

ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ НАУКИ

КАТЕДРА „АНАЛИТИЧНА ХИМИЯ”

СОФИЯ

хим. Надежда Атанасова Стоилова

**Определяне на хинолони в храни с животински произход чрез
течна хроматография с флуоресцентно детектиране и масспектрометрия**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научната специалност 4.2 Химически науки (Аналитична химия)

Научни ръководители: **проф. Георги Стоев дхн**

доц. Цветанка Неделчева д-р

Научно жури:

1. доц. д-р инж. Латинка Славева Костадинова - председател

2. проф. д.х.н. Васил Симеонов - рецензент

3. доц. д-р Румяна Стаматова Милина – Димитрова - рецензент

4. проф. д. х. н. Георги Стоев

5. проф. д-р инж. Емилия Димитрова Найденова

София, 2015

*Дисертационният труд е написан на **154**(сто и петдесет и четири) страници, съдържа **8** (осем) фигури и **11** (единадесет) таблици. Цитирани са **169** (сто шейсет и девет) източника.*

*Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на **разширен** научен съвет на научното звено на катедра „Аналитична химия”, състояло се на **21.04.2015г.***

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на **05. 10. 2015г. от 15 часа** в зала **424**, сграда „А” на ХТМУ.*

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



БЪЛГАРСКА АГЕНЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ

ЦЕНТРАЛНА ЛАБОРАТОРИЯ ПО ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНА ЕКСПЕРТИЗА И ЕКОЛОГИЯ

1528 гр.София ул."Искърско шосе" №5, тел.:02 979 10 34, факс: 02 979 07 42, e-mail: clvce@clvce.eu

Експерименталните изследвания са извършени в
Централна Лаборатория по Ветеринарно-Санитарна Експертиза
и Екология (ЦЛВСЕЕ)

отдел „Развитие на нови методи и анализ на
ветеринарно-медицински препарати” (РНМАВМП)

Българска агенция по безопасност на храните, БАБХ

I. Увод

Хинолоните са синтетични антимикробни агенти използвани за лечение, за превенция на заболявания или като средства за стимулиране растежа на животните. Представяват азот-съдържащи осем-членни хетероциклени ароматни съединения с кетонна група на позиция 4 и карбоксилна група на позиция 3, т.е. 1-заместена-1, 4-дихидро- 4-оксопиридин- 3-карбоксилна част, комбинирана с ароматен или хетероароматен пръстен. Производни (деривати) са на налидиксовата киселина с различни алкилови и арилови групи (като заместители), разположени на позиция 1 и флуоро и пиперазинилови заместители, на позиции 6 и 7, респективно. След откриването на налидиксовата киселина (1- Ethyl-7- methyl-4-oxo- [1, 8] naphthyridine-3-carboxylic acid) през 1962 г. се разработват и внедряват структурни аналози с по-висока биологична и фармакологична активност. Синтезирани са над 25 производни на налидиксовата киселина. В зависимост от биологичната и фармакологична активност производните на налидиксовата киселина се класифицират като първо, второ, трето, четвърто поколение хинолони [3; 17], представени на фиг.1 :

1 st	 nalidixic acid cinoxacin piromidic acid oxolinic acid pipemdic acid
2 nd	 flumequine enoxacin norfloxacin ciprofloxacin pefloxacin enrofloxacin ofloxacin lomefloxacin fleroxacin
3 rd	 danofloxacin sparfloxacin sarafloxacin difloxacin
4 th	 moxifloxacin gatifloxacin

Фиг.1 Структура на 20 антибиотика от групата на хинолони и флуорохинолони: I, II, III, IV поколение [41]

Хинолоните са слаби киселини. Карбоксилната група на позиция 3 придава на молекулите кисели, а наличието на 7-пиперазинилова част, т.е. допълнителните аминови групи, придават базичен характер. Хинолоните с пиперазинилов пръстен в молекулата си се означават като пиперазинилови (PQ). Молекулите им притежават две рКа стойности в интервал 5.5÷6.6 и 7.2÷8.9 за рК₁ и рК₂, съответно. Тези хинолони се означават още и като амфотерни: marbofloxacin (Mar), norfloxacin (Nor), ciprofloxacin (Cip), danofloxacin (Dan), enrofloxacin (Enro), sarafloxacin (Sara), difloxacin (Dif) [17]. Във воден разтвор съществуват под формата на катиони, аниони или цвтерйони. Останалите хинолони, които имат една рКа стойност варираща в границите 6.0÷6.9, се означават като кисели (AQ) и съществуват само в неутрална форма или във вид на аниони: flumequine (Flu), oxolinic acid (Oxo), nalidixic acid (Nal), cinoxacin (Cin) и др. Въпреки че хинолоните се различават по

своята хидрофобност (киселинните хинолони са по-хидрофобни от амфотерните), те са разтворими в полярни органични разтворители и смеси вода-органичен разтворител. Голям брой научни публикации представят резултатите от изследвания на структурата и химичните свойства на хинолоните [3; 6; 17; 20; 35].

Хинолоните, като синтетични антибактериални лекарствени средства, са широко използвани в хуманната и ветеринарна практики. Дори в ниски концентрации (като следи), провокират резистентност на патогените, а това налага мониториране на храни за наличие на хинолони. Здравните власти са установили критерии за качество на храните с определени пределно допустими концентрации (ПДК), означавани в български превод на съответните Директиви като МДСОК (Максимално Допустими Стойности на Остатъчните Количества) или МДГОВ (Максимално Допустими Граници на Остатъчни Вещества), а именно Регламенти (ЕС) 470/2009 и № 37/2010.

Контролът на качеството и безопасността на хранителни продукти от животински произход изисква проучване, разработване и валидиране на аналитични методи за определяне на следи от антибиотици и техните метаболитни продукти в различни матрици. Определяните вещества са в ниски концентрации - следови, а аналитичните методи трябва да се отличават с висока чувствителност, бързина и ценова ефикасност, като се извършват предимно по екологичен и безопасен за здравето начин.

II. Литературен обзор

Представяните съвременни хроматографски методи за определяне на хинолони в храни са достатъчно чувствителни, така че да се детектират хинолони в количества под съответното ПДК (МДСОК) [3; 17; 33; 35]. Работните направления/области при изследванията за определяне на остатъчни количества хинолони могат да бъдат условно обобщени по следния начин:

А) усъвършенстване на методите за определяне на хинолони: Контролираните хинолони в хранителни продукти с животински произход са описани в European Council Regulation of Veterinary Drug Residues (Наредба (ЕС) 470/2009 и Регламент 37/2010). Броят и видовете хинолони, както и техни продукти непрекъснато нараства, а изискванията за ПДК/МДСОК непрекъснато се повишават. Тенденцията за засилване на контрола на следи от лекарствени препарати в храни налага и усъвършенстване на методите за тяхното аналитично определяне. Наред с изискванията за подобряване на характеристиките на методите, се налага и разработване на мултикомпонентни методики, които да отговорят на нарастващия брой на анализите и видовете матрици. Публикуваните досега методи се основават на разделяне с течна хроматография или капилярна електрофореза, съчетани с най-често с ултравиолетова (UV) или флуоресцентна детекция (FD) [6; 7; 8; 11; 12; 13; 14; 18; 19; 20; 21; 23; 24; 29; 34; 36; 37; 38; 40; 41].

Сравнително изследване на четири техники за детекция: УВ, флуоресцентна, масспектрометрична и тандем масспектрометрично детектиране на хинолони след разделяне чрез течна хроматография, публикувано наскоро, показва, че методите се характеризират с граници на количествено определяне по-ниски от МДСОК за хинолони и техни метаболити в мляко [15]. ТХ-Фл (HPLC/Fl), както и малко по-

ниски граници на количествено определяне от ТХ-УВ (HPLC/UV). С Мас-ТХ (LC-MS) се демонстрира по-кратко време за анализ в сравнение с другите два изучавани метода.

Броят на определяните хинолони, в описаните в литературата методи, се определя от European Council Regulation on Veterinary Drug residues (Regulation (EC) 470/2009 и 37/2010). Допълнително се съобщават и резултати от определянето на някои метаболитни продукти на контролираните хинолони, като броят на определяните анализи се увеличава до 8 или дори 18 [6; 12; 20; 29]. Разширяването на кръга от анализи и възможностите за едновременното им определяне налага разработване и съчетаване на нови, все по-сложни в апаратурно оформление техники за разделяне и детекция. Предложен е скрийнинг метод за едновременно определяне на 22 антибиотика и техните метаболити в сурово мляко и мляко на прах, основан на свръх ефективна течна хроматография с тандем масспектрометрична детекция [18; 23]. Разработват се интензивно и нови хроматографски колони и стационарни фази за повишаване на разделителната способност на хроматографския метод и ефективността на анализа. Т. нар. core-shell (fused-core) частици дават възможност да се извършва бързо хроматографско разделяне и с конвенционалните хроматографски колони, но до провеждане на нашето изследване колони с такъв пълнеж са използвани ограничено за определяне на следи от хинолони в храни.

Б) разработване на методи за подготовка на пробата, подходящи за различни матрици. Разработването на нови методи за подготовка на пробата за хроматографско разделяне има за цел повишаване на ефективността на анализа чрез намаляване на времето, разхода на разтворители и използването на безопасни за здравето и околната среда реактиви. Основно направление е разработване на методики за пробоподготовка, ефективни за изолиране на регулираните хинолони

от описаните в наредбата матрици. Обичайната практика е хинолоните да се изолират чрез течна екстракция и пречистване на екстракта с твърдофазна екстракция. Интересът към разработването на нови методи за подготовка на пробата може да се потвърди от големия брой съвременни разработки, представящи редица иновативни методи за извличане и пречистване на хинолони: течна екстракция под високо налягане; on-line твърдофазна екстракция; твърдофазна микроекстракция; твърдофазово разпръскване на матрицата (matrix solid phase dispersion), полимер с молекулно отпечатване (molecular imprinted polymer); дисперсионна течна-течна микроекстракция (dispersive liquid-liquid extraction); екстракция в микровълнов реактор; QuEChERS – процедура [1; 2; 5; 10; 14; 15; 18; 20; 22; 23; 24; 25; 28; 30; 31; 34; 36; 40; 41; 44]. Техниката на течна екстракция под налягане комбинира ползите от висока производителност, автоматизация и нисък разход на разтворители, но е необходимо скъпо лабораторно оборудване [21; 25; 30]. Течно - течната дисперсионна микроекстракция силно увеличава контактната повърхност между фазите и намалява времето за екстракция, но тази модерна техника рядко е използвана за анализ на храни [25; 41]. Екстракцията в микровълнов реактор значително намалява консумацията на реактиви, но е приложима само за твърди проби [25]. Твърдофазната екстракцията чрез дисперсия на матрицата е модерен метод, който комбинира хомогенизиране, екстракция и очистване в едноетапна процедура, но е разработена само за твърди или полутвърди проби [10; 25; 38]. Молекулно отпечатани полимери са иновативни и много ефективни сорбенти, които интензивно се използват в анализа на води, но се съобщават проблеми със замърсяване на екстракта и неприложимост в on-line условия [14; 24; 25; 28; 44]. Сорбенти с ограничен достъп (Restricted access sorbents) позволяват

автоматизиране и on-line прекоцентриране на анализите, но краткият живот на екстракционните колони и високата им цена ограничават приложението при анализа на храни [25]. Много актуална е напоследък новоразработената процедура за течна екстракция, наречена QuEChERS – процедура. Методологията QuEChERS - бърза, лесна, евтина, ефективна, устойчива и сигурна процедура за екстракция, Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe, при която не се налага почистване на екстракта, е разработена за анализ на храни с растителен произход и е приложена за ограничен брой храни от животински произход [1; 2; 10; 36].

