0,9995
3,2-4,2	$E=(0,87\pm0,04)+(0,042\pm0,012)\cdot\text{pH}$	0,8536
4,6-6,2	$E=(0,634\pm0,028)+(0,101\pm0,005)\cdot\text{pH}$	0,9948

Оскільки струм піку відновлення РОБ досягає максимального значення за рН 1,0-1,5, то для подальших досліджень обрали рН 1,3, яке відповідає середині інтервалу і, в разі використання сильної кислоти, забезпечує достатню для ВА іонну силу розчину.

Як фонові електроліти дослідили HCl, HClO₄, HNO₃, H₂SO₄ і H₃PO₄ (рис. 2б). Усі кислоти (за винятком H₂SO₄) можуть забезпечити необхідне значення рН, і в результаті отримуємо відносно високі значення струму піку відновлення. Сульфатна кислота, імовірно, виявляє окиснювальні властивості, тому струм відновлення РОБ значно зменшувався [46].

Оскільки в аналізі складних матриць, таких як м'ясо чи корм, для вилучення КОКЦ використовують органічні екстрагенти [11, 17, 28-37, 47-54] і форміатну кислоту для створення кислого рН, то дослідили вплив органічних розчинників як індивідуально (метанол, ДМФА, ацетонітрил), так і їхні суміші (рис. 3). Для подальших досліджень [55] обрали 30% MeOH, 30% MeCN і водний розчин HCl (концентрація HCl в усіх розчинах C_{HCl}=0,08 М), бо в таких розчинах можна забезпечити необхідне значення рН і найвищі значення струму піків відновлення РОБ.

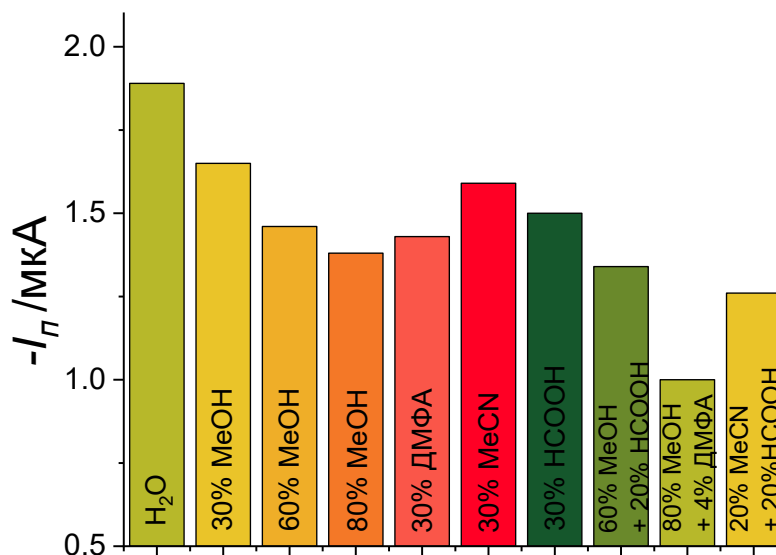


Рис. 3. Вибір екстрагента для вольтамперометричного визначення РОБ у м'ясі та кормі. У всіх розчинах як фоновий електроліт HCl. Умови: р.к.е., ВАЛШ, $\nu=0,5$ В/с, $C_{\text{РОБ}}=1,3 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{HCl}}=0,08$ М.

3.2. Вибір інструментальних параметрів одержання вольтамперограм

Вплив швидкості розгортки напруги поляризації (ν) досліджували на р.к.е. і р-AgSAE в межах від 0,1 до 4,5 В/с для розчинів з концентрацією РОБ $C_{\text{РОБ}}=1,0 \cdot 10^{-5}$ М і $C_{\text{РОБ}}=5,0 \cdot 10^{-5}$ М. Зі збільшенням ν значення струму піку збільшувалося, а потенціал зсувався у катодну ділянку. Тангенс кута нахилу залежності $\lg I$ від $\lg \nu$ (рис. 4а) дорівнює 0,51 для $C_{\text{РОБ}}=1,0 \cdot 10^{-5}$ М і 0,42 для $C_{\text{РОБ}}=5,0 \cdot 10^{-5}$ М, рН 1,3. Подальші дослідження методом ВАЛШ виконували з $\nu=0,5$ В/с на р.к.е., і $\nu=1,0$ В/с для р-AgSAE. Одержані залежності також використали для дослідження механізму відновлення РОБ [56].

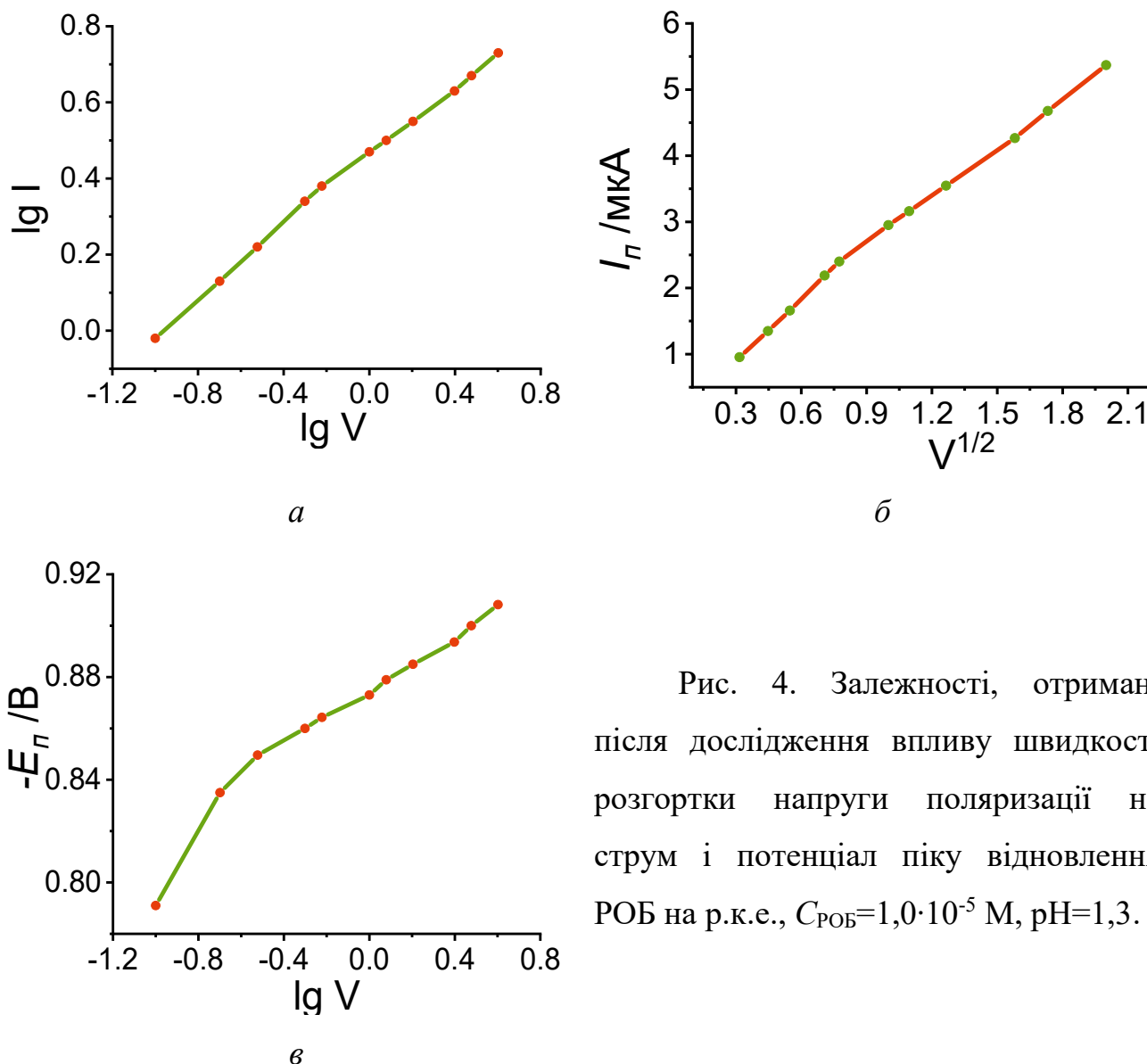


Рис. 4. Залежності, отримані після дослідження впливу швидкості розгортки напруги поляризації на струм і потенціал піку відновлення РОБ на р.к.е., $C_{\text{РОБ}}=1,0 \cdot 10^{-5}$ М, $\text{pH}=1,3$.

Для амальгамних електродів дослідили вплив параметрів акумуляції. На рис. 5 зображено відповідні залежності на прикладі р-AgSAE. Потенціал акумуляції (E_{acc}) змінювали в межах від -0,05 В до -0,60 В для р-AgSAE і від -0,05 до -1,10 В для m-AgSAE (за фіксованого часу акумуляції t_{aac}). Найбільше значення струму піку досягається за $E_{\text{acc}}=-0,10$ В для обох електродів, тому такий потенціал акумуляції обрали для подальших досліджень.

Час акумуляції змінювали від 5 с до 185 с. Струм піку збільшується лінійно зі збільшенням t_{aac} від 5 с до 125 с. При більшому часі накопичення від 125 с до 185 с значення струму змінювалося незначно, очевидно через блокування поверхні електрода. Тому для подальших вимірювань на обох електродах було обрано $t_{\text{aac}}=125$ с.

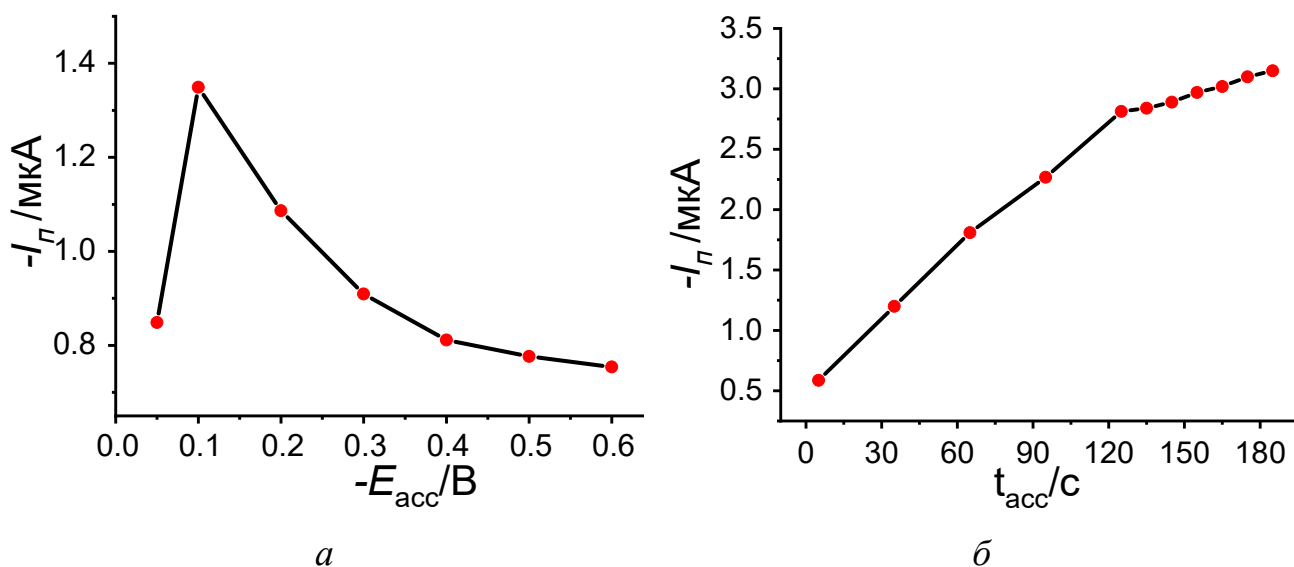


Рис. 5. Вплив потенціалу акумуляції на р-AgSAE (а) і часу акумуляції на р-AgSAE (б) на значення струму піку відновлення розчину РОБ з фоновим електролітом HCl + 30% MeOH; $C_{POB}=6,0 \cdot 10^{-5}$ М для р-AgSAE, pH=1,3, в усіх розчинах $C_{HCl}=0,08$ М.

Результати оптимізації інструментальних параметрів для ДІВ і КХВ подано у табл. 4. Обираючи один з параметрів, інші параметри залишали фіксованими.

Таблиця 4. Оптимізація інструментальних параметрів для ДІВ і КХВ.

Різновид ВА	Досліджуваний параметр	Досліджувані межі	Фіксований параметр	Обране значення параметру
ДІВ	Амплітуда імпульсу Р	20-100 мВ	$t_1=50$ мс, $t_2=100$ мс	100 мВ
	Тривалість імпульсу t_1	50-500 мс	$P=100$ мВ, $t_2=100$ мс	50 мс
	Паузи між імпульсами t_2	50-1000 мс	$P=100$ мВ, $t_1=50$ мс	50 мс
КХВ	Амплітуда імпульсу Р	10-50 мВ	$f=10$ Гц	50 мВ
	Частота, f	20-3 Гц	$P=50$ мВ,	20 Гц

3.3. Механізм відновлення РОБ

Тангенс кута нахилу залежності $\lg I$ від $\lg v$ (рис. 4а) дорівнює 0,51 для $C_{\text{РОБ}}=1,0 \cdot 10^{-5}$ М і 0,42 для $C_{\text{РОБ}}=5,0 \cdot 10^{-5}$ М, рН 1,3. Це дуже близько до теоретичного значення 0,5, яке вказує на дифузійну природу струму. Також відповідно до рівняння Рендлса-Шевчика для необоротних реакцій лінійна залежність I_p від квадратного кореня із швидкості сканування ($v^{1/2}$) (рис. 4б) чітко відображає дифузійний характер електродної реакції [57-60].

Отримані експериментальні залежності дають змогу обчислити кількість протонів і електронів, які беруть участь у реакції відновлення РОБ. Кількість електронів можна визначити зі залежності $E_p = f(\lg v)$, де нахил кривої дорівнює $2,3RT/\alpha nF$ (F – константа Фарадея, R – універсальна газова стала, n – кількість електронів, α – коефіцієнт перенесення заряду, який для необоротних процесів дорівнює 0,5, T – температура). Для цього вивчали вплив швидкості розгортки напруги поляризації для розчинів РОБ різної концентрації (рис 4в). Обчислені значення n коливалися від 1,8 до 2,2.

Додатково ще обчислили кількість електронів на основі параметрів вольтамперограм згідно з рівнянням [58, 60]:

$$\alpha n = -47,7 / (E_p - E_{p/2}), (1)$$

де E_p – потенціал піку відновлення, мВ, $E_{p/2}$ – потенціал на половині піку відновлення, мВ.

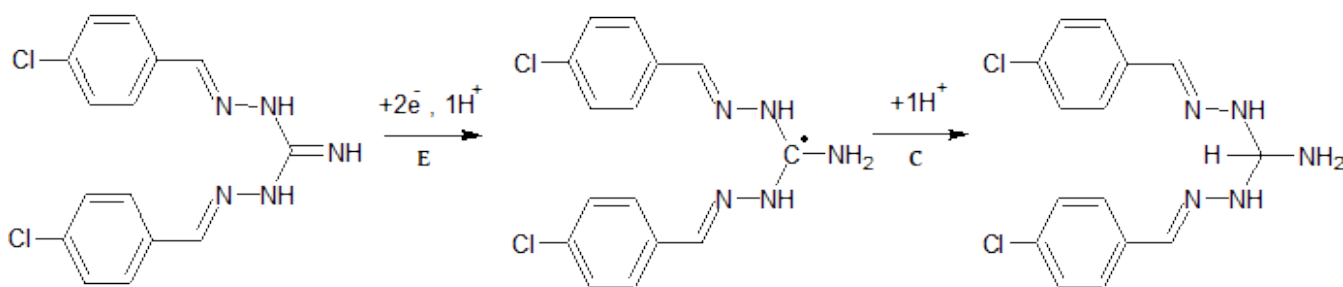
Для цього використовували вольтамперограми у розчинах РОБ за різних значень рН (1-7), з різними концентраціями РОБ і з різними фоновими електролітами (HCl і HCl + 30% MeOH). За результатами розрахунків одержали значення n в межах 1,9-2,3. На підставі результатів, отриманих двома методами, зробили висновок, що в електрохімічній реакції відновлення РОБ бере участь два електрони.

Співвідношення кількості протонів (zH^+) і електронів n , які беруть участь в електрохімічній реакції, можна обчислити із залежності потенціалу піку від рН (рис. 2а, вставка) за рівнянням:

$$\frac{dE}{dpH} = \frac{2.3RT \cdot zH^+}{\alpha nF} \quad (2)$$

У таблиці 3 подано рівняння лінійних залежностей потенціалу піку відновлення від рН розчину. Розраховані значення zH^+ є в межах 0,7-1,2, тобто в електрохімічній реакції бере участь один протон.

РОБ може існувати у двох таутомерних формах і має щонайменше три реакційні центри, здатних до відновлення за участю протонів. Першою стадією є електрохімічне приєднання (Е) двох електронів і одного протона. Це етап, який визначає швидкість електрохімічного процесу. Далі у сильноокислому середовищі найімовірніше відбувається приєднання другого протону (хімічна стадія, С) за наступною схемою [61]:



3.4. Використання результатів дослідження в аналізі

3.4.1. Методика одержання градувальних розчинів

Аліквоту стандартного розчину РОБ вливали у мірну колбу місткістю 25,0 мл для одержання розчину потрібної концентрації, тоді додавали 7,0 мл фонового електроліту (були досліджені фонові електроліти різної природи, див. п. 3.1), до позначки доводили бідистильованою водою. Переносили розчин до електролітичної комірки, видаляли розчинений кисень очищеним аргоном протягом 10 хв та реєстрували вольтамперограми в інтервалі потенціалів від 0,0 до -1,1 В. Вимірювали струм піку I_p , мкА і будували залежність I_p , мкА від концентрації РОБ C , М (рис. 6). Аналітичні параметри залежностей подано у табл. 5. LOD і LOQ для визначення обчислювали так: $LOD = 3,3S_a/b$; $LOQ = 10S_a/b$ (S_a – залишкове стандартне відхилення параметра a у рівнянні прямої лінійної залежності I , мкА – C , М; b – кутовий коефіцієнт цієї залежності) [57].

