



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

инж. Искра Иванова Стойкова

БИОАНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА
ПЕСТИЦИДИ В МАТРИЦИ ОТ ЧЕРЕН ДРОБ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните
и физиологично активни вещества)

Научен ръководител: доц. д-р инж. Данчо Даналев

Научно жури: 1. доц. д-р инж. Андриана Сурлева - председател, рецензент

2. проф. д-р Ангел Ангелов- рецензент

3. проф. д-тн Цонка Годжевъргова

4. доц. дн Иванка Стойнева

5. доц. д-р инж. Данчо Даналев

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 136 страници, съдържа 44 фигури и 30 таблици. Цитирани са 156 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 19.07.2016г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 19.12.2016г. от 14:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувалите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Изказвам най-сърдечна благодарност и признателност към проф. д-р инж. Любов Йотова за доверието, което ми гласува, приемайки ме в екипа на катедра „Биотехнология”, както и за научния интерес, който предизвика у мен, с избора на работна тематика.

Изказвам искрена благодарност към научния си ръководител доц. д-р инж. Данчо Даналев за подкрепата, отделеното време, насоките и придобитите знания и умения при изработването и оформянето на настоящата работа.

Благодаря на научния си консултант гл. ас. д-р инж. Спаска Янева за търпението, помощта, мотивацията и дадените ценни съвети, при съвместната ни ползотворна работа.

Благодаря на целия колектив на катедра „Биотехнология“ за отзивчивостта и приятелското отношение.

Благодаря на ръководството на ЦЛВСЕЕ в лицето на доц. д-р Тодорка Янковска-Стефанова и д-р Руслан Димитров, както и на колектива от отдел „ЗОС“ за разбирането, подкрепата и предоставената възможност за разработване на части от дисертационния труд в лабораторията.

И не на последно място сърдечно благодаря на семейството си за безкрайното търпение, неотлъчната помощ и подкрепа, която ми оказват.

Списък на съкращенията в дисертацията

ACh	Ацетилхолин
AChE	Ацетилхолинестераза
AChEI	Ацетилхолинестеразни инхибитори
APTES	Аминопропилтриетокси силан
ASE	Ускорена екстракция с разтворители
CAB	Целулозен ацетат бутират
CAP	Целулозен ацетат пропионат
ChE	Холинестераза
ChO	Холиноксидаза
DAD	Детектор с диодна матрица
d-SPE	Дисперсивна твърдофазна екстракция
ECD	Електрон улавящ детектор
ELISA	Ензимно-свързан имуносорбентен анализ
ESI	Електроспрей йонизация
FL	Флуоресцентен детектор
FPD	Пламъчно фотометричен детектор
GC	Газова хроматография
GC-MS	Газова хроматография с мас спектрометрия
GPC	Гел-проникваща хроматография
HPLC-FL	Високоэффективна течна хроматография с флуоресцентна детекция
HRP	Пероксидаза от хрян
LC	Течна хроматография
LC-MS	Течна хроматография с мас спектрометрия
NCI	Отрицателна химична йонизация
NPD	Азот-фосфорен детектор
PAA	Полиакрилна киселина
PAMAM	Поли-(амидоаминови) дендримери
PSA	Първичновториичен амин
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (бърз, лесен, евтин, ефективен, стабилен и безопасен)
UV-VIS	Детектор в ултравиолетова и видимата област
БАБХ	Българска агенция по безопасност на храните
ВМП	Ветеринарно-медицински препарат
ВНТи	Въглеродни нанотръби
ГД	Границата на докладване
ГКО	Граница на количествено определяне
ДДТ	Дихлородифенилтрихлоретан
ЕС	Европейски съюз
ЗВМД	Закон за ветеринарно-медицинската дейност
МВНТи	Многостенни въглеродни нанотръби
MTES	Метил триетокси силан
НМПКО	Национална мониторингова програма за контрол на остатъци
НРЛ	Национална референтна лаборатория
ОСФ	Оксидаза със смесена функция
ОФХ	Органофосфат хидролаза

2- ПАМ	2- Пиридин алдоксим метиодид
ПДК	Пределно допустима концентрация
УОЗ	Устойчиви органични замърсители
ФОС	Фосфорорганични съединения
ХОП	Хлорорганичните пестициди
ХЦХ	Хексахлорциклохексан
ЦДВСЕЕ	Централната лаборатория по ветеринарно-санитарна експертиза и екология

ВЪВЕДЕНИЕ

Масовата употреба на пестицидите започва с откриването на инсектицидните свойства на хлорорганичния пестицид дихлородифенилтрихлороетан (ДДТ) през 1939 г. Именно хлорорганичните пестициди (ХОП) са най-широко разпространени в селското стопанство през 60-те години на миналия век, а в някои страни те са използвани в медицинската практика за борба с маларията. Силната токсичност, натрупването в човешкия и животинските организми, голямата устойчивост в околната среда (до 90 г. период на полуразпад), са довели до въвеждане на забрана за тяхното използване и включване на някои от тях към устойчивите органични замърсители (УОЗ).

Приносът на пестицидите за увеличаване на добивите в селското стопанство, борбата с болестите по растенията и други е безспорен. Поради това тяхното развитие не приключва със забраната за употребата им. Те продължават да бъдат неизменна част от селското стопанство и днес, като се създават все повече нови групи пестициди с разнообразно действие и структура. Новосъздаваните пестициди имат по-малък период на полуразпад (до 90 дни), но биха могли да причинят остри натравяния, ако не се спазват карантните срокове при употребата им.

N-метилкарбаматите, фосфорорганичните съединения (ФОС) и пиретроидите са най-масово използваните инсектициди в днешно време. Те инхибират ензима ацетилхолинестераза (AChE), причинявайки сходна симптоматика при остро отравяне. Използват се както в мащабни производства, така и в домовете и градините ни. За съжаление, техни остатъци и/или метаболити могат да попаднат в животинските тъкани, мляко, яйца, мед и т.н. Поради това, безопасността на храните е неизменна част от политиката на Европейски съюз (ЕС) и постоянно нараства интересът към бързи скрининг методи за детекция на различни групи замърсители в храните.

Основно в практиката анализа на пестициди се осъществява чрез течна и газова хроматография (LC, GC), но през последните години с развитието на биосензорните

техники все по-широко се доказва, че биосензорите са отлична алтернатива на стандартните хроматографски методи. Те са бързи, лесни за употреба и показват напълно приемливи параметри- чувствителност, граница на откриване, линейност, възпроизводимост.

Настоящата работа е фокусирана върху разработване и валидиране на метод за анализ на различни групи пестициди в храни от животински произход чрез оптичен биосензор. При конструирането на биосензора е имобилизирана AChE, като целеви ензим, върху новосинтезирани мембрани, получени по зол-гелен метод. Бяха разработени и хроматографски методи- HPLC-FL за N-метилкарбаматите и GC-MS за ФОС и ХОП, които на по-късен етап бяха използвани за потвърждение, сравнение и валидиране на резултатите от новоконструирания биосензор.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е разработване и валидиране на аналитичен метод за определяне на пестициди в хранителни матрици от животински произход чрез оптичен биосензор. Във връзка с тази цел бяха поставени и следните по-конкретни задачи:

1. Разработване на подходящи методики за пробоподготовка при определяне на пестициди в храни от животински произход;
2. Разработване на потвърдителни аналитични методи за определяне на пестициди в храни от животински произход чрез LC и GC;
3. Валидиране на потвърдителните методи, според официалните изисквания към методите за анализ на храни;
4. Синтез на носители за имобилизация на биологични рецептори (AChE, ChO, HRP);
5. Конструиране на оптичен биосензор за мултикомпонентен анализ на пестициди;
6. Разработване на аналитичен скрининг метод за определяне на остатъчни количества от пестициди в храни от животински произход чрез оптичен биосензор;
7. Валидиране на скрининг метода, според официалните изисквания към методите за анализ на храни;
8. Съпоставяне аналитичните характеристики на разработените хроматографски методи и новоконструирания биосензор.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Оптимизация на пробоподготовката при потвърдителни (хроматографски) методи за анализ на пестициди в храни от животински произход

Унифицирането на пробоподготовката при анализ на пестициди в храни от животински произход е предизвикателство, поради големите разлики в природата на различните групи пестициди от една страна, а от друга страна разнообразните матрици, в които трябва да бъдат контролирани остатъчните им количества. От изключително значение за добивите на анализите е подходящата методика за извличането им от пробата. Важно е също пробите да са достатъчно добре пречистени преди да бъдат инжектирани в хроматографската система, особено при газовата хроматография, където се използват капилярни колони и попадането дори на минимални онечиствания от матрицата, може да доведе до трайно влошаване на аналитичния сигнал.

• Оптимизация на пробоподготовката за ФОС и ХОП

Първоначалните изследвания бяха проведени с матрици черен дроб и яйца. На база проведеното литературно проучване, са избрани два различни подхода, които да бъдат сравнени: ASE като метод за екстракция на липиди последван от ТФЕ за пречистване на анализите; QuEChERS метод, като цялостен подход за екстракция и пречистване

○ ASE/ТФЕ

– Екстракция

Първият етап от тази пробоподготовка е екстракция на анализите от матрицата. За матрици като яйца и черен дроб е от особено значение правилният подбор на разтворители. Важно е да се оптимизира съотношението полярен/неполярн разтворител, тъй като това са матрици с високо водно съдържание, при които екстракцията само с неполярни разтворители е неефективна поради голямата разлика в полярността на разтворителя и пробата (Cizkova et al., 2004). Полярните разтворители не са достатъчно ефективни по отношение на аналитичния добив. За това е важно да се подбере правилната комбинация от разтворители, осигуряваща най-пълна екстракция (Ahn et al., 2006).

С цел разработване и оптимизиране на пробоподготовката за интересуващите ни групи пестициди, са използвани проби от яйце и черен дроб, които са екстрахирани с различни съотношения на толуен/етанол чрез ASE (Stoykova et al., 2014). По 10g проба са смесени с 5g дехидратиращ агент РАА. Така хомогенизираните проби се поставят в клетки за ASE и се екстрахират с десет различни съотношения на разтворителите. Екстрактите са изпарени под вакуум, след което тегловно е определено количеството на екстрахираните липиди. Резултатите са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Резултати за липидно съдържание при екстракция чрез ASE с различни съотношения толуен/етанол

Разтворител		Липидно съдържание [%]	
Етанол [%]	Толуен [%]	Яйце	Черен дроб
10	90	8,09	3,21
20	80	8,25	3,65
30	70	7,97	2,98
40	60	7,20	2,73
50	50	5,99	2,11
60	40	6,60	1,54
70	30	5,44	1,49
80	20	4,20	1,45
90	10	4,53	1,20
100	0	5,15	0,86

Най-добър резултат за количество екстрахирани липиди от матриците е получен при съотношение на разтворителите толуен/етанол 80/20. С увеличаване количеството етанол, добивът значително намалява. Добивите, получени при използване на 10% етанол са по-близки до оптималния, от колкото тези, получени при екстракция с 30% етанол. Това доказва важността на оптимизиране на съотношението на използваните разтворители. Включването на полярен разтворител подпомага екстракцията на липидите, но, ако количество му е по-голямото, се постига обратен ефект и добивът намалява.

– Пречистване

Следващата стъпка при конвенционалната пробоподготовка е пречистването на анализите от останалите компоненти, които са били екстрахирани заедно с тях (основно мазнини), за което обикновено се използва твърдофазна екстракция с различни сорбенти. В настоящата работа за пречистване на мазнини, като пълнежи за ТФЕ са използвани флоризил и силикагел съгласно стандарт БДС EN 1528-3:2001. Проведените експерименти са при концентрация на анализите на ниво, отговарящо на ПДК за всеки отделен анализ.

Приготвянето на колоните с флоризил и силикагел е подробно описано в частта Материали и методи. В хода на работа е доказано, че 5g флоризил имат капацитет да задържат до 100mg мазнина.

След пречистването на екстракта през колона със силика гел, в пробите видимо остава мазнина, която не е била задържана от пълнежа. Инжектирането на не добре пречистени от мазнини проби в газ-хроматографска система е не допустимо, тъй като би довело до замърсяване на всички части на апарата- отлагане на мазнина в инжектора, замърсяване на капилярната колона, което води до висок шум на базовата линия и съответно ниска чувствителност, както и замърсяване на детектора, което би довело до влошаване селективността на детекция и невъзможност да се отличи спектъра на анализа от матричните преченията. Поради това, бихме могли да заключим, че пречистването на проби от животински произход, които съдържат по-високи количества мазнина, не е достатъчно да се извършва само през силикагел колона.

В Таблица 2 са представени резултатите за аналитичен добив за матрици яйце и черен дроб, пречистени през флоризил.

Таблица 2. Аналитичен добив на ХОП и ФОС при ТФЕ с флоризил.

Група	Пестицид	Аналитичен добив [%], (n=18)	
		Черен дроб	Яйце
Хлорорганични	Алдрин	93	87
	Диелдрин	89	92
	алфа Ендусулфан	58	64
	бета Ендусулфан	62	60
	Ендусулфан сулфат	70	73
	Хексахлорбензен	87	91
	Хептахлор	95	98
	ХХЕ изом Б екзо	98	90
	ХХЕ изом А ендо	96	93
	алфа ХЦХ	89	95
	Бета ХЦХ	96	97
	Гама ХЦХ линдан	83	90
	ДДЕ	92	93
	ДДД	86	99
	ДДТ	94	92
	Хлорбензилат	63	65
Фосфорорганични	Диазинон	нд	нд
	Пиримифос- метил	16	21
	Паратион	24	32
	Хлорпирифос-метил	41	38
	Пиразофос	30	35
	Триазофос	нд	нд
	Фентион	нд	нд
	Хлорфенвинфос	нд	нд

*нд- не се детектира

С изключение на хлорбензилат, алфа и бета ендосулфан, добивите на ХОП покриват изискванията на документ SANTE 11945/2015 от 70-120%. Стойностите при ендосулфан сулфат са на границата на приемливите резултати (70% за черен дроб и 73% за яйце). При него беше забелязано интересно явление. При преминаване през флоризилна колона, ендосулфан сулфат претърпява превръщания и се открива в пробата под формата на алфа и бета ендосулфан, като сумата от концентрациите им съвпада с липсващата концентрация на ендосулфан сулфат. Нормата за ПДК в Регламент 369/2005 е определена като сума от тези три анализита- ендосулфан сулфат, алфа и бета ендосулфан, изразени общо като ендосулфан. Това означава, че въпреки превръщанията по време на колонното пречистване, крайният резултат за сума от трите форми на ендосулфан ще бъде коректна. За потвърдителните анализи обаче, има поставено изискване в документ SANTE 11945/2015, което гласи, че те трябва да могат да определят точните концентрации на всеки отделен анализит, дори и нормата им за ПДК да бъде изразявана като сума. В такъв случай, ползването на флоризил като пълнеж за ТФЕ, е ограничено по отношение на ендосулфан.

Определените добиви за ФОС са изключително ниски. Всички са под изискуемия минимум от 70%, а някои от съединенията отсъстват от анализираната проба (диазинон, триазофос, фентион, хлорфенвинфос). Това би могло да бъде обяснено с разликата в поляритета им, ФОС са по-полярни от ХОП. Самият флоризил е неполярен, поради което успява да пропусне ХОП, а да задържи полярните компоненти от пробата, като мазнините, а вероятно и ФОС. Това ни дава основание да обобщим, че колонното пречистване с флоризил не е подходящо да се прилага в мултикомпонентни методи, където целта е извличане на максимален брой пестициди с унифицирана пробоподготовка. Флоризилната колона пречиства много добре мазнините от матрицата, но задържа и някои от търсените анализити. Тя е подходяща за самостоятелно пречистване на неполярни съединения каквито са ХОП.

○ *QuEChERS метод*

За втори вариант на пробоподготовка е избран QuEChERS метод, като цялостен подход- екстракция и пречистване.

В стандартната процедура разтворителят, ползван за екстракция е ацетонитрил. При храни от животински произход са необходими някои модификации по отношение на разтворителя, поради сложността на матрицата. Модификацията, приложена в настоящата работа се състои в добавянето на 10ml вода/метанол в съотношение 85/15, към

ацетонитрила. Тази пробоподготовка е успешно приложена за анализ на карбамати в матрица черен дроб в предходна наша разработка (Stoykova et al., 2015a). Поради това е приложена същата комбинация от разтворители за ХОП и ФОС, с цел унифициране на пробоподготовката за всички групи пестициди. Тъй като пробите не са достатъчно добре пречистени, за да бъдат инжектирани на газ-хроматографска система, е извършено допълнително пречистване през силикагелна колона. Подробно описание на процедурата е представено в частта Материали и методи. Въпреки допълнителното пречистване, при пробите от яйца все още има наличие на мазнини от матрицата, което вероятно се дължи на по-високото мастно съдържание в тази матрица. Като резултат беше взето решение, разработките да продължат само за черен дроб като целеви орган, чрез което се обхваща по-голям брой животински видове, които могат да бъдат анализирани за остатъчни количества от пестициди.

Получените стойности за аналитичен добив са представени в Таблица 3.

Таблица 3. Аналитичен добив за ХОП и ФОС в черен дроб по модифициран QuEChERS метод

Група	Пестицид	Аналитичен добив [%], (n=18)
Хлорорганични	Алдрин	65
	Диелдрин	73
	алфа Ендусулфан	75
	бета Ендусулфан	78
	Ендусулфан сулфат	83
	Хексахлорбензен	86
	Хептахлор	84
	ХХЕ изом Б екзо	72
	ХХЕ изом А ендо	75
	алфа ХЦХ	56
	Бета ХЦХ	67
	Гама ХЦХ линдан	63
	ДДЕ	нд
	ДДД	нд
	ДДТ	нд
	Хлорбензилат	нд

Фосфорорганични	Диазинон	102
	Пиримифос- метил	98
	Паратион	100
	Хлорпирифос-метил	99
	Пиразофос	65
	Триазофос	67
	Фентион	59
	Хлорфенвинфос	нд

*нд- не се детектира

При този вид пробоподготовка най-високи добиви са отчетени за ФОС, като само един представител хлорфенвинфос не е детектиран. Тази комбинация от разтворители се оказва не достатъчно ефективна за екстракция на ХОП, тъй като те са не полярни и по-трудно се отделят от мазнината. По-голяма част от резултатите за аналитичен добив на ХОП не покриват изисването на документ SANTE 11945/2015 от 70-120%. За тази група пестициди по-подходяща е конвенционалната методика за екстракция под налягане и при висока температура, и пречистване с флоризил.

Поради ниските добиви, постигнати по QuEChERS метод за ХОП, за продължаване на разработката по създаване на биосензор за анализ на пестициди в храни бяха подбрани четири представителя диазинон, пиримифос-метил, хлорпирифос-метил и паратион от групата на ФОС, при които пробоподготовката може да бъде унифицирана с тази за карбамати в матрица черен дроб.

• Оптимизация на пробоподготовката за N-метил карбамати

Тъй като карбаматните пестициди са не стабилни при подлагане на високи температури и налягане, прилагането на автоматизирани системи за пробоподготовка може да доведе до загуба на аналити и не коректни резултати. Поради това варианта на пробоподготовка, който е избран за тези съединения е модифициран QuEChERS метод (Stoykova et al., 2015a). Подробно описание на процедурата е представено в частта Материали и методи. В Таблица 4 са представени резултатите за аналитичен добив на четирите карбамата, включени в настоящия дисертационен труд: алдикарб, метомил, карбофуран и пропоксур. Концентрацията на стандартни разтвори, добавени към пробата, е на ниво ПДК за всеки отделен карбамат.