Литературният преглед показва и напредък при изследванията в това направление, както и значителен напредък в процеса на подготовка на пробите за анализ, но предложените процедури за подготовка на пробата или са приложими за ограничен брой матрици или са специфични за определена матрица. На този етап няма унифицирана методика за подготовка на пробата, която да е ефективна за всички контролирани хинолони във всички контролирани матрици. Актуалността на проблема е обусловена от изискването за определяне на ниски концентрации (следи) от хинолони в хранителни продукти с животински произход в разнообразни сложни матрици, описани в европейските и световни законодателни документи.

Едновременното определяне на няколко хинолона с течна хроматография непрекъснато се оптимизира и информацията в научната литература непрекъснато се обновява и допълва. Постиженията могат да се разгледат двустранно: От гледна точка на иновациите в анализа: разработват се методики за все по-голям брой хинолони и техните метаболитни продукти. Описани са приложения в голям брой разнообразни матрици. Особено ценни в това направление са изследванията на два екипа, които предлагат методики за мултикомпонентен анализ (течна екстракция, течна хроматография с флуоресцентна или тандем маспектрална детекция) на 10

хинолона в осем матрици от животински произход [6; 39]. От гледна точка на мониторинга на хранителни продукти в съответствие с европейските директиви не е описана методика на подготовка на пробите за анализ (екстракция и пречистване), съчетана с течно хроматографско разделяне, която да е приложима за едновременното определяне на хинолони в проби с животински произход (т. нар. multi-residue/multi-matrix), указани в Наредба №37/2010, без модифициране на процедурите на подготовка на пробата и/или на хроматографския анализ в зависимост от анализираните матрици.

III. Цел и задачи на дисертационния труд

Целта на настоящата работа е разработване на хроматографски метод за едновременно определяне на девет хинолона в храни с животински произход, описани в Наредба №37/2010.

В тази насока е необходимо да се решат следните задачи:

1. Едновременно екстрахиране на хинолони от проби с биологичен произход и с унифицирана пробоподготовка;
2. Разработване на течно-хроматографски метод с флуоресцентно детектиране за определяне на анализите с инструментален метод, който се отличава с добра чувствителност и селективност;
3. С разработваните метод за подготовка на проби и инструментален анализ трябва да се осигури намаляване на консумацията на разтворител, както и на време за анализ;
4. Подобряване на времето за анализ и чувствителността на метода, като за разделяните хинолони се използват и нови видове хроматографски колони;
5. Повишаване на чувствителността и надеждността на метода с маспектрално детектиране;
6. Валидиране на метода съгласно Решение на Комисията 2002/657/ЕО.

IV.1. Експериментална част.

IV. 1.1. Стандартни субстанции и реактиви

Стандартни субстанции: Norfloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Difloxacin (като difloxacin hydrochloride), Nalidixic acid - Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); Flumequine, Fluka (Buchs, Switzerland); Danofloxacin-Riedel de Haen (Seelze, Germany); Sarafloxacin (като sarafloxacin hydrochloride trihydrate) и Oxolinic acid - Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Всички *реагенти* са със степен на чистота Vetranal grade

Реактиви: Ацетонитрил (ACN) и метанол (MeOH)-Labscan (Dublin, Ireland), използвани при пробоподготовка или HPLC експерименти, със степен на чистота ч.з.а. (р.а.), както и HPLC-grades. Натриев хидроксид (NaOH), мравчена киселина (HCOOH), амонев ацетат (AmAc) - всички със степен на чистота ч.з.а.(р.а.), Merck (Darmstadt, Germany). Всички работни разтвори са приготвени с дейонизирана вода (18.2 MΩ cm resistivity) пречистена чрез ELGA system (Marlow, UK).

IV. 1. 2. Основни и работни стандартни разтвори:

Основен стандартен разтвор на хинолони с концентрация (1 g L^{-1}) се приготвя чрез разтваряне на 10 mg стандартна субстанция в $50 \mu\text{L } 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ и разреждане до 100 mL с метанол. Основният разтвор се съхранява при 4°C в полипропиленова мерителна колба за период най-много от три месеца. Работен стандартен разтвор с концентрация (2.5 mg L^{-1}) се приготвя чрез разреждане на основния стандартен разтвор с метанол. Работните разтвори за течно-хроматографски анализ се приготвят непосредствено преди анализ чрез подходящо разреждане с мобилна фаза: 0.1% воден разтвор на HCOOH и ацетонитрил в съотношение (9:1; v/v). Разтворите за изготвяне на проби с добавка на стандарт (т. нар. спайкване) се приготвят чрез смесване на съответните обеми индивидуални основни разтвори на хинолони и разреждане до финалната концентрация с мобилна фаза.

Амониено-ацетатен буфер (с pH 9 и 3) се приготвят чрез разтваряне на 0.15g амониев ацетат в 100 mL дейонизирана вода. Добавя се оцетна киселина или амоняк. pH-стойността се контролира потенциометрично. Концентрацията на буферите е 20 mM.

IV. 1. 3. Проби

Пилешки, агнешки, свински мускул и бъбрек, мляко, риба, яйца, пчелен мед са получени съгласно НМПКО при ЦЛВСЕЕ. За да се установи, че материалът е бланков, пробите са изпитвани с микробиологичен тест тип „петте петри”. Пробите са хомогенизирани и съхранявани при температура $(-18)^{\circ}\text{C}$ и са размразявани преди провеждане на анализ. Проби с добавка на стандартен разтвор се приготвят като към всяка тест-порция от хомогенизираните проби се добавя съответен обем стандартен разтвор на хинолони. Приготвени са три серии от проби:

- (a) проби с добавка на стандарт непосредствено преди анализ;
- (b) проби с добавка на стандарт и съхраняване при температура $(-18)^{\circ}\text{C}$ за период от 1 месец;
- (c) проби с добавка на стандарт и съхраняване при температура $(4)^{\circ}\text{C}$ за период от 24 h.

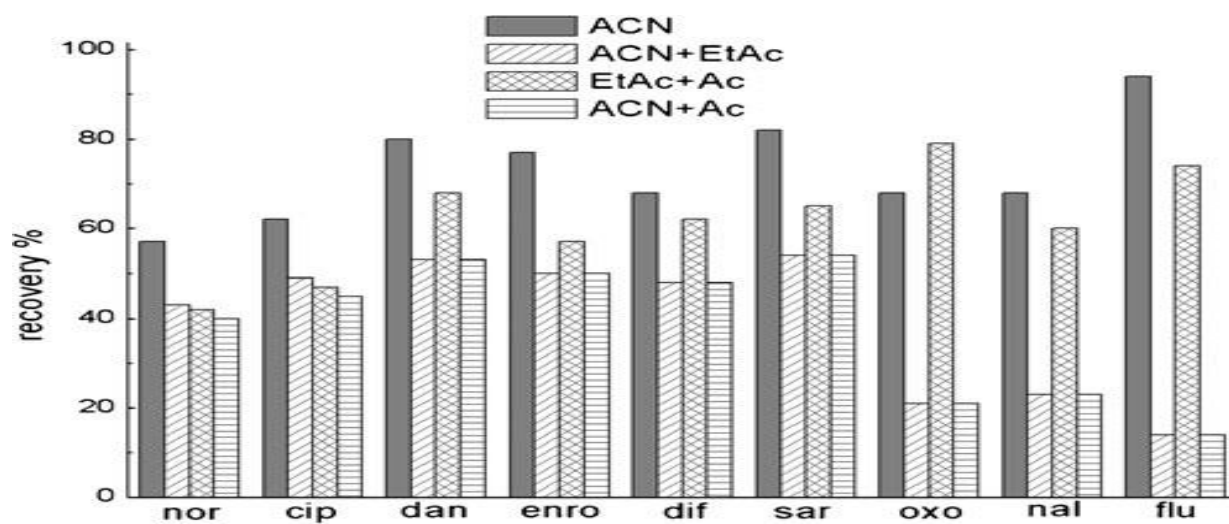
V. Основни резултати.

V. 1. 1. Разработване на метод за подготовка на проби

Оптимизиране на процедурата по екстракция.

Оптимизирани са: брой екстракции, вид и обем на екстрахиращия разтворител, начин за изпаряване на солвента. Изследвано е влиянието на обема разтворител чрез еднократна и двукратна екстракция с различни обеми разтворител. Изследвана е ефективността на смесващи се и несмесващи се с вода разтворители (етилацетат). Критериите за ефективност на процедурата по екстрахиране на анализите са чистота на екстракта и аналитичен добив спрямо всеки от изследваните хинолони. Ефективността на екстракционната процедура е определена чрез стандартна добавка на хинолони към пробите на различни концентрационни нива. Установено е, че ацетонитрил е най-ефективен екстрахиращ разтворител за едновременно извличане на анализирания девет хинолона, като двукратната екстракция се отличава с добра ефективност, без да е необходимо допълнително обезмасляване на екстракта от проби (фигура 2).

Изследвани са две техники за изпаряване на разтворител: изпаряване под азот, водна баня и температура от 60°C, както и изпаряване под вакуум. Определен е висок аналитичен добив при изпаряването под поток от азот, N₂.



Фиг.2:

Ефективност на течната екстракция за деветте хинолона (всеки на ниво $500 \mu\text{g kg}^{-1}$) получени от пилешки мускул с използването на ацетонитрил (ACN), етилацетат (EtAc) и ацетон (Ac).