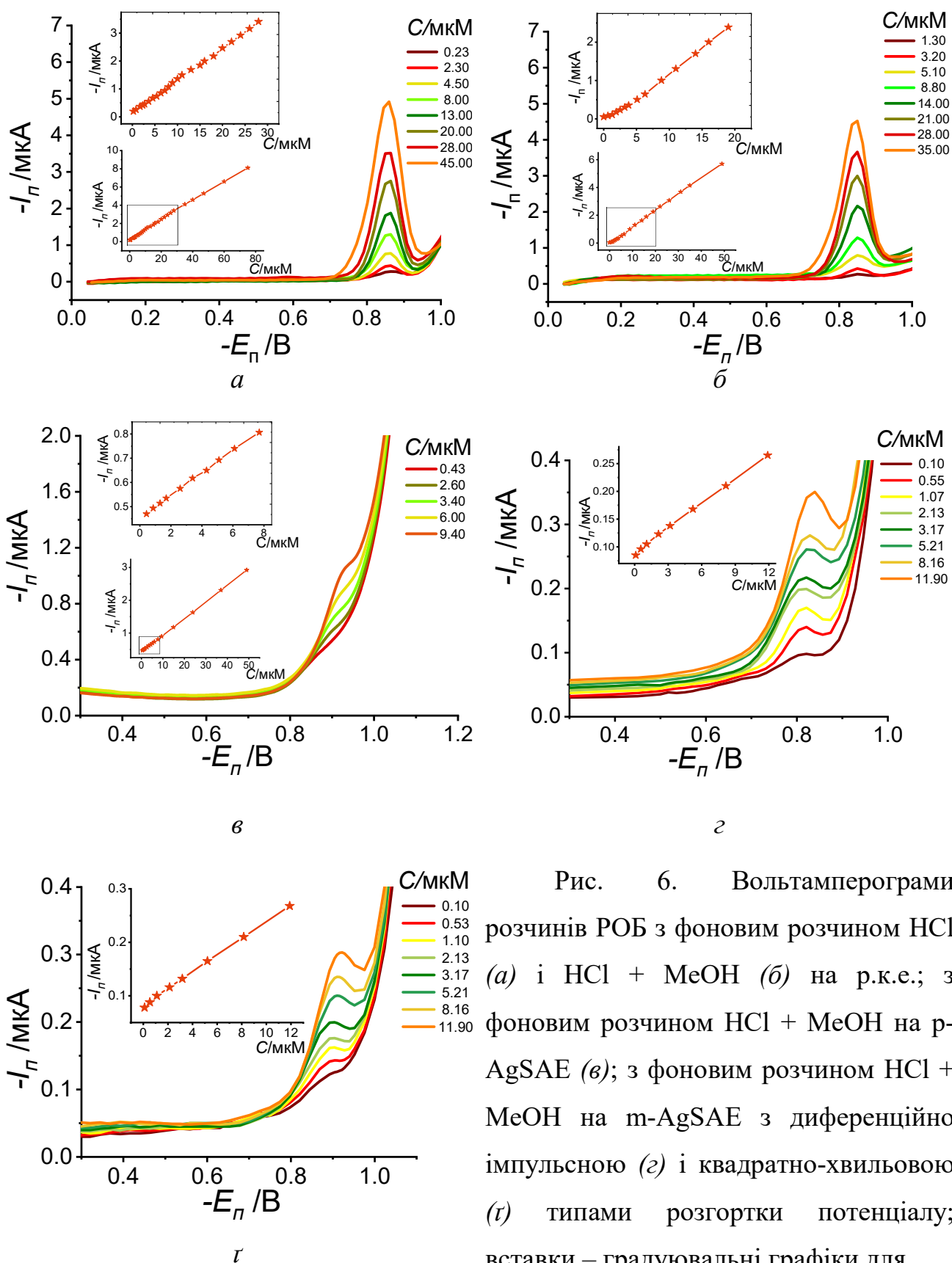


Рис. 6. Вольтамперограми розчинів РОБ з фоновим розчином HCl (*a*) і HCl + MeOH (*б*) на р.к.е.; з фоновим розчином HCl + MeOH на р-AgSAE (*в*); з фоновим розчином HCl + MeOH на m-AgSAE з диференційно імпульсною (*г*) і квадратно-хвильовою (*д*) типами розгортки потенціалу; вставки – градувальні графіки для

кожного фонового електроліту, робочого електрода і типу розгортки; pH 1,3, $v=0,5$ В/с на р.к.е., для р-AgSAE $v=1,0$ В/с, $E_{acc}=-0,10$ В, $t_{acc}=125$ с; в усіх розчинах $C_{HCl}=0,08$ М.

Таблиця 5. Аналітичні параметри градувальних графіків, $C_{\text{HCl}}=0,08 \text{ M}$

Робочий електрод	Р.к.е.		p-AgSAE	m-AgSAE	
Фоновий електроліт	HCl	HCl + 30% MeOH	HCl + 30% MeOH	HCl + 30% MeOH	HCl + 30% MeOH
Аналітичні параметри					
Різновид ВА	ВАЛШ	ВАЛШ	ВАЛШ	ДІВ	КХВ
Швидкість розгортки v , В/с	0,5	0,5	1,0	Див. табл. 4	Див. табл. 4
Потенціал піку E , В	-0,86	-0,85	-0,93	-0,82	-0,92
Діапазон лінійної залежності I_p , мкА від C , М ^[a]	$2,3 \cdot 10^{-7} - 7,5 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^{-7} - 5,0 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-7} - 5,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-7} - 1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-7} - 1,2 \cdot 10^{-5}$
Параметр $b \pm \Delta b$, мкА/М	$(116,0 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(128,4 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(46,4 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(19,91 \pm 0,24) \cdot 10^3$	$(24,73 \pm 0,21) \cdot 10^3$
Параметр $a \pm \Delta a$, мкА	$(15,3 \pm 0,6) \cdot 10^{-2}$	$(-5,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-2}$	$(45,4 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$	$(88,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$	$(80,50 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$
Коефіцієнт кореляції, R	0,99996	0,99997	0,99968	0,99923	0,99947
RSD	0,011	0,010	0,004	0,008	0,006
Межа визначення (LOQ), М	$5,2 \cdot 10^{-7}$	$4,7 \cdot 10^{-7}$	$4,1 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-7}$	$4,0 \cdot 10^{-7}$
Межа виявлення (LOD), М	$1,7 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$

^[a] вищі концентрації розчинів РОБ не досліджували.

3.4.2. Методика пробопідготовки і одержання градувального графіку для визначення РОБ у кормі для тварин

На аналітичній вазі важили 0,25 г корму (див. п. 2.2) у пластикову пробірку для центрифуги (об'ємом 15,0 мл), додавали 10,0 мл фонового електроліту, інтенсивно перемішували протягом 10 хв. Потім суміш центрифугували протягом 5 хв на швидкості 5000 оборотів на хв, за допомогою мірної піпетки переносили 8,0 мл розчину в електролітичну комірку. Далі безпосередньо у електролітичну комірку за допомогою мікропіпетки додавали певні об'єми стандартного розчину РОБ. Перед кожним вимірюванням усували розчинений кисень очищеним аргонем. Вольтамперограми реєстрували в межах від 0,0 до -1,1 В. Отримані залежності зображено на рис. 7, метрологічні характеристики градувальних графіків для визначення РОБ у кормі для свійської птиці подано у табл. 6.

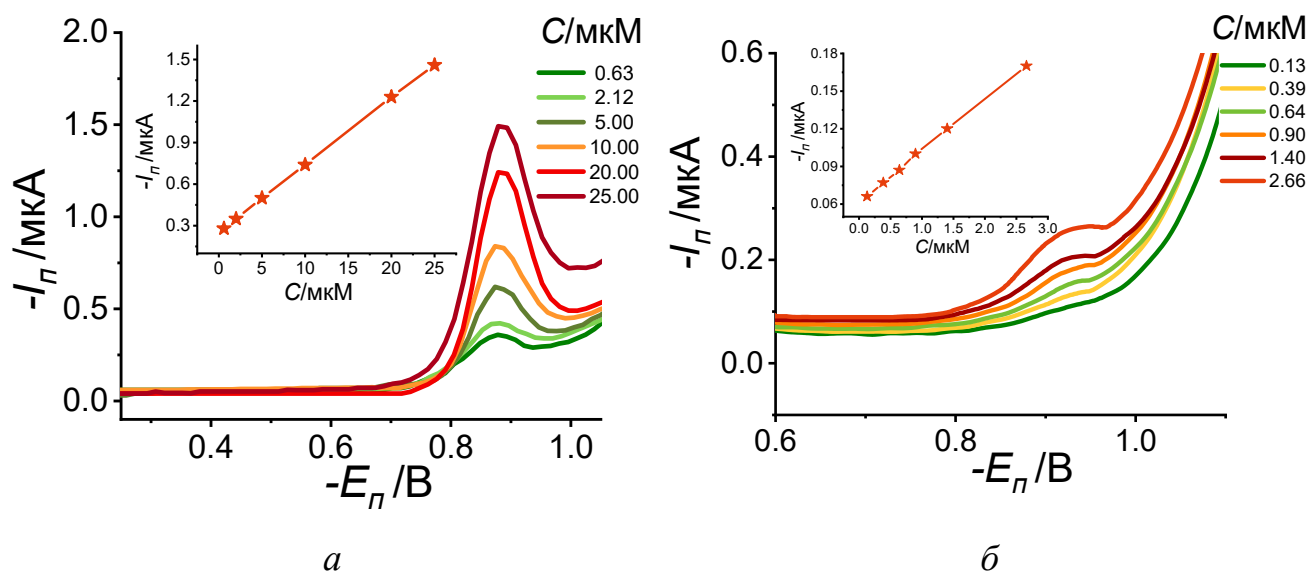


Рис. 7. Вольтамперограми на р.к.е. (а), р-AgSAE (б) і відповідні градувальні графіки (вставки), одержані в розчинах екстрактів з корму для свійської птиці. Умови: HCl + MeOH, $C_{\text{HCl}}=0,08$ М, для р.к.е $v=0,5$ В/с.; для р-AgSAE $v=1,0$ В/с, $E_{\text{acc}}=-0,10$ В, $t_{\text{acc}}=125$ с.

3.4.3. Методика пробо підготовки й одержання градуовального графіку для визначення РОБ у м'ясі

Градуовальні графіки для визначення РОБ у м'ясі одержували з використанням різних екстрагентів.

Спосіб I. На аналітичній вазі важили 1,00 г м'яса (див. п. 2.2) у пластикову пробірку для центрифуги (об'ємом 15,0 мл), додавали 10,0 мл суміші HCl + 30% метанолу, інтенсивно перемішували протягом 20 хв. Після центрифугування впродовж 15 хв на швидкості 5000 оборотів/хв за допомогою мірної піпетки переносили 8,00 мл розчину в електролітичну комірку. Далі безпосередньо в електролітичну комірку за допомогою мікропіпетки додавали певні об'єми стандартного розчину РОБ і продовжувати так само, як описано для аналізу корму. Отримали залежності, зображені на рис. 8а, метрологічні характеристики зазначено в табл. 6.

Спосіб II. РОБ вилучали ацетонітрилом, який часто використовують для хроматографічного визначення РОБ [9, 47-50, 52, 53, 32, 36]. Важили 1,00 г м'яса в пластикову пробірку для центрифуги (15,0 мл), додавали 5,0 мл ацетонітрилу, інтенсивно перемішували протягом 20 хв. Після центрифугування протягом 15 хв на швидкості 5000 оборотів/хв за допомогою мірної піпетки переносили 4,00 мл розчину у мірну колбу місткістю 10,0 мл, додавали 0,40 мл розчину HCl ($C_{\text{HCl}}=2,00 \text{ M}$), до позначки доводили бідистильованою водою. Розчин інтенсивно перемішували, за допомогою мірної піпетки переносили 8,00 мл розчину в електролітичну комірку. Безпосередньо в електролітичну комірку за допомогою мікропіпетки додавали певні об'єми стандартного розчину РОБ і продовжувати так само, як описано для корму. Отримали залежності, які зображено на рис. 8б, метрологічні характеристики подано в табл. 6.

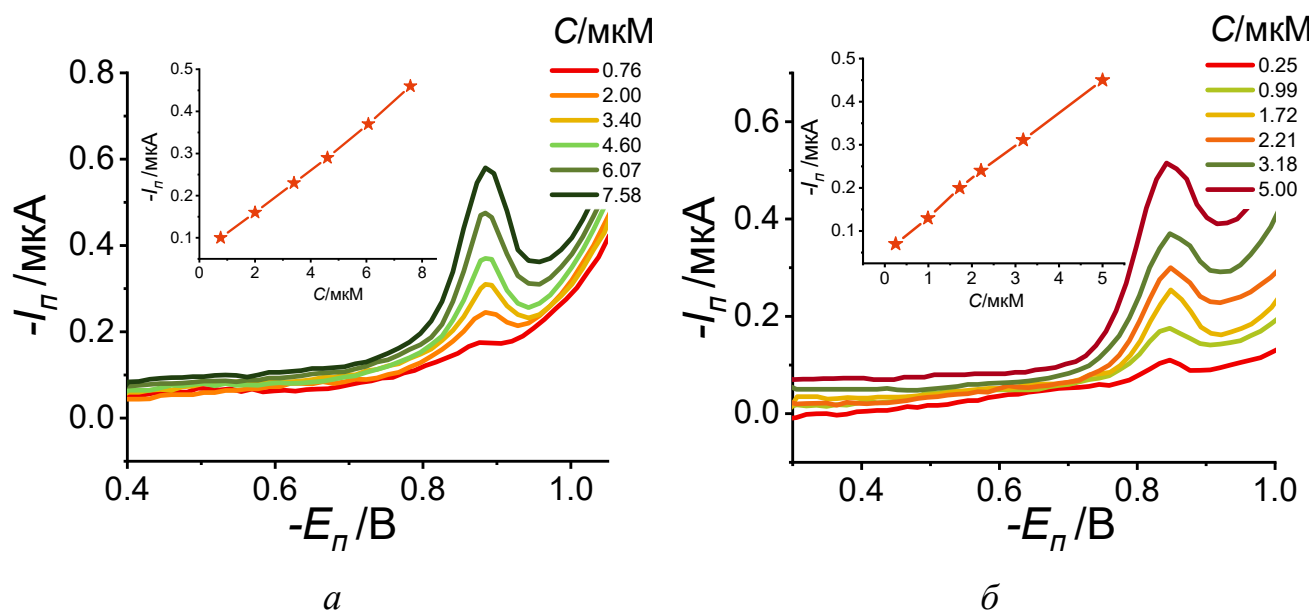


Рис. 8. Вольтамперограми і відповідні градувальні графіки (вставки), одержані в екстрактах HCl + MeOH (а) і HCl + MeCN (б) з м'яса птиці.

Вольтамперограми, одержані у розчинах екстрактів з корму чи м'яса, порівняли з вольтамперограмами для стандартних розчинів РОБ (рис. 6). Значення струму фонові лінії для розчинів екстрактів є дещо вищим, ніж для стандартних розчинів, однак не виникає ніяких нових піків. Струм фону зазвичай вищий для реальних зразків, що пов'язане з матричним ефектом. Відсутність інших піків на вольтамперограмах з розчинів екстрактів сприяє селективності визначення РОБ.

Таблиця 6. Метрологічні параметри градувальних графіків визначення РОБ у кормі та м'ясі, $C_{\text{HCl}}=0,08 \text{ M}$.

Робочий електрод	Р.к.е.			p-AgSAE	
Фоновий електроліт	Корм	М'ясо		Корм	М'ясо
Аналітичні параметри	HCl + MeOH	HCl + MeCN	HCl + MeOH	HCl + MeOH	HCl + MeOH
Потенціал піку E, В	-0,87	-0,84	-0,88	-0,94	-1,00
Діапазон лінійної залежності I_p , мкА від $C_{\text{РОБ}}$, М	$6,0 \cdot 10^{-7} - 2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-7} - 5,0 \cdot 10^{-6}$	$7,6 \cdot 10^{-7} - 7,6 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-7} - 2,6 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-7} - 1,4 \cdot 10^{-6}$
Діапазон лінійної залежності I_p , мкА від умісту РОБ мг/кг	8,90-370,70	0,93-18,54	2,82-28,17	1,93-38,55	0,41-51,90
Коефіцієнт кореляції, R	0,9998	0,9989	0,9992	0,9996	0,9993
Параметр b , мкА/М	$46,46 \cdot 10^3$	$79,9 \cdot 10^3$	$52,5 \cdot 10^3$	$41,1 \cdot 10^3$	$474,5 \cdot 10^3$
Δb , мкА/М	$0,22 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$0,6 \cdot 10^3$	$10,0 \cdot 10^3$
Параметр a , мкА	$25,4 \cdot 10^{-2}$	$55,7 \cdot 10^{-3}$	$54,7 \cdot 10^{-3}$	$61,5 \cdot 10^{-3}$	$120,7 \cdot 10^{-3}$
Δa , мкА	$3,1 \cdot 10^{-2}$	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$0,7 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^{-3}$
LOQ, М	$6,39 \cdot 10^{-7}$	$6,13 \cdot 10^{-7}$	$9,33 \cdot 10^{-7}$	$1,70 \cdot 10^{-7}$	$1,37 \cdot 10^{-7}$
LOQ, мг/кг	9,48	2,27	3,46	2,52	0,51
LOD, М	$2,11 \cdot 10^{-7}$	$2,02 \cdot 10^{-7}$	$3,08 \cdot 10^{-7}$	$5,62 \cdot 10^{-8}$	$4,52 \cdot 10^{-8}$
LOD, мг/кг	0,31	0,75	1,14	0,83	0,17

3.5. Результати аналізу реальних зразків

Для перевірки розроблених методик визначення РОБ створювали модельні зразки корму і м'яса. Корм і м'ясо, які описано у п. 2.2, збагачували точно відомими кількостями РОБ.