Таблица 4. Аналитичен добив N-метил карбамати в черен дроб по модифициран QuEChERS метод

Пестицид	Аналитичен добив [%], (n=18)
<i>Метомил</i>	101.1
<i>Алдикарб</i>	105.25
<i>Пропоксур</i>	97.17
<i>Карбофуран</i>	104.3

Всички получени резултати за аналитичен добив (истинност) покриват изискванията на документ SANTE 11945/2015 от 70-120%. Това означава, че избраният метод за пробоподготовка е приложим за тези съединения. Стойностите, надвишаващи 100% се дължат на матричния ефект, който се отразява като шум на базовата линия на хроматограмата.

2. Валидиране на потвърдителен метод за анализ на ФОС в черен дроб чрез GC-MS/MS

Ако в рутинната работа на една лаборатория за анализ на храни, чрез скрининг метод е открито наличие на пестициди в проба, трябва да съществува потвърдителен метод (обикновено хроматографски), който допълнително да докаже дали откритата концентрация на пестициди превишава допускателна. Апаратурата, която може да се прилага при потвърдителните методи, е описана в Решение 657/2002. Както беше коментирано в раздела Литературен обзор, мас-спектрометрията е универсален и широко прилаган метод при потвърдителни анализи за тази група съединения. Повечето пестициди могат да бъдат детектирани с GC. Карбаматите обаче, поради това, че са термо нестабилни, следва да бъдат анализирани с LC. В настоящата работа за потвърдителен метод при анализа на карбамати е използвана HPLC-FL със следколонна дериватизация, а останалите пестициди са анализирани чрез GC-MS/MS с йон-трап детекция.

За да бъде потвърдено, че разработваният метод е приложим за целта, е проведено валидиране според изискванията на документ SANTE 11945/2015, който е разработен съобразно стандарт ISO 17025:2005.

Хроматографските методи са разработени в ЦЛВСЕЕ, като валидирането им е проведено отново в съответствие с гореспоменатите документи и методология.

Използваните пробоподготовка и апаратура са описани подробно в частта Материали и методи.

Съединенията, за които методът е приложим са: *Хлорпирифос-метил*, *Паратион*, *Пиримифос-метил*, *Диазинон*.

Валидирането се извършва в три нива, съответстващи на:

- 1во валидационно ниво- 0,5 пъти ПДК на съответния пестицид;
- 2ро валидационно ниво- 1,5 пъти ПДК на съответния пестицид;
- 3то валидационно ниво- 1,5 пъти ПДК на съответния пестицид;

• Идентификация на анализите

Когато за определянето на пестициди се използва мас детектор, съществува допълнително изискване към идентификацията на съединенията. В режим на инструмента MS/MS, за потвърждение са необходими поне два продуктови йона. Обобщените данни, свързани с идентификацията на ФОС, са представени в Таблица 5.

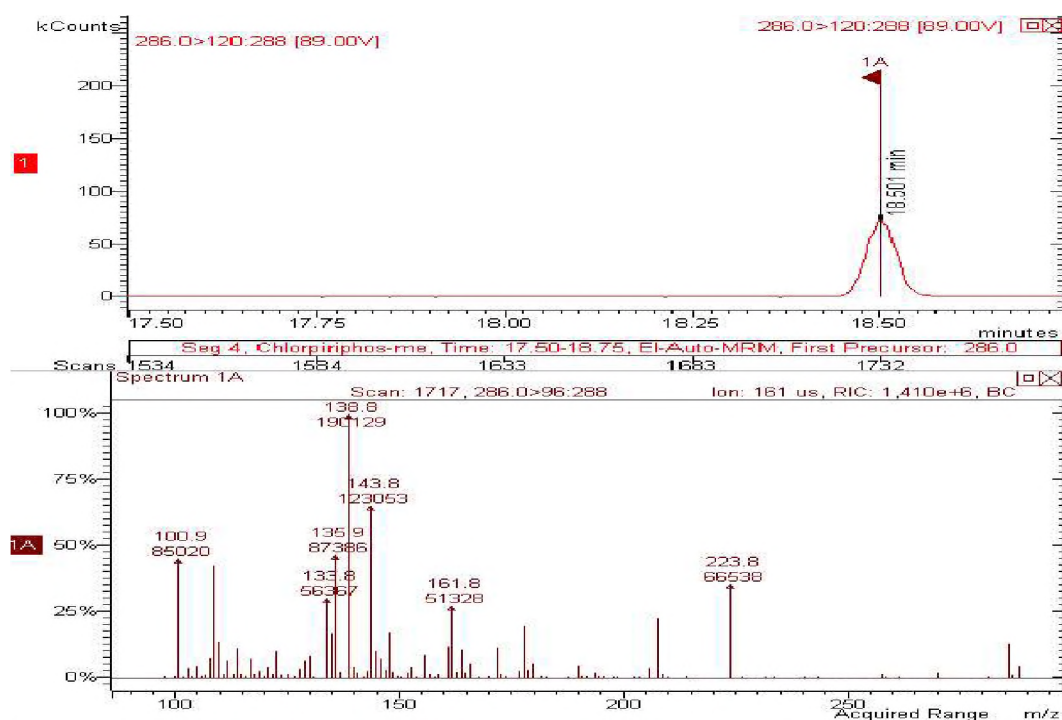
Таблица 5. Идентификация на ФОС в черен дроб чрез GC-MS/MS

Аналит	Mw [g/mol]	Време на задържане (Rt)	Молекулен йон m/z	Фрагменти m/z	Колизационна енергия [V]
<i>Хлорпирифос-метил</i>	350.59	18,501	286	101;139;223	89
<i>Паратион</i>	291.26	21,056	292	136;144;233	95
<i>Пиримифос-метил</i>	305.33	19,786	306	152;180	100
<i>Диазинон</i>	304.34	16,678	305	121;145	98

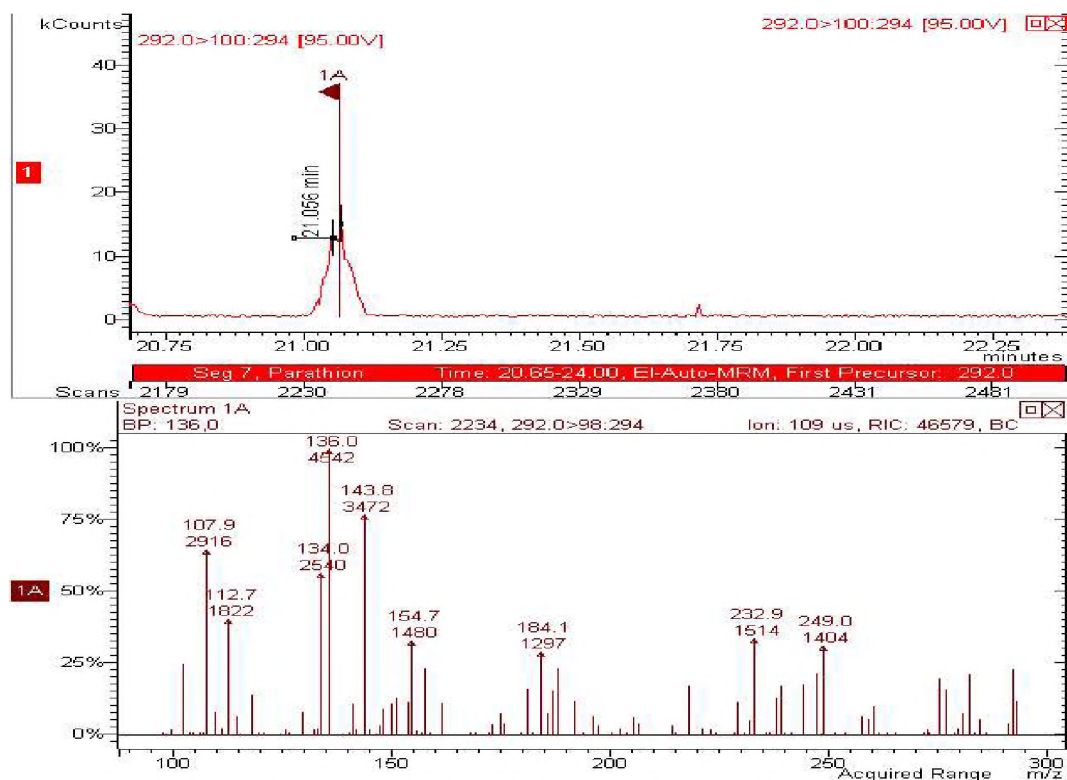
След оптимизация на условията за фрагментиране на молекуления йон на всяко съединение, са получени по минимум два фрагмента, което покрива изискването на документ SANTE 11945/2015. За две от съединенията- хлорпирифос-метил и паратион, са

получени по три фрагмента. Молекулните йони на пиримифос-метил и диазинон са с големи (m/z съответно 306 и 305), което това затруднява разбиването на фрагменти от йон-трап детектора. От получените спектри на тези съединения е видно, че въпреки приложената максимална коализационна енергия, молекулните йони само са понижили интензитета си, но продължават да присъстват в спектъра и то като 100%. Представените на Фигура 1 спектри и хроматограми са от проба с добавка на ниво ГКО за всяко съединение.

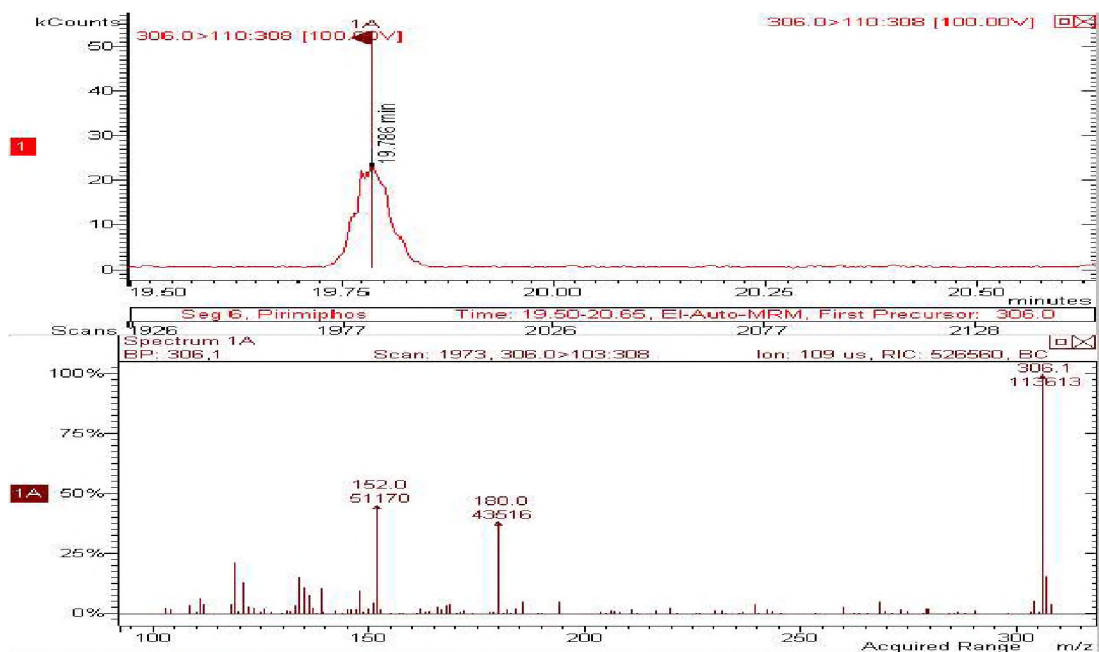
Хлорпирифос-метил



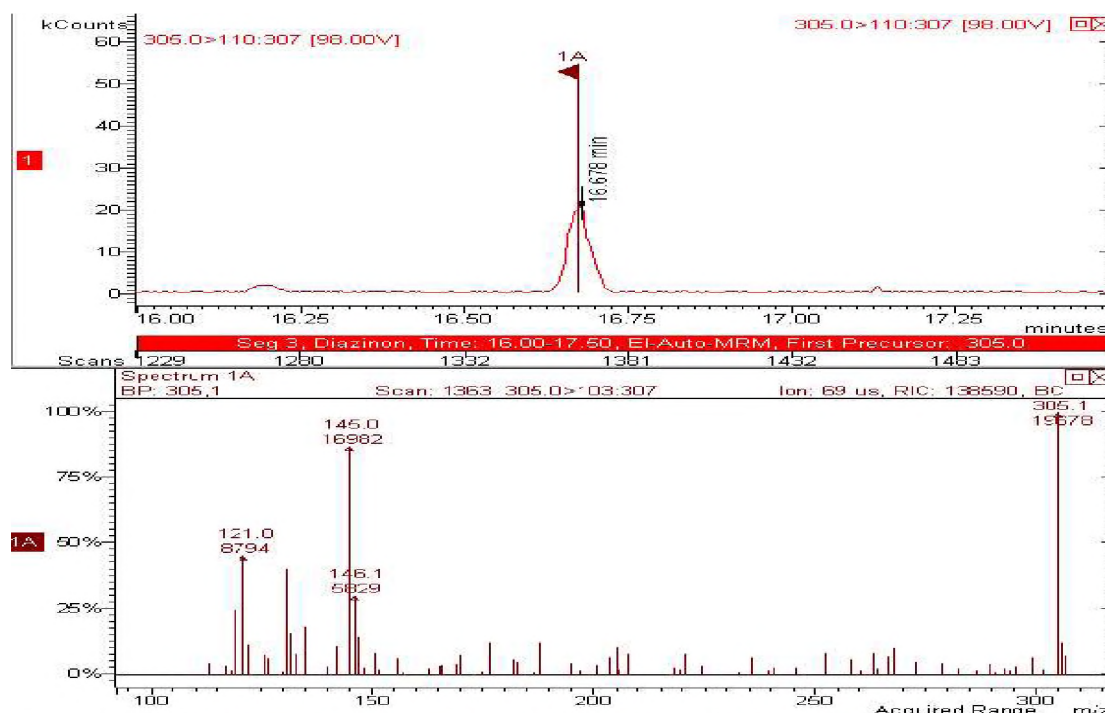
Паратион



Пиримифос-метил



Диазинон



Фигура 1. Хроматограми и спектри от проба за ФОС в черен дроб с добавка на ниво ГКО

• Граница на количествено определяне

ГКО беше определена като най-малката концентрация на аналит, която може да бъде количествено определена с приемливи истинност и прецизност. За да бъде определена ГКО, са разработени 20 броя проби от черен дроб с добавка на стандартен разтвор. Резултатите са обобщени в Таблица 6.

Таблица 6. ГКО за ФОС в черен дроб чрез GC-MS/MS

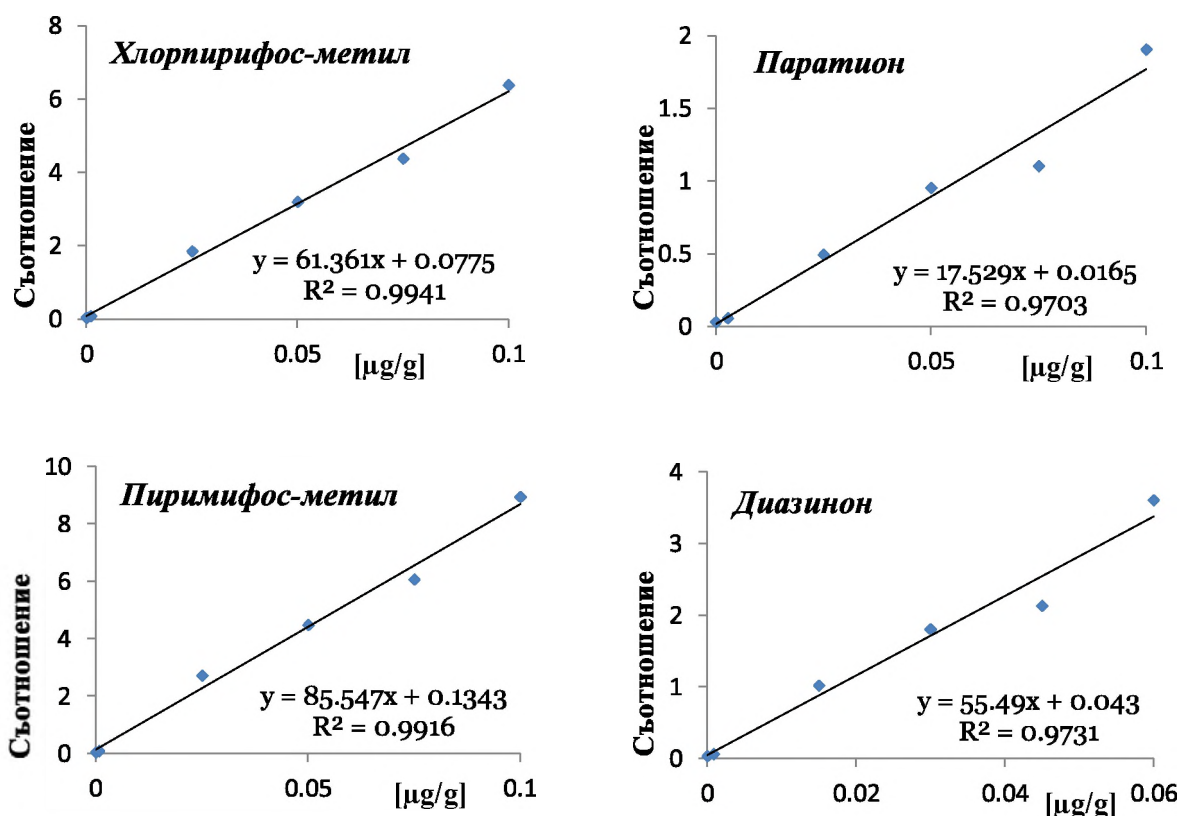
	ПДК [µg/g]	ГКО [µg/g]	Аналитичен добив, [%], (n=20)	Вътрешно-лабораторна възпроизводимост RSD_{wR} , $RSD[\%]$, (n=20)
Хлорпирифос-метил	0,05	0,0010	98,3	8,7
Паратион	0,05	0,0027	101,7	10,3
Пиримифос-метил	0,05	0,0007	81,2	7,8
Диазинон	0,03	0,0009	82,4	9,1

Критерий: ГКО трябва да бъде $\leq$ ПДК (според Документ No. SANTE 11945/2015)

Всички стойности за ГКО са под ПДК, което напълно покрива изискването. Най-ниска е ГКО за Пиримифос-метил- 0,0009µg/g, което е повече от 30 пъти по-малко от стойността, определена за ПДК.

- **Линесен обхват**

Линейният обхват е определен по функцията от концентрацията на съответния пестицид от съотношението на площта му спрямо вътрешния стандарт. Методът на калибриране е многоточкова калибрационна крива с проби със стандартна добавка по метода на вътрешния стандарт. Използван е стандартен разтвор на смес от 4те ФОС и ВС в пет нарастващи концентрации и празна проба, използвана за нулева концентрация: 0,0; ГКО; 0,5хПДК; 1,0хПДК; 1,5хПДК; 2,0хПДК. Концентрацията на ВС във всеки разтвор е една и съща. Графиките са представени във Фигура 2.



