

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vytautas Tamošiūnas

SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJA–TANDEMINĖ MASIŲ  
SPEKTROMETRIJA ANTIBIOTIKŲ NUSTATYMOI  
MAISTO PRODUKTUOSE

Daktaro disertacija  
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2004 – 2008 metais Vilniaus universitete ir Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Audrius Padarauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

## TURINYS

PAGRINDINĖS SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Efektyvioji skysčių chromatografija: vystymosi tendencijos	9
1.1.1. Ultraefektyvioji skysčių chromatografija	9
1.1.2. Aukštatemperatūrė skysčių chromatografija	14
1.1.3. Masių spektrometrinis detektavimas	19
1.2. Maisto sauga Europos Sąjungoje	28
1.3. Antibiotikų savybės ir nustatymas	33
1.3.1. Chloramfenikolis	33
1.3.2. Sulfonamidai	38
1.3.3. Nitroimidazolai	42
2. EKSPERIMENTO METODIKA	46
2.1. Aparatūra	46
2.2. Reagentai ir tirpalai	46
2.3. Mėginių paruošimo procedūros	47
2.4. Metodų įteisinimo procedūros	49
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	50
3.1. Chloramfenikolio tyrimai ESCh-MS/MS metodu	50
3.1.1. MS/MS detektavimo sąlygų parinkimas	50
3.1.2. Chromatografinio atskyrimo sąlygų optimizavimas	52
3.1.3. Ekstrakcija ir ekstraktų valymas	54
3.1.4. Metodo analizinės charakteristikos	56
3.2. Sulfonamidų nustatymo ESCh ir UESCh metodais tyrimas	61
3.2.1. MS/MS detektavimo sąlygų parinkimas	61
3.2.2. Sulfonamidų atskyrimas ESCh ir UESCh metodais	64
3.2.3. Kiaušinių ir medaus mėginių paruošimas	66
3.2.4. ESCh ir UESCh analizinių charakteristikų palyginimas	69
3.3. Nitroimidazolų nustatymas kiaušiniuose UESCh-MS/MS metodu	74

3.3.1. UESCh atskyrimo ir MS/MS detektavimo sąlygų parinkimas	75
3.3.2. Ekstrakcija ir ekstraktų valymas	78
3.2.4. UESCh-MS/MS metodo įteisinimas	81
3.4. Palyginamieji tyrimai ir lietuviškos maisto produkcijos stebėsena	84
IŠVADOS	88
Mokslinių publikacijų, apibendrintų daktaro disertacijoje, sąrašas	91
PADĖKA	91
LITERATŪROS SĄRAŠAS	92

## PAGRINDINĖS SANTRUMPOS

**ACN** - acetonitrilas  
**APCI** - atmosferos slėgio cheminė jonizacija  
**CAP** - chloramfenikolis  
**DCh** - dujų chromatografija  
**DLK** - didžiausia leistina koncentracija  
**DMZ** - dimetridazolas  
**ESCh** - efektyvioji skysčių chromatografija  
**ESI** - elektrošrauto jonizacija  
**EtOAc** - etilacetatas  
**HEX** - heksanas  
**IPZ** - ipronidazolas  
**IPZOH** - 1-metil-2-(2'-hidroksiizopropil)-5-nitroimidazolas  
**KFE** - kietafazė ekstraktacija  
**MeOH** - metanolis  
**MHMNI** - 1-metil-2-hidroksimetil-5-nitroimidazolas  
**MNZ** - metronidazolas  
**MNZOH** - 1-(2-hidroksietil)-2-hidroksimetil-5-nitroimidazolas  
**MS** - masių spektrometrija  
**MS/MS** - tandeminė masių spektrometrija  
**NIZ** - nitroimidazolai  
**RNZ** - ronidazolas  
**SA** - sulfonamidai  
**SAC** - sulfacetamidas  
**SBZ** - sulfabenzamidas  
**SDZ** - sulfadiazinas  
**SMD** - sulfadimetoksinas  
**SMZ** - sulfametazinas  
**SMR** - sulfamerazinas  
**SMT** - sulfametizolas  
**SMX** - sulfametoksazolas  
**SPY** - sulfapiridinas  
**STZ** - sulfatiazolas  
**TCA** - trichloracto rūgštis  
**TNZ** - ternidazolas  
**UESCh** - ultraefektyvioji skysčių chromatografija  
**QIT** - kvadrupolinė jonų gaudyklė

## ĮVADAS

Dideli vaistų kiekiai, naudojami veterinarijoje ligų profilaktikai, jų gydymui ir maistinių gyvūnų augimo skatinimui neišvengiamai susiję ir su jų likučių bei metabolitų patekimu į maisto produktus. Tokiomis medžiagomis užterštų maisto produktų vartojimas gali sukelti visą eilę ligų, tarp kurių neabejotinai dominuoja vėžiniai susirgimai. Pvz., sulfonamidų likučiai pasižymi stipriu kancerogeniniu poveikiu bei labai padidina žmogaus organizmo atsparumą antibiotikams. Veterinarinių vaistų ir augimo skatintojų likučiai yra bene didžiausia ir griežčiausiai kontroliuojama sritis. ES šios medžiagos suskirstytos į dvi grupes: A grupė – visiškai uždrausti naudoti vaistai (pvz., chloramfenikolis, nitroimidazolai ir kt.), ir B grupė – vaistai kuriems numatytos didžiausios leistinos koncentracijos (DLK). Jei konkretus vaistas neturi numatytos DLK vienoje ar kitoje matricoje, laikoma, kad jo naudojimas yra draudžiamas. Siekiant kontroliuoti veterinarinių vaistų naudojimą, būtina nuolatinė vaistų likučių ir jų metabolitų stebėseną maisto produktuose. Tam reikalingi efektyvūs, jautrūs ir patikimi analizės metodai.