V. 1. 2. Оптимизиране на процедурата по пречистване и концентриране на получените екстракти.

В резултат на проведените проучвания за определяне на девет хинолона в различни видове матрици с животински произход, предлагаме процедура за очистване на екстрактите от проби с колона за твърдофазна екстракция тип HLB. При изследваните матрици: пилешки, свински, агнешки мускул, мляко, риба, бъбрек, яйца и пчелен мед не се отбелязват матрични пречения. Комбинирането на двукратна екстракция с ацетонитрил и твърдофазна екстракция подобряват очистването и концентрирането на анализите. Получените аналитични добиви за всеки от деветте хинолона са около 100%. Регистрираните хроматографски пикове са добре разделени и оформени.

V. 1. 3. Оптимизирана процедура за подготовка на пробите за анализ.

Претегля се 1g хомогенизирана проба в полипропиленова епруветка. Добавят се 10 mL ACN. Пробата се поставя за 10 min при стайна температура на клатачна машина с цел по-добро хомогенизиране. Следва центрофугиране (7.500 rpm) за 10 min при 0 °C. Течната фаза се отделя, а екстракцията се повтаря с 10 mL ACN. Обединените екстракти се изпаряват до сухо под азот (N₂) при температура 60 °C и водна баня. Сухият остатък се разтваря в 5 mL 20 mM амониев ацетат (pH 9)-хомогенизиране с вортекс и центрофугиране за 5 min (0°C, 7.500rpm). Очистване на екстракта от пробата: твърдофазна екстракция с HLB колона, активирана с метанол (MeOH; 1mL) и кондиционирана с 1mL ацетатен буфер (pH 3). Пробата се нанася, а след това пълнежът на колоната се промива с обем дейонизирана вода (етап миене). Анализите се елуират с 10mL 0.2% HCOOH в ACN. Елуатът се изпарява до сухо под азот на водна баня и температура до 70°C. Сухият остатък от пробата се разтваря в 1mL смес от 0.1% воден разтвор на HCOOH и ACN (9:1; v/v). Преди инжектиране в хроматографската система разтворът на пробите се филтрува през филтър с найлонова мембрана и размер на порите 0.45-µm (ако е необходимо, преценява се визуално), във виал. При подготовката на пчелния мед и необходимо медът да се разтвори в 5ml дейонизирана вода. Следва описаната подготовка за анализ.

V. 1. 4. Разработване на метод за определяне на хинолони с течна хроматография и флуоресцентна детекция

В процедурата по оптимизиране на HPLC/FL (BETX-Фл) метод с флуоресцентна детекция са изследвани няколко хроматографски колони и мобилни фази и са разработени програма за градиентно елуиране и детектиране. Изследвани са три типа аналитични колони Zorbax Eclipse XDB C8, Zorbax Eclipse XDB C18, и Varian Inertsil C18. Първата изследвана колона е C8 (silica-based reversed phase column) с мобилна фаза ацetonитрил-вода, подкислена с трифлуороцетна киселина (10 mM). Поради различните физикохимични характеристики на изследваните хинолони е разработена и програма за градиентно елуиране: съдържанието на ацetonитрил в мобилната фаза е вариращо в границите от 12 до 22 %. Така амфотерните хинолони (Nor, Cip, Dan, Enro, Dif и Sara) се елуират за максимум 18.66 min, а Oxo, Flu, и Nal се задържат много силно - с време на задържане повече от 25 min. Втората изследвана колона е C18 Varian Inertsil 5 ODS-3 (250×4.6 mm, 5 µm размер на частиците) с мобилна фаза съдържаща ацetonитрил, метанол и 0.1 % воден разтвор на HCOOH. Концентрациите на ACN и HCOOH в мобилната фаза варират между 12–30 % и 68–86 %, съответно, при постоянна концентрация на MeOH (2 %). Резултатите показват, че по-високата концентрация на воден разтвор на HCOOH затруднява разделянето на киселите хинолони: flumequine (Flu), oxolinic acid (Oxo), nalidixic acid (Nal). Ако съдържанието на ацetonитрил в мобилната фаза е високо, разделянето на деветте хинолона е по-ефективно, но се наблюдава разширяване на пиковите на киселите хинолони. За да се подобри формата на пиковите е изследвана колона тип C18 Zorbax Eclipse XDB със същата елуентна програма.

Хинолоните притежават естествена флуоресценция с две ивици на възбуждане при 300-350nm и 245-290nm (с по-силна абсорбция), както и широки ивици при емисии с център 440-500nm. Разработена е програма за флуоресцентното детектиране с двустепенна промяна в дължините на вълните: от 0 до 12 min: $\lambda_{\text{ex}} = 280\text{nm}$ и $\lambda_{\text{em}} = 450\text{nm}$; от 12 до 23 min: $\lambda_{\text{ex}} = 321\text{nm}$ и $\lambda_{\text{em}} = 360\text{nm}$. В резултат на програмираното флуоресцентно детектиране се повишава чувствителността на метода за всеки от хинолоните, тъй като са създадени оптимални условия за провокиране и регистриране на аналитичния сигнал.

Синхронизирането на програмите за елуиране и за детекция е ключов фактор за провеждане на оптимален хроматографски анализ. За оценка на ефективността на двете програми се сравняват хроматограмите на единични стандарти и стандартни смеси. Времето на задържане и площта на пиковете при двете хроматограми съвпадат напълно, което е указание, че разработените елуентна програма и програма за детекция са добре синхронизирани.

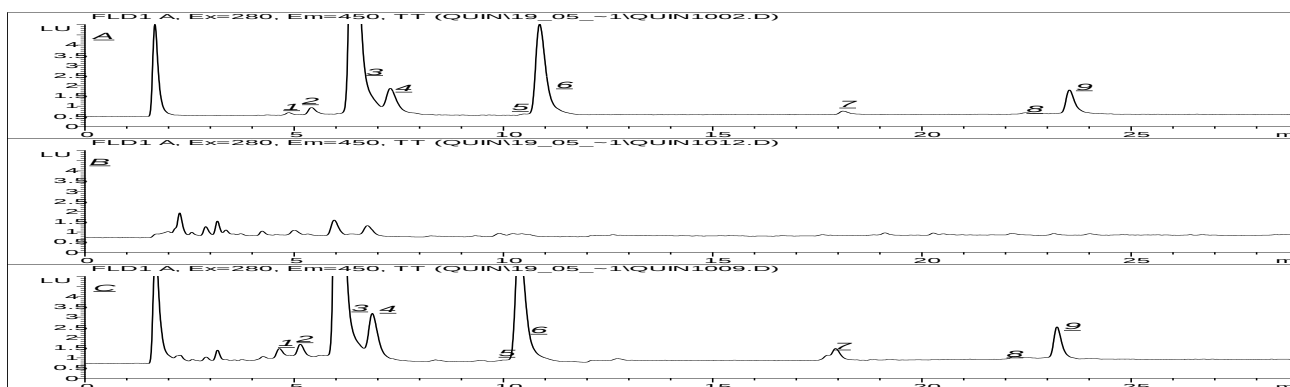
За оценка на ефективността на разделянето към проба от пилешки мускул е добавена стандартна смес от деветте изследвани хинолони преди започване на подготовката на пробата за анализ. Разделянето на анализите се провежда на течно хроматографска система Agilent 1100 (Agilent Technologies, Morges, Suisse) с аналитична колона тип Zorbax Eclipse XDB C18 и същата по вид предколона. Оптимизираният състав на мобилната фаза е: 0.1 % (v/v) HCOOH във вода (елуент А); ацетонитрил (елуент В) и MeOH (елуент С) с градиентна програма за елуиране, представена в таблица 1. Скоростта на потока на подвижна фаза е 0.5 mL min^{-1} ; температурата на колоната е 50°C ; обем на инжектираната аликвота от екстракта на пробата: 25 μL . Хроматограмите са представени на фигура 3. Резултатите показват, че не се наблюдава значима разлика във времената на задържане на

стандарты в разтворител и стандарт, добавени към матрицата. Ефективно разделяне се постига за 22 минути. Допълнително предимство на разработеният и оптимизиран метод е намаления разход на разтворители и намаленото време за анализ: 17.5 mL мобилна фаза и 27 минути за анализ на една проба.

Табл.1: Градиентна програма за елуиране и програма за промяна дължините на вълните на възбуждане и емисия за деветте определяни хинолона

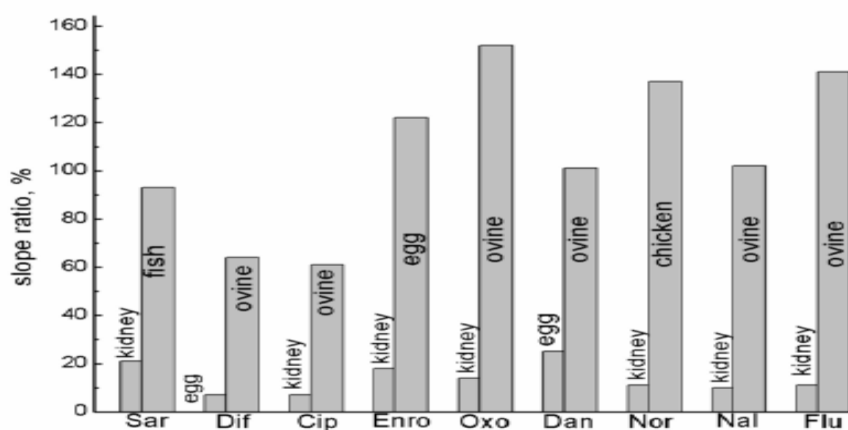
Време, min	Подвижна фаза А, %	Подвижна фаза В, %	Подвижна фаза С, %	λ_{ex} , ^a nm	λ_{em} , ^a nm	Детектиран компонент
0	83	15	2	280	450	Nor, Cip, Dano,
9	78	20	2			Enro, Sara
12	78	20	2	312	360	Dif, Охо,
17	63	35	2			Nal, Flu
23	58	40	2			
26	83	15	2			

^a λ_{ex} : Дължина на вълната за възбуждане и λ_{em} : Дължина на вълната за емитиране.