Фигура 2. Калибрационни криви за ФОС в черен дроб чрез GC-MS/MS

Критерий: $R^2 \geq 0,95$ (според Документ No. SANTE 11945/2015)

Обобщените резултати за линейност и работен обхват са представени в Таблица 7. Корелационен коефициент и работен обхват за ФОС в черен дроб чрез GC-MS/MS

Таблица 7. Корелационен коефициент и работен обхват за ФОС в черен дроб чрез GC-MS/MS

	<i>Хлорпирифос-метил</i>	<i>Паратион</i>	<i>Пиримифос-метил</i>	<i>Диазинон</i>
R^2	0.9941	0.9703	0.9916	0.9731
Работен обхват	0,0010-0,0750	0,0027-0,0750	0,0007-0,0750	0,0009-0,0450

С всички пестициди се постига много добра линейност. Покрит е обхвата от ГКО до 2,0хПДК с корелационен коефициент $R^2 \geq 0,95$.

- Аналитичен добив, прецизност и неопределеност**

Обобщените данни от валидиране на метода са представени в Таблица 8.

Таблица 8. Аналитичен добив, повторяемост, възпроизводимост и неопределеност за ФОС в черен дроб чрез GC-MS/MS

Пестицид	Ниво [µg/g]	Аналитичен добив [%], (n=18)	Повторяемост RSDr [%], (n=6)	Вътрешно-лабораторна възпроизводимост RSD_{wR} [%], (n=18)	Неопределеност [%]
Хлорпирифос-метил	0,025	97,8	4,31	6,12	6,07
	0,050	99,0	7,32	7,64	6,27
	0,075	101,2	6,63	6,51	4,46
Паратион	0,025	72,6	6,61	8,81	7,41
	0,050	99,8	8,55	8,87	7,23
	0,075	97,4	7,80	9,54	5,55
Пиримифос-метил	0,025	99,9	3,02	5,90	6,10
	0,050	98,4	4,41	6,27	5,55
	0,075	99,3	2,56	2,54	2,50
Диазинон	0,015	78,2	5,33	7,46	6,95
	0,030	101,8	7,99	8,05	6,69
	0,045	103,5	5,43	5,80	3,75

Определените критерии, на които трябва да отговарят резултатите според Документ No. SANTE 11945/2015 са:

Аналитичен добив: 70-120%

Прецизност (повторяемост и възпроизводимост): $\leq 20\%$

Неопределеност: $\leq 50\%$

Аналитичният добив е свързан с избора на подходяща пробоподготовка. Всички резултати покриват критерия. Най-нисък добив е получен за паратион на валидационно ниво 1- 72,6%, а най-висок е добивът за диазинон в най-високата концентрация на валидиране- 103,5%. Резултатите за аналитичен добив, надхвърлящи 100%, се получават основно заради матричния ефект. Kiljanek и колектив, разработват метод за анализ на ФОС в черен дроб чрез GC-NPD, като използват гел-проникваща хроматография (GPC) за пречистване на пробите, с последваща силика гел колона. Въпреки прилагането на системата за GPC, която е скъпа и изразходва голямо количество разтворители, докладваните от тях резултати за аналитичен добив са в границите от 75,6% до 105,4% (Kiljanek T. et al., 2011). Тези резултати са съпоставими с получените в настоящата работа, като тук е използван много по-бърз и улеснен метод при пробоподготовка.

Всички резултати за повторяемост и възпроизводимост са под 20%, а дори под 10%, като напълно покриват критерия. Възпроизводимостта е свързана с приложимостта на метода в различни условия, като различен оператор, различно време или място на извършване на анализа. Данните дават основание да считаме, че методът е стабилен и не се повлиява драстично при промяна на външните условия.

Стойността за неопределеност от измерването в документ SANTE 11945/2015 е изчислена като средна стойност от неопределеностите, докладвани от всички лаборатории в Европейския съюз, участващи в междулабораторни изпитвания за анализ на пестициди в храни, организирани от Европейската референтна лаборатория. Всички получени стойности покриват критерия.

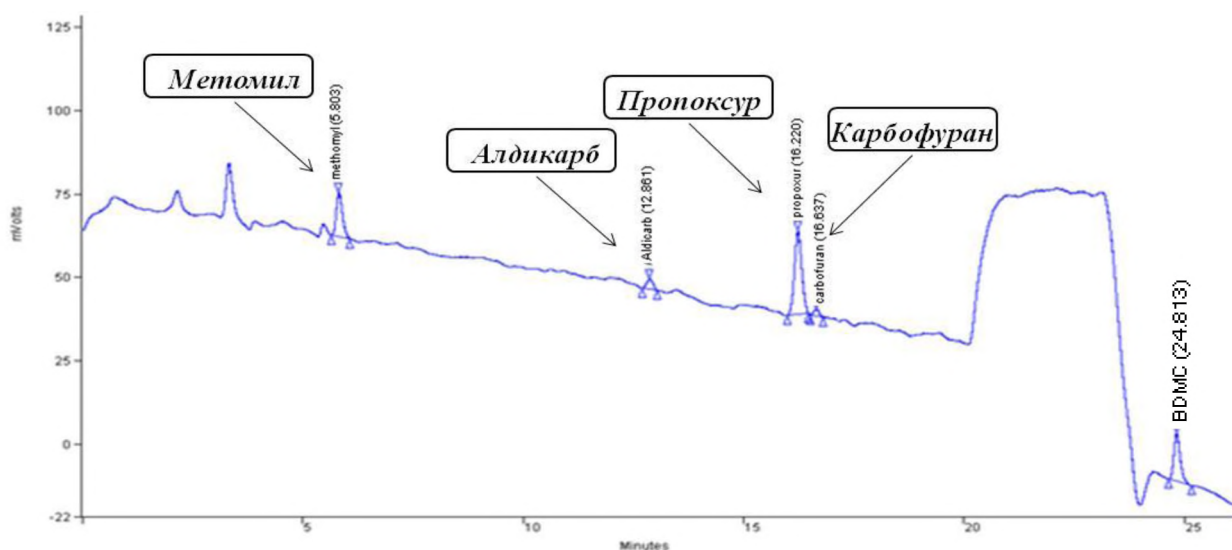
3. Валидиране на потвърдителен метод за анализ на N-метил карбамати в черен дроб чрез HPLC-FL със следколонна дериватизация

Използваните пробоподготовка и апаратура са описани подробно в частта Материали и методи.

Съединенията, за които методът е приложен са: *Метомил*, *Алдикарб*, *Пропоксур*, *Карбофуран*. Нивата на валидиране са същите както и при ФОС- 0,5; 1,0 и 1,5хПДК за всяко съединение.

- **Граница на количествено определяне**

ГКО беше определена като най-малката концентрация на аналит, която може да бъде количествено определена с приемливи стойности за истинност и прецизност. За да бъде определена ГКО, са разработени 20 броя проби от черен дроб с добавка на стандартен разтвор. Постигнато е много добро съотношение сигнал/шум и пиковите от хроматограмата могат да бъдат ясно отчетени (интегрирани). На Фигура 3 представена хроматограма от проба с добавка на N-метил карбамати в концентрация съответстваща на ГКО.



Фигура 3. Хроматограма от проба с добавка на N-метил карбамати в концентрация съответстваща на ГКО

Най-нисък отклик от детектора има при карбофуран, а най-висок при пропоксур. Преминаването през каскадата от реакции в модула за следколонна дериватизация, свежда до минимум паразитните пикове от матрицата. Пикове от матрични компоненти се наблюдават само в началото на хроматограмата- до 5-тата минута, което е преди времето на задържане на първия елуиран от хроматографската колоната пестицид- метомил. От там нататък шумът базовата линия е минимален, което прави възможно разпознаването и

интегрирането на много малки пикове, съответно ниски концентрации на пестицидите. Резултатите за ГКО са обобщени в Таблица 9.

Таблица 9. ГКО за N-метил карбамати в черен дроб чрез HPLC-FL

	<i>ПДК [µg/g]</i>	<i>ГКО [µg/g]</i>	<i>Аналитичен добив, [%], (n=20)</i>	<i>Вътрешно-лабораторна възпроизводимост RSD_{wR}, RSD[%], (n=20)</i>
<i>Метомил</i>	0.02	0.0012	93,2	8,1
<i>Алдикарб</i>	0.01	0.0004	91,1	7,3
<i>Пропоксур</i>	0.05	0.0022	104,1	9,8
<i>Карбофуран</i>	0.01	0.0002	93,7	6,3

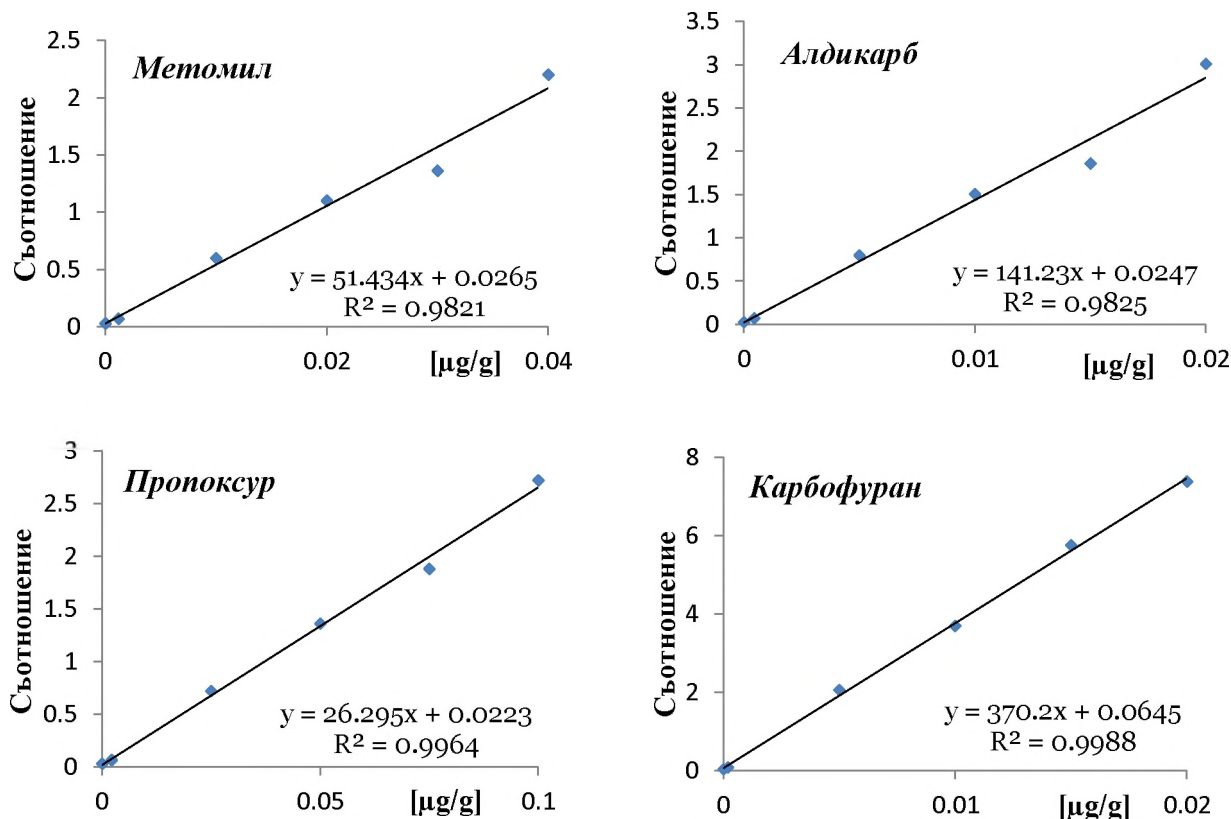
Критерий: ГКО трябва да бъде $\leq$ ПДК (според Документ No. SANTE 11945/2015)

Всички стойности за ГКО са под ПДК, каквото е изискването. Най-ниска е ГКО за карбофуран- 0,0002µg/g, което е 50 пъти по-малко от стойността, определена за ПДК. От получените резултати можем да заключим, че изборът на апаратура и оптимизацията на метода за инструментален анализ са успешни и е постигната много-добра чувствителност.

- **Линеен обхват**

Линейният обхват е определен като функция на концентрацията на съответния пестицид от съотношението на площта му спрямо вътрешния стандарт. Методът на калибриране е многоточкова калибрационна крива, построена с проби със стандартна добавка по метода на вътрешния стандарт. Използван е стандартен разтвор на смес от 4те карбамата и вътрешен стандарт в съответните концентрации: 0,0 (празна проба); ГКО; 0,5хПДК; 1,0хПДК; 1,5хПДК; 2,0хПДК.

Калибрационните криви са представени във Фигура 4.



Фигура 4. Калибрационни криви за N-метил карбамати в черен дроб чрез HPLC-FL.

Критерий: $R^2 \geq 0.95$

С всички пестициди се постига много добра линейност. Покрит е обхвата от концентрации от ГКО до 2,0xПДК с корелационен коефициент $R^2 \geq 0.95$. Данните за корелационен коефициент, работен обхват и време на заддържане са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Корелационен коефициент, работен обхват и време на заддържане за N-метил карбамати в черен дроб чрез HPLC-FL

	<i>Метомил</i>	<i>Алдикарб</i>	<i>Пропоксур</i>	<i>Карбофуран</i>	<i>BDMC (BC)</i>
<i>R</i>²	0.9821	0.9825	0.9964	0.9988	-
<i>Работен обхват</i>	0,0012-0,0400	0,0004-0,0200	0,0022-0,0500	0,0002-0,0200	-
<i>Rt [min]</i>	5.803	12.861	16.220	16.637	24.813

Въпреки близкото време на задържане, пиковите на пропоксур и карбофуран са разделени с достатъчно отстояние, за да могат да бъдат интегрирани. Разликата във времето на задържане е 0,4 минути, което е достатъчно за коректното им определяне.

- **Аналитичен добив, прецизност и неопределеност**

Обобщените данни от валидиране на метода са представени в Таблица 11.

Таблица 11. Аналитичен добив, повторяемост, възпроизводимост и неопределеност за N-метил карбамати в черен дроб чрез HPLC-FL

<i>Пестицид</i>	<i>Ниво [µg/g]</i>	<i>Аналитичен добив [%], (n=18)</i>	<i>Повторяемост RSDr [%], (n=6)</i>	<i>Вътрешно- лабораторна възпроизводимост RSD_{wR} [%], (n=18)</i>	<i>Неопределеност [%]</i>
<i>Метомил</i>	0,010	95,2	4,59	5,77	5,77
	0,020	101,1	5,13	5,34	5,18
	0,030	103,1	6,37	6,33	4,12
<i>Алдикаרב</i>	0,005	95,8	4,59	5,98	5,83
	0,010	105,3	7,66	7,23	6,18
	0,015	109,5	7,54	8,06	5,01
<i>Пропоксур</i>	0,025	84,8	4,52	6,07	5,78
	0,050	97,2	6,05	6,53	5,70
	0,075	109,2	4,98	6,37	4,42
<i>Карбофуран</i>	0,005	100,2	3,84	5,26	5,40
	0,010	104,3	8,18	7,83	6,23
	0,015	109,7	6,50	7,19	5,24

Определените критерии, на които трябва да отговарят резултатите според Документ No. SANTE 11945/2015 са:

Аналитичен добив: 70-120%

Прецизност (повторяемост и възпроизводимост): ≤ 20%

Неопределеност: ≤ 50%

Всички резултати покриват критерия за аналитичен добив. Колкото по-висока е концентрацията пестициди в пробата, толкова по-висок е аналитичния добив. Стойностите за отделните аналити варират от 85% до 110%.

Всички резултати за повторяемост покриват критерия от $\leq 20\%$. Най-ниска стойност се получава за карбофуан на първо валидационно ниво, което означава, че въпреки ниския отговор от детектора за този пестицид, измерванията са прецизни и при най-ниската концентрация. Най-висока е стойността при Алдикарб на ниво 2- 7,66%, което е далеч под максималната стойност от 20% и също е много добър резултат.

Всички резултати за възпроизводимост са под $\frac{1}{2}$ от критерия. Най-висока стойност е получена за алдикарб на валидационно ниво 3- 8,06%. Общо данните от повторяемост и възпроизводимост показват, че методът е много прецизен и промяната в условията не повлиява точността на получаваните резултати.

Всички получени стойности за неопределеност са значително под изискването от 50% и също напълно покриват критерия.

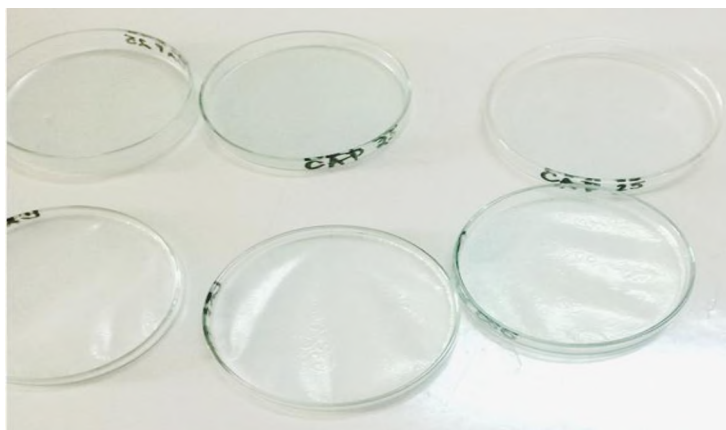
От всички данни за валидиране на метода, можем да обобщим, че той е точен, надежден и прецизен. Ефективността на пробоподготовката по модифицирания QuEChERS метод в комбинация с HPLC-FL със следколонна дериватизация, прави този метод много чувствителен и подходящ за прилагане като потвърдителен метод при съмнителни концентрации на карбамати, открити при скрининг анализ.

4. Синтез на мембрани по зол-гел метод. Иммобилизация на HRP (моделен ензим), ChO и AChE. Изследване за количество свързан ензим, оптимални условия и кинетични свойства

- Синтез и характеристика на получените носители**

За имобилизация са синтезирани мембрани съдържащи CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM. Те са синтезирани съгласно описаната методика в раздела Материали и Методи по зол-гел метод.

Получените мембрани са прозрачни, пластични, с висока механична стабилност, което позволява да бъдат формувани, съобразено с изискванията на експеримента за форма и размер. Мембраните могат да бъдат отливани под формата на тънки филми с контролируема дебелина. На Фигура 5 е представена снимка на синтезираните мембрани.



Фигура 5. CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM хибридни мембрани синтезирани по сол-гел метод

- **Изследване за количество свързан ензим върху синтезираните носители**

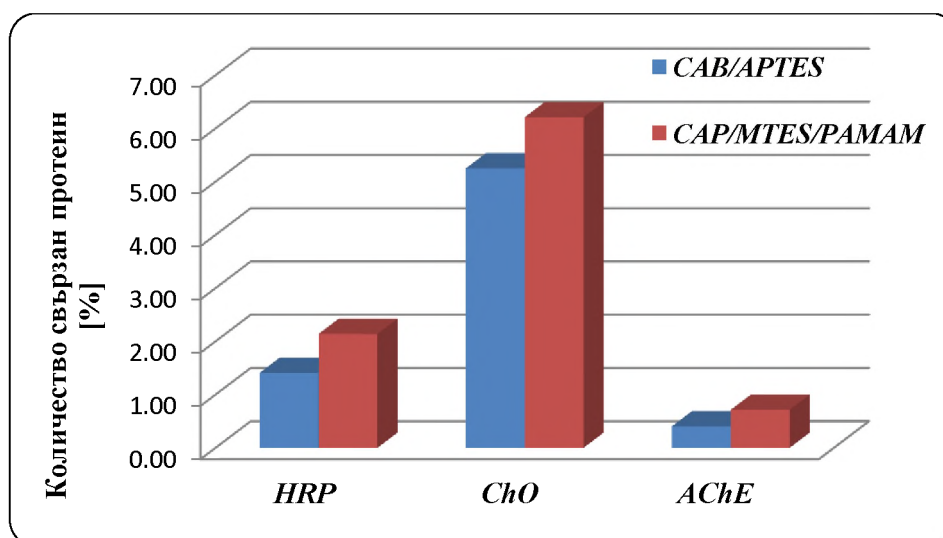
За да бъде определено количеството свързан ензим върху новополучените мембрани с ензимите, първо е проведено изследване върху количеството имобилизиран ензим върху двата вида мембрани по метода на Lowry. Определени са също и специфичната и относителна активност на свободните и имобилизирани върху CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM ензими. Резултатите от тези изследвания са обобщени в Таблица 12.