Jau daugiau nei tris dešimtmečius dominuojančiu cheminės analizės metodu yra chromatografija. Chromatografijos populiarumą lėmė tai, kad šis metodas jungia dvi labai svarbias analizei procedūras: analičių atskyrimą ir jų kiekybinį nustatymą. Be to, chromatografijos metodų pagalba galima analizuoti labai platų junginių spektrą, pradedant paprastais neorganiniais jonais ir baigiant sudėtingais bioorganiniais junginiais. Nelakių, dažniausiai ganėtinais polinių bei nepasižyminčių dideliu terminiu stabilumu antibiotikų nustatymui neabejotinai tinkamiausias metodas - efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh). Pastarąjį dešimtmetį sėkmingai apjungus ESCh su masių spektrometriniu (MS) detektoriumi, jis tapo nepakeičiamu identifikavimo ir kiekybinio nustatymo metodu maisto produktų analizėje. Šio metodo svarba dar labiau išaugo neseniai sukūrus ir pritaikius ESCh tandeminės masių spektrometrijos (MS/MS) detektorių, kuriame masių analizė atliekama dviejų nuosekliai sujungtų per skaldymo celę masių spektrometrų pagalba. Pirmajame masių spektrometre analizės yra švelniai jonizuojamos,

„rūšiuojamos“ ir „sveriamos“, po to konkrečiai analitei būdingas molekulinis jonas fragmentuojamas skaldymo celėje, o pasirinktas fragmentas ar keli fragmentai vėl „rūšiuojami“ ir „sveriami“ antrajame masių spektrometre. Tokioje sistemoje labai išauga detektavimo jautris ir atrankumas bei smarkiai sumažėja mėginio matricos įtaka, todėl ESCh-MS/MS idealiai tinka sudėtingos matricos mėginiams tirti. Tobulėjant detektavimo technikai limituojančiu faktoriumi ESCh metode tapo chromatografinio atskyrimo etapas. Dėl riboto chromatografinių sistemų efektyvumo sudėtingesnių mišinių atskyrimas dažnai trunka 30 ir daugiau min. 2004 m. buvo komercializuota nauja ESCh sistema – ultraefektyvioji skysčių chromatografija (UESCh), sudaryta iš naujos kartos 1000 bar maksimalaus slėgio binarinio siurblio, dideliems slėgiams pritaikytos automatinės mėginio įleidimo sistemos bei dideliems slėgiams atsparaus, porėto 1,7 μm dalelių dydžio etilsiloksano/silikagelio hibridinio sorbento. Tai leido ženkliai pagerinti atskyrimo efektyvumą ir atrankumą bei pagreitinti atskyrimą. Tokiu būdu, UESCh metodas sujungtas su MS/MS detektoriumi iškelia naujus uždavinius analitikams ir suteikia puikią progą ištirti jo galimybes bei pritaikomumą vienoje iš sudėtingiausių analizės sričių - vaistų likučių nustatymui biologiniuose objektuose.

**Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas** – nuodugniai ištirti ir pritaikyti efektyviosios ir/arba ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos metodus kai kurių antibiotikų nustatymui maisto produktuose.

**Disertacinio darbo uždaviniai:**

1. Optimizuoti chloramfenikolio, sulfonamidų ir nitroimidazolų bei jų metabolitų MS/MS detektavimo sąlygas bei atskyrimo efektyviosios ir/arba ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu sąlygas.
2. Ištirti ir optimizuoti naujas chloramfenikolio, sulfonamidų, nitroimidazolų bei jų metabolitų ekstrakcijos iš maisto produktų ir ekstraktų valymo procedūras.
3. Remiantis ES reikalavimais nuodugniai įvertinti metodų analizines charakteristikas.

4. Įteisinti ir panaudoti naujus metodus maisto produktų kontrolei.