У точні наважки чистих (без РОБ) зразків корму вводили точні наважки субстанції РОБ і перемішували протягом 10 годин на пристрої вортєксного типу, тоді зберігали тиждень у холодильнику.

Детальну процедуру пробопідготовки зразків корму описано у п. 3.4.2. Визначення виконували методом добавок: в екстракт корму в електролітичній комірці за допомогою мікропіпетки вводили добавки стандартного розчину РОБ. Після введення кожної добавки розчин продували очищеним аргоном протягом трьох хв для усунення розчиненого кисню і перемішування розчину, тоді реєстрували вольтамперограми (рис. 9а і 9б). Результати визначення представлено у табл. 7.

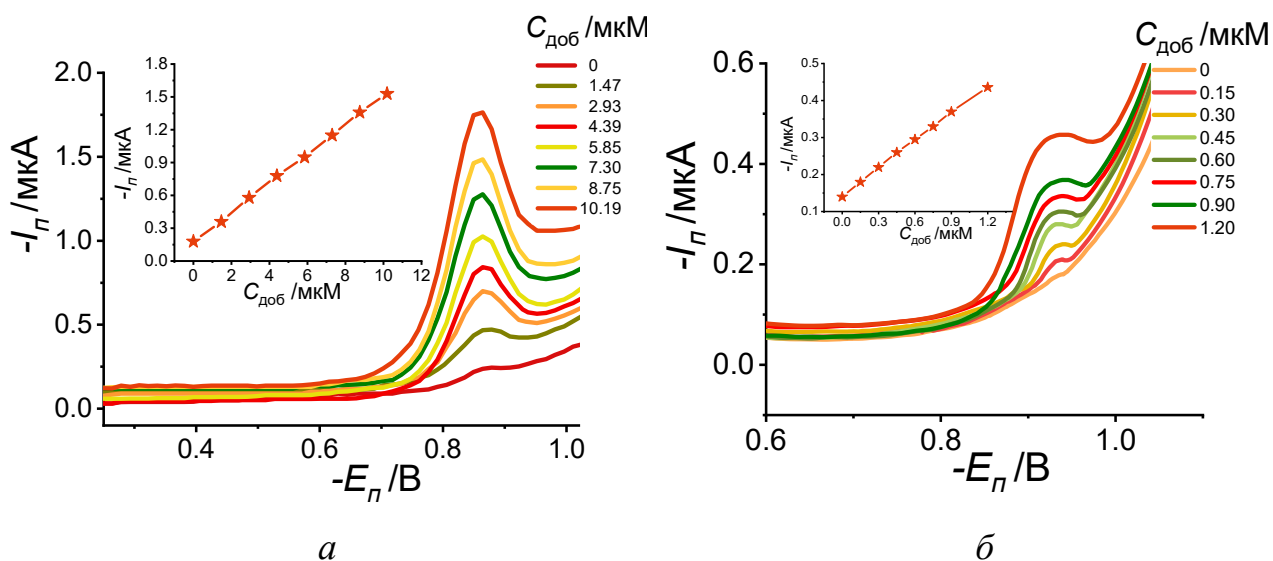
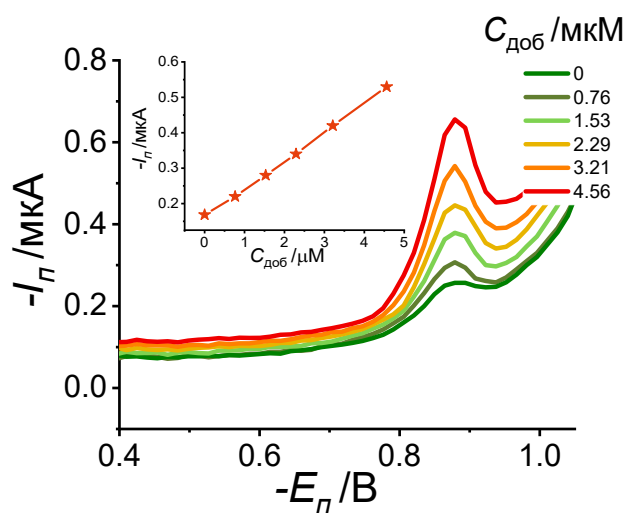


Рис. 9. Визначення РОБ у кормі способом стандартних добавок: вольтамперограми у розчинах екстрактів з корму з фоновим розчином $\text{HCl} + \text{MeOH}$ на р.к.е. (а) і на р-AgSAE (б), вставки – градуювальні графіки. Умови: $\text{HCl} + \text{MeOH}$, $C_{\text{HCl}} = 0,08 \text{ M}$, для р.к.е $v = 0,5 \text{ V/s}$; для р-AgSAE $v = 1,0 \text{ V/s}$, $E_{\text{acc}} = -0,10 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 125 \text{ s}$.

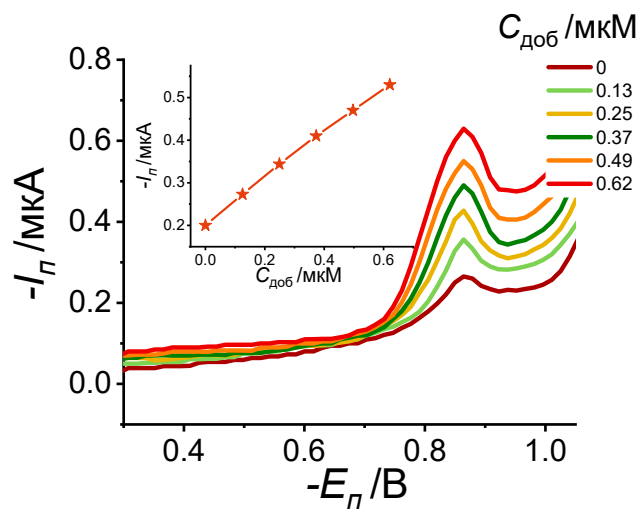
У точні наважки чистих (без РОБ) зразків м'яса вводили (заколювали шприцом) точні об'єми стандартного розчину РОБ. Такі модельні зразки зберігали у холодильнику не менше 24 годин і тільки тоді аналізували на вміст РОБ.

Детальну процедуру пробопідготовки зразків м'яса описана у п. 3.4.3. РОБ вилучали з м'яса двома способами: підкисленим метанолом (*Спосіб I*) і ацетонітрилом (*Спосіб II*). Визначення виконували методом добавок: в екстракт м'яса в електролітичній комірці за допомогою мікропіпетки вводили добавки стандартного розчину РОБ. Після введення кожної добавки розчин барботували очищеним аргонном протягом 3 хв для усунення розчиненого кисню і перемішування розчину, тоді реєстрували вольтамперограми (рис. 10а і 10б). Результати визначення подано у табл. 7.

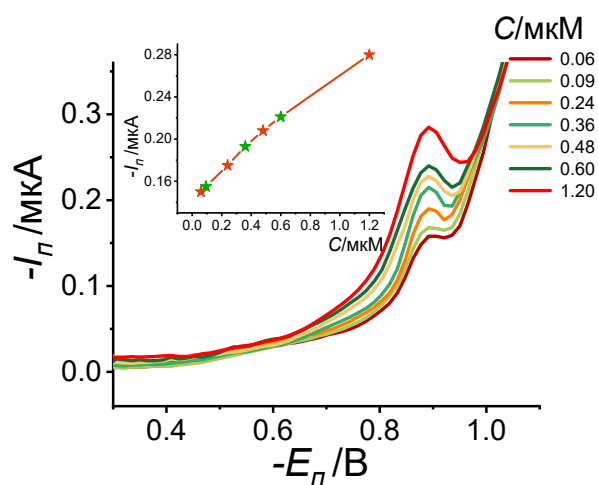
Під час аналізу зразків м'яса за такою методикою виявилася систематична похибка: ступінь визначення був надто великим (табл. 7). Імовірно, відбувається взаємодія РОБ з матричними компонентами м'яса, і таким чином аналітичний сигнал значно посилюється. Отже, для аналізу м'яса введення добавки стандартного розчину РОБ в електрохімічну комірку не підходить. Тому ми випробували інший спосіб, коли кожна стандартна добавка вводиться (заколюється шприцом) в окрему пробу м'яса (рис. 10в). Далі вилучали РОБ так само, як у *Способі II*. На жаль, через карантинні обмеження ми встигли апробувати такий спосіб тільки для р.к.е. для двох зразків. Ми підтвердили, що такий підхід є ефективним, однак ще потребує доопрацювання. Результати визначення наведено у табл. 7.



а



б



в

Рис. 10. Визначення РОБ у м'ясі: вольтамперограми і відповідні градувальні графіки (вставки), одержані в екстрактах HCl + MeOH (сп. I – а) і HCl + MeCN (сп. II – б) (сп. III – в); pH 1,3, $\nu=0,5$ В/с; в усіх розчинах $C_{\text{HCl}}=0,08$ М.

Таблиця 7. Результати аналізу методом «введено-знайдено» реальних зразків корму і м'яса, отримані розробленими нами методиками.

Додано (уведено) РОБ, мг/кг	Експериментально знайдено РОБ, мг/кг		Ступінь визначення	
	На р.к.е., $n=5, P=0,95$	На р-AgSAE, $n=3, P=0,95$	$Z = \frac{C_{\text{експ. знайд}}}{C_{\text{ув}}} \cdot 100 \%$	
			На р.к.е.	На р-AgSAE
КОРМ				
17,5	19,7±0,8	—	112,6	—
18,9	18,7±0,5	—	98,9	—
19,6	19,8±0,4	19,7±0,3	101,0	100,51
40,5	40,5±0,3	40,45±0,21	100,0	99,88
М'ЯСО (спосіб I і спосіб II)				
0,30	1,3±0,5	0,76±0,3	433,3	253,33
0,60	2,1±1,0	—	350,0	—
1,70	3,3±1,2	—	194,1	—
3,40	7,8±3,6	—	229,4	—
М'ЯСО (спосіб III)				
0,30	0,34±0,11	—	113,3	—
0,90	1,00±0,09	—	111,1	—

ВИСНОВКИ

1. Проблема контролю вмісту кокцидіостатиків є актуальною для харчової промисловості. Ми дослідили відновлення робенідину на ртутному краплинному електроді і твердих амальгамних електродах (полірованому і модифікованому ртутним меніском) методами циклічної, швидкої лінійної, диференційної імпульсної і квадратно-хвильової вольтамперометрії. На всіх вольтамперограмах простежується один контрольований дифузійний пік, струм якого прямо залежить від концентрації робенідину у широких межах (більше, ніж два порядки).
2. Робочі електроди на основі ртутних крапель (р.к.е., SDME або HDME) найкраще підходять для швидкого аналізу зразків зі складною матрицею, які не пройшли складної підготовки. Тверді амальгамні електроди (AgSAE) ефективніші для постійного контролю у потоці. Вольтамперометричне визначення за струмом відновлення зазвичай є більш селективним, ніж за струмом окиснення, оскільки більшість органічних сполук, включаючи ті, що містять групу –ОН, здатні вольтамперометрично окиснюватися.
3. Вперше вивчено механізм відновлення робенідину: відновлення відбувається за ЕС механізмом з перенесенням в електрохімічній стадії двох електронів і одного протона.
4. Розроблено просту, швидку, вибірккову та надійну методику аналізу кормів на вміст робенідину. Аналітичні параметри методики повністю задовольняють вимоги Регламенту (ЄС) No 1455/2004 та Регламенту (ЄС) No 2020/148.
5. Встановлено, що для визначення робенідину у м'ясі треба стандартні добавки вводити кожну в окрему пробу м'яса.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Rypula K., Porowski M., Kaba J., Gorczykowski M., Deniz A. Effect of Isosporiasis prevention with toltrazuril on long-term pig performance. *Scientific World Journal*. 2012. №72, p. 1–4.
<https://doi.org/10.1100/2012/486324>
2. Mitchell, E. S. E., Smith, R. P., & Ellis-Iversen, J. Husbandry risk factors associated with sub-clinical coccidiosis in young cattle. *Veterinary Journal*. 2012. №193(1), p. 119–123.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.017>
3. Chartier, C., & Paraud, C. Coccidiosis due to Eimeria in sheep and goats, a review. *Small Ruminant Research*. 2012. №103(1), p. 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.022>
4. Akpo, Y., Kpodekon, M. T., Djago, Y., Licois, D., & Youssao, I. A. K. Vaccination of rabbits against coccidiosis using precocious lines of Eimeria magna and Eimeria media in Benin. *Veterinary Parasitology*. 2012. №184(1), p. 73–76.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.012>
5. Shirley, M. W., & Lillehoj, H. S. The long view: A selective review of 40 years of coccidiosis research. *Avian Pathology*. 2012. №41(2), p. 111–121.
<https://doi.org/10.1080/03079457.2012.666338>
6. Norton C. C., Wise D. R. Anticoccidial drugs for preventive therapy in intensively reared pheasants. *The Veterinary Record*. 1981, №109, p. 554-556.
7. A Review of Coccidiostat Residues in Poultry (2003)
<https://www.safefood.eu/Publications/Research-reports/A-Review-of-Coccidiostat-Residues-in-Poultry.aspx>
8. McEvoy, J.D., Smyth, W. G., & Kennedy, D.G. Contamination of animal feedingstuffs with nicarbazin: Investigations in a feed mill. *Food Additives and Contaminants*. 2003. №20(2), p. 136–140.
<https://doi.org/10.1080/0265203021000050608>

9. Delahaut, P., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., Gillard, N. Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC–MS/MS. *Food Additives and Contaminants*. 2010. №27, p. 801–809.
<https://doi.org/10.1080/19440040903552408>
10. Vincent, U. Ezerskis, Z. Chedin, M. von Holst, C. Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. №54(3), p. 526–534.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.038>
11. Verstraete, R. Risk management of undesirable substances in feed following updated risk assessments. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013. №270(3), p. 230–247.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.09.015>
12. Roila R., Branciarri R., Pecorelli I., Cristofani E., Carloni C., Ranucci D., Fioroni L. Occurrence and Residue Concentration of coccidiostats in Feed and Food of Animal Origin; human Exposure Assessment. *Foods*. 2019. №8(10), p. 477.
<https://doi.org/10.3390/foods8100477>
13. Cannavan A., Ball G., Kennedy D. G. Nicarbazine contamination in feeds as a cause of residues in eggs. *Food Additives and Contaminants*. 2000. №17(10), p. 829-836.
<https://doi.org/10.1080/026520300420394>
14. Cannavan A., Kennedy D. G. Possible causes of nicarbazine residues in chicken tissues. *Food Additives and Contaminants*. 2000. №17(12), p. 1001-1006.
<https://doi.org/10.1080/0265203001001325>
15. Dorne J. L. C. M., Fernández-Cruz M. L., Bertelsen U. et al. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013. №270(3), p. 196-208.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.12.014>

16. Bacila D. M., Feddern, V., Mafra L. I., Scheuermann, G. N., Molognoni, L., Daguer H. Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. *Food Research International*. 2017. №99(1), p. 31–40.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.011>
17. Commission Regulation 2009/152/EC laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.
18. Dubenska L, Blazhejevskyj M., Plotycya S. et al. Voltammetric methods for the determination of pharmaceuticals. *Methods and Objects of Chemical Analysis*. 2017. №12(2), p. 61-75.
<https://doi.org/10.17721/moca.2017.61-75>
19. Ozkan S. A., Uslu B. From mercury to nanosensors: past, present and the future perspective of electrochemistry in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016. №130, p. 126-140.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.006>
20. Flanagan R., Perrett D., Whelpton R. Electrochemical detection in HPLC analysis of drugs and poisons. *The Royal Society of Chemistry*. 2005. p. 239.
21. Clarke L., Fodey T. L., Crooks S. R. H. et al. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Science*. 2014. №97(3), p. 358-374.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.004>
22. Kantor S., Kennett R. L., Waletzky E., Tomcufcik A. S. 1,3-bis(p-chlorobenzylideneamino)guanidine hydrochloride (Robenzidene): New poultry anticoccidial agent. *Science*. 1970. №168(3929), p. 373-374.
<https://doi.org/10.1126/science.168.3929.373>
23. Hansen M., Krogh K. A., Brandt A., Christensen J. H., Halling-Sørensen B. Fate and antibacterial potency of anticoccidial drugs and their main abiotic degradation products. *Environmental Pollution*. 2009. №157(2), p. 474–480.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.022>

24. Commission Regulation 101/2009/EC amending Regulation (EC) No 1800/2004 as regards the terms of the authorisation of the feed additive Cycostat 66G.
25. Code of Federal Regulations Title 21, Volume 6. Sec. 556.580 Robenidine hydrochloride.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=556.580>
26. Bories G.F. Simple determination of the coccidiostat robenidine in poultry feed. *Analyst*. 1975. №100, p. 567-569.
27. Analytical Methods Committee. The determination of robenidine in animal feeds and pre-mixes. *Analyst*. 1975. №100, p. 668-674.
28. Liu Y., Wu Y., Jiang Y. Determination of robenidine residue in chicken tissues and eggs by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*. 2010. №28(9), p. 905–907.
29. Wu Shi-hui, Chen Kun-ci, Dai Xiao-xin et al. Determination of Robenidine in Fishery Products by High Performance Liquid Chromatography with Dispersive Solid Phase Extraction. *Journal of Instrumental Analysis*. 2011. №12, p. 1356-1361.
30. Zhou Zhao-ming, Zeng Yong, Jin Xiu-e. Determination of robenidine residues in chicken and rabbit tissues. *Chinese Journal of Veterinary Drug*. 2005 №3, p. 19-22.
31. Douša M. HPLC Determination of Robenidine in Feedstuffs *Chemické listy*. 2005. №99(7), p. 509-514.
32. Hyesun Yeom, Dong-Hyug Yang, Joon Hyuk Suh et al. Determination of robenidine residues in chicken muscle by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Archives of Pharmacal Research*. 2013. №36(3), p.359–365.
<https://doi.org/10.1007/s12272-013-0065-y>
33. Li Hui-su, Wu Ning-peng, Ban Fu-guo, Peng Li, Zhou Hong-xia. Determination of robenidine residue in chicken tissues by ultra performance liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry, *Chinese Journal of Veterinary Drug*. 2012. №9, p. 26-29.
34. Gili M., Stella P., Strambaci B., Olivo F., Ostorero F., Abete M. C. Quantitative determination of robenidine in feed by HPLC-DAD: method development and validation. *Tecnica Molitoria*. 2012. №63(3), p. 246-258.
 35. Cohen H., Armstrong F., Campbell H. Sensitive fluorescence detection of robenidine by derivatization with dansyl chloride and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1995. №694(2), p. 407-413.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01096-W](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01096-W)
 36. Dowling G., O'Keeffe M., Smyth M. Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 2005. №539, p. 31-34.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.063>
 37. Kot-Wasik A., Wasik A. Determination of robenidine in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction. *Analytica Chimica Acta*. 2005. №543, p. 46–51.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.04.052>
 38. Smith J. E., Pasarela N. R., Wyckoff J. C. Polarographic determination of robenidine residues in chicken tissues, eggs, litter, soil, and plant tissue. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 1977. №60(6), p. 1310-1317.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/60.6.1310>
 39. Hocquellet P., Lespaigne C. Determination of robenidine in animal foods by differential pulse polarography. *Analysis*. 1978. №6, p. 215-219.
 40. Measuring Tehnologies, Devices.
<http://chem.lnu.edu.ua/mtech/devices.htm>
 41. Yosypchuk B., Barek J. Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2009. №39(3), p. 189-203.
<https://doi.org/10.1080/10408340903011838>
 42. Yosypchuk B., Novotny L. Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. *Electroanalysis*. 2002. №14, p. 1733-1738.