Таблица 12. Количество свързана HRP, ChO и AChE към CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

Ензим	Носител	Специфична активност [U/mg]	Относителна активност [%]	Свързан ензим [mg/g абс. сух носител]
HRP	свободна	43,6	-	-
	CAB/APTES	16,2	37,2	1,41
	CAP/MTES/PAMAM	28,7	65,8	2,14
ChO	свободна	16,3	-	-
	CAB/APTES	7,56	46,5	5,25
	CAP/MTES/PAMAM	10,8	66,4	6,21
AChE	свободна	226,9	-	-
	CAB/APTES	118,0	52,0	0,405
	CAP/MTES/PAMAM	152,8	67,3	0,715

При сравнение по отношение на специфична и относителна активност, носителът на основата на CAP/MTES/PAMAM показва по-голямо количество имобилизиран ензим,

което дава възможност за по-голямо количество трансформиран субстрат. Това вероятно се дължи на по-големия брой активни групи, включени в носителя чрез PAMAM дендримера. На Фигура 6 графично са представени количествата свързани HRP, ChO и AChE към двата вида носители.



Фигура 6. Графично представяне на количествата свързани HRP, ChO и AChE към CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

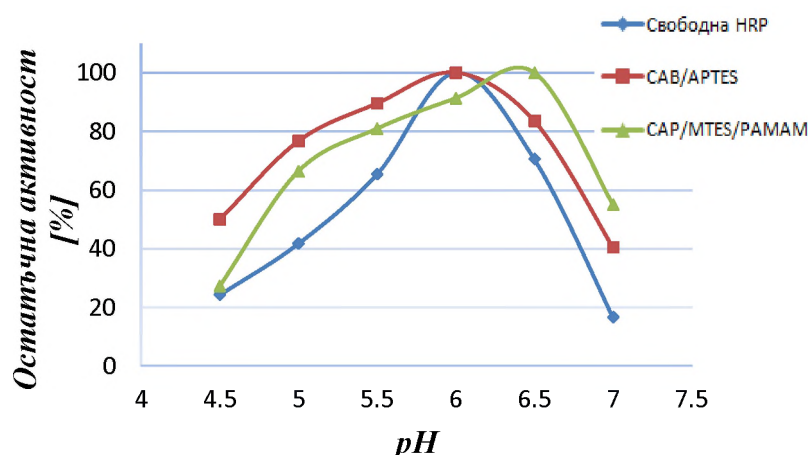
От представените на фигурата данни, може да се обобщи, че върху мембраните, съдържащи CAP/MTES/PAMAM, е имобилизирано по-голямо количество ензим, в сравнение с мембраните, съдържащи CAB/APTES. Тези резултати се повтарят и с трите използвани за имобилизация ензими- HRP, ChO и AChE. Екип от ХТМУ, докладва резултати от сравнение кинетичните параметри на липоксигеназа, имобилизирана върху различни хибридни мембрани. В тяхната работа, най-голямо количество свързан ензим се отчита при носителите, съдържащи CAP/MTES/PAMAM, като се наблюдава и по-висока специфична активност (Semerdzhieva et al., 2015).

- **Изследване на оптималните рН и температура за свободни и имобилизирани HRP, ChO и AChE към CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM**

- *рН и температурен оптимум за HRP (моделен ензим)*

Изследването е проведено с моделен ензим– пероксидаза, изолирана от хрян. След предварително окисление на въглехидратните остатъци е извършена имобилизация. рН

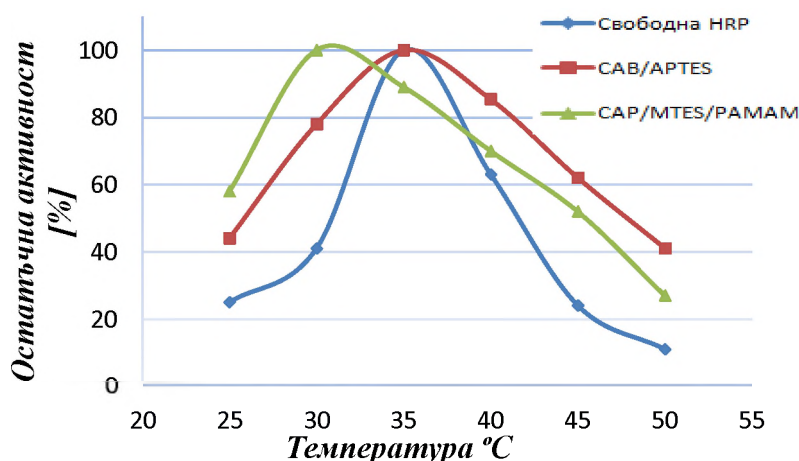
оптимумите на имобилизирана и свободна HRP са определени в диапазон 4,5 –7,0. На Фигура 7 са представени рН профилите за свободна и имобилизирана пероксидаза.



Фигура 7. рН профил на свободна и имобилизирана HRP върху CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

рН оптимумът за свободна HRP е определен при рН=6, което съвпада с техническата информация, предоставена от производителя (Sigma-Aldrich). За мембрана, съдържаща CAB/APTES се наблюдава типичното поведение за имобилизирани ензими - разширяване на рН профила и относително висока остатъчна активност и при по-ниски стойности на рН и отчетен оптимум при рН=6,5. За мембраната, съдържаща CAP/MTES/PAMAM отново се наблюдава отместване на оптимума до рН=6,5, като профилът на кривата е идентичен на този CAB.

Температурният оптимум на свободния и свързан ензим са определени в диапазон 25° – 65° С. На Фигура 8 са представени температурните профили на свободния и имобилизираните ензим.



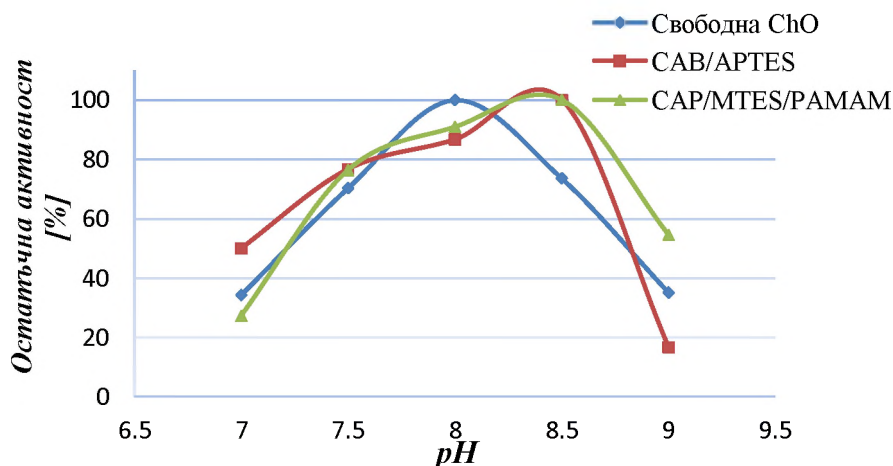
Фигура 8. Температурен профил на свободна и имобилизирана HRP върху CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

Оптимумът за свободна HRP е определен при $t = 35^{\circ}\text{C}$. Идентична е стойността за оптимума, получен при имобилизирана HRP върху CAB/APTES- 35°C , но се наблюдава по-широк профил на кривата. За матриците, съдържащи CAP/MTES/PAMAM, определеният температурен оптимум е 30°C , но при 35°C също се наблюдава висока остатъчна активност- 89%.

Оптималните условия са обобщени в Таблица 13.

○ *pH и температурен оптимум за ChO*

За втори моделен ензим е избрана холиноксидаза. Изследвани са pH оптимумите за свободна ChO и за имобилизирана върху двата вида мембрани. Изследванията са проведени в pH диапазон от 7,0 до 9,0. Получените pH профили са представени на Фигура 9.

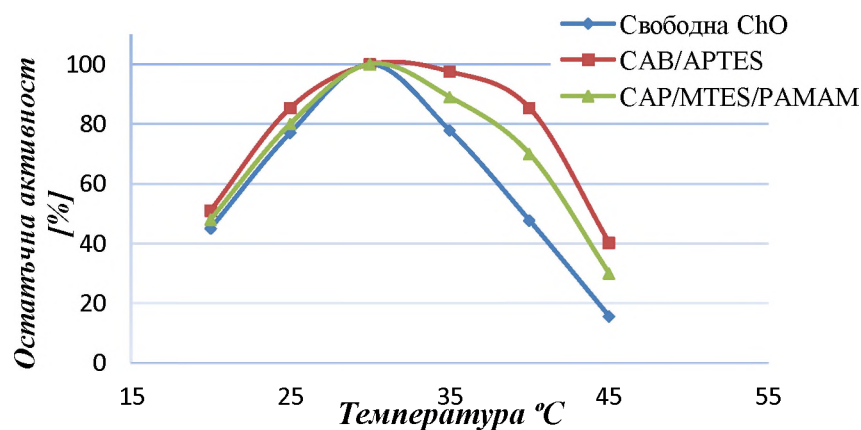


Фигура 9. pH профил на свободна и имобилизирана ChO върху CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

Оптимумът за свободна ChO е определен при $\text{pH}=8,0$, което съвпада с литературните източници (Некmat A. et al., 2008). При двата вида матрици с имобилизирана ChO се наблюдават почти напълно припокриващи се стойности за остатъчна активност в диапазона 7,5-8,5 с отместване на pH оптимума към $\text{pH}=8,5$.

Температурният оптимум на свободния и свързан ензим са определени в диапазон $25^{\circ} - 50^{\circ}\text{C}$. На

Фигура 10 са представени съответните профили.



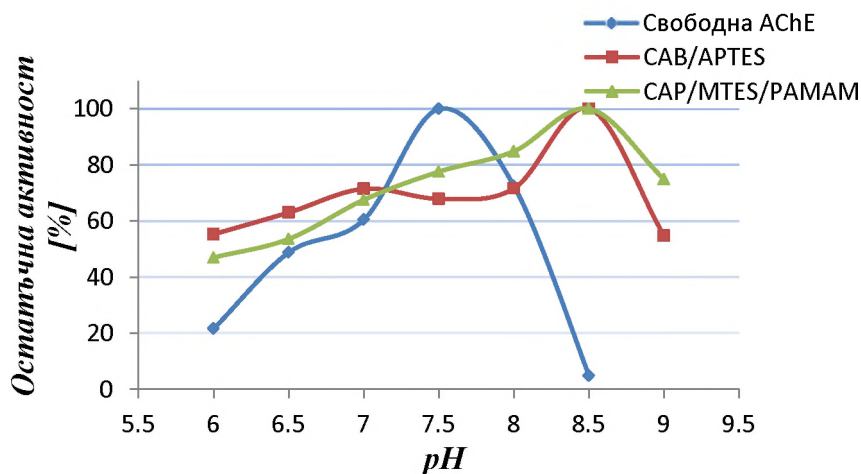
Фигура 10. Температурен профил на свободна и имобилизирана ChO върху CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

Данните от графиката показват, че както свободната, така и имобилизираните ChO имат идентични стойност на температурен оптимум при 30°C. Прави впечатление също, че стойностите на остатъчна активност се припокриват от 20 до 30°C за свободен и имобилизиран ензим. Носителят, съдържащ CAB/APTES, показва висока остатъчна активност в широк температурен интервал- от 25 до 40°C.

Оптималните условия са обобщени в Таблица 13.

○ рН и температурен оптимум за AChE

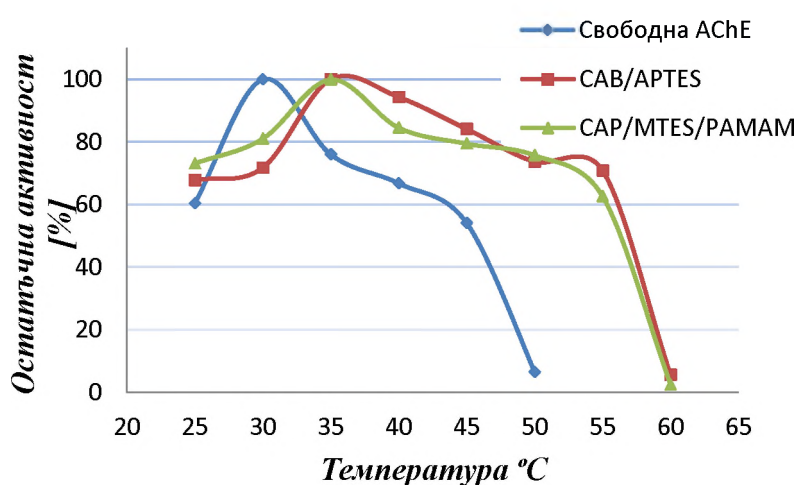
На Фигура 11 са представени резултатите, получени при определяне на рН оптимум за свободен и имобилизиран ензим, измерени в диапазона рН= 6 до 9.



Фигура 11. рН профил на свободна и имобилизирана AChE върху CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

Прави впечатление, че профилите на имобилизирани ензими са сходни по между си. При свободния ензим се наблюдава ясно изразен пик при $pH=7,5$, докато при имобилизирания максимумът е при $pH=8,5$, където остатъчната активност на свободния ензим е едва 4,8%. Това прави подходящо прилагането на имобилизацията, за работа в среда, със стойности на pH в алкалната област, които са не специфични за свободния ензим.

Температурният оптимум на свободния и свързан ензим са определени в диапазон $25^{\circ} - 60^{\circ} C$ и представени на Фигура 12.



Фигура 12. Температурен профил на свободна и имобилизирана AChE върху CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM

Температурният оптимум за свободния ензим е определен при $30^{\circ}C$, а за имобилизирания при $35^{\circ}C$ и с двата вида мембрани. Отново имаме по-широк профил, когато AChE е имобилизирана върху хибридни мембрани.

На Таблица 13 са представени обобщените данни за оптималните условия за извършване на ензимно-субстратната реакция за свободни и свързани пероксидаза, холиноксидаза и ацетилхолинестераза към хибридни мембрани съдържащи CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM.

Таблица 13. Оптимални условия за извършване на ензимно-субстратната реакция за свободни и имобилизирани HRP, ChO и AChE към CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM ензими

Ензим	Носител	pH оптимум	Темп. Оптимум [°C]
HRP	свободна	6,0	35
	CAB/APTES	6,0	35
	CAP/MTES/PAMAM	6,5	30
ChO	свободна	8,0	30
	CAB/APTES	8,5	30
	CAP/MTES/PAMAM	8,5	30
AChE	свободна	7,5	30
	CAB/APTES	8,5	35
	CAP/MTES/PAMAM	8,5	35

При имобилизация на HRP върху CAB/APTES носител, pH и температурният оптимум са идентични с тези за свободния ензим. Същевременно не се наблюдава повишаване на температурния оптимум за имобилизирания ензим, което показва, че матрицата не оказва съществено влияние за повишаване устойчивостта на ензима при температурни стойности, различни от неговия оптимум.

Идентични са резултатите, получени при имобилизация на ChO, където температурният оптимум при имобилизирания ензим не се променя спрямо стойностите на свободния ензим, а отместването при pH оптимума е със стойности от 0,5 спрямо този на свободния ензим.

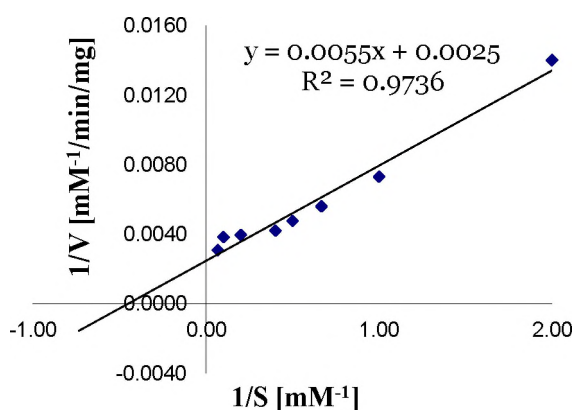
Вероятната причина за несъщественото отместване на температурния оптимум при имобилизирания ензим, се дължи на спецификата на носителя. Синтезираните мембрани са гладки, слабо порьозни, поради което ензимът се намира изцяло на повърхността на носителя, а не прониква във вътрешността му. По този начин матрицата не може да окаже съществен защитен механизъм върху ензима при третирането му с различни от оптималните pH и температура.

Също така, с изключение на резултатите, получени за pH оптимума при имобилизация на AChE, не се наблюдава съществено отместване в стойностите спрямо свободния ензим.

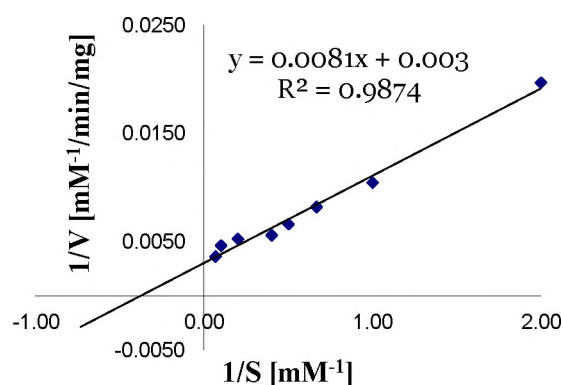
Това е показателно за неутралния характер на носителя, което го прави подходящ за имобилизация на различни ензими, а вероятно и клетки.

- Изследване кинетичните параметри на свободна и имобилизирана AChE към CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM**

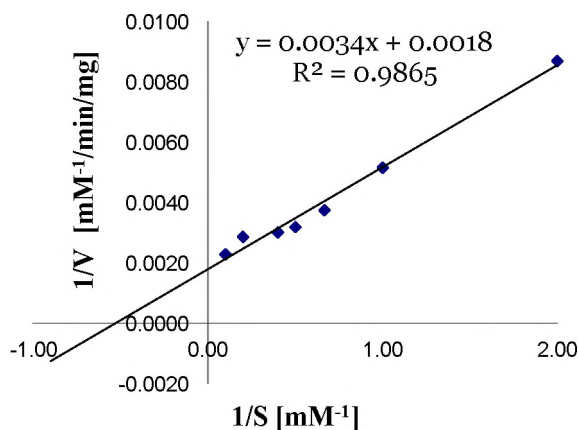
Изследвани са и кинетичните параметри за свободна и имобилизирана AChE върху двата вида мембрани спрямо субстрат ацетилхолин. Графичното изобразяване на данните е представено в координати на Лайнуивър-Бърк на Фигура 13.



*AChE имобилизирана върху
CAP/MTES/PAMAM*



AChE имобилизирана върху CAB/APTES



Свободна AChE

Фигура 13. Графично представяне на кинетичните параметри на свободна и имобилизирана AChE в координати на Лайнуивър-Бърк

В Таблица 14 са обобщени кинетичните параметри на свободната и имобилизирана AChE.