Фиг.3: ТХ-Фл (LC/FD) хроматограми на стандартни разтвори на хинолони (А), екстракти на чист, бланков, пилешки мускул (В) и пилешки мускул с добавка на стандарт (С) получени с използването на колона C18 Zorbax Eclipse XDB с ACN/MeOH/HCOOH подвижни фази и програма за градиентно елуиране (от табл. 1): (1) Nor 25 μ g kg⁻¹; (2) Cipro 100 μ g kg⁻¹; (3) Dano 200 μ g kg⁻¹; (4) Enro 100 μ g kg⁻¹; (5) Sara 10 μ g kg⁻¹; (6) Diflo 300 μ g kg⁻¹; (7) Охо 100 μ g kg⁻¹; (8) Nal 25 μ g kg⁻¹; (9) Flu 400 μ g kg⁻¹.

Влиянието на матрицата е оценено чрез сравняване на калибровъчните параметри, получени от разтвор на стандарти, съдържащи хинолони и стандарти, добавяни към всяка от матриците. Изчислено е отношението на наклоните на калибровъчните прави (получени по метода на външния стандарт и по метода на външен стандарт в присъствие на матрица (matrix-matched calibration)). Получените най-ниско и най-високо отношение са представени на фигура 4. Както се вижда от фигурата матриците яйца и свински мускул влияят негативно на чувствителността на метода за всички изследвани хинолони. Отношение над 100% се получава само при Enro в яйца, Oxo и Flu в агнешки мускул и Nor в пилешки мускул. Следователно, препоръчваме калибриране в присъствие на матрица и всички следващи изследвания са проведени по този метод на калибриране.



Фиг. 4: Матричен ефект при определянето на хинолони с LC/FD. Отношение на наклоните е определено като отношение между наклона на калибрационната графика (крива), получена от стандартни разтвори и наклона на калибрационната графика (крива), получена при анализ на пилешки мускул с добавка на стандарт.

Използван е методът на външния стандарт, добавян към матрицата (matrix matched calibration curve).

Таблица 3 представя аналитичните характеристики на метода: линеен обхват, точност (аналитичен добив), прецизност (RSD), долна граница на количествено определяне (LOQ), граница на откриване (LOD). Калибрационните графики (криви) са получени от шест калибрационни стандартни разтвора, както и от проби, приготвени чрез добавяне на стандартна смес от хинолони към чист пробен материал (не съдържащ хинолони). Линейният обхват на метода е определен при концентрации от 0,5 до 2,5 x МДСОК за хинолони с определено МДСОК, а за хинолони без установена МДСОК – при най-ниската концентрация на калибровъчната права (LCP), [46].

Аналитичният добив е определен при концентрации, съответстващи на 0,5xМДСОК и при най-ниските концентрации от линейния обхват за хинолони,

Табл. 3:

Табл. 3: Аналитичен добив за хинолони, получен чрез разработения метод ВЕТХ с флуоресцентна детекция при концентрации, съответстващи на най-долната точка от калибровъчната права. За хинолони с МДСОК при концентрация, равна на 0,5 x МДСОК; за хинолони без установена МДСОК – при най-ниската концентрация на калибровъчната права:

Компонент/ матрица	Sara	Diflo	Cip	Enro	Dano	Oxo	Nal	Nor	Flu
<i>Яйца</i>									
МДСОК/MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$						-			
Оценявано ниво, $\mu\text{g kg}^{-1}$	5	15	25	25	20	25	25	25	40
Аналитичен добив, %	65	106	92	55	95	50	124	77	107
<i>Риба</i>									
МДСОК/MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	30	300	-	-	100	100	-	-	600
Оценявано ниво, $\mu\text{g kg}^{-1}$	15	150	50	50	50	50	15	15	300
Аналитичен добив, %	120	128	118	120	122	116	119	111	116
<i>Мускул агне</i>									
МДСОК/MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	400	100	200	100	-	-	200	-
Оценявано ниво, $\mu\text{g kg}^{-1}$	50	200	50	50	100	50	50	50	100
Аналитичен добив, %	84	64	96	81	80	81	86	78	119
<i>Мляко</i>									
МДСОК/MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	-	100	30	-	-	-	50	-
Оценявано ниво, $\mu\text{g kg}^{-1}$	15	15	50	50	15	15	25	25	25
Аналитичен добив, %	91	75	100	111	102	61	108	117	97

<i>Мускул пиле</i>									
МДСОК/MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	10	300	100	200	100	-	-	400	-
Оценявано ниво, $\mu\text{g kg}^{-1}$	5	150	50	50	100	50	25	25	200
Аналитичен добив, %	80	57	75	90	100	124	113	95	99
<i>Бъбрек прасе</i>									
МДСОК/MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	800	200	400	150	-	-	1500	-
Оценявано ниво, $\mu\text{g kg}^{-1}$	400	400	100	100	200	75	75	75	750
Аналитичен добив, %	100	120	90	67	125	56	40	60	42
<i>Пчелен мед</i>									
МДСОК/MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Оценявано ниво, $\mu\text{g kg}^{-1}$	15	100	15	15	15	15	15	15	150
Аналитичен добив, %	99	86	126	104	101	118	95	101	108

V. 1. 5. Разработване на метод за определяне на хинолони с течна хроматография с маспектрометрия (LC/MS/MS).

За да се намали времето за анализ и да се повиши чувствителността на аналитичния метод, е изследвано разделяне на аналитите с течна хроматография с обратна фаза и маспектрална детекция, като са използвани ново поколение хроматографски колони: Kinetex PFP (core-shell particles), Poroshell 120 EC C18 (core-shell particles), Synergi Polar RP (fully porous particles, порести частици), Gemini C18 (fully porous particles, напълно порест материал). Определянето на хинолоните се провежда на система LC-MS/MS System TSQ Quantum Discovery MAX (Thermo Electron Corporation). Разработени са няколко програми за градиентно елеуиране, подходящи за всяка изследвана колона (таблица 4).

Табл. 4:

Колона	Poroshell 120 EC-C18		Synergi Polar RP		Gemini C18		
	Kinetex PFP						
Време, min	ACN ^a , %	H ₂ O ^a , %	ACN ^a , %	H ₂ O ^a , %	Време, min	ACN ^a , %	H ₂ O ^a , %
0	80	20	85	15	0	95	5
0.5	80	20	85	15	6	70	30
4.0	45	55	45	55	10	30	70
4.20	20	60	20	60	12	30	70
5.00	80	20	85	15	12.5	95	5
8.00	80	20	85	15	15	95	5

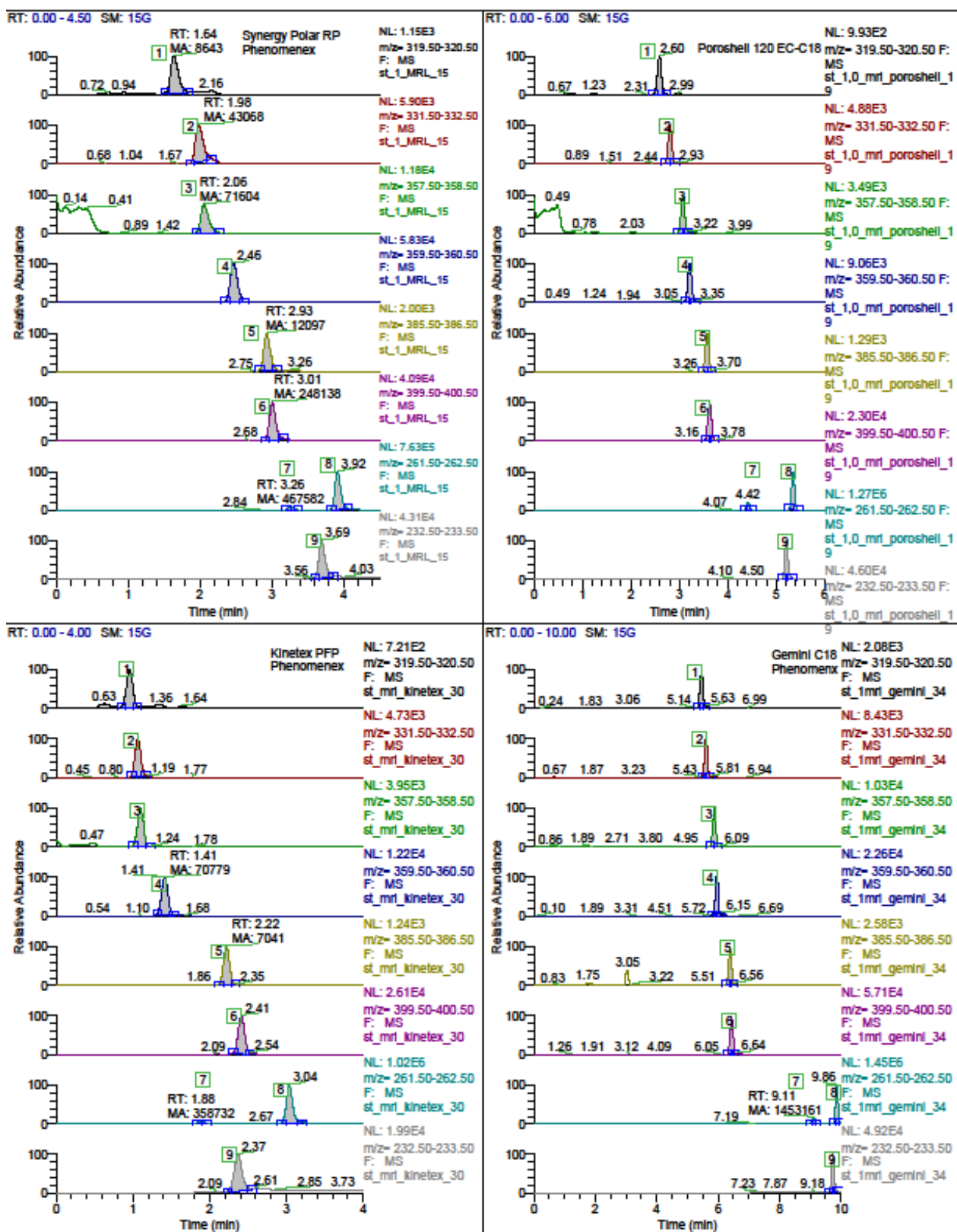
^a Всички разтворители съдържат 0.1 % (v/v) HCOOH

Резултатите показват, че времето за анализ при разделянето на всички девет анализа е: 5 min за колона Poroshell, 8 min за Kinetex и Synergy, и 15 min за колона Gemini. Времето за разделяне на колона Gemini е по-голямо в сравнение с останалите изследвани колони, но е достатъчно съкратено, за да се осигури добро разделяне на анализите при ниска консумация на разтворители.