- <https://doi.org/10.1002/elan.200290018>
43. Yosypchuk B., Novotny L. Nontoxic electrodes of solid amalgams. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2002. №32, p. 141-151.
<https://doi.org/10.1080/10408340290765498>
44. Yosypchuk B., Barek J., Yosypchuk O. Preparation and properties of reference electrodes based on silver paste amalgam. *Electroanalysis*. 2011. №23, p. 2226-2231.
<https://doi.org/10.1002/elan.201100143>
45. Івах С., Дубенська Л. Вольтамперометрична поведінка кокцидіостатика робенідину. *Звітна студентська наукова конференція: тези доп. конф. (м. Львів, 13 травн. 2020 р.). Львів, 2020. С. 5.*
46. Ivakh S., Dubenska L. Polarographic reduction of robenidine. *Current chemical problems: тези доп. міжнар. конф. (м. Вінниця, 25-27 бер. 2020 р.). Вінниця, 2020. С. 11.*
47. Dubois M., Pierret G., Delahaut P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2004. №813(1-2), p. 181-189.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.039>
48. Dubreil-Chéneau E., Bessiral M., Roudant B., Verdon E., Sanders P. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials an eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*. 2009. №1216(46), p. 8149-8157.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.048>
49. Olejnik M., Szprengier-Juszkiewicz T., Jedziniak P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009. №1216(46), p. 8141-8148.

- <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.097>
50. Moloney M., Clarke L., O'Mahony J., Gadaj A., O'Kennedy R., Danaher M. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012. №1253, p. 94-104.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.001>
51. Nász S., Debreczeni L., Rikker T., Eke Z. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. *Food Chemistry*. 2012. №133(2), p. 536-543.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.022>
52. Mortier L., Daeseleire E., Van Peteghem C. Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *Journal of Chromatography B*. 2005. №820(2), p. 261-270.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.016>
53. Bing Shao, Xiaoyan Wu, Jing Zhang, Hejun Duan, Xiaogang Chu, Yongning Wu. Development of a rapid LC-MS-MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. *Chromatographia*. 2009. №69, p. 1083-1088.
<https://doi.org/10.1365/s10337-009-1009-z>
54. Mortier L., Daeseleire E., Delahaut P. Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2003. №483(1-2), p. 27-37.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01365-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01365-X)
55. Ivakh S., Dubenska L. Control of poultry meat for the coccidiostat robenidine content. *Food chemistry. Modern methods for production of food, food additives and packaging materials: тези доп. міжнар. конф. (м. Львів, 7-9 жовтн. 2020 р.). Львів, 2020. С. 19.*
56. Ivakh S., Dubenska L., Rydchuk M., and Plotycya S. Voltammetric behavior and reliable method for the determination of coccidiostat

robenidine in animal feed and poultry meat. *Electroanalysis*. 2021. №33(1), p. 256-267.

<https://doi.org/10.1002/elan.202060225>

57. Ermer J., Miller J. *Validation in pharmaceutical analysis* (2nd ed.). 2006. Wiley.
58. Gosser D. K. *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms* (1st ed.). 1993. Wiley.
59. Brett A. M. O., Brett C. M. A. *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*. 1993. Oxford University Press.
60. Scholz F. *Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications*. 2010. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 61. Івах С., Дубенська Л. Механізм полярографічного відновлення робенідину. VII науковий семінар студентів, аспірантів і молодих учених «Прикладні аспекти електрохімічного аналізу»: тези доп. конф. (м. Львів, 15-16 жовтн., 2020 р.). Львів, 2020. С. 8**

Державна служба України з питань
безпечності харчових продуктів
та захисту споживачів
Держпродспоживслужба



State Service for Food Safety and
Consumer Protection
of Ukraine
SSUFSCP

ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ
КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНИХ
ПРЕПАРАТІВ ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК

вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019
тел.: (032) 252 33 72; факс: (032) 252 27 78
e-mail: secretar@scivp.lviv.ua www.scivp.lviv.ua
ЄДРПОУ 00485670

STATE SCIENTIFIC RESEARCH CONTROL
INSTITUTE OF VETERINARY MEDICAL
PRODUCTS AND FEED ADDITIVES

Donetska str., 11, Lviv, 79019, Ukraine
tel.: +38 032 252 33 72; fax: +380 32 252 27 78
e-mail: secretar@scivp.lviv.ua www.scivp.lviv.ua
EDRPOU 00485670

30.11.2020 N 3941 - Короб

Акт впровадження

методики вольтамперометричного визначення кокцидіостатика
робенідину в кормах для тварин і в м'ясі птиці

Підтверджуємо, що Лабораторією високоефективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок апробовано методики вольтамперометричного визначення кокцидіостатика робенідину, які розроблено Івах С.Р. в межах курсової роботи, виконаної у Львівському національному університеті імені Івана Франка під керівництвом к.х.н. Дубенської Л.О.

Методики ґрунтуються на прямому відновленні робенідину на різних робочих електродах – ртутному краплинному (р.к.е.) і полірованому твердому амальгамному (р-AgSAE). Розроблена авторами методика вольтамперометричного визначення вмісту робенідину у кормах для тварин вирізняється простою пробопідготовкою, доступністю, невеликою вартістю реагентів і обладнання, експресністю, що дає змогу використовувати її під час серійних аналізів. У перспективі напрацьовані авторами підходи можна використати як альтернативні для детектування залишкових кількостей робенідину у продуктах харчування тваринного походження після хроматографічного розділення.

Акт не є основою для фінансових розрахунків.

Завідувач Лабораторії
високоефективної
рідинної хроматографії, к.б.н.

В.о. Директора ДНДКІ
ветпрепаратів та кормових добавок



Коробова О.В.

Музика В.П.

Voltammetric Behavior and Reliable Method for the Determination of Coccidiostat Robenidine in Animal Feed and Poultry Meat

S. Ivakh,^{*,[a]} L. Dubenska,^[a] M. Rydchuk,^[b] and S. Plotycya^[b]

Abstract: The voltammetric behaviour of coccidiostat robenidine was investigated. The outcomes have revealed that reduction of robenidine causes an appearance of one diffusion-controlled cathodic peak on a static mercury drop electrode (SMDE) and a silver solid amalgam electrode (p-AgSAE). The influence of pH, a supporting electrolyte, a scan rate and accumulation parameters was evaluated. The mechanism of robenidine reduction involving two electrons and one proton was studied for the first time. The calibration curves with the wide linear concentration ranges (more than two concentration

orders) were obtained under optimized experimental conditions and operating parameters. The reduction current linearly increases when increasing the concentration of coccidiostat. The methods of voltammetric determination of robenidine in feed and meat have been developed. The limits of quantitation of the methods of robenidine determination in feed are 9.5 mg/kg and 2.5 mg/kg on SMDE and p-AgSAE, respectively. Calculated recoveries ranges of robenidine were between 88.8 % and 101.5 %.

Keywords: coccidiostats • drug residues • feed • robenidine • voltammetry

1 Introduction

Coccidiosis is a common infectious amoebic disease affecting livestock, viz. pigs [1], cattle [2], sheep [3], rabbits [4] and especially poultry [5,6]. Also there are known facts of this infection of fish [7,8]. The disease is caused by several species of unicellular organisms of *Eimeria* and *Isoospora protozoa*. Coccidiosis is highly contagious and it is carried from one animal to another by a contact with infected faeces [9]. The illness has several forms. The acute form of coccidiosis leads to high mortality in animals; and the chronic form causes a reduction of weight gain, a poor feed conversion and insufficient egg production in poultry. Nowadays, this disease is the most dangerous parasitic disease of poultry.

Coccidiostats are special feed additives, used to prevent this disease in animals. These substances can be categorised as naturally occurring polyether ionophores (lasalocid, maduramycin, monensin, narasin, salinomycin, semduramycin) and chemical or synthetic (amprolium, clodolol, decoquinat, diclazuril, ethopabate, halofuginone, nequinate, robenidine, roxarsone, toltrazuril) according to their chemical nature and main biological activity. Some of the chemical coccidiostats are in the form of hydrochloride [10]. Coccidiostats are generally mixed into compound feed [11].

Robenidine [1,3-bis(p-chlorobenzyldeneamino)guanidine hydrochloride] (physicochemical properties: $M_w = 334.2$ g/mole, $pK_a = 3.3$ [12]) was designed in 1970 as a highly effective prophylactic agent against eight tested species of chicken coccidia [13]. Now it is actively used in

agriculture, robenidine is applied for 70 broilers out of 100 [14].

Whilst coccidiostats are important and necessary in industrial livestock, during the production of feed cross-contamination (unintentional transfer of these substances from target to non-target feed, for which the use of coccidiostats is not authorized) can and does occur. Such transfer happens primarily during the production of feed, but also during its transport and storage as well as on a farm [14–19]. As a result, it can potentially cause toxic effects in non-target animals and can result in undesirable levels of coccidiostats residues in food of animal origin. It is also a known fact that robenidine is not permitted for the use for laying hens because there is a serious risk of coccidiostats being excreted in eggs, resulting in an undesirable coccidiostats level in food for humans. The research [20,21] has pointed at the feed contamination as a likely source of coccidiostats residues in poultry products. Therefore, the level of coccidiostats in feed should be particularly monitored. For this purpose,

[a] S. Ivakh, L. Dubenska

Analytical Chemistry Department, Ivan Franko National University of Lviv, 79005, Kyryla i Mefodia Str. 8, Lviv, Ukraine

E-mail: sophiaivakh@gmail.com

[b] M. Rydchuk, S. Plotycya

National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues Control, State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, 79019, Donetska Str. 11, Lviv, Ukraine

Regulation (EU) No 1455/2004 and Regulation (EU) No 2020/148 have authorised the use of feed with level of robenidine 30–36 mg/kg. The withdrawal period before poultry slaughter for robenidine is 5 days [22,23].

Concerning the negative impact of coccidiostats on human health, clinical signs of acute rhabdomyolysis were observed due to accidental ingestion of the pure compounds. The symptoms were muscle weakness and myocardial insufficiency [22]. Additionally, paper [14] reported exacerbation of certain conditions of ischemic disease by residues of coccidiostats in food. Although there are cases of acute toxicity, special attention should be paid to the chronic toxicity resulting from the prolonged exposure to low levels of coccidiostats [24].

Regarding risks associated with human health, regulatory authorities have set maximum residue limits (MRLs) for robenidine in chicken tissues. In the European Union individual MRLs have been set for specific chicken tissues namely 0.80 mg/kg for liver, 0.35 mg/kg for kidney, 0.20 mg/kg for muscle and 1.30 mg/kg for skin or fat [25]. Similarly, the US Food and Drug Administration (FDA) has set MRLs of 0.20 mg/kg for skin or fat and 0.10 mg/kg for other edible tissues [26].

Therefore, the reliable methods are needed to detect and quantify coccidiostats precisely, in particular, to detect robenidine residues in the feed and products of animal origin. The number of methods for the determination of robenidine is limited. Chromatography with various detectors is commonly used. The short description of the methods for robenidine determination is presented in Table 1. For the detection in different matrices a thin layer chromatographic [27] and photometric [28] methods were also described. Quite a few papers have been published considering multi-methods for the determination of few coccidiostats, including robenidine, using chromatography [16,29–36].

Good alternatives to known methods of robenidine determination are electroanalytical methods, particularly voltammetry, which combines high selectivity and sensitivity, relatively inexpensive instrumentation, a short time of analysis and possible automation as well. There are reported works where voltammetric detectors were used in chromatography [47–49]. As far as it is known, previously scientists [50–51] have investigated a polarographic reduction of robenidine. The robenidine was extracted from chicken fat, skin, muscle, liver, and eggs with ethyl acetate; from blood with acetone [54]. After extraction by high-speed blending or overnight shaking, the extract was cleaned up by evaporation, solvent partition, and/or elution from CG-50 ion exchange resin. Recoveries ranged from 64 to 125 %. Authors of paper [55] extracted the robenidine from concentrate with dimethylformamide, and from products with chloroform.

Therefore, the purpose of our study was to investigate the electrochemical process in solutions of robenidine on static mercury drop electrode and silver solid amalgam electrode. Silver solid amalgam electrodes (AgSAEs) represent non-toxic alternative to the traditional mercury electrodes due to outstanding properties such as a wide negative potential window, a low noise, an easy construction and a regeneration of an electrode surface [52–55]. Moreover, AgSAEs are mechanically stable and can be successfully used for a continuous control in a flow. Based on this, our next purpose was to develop new methods of the determination robenidine in complex matrices (feed and meat) using these two electrodes.

Table 1. The methods of robenidine determination.

Method	Linear range	LOQ	LOD	Objects analyzed	References
HPLC ^[a]	10–1000 µg/L	15 µg/kg	10 µg/L	chicken tissues and eggs	[37]
–/–	0.01–1.00 mg/L	30 µg/kg	10 µg/kg	fishery products	[38]
–/–	5 ~ 500 ng/mL	–	10 ng/g	chicken and rabbit tissues	[39]
HPLC-UV ^[b]	–	–	400 µg/kg	animal feeds	[40]
–/–	0.05–0.5 µg/g	0.05 µg/g	–	chicken muscle	[41]
UPLC-MS/MS ^[c]	–	10 µg/kg	5 µg/kg	chicken tissues	[42]
HPLC-DAD UV ^[d]	–	2 mg/kg	0.2 mg/kg	animal feeds	[43]
HPLC-Fl ^[e]	–	–	0.4 µg/ml	standard solution	[44]
LC-UV ^[f]	0–2000 ng/mL	17 µg/kg	10 µg/kg	eggs	[45]
LC-DAD UV ^[g]	–	0.1 mg/kg	–	animal feeds	[46]
LC-MS	–	0.02 mg/kg	–	animal feeds	[46]
reversed-phase HPLC-UV	–	5 mg/kg	–	animal feeds	[23]
LC-MS/MS ^[h]	–	5 µg/kg	3 µg/kg	animal feeds	[18]
–/–	–	1 µg/kg	1 µg/kg	eggs, poultry, rabbit	[18]

^[a] HPLC – high performance liquid chromatography; ^[b] HPLC-UV – HPLC with ultraviolet detection; ^[c] UPLC- MS/MS – ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; ^[d] HPLC-DAD UV – HPLC with UV diode-array detection; ^[e] HPLC-Fl – HPLC with fluorescence detection; ^[f] LC-UV – liquid chromatography with UV detection; ^[g] LC-DAD UV-LC with DAD detection; ^[h] LC-MS/MS-LC with MS/MS detection.

2 Experimental

2.1 Standard Solutions

Robenidine standards were purchased from Lanxi, Zhejiang (Zhejiang K-Sheng Bio-Pharm Co., LTD) with the purity 98.3 %.

The working solutions of standard samples (SSS) of robenidine (ROB) for the voltammetric investigation were prepared by dissolving the exact amount of the standard in methanol in 10.0 mL volumetric flask to yield the final concentration of $1.0 \cdot 10^{-3}$ M. Since ROB is not too well soluble in methanol at room temperature, the solution was heated to 27–30 °C to improve the solubility. Then the volume of the solutions was adjusted to the mark at room temperature (ca. 20 °C) with methanol and mixed thoroughly. ROB solutions in methanol were unstable (the value of the reduction peak current decreases by 25 % per week); therefore, fresh solutions were prepared daily before work.