Таблица 14. Кинетични свойства на свободна и имобилизирана AChE, спрямо субстрат Ацетилхолин

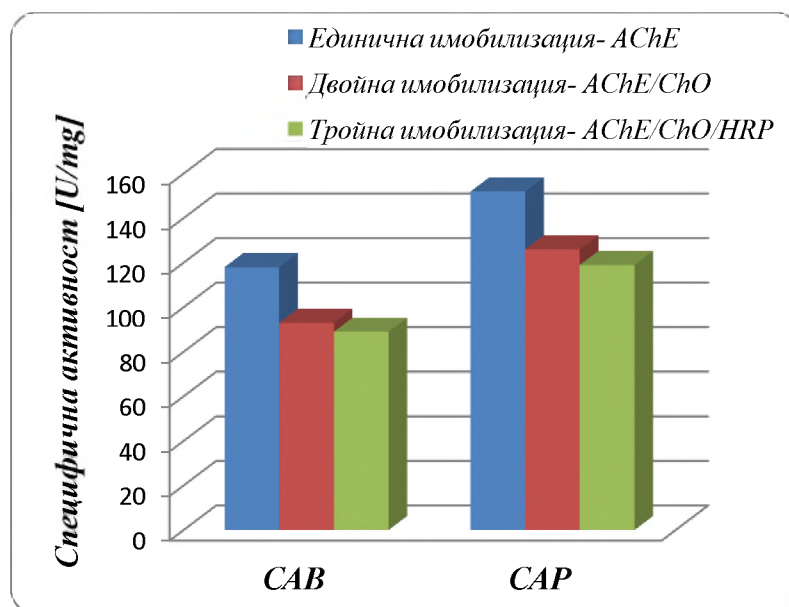
Носител AChE	Km [mM]	Vmax [mM/min/mg]	R ²
свободна	1.9	555.6	0.9865
CAB/APTES	2.7	333.3	0.9874
CAP/MTES/PAMAM	2.2	400.0	0.9736

При мембраните, на база CAP/MTES/PAMAM, стойността на Km е 1,9mM, което показва по-голямо сродство на ензима към субстрата, в сравнение с имобилизирания ензим върху мембраните, съдържащи CAB/APTES, където Km е 2,7mM. Стойността на Vmax при CAP/MTES/PAMAM носителите също е по-висока- 400,0mM/min/mg, докато при CAB/APTES Vmax е 333,3mM/min/mg.

- **Едновременна имобилизация на AChE с ChO и HRP**

Понякога при конструирането на биосензори се прилагат двуензимни системи. Най-често прилаганата при анализ на пестициди е едновременната имобилизация на AChE и ChO (Yotova L., 2012; Upadhyay S., 2009; Thévenot D., 1999) или мултиензимни системи с имобилизирани повече от два ензима- AChE, ChO и HRP (Karousos N., 2002). С прилагането на мултиензимните системи може да се конструира биосензор, работещ на принципа на каскадна реакция, в която получените продукти след основната E-S реакция е субстрат за следваща реакция. Това дава възможност детекцията да бъде извършена с различни видове устройства, като се цели най-добра чувствителност.

За да се определи кога е достигната най-висока активност на AChE, ензимът е имобилизиран самостоятелно, заедно с ChO и в тройна система едновременно с ChO и HRP. Имобилизациите са направени върху двата новополучени носителя за сравнение на ефективността- CAB/APTES и CAP/MTES/PAMAM. При трите вида имобилизация е изследвана активността на целевия ензим AChE. Данните са представени графично на Фигура 14.



Фигура 14. Активност на AChE, имобилизирана самостоятелно, в дву-ензимна система с ChO и в три-ензимна система с ChO и HRP

Резултатите от графиката показват, че най-висока специфична активност за ензима AChE, се постига при самостоятелната му имобилизация. Случаите, когато се прилагат мулти-ензимни системи, редица параметри трябва да бъдат оптимизирани, което е значително по-сложен процес, в сравнение със система работеща само с един ензим. Освен това, активността на основния ензим (в случая AChE) намалява, с увеличаване броя ензими, имобилизирани върху мембраната. По-ниската активност е условие, предполагащо и по-ниска реакционна способност и съответно по-ниска чувствителност при мулти-ензимните системи.

5. Конструирание на биосензор за анализ на пестициди. Оптимизиране на условията и параметрите.

- Избор на пестициди и матрица за разработване на биосензорен метод за анализ

При разработване на метод за анализ на пестициди в храни чрез биосензор, в настоящата дисертация са избрани карбамати (алдикарб, метомил, пропоксур и карбофуран) и фосфорорганични пестициди (диазинон, пиримифос-метил, паратион и хлорпирифос-метил) в матрица черен дроб.

- **Избор на детекция**

Според резултатите, получени от Mahmoud N. в дисертационния и труд, оптичният биосензор, измерващ изменението в абсорбцията, показва по-добра възпроизводимост на резултатите, в сравнение с оптичен биосензор на основата на измерване консумацията на кислород с оптични влакна (Mahmoud N, Dissertat UCTM, 2012). Също така, при този метод на анализ, не е необходимо конструиране на мулти-ензимна система, което дава възможност за регистриране на по-ниски инхибиторни концентрации, а от там и по-висока чувствителност на биосензора.

При конструирането на оптичен биосензор за анализ на инхибитори на AChE, в настоящата работа се спряхме именно на измерване чрез съпоставка на абсорбцията при инхибиран и не инхибиран ензим AChE. Измерванията са извършени спектрофотометрично при дължина на вълната 540nm.

- **Избор на мембрани за имобилизация**

Проведени са експерименти с два вида хибридни мембрани- съдържащи CAP/MTES/PAMAM и съдържащи CAB/APTES. Изследвани са основните параметри, които характеризират един биосензор- линейен диапазон по отношение на субстрата (ацетилхолин), време за отговор, време живот на сензора и възпроизводимост. Данните са представени в Таблица 15.

Таблица 15. Сравнение на оптичен биосензор с различни видове носители

<i>Вид хибридна мембрана с имобилизирана AChE</i>	<i>Линеен диапазон за ацетилхолин [Mx10⁻³]</i>	<i>Време за отговор [s]</i>	<i>Време-живот на сензора [Дни]</i>	<i>Възпроизводимост [%]</i>
<i>CAP/MTES/PAMAM</i>	0,5-20	120	128	2,4
<i>CAB/APTES</i>	0,5-15	120	116	3,6

Линейният диапазон на работа на биосензора с мембрана на основата на CAP/MTES/PAMAM е по-широк- между 0,5-20.10⁻³M. Имобилизирани върху тези мембрани, ензимът запазва активността си за по-дълго време. Наблюдава се и по-добра възпроизводимост на резултатите при CAP/MTES/PAMAM мембраните в сравнение с тези, съдържащи CAB/APTES.

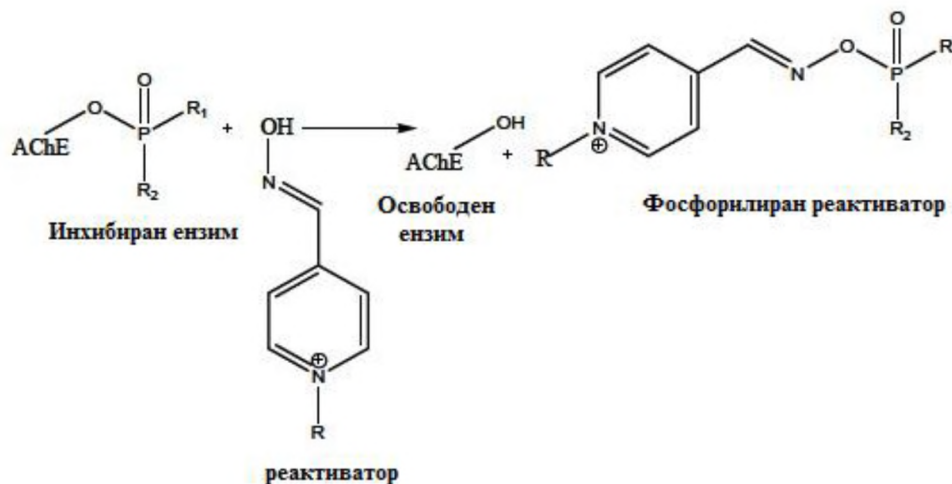
Проведените експерименти и обобщените резултати показват, че всички изследвани ензими (HRP, ChO и AChE) са имобилизирани в най-голямо количество върху мембраната на основата на CAP/MTES/PAMAM.

В резултат на това, и трите изследвани ензима притежават по-висока специфична и относителна активност, както и по-добри каталитични параметри в сравнение с ензимите, имобилизирани върху носителя на основата на CAB/APTES.

За валидирането на метода за анализ на пестициди е приложен носителът, съдържащ CAP/MTES/PAMAM.

• Възстановяване на ензима

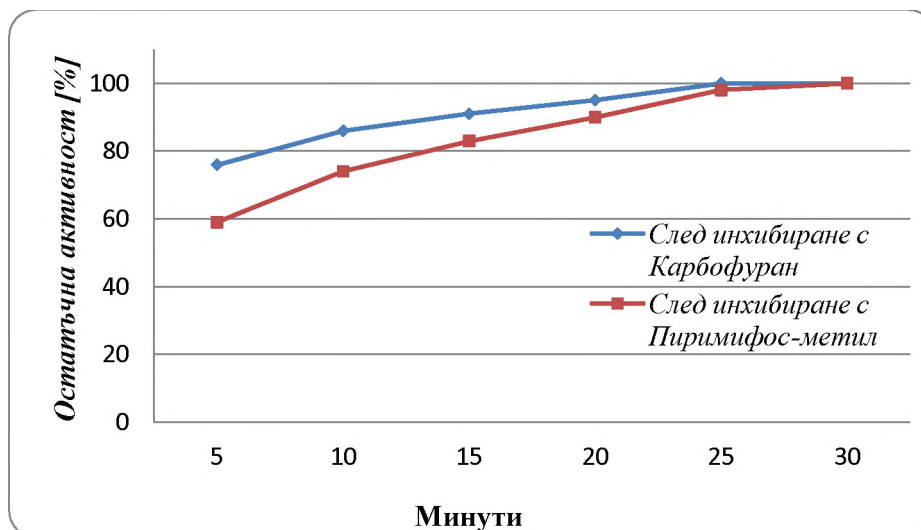
Карбамоил-AChE комплекс се дисоциира по-бързо от фосфорил-AChE комплекс, който се образува при реакцията на ФОС с AChE. Механизмът за реактивиране на AChE се базира на нуклеофилна атака от страна на реактиватора- хидроксииминометил (оксим) към оргонофосфорната група (ОФ) на фосфорилираната AChE. Ковалентната връзка между ОФ и Ser от AChE се разкъсва, образува се комплекс между реактиватора и ФОС и ензимът се освобождава (Фигура 15) (Eyer et al., 2003; Bajgar et al., 2007).



Фигура 15. Реакция на реактивиране на инхибирана AChE с оксим

Реактиваторът, използван в настоящата работа, е пиридин-2-алдоксим метохлорид (пралидоксим или 2-ПАМ), който е най-широко използван. Основното му предназначение е да понижава степента на отравяне в нервната система (Worek et al., 2007).

Времето, необходимо за възстановяване на ензима, е определено експериментално (Фигура 16), като в рутинната работа се препоръчва поне 15 минути реактивиране след работен цикъл.

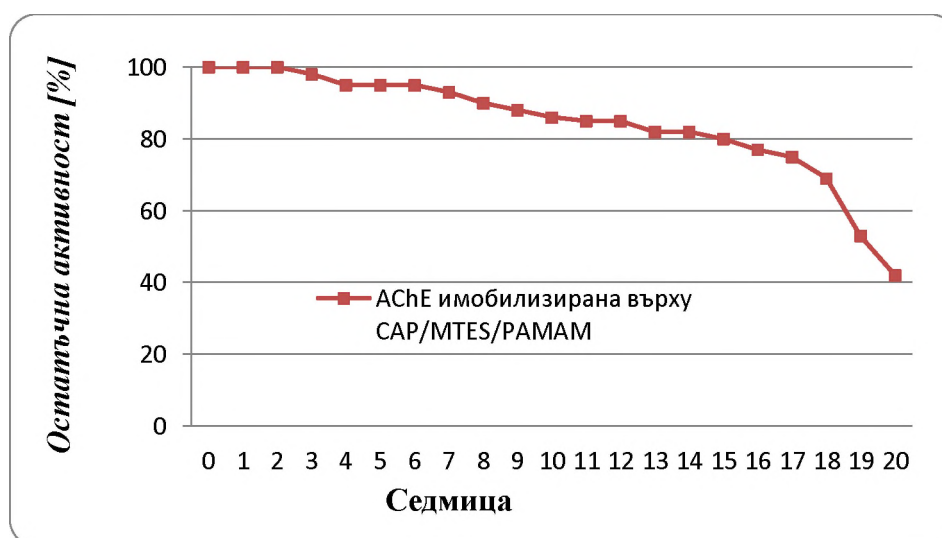


Фигура 16. Степен на възстановяване на AChE с 2-ПАМ

Ензимът се реактивира по-бавно след като е бил инхибиран от ФОС, но и в двата случая след 15-тата минута е възстановил активността си в достатъчна степен, за да може да встъпи в нова реакция със субстрата.

- **Време живот на биосензора**

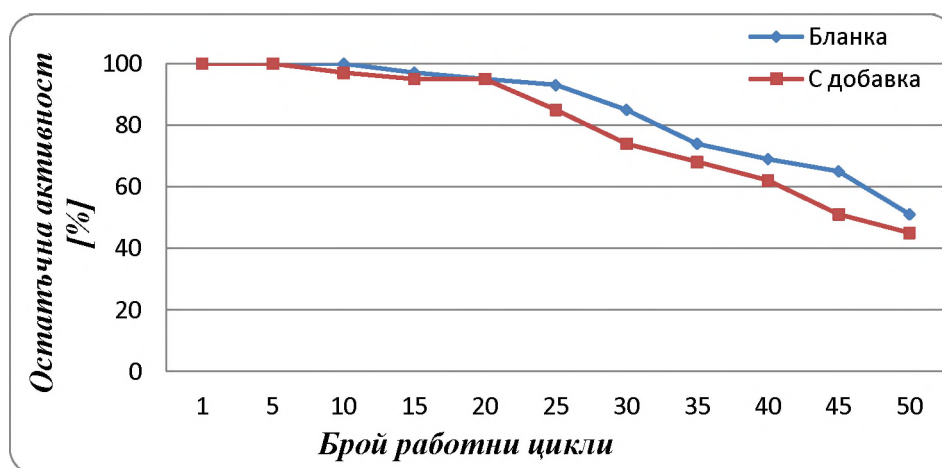
Изследван е също време животът на биосензора, като CAP/MTES/PAMAM носителите с имобилизирана AChE са съхранявани при 4°C в буферен разтвор. Всяка седмица е измервана остатъчната активност. Резултатите са представени на Фигура 17.



Фигура 17. Изследване време-живота на имобилизирана AChE върху CAP/MTES/PAMAM

До 7-мата седмица (~50дни) остатъчната активност се запазва до 90% спрямо първоначалната. На 19-тата седмица (133-тия ден), остатъчната активност достига 50%, след което понижението продължава.

Друг важен за рутинната работа параметър, свързан с активността на имобилизиранения ензим, е броят работни цикли с реални проби, през които може да премине AChE, запазвайки активността си. Направено е изследване на броя последователни работни цикли при проби от черен дроб с добавен инхибитор и без добавен инхибитор (бланки). Резултатите са представени на Фигура 18.



Фигура 18. Изследване на броя последователни работни цикли на оптичен биосензор при проби от черен дроб

До 20-тия цикъл, ензимът запазва високи стойности на остатъчна активност (над 90%). След това при пробите с добавен инхибитор, каквито се ползват за построяване на калибрационна крива, се отчита по-бърза загуба на активност от тези, при които не е добавян инхибитор.

- **Избор на методика за определяне на ензимна активност**

Изборът на методика за определяне на ензимната активност е базирана основно на налични литературни данни в областта. Най-разпространеният подход е метода на Елман, при който се използва алтернативен субстрат- ацетилтиохолин и 5,5'-дителио-бис-2-нитробензоена киселина (DTNB). Продуктът на реакцията е 5-тио-2-нитробензоат, който има жълт цвят, дължащ се на изместването на електрони към серния атом. Методът е

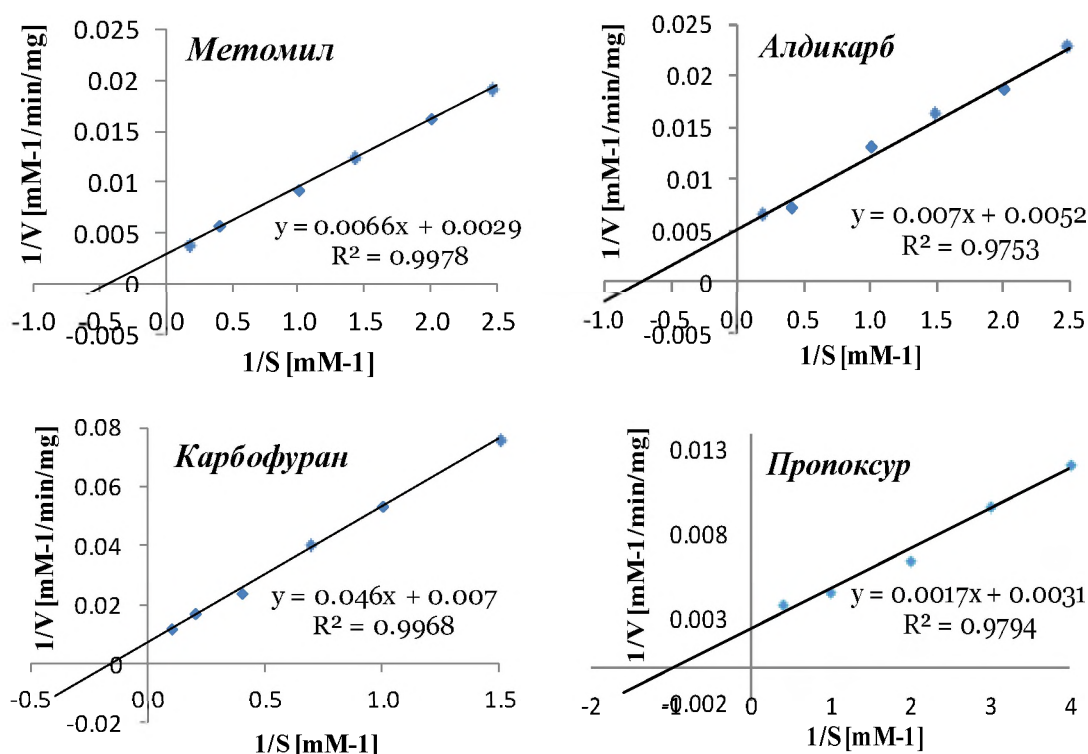
разработен от Ellman и екип още през 1960г. (Ellman et al., 1961) и все още се използва с различни модификации (Pohanka et al., 2008). Методиката на Елман е ограничена особено по отношение на анализирането на антидоти срещу фосфорорганични AChE инхибитори или измерването активността на AChE при проби, съдържащи такива съединения. Антидоти, съдържащи реактивни оксимни групи, разрушават DTNB и създават фалшиво положителни резултати. Този процес се нарича оксимолиза (Sinko et al., 2007).

Тъй като обект на настоящата работа са и фосфорорганичните пестициди, това налага използването на реактиватор на ензима от групата на оксимите (2-ПАМ). Поради това, в настоящата работа е използвана методиката на Worthington, като подход при определяне на ензимната активност (подробно описание в частта Материали и методи).