ESI-MS/MS детектирането на хинолоните е направено с масспектрометър с троен квадрупол. Използва се положителна йонизация. Йоните са мониторирани с подхода за наблюдение на множествена реакция, multiple reaction monitoring (MRM). Времето на задържане, необходимо за преход, е 100ms. Наблюдават се два прехода, необходими за идентификация, а за количествено определяне се използва само един от продуктовете йони. По литературни данни са избрани по два продуктови йона за всеки определян компонент (от съответния родителски йон), за да се изпълни условието от актуалното законодателство, изискващо минимален общ резултат за три точки за идентифициране при прилагане на потвърдителен масспектрометричен анализ. Така всеки анализ се характеризира чрез хроматографско време на задържане и два продуктови йона, получени при фрагментация на съответния родителски йон. За количествено определяне се използва най-интензивният продуктов йон, а останалите два йона се използват за потвърждение. Получените хроматограми при инжектиране на стандартна смес, съдържаща 10 µg/kg от всеки хинолон, са представени на фигура 5. Както се вижда от фигурата хроматографските пикове са добре оформени и разделени, което позволява селективно и чувствително определяне на хинолони при едновременно присъствие. Тъй като молекулните маси на Охо и Flu са идентични, тяхното идентифициране се потвърждава чрез времената на задържане. Най-отчетлива разлика във времената на задържане на двата хинолона се наблюдава при колони

Kinetex PFP и Poroshell 120 EC-C18: 1.13 и 1.07 min, съответно. Въпреки че разликата във времената на задържане на Охо и Flu в колони Gemini и Synergy е по-малко: 0.7 min, двата хинолона могат да бъдат достоверно идентифицирани при разделяне с тези две колони.

Аналитичните характеристики на метода са изучени върху матрица риба за петте контролирани хинолона: Sar, Dif, Dan, Охо и Flu.



Фиг.5: TX-MC/MC (LC-MS/MS) хроматограми при MRM mode на ниво от 10 µg/kg всеки: (1) norfloxacin, (2) ciprofloxacin, (3) danofloxacin, (4) enrofloxacin, (5) sarafloxacin (6) difloxacin, (7) oxolinic acid, (8) nalidixic acid, (9) flumequine, разделени на колони: (A) Synergi Polar RP; (B) Poroshell 120 EC C18; (C) Kinetex PFP and (C) Gemini C18 columns

V. 1. 6. Валидиране на разработения хроматографски метод с флуоресцентна детекция

Методът е валидиран съгласно Решение на Комисията 2002/657/ЕО за матрици риба, мляко, яйца, пилешки, агнешки, свински мускул, бъбрек и пчелен мед. Оценяваните валидационни параметри са: специфичност, линеен обхват, аналитичен добив, прецизност (повторяемост и вътре-лабораторна възпроизводимост), критична граница (decision limit, CC_{α}), способност за откриване (detection capability, CC_{β}). Резултатите са представени в таблици 5-9. За аналити с установени МДСОК валидационните параметри са определени при концентрации, равни на 0.5 МДСОК, 1 МДСОК, 1.5 МДСОК и 2 МДСОК. За хинолони без установени МДСОК или минимално изисквана граница за ефективност, minimal required performance limit (MRPL), валидационните параметри са определени при концентрации, съответстващи на най-ниската точка от калибрационната графика (крива), означени като LCP: 1, 1.5, 2, и 2.5 x LCP. Подготвяни са по шест проби за всяко концентрация със стандартна добавка на смес от хинолони. Стандартната добавка се извършва преди започване, с подготовката на пробата. Всички проби със стандартна добавка са подложени на разработената и описана по-горе процедура за подготовка на пробата: течна екстракция, твърдофазна екстракция и HPLC анализ. За всяка концентрация на хинолоните са анализирани по шест проби, всяка проба е анализирана трикратно. Калибрационният обхват за всеки хинолон е в границите $(0.5-2.5) \times \text{МДСОК/MRL}$ или $(1-2.5) \times \text{LCP}$.

Границата на определяне, LOD, и границата на количествено определяне, LOQ, са определени за всяка от изследваните матрици, като е използвана стандартна смес

на хинолони. Стойностите са изчислени като три и десет пъти стандартно отклонение на базовата линия съответно, получена от хроматограма на екстракти на бланкови, чисти от съдържание на хинолони, проби с добавка на стандартна смес от девет хинолона на най-ниското детектируемо концентрационно ниво.

Специфичността на метода е определена чрез сравняване на хроматограми на смес от деветте изследвани хинолона, получени от стандартен разтвор, от матрица със стандартна добавка и от чиста от съдържание на хинолони проба (фигури 6 и 7). Анализирани са 20 чисти проби, като хроматограмите са сравнени с хроматограми на стандартни разтвори и проби с добавен стандарт.

Точността и прецизността на метода са оценени чрез определяне на аналитичен добив и възпроизводимост за всеки аналит във всяка от изследваните матрици. По 1g от шестте чисти от съдържание на хинолони проби от всяка матрица са с добавен стандартен разтвор на деветте хинолона на четири концентрационни нива: от 0.5 до 2.5 МДСОК/LCP. Така подготвените проби са обработени и анализирани трикратно. Аналитичният добив се изчислява за всяко валидационно ниво като отношение на получената стойност към концентрацията на стандартната добавка, представени в проценти. Използвана е калибровъчна графика, получена чрез добавяне на стандартна смес от хинолони към чиста от съдържание на хинолони матрица.

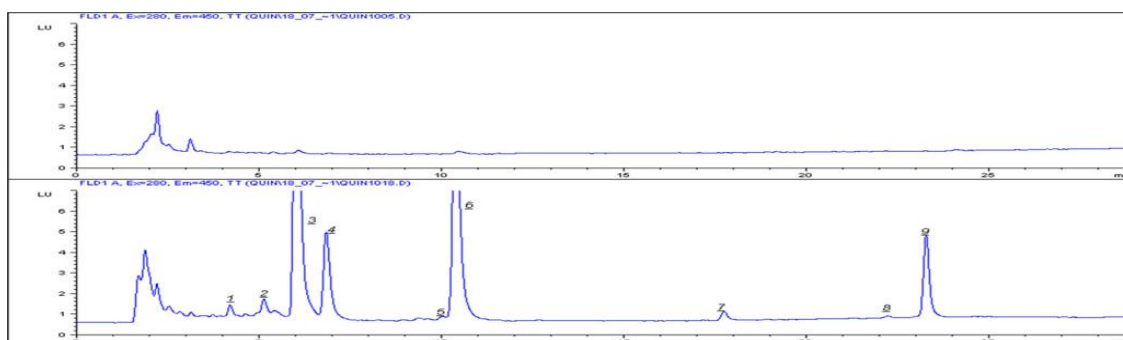
Определената критична концентрация, CC_{α} , е дефинирана като „концентрацията при и над която може да бъде заключено с вероятностна грешка α , че пробата е „несъответстваща““. За определяне на този показател бланковите (чистите от съдържание на хинолони) проби са обработени и анализирани със сместа на деветте хинолона при пет различни концентрации. След построяване на калибрационната графика (крива) и изчисляване на гореописаните показатели, CC_{α}

е изчислена като сума от МДСОК и $1.64 \times$ стандартното отклонение на вътрешно-лабораторна възпроизводимост или като сума от LCP и $2.33 \times$ стандартното отклонение ($\alpha 0.5\%$).

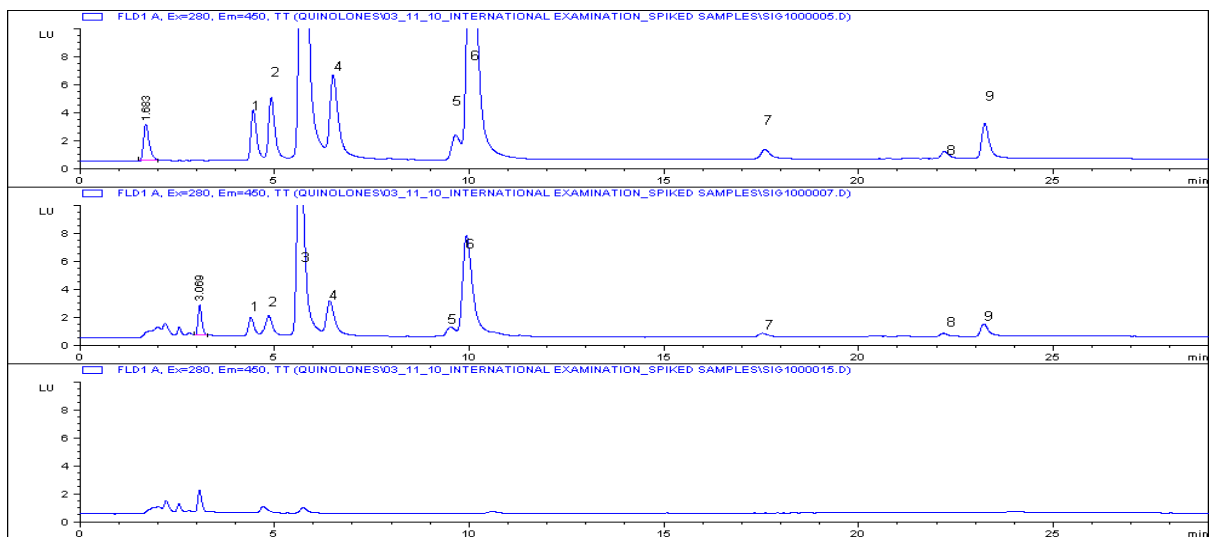
Способността за откриване, CC_{β} , е минималната концентрация, при която методът може да детектира проба, съдържаща аналит, с вероятностна грешка β . За целта към чистият от съдържание на хинолони материал е добавен стандартен разтвор на хинолони с концентрация под и над МДСОК/LCP. CC_{β} е изчислена като критична концентрация плюс $1.64 \times$ съответното стандартно отклонение, получено при анализ на двадесет чисти от хинолони проби, с добавка на стандарт с концентрация равна на МДСОК или LCP.

Дълговременната стабилност на хинолони е определена в свински мускул чрез сравняване на концентрации, определени при анализ на проби съхранявани за период от 3 месеца при температура от $(-18) ^\circ\text{C}$ спрямо резултатите от анализ на проби с добавен стандарт непосредствено преди извършване на подготовката на пробите за анализ.

Резултатите от валидиране на метода са представени в таблици 5-9 .