2.2 Chemicals and Reagents

The solution of HCl fixanal was used in the work. The glass ampoule was broken, and the solution with the exact concentration was quantitatively transferred into a 50.0 mL volumetric flask. Then the solution was adjusted to the mark at 25 °C with double-distilled water and mixed thoroughly. Thus, the solution of 2 M HCl was obtained. Solvents MeOH, MeCN, DMFA and concentrated solutions of HClO_4 , HCOOH , MeCOOH , HNO_3 , H_2SO_4 and H_3PO_4 were of analytical grade.

Purified argon was used to remove dissolved oxygen from the solution before obtaining voltammograms.

2.3 Instrumentation

Voltammetric measurements were performed on two instruments.

At the beginning of the research we worked on the digital device MTech OVA-410 [56] with three-electrode cell (working static mercury drop electrode (SMDE), a saturated calomel reference electrode and platinum wire auxiliary electrode). The accuracy of potential measurement is 1 mV, the uncertainty of current measurement is 0.1 %. The employed SMDE had the following characteristics: $m = 5.94 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1}$; $\tau = 10 \text{ s}$ in 0.2 M NH_4Cl with open circuit. The current was measured at a fixed time (8 s) in the life of the drop. Then we used digital device MTech UVA-410 [60] with three-electrode cell (working silver solid liquid mercury free polished (p-AgSAE) amalgam electrode, a saturated silver/silver chloride reference electrode and platinum wire auxiliary electrode).

The measurements of electrochemical process were carried out using cyclic voltammetry, and the linear sweep voltammetry was applied for the development of an analytical technique. This method can be considered as a

quick screening method, which is characterized by a low limit of detection and a quick response.

The pH of the solutions was measured potentiometrically using pH-meter pH-150 MI (Russia) with combined glass electrode.

The analytical balances UYA 6.4Y Ultra-Microbalance (company RADWAG BALANCES AND SCALES, Poland) were used. Datasheet: maximum capacity 6.1 g, minimum load 10 μg , readability 0.1 μg , OIML Class I.

2.4 Voltammetric Procedure and Sample Preparation

The preparation of working solution was as follows: an aliquot of SSS was added into a 25 mL volumetric flask to obtain a solution with the requested concentration, then 7 mL of supporting electrolyte (the supporting electrolyte of different nature were utilized, see further) was added to the flask and double-distilled water was added to the mark. The obtained working solutions were introduced into the cell. Prior to the measurement, the cell with solutions was deoxygenated with purified argon for 10 min. Voltammograms were recorded in the range of potentials from 0.0 to -1.5 V .

2.5 Preparation of Feed and Meat Samples and the Procedure for their VA Analysis

In the study we used feed and meat samples free from robenidine (according to HPLC-MS/MS analysis) provided by National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues Control.

For the verification of our method, blank samples of feed and meat, fortified with ROB, were used. Different exact amounts of standard powder were added into the samples of feed depending on sample weight. Then these samples were stirred for 10 h on the vortex type mixing device. Afterwards, they were stored in the refrigerator for a week. The preparation of meat samples for the verification was the same, but the solution of ROB was used for the fortification.

0.25 g of feed was weighed into 15 mL plastic centrifuge test tube, and then 10.0 mL of the background electrolyte ($\text{HCl} + 30 \%$ methanol, $C_{\text{HCl}} = 0.08 \text{ M}$) was added. Then the sample was mixed thoroughly. After centrifuging at 5000 rpm for 5 min, 8.0 mL of the solution was transferred by measuring pipette into the electrolytic cell. Prior to the measurement, the cell with solutions was deoxygenated with purified argon for 10 min. Voltammograms were recorded in the range of potentials from 0.0 to -1.5 V .

Two extracting solutions for the determination of ROB in meat were investigated. According to the procedure with the first extractant, 1.00 g of meat was weighed into 15 mL plastic centrifuge test tube, and then 10.0 mL of background electrolyte ($\text{HCl} + 30 \%$ methanol, $C_{\text{HCl}} = 0.08 \text{ M}$) was added. Then the sample was mixed thoroughly. After centrifuging at 5000 rpm for 15 min,

8 mL of solution was transferred by measuring pipette into the electrolytic cell. Prior to the measurement, the cell with solutions was deoxygenated with purified argon for 10 min. Voltammograms were recorded in the range of potentials from 0.0 to -1.5 V.

Another extractant, used in this research, was acetonitrile. This extractant is often used in chromatographic methods of robenidine determination [16,29–32,34,35,41,45]. The procedure of sample preparation was as follows: 1.00 g of meat was weighed into 15 mL plastic centrifuge test tube, and then 5.0 mL of acetonitrile was added. Then the sample was mixed thoroughly. After centrifuging at 5000 rpm for 15 min, 4.0 mL of solution

was transferred by measuring pipette into a 10 mL volumetric flask, then 0.4 mL of HCl ($C_{\text{HCl}}=2.00$ M) solution was added, adjusted to the mark with double-distilled water. The obtained solution was mixed thoroughly and then transferred by a measuring pipette into the electrolytic cell. Prior to the measurement, the cell with solutions was deoxygenated with purified argon for 10 min. Voltammograms were recorded in the range of potentials from 0.0 to -1.5 V.

3 Results and Discussion

Figure 1 shows the cyclic voltammograms in the solutions of ROB. The reduction of ROB on SMDE and p-AgSAE gives one cathodic peak at the potentials ca. -0.85 V and -0.94 V, respectively. With the increase of analyte's concentration, the potential of the reduction peak is kept unchanged on two instruments.

The absence of anodic peaks indicates the irreversibility of electrochemical process. In the anodic region the voltammogram was not changed during the change of experimental conditions. Therefore, we used cathodic linear sweep voltammetry to select the optimal conditions and to determine the analytical parameters.

3.1 Effect of pH and Supporting Electrolyte

The value of current and of the reduction potential of ROB solutions are affected by various factors, particularly, by pH of the solution. This is clearly demonstrated in the Figure 2a. The study of pH influence was performed in pH range from 0.5 to 10 (pH < 3 – at the background of hydrochloric acid and acetic acid mixture, pH > 3 – at Britton-Robinson background solution).

The currents of the reduction peak reach maximum in a strongly acidic medium at pH < 2.5; then decreases with the increase of pH. The rise of pH value ≥ 7 did not cause

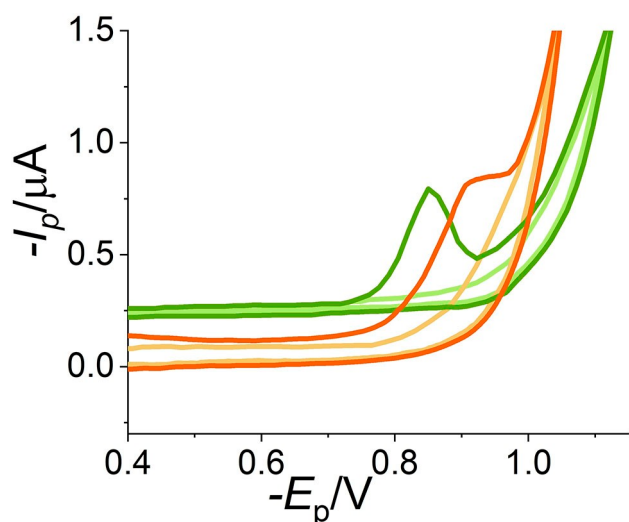


Fig. 1. Cyclic voltammograms of $5.1 \cdot 10^{-6}$ M ROB solution at HCl + 30 % methanol, as the background electrolyte on SMDE (olive) and p-AgSAE (orange), blank measurements lighter colors, respectively, pH 1.3. For SMDE $v=0.5$ V $\cdot$ s $^{-1}$, for p-AgSAE $v=1.0$ V $\cdot$ s $^{-1}$, $E_{\text{acc}}=-0.10$ V and $t_{\text{acc}}=125$ s; concentration of HCl $C_{\text{HCl}}=0.08$ M in all solutions.

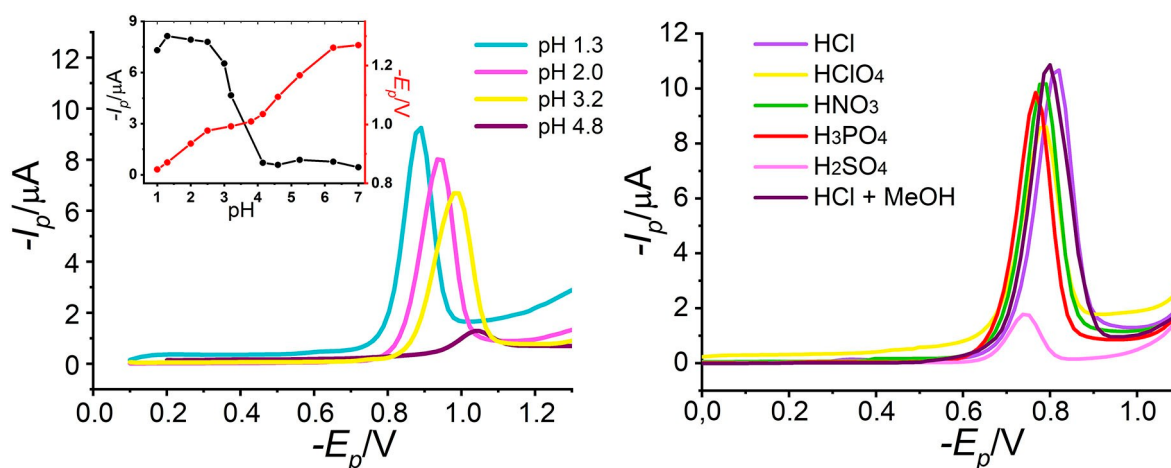


Fig. 2. Voltammograms of ROB solutions at different pH (a) and plots of the reduction current and the reduction potential vs. pH of the solution (inset); voltammograms of ROB solutions at different background electrolytes, pH = 1.3 (b) on SMDE, $C_{\text{ROB}}=4.0 \cdot 10^{-5}$ M, $v=0.5$ V $\cdot$ s $^{-1}$.

the changes on the plots of reduction current vs. pH, and the results were poorly reproducible.

Regarding the potentials of the reduction peak, they are shifted to the negative direction with increasing pH, and have three linear segments. This behaviour demonstrates that the electrochemical reduction of ROB involves the stage of proton transfer. The dependences of the reduction peak current vs. pH of the solution and of the potential of the reduction peak vs. pH of the solution are shown in Figure 2a (inset). The obtained plot of the reduction potential vs. pH of the solution can be described by the equation presented in Table 2. The strictest linear range on the plot of the potential of the reduction peak vs. pH of the solution is observed for pH value 1.0–2.5. These dependences can be used for the calculation of the number of protons involved in the reduction of ROB.

Since the peaks current reaches its maximum at pH 1.1–1.3, so this pH value was chosen for further measurements.

The influence of a supporting electrolyte on ROB voltammetric behaviour was investigated. Since the acidic pH value was chosen for measurements, so effect of acids such as HCl, HClO₄, HNO₃, H₂SO₄ and H₃PO₄ has been examined as well (Figure 2b). As it is shown in Figure 2b, all strong acids (except of H₂SO₄) can provide needed pH value, and as a result, relatively high currents of the reduction peak are obtained. As for sulphuric acid, it probably exhibits its oxidizing properties, so it cannot be used.

Table 2. The equations of the linear plots of the reduction peak potentials vs. pH of the solution.

pH range	Equation	Correlation coefficient, R
1.0–2.5	$E = (0.758 \pm 0.002) + (0.089 \pm 0.001) \cdot \text{pH}$	0.9995
3.2–4.2	$E = (0.87 \pm 0.04) + (0.042 \pm 0.012) \cdot \text{pH}$	0.8536
4.6–6.2	$E = (0.634 \pm 0.028) + (0.101 \pm 0.005) \cdot \text{pH}$	0.9948

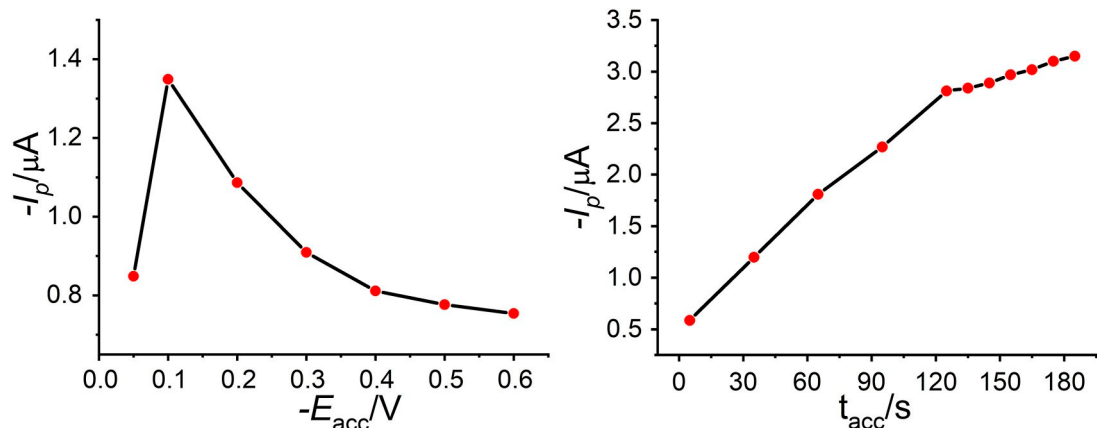


Fig. 3. The effect of the accumulation potential (a) and the accumulation time (b) on the peak's current of ROB solution on p-AgSAE, $C_{\text{ROB}} = 6.0 \cdot 10^{-5}$ M.

Also tetraoxalate buffer solution as a background electrolyte with the acidic pH value was studied. The results were poorly reproducible and the peak's current peak was of small value.

3.2 The Effect of Scan Rate and Accumulation Parameters

The influence of scan rate (v) was investigated in the range from 0.1 to 4.0 V·s⁻¹. When increasing the v , the peak height also increases, and the potential shifts to the cathodic region for both investigated concentrations of ROB solutions. The slope of dependence of $\lg I$ vs. $\lg v$ has the value of 0.51 at pH 1.3 and at $C = 1.0 \cdot 10^{-5}$ M, and 0.42 – at pH 1.3 and at $C = 5.0 \cdot 10^{-5}$ M. It is close to the theoretical value of 0.5, indicating the diffusive nature of the current. According to the Randles-Sevcik equation for irreversible reactions, a linear change of the current with a change of the square root of the scan rate ($v^{1/2}$) clearly reflects a diffusion-driven mechanism of the electrode reaction [57–60].

For p-AgSAE, the factors affecting the ROB accumulation, viz. the accumulation potential and the accumulation time, were investigated. The influence of the accumulation potential (E_{acc}) on the value of the reduction current was examined by varying it over a range from –0.05 V to –0.60 V, while the accumulation time (30 s) was constant. As it is shown on Figure 3a, the maximum values of the peak heights were obtained at $E_{\text{acc}} = -0.10$ V, and then they gradually decreased. Therefore, the accumulation potential of –0.10 V was chosen for all subsequent measurements. The dependence of the value of the reduction current on the accumulation time (t_{acc}) is shown on Figure 3b. As it is demonstrated, the peak's current increases linearly, as the value of t_{acc} is increased from 5 s to 125 s. Since at the larger accumulation time the value of the current was changed slightly, so the electrode surface was saturated; and t_{acc} of 125 s was chosen for further measurements.

3.3 The Possible Mechanism of the Electrochemical Reaction

The number of protons and electrons involved in the reaction has been calculated to establish the mechanism of the electrochemical reduction of robenidine.

The number of electrons can be determined from the dependence $E_p = f(\lg v)$, where the slope of this dependence is equal to $2.3RT/anF$ (F is the Faraday's constant, R – the universal gas constant, n – the number of electrons, α – the charge transfer coefficient and T is the temperature). For this purpose, the effect of scan rate and the solutions of different concentrations of ROB were investigated. Then the dependence of the potential of the reduction peak E , V vs. $\lg v$ was constructed. The coefficient α equals to 0.5 because investigated system is irreversible. The analysis of this plot shows that the number of electrons varies within 1.8–2.2.

Also the electron number n was calculated using another approach, viz. by the following equation [58, 60]:

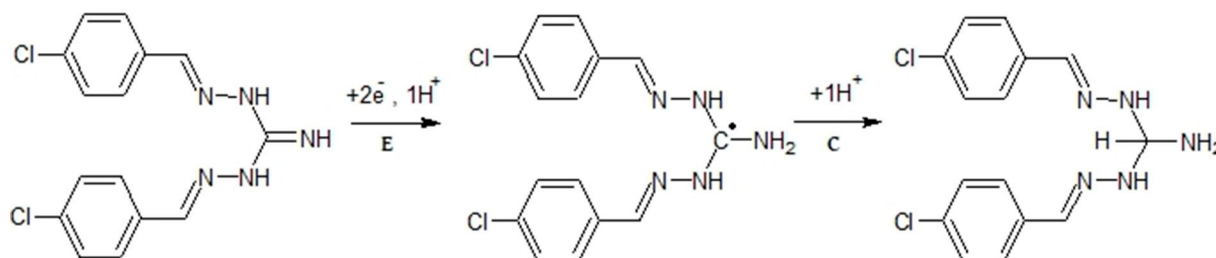
$$\alpha n = -47.7 / (E_p - E_{p/2}) \text{ (mV)}, \quad (1)$$

where α – the charge transfer coefficient, n – the number of electrons transferred in a stage of an electrode process, E_p – the potential of the reduction peaks, $E_{p/2}$ – the potential of the reduction half-peak.

Based on the quantitative parameters of the voltammograms, obtained at different conditions, the electron number n was calculated by the equation (1). For this purpose, the voltammograms of ROB solutions with pH 1–7 were used; as well as the voltammograms of the solutions with different ROB concentrations and different background electrolytes (HCl and HCl+30% MeOH, $C_{\text{HCl}}=0.08$ M). The results of the calculations showed that the value of n varies within 1.9–2.3. It means that the number of electrons is equal 2.