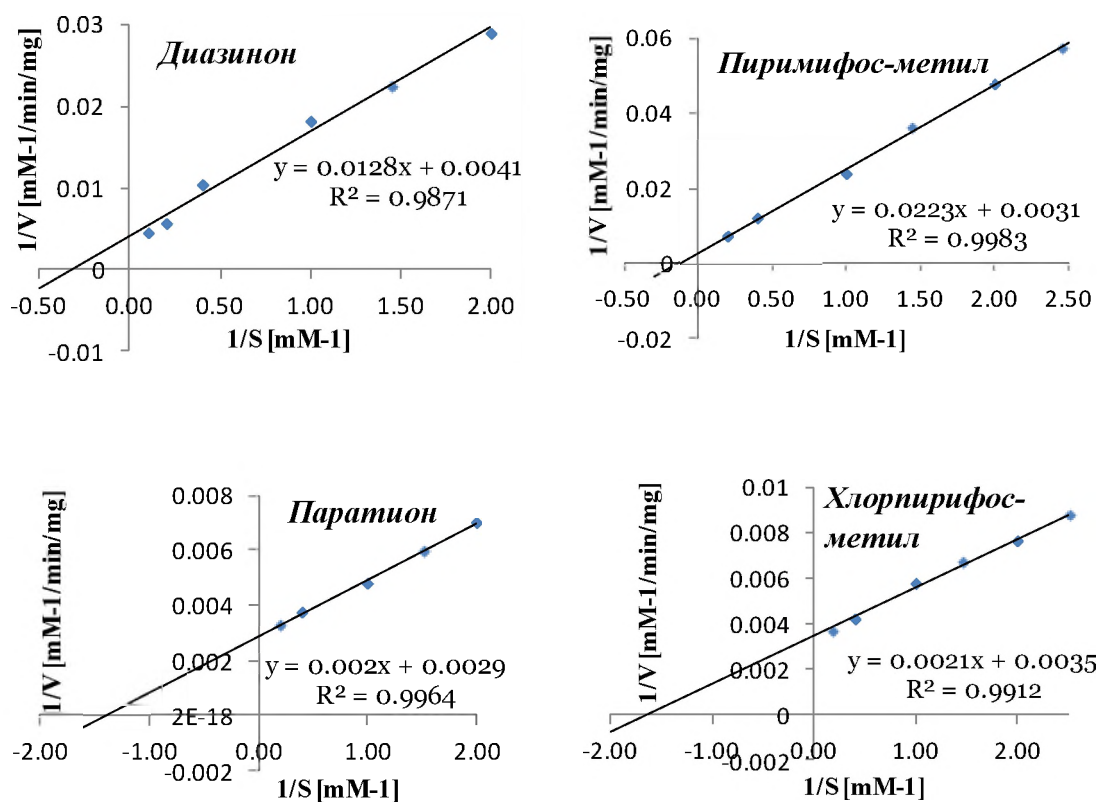
• Влияние на инхибиторите върху кинетичните параметри на AChE

За всеки отделен представител са определени инхибиторна константа K_i и кинетичните параметри - $V_{\max}^{\text{app}}$ и K_m^{app} . Експериментите са проведени със стандартни разтвори, приготвени от сертифицирани референтни материали на съответните пестициди

На Фигура 19 и Фигура 20 са представени данните в координати на Лайнуивър-Бърк, обобщените резултати са представени в Таблица 16.



Фигура 19. Влияние на карбаматите върху кинетичните параметри на имобилизирана AChE



Фигура 20. Влияние на ФОС върху кинетичните параметри на имобилизирана AChE

Обобщените данни за кинетичните параметри в присъствие на инхибитор са обобщени в Таблица 16.

Таблица 16. Кинетични параметри в присъствие на инхибитор

	$V_{\max}^{\text{app}}$ [mM/min/mg]	K_m^{app} [mM]	$V_{\max}^{\text{app}} / K_m^{\text{app}}$	K_i [mM]
Метомил	344.8	2.27	151.5	4
Алдикарб	384.6	1.65	232.5	6.4
Пропоксур	322.6	0.55	588.2	25.1
Карбофуран	147.0	3.35	43.8	2.5
Хлорпирифос-метил	285.7	0.6	476	6.8
Паратион	344.8	0.7	500	16.5
Пиримифос-метил	322.6	7.2	44.8	1
Диазинон	243.9	3.1	78.1	3.1

Най-ниската стойност на K_m^{app} е получена за пропоксур, което показва, че инхибиторът не оказва съществено влияние върху ензимната активност. Най-високи стойности на K_m^{app} за определени за карбофуран - 3,35mM и диазинон- 3,10mM. Резултатите за K_i при третиране с пиримифос-метил показват най-висока инхибиторна активност спрямо AChE при минимални концентрации на пестицида.

6. Валидиране на скрининг метод за анализ на пестициди в черен дроб чрез оптичен биосензор

За да бъде валидиран биосензорният тест, са анализирани по 54 проби за всеки инхибитор, разпределени в по 3 валидационни нива. Всички проби са предварително анализирани с хроматографски методи, валидирани в настоящата работа, с цел потвърждение на резултатите. Пробоподготовката е подробно описана в частта Материали и методи.

Биоаналитичният метод, който е разработен в настоящия дисертационен труд, е предназначен за анализ на остатъчни количества от пестициди в храни, а не с токсикологични цели. Поради тази причина той следва да отговаря на изискванията, определени от Европейския съюз. Освен параметрите, свързани с достоверността на резултатите- прецизност, повторяемост, възпроизводимост, неопределеност и пр., от изключително значение в практическо отношение е чувствителността на метода или границата на количествено определяне (ГКО) на пестицидите в пробата.

В Регламент (ЕС) 396/2005 са определени пределно допустимите концентрации за остатъчни количества от пестициди по вид продукт. ПДК за матрица черен дроб и пестицидите, обект на изследване в дисертационния труд, са представени в Таблица 17.

Таблица 17. ПДК за пестициди в черен дроб според Регл. 396/2005 и съответстващите стойности преизчислени в $[M \times 10^{-12}/g]$

	ПДК за черен дроб	
	$[\mu g/g]$	$[M \times 10^{-12}/g]$
<i>Метомил</i>	0.02	123
<i>Алдикаרב</i>	0.01	52.6
<i>Пропоксур</i>	0.05	239
<i>Карбофуран</i>	0.01	45.2
<i>Хлорпирифос-метил</i>	0.05	142.6
<i>Паратион</i>	0.05	171.7
<i>Пиримифос-метил</i>	0.05	163.7
<i>Диазинон</i>	0.03	98.6

В документ SANTE/11945/2015, са определени параметрите, на които трябва да отговарят валидираните аналитичните методи за изпитване на храни за пестициди. Той е съобразен и с изискванията на стандарт ISO 17025, по който задължително работят лабораториите, отговорни за официалния контрол в страните членки на ЕС. Според този документ ГКО е най-ниското ниво на съдържание на пестициди, което може да бъде определено, покривайки критериите за истинност и прецизност и трябва да бъде $\leq$ ПДК.

Определени са и нивата на валидиране, като най-ниското ниво трябва да бъде ГКО или границата на докладване (ГД). ГД е стойност, под която е позволено да не се изчислява точен резултат за остатъчни количества от пестициди. Тази стойност трябва да бъде не по-ниска от ГКО и не по-висока от ПДК. Необходимо е най-малко още едно, по-високо ниво на валидиране. В настоящата работа са определени три валидационни нива, съобразени с ПДК за всяко съединение:

Валидационно ниво 1: 0,5xПДК

Валидационно ниво 2: 1,0xПДК

Валидационно ниво 3: 1,5xПДК

Тъй като биосензорът не дава информация за количеството на всеки отделен пестицид в пробата, а за общото им съдържание- като сума, разработваният метод е скрининг. За количествено определяне (потвърдителен метод) при съмнителни резултати, се използват разработените хроматографски методи.

Според изискванията, вътрешно-лабораторните методи трябва да предоставят ясни доказателства, че методът е подходящ за целта, с която се използва. Валидиране на методите се изисква и от акредитиращите органи. Необходимо е да се подсигури надежден начин за постоянно следене на параметрите на метода в рутинната работа (качествен контрол).

В процеса на валидиране трябва да се оценят следните параметри: линейност, аналитичен добив (истинност), прецизност (повторяемост и възпроизводимост), ГКО и неопределеност за всяко валидационно ниво.

- **Граница на количествено определяне**

ГКО беше определена като най-малката концентрация на аналит, която може да бъде количествено определена с приемливи стойности за истинност и прецизност. За да бъде определена ГКО, са разработени 20 броя проби от черен дроб с добавка на стандартен разтвор. Резултатите са представени в Таблица 18.

Таблица 18. ГКО за оптичен биосензор

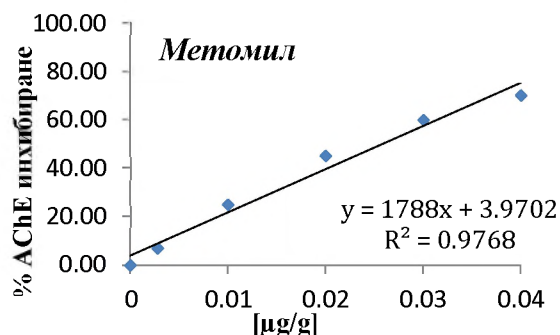
	<i>ПДК [µg/g]</i>	<i>ГКО [µg/g]</i>	<i>Аналитичен добив, [%], (n=20)</i>	<i>Вътрешно-лабораторна възпроизводимост RSD_{wR}, RSD[%], (n=20)</i>
<i>Метомил</i>	0.02	0.0028	81,4	13,1
<i>Алдикаרב</i>	0.01	0.0019	85,3	12,8
<i>Пропоксур</i>	0.05	0.0059	83,4	12,4
<i>Карбофуран</i>	0.01	0.0020	87,9	10,7
<i>Хлорпирифос-метил</i>	0.05	0.0061	73,3	8,1
<i>Паратион</i>	0.05	0.0053	76,1	9,3
<i>Пиримифос-метил</i>	0.05	0.0045	75,0	7,5
<i>Диазинон</i>	0.03	0.0038	73,7	6,9

Критерий: Стойността на ГКО трябва да бъде $\leq$ ПДК (според SANTE 11945/2015)

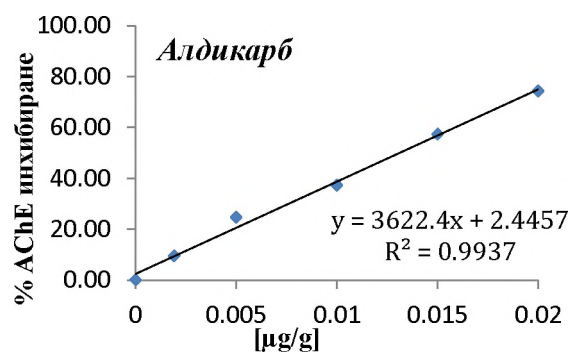
При всички инхибитори ГКО е приблизително 10 пъти по-ниска от ПДК, което напълно покрива изискванията. Schulze и екип, докладват ГКО за Параоксон по-ниска от 0,005µg/g, измерена чрез AChE биосензор в детски храни, което е съпоставимо с получените резултати (Schulze et al., 2002). Двете най-високи стойност за ГКО са получени при пропоксур и паратион. Това се дължи на по-ниската степен на инхибиране на ензима от тези пестициди, което се потвърждава от стойностите, получени за инхибиторната константа K_i - съответно 25,1mM и 16,5mM, които са най-високи при тези съединения. Въпреки това, ГКО и за двата инхибитора са почти 10 пъти по-ниски от стойностите на ПДК, което удовлетворява изискванията на документа.

- **Линеен обхват**

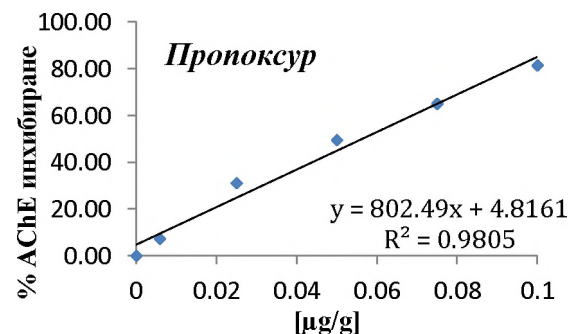
Линейният обхват е определен като функция на концентрацията на съответния пестицид от процента инхибиране на AChE. Зависимостта е построена като са използвани проби с добавен стандартен разтвор на всяко съединение по отделно, в 6 точки: 0,0; ГКО; 0,5хПДК; 1,0хПДК; 1,5хПДК; 2,0хПДК. Калибрационните криви са представени на Фигура 21.



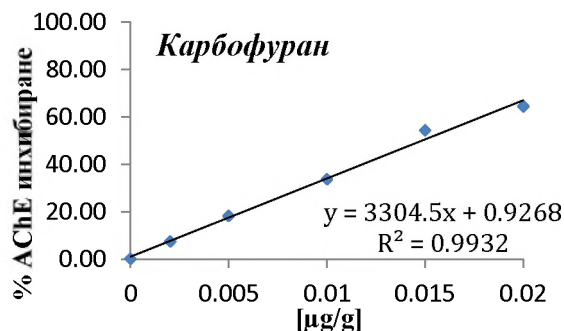
% AChE инхибиране	Ниво	[µg/g]	[Mx10 ⁻¹² /g]
0.00	0,0	0	0
7.02	ГКО	0.0028	17.2619
25.06	0,5хПДК	0.010	61.50
45.27	1,0хПДК	0.020	123.00
60.07	1,5хПДК	0.030	184.50
70.21	2,0хПДК	0.040	246.00



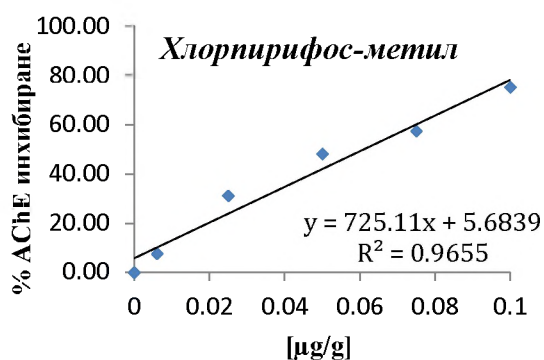
% AChE инхибиране	Ниво	[µg/g]	[Mx10 ⁻¹² /g]
0.00	0,0	0	0
9.42	ГКО	0.0019	10.07
24.59	0,5хПДК	0.005	26.28
37.18	1,0хПДК	0.010	52.56
57.31	1,5хПДК	0.015	78.84
74.23	2,0хПДК	0.020	105.12



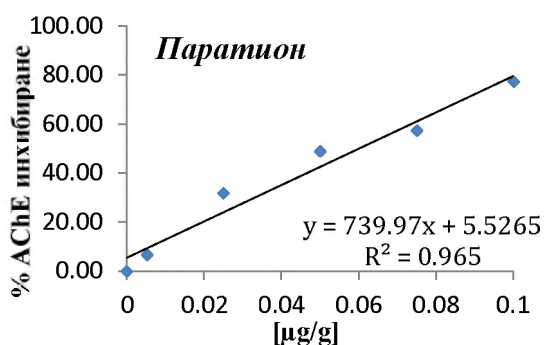
% AChE инхибиране	Ниво	[µg/g]	[Mx10 ⁻¹² /g]
0.00	0,0	0	0
7.31	ГКО	0.0059	29.1
31.08	0,5хПДК	0.025	119.47
49.48	1,0хПДК	0.050	238.95
64.97	1,5хПДК	0.075	358.42
81.40	2,0хПДК	0.100	477.90



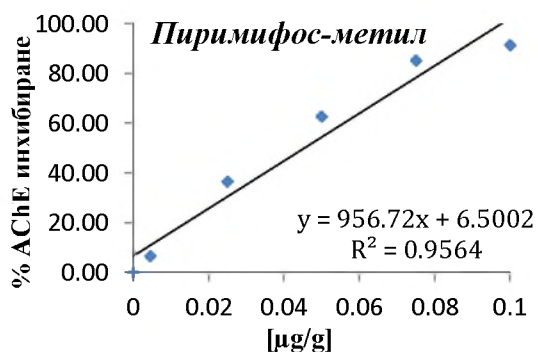
% AChE инхибиране	Ниво	[µg/g]	[Mx10 ⁻¹² /g]
0.00	0,0	0	0
7.34	ГКО	0.0020	9.18
18.08	0,5хПДК	0.005	22.60
33.55	1,0хПДК	0.010	45.20
54.21	1,5хПДК	0.015	67.79
64.31	2,0хПДК	0.020	90.39



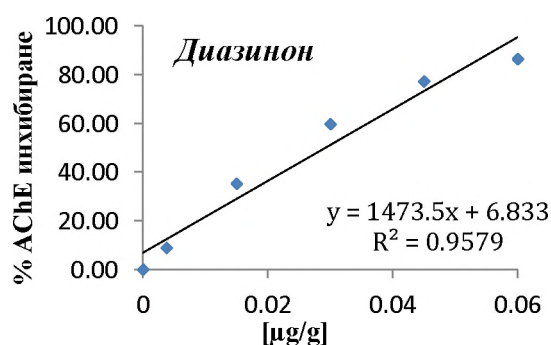
% AChE инхибиране	Ниво	[$\mu\text{g/g}$]	[$\text{M} \times 10^{-12}/\text{g}$]
0.00	0,0	0	0
7.63	ГКО	0.0061	17.5
31.18	0,5хПДК	0.025	71.31
48.22	1,0хПДК	0.050	142.62
57.47	1,5хПДК	0.075	213.93
75.31	2,0хПДК	0.100	285.23



% AChE инхибиране	Ниво	[$\mu\text{g/g}$]	[$\text{M} \times 10^{-12}/\text{g}$]
0.00	0,0	0	0
6.71	ГКО	0.0053	18.1
31.84	0,5хПДК	0.025	85.83
48.85	1,0хПДК	0.050	171.67
57.35	1,5хПДК	0.075	257.50
77.31	2,0хПДК	0.100	343.34



% AChE инхибиране	Ниво	[$\mu\text{g/g}$]	[$\text{M} \times 10^{-12}/\text{g}$]
0.00	0,0	0	0
6.58	ГКО	0.0045	14.7
36.55	0,5хПДК	0.025	81.88
62.71	1,0хПДК	0.050	163.76
85.24	1,5хПДК	0.075	245.64
91.40	2,0хПДК	0.100	327.51



% AChE инхибиране	Ниво	[$\mu\text{g/g}$]	[$\text{M} \times 10^{-12}/\text{g}$]
0.00	0,0	0	0
8.88	ГКО	0.0038	12.4
35.28	0,5хПДК	0.015	49.29
59.72	1,0хПДК	0.030	98.57
77.27	1,5хПДК	0.045	147.86
86.44	2,0хПДК	0.060	197.15

Фигура 21. Калибрационни криви от биосензор за ФОС и карбамати

С всички инхибитори е постигната много добра линейност. Покрит е обхвата от ГКО до 2,0хПДК с корелационен коефициент $R^2 \geq 0,95$, каквото е изискването в документ SANTE 11945/2015. На

Таблица 19 са обобщени данните от калибрационните криви- корелационните коефициенти и работният обхват за всяко съединение.

Таблица 19. Корелационни коефициенти и работен обхват от биосензор за ФОС и карбамати

	Метомил	Алдикаרב	Пропоксур	Карбофуран	Хлорпирифос-метил	Парагтон	Пиримифос-метил	Диазинон
R²	0.9768	0.9937	0.9805	0.9932	0.9655	0.965	0.9564	0.9579
Работен обхват [µg/g]	0,003-0,040	0,002-0,020	0,006-0,100	0,002-0,020	0,006-0,100	0,005-0,100	0,005-0,100	0,004-0,060

Критерий: $R^2 \geq 0,95$

Работният обхват е определен от ГКО до 2хПДК за всяко съединение. Това е концентрационния диапазон, в който може да се даде количествен резултат.