Фиг.6: TX-Фл (LC/FD) хроматограми на екстракти на (А) чиста, бланкова, проба риба и (В) проба риба с добавен стандарт смес от хинолони на ниво МДСОК или LCP: (1) Norf $30\mu\text{g kg}^{-1}$; (2) Cipro $100\mu\text{g kg}^{-1}$; (3) Dano $100\mu\text{g kg}^{-1}$; (4) Enro $100\mu\text{g kg}^{-1}$; (5) Sara $30\mu\text{g kg}^{-1}$; (6) Diflo $300\mu\text{g kg}^{-1}$; (7) Oxo $100\mu\text{g kg}^{-1}$; (8) Nal $30\mu\text{g kg}^{-1}$; (9) Flu $600\mu\text{g kg}^{-1}$



Фиг.7: ТХ-Фл (LC/FD) хроматограми на (а) стандартен разтвор на хинолони, (b) екстракти на свински мускул с добавен стандарт, и (с) екстракти на чист, бланков, свински мускул, получен с използването на колона C18 Zorbax Eclipse XDB с ACN/MeOH/HCOOH подвижни фази и програма за градиентно елуиране: (1) nor 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (2) cipro 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (3) dano 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (4) enro 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (5) sara 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (6) diflo 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (7) oxo 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (8) nal 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (9) flu 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Таблица 5: Параметри на валидиране на представения метод при определяне на хинолони в мляко

	МДСОК/ MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ан. добив, %	RSD, % n=54	Обхват	Наклон, slope	Отрез, Intercept	Кор. коефициент, r	ССа, $\mu\text{g.kg}^{-1}$	ССб, $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Sara ^b	-	89	22	15-75	1.531	1.0619	0.9905	22.7	24.7
Diflo ^b	-	107	23	15-75	0.5007	6.482	0.9697	21.3	25.8
Cip ^a	100	96	15	25-125	0.722	4.13	0.9723	56.2	62.3
Enro ^a		85	20	25-125	1.8348	13.038	0.9509	57.9	65.8
Dano ^a	30	77	12	15-75	10.297	27.03	0.9218	36.1	42.1
Oxo ^b	-	130	17	15-75	0.0955	1.373	0.9837	21.2	25.5
Nal ^c	-	95	17	25-125	0.0706	0.051	0.9928	33.2	39.0
Nor ^c	-	112	19	25-125	0.7416	3.981	0.9517	32.7	38.1
Flu ^a	50	101	22	25-125	0.2708	0.831	0.9976	79.4	108.8

^a Аналитичен добив и RSD са определени на концентрационно ниво МДСОК/MRL^b Аналитичен добив и RSD са определени на ниво $15\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c Аналитичен добив и RSD са определени на ниво $25\mu\text{g kg}^{-1}$

Таблица 6: Параметри на валидиране на представения метод при определяне на хинолони в риба

	МДСОК/ MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ан. добив, %	RSD, % n=54	Обхват, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Наклон, slope	Отрез, Intercept	Кор. Коефи- циент, r	СС α , $\mu\text{g kg}^{-1}$	СС β , $\mu\text{g kg}^{-1}$
Sara ^a	30	89	0.4	15-90	7.8367	30.698	0.9733	32.1	33.0
Diflo ^a	300	87	3.8	150-900	0.0152	0.9178	0.9286	308	317
Cip ^b	-	97	1.0	50-300	0.2608	9.0243	0.9705	104	108
Enro ^b	-	87	0.65	50-300	0.8791	20.912	0.9843	103	106
Dano ^a	100	91	0.5	50-300	4.2283	104.4	0.9821	104	107
Oxo ^a	100	94	2.5	50-300	0.0871	2.4124	0.9876	104	108
Nal	-	119	7.1	15-90	0.499	0.2954	0.9858	18	20
Nor ^c	-	119	6.9	15-90	0.1487	1.0919	0.9753	18	20
Flu ^a	600	96	0.6	300-1800	0.1148	16.552	0.989	608	615

^a Аналитичен добив и RSD са определени на концентрационно ниво МДСОК/MRL^b Аналитичен добив и RSD са определени на ниво $50\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c Аналитичен добив и RSD са определени на ниво $15\mu\text{g kg}^{-1}$

Табл.7: Параметри на валидиране на представения метод при определяне на хинолони в мускул пиле

	МДСОК/ MRL $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ан. добив, %	RSD %	Обхват, range $\mu\text{g kg}^{-1}$	Наклон, slope	Отрез, Intercept	Кор. Коефи- циент, r	ССа, $\mu\text{g kg}^{-1}$	ССб, $\mu\text{g kg}^{-1}$
Sara ^a	10	95	27	5-25	5.736	2.4389	0.9909	14.1	18.3
Diflo ^a	300	134	22	150-750	0.235	0.2153	0.9527	455.7	507.6
Cip ^a	100	108	35	25-125	0.045	1.4029	0.9926	109.9	117.9
Enro ^a		104	22	25-125	0.826	2.3881	0.9894	110.7	121.4
Dano ^a	200	105	26	100-500	6.074	19.347	0.9957	179.1	134.0
Oxo ^a	100	94	35	50-250	0.020	0.9249	0.9508	111.9	123.9
Nal ^b	-	108	25	25-125	0.048	0.0319	0.9916	32.3	37.4
Nor ^b	-	68	33	25-125	0.205	0.8731	0.9881	33.2	38.9
Flu ^a	400	96	27	200-1000	0.103	1.000	0.9921	467	533

^a Аналитичен добив и RSD са определени на концентрационно ниво МДСОК/MRL

^b Аналитичен добив и RSD са определени на ниво $25\mu\text{g kg}^{-1}$

Табл.8: Параметри на валидиране на представения метод при определяне на хинолони в мускул агне

	МДСОК, MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ан. добив, Recovery, %	RSD ^c , %	Обхват, range $\mu\text{g kg}^{-1}$	Наклон, slope	Отрез, intercept	Кор. Коефици- циент, r	СС _а , $\mu\text{g kg}^{-1}$	СС _в , $\mu\text{g kg}^{-1}$
Sara ^b	-	69	25	50-250	2.4175	11.596	0.9753	50.6	50.9
Diflo ^a	400	116	15	200-1000	0.0429	0.3602	0.9706	416.7	432.3
Cip ^a	100	76	34	25-125	0.2019	1.1519	0.9561	108.9	116.03
Enro ^a		80	22	25-125	0.6358	3.3199	0.9725	109.4	118.7
Dano ^a	200	102	18	100-500	3.0295	48.095	0.9677	212.2	224.5
Oxo ^a	100	105	17	50-250	0.1108	0.812	0.9525	109.6	119.3
Nal ^b	-	78	26	50-250	0.0414	0.0674	0.9616	58.7	64.9
Nor ^b	-	108	18	50-250	0.2486	1.4943	0.9828	58.4	64.3
Flu ^a	200	90	19	100-500	0.1148	4.689	0.9552	211.9	223.8

^a Аналитичен добив и RSD са определени на концентрационно ниво МДСОК/MRL^b Аналитичен добив и RSD са определени на ниво 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c n=54

Табл. 9: Параметри на валидиране на представения метод при определяне на хинолони в мускул прасе

	МДСОК, MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Аналитичен добив, Recovery, %	RSD ^d , %	Обхват $\mu\text{g kg}^{-1}$	Наклон, slope	Отрез, intercept	Кор. Коефи- циент, r	CC _w , $\mu\text{g kg}^{-1}$	CC _p , $\mu\text{g kg}^{-1}$
Sara ^b	-	100	1.2	400-2000	0.3297	219.09	0.9975	419.4	438.8
Diflo ^a	800	130	28	400-2000	0.1064	71.305	0.9954	833.4	866.8
Cip ^a	200	121	19	100-500	0.2433	18.969	0.9894	226.6	232.8
Enro ^a		140	23	100-500	0.5237	53.358	0.9805	219.5	221.5
Dano ^a	400	72	14	200-1000	1.2658	102.54	0.9711	415.9	432.8
Oxo ^a	150	40	10	75-375	0.0415	4.674	0.9905	95.5	109.7
Nal ^c	-	100	30	75-375	0.0231	3.8709	0.9882	92.7	105.3
Nor ^c	-	93	24	75-375	0.3207	39.63	0.9891	93.8	107.0
Flu ^a	1500	111	12	750-3750	0.0403	122.14	0.9604	1534.7	1569.3

^a Аналитичен добив и RSD са определени на концентрационно ниво МДСОК/MRL

^b Аналитичен добив и RSD са определени на ниво 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$

^c Аналитичен добив и RSD са определени на ниво 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$

^d n=54

VI. ОСНОВНИ ПРИНОСИ.

- Представен е метод за определяне на остатъци (точни концентрации) от различни вещества от групата на хинолоните в различни видове матрици (хранителни продукти с животински произход), т.е. подходящ за определяне на хинолони в храни с животински произход и пчелен мед, указани в Регламент №37/2010/ЕС.
- Разработен е протокол за екстрахиране на анализираните компоненти с ацетонитрил, както и процедура за очистване на получените екстракти. Представената подготовка на пробите е определена като достатъчно ефикасна за едновременно количествено извличане на деветте хинолона във всяка една от изследваните матрици.
- Изследването представя резултати от разработването на метод за определяне на остатъчни количества хинолони в различни видове матрици, т. нар. *multimatrix/multispecies method*, чрез течна хроматография комбинирана с флуоресцентно детектиране и масспектрометрия. От гледна точка инструментален анализ и широкият спектър на приложение на метода за контрола на храни, течната хроматография с флуоресцентно детектиране е добър избор - отличава се с достатъчна чувствителност за количествено определяне на означените хинолони. ТХ-Фл (LC-Fl) методът позволява лесно приложение и относително евтино оборудване.
- Анализите се разделят чрез градиентно елуиране и се детектират с разработените програма за градиентно елуиране и двустепенна програма за промяна дължините на вълните в хода на анализа. Така определянето на деветте вещества е за време от 22 min. Резултатът от разработената процедура за инструментален анализ е намаляване на разхода на разтворител и редуциране на времето за анализ.
- В опит да се подобри времето за анализ, да се повишат чувствителността и надеждността на метода, е изследвана и ефективността на четири вида нови хроматографски колони за разделянето на девет хинолона с последващо масспектрално детектиране. Течно хроматографският метод с масспектрометрична детекция, LC-MS/MS, има предимството на високо

чувствителен, надежден и дава възможността както за идентифициране, така и за изясняване структурата на анализите. LC-MS/MS заедно с новите видове хроматографски колони позволява определяне на хинолони за по-малко от 5 min. Колоните са с различни по вид стационарни фази, чиито частици са от напълно порест материал и core-shell частици. И двата метода, обаче, позволяват детекция на концентрационни нива, по-ниски от съответните МДСОК (т. нар. ПДК, MRL) за остатъци от хинолони в хранителни продукти (табл. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

- Изборът на техника за детектиране може да се извърши и според нуждите на анализа.
 - Методът е оптимизиран и валидиран съгласно Решение на Комисията 2002/657/ЕО (т. нар. Решение на Комисията 657) в различни видове храни (матрици), препоръчани от Европейските и Световни здравни власти: мляко, пилешки, агнешки, свински мускул, бъбрек, риба, пчелен мед и яйца. Представени са и резултатите от валидирането на метода.
 - Методиката се прилага като част от рутинната работа и е включена в обхвата на акредитация на ЦЛВСЕЕ, и като Националната Референтна Лаборатория, БАБХ..
-

В ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

- Разработен е хроматографски метод с флуоресцентно детектиране и масспектрална детекция за едновременно определяне на остатъчни концентрации на девет хинолона (norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, nalidixic acid, flumequine, danofloxacin, oxolinic acid) в девет аналитични обекта – храни с животински произход: пилешки, агнешки и свински мускули, свински бъбрек, мляко, риба, яйца, пчелен мед, препоръчани от европейските здравни власти, указани в Регламент 37/2010/ЕС.