**Ginamieji teiginiai:**

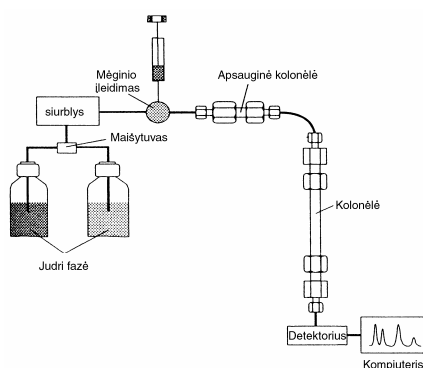
1. Tandeminė masių spektrometrija – labai atrankus ir jautrus detektorius, puikiai tinkantis sudėtingos matricos biologinių mėginių tyrimui.
2. Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodas yra efektyvesnis, atrankesnis, greitesnis ir tikslesnis už efektyviosios skysčių chromatografijos metodą.
3. Paruoštos chloramfenikolio, sulfonamidų, nitroimidazolų bei jų metabolitų ekstrakcijos iš maisto produktų ir ekstraktų valymo procedūros yra greitos ir efektyvios.
4. Optimizuoti ESCh/UESCh-MS/MS metodai tenkina ES reikalavimus vaistų likučių nustatymo metodams.



# I. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Efektyvioji skysčių chromatografija: pagrindinės vystymosi tendencijos

Efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh) – vienas iš plačiausiai šiuolaikinėje analizėje taikomų metodų [1]. Vienas iš pagrindinių ESCh metodo privalumų, sąlygojančių šio metodo populiarumą, galimybė naudojant tą pačią įrangą nustatyti labai platų junginių spektrą, pradedant paprastais neorganiniais jonais ir baigiant sudėtingomis biomolekulėmis. Principinė šiuolaikinio skysčių chromatografo schema pavaizduota 1.1 pav. Norint pereiti nuo vieno prie kito ESCh varianto, dažniausiai tereikia pakeisti kolonėlę ir/arba judrią fazę.



1.1 pav. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodo principinė schema.

Nuo pat ESCh metodo atsiradimo (~1965 m.) vyko nuolatinis jo tobulinimas siekiant pagerinti efektyvumą, atrankumą, pagreitinti atskyrimą bei padidinti detektavimo jautrį [2].

### 1.1.1. Ultraefektyvioji skysčių chromatografija

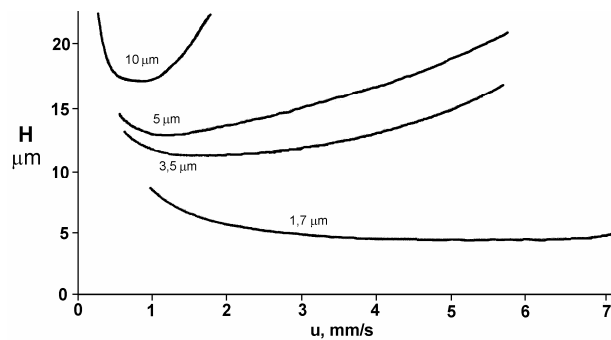
Chromatografinės sistemos efektyvumo didinimas yra bene ryškiausia ESCh vystymo kryptis, kadangi efektyvumo padidinimas ne tik pagerina atskyrimo atrankumą, bet įgalina pagreitinti atskyrimą bei padidina detektavimo jautrį. Kolonėlės efektyvumas (teorinių lėkštelių skaičius  $N$ ) susijęs su sorbento dalelių skersmeniu ( $d_p$ ) [3]:

$$N \propto \frac{1}{d_p}$$

Taigi, sumažinus sorbento dalelių dydį 2 kartus, efektyvumas taip pat padidės dvigubai. Be to, sorbento dalelių dydžio sumažinimas ne tik pagerina efektyvumą, bet ir leidžia didinti judrios fazės greitį ir taip pagreitinti atskyrimą be didelių efektyvumo nuostolių. Tai iliustruoja *Van Deemter'io* lygtis, aprašanti teorinės lėkštelės aukščio priklausomybę nuo judrios fazės linijinio tekėjimo greičio:

$$H = A(d_p) + \frac{B}{u} + C(d_p^2) \cdot u$$

$H$  – teorinės lėkštelės aukštis (cm, mm);  $u$  – linijinis judrios fazės tekėjimo greitis (cm/s, mm/s);  $A$ ,  $B$  ir  $C$  – dydžiai, aprašantys skirtingų difuzijos procesų (sukūrinės difuzijos, molekulinės difuzijos ir pasipriešinimo masių mainams tarp fazių) įtaką efektyvumui.



**1.2 pav.** Teorinės lėkštelės aukščio priklausomybės nuo linijinio judrios fazės tekėjimo greičio skirtingo dydžio sorbento dalelėms skysčių chromatografijoje.

Pirmasis ir trečiasis dėmenys pateiktoje lygtyje susiję su sorbento dalelių dydžiu. Pvz., dvigubai sumažinus sorbento daleles, sukūrinės difuzijos įtaka efektyvumui sumažės 2 kartus, o pasipriešinimo masių mainams įtaka - net 4 kartus. ESCh metode didžiausią įtaką efektyvumui turi masių mainų tarp fazių procesas, todėl sumažinus sorbento daleles galima didinti judrios fazės tekėjimo greitį (greitinti atskyrimą) be žymesnių efektyvumo nuostolių. Tai iliustruoja 1.2 pav. pavaizduotos  $H$  priklausomybės nuo judrios fazės tekėjimo

greičio skirtingo dalelių dydžio sorbentams. Matome, kad 10  $\mu\text{m}$  dalelėms  $u$  verčių, duodančių minimalų  