The number of H^+ ions ($z\text{H}^+$) involved in the electrochemical process, can be estimated from the plots of the peak potential E , V vs. pH, according to the following equation:

$$\frac{dE}{dpH} = \frac{2.3RT \cdot z\text{H}^+}{anF} \quad (2)$$



In Table 2 presented the equations of linear dependence of potential of the reduction peak vs. pH of solution. The obtained values of $z\text{H}^+$ were within 0.7–1.2.

Robenidine may exist in two tautomeric forms and has at least three reaction centres, capable for proton reduction. The first stage is the electrochemical accession (E) of two electrons and one proton. This is the stage that determines the speed of the electrochemical process. Next, in a highly acidic medium, the most likely to join the second proton (chemical stage, C) according to the scheme below.

This is the stage that determines the speed of the electrochemical process. Further, the unpaired electron can move along the chain, and the anion radical can be coupled fast.

3.4 Determination of Analytical Parameters

To obtain the dependence of the reduction current vs. the concentration, the solutions with the specified concentrations were prepared, and the voltammograms were obtained as described in Section 2.4. According to the maximum values of the peak heights, the plot of the reduction current I , μA vs. the concentration of ROB C , M was constructed. To determine the analytical parameters at SMDE, three background electrolytes were investigated. Initially we have used H_3PO_4 as supporting electrolyte to construct a calibration curve, but linearity concentration ranges were narrow (less than one concentration order), and the results were poorly reproducible. The calibration graph obtained at the background of HCl has much better performance (Figure 5a).

Since organic reagents are used as extractants in the analysis of complex matrices (such as meat or feed), so the influence of various organic solvents as background electrolytes has been investigated. We have studied methanol, dimethyl formamide (DMFA), formic acid, acetonitrile as individual reagents and their different mixtures (Figure 4) and consequently, the mixtures HCl+30% MeOH, HCl+MeCN, and individual HCl, have been chosen. (Concentration of HCl was $C_{\text{HCl}}=0.08$ M in all solutions). As a result, this solution provides the necessary pH and high current values in the solutions of ROB. The calibration curve at the background of this solution is linear with good analytical parameters (Figure 5b, Figure 5c).

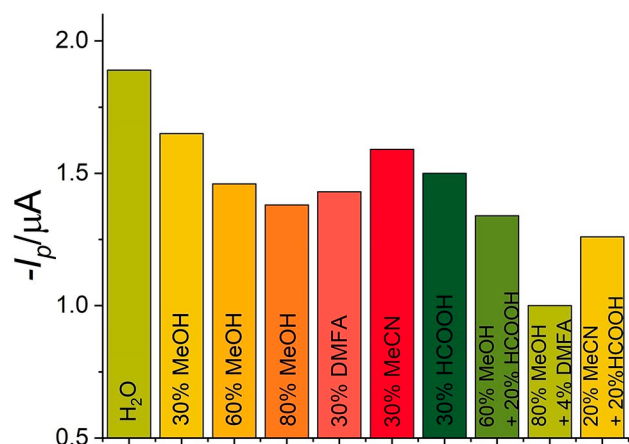


Fig. 4. The choice of extractants for voltammetric determination of ROB in meat and feed on SMDE. There is a background electrolyte HCl in all solutions. $C_{\text{HCl}} = 0.08 \text{ M}$, $C_{\text{ROB}} = 1.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

The analytical parameters are presented in Table 3. The LOD and LOQ for the determination is based on three and ten times of the blank standard deviation &bk, $(3.3S_d/b, 10S_d/b)$, respectively (S_d – residual standard deviation or standard deviation of the y-intercept) [61].

3.5 Analysis of Feed and Model Solution of Meat

The detailed preparation of the samples is described in Section 2.5, we used feed and meat samples free from ROB according to HPLC-MS/MS analysis. The dependences of the reduction current I , μA vs. the concentration of added ROB C , M have been constructed for feed and meat, and strictly linear plots were observed. According to the voltammograms on Figure 6, the background current is higher compared to voltammograms of standard solutions of ROB (Figure 5), but there are no peaks on the background line of voltammograms of blank samples of feed and meat solutions (without ROB). The background current of the real samples increases, obviously due to the matrix effects. It contributes to the selectivity

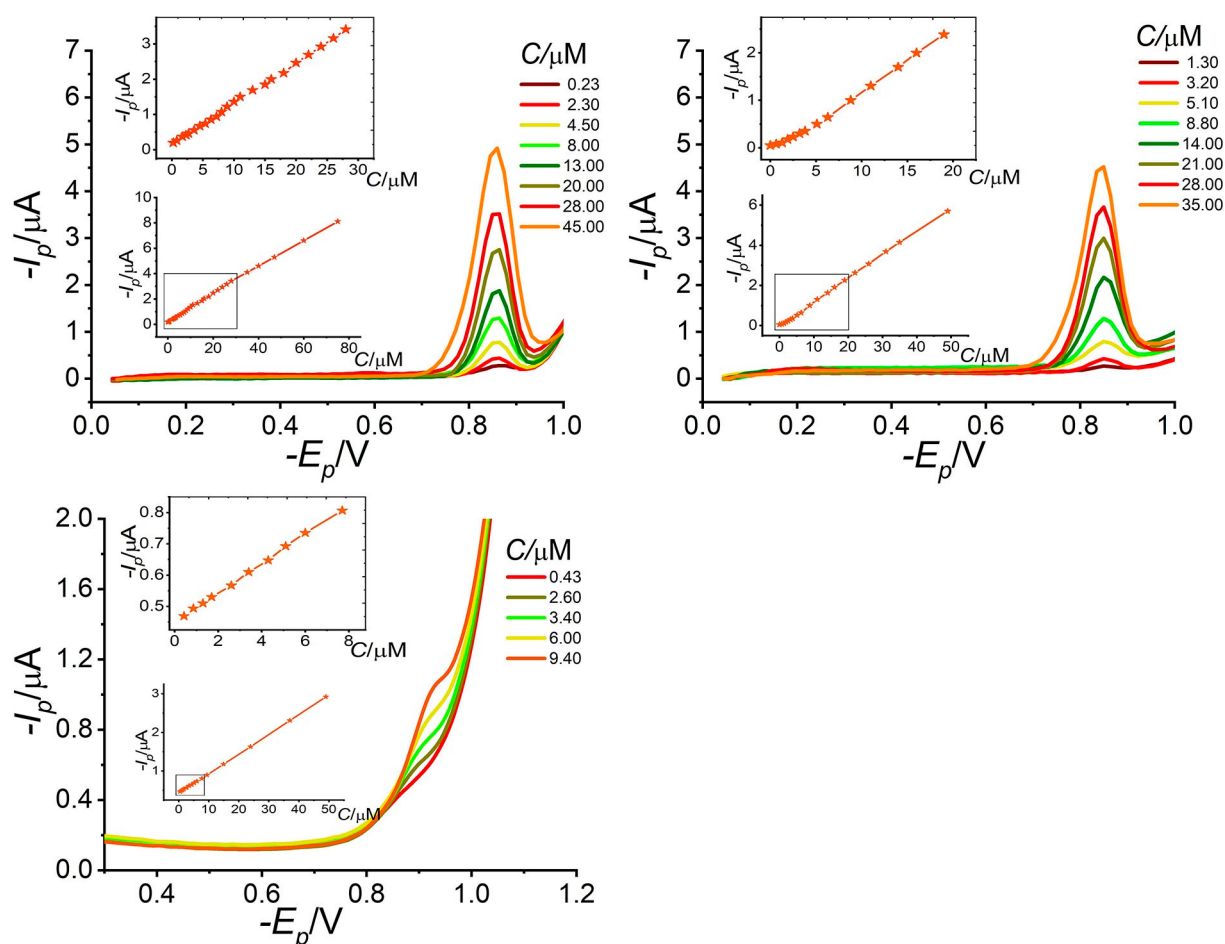


Fig. 5. Voltammograms of ROB solutions at the background of HCl solution (a) and at HCl + 30 % methanol solution (b) at SMDE; voltammograms of ROB solutions at HCl + 30 % methanol solution, at p-AgSAE (c); insets – the calibration curve at the corresponding background electrolytes and the instruments; pH 1.3, for SMDE $v = 0.5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$, for p-AgSAE: $E_{\text{acc}} = -0.10 \text{ V}$ and $t_{\text{acc}} = 125 \text{ s}$; concentration of HCl $C_{\text{HCl}} = 0.08 \text{ M}$ in all solutions.

Table 3. Analytical parameters of the calibration graph.

	Working electrode and supporting electrolyte	SMDE	SMDE	p-AgSAE ^[a]
Analytical parameter		HCl ^[c]	HCl + 30 % MeOH ^[c]	HCl + 30 % MeOH ^[c]
Scan rate ν , V/s		0.5	0.5	1.0
Peak potential E , V		−0.86	−0.85	−0.93
Linear concentration ^[b] range, M		$2.3 \cdot 10^{-7}$ – $7.5 \cdot 10^{-5}$	$6.4 \cdot 10^{-7}$ – $5.0 \cdot 10^{-5}$	$4.3 \cdot 10^{-7}$ – $5.0 \cdot 10^{-5}$
Slope $b \pm \Delta b$, $\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$		$(116.0 \pm 0.5) \cdot 10^3$	$(128.4 \pm 0.5) \cdot 10^3$	$(46.4 \pm 0.6) \cdot 10^3$
Intercept $a \pm \Delta a$, μA		$(15.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-2}$	$(-5.7 \pm 0.6) \cdot 10^{-2}$	$(45.4 \pm 1.9) \cdot 10^{-3}$
Correlation coefficient, R		0.99996	0.99997	0.99968
RSD		0.011	0.010	0.004
Limit of quantitation (LOQ), M		$5.2 \cdot 10^{-7}$	$4.7 \cdot 10^{-7}$	$4.1 \cdot 10^{-7}$
Limit of detection (LOD), M		$1.7 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.4 \cdot 10^{-7}$

^[a] for p-AgSAE $E_{\text{acc}} = -0.10$ V and $t_{\text{acc}} = 125$ s; ^[b] the solutions with higher concentrations were not prepared. ^[c] $C_{\text{HCl}} = 0.08$ M

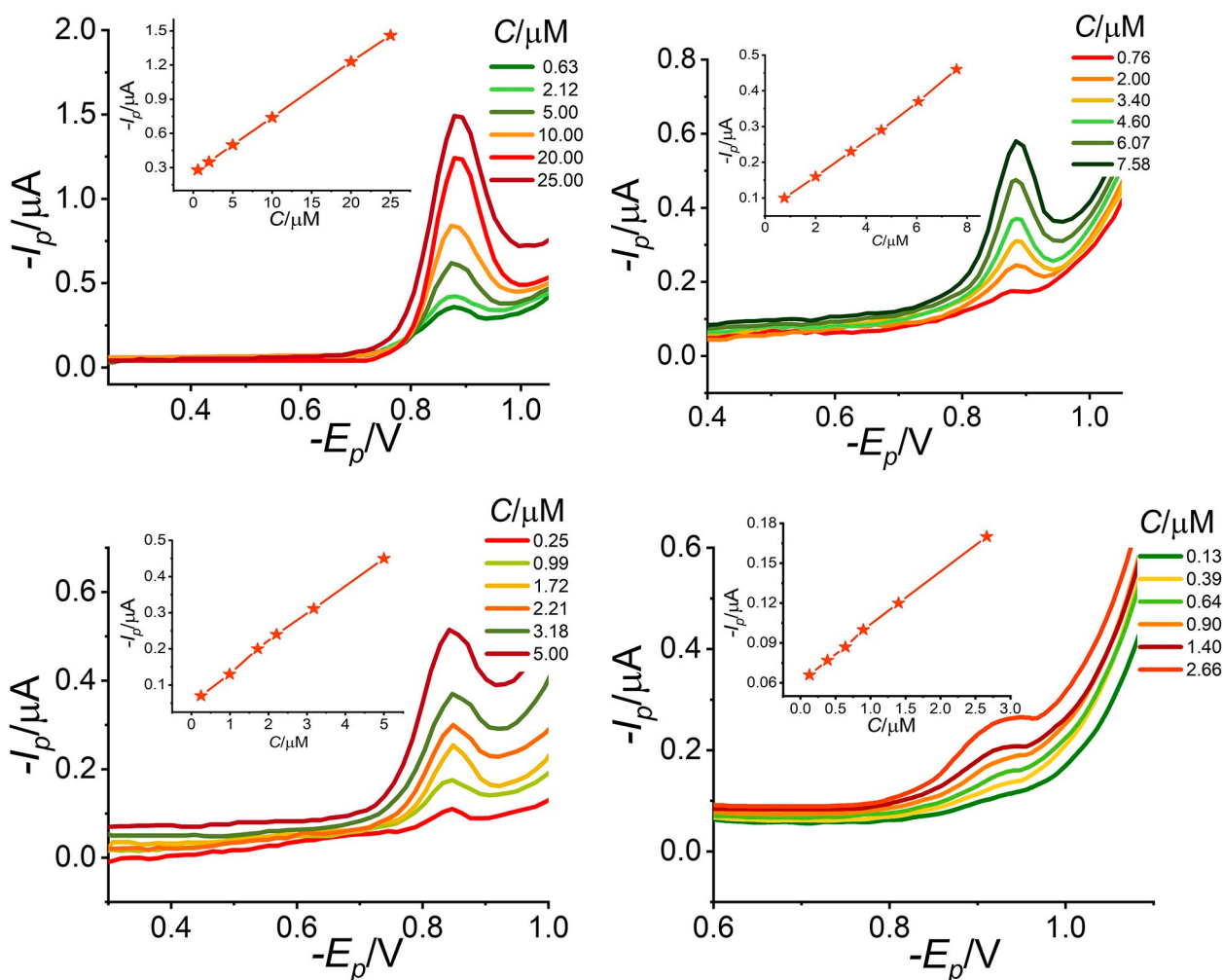


Fig. 6. Voltammograms of feed solutions with ROB (a) of meat solutions with ROB (b) at the background of HCl + 30 % methanol solution, of meat solutions with ROB at the background of HCl + acetonitrile solution (c) at SMDE; voltammograms of feed solutions with ROB at the background of HCl + 30 % methanol solution at p-AgSAE (d); insets – the calibration curve at the corresponding background electrolytes and the instruments; pH 1.3; for SMDE $\nu = 0.5$ V $\cdot$ s^{−1}, for p-AgSAE: $E_{\text{acc}} = -0.10$ V and $t_{\text{acc}} = 125$ s; concentration of HCl $C_{\text{HCl}} = 0.08$ M in all solutions.

Table 4. Analytical parameters of the methods of determination of ROB in feed and meat.

Analytical parameter	Working electrode and supporting electrolyte	SMDE			p-AgSAE	
		feed HCl + MeOH ^[a]	meat HCl + MeCN ^[a]	meat HCl + MeOH ^[a]	feed HCl + MeOH ^[a]	meat HCl + MeOH ^[a]
Peak potential <i>E</i> , V		−0.87	−0.84	−0.88	−0.94	−1.00
Linear concentration range, M		$6.0 \cdot 10^{-7}$ – $2.5 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-7}$ – $5.0 \cdot 10^{-6}$	$7.6 \cdot 10^{-7}$ – $7.6 \cdot 10^{-6}$	$1.3 \cdot 10^{-7}$ – $2.6 \cdot 10^{-6}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$ – $1.4 \cdot 10^{-6}$
Linear concentration range, mg/kg		8.90–370.70	0.93–18.54	2.82–28.17	1.93–38.55	0.41–51.90
Correlation coefficient, R		0.9998	0.9989	0.9992	0.9996	0.9993
Slope <i>b</i> , $\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$		$46.46 \cdot 10^3$	$79.9 \cdot 10^3$	$52.5 \cdot 10^3$	$41.1 \cdot 10^3$	$474.5 \cdot 10^3$
Δb		$0.22 \cdot 10^3$	$1.8 \cdot 10^3$	$1.0 \cdot 10^3$	$0.6 \cdot 10^3$	$9.9 \cdot 10^3$
Intercept <i>a</i> , μA		$25.44 \cdot 10^{-2}$	$55.7 \cdot 10^{-3}$	$54.7 \cdot 10^{-3}$	$61.5 \cdot 10^{-3}$	$120.7 \cdot 10^{-3}$
Δa		$3.12 \cdot 10^{-2}$	$4.9 \cdot 10^{-3}$	$4.9 \cdot 10^{-3}$	$0.7 \cdot 10^{-3}$	$6.5 \cdot 10^{-3}$
LOQ, M		$6.39 \cdot 10^{-7}$	$6.13 \cdot 10^{-7}$	$9.33 \cdot 10^{-7}$	$1.70 \cdot 10^{-7}$	$1.37 \cdot 10^{-7}$
LOQ, mg/kg		9.48	2.27	3.46	2.52	0.51
LOD, M		$2.11 \cdot 10^{-7}$	$2.02 \cdot 10^{-7}$	$3.08 \cdot 10^{-7}$	$5.62 \cdot 10^{-8}$	$4.52 \cdot 10^{-8}$
LOD, mg/kg		0.31	0.75	1.14	0.83	0.17

^[a] $C_{\text{HCl}} = 0.08 \text{ M}$

of the determination, but as well it has the negative effect on the sensitivity. The absence of other peaks contributes to the selectivity of the determination, but the increase in background current has the negative effect on the sensitivity.

The blank samples of feed and meat (free of ROB) were used for the verification of the analytical procedure. The analytical parameters of the determination of ROB in feed and meat are shown in Table 4.

The accuracy was verified by the “added-found” method. Feed samples were further prepared as described in Section 2.5. Afterwards, the aliquots of ROB SSS (standard additives) were added into the cell with a micropipette, so that the concentration of these additives in the final volume was from 1.5 μM to 10.0 μM (which corresponds to the range 3.8–25.2 μg). After the introduction of each additive, the obtained solutions were purged with argon for 3 min to remove oxygen and to stir the mixture, and then the voltammograms were recorded.