- За целта са решени следните проблеми:

изследвани са и са намерени оптимални условия за: групова количествена екстракция на изследваните хинолони в анализираните обекти с ацетонитрил и изпаряване на разтворителя в поток от азот при температура от 60 °C без предварително обезмасляване на екстракта;

пречистване и концентриране на екстракта чрез твърдофазна екстракция с колони тип HLB (N-винилпирилидон DVB, съполимер с дивинилбензен).

Разработена е аналитична BETX (HPLC) процедура за разделяне на хинолоните на колона Zorbax Eclipse XDB C18 (150x3 mm, 5 µm) с градиентно елуиране и флуоресцентна детекция с програмирана промяна на дължините на вълните. Предложената процедура дава възможност да се анализират с достатъчна чувствителност деветте хинолона с естествена флуоресценция при малък разход на разтворител и за кратко време. Получените резултати за анализираните хинолони имат добра възпроизводимост и точност.

- Изследвано е разделянето на хинолоните с четири нови колони и е предложена ВЕТХ процедура с градиентно елуиране и масспектрометрична детекция.

Хроматографският метод, основан на тази процедура, притежава следните предимства: висока чувствителност, кратко време за хроматографско измерване (5 мин), възможност за анализ на хинолони без собствена флуоресценция.

- Методът е валидиран, съгласно Решение на комисията 2002/657/ЕО, и е включен в обхвата на акредитация на ЦЛВСЕЕ, като Национална Референтна Лаборатория, БАБХ.

VII. 1. Списък с публикации по темата на дисертация:

1. **N. Stoilova**, A. Surleva, G. Stoev, „Determination of Quinolones in Food of Animal Origin by Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence and Mass Spectrometric Detection”, *Acta Chromatographica* (2014), 26, pp 599–614
2. **N. Stoilova**, A. Surleva, G. Stoev, “Simultaneous Determination of Nine Quinolones in Food by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection”, *Food Anal. Methods* (2013), 6, pp 803–813
3. **Н. Стоилова** „Метод лабораторной диагностики хинолонов в пчелином меде”, *Journal VetPharma*, Moscow (2012), №1, pp 30-36; (in Russian)
4. **N. Stoilova**, M. Petkova, “Developing and validation of method for detection of quinolone residues in poultry meat”, *Trakia Journal of Sciences*, (2010), 8 (1), pp 64-69
5. **N. Stoilova**, “Determination of quinolones in fish tissues with high-performance liquid chromatography with fluorescence detection”, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, (2008), 43, pp 423-426

VII. 2. Постери, участия в научни сесии:

1. **N. Stoilova**, A. Surleva, G. Stoev, “Simultaneous determination of nine quinolones in food of animal origin by liquid chromatography with fluorescence detection”, *ISC 2012*, Torun, Poland, 09-13 September, 2012 (Проект BG051PO001-3.3.05-0001 „Наука и бизнес”, с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз, МОН)

VII. 3. Цитирания:

Цитирания на статия № 2 (“Simultaneous Determination of Nine Quinolones in Food by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection”) в:

1. Gilart N., Cormack P.A.G., Marcé R.M., Fontanals N., Borrull F. „Selective determination of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewaters using a novel strong cation-exchange solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 2014, volume 1325, issue, pp. 137–146;
2. Xiao-kun Ou Yang, Yu-Yang Luo et all „Simultaneous Determination of Flumequine and Oxolinic Acid Residues in Aquatic Products Using Pressurized Capillary Electrochromatography”, *Food Analytical Methods*, October 2014, Volume 7, Issue 9, pp 1770-1775;.
3. Ying Xu, Yiping Du, Oingqing Li, Xuan Wang, Yingcheng Pan, Han Zhang Ting, Ting Wu, Huilian Hu „Ultrasensitive Detection of Enrofloxacin in Chicken Muscles by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Amino-Modified Glycidyl Methacrylate-Ethylene Dimethacrylate (GMA-EDMA) Powdered Porous Material”, *Food Analytical Methods*, July 2014, Volume 7, Issue 6, pp 1219-1228; DOI: 10.1007/s12161-013-9736-z
4. Qinghai Xia, Yang Jiao, Wei Xiong, Yaling Yang, Mousheng Liu “Development of a Precolumn Derivatization Procedure Prior to Ultrasound-Assisted Cloud Point Extraction for Sensitive Determination of Fluoroquinolones in Eggs by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection”, *Food Analytical Methods*, 2013, 05; DOI: 10.1007/s12161-013-9725-2
5. Xiao-kun Ou Yang, Yu-Yang Luo, Zheng-Shun Wen, Wei-Jian Wu, Guo-Zhou Cao, Xiao-Yan Zhu, Li-Ye Yang, Yang-Guang Wang, Jie-Ying Dong “Simultaneous

Determination of Flumequine and Oxolinic Acid Residues in Aquatic Products Using Pressurized Capillary Electrochromatography”, Food Analytical Methods, 10/2014; 7(9):1770-1775, DOI: 10.1007/s12161-014-9818-6

6. Y. Verónica Talero-Pérez, Oscar Julio Medina, Wilson Rozo-Núñez “Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol” (Contemporary analytical techniques to identify residues of sulfonamides, quinolones and chloramphenicol), Journal of the Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana, is licensed under the Creative Commons 2.5 of Colombia: Attribution – Noncommercial; Univ. Sci., 2014, Vol. 19 (1): 11-28; doi: 10.11144/Javeriana.SC19-1.taci
Print version ISSN 0122-7483

Цитирания на статия № 4 (“Developing and validation of method for detection of quinolone residues in poultry meat”) в:

1. “Determinação de Fluoroquinolonas em Tecido Muscular de Aves” Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar sob a orientação da Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena. Setembro de 2013 Universidad di Coimbra hdl.handle.net/103016/26318

Цитирания на статия № 5 “Determination of quinolones in fish tissues with high-performance liquid chromatography with fluorescence detection” в:

1. Felismina T.C. Moreira, Victor A. P. Freitas, Maria G. F. Sales “Rapid screening of Norfloxacin in water”, Iberosensor 2010, 7th Ibero-American congress of sensors, November 9-11; 2010
2. Felismina T.C. Moreira, Victor A. P. Freitas, Maria G. F. Sales „Biomimetic norfloxacin sensors made of molecularly-imprinted materials for potentiometric transduction”, Microchimica Acta, February 2011, Volume 172, Issue 1-2, pp 15-23; DOI: 10.1007/s00604-010-0464-4;
3. D. Moema, M. M. Nindi, S. Dube „Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography”, Analytica Chimica Acta, 12 June 2012, Volume 730, Pages 80–86;
4. Yu Wang, Yu-Dong SHEN, Zhen-Lin XU, Hong-Tao LEI, Hong Wang, Yuan-Ming Sun Key “Production and Identification of Monoclonal Antibody Against Flumequine and Development of Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, Chinese Journal of Analytical Chemistry, March 2010, Volume 38, Issue 3, Pages 313–317
5. Chinese Journal of Analytical Chemistry 40/2012 DOI 10.3724/SP.J.1096.2012.11253
6. Chinese Journal of Analytical Chemistry 38/2012

Други публикации, не свързани с темата на дисертацията:

1. Pavlina Sasheva, Iliana Ionkova, **Nadezhda Stoilova**, “Methyl Jasmonate Induces Enhanced Podophyllotoxin Production in Cell Cultures of Thracian Flax (*Linum Thracicum* ssp. *thracicum*)”, “NPC Natural Product Communications”, 2015, VOL. 10, 1-2; Print accepted XX 2015;
2. **Stoilova N.**, Peycheva M., Petkova M., “LC-MS/MS determination of malachite green, crystal violet and brilliant green in fish products”, “Arhimed Journal of Science and Practice”, March 2015, № 4, ISSN 2306-7780;
3. T.Yankovska, **N. Stoilova**, M. Peycheva, S. Ivanova-Gocheva & A. Nazarov “Validation of analytical method for determination of 8-alpha-hydroxymutilin”, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2015, ISSN 1311-1477; online at: tru.uni-sz.bg/bjvm/bjvm.htm;
4. Т. Янковска - Стефанова, **Н. Стоилова**, „ Национална мониторингова програма за контрол на остатъци и развитие на контрола на остатъци от ВМП”, сп. „Ветеринарна сбирка”, 2014, 6-7, ISSN 0205-3829;
5. L. Costadinnova, M. Hristova, T. Kolusheva, **N. Stoilova**, “Conductometric study of the acidity properties of tannic acid (Chinese tannin)”, J. Univ. Chem. Technol. Metallurgy, 2012, 47 (3). 289-296;
6. **Stoilova N.**, M. Peycheva, T. Yankovska, “HPLC/FL method for histamine testing in fish”, Days of Veterinary Medicine, Ohrid, Macedonia, 2-4 September 2012
7. **N. Stoilova**, “Determination of Streptomycin Residues in Bee Honey”, Food Processing Industry Magazine, Food and Science, Issue 9/2008

8. N. Stoilova, M. Petkova, “Review of Sample Preparation Trends, HPLC-Methods and Detection Techniques used for Examination of Sulfonamides Residues in Bee Honey”, Food Processing Industry Magazine, Food and Science, Issue 1/2008