- Аналитичен добив, прецизност и неопределеност**

За определяне на аналитичния добив се измерва активността на имобилизирания ензим с добавен стандарт на инхибитор на всяко от трите концентрационни нива на валидиране. Приготвени са по 18бр. проби от матрица черен дроб за всяко валидационно ниво, към които се добавя стандартен разтвор на търсения пестицид в необходимата концентрация. Пробите се разработват по определената пробоподготовка и се отчитат резултатите. Изчислява се средната стойност от 18-те проби и се съпоставя с тази от пробата със стандартни разтвори (без матрица), която се приема за 100%.

Обобщените данни от валидиране на метода са представени в

Таблица 20.

Таблица 20. Аналитичен добив, повторяемост, възпроизводимост и неопределеност за определяне на N-метил карбамати и ФОС в черен дроб чрез оптичен биосензор

<i>Пестицид</i>	<i>Ниво [µg/g]</i>	<i>Аналитичен добив [%], (n=18)</i>	<i>Повторяемост RSD_r [%], (n=6)</i>	<i>Вътрешно- лабораторна възпроизводимост RSD_{wR} [%], (n=18)</i>	<i>Неопределеност [%]</i>
<i>Метомил</i>	0,010	83,2	12,73	15,43	12,6
	0,020	85,6	8,01	11,35	9,49
	0,030	93,1	3,63	4,18	4,87
<i>Алдикарб</i>	0,005	82,8	10,88	12,01	10,45
	0,010	84,1	6,92	12,14	8,62
	0,015	92,8	3,81	3,99	4,74
<i>Пропоксур</i>	0,025	85,0	7,59	7,38	7,48
	0,050	85,1	4,28	4,04	4,92
	0,075	87,1	4,09	4,24	4,81
<i>Карбофуран</i>	0,005	89,2	8,89	8,43	6,98
	0,010	88,3	5,13	5,09	5,21
	0,015	90,1	3,73	4,14	4,98
<i>Хлорпирифос-метил</i>	0,025	76,6	7,47	7,17	7,73
	0,050	78,6	5,06	4,93	5,47
	0,075	75,9	4,92	6,06	5,46
<i>Паратион</i>	0,025	76,3	7,34	8,63	9,00
	0,050	76,5	7,09	6,76	6,53
	0,075	75,7	4,92	5,12	5,03
<i>Пиримифос-метил</i>	0,025	73,3	4,62	4,42	5,36
	0,050	75,7	2,94	2,94	4,54
	0,075	74,6	5,35	3,12	4,52

	0,015	72,1	3,86	4,91	5,72
<i>Диазинон</i>	0,030	73,7	2,39	2,57	4,41
	0,045	74,7	2,22	2,11	4,19

Определените критерии, на които трябва да отговарят резултатите според Документ No. SANTE 11945/2015 са:

Аналитичен добив: 70-120%

Прецизност (повторяемост и възпроизводимост): $\leq 20\%$

Неопределеност: $\leq 50\%$

Всички резултати покриват критерия за аналитичен добив. Прави впечатление, че при ФОС, добивите са по-ниски, което вероятно се дължи на тяхната по-слаба разтворимост във вода в сравнение с карбаматите. При всички пестициди най-високи добиви се достигат на валидационно ниво 3. Най-ниски са стойностите на аналитичен добив, получени за диазинон, а най-високи- за метомил.

Колкото по-висока е концентрацията на пестициди в пробата, толкова по-добри са резултатите за повторяемост. Още на второ валидационно ниво (ПДК), всички резултати за повторяемост са под 8%, което е по-малко от половината на изискването. Това означава, че биосензорът работи много прецизно и резултатите са с минимални отклонения при повтарящи се условия. Най-ниска стойност за RSD_r се получават при Диазинон на валидационно ниво 3- 2,22%, което 10 пъти под критерия.

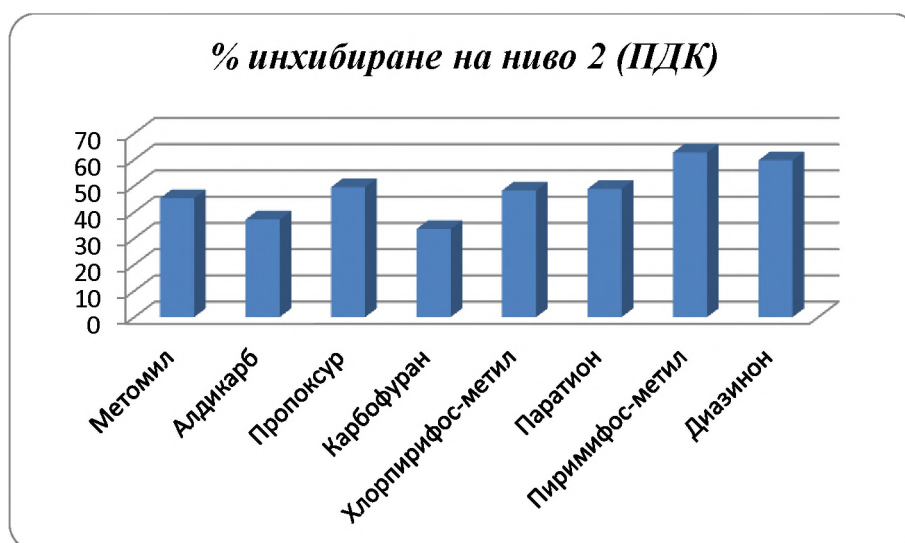
По-ниските стойности на RSD_{WR} при високите концентрации на пестициди са основание да се счита, че съществува минимален риск от фалшиво отрицателни проби. Поради високата специфичност на реакцията, на практика всички инхибитори на АХЕ могат да бъдат детектирани дори и в ниските търсени нива при контрола на храни. Това е изключително важно за скрининг методите, тъй като е много по-опасно да има фалшиво отрицателен резултат (ФО), от колкото фалшиво положителен (ФП). При ФП пробата ще бъде потвърдена хроматографски, докато, ако методът даде ФО сигнал за проба, съдържаща пестициди, е възможно тя да надвишава нивата, но да стигне пазара. За това има и строги мерки- не повече от 5 % ФО проби (Решение 2002/657/ЕО).

- **Изчисляване на резултати и контрол върху качеството на анализа**

- **Изчисляване на резултати**

Концентрацията от интерес при валидиране е стойността на ПДК (валидационно ниво 2). Тъй като в рутинната работа ще се получава резултат за сума от всички

съдържащи се в пробата пестициди, е необходимо да определим при какви условия тя да се счита за съмнителна и резултатът да бъде потвърден чрез хроматографски анализ (Фигура 22).



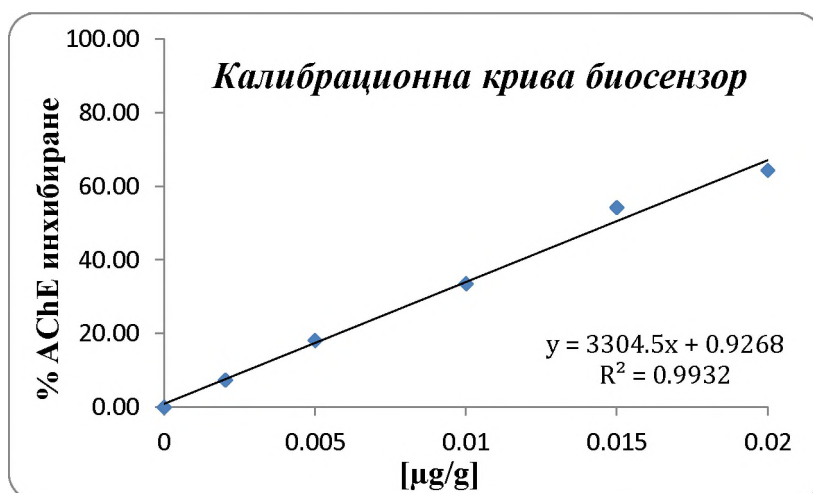
Фигура 22. Инхибиране в процент на ниво ПДК чрез оптичен биосензор

AChE се инхибира в най-малък процент от карбофуран (33,5%), за това построяваме калибрационна крива за рутинна работа с него. По нея се съди за общото наличие/липса на пестициди в пробата (за сума от всички).

При анализ на неизвестна проба се отчита остатъчната активност на имобилизираната AChE. Резултатът се превръща в относителна активност (%), като се сравнява с остатъчната активност на проба, в която не се съдържат пестициди (тя се приема за 100%). Процентът инхибиране за пробата се изчислява по следния начин:

$100 - \text{относителна активност (\%)} \text{ на проба} = \% \text{ инхибиране}$

Резултатите от анализа се изчисляват по следната функция:



Фигура 23. Калибрационна крива за оптичен биосензор

Калибрационна крива следва да се построява от проби с добавка на инхибитор (карбофуран) в най-малко три концентрационни нива включващи ГКО, 1/2ПДК и ПДК. Това се прави с всяка серия разработвани проби.

Kok и Nasirci съобщават, че общата анти-холинестеразна активност на двукомпонентни смеси на пестициди е по-ниска от сумата на индивидуалните стойности на инхибиране (Kok F. et al., 2004).

Взето е решение в случай на резултат за процент инхибиране по-висок от 30%, то тази проба се счита за съмнителна и резултатът следва да бъде потвърден чрез хроматографския метод.

○ **Качествен контрол**

За целите рутинната работа в ексел е създаден интерактивен симулатор за калкулиране на резултатите от анализа (ИСКРА). Симулаторът е собствена разработка на методика за контрол на качеството на анализа. Въведени са всички необходими формули за изчисляване на крайните резултати, което значително улеснява работа. Автоматично се построява и контролна карта за рутинна проверка на аналитичния добив, която е задължително да се извършва според изикванията на SANTE 11945/2015.

В работен лист 1 са нанесени данните за количество белтък по Lowry, които автоматично се прехвърлят във формулата за изчисляване на ензимната активност.

В работен лист 2 първо следва да се прострои калибрационна крива и по нея се изчисляват резултатите за неизвестни проби (Фигура 24).

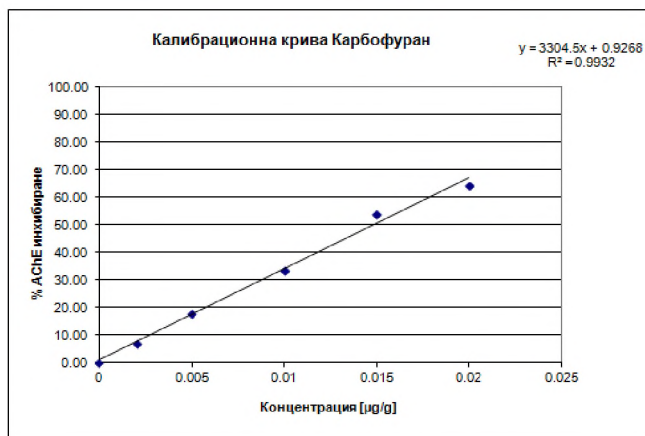
ЛИНЕЙНОСТ

Карбофуран [M]x10-12	% AChE инхибиране	Ниво	µg/g	x10-12 M/g
0	0.00	0.00	0	0
0	7.34	ГКО	0.0020	9.18
61.5	18.08	0.5 ПДК	0.005	22.60
123	33.55	1.0 ПДК	0.010	45.20
185	54.21	1.5 ПДК	0.015	67.79
246	64.31	2.0 ПДК	0.020	90.39

Данни от линейност:

a=	3304.5
b=	0.9268

0.5 mg протеин/g носител



Стъпка A (540nm) Проба

1 0.0797 празна проба

2 0.0436 празна проба + Ензим

244.5922 U/mg

3 0.0631 Проба

112.4718 U/mg в присъствие на инхибитор

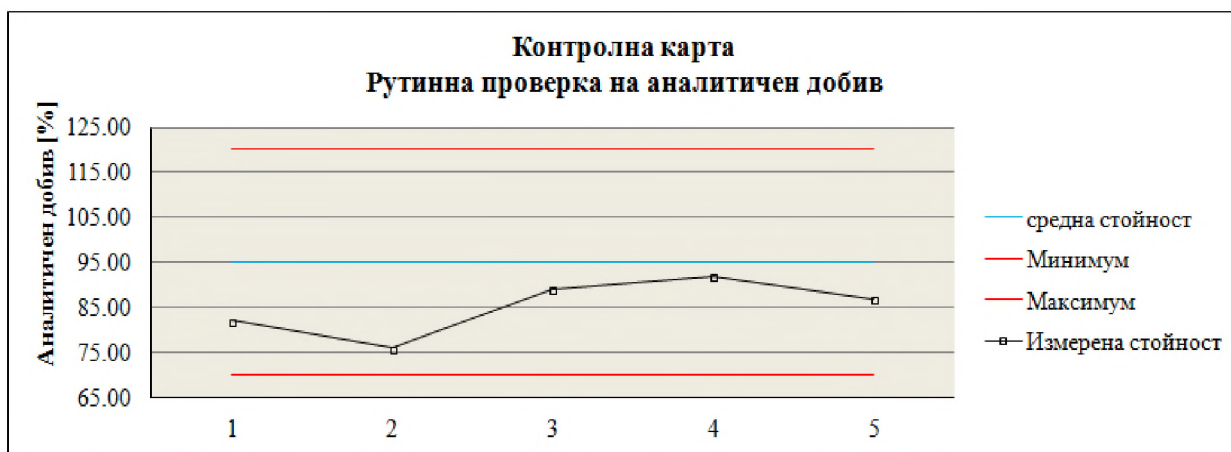
54.01662 % inhib

Резултат: 0.006 µg/g

Фигура 24. Работен лист 2- Калибрационна крива и изчисляване на резултатите от анализа

В жълтите полета се въвеждат стойностите на абсорбцията за съответните проби. Резултатът за съдържанието на пестициди в пробата се изчислява автоматично по предварително построената калибрационна крива.

Чрез пробата, използвана за построяване на калибрационна крива, с концентрация съответстваща на 0,5 ПДК се извършва рутинна проверка на аналитичния добив. С цел контрол върху качеството на анализа, резултатът автоматично се пренася в контролна карта в работен лист 3, като се следи стойността му да не е извън определените граници от 70 до 120% (Фигура 25).



№ по ред	средна стойност	Минимум	Максимум	Измерена стойност
1	95.00	70.00	120.00	82.00
2	95.00	70.00	120.00	76.00
3	95.00	70.00	120.00	89.00
4	95.00	70.00	120.00	92.00
5	95.00	70.00	120.00	87.00

Фигура 25. Работен лист 3- контролна карта за рутинна проверка на аналитичния добив

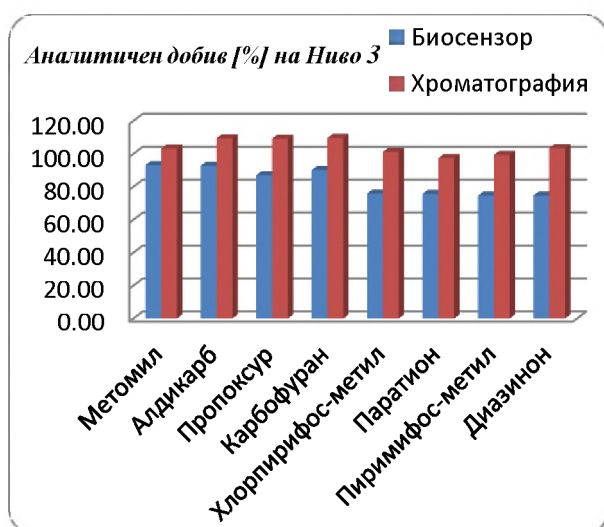
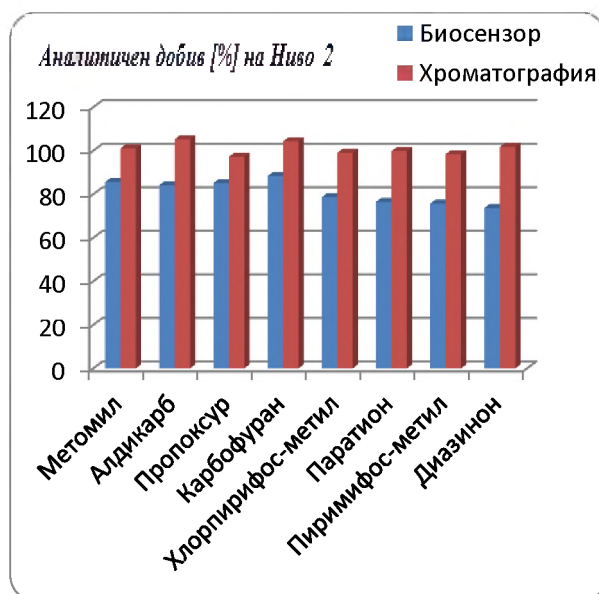
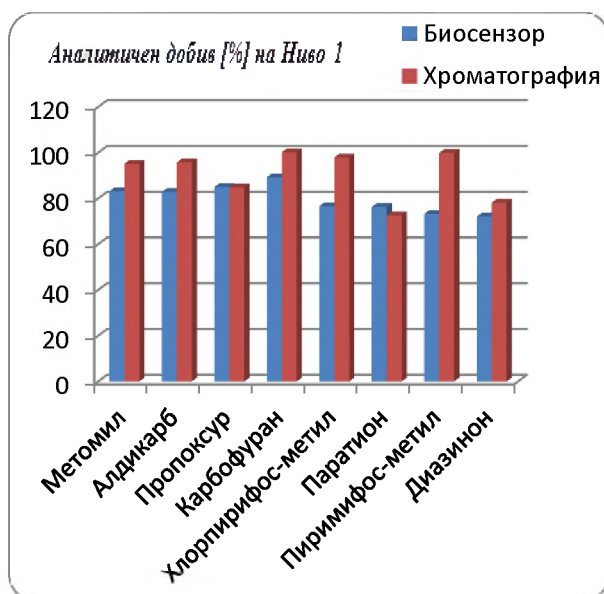
При резултат, попадащ в зоните над 120% или под 70%, носителите с имобилизиран ензим следва да се сменят и анализът да се повтори.

7. СРАВНЕНИЕ НА ПАРАМЕТРИТЕ НА МЕТОДИТЕ

Параметрите на валидираните методи са сравнени по показатели.

- Аналитичен добив**

Аналитичните добиви за всички компоненти, използвайки оптимизираните процедури за пробоподготовка, са сравнени по валидационни нива. Резултатите са изчислени спрямо концентрацията на определяното съединение, добавена към пробата чрез стандартен разтвор. Данните са сравнени по нива на Фигура 26.



Фигура 26. Сравнение на аналитичния добив по нива

С изключение на пропоксур и паратион на ниво 1, за всички останали аналити, чрез пробоподготовката за хроматографските методи е постигнат по-добър аналитичен добив в сравнение с пробоподготовката за биосензорен анализ. Във всички случаи обаче, е покрит критерия за добив над 70% (документ SANTE 11945/2015). Колкото по-висока концентрация на пестицид в пробата, толкова по-висок е аналитичният добив. Обобщените данни от сравнението са представени в Таблица 21.

Таблица 21. Обобщени данни аналитичния добив

	Аналитичен добив [%], (n=18)					
	Ниво 1		Ниво 2		Ниво 3	
	(0.5 ПДК)		(1.0 ПДК)		(1.5 ПДК)	
	Биосензор	Хроматография	Биосензор	Биосензор	Хроматография	Биосензор
Метомил	83.15	95.18	85.58	101.1	93.10	103.1
Алдикаרב	82.82	95.76	84.13	105.25	92.75	109.5
Пропоксур	84.99	84.83	85.08	97.17	87.06	109.2
Карбофуран	89.24	100.2	88.34	104.3	90.07	109.7
Хлорпирифос-метил	76.63	97.88	78.64	99.03	75.88	101.2
Паратион	76.26	72.62	76.49	99.78	75.65	97.38
Пиримифос-метил	73.25	99.91	75.69	98.42	74.61	99.33
Диазинон	72.06	78.16	73.70	101.8	74.68	103.5

За разлика от други биосензорни тестове, срещани в литературата, които достигат далеч по-ниски стойности за аналитичен добив в храни (в повечето случаи под 70%) (Skladal et al., 1997; Nunes et al., 1998, 1999; Pogacnik and Franko, 1999), при нашите данни за аналитичен добив всички стойности покриват изискуемия минимум от 70%. Schulze и екип докладват добив за параоксон-етил 101% в пюре от праскови и 106% в ябълково пюре (Schulze H. et al., 2002). Конструираният от тях биосензор е инкубиран директно в храните, което не е приложено в настоящата работа, поради вида проба, която се изследва, а именно черен дроб. Пробите от животински произход предизвикват много повече пречещи ефекти, от колкото пробите от растителен произход, поради съдържащите се мазнини. Малки частици от матрицата остават върху мембраната с имобилизиран ензим и не могат да бъдат отмити от нея. В настоящата разработка матричните пречения се избягват чисто методично по време на пробоподготовката, като екстрактът се филтрува през филтърна хартия преди да бъде инкубиран с носителите на имобилизирания ензим.

Въпреки че с пробоподготовката за хроматографските методи се постигат по-високи стойности за аналитичен добив, предимствата на пробоподготовката, ползвана за работа с биосензора, са безспорни. При нея не се налага употребата на органични разтворители и не е необходимо допълнително пречистване на екстракта. Работните стъпки са много по-малко, което прави боравенето с пробите значително по-лесно и не

изисква високо квалифициран персонал, който да е специално обучен за работа със специфичните и скъпо струващи инструменти за пробоподготовка като тези при потвърдителните анализи. Друго предимство е, че анализът е еднакъв за двете групи пестициди и практически, всички инхибитори на AChE могат да бъдат детектирани, включително и тези с непестицидна природа (Yaneva S. et al., in press). Недостатък на биосензорния анализ е, че получаваният резултат е за сума от инхибитори в пробата, а не за всеки отделен представител. Това означава, че в лабораториите за контрол на храни задължително трябва да има и валидиран потвърдителен метод, тъй като при резултати от биосензора над ПДК, пробата трябва да бъде повторно анализирана чрез потвърдителен метод (хроматографски), за да се определят точните концентрации на всеки отделен аналит.

- **Икономическа себестойност на анализа**

Поради минималната консумация на реактиви за пробоподготовка и по-евтината необходима апаратура за измерване, себестойността за анализ на една проба е значително по-малка. Проведен е сравнителен анализ между хроматографския анализ и този с биосензор. В Таблица 22 са представени корелациите между тези параметри.

Таблица 22. Сравнение на икономическите характеристики и времето за анализ между биосензорно и хроматографско определяне на пестициди

Метод за анализ	Цена за 1 проба (лв.)	Време за анализ (мин)	Разход апаратура за пробоподготовка (лв.)	Разход апаратура за анализиране (лв.)
Определяне на фосфорорганични пестициди в черен дроб чрез GC-MS/MS	95,00	240	15 000	300 000
Определяне на N-метил карбамати в черен дроб чрез HPLC-FL	83,00	180	5 000	60 000
ОБЩО ЗА ПОТВЪРДИТЕЛЕН АНАЛИЗ:	188,00	420	15 000	360 000
Определяне на общо съдържание на пестициди в черен дроб чрез оптичен биосензор на основата на имобилизирана AChE	37,00	45	Няма	7 000

Наблюдават се значителни разлики по отношение на три основни параметъра: време, себестойност и разход на консумативи. Въпреки че анализът чрез биосензор може да се използва само като скрининг метод, внедряването му в практиката би намалило чувствително разходите за лабораториите. В практиката повече от 80% от пробите са отрицателни, поради което интересът към подобен бърз, евтин и в същото време с достатъчно добри аналитични параметри метод, постоянно нараства.

- **Повторяемост и възпроизводимост (прецизност)**

Повторяемостта е свързана с правилния избор на средството за измерване, неговата изправност, избраният метод за измерване.

Сравнение на получените резултати за повторяемост е представено на Таблица 23.

Таблица 23. Сравнение на резултати от повторяемост

	ПОВТОРЯЕМОСТ RSD_r [%], (n=6)					
	Ниво 1		Ниво 2		Ниво 3	
	(0.5 ПДК)		(1.0 ПДК)		(1.5 ПДК)	
	<i>Биосензор</i>	<i>Хроматография</i>	<i>Биосензор</i>	<i>Хроматография</i>	<i>Биосензор</i>	<i>Хроматография</i>
Метомил	12.73	4.59	8.01	5.13	3.63	6.37
Алдикаרב	10.88	4.59	6.92	7.66	3.81	7.54
Пропоксур	7.59	4.52	4.28	6.05	4.09	4.98
Карбофуран	8.89	3.84	5.13	8.18	3.73	6.50
Хлорпирифос-метил	7.47	4.31	5.06	7.32	4.92	6.63
Паратион	7.34	6.61	7.09	8.55	4.92	7.8
Пиримифос-метил	4.62	3.02	2.94	4.41	5.35	2.56
Диазинон	3.86	5.33	2.39	7.99	2.22	5.43

Най-голяма разлика в резултатите за повторяемост между резултатите от анализа чрез биосензора и хроматографията се наблюдава на първо валидационно ниво, главно при карбаматите. На най-високото валидационно ниво тази зависимост се обръща, като стойностите от биосензора са дори по-ниски от тези, достигнати при хроматографския анализ. Това се дължи на високата специфичност на ензимно-субстратното взаимодействие.

Вътрешно-лабораторната възпроизводимост се измерва при промяна в едно или няколко от условията на анализа- време, място, оператор, апарат и т.н. Този параметър е показателен за стабилността на метода и достоверността на получаваните резултати при променливи условия. Резултатите се представят чрез относително стандартно отклонение (RSD) в %. Сравнение на данните, получени чрез оптичен биосензор и хроматографски анализ са представени в Таблица 24.

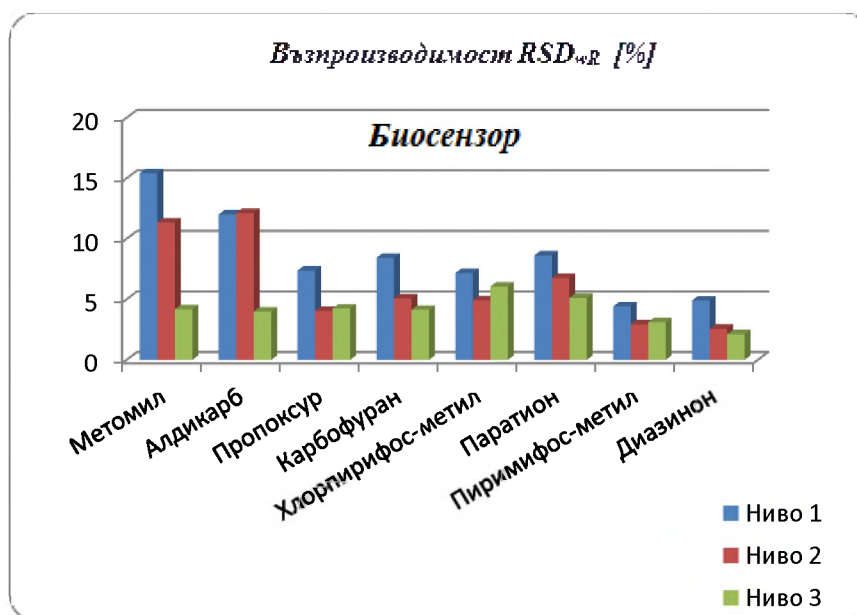
Таблица 24. Сравнение на резултати от вътрешно-лабораторна възпроизводимост

	ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ RSD_{WR} [%], (n=18)					
	Ниво 1		Ниво 2		Ниво 3	
	(0.5 ПДК)		(1.0 ПДК)		(1.5 ПДК)	
	Биосензор	Хроматография	Биосензор	Хроматография	Биосензор	Хроматография
Метомил	15.43	5.77	11.35	5.34	4.18	6.33
Алдикарб	12.01	5.98	12.14	7.23	3.99	8.06
Пропоксур	7.38	6.07	4.04	6.53	4.24	6.37
Карбофуран	8.43	5.26	5.09	7.83	4.14	7.19
Хлорпирифос-метил	7.17	6.12	4.93	7.64	6.06	6.51
Паратион	8.63	8.81	6.76	8.87	5.12	9.54
Пиримифос-метил	4.42	5.90	2.94	6.27	3.12	2.54
Диазинон	4.91	7.46	2.57	8.05	2.11	5.80

Всички резултати от хроматографските методи са в границите от 2,54 до 9,54%, а от оптичния биосензор в границите 2,11-15,43%. Най-високи стойности за възпроизводимост са получени на най-ниското концентрационно ниво. И тук забелязваме същата тенденция, както при резултатите от повторемост- с увеличаване концентрацията на инхибитор, стойността на вътрешно-лабораторна възпроизводимост намалява. При метомил и алдикарб, за които са получени най-високи стойности при ниските концентрации, на валидационно ниво 3 резултатите за RSD_{WR} са 3 пъти по-ниски, т.е. сензорът работи 3 пъти по-добре. Зависимостта е представена графично на Фигура 27.

Точността и прецизността са оценени по метода на стандартната добавка преди подготовката на пробата. Това позволява оценяването на аналитичните характеристики на

всеки от разработените аналитични методи, да включва и етапите на пробоподготовка, хроматографско разделяне и детекция.



Фигура 27. Възпроизводимост по нива от оптичен биосензор

От данните за повторяемост и възпроизводимост, можем да обобщим, че с увеличаване концентрацията на пестицид в пробата, биосензорът работи все по-прецизно, което е предпоставка да се счита, че възможността за получаване на фалшиво отрицателни резултати е минимална.

- **Граница на количествено определяне**

ГКО е най-малкото количество аналит, което може да бъде определено в пробата и да бъде даден коректен резултат. За целите на контрола на храни, този аналитичен параметър е от особено значение, тъй като съществуват норми за остатъчни количества от замърсители в храните и тези норми трябва да могат да бъдат достигнати от прилаганите методи за анализ. Сравнените ГКО получени при валидирането на хроматографските методи и оптичния биосензор, са представени в Таблица 25.

Таблица 25. Сравнение на границите на количествено определяне

	Граница на количествено определяне, (n=20)					
	[µg/g]			[Mx10 ⁻¹² /g]		
	ПДК	Биосензор	Хроматография	ПДК	Биосензор	Хроматография
Метомил	0.02	0.0028	0.0012	123	17.3	7.4
Алдикарб	0.01	0.0019	0.0004	52.6	9.98	2.1
Пропоксур	0.05	0.0059	0.0022	239	28.2	10.5
Карбофуран	0.01	0.0020	0.0002	45.2	9.04	0.9
Хлорпирифос-метил	0.05	0.0061	0.0010	142.6	17.4	2.85
Паратион	0.05	0.0053	0.0027	171.7	18.2	9.27
Пиримифос-метил	0.05	0.0045	0.0007	163.7	14.7	2.3
Диазинон	0.03	0.0038	0.0009	98.6	12.4	2.96

Според Документ *SANTE 11945/2015*, стойността на ГКО трябва да бъде ≤ ПДК

Броят на източниците, докладващи резултати от биосензорни анализи, проведени с реални проби и съобразени с изискванията на контрола на храни, е ограничен. От наличните такива, основно са провеждани експерименти с храни от растителен произход и води (Schulze et al., 2002; Pedrosa et al., 2008), поради ниското мастно съдържание, което улеснява пробоподготовката. Резултати от анализ на карбамати и ФОС в мляко чрез биосензор са представени от Zhang и сърудници. Пробоподготовка не е прилагана, тъй като матрицата е течна. Получената ГКО за параоксон е 0,001µg/g, а за карбарил-0,020µg/g, което е с един порядък по-висока стойност от получените в настоящата дисертация. Освен това, прилаганият биосензор в тяхната разработка е конструиран така, че ензимът се ползва еднократно (Zhang Y. et al., 2005).

ИЗВОДИ

1. Новоконструиранят биосензор предлага много предимства в сравнение с хроматографските методи, основните от които са кратко време за отговор, много по-ниска цена, по-лесна поддръжка. В конкретния случай за определяне на карбамати и ФОС беше доказано близо 10 пъти по-малко необходимо време за анализ, над 4 месеца стабилност на биосензора и 5 пъти по-ниска себестойност на анализа.
2. Недостатък на биосензорния анализ е, че получаваният резултат е за сума от инхибитори в пробата, а не за всеки отделен представител. Ниската себестойност, бързината на анализа и високата чувствителност обаче, го правят добра алтернатива за скрининг метод в анализа на храни.
3. Доказвайки приложимостта на метода чрез валидиране съобразно изискванията на документ SANTE/11945/2015, можем да обобщим, че новоконструиранят оптичен биосензор покрива изискванията на европейския съюз, свързани с характеристиките на методите за изпитване на храни, а именно чувствителност, граница на откриване, линейност, вътрешно-лабораторна възпроизводимост.
4. Стойностите за възпроизводимост при анализ на карбамати и ФОС в черен дроб чрез разработения оптичен биосензор, са в границите 2,1-15,4%, като с нарастване концентрацията на пестицид в пробата, прецизността се увеличава.
5. Разработените потвърдителни хроматографски методи за анализ на пестициди също покриват изискванията на Европейския съюз в сферата на контрола на храни.
6. Направеното сравнително разглеждане на получените при валидирането аналитични характеристики от потвърдителните методи и скрининг метода, подчертава потенциалните ползи за бъдещото практическо приложение на биосензора.
7. Разработената пробоподготовка за анализ на пестициди чрез оптичен биосензор е лесна за прилагане и се характеризира с висока ефективност- между 72 и 93%. За пробоподготовка при хроматографските методи, най-добра ефективност е постигната при прилагане на модифициран QuEChERS метод- между 73 и 110% за отделните аналити.
8. Настоящите изследвания дават основание да се счита, че биосензорите могат да се внедрят в контрола на храни като алтернативен скрининг метод за анализ на пестициди.

ПРИНОСИ

1. Разработен е аналитичен метод за определяне на N-метил кабамати в черен дроб чрез HPLC-FL. За целта е разработена и методика за пробоподготовка. Оптимизирани са условията на хроматографското определяне.
2. Разработен е аналитичен метод за определяне на фосфорорганични съединения в черен дроб чрез GC-MS/MS-IT. Разработена е методика за пробоподготовка и разделяне на анализите.
3. Конструиран е оптичен биосензор с имобилизирана AChE за определяне на пестициди, който е приложим и за други AChEI.
4. Синтезирани са нови хибридни мембрани по зол-гелен метод на основата на SiO_2 за целите на конструирането на биосензора.
5. Върху получените носители успешно са имобилизирани HRP, като моделен ензим, ChO и AChE.
6. Разработен е скрининг метод за определяне на пестициди в проби от черен дроб на основата на конструирания биосензор. Разработена е и лесна за прилагане пробоподготовка, която се характеризира с висока ефективност. Методът е валидиран съгласно изискванията на нормативните документи.
7. Валидирането на разработените аналитични методи е извършено съгласно изискванията на съответните нормативни документи (SANTE/11945/2015) и е доказано, че методите са приложими за поставената цел: определяне на изучаваните анализи в избраната матрица.
8. Предложена е методика за бърза оценка на качеството на анализа с биосензор, подходяща за рутинната лабораторна практика.

Списък

на публикациите свързани с дисертационния труд

1. Yaneva S., **Stoykova I.**, Ilieva L., Vezekov L., Marinkova D., Yotova L., Raykova R., Danalev D., Acetylcholine estherase inhibition activity of peptin analogues of galanthamine with potential application for treatment of AD, Bulgarian Chemical Communications, Vol. 49, 2017, accepted (I.F. 0.349).
2. **Stoykova I.**, Yankovska-Stefanova T., Yotova L., Danalev D., The impact of different solvent ratios on the recovery of lindane in egg, Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski" Faculte de Biologie 2015, volume 100, livre 4, pp. 96-99.
3. **Stoykova I.**, Yankovska-Stefanova T., Yotova L., Danalev D., Modified QuEChERS method for determination of methomyl, aldicarb, carbofuran and propoxur in liver, Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education, Vol. 24, nr.3, 2015 (JIR 0.21).

Списък

на докладите по дисертационния труд, изнесени на национални и международни конференции

2016

1. S. Yaneva, L. Ilieva, L. Vezekov, I. Stoykova, D. Marinkova, L. Yotova, D. Danalev, Acetylcholinesterase inhibition activity of peptide analogues of galantamine with potential application for treatment of AD, 7th Bulgarian Peptide Symposium, 10-12 June 2016, Blagoevgrad, Bulgaria- *постер*.
2. L.Yotova, I. Stoykova, S. Yaneva, D. Marinkova, D. Danalev, Development of an Acetylcholinesterase Biosensor Using New Hybrid Membranes for Determination of Pesticides in Liver Samples, European Biotechnology Congress, 05-07 May, 2016, Riga, Latvia- *доклад*.
3. I. Stoykova, S. Yaneva, D. Danalev, L. Yotova, Optical biosensor for insecticides detection in samples of animal origin, XIII Научна постерна сесия, 20 май 2016, ХТМУ, София- *постер*.

2015

4. I.Stoykova, T. Yankovska-Stefanova, L.Yotova, D.Danalev, Modified QuEChERS method for determination of methomyl, aldicarb, carbofuran and propoxur in liver, 6th Internntional Conference South-West University, 10-14 June 2015, Blagoevgrad, Bulgaria- *доклад*.
5. I. Stoykova, M. Velinova, L. Yotova, D. Danalev, Modified QuEChERS method for determination of Amitraz and 2,4-Dimethylaniline in honey with HPLC-UV, XII- Научна постерна сесия, 22 май 2015, ХТМУ, София- *постер*.
6. I. Stoykova, S. Yaneva, L. Yotova, D. Danalev, Biotechnology vs. Chromatography in food analyses, XII- Научна постерна сесия, 22 май 2015, ХТМУ, София-*постер*.
7. I.Stoykova, T. Yankovska-Stefanova, L.Yotova, D.Danalev, Rapid method for determination of N-methyl carbamates in liver using QuEChERS methodology, 2nd National Food Conference with International Participation, 20-21 March, 2015, Sofia, Bulgaria- *доклад*.

2014

8. I.Stoykova, T. Yankovska-Stefanova, L.Yotova, D.Danalev, Recovery of Lindane in egg samples using different extraction solvents, Първа Национална Конференция по Биотехнология “30 години Биотехнология”, Октомври 2014, София, България- *постер*.
9. I. Stoykova, M. Velinova, L. Yotova, D. Danalev, Sample preparation a key step for the recovery of pesticides in food, XI- Научна постерна сесия, май 2014, ХТМУ, София- *постер*.

2013

10. I. Stoykova, D. Danalev, D. Marinkova, L. Yotova, Bioanalytical methods for detection of pesticides in food products, X- Научна постерна сесия, май 2013, ХТМУ, София- *постер*.