The sample preparation procedure of meat was as follows: 1.0 g of blank meat was fortified with 0.8 μL , 1.6 μL , 4.0 μL and 8.0 μL of SSS of ROB and stored in the refrigerator for 24 hours. Thus, 0.3 μg , 0.6 μg , 1.5 μg and 3.0 μg of ROB were added. The samples were further prepared as described in Section 2.5. Afterwards, the aliquots of ROB SSS (standard additives) were added into the cell with a micropipette, so that the concentration of these additives in the final volume was from 0.12 μM to 0.86 μM (which corresponds to the range 0.29–2.07 μg). After that the same procedure as with feed was used. Results are presented in Figure 7 and Table 5.

During the analysis of meat samples, a systematic error is detected if we use this approach. Probably, the chemical interaction of robenidine with the matrix components of meat takes place, and thus the analytical signal is greatly enhanced. Therefore, for the analysis of meat, the introduction of the additive of ROB standard solution immediately into the electrochemical cell is not

Table 5. Results of “added-found” of ROB determination in feed and meat, obtained by the developed voltammetric method.

Added ROB, mg/kg	Found ROB, mg/kg		Recovery, %
	On SMDE, <i>n</i> = 5, <i>P</i> = 0.95	On p-AgSAE, <i>n</i> = 3, <i>P</i> = 0.95	On p-AgSAE
FEED			
17.5	19.7 ± 0.8	–	–
18.9	18.7 ± 0.5	–	–
19.6	19.8 ± 0.4	19.7 ± 0.3	100.51
40.5	40.5 ± 0.3	40.45 ± 0.21	99.88
MEAT			
0.3	1.3 ± 0.5	0.76 ± 0.3	253.33
0.6	2.1 ± 1.0	–	–
1.7	3.3 ± 1.2	–	–
3.4	7.8 ± 3.6	–	–

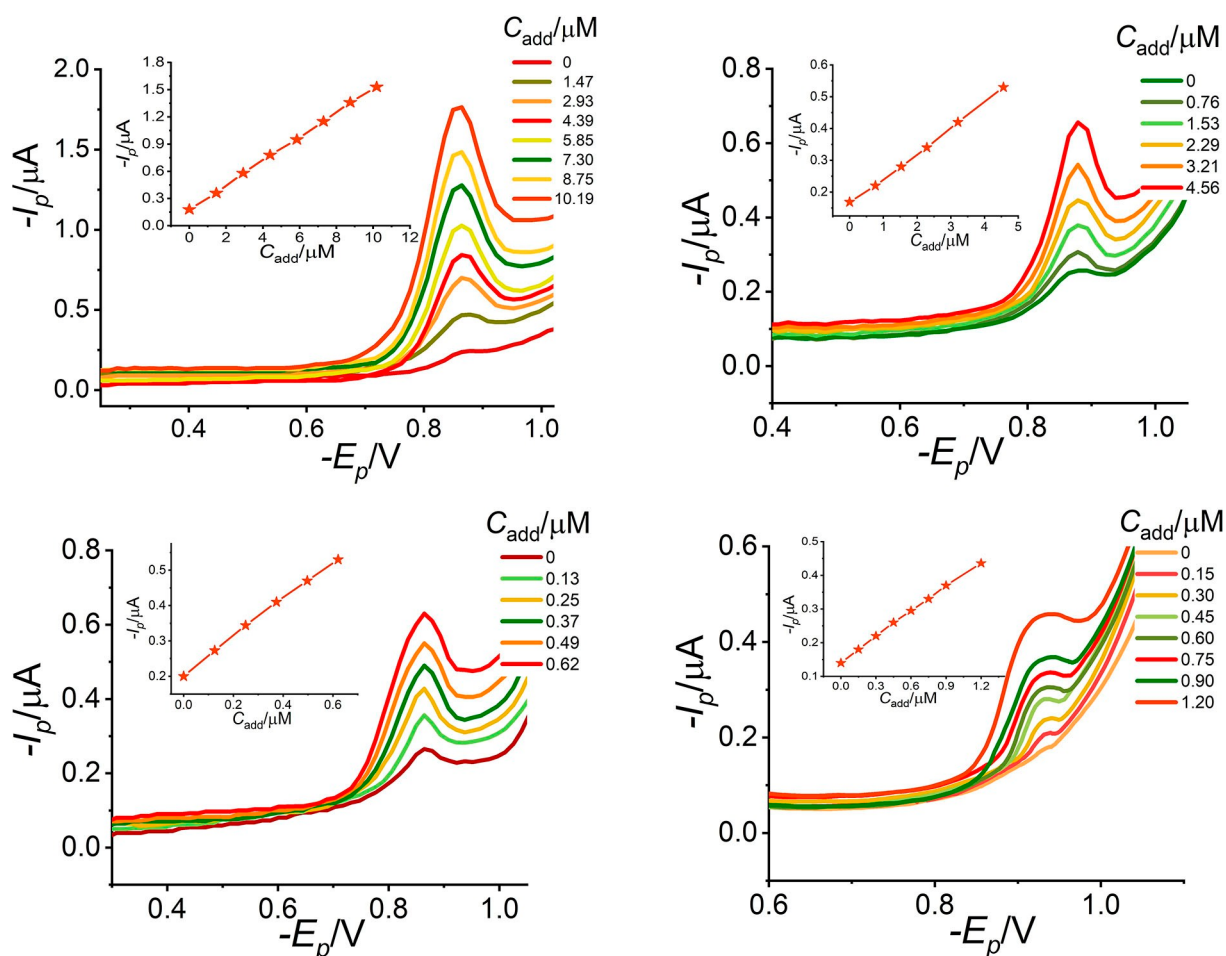


Fig. 7. Determination of ROB in feed and meat: voltammograms of feed solutions with ROB (a) of meat solutions with ROB (b) at the background of HCl+30 % methanol solution, of meat solutions with ROB at the background of HCl+acetonitrile solution (c) at SMDE; voltammograms of feed solutions with ROB at the background of HCl+30 % methanol solution at p-AgSAE (d); insets – the calibration curve at the corresponding background electrolytes and the instruments; pH 1.3; for SMDE $\nu=0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, for p-AgSAE: $E_{\text{acc}}=-0.10 \text{ V}$ and $t_{\text{acc}}=125 \text{ s}$; concentration of HCl $C_{\text{HCl}}=0.08 \text{ M}$ in all solutions.

suitable. Different calibration method has to be used, e.g. when each additive should be pre-entered into each meat sample, or the separation step has to be added.

4 Conclusions

The problem of the control of coccidiostats content is urgent for the food industry. We have studied the voltammetric behaviour of robenidine and selected the optimal conditions for its determination, and as a result, we have proposed a method of its voltammetric determination in animal feed and poultry meat, which is based on the electrochemical reduction. The mechanism of ROB reduction involving two electrons and one proton was studied for the first time.

Voltammetric determination using the reduction current usually is more selective, than by the oxidation current, because most organic compounds, including those containing the $-\text{OH}$ group, are capable to be oxidized. We suggest to determine robenidine on two electrodes-

systems, each of which has several advantages. A “mercury drop” working electrode (SDME or HDME) is best suited for the rapid analysis of samples with complex matrix, which have not undergone sophisticated sample preparation and separation. The surface of these electrodes is easily and constantly renovated, so the components of the matrix do not block the surface of the electrode. Silver solid amalgam electrodes (AgSAEs) have also wide negative potential window and can be successfully used for continuous control in flow. Our method is simple, rapid and selective, specially for the analysis of feed.

Using our developed voltammetric method, it is possible to accurately determine robenidine in feed in a wide range (for large contents, the reliability of the determination is higher). It fully complies with the requirements of the Regulation (EU) No 1455/2004 and Regulation (EU) No 2020/148, because they have authorised the use of feed with level of robenidine 30–36 mg/kg.

Acknowledgement

This work was financed by the Ministry of Education and Science of Ukraine (Grant number 0116U001541).

Data Availability Statement

Data available on request from the authors. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- [1] K. Rypula, M. Porowski, J. Kaba, M. Gorczykowski, A. Deniz, *Sci. World J.* **2012**, 72, 1–4.
- [2] E. S. E. Mitchell, R. P. Smith, J. Ellis-Iversen, *Vet. J.* **2012**, 193(1), 119–123.
- [3] C. Chartier, C. Paraud, *Small Ruminant Research* **2012**, 103(1), 84–92.
- [4] Y. Akpo, M. T. Kpodekon, Y. Djago, D. Licois, I. A. K. Youssao, *Vet. Parasitol.* **2012**, 184(1), 73–76.
- [5] M. W. Shirley, H. S. Lillehoj, *Avian Pathol.* **2012**, 41(2), 111–121.
- [6] C. C. Norton, D. R. Wise, *Vet. Rec.* **1981**, 109, 554–556.
- [7] K. Molnár, G. Ostoros, *Acta Vet. Hung.* **2007**, 55(1), 67–76.
- [8] Y. Liu, Y. Song, B. Cheng, et al, *Food Anal. Methods* **2020**, 13, 516–529.
- [9] P. A. Sharman, N. C. Smith, M. G. Wallach, M. Katrib, *Parasite Immunol.* **2010**, 32(8), 590–598.
- [10] L. Clarke, T. L. Fodey, S. R. H. Crooks, et al, *Meat Sci.* **2014**, 97(3), 358–374.
- [11] M. Trevisani, G. Fedrizzi, G. Diegoli, in *Chemical hazards in foods of animal origin*, Vol. 7 (Eds.: Frans J. M. Smulders, Ivonne M. C. M. Rietjens and Martin Rose), ECVPH Food safety assurance, **2019**, pp. 315–340.
- [12] M. Hansen, K. A. Krogh, A. Brandt, J. H. Christensen, B. Halling-Sørensen, *Environ. Pollut.* **2009**, 157, 474–480.
- [13] S. Kantor, R. L. Kennett, E. Waletzky, A. S. Tomcufcik, *Science* **1970**, 168, 373–374.
- [14] A Review of Coccidiostat Residues in Poultry **2003**, <https://www.safefood.eu/Publications/Research-reports/A-Review-of-Coccidiostat-Residues-in-Poultry.aspx>.
- [15] J. D. McEvoy, W. G. Smyth, D. G. Kennedy, *Food Addit. Contam.* **2003**, 20(2), 136–140.
- [16] P. Delahaut, G. Pierret, N. Ralet, M. Dubois, N. Gillard, *Food Addit. Contam.* **2010**, 27, 801–809.
- [17] U. Vincent, Z. Ezerskis, M. Chedin, C. von Holst, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 54, 526–534.
- [18] R. Verstraete, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, 270, 230–247.
- [19] R. Roila, R. Branciarri, I. Pecorelli, E. Cristofani, C. Carloni, D. Ranucci, L. Fioroni, *Foods* **2019**, 8(10), 477.
- [20] A. Cannavan, G. Ball, D. G. Kennedy, *Food Addit. Contam.* **2000**, 17(10), 829–836.
- [21] A. Cannavan, D. G. Kennedy, *Food Addit. Contam.* **2000**, 17(12), 1001–1006.
- [22] J. L. C. M. Dorne, M. L. Fernández-Cruz, U. Bertelsen, et al, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, 270, 196–208.
- [23] Commission Regulation 2009/152/EC laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.
- [24] D. M. Bacila, V. Feddern, L. I. Mafra, G. N. Scheuermann, L. Molognoni, H. Daguer, *Food Res. Int.* **2017**, 99, 31–40.
- [25] Commission Regulation 101/2009/EC amending Regulation (EC) No 1800/2004 as regards the terms of the authorisation of the feed additive Cycostat 66G.
- [26] Code of Federal Regulations Title 21, Volume 6. Sec. 556.580 Robenidine hydrochloride. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=556.580>.
- [27] G. F. Bories, *Analyst* **1975**, 100, 567.
- [28] Analytical Methods Committee, *Analyst* **1975**, 100, 668–674.
- [29] M. Dubois, G. Pierret, P. Delahaut, *J. Chromatogr. B* **2004**, 813, 181.
- [30] E. Dubreil-Chéneau, et al, *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 8149–8157.
- [31] M. Olejnik, et al, *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 8141–8148.
- [32] M. Moloney, L. Clarke, J. O'Mahony, A. Gadaj, R. O'Kennedy, M. Danaher, *J. Chromatogr. A* **2012**, 1253, 94–104.
- [33] S. Nász, L. Debreczeni, T. Rikker, Z. Eke, *Food Chem.* **2012**, 133, 536–543.
- [34] L. Mortier, E. Daeseleire, C. Van Peteghem, *J. Chromatogr. B* **2005**, 820, 261–270.
- [35] B. Shao, X. Wu, J. Zhang, H. Duan, X. Chu, Y. Wu, *Chromatographia* **2009**, 69, 1083–1088.
- [36] L. Mortier, E. Daeseleire, P. Delahaut, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 483, 27–37.
- [37] Y. Liu, Y. Wu, Y. Jiang, *Chin. J. Chromatogr.* **2010**, 28(9), 905–907.
- [38] W. Shi-hui, C. Kun-ci, D. Xiao-xin, et al, *J. Instrum. Anal.* **2011**, 12, 1356–1361.
- [39] Z. Zhao-ming, Z. Yong, J. Xiu-e, *Chin. J. Vet. Drug* **2005**, 3, 19–22.
- [40] M. Douša, *Chemické listy* **2005**, 99(7), 509–514.
- [41] H. Yeom, D.-H. Yang, J. H. Suh, et al, *Arch. Pharmacol. Res.* **2013**, (36), 359–365.
- [42] L. Hui-su, W. Ning-peng, B. Fu-guo, P. Li, Z. Hong-xia, *Chin. J. Vet. Drug* **2012**, 9, 26–29.
- [43] M. Gili, P. Stella, B. Strambaci, F. Olivo, F. Ostorero, M. C. Abete, *Tec. Molitoria* **2012**, 63(3), 246–258.
- [44] H. Cohen, F. Armstrong, H. Campbell, *J. Chromatogr. A* **1995**, (694), 407–413.
- [45] G. Dowling, M. O'Keeffe, M. Smyth, *Anal. Chim. Acta* **2005**, (539) 31–34.
- [46] A. Kot-Wasik, A. Wasik, *Anal. Chim. Acta* **2005**, (543), 46–51.
- [47] L. Dubenska, M. Blazhejevskij, S. Plotycya, et al, *Methods Objects Chem. Anal.* **2017**, 12, 61–75.
- [48] S. A. Ozkan, B. Uslu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 130, 126–140.
- [49] R. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, in *Electrochemical detection in HPLC analysis of drugs and poisons*, Vol. 10, (Eds.: Roger M Smith), Royal Society of Chemistry, **2005**, p. 239.
- [50] J. E. Smith, N. R. Pasarella, J. C. Wyckoff, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1977**, 60, 1310–1317.
- [51] P. Hocquellet, C. Lespaigne, *Analyst* **1978**, 6, 215–219.
- [52] B. Yosypchuk, J. Barek, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 39(3), 189–203.
- [53] B. Yosypchuk, L. Novotny, *Electroanalysis* **2002**, 14, 1733–1738.
- [54] B. Yosypchuk, L. Novotny, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, 32, 141–151.
- [55] B. Yosypchuk, J. Barek, O. Yosypchuk, *Electroanalysis* **2011**, 23, 2226–2231.
- [56] Measuring Technologies, Devices. <http://chem.lnu.edu.ua/mtech/devices.htm>.

- [57] J. Ermer, J. H. M. Miller, in *Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2006**, p. 411.
- [58] D. K. Gosser, in *Cyclic voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*, VCH, New York, **1993**, p. 156.
- [59] A. M. O. Brett, C. M. A. Brett, in *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, **1993**, p. 464.
- [60] F. Scholz, in *Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications*, **2010**, p. 386.

Received: May 23, 2020
Accepted: August 6, 2020
Published online on ■■, ■■



S. Ivakh, L. Dubenska, M. Rydchuk, S. Plotycya*

1 – 13

**Voltammetric Behavior and
Reliable Method for the Determination of Coccidiostat Robenidine
in Animal Feed and Poultry Meat**

ISSN print 2708-0536
ISSN on-line 2708-0544

Vasyl' Stus Donetsk National University
L. M. Litvinenko Institute of Physical-Organic
Chemistry and Coal Chemistry

III INTERNATIONAL (XIII UKRAINIAN)
SCIENTIFIC CONFERENCE
FOR STUDENTS AND YOUNG SCIENTISTS

CURRENT CHEMICAL PROBLEMS

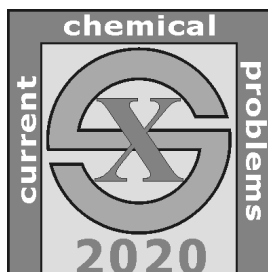


ABSTRACT BOOK

Vinnytsia 2020

**MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
VASYL' STUS DONETSK NATIONAL UNIVERSITY
L. M. LITVINENKO INSTITUTE OF PHYSICAL-ORGANIC
CHEMISTRY AND COAL CHEMISTRY**

CURRENT CHEMICAL PROBLEMS



**III International (XIII Ukrainian) scientific conference
for students and young scientists**

BOOK OF ABSTRACTS

**March 25–27, 2020
Vinnytsia**

POLAROGRAPHIC REDUCTION OF ROBENIDINE

Ivakh S. R., Dubenska L. O.Department of Analytical Chemistry, Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine
sophiaivakh@gmail.com

Coccidiosis is a common infectious amoebic illness affecting domestic animals and especially poultry. The disease has several forms. The acute form of coccidiosis leads to high mortality, chronic form causes weight gain reduction, poor feed conversion and insufficient egg production in poultry. Nowadays this disease is the most dangerous parasitic disease of poultry.

Robenidine [1,3-bis(p-chlorobenzylideneamino)guanidine hydrochloride] is special feed additives which are added to prevent animal's coccidiostats. Presently it actively used in agriculture. However, contamination of animal meat with coccidiostats may occurs, thereby causing adverse effects in humans consuming such meat.

Therefore, reliable methods are needed for accurate qualitative and quantitative determination of robenidine. There are very limited number of robenidine determination methods. Chromatography with various detectors are commonly used. Good alternative to known methods of robenidine determination are electroanalytical methods, particularly voltammetry, which combines high selectivity and sensitivity, relatively, inexpensive instruments, quickness of use and possible automation as well.

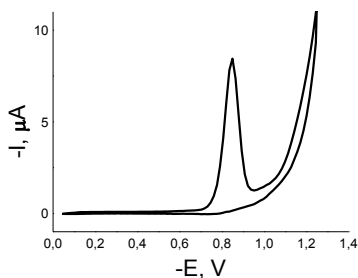


Fig. 1. Cyclic voltammogram in robenidine solution at HCl as background electrolyte, pH 1.3, $C_{\text{robenidine}} = 4.0 \times 10^{-5}$ mol/L, $v = 0.5$ V/s on HMDE

The behavior of robenidine in hanging mercury drop electrode were investigated. The robenidine directly reduced on hanging mercury drop electrode and did not need derivatization to other forms. Cyclic voltammogram of robenidine is shown in Fig. 1.

The different factors, which can affect the reduction of robenidine, was investigated. The study of the pH influence was performed in the pH range from 0.5 to 10. The current of the reduction peak reaches maximum at pH 1.3, then decreases with increasing pH. The initial studies were performed in the presence of HCl, HClO_4 , HNO_3 , H_2SO_4 and H_3PO_4 as well. The best results were obtained in the presence of hydrochloric acid as background electrolyte. Therefore, this acid was chosen to get proper pH, ionic strength and highest

current values in following measurements.

Additionally, the analytical parameters were determined. The calibration curve with different values of the concentration of the robenidine solutions were constructed. The linear dependence of reduction current vs. concentration were obtained in range from $2.3 \cdot 10^{-7}$ mol/L to $2.0 \cdot 10^{-5}$ mol/L. The detection limit is $1.9 \cdot 10^{-7}$ mol/L, the quantitation limit is $5.7 \cdot 10^{-7}$ mol/L and the correlation coefficient is 0.9999.

Хімічний факультет



СТУДЕНТСЬКА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ хімічного факультету

Тези доповідей



13 травня 2020 року
Львів

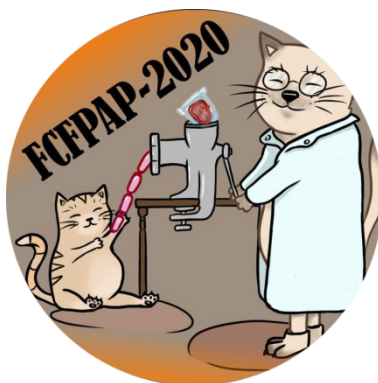
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧНА ПОВЕДІНКА КОКЦИДІОСТАТИКА РОБЕНІДИНУ

*Івах С.Р., Дубенська Л.О.
Кафедра аналітичної хімії,
Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна
e-mail: sophiaivakh@gmail.com*

Кокцидіостатики – це речовини, які вводять як добавки до кормів для тварин з лікувальною і профілактичною метою, щоб запобігти кокцидіозу (паразитарна хвороба, вражає шлунково-кишковий тракт). Робенідин (РОБ) використовують у промисловому вирощуванні курей, індиків і кролів. Цей кокцидіостатик є особливо популярним, зокрема, його додають до раціону 70 % бройлерів. Потрапляючи в організм тварини разом з кормом, РОБ залишається в тканинах, таким чином і у продуктах тваринного походження. Директива Ради ЄС 2020/148 регламентує вміст РОБ у кормі в межах 30-36 мг/кг, а максимально допустимі рівні РОБ у курячих тканинах коливаються від 0.20 мг/кг до 1.30 мг/кг залежно від тканини. Для визначення РОБ у продуктах харчування використовують виключно високоефективну рідинну хроматографію. Тому питання розроблення нових доступних, простих, але водночас надійних методів визначення РОБ є актуальним.

РОБ містить функціональні групи, здатні до відновлення в умовах вольтамперометрії. Дослідження проводили на двох робочих електродах – ртутному краплинному (р.к.е.) і полірованому твердому амальгамному (р-AgSAE). Вивчили вплив рН, фонового електроліту, швидкості розгортки, параметрів акумуляції на електрохімічне відновлення. РОБ відновлюється з утворенням одного піку, контрольованого дифузією, за потенціалів -0.85 В і -0.94 В на р.к.е. і р-AgSAE відповідно. рН змінювали в межах 0.5-10, найбільші значення струмів досягаються за значення рН 1.3. Для забезпечення такого низького рН дослідили вплив кислот – HCl, HNO₃, H₂SO₄, HClO₄, H₃PO₄. З огляду на те, що при роботі з такими складними матрицями, як м'ясо чи корм, потрібно використовувати екстрагенти, то ми дослідили також MeCN, ДМФА, MeOH, HCOOH як індивідуально, так і їх суміші у різному співвідношенні. Найкращі результати отримали для фонового електроліту суміш HCl + 30 % MeOH. За оптимальних умов лінійні залежності струму від концентрації РОБ отримали для $2.3 \cdot 10^{-7}$ – $7.5 \cdot 10^{-5}$ М. Межа визначення РОБ для корму дорівнює 9.5 мг/кг на р.к.е. і 2.5 мг/кг на р-AgSAE, результати повторювані.

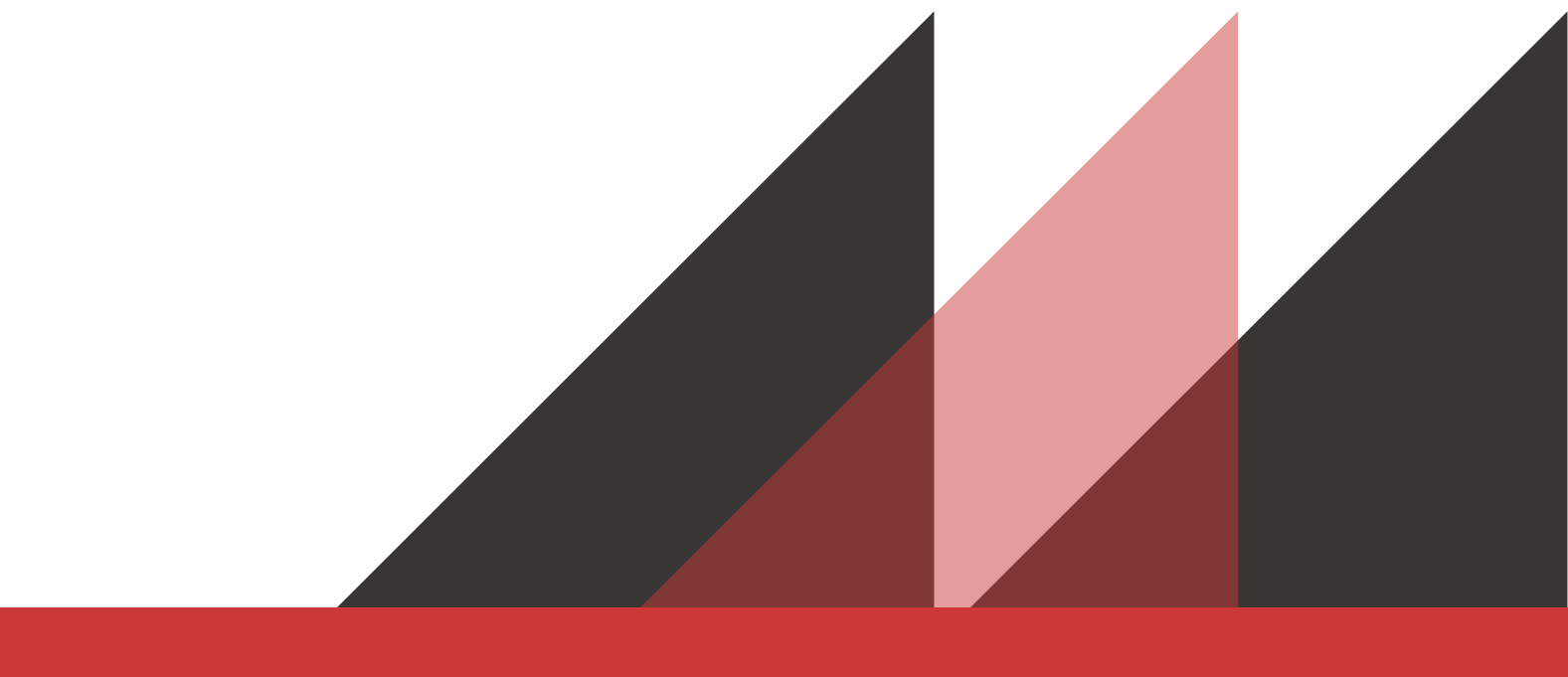
Ministry of Education and Science of Ukraine
Lviv Polytechnic National University



BOOK OF ABSTRACTS

**FOOD CHEMISTRY. MODERN METHODS FOR PRODUCTION
OF FOOD, FOOD ADDITIVES AND PACKAGING MATERIALS**

Lviv, October 7-9, 2020



CONTROL OF POULTRY MEAT FOR THE COCCIDIOSTAT ROBENIDINE CONTENT

Ivakh S. R., Dubenska L. O.

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,
Ivan Franko National University of Lviv, Kyryla & Mephodia Str. 8, Lviv, Ukraine
sophiaivakh@gmail.com

Contemporary agricultural practice often involves the application of a wide range of veterinary medicines and feed additives to treat and protect animals from a large variety of pathological conditions. Infections (bacterial, parasitic, or viral) account for a large fraction of these diseases. Coccidiostats (COC) are pharmacologically active molecules employed to prevent and inhibit parasitic protozoa of the genus *Eimeria*, referred to as coccidia, causing a very contagious disease of the gastrointestinal tract in many farmed animals. Coccidiosis represents a major disease in poultry, causing intestinal lesions, scarce weight gain, poor feed conversion and poor egg production; in its acute form, coccidiosis causes high mortality rates.

A range of COC is currently licensed as feed additives according to Regulation (EC) No 1831/2003. The International Federation for Animal Health (IFAH) estimated that of the 40.7 million tons of feed produced annually in the EU for chickens for fattening, turkeys, and rabbits, approx. 18.3 million tons (45%) contain an added COC. Unfortunately, the overuse and/or improper application of veterinary drugs can result in high residual drug levels in tissue and the surrounding environment. Thus, due to feed contamination, COC get into food of animal origin. Regarding risks associated with human health, regulatory authorities have set maximum residue limits (MRLs) for robenidine (ROB) in chicken tissues. In the European Union individual MRLs have been set for specific chicken tissues namely 0.80 mg/kg for liver, 0.20 mg/kg for muscle and 1.30 mg/kg for skin or fat. Concerning the negative impact of COC on human health, clinical signs of acute rhabdomyolysis were observed due to accidental ingestion of the pure compounds. The symptoms were muscle weakness and myocardial insufficiency. Additional studies show exacerbation of certain conditions of ischemic disease by residues of COC in food.

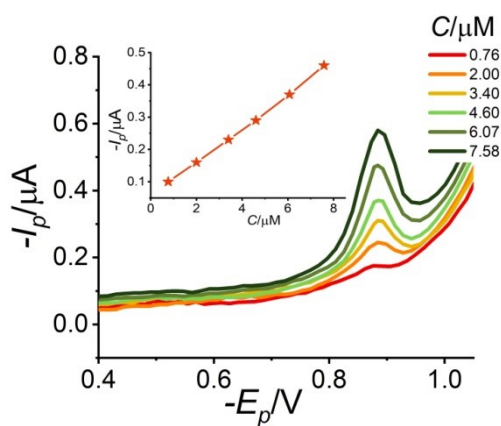


Fig. 1. Cathodic voltammograms of meat solutions with ROB at the background HCl – methanol solution at SMDE; inset – the calibration curve; $v = 0.5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$, pH 1.3.

Therefore, reliable methods are needed to detect and quantify COC precisely, in particular, to detect ROB residues in products of animal origin. We propose to determine ROB in poultry meat according to a unique method developed by us using voltammetric analysis. This method is based on the electrochemical reduction of ROB on the mercury drop indicator electrode. We investigated the influence of pH, a supporting electrolyte, a scan rate and accumulation parameters [1]. Since organic reagents are used as extractants in the analysis of complex matrices (such as meat or feed), so the influence of various organic solvents as background electrolytes has been investigated. We have studied methanol, dimethyl formamide, formic acid, acetonitrile as individual reagents and their different mixtures and consequently, the mixtures HCl + 30% MeOH, HCl + MeCN, and individual HCl, have been chosen.

As shown in Figure 1, we obtained the linear dependence of the reduction current vs. the concentration of ROB in poultry meat.

[1] S. Ivakh, L. Dubenska, M. Rydchuk, and S. Plotycya. Voltammetric behavior and reliable method for the determination of coccidiostat robenidine in animal feed and poultry meat // Electroanalysis. DOI: 10.1002/elan.202060225



ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

ХІМІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
НАУКОВЕ ТОВАРИСТВО СТУДЕНТІВ,
АСПІРАНТІВ ТА МОЛОДИХ ВЧЕНИХ
ХІМІЧНОГО ФАКУЛЬТЕТУ



VII НАУКОВИЙ СЕМІНАР СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ
І МОЛОДИХ УЧЕНИХ

«ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ ЕЛЕКТРОХІМІЧНОГО АНАЛІЗУ»

ЗБІРНИК ТЕЗ

Львів - 2020

МЕХАНІЗМ ПОЛЯРОГРАФІЧНОГО ВІДНОВЛЕННЯ РОБЕНІДИНУ

Івах С.Р., Дубенська Л.О.

Львівський національний університет імені Івана Франка

Кафедра аналітичної хімії

sophiaivakh@gmail.com

З розвитком сільськогосподарської діяльності зростає потреба у застосуванні широкого спектру кормових добавок і ветеринарних препаратів, щоб захистити тварин від бактеріальних, вірусних чи паразитарних інфекцій. Одним із поширених таких захворювань є кокцидіоз, що вражає свійських тварин, особливо птицю. Оскільки фермери зацікавлені у здорових тваринах, швидкому відгодовуванні і малих конверсіях корму, то широкого застосування набули кокцидіостатики (КОКЦ) – фармакологічно активні речовини, які вводять у корми з профілактичною або лікувальною метою. Згідно з даними Міжнародної федерації охорони здоров'я тварин, з 40.7 млн тонн кормів, що щорічно виробляються в ЄС для птиці та кролів, приблизно 18.3 млн тонн (45%) містять КОКЦ. КОКЦ як кормові добавки дозволені Регламентом ЄС 1831/2003.

Об'єктом нашого дослідження є кокцидіостатик робенідин (похідне діаміногуанідину), особливо популярний через антипаразитарні властивості, його додають до раціону 70% бройлерів. Робенідин (РОБ) має у структурі (рис. 1)

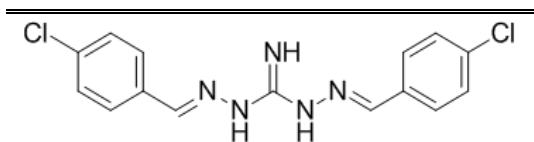


Рис. 1. Структурна формула робенідину

функціональні групи, здатні до відновлення в умовах полярографічного аналізу. Дослідження проводили у триелектродній електролітичній комірі з робочим ртутним краплинним електродом (р.к.е.), насиченим каломельним електродом порівняння і платиновим допоміжним електродом.

Для того щоб дослідити механізм відновлення РОБ, вивчили вплив різних чинників (рН, природа фонового електроліту, розчинник, концентрація) та обрали оптимальні умови для відновлення РОБ. Змінювали рН в межах від 0.5 до 10. Струм відновлення РОБ досягав найбільшого значення у сильно кислому середовищі (рН < 2.5), потім різко зменшувався зі збільшенням рН. За значення рН > 7 полярограми не відтворювалися. Залежність потенціалу піку від значення рН розчину мала чіткі три лінійні ділянки у таких межах рН: 1.0-2.5; 3.2-4.2; 4.6-6.2. Використовуючи формули $dE/dpH = (2.3RTzH^+)/(\alpha nF)$ (1) і $\alpha n = -47.7/(E_p - E_{p/2})$ (2), розраховували співвідношення кількості електронів n і протонів zH^+ . За формулою (2) додатково обчислили кількість електронів із залежностей струму від концентрації розчину РОБ. Отож результати обчислень такі: кількість електронів 1.9-2.3, кількість протонів 0.7-1.2.

Вплив швидкості розгортки потенціалу v змінювали в межах 0.1-4.0 В/с. Спостерігали збільшення висоти піку зі збільшенням v , потенціали зсувалися в катодну область. Залежність $E = f(\lg v)$, де нахил кривої дорівнює $2.3RT/\alpha nF$, також дає змогу обчислити кількість електронів n , яка дорівнює 1.8-2.2. Природа струму дифузійна, бо коефіцієнт b нахилу залежності $\lg I = f(\lg v)$ для різних концентрацій дорівнює 0.51 і 0.42, що дуже близьке до теоретичного 0.5.

Робенідин має щонайменше три активні центри, здатних до відновлення за участю протонів. Найімовірніше, на першій стадії (електрохімічній) відбувається приєднання двох електронів і одного протона, утворюючи продукт реакції – аніон-радикал. Це етап, який визначає швидкість електрохімічного процесу. Далі неспарений електрон рухається вздовж ланцюга, у сильно кислому середовищі швидко приєднується протон, що є хімічною стадією механізму відновлення.