VII. 4. Други, не свързани с темата на дисертацията:

1. Т. Янковска-Стефанова, **Надежда Стоилова**, „Национална мониторингова програма за контрол на остатъци и развитие на контрола на остатъци от ВМП”, VII Национална научна конференция на Българския фокален център на EFSA към Център за оценка на риска, БАБХ; Научни доклади по безопасност на храните, 30. 10. 2014г., София
2. Yankovska Todorka, Peycheva Milena, **Stoilova Nadezhda**, P34: “LC-MS/MS Method for Thyreostatic Agents in Urine and Muscle”, Days of Veterinary Medicine 2013, 4th International Scientific Meeting 06-08 September 2013 Struga, Republic of Macedonia
3. **Stoilova N.**, M. Peycheva, T. Yankovska, “HPLC/FL method for histamine testing in fish”, Days of Veterinary Medicine, Ohrid, Macedonia, 2-4 September 2012
4. L. Costadinova, M. Hristova, T. Kolusheva, N. Stoilova, “Conductometric study of the protolysis of tannic acid (Chinese tannin)”, VIII Scientific poster Session,UCTM, Sofia, 18 May, 2011
5. L. Costadinova, M. Hristova, T. Kolusheva, **N. Stoilova**, “Conductometric study of the protolysis of tannic acid (Chinese tannin)”, Seventh National Conference on Chemistry, International Conference on Green Technologies and Environmental Protection, Sofia, Bulgaria, 26-29 May 2011.
6. **N. Stoilova**, M. Petkova, K. Krasteva, D. Semerdjieva, G. Stoev, “Determination of sulfonamides residues in honey with HPLC with fluorescence detection”, IV Scientific poster session – students, PhD students, young Scientifics, teachers, UCTM Sofia, Bulgaria, May 2007

VIII. Литература

1. Aguilera-Luiz M. M., Vidal J. L. M., Romero-González R., Frenich A. G., J Chromatogr A, (2008); 1205:10;
2. Aguilera-Luiz M. M., Vidal J. L.M., Romero-González R., Frenich A.G., Food Chem, (2012); 132:2171
3. Andreu V., Blasco C., Pico Y., Trends Anal Chem, (2007); 26:534
4. Bailac S., Ballesteros O., Jimenez-Lozano E., Barron D., Sanz-Nebot V., Navalon A., Vilchez J. L., Barbosa J., J Chromatogr A, (2004); 1029:145;
5. Bohm D. A., Stachel C. S., Gowik P., J Chromatogr A, (2009); 1216:8217
6. Chang C.-S., Wang W.-H., Tsai C.-E., J Food Drug Anal, (2010); 18:87
7. Choi J.-H., Mamun M. I. R., Abd El-Aty A. M., Park J.-H., Shin E.-H., Park J. Y., Cho S.-K., Shin S. C., Lee K. B., Shim J.-H., Food Chem, (2011); 127:1878
8. Christodoulou E. A., Samanidou V. F., Papadoyannis I. N. J Chromatogr B, (2007); 859:246
9. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities L221/8/17.8.2002
10. Frenich A. G., Aguilera-Luiz M. M., Vidal J. L. M., Romero-González R., Anal Chim Acta, (2010); 661:150
11. Galarini R., Fioroni L., Angelucci F., Tovo G., Cristofani E., J Chromatogr A, (2009); 1216:8158
12. Hassouan M. K., Ballesteros O., Zafra A., Vilchez J. L., Navalon A., J Chromatogr B, (2007a); 859:282

13. Hassouan M., Ballesteros O., Taoufiki J., Vilchez J., Cabrera-Aguilera M., Navalon A., J Chromatogr B, (2007b); 852:625
14. He H-B., Lv X-X., Yu Q-W., Feng Y-Q., Talanta, (2010); 82:1562
15. Hermo M. P., Nemutlu E., Kir S., Barron D., Barbosa J., Anal Chim Acta, (2008a) ; 613:98
16. Hermo M., Barron D., Barbosa J., J Chromatogr A, (2008b); 1201:1
17. Hernandez-Arteseros J. A., Barbosa J., Compano R., Prat M. D., J Chromatogr A, (2002); 945:1
18. Herrera-Herrera A. V., Hernandez-Borges J., Rodriguez-Delgado M. A., Herrero M., Cifuentes A., J Chromatogr A, (2011); 1218:7608
19. Ho C., Sin D., Tang H., Chung L., Siu A., J Chromatogr A, (2004); 1061:123
20. Jimenez V., Companyo R., Guiteras J., Talanta, (2011a); 85:596
21. Jimenez V., Rubies A., Centrich F., Companyo R., Guiteras J., J Chromatogr A, (2011b); 1218:1443
22. Junza A., Amatya R., Barron D., Barbosa J., J Chromatogr B, (2011); 879:2601
23. Kantiani L., Farre M., Barcelo D., J Chromatogr A, (2011); 1218:9019
24. Lombardo-Agui M., Gamiz-Gracia L., Cruces-Blanco C., Garcia-Campana A. M. J Chromatogr A, (2011); 1218:4966
25. Marazuela M. D., Bogialli S., Anal Chim Acta, (2009); 645:5–17
26. Pecoreli I., Galarini R., Bibi R., Al F., Casciarri E., Floridi A., Anal Chim Acta, (2003); 483:81
27. Prat M. D., Benito J., Compano R., Hernandez-Arteseros J. A., Grandos M., J Chromatogr A, (2004); 1041:27
28. Prieto A., Schrader S., Bauer C., Moder M., Anal ChimActa, (2011); 685:146

29. Rubies A., Vaquerizo R., Centrich F., Compano R., Granados M., Prat M. D., Talanta, (2007); 72:269
30. Runnqvist H., Bak S. A., Hansen M., Styris have B., Halling-Sørensen B., Björklund E., J Chromatogr A, (2010); 1217:2447
31. Samanidou V., Evaggelopoulou E., Trotsmuller M., Guo X., Lankmayr E., J Chromatogr A, (2008), 1203:115
32. Scortichini G., Annunziata L., Girolamo V., Buratti R., Galarini R., Anal Chim Acta, (2009) ; 637:273
33. Seifrtova M., Novakova L., Lino C., Pena A., Solich P., Anal Chim Acta, (2009); 649:158
34. Si-Jun Z., Cun L., Hai-Yang J., Bing-Yu L., Jian-Zhong S., Chin J Anal Chem, (2007); 35:786
35. Stolker A. A. M., Brinkman U. A. T., J Chromatogr A, (2005); 1067:15
36. Stubbings G., Bigwood T., Anal Chim Acta, (2009); 637:68
37. Sun H., He P., Lv Y., Liang S., J Chromatogr B, (2011); 852:145
38. Tsai W-H., Chuang H-Y., Chen H-H., Huang J-J., Chen H-C., Cheng S-H., Huang T-C., Anal Chim Acta, (2009); 656:56
39. Verdon E., Couedor P., Roudaut B., Sanders P., JAOAC Int, (2005); 88:1179
40. Wang Y., Baeyens W. R. G., Huang C., Fei G., He L., Ouyang J., Talanta, (2009); 77:1667
41. Xiao Y., Chang H., Jia A., Hu J., Journal of Chromatography A, (2008), 1214, 100
42. Yan H., Wang H., Qin X., Liu B., Du J., J Pharm Biomed Anal, (2011); 54:53
43. Yu Y-J., Wu H-L., Shao S-Z., Kang C., Zhao J., Wang Y., Zhu S-H., Yu R. Q., Talanta, (2011); 85:1549
44. Zheng M-M., Ruan G-D., Feng Y-Q., J Chromatogr A, (2009); 1216:7510

45. Zheng M-M., Gong R., Zhao X., Feng Y-Q., J Chromatogr A, (2010); 1217:2075
46. Lowest point of the calibration curve (LCP): anon. 2005 vol. 8 Notice for applicants, Veterinary medicine products: establishment of maximum residues of Veterinary products in foodstuffs of animal origin: Development and validation of a proposed regulatory method EMEA/CVMP/573/00

„DETERMINATION OF QUINOLONES RESIDUES IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION AND MASS SPECTROMETRY“

SUMMARY: A confirmatory analytical method for simultaneous determination of nine regulated quinolones (Council Regulation 2377/90/ECC) in six matrices of animal origin is proposed. The sample pre-treatment involves double step liquid extraction with acetonitrile and purification by solid-phase extraction on Oasis HLB cartridges. The proposed sample pre-treatment protocol was applied to each of the six studied matrices without any modification. The quinolones were separated by liquid chromatography on C18 Zorbax column with gradient elution program. Aqueous formic acid, methanol, and acetonitrile were used as a mobile phase. A multi-wavelength excitation/emission program was used for sensitive fluorescence detection of quinolones. The method was validated according to Commission Decision 2002/657 EC. Tandem mass spectrometric detection (LC-MS/MS) was studied as a versatile tool for fast and reliable determination of nine regulated quinolones in food of animal origin (Council Regulation 2377/90/ECC; Reglament 37/2010/EC). The separation efficiency of newly available chromatographic columns: Gemini C18 and Synergi Polar RP (fully porous particles), as well as Kinetex PFP and Poroshell 120 EC-C18 (core-shell particles), was studied in liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis. Appropriate gradient elution program was designed for each column. Multiple reaction monitoring was used for selective determination of each quinolone. LC-MS/MS allowed quinolones determination in less than 5 min. Residues were quantified down to 15- $\mu\text{g kg}^{-1}$ with limits of detection and quantification ranging from three to 50- $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 7.5 to 100- $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The recoveries at the maximum residual limits (MRL) were between 77 and 120 % with RSD values lower than 30 %. For quinolones without established MRL or maximum required performance limit (MRPL), the accuracy and precision of the method were estimated at concentration levels corresponding to the lowest linear calibration point and recoveries between 70 and 130 % were achieved. Decision limits, detection capability, linear range in eggs, milk, fish, ovine muscle, chicken muscle, and porcine kidney are also reported. Both methods showed detection limits below maximum residue limits for quinolones residues in food commodities. **NOVELTY STATEMENT:** The proposed method for quinolones determination by liquid chromatography with fluorescence detection after two-step liquid extraction and SPE clean-up has an advantage to be applicable to different matrices without modification. The combination of the proposed double extraction and HLB-cartridge based clean-up procedure using ACN as a solvent improves the analytes purification and concentration. Method was validated in: eggs, milk, fish, ovine muscle, chicken muscle, and porcine kidney according to Commission Decision 2002/657 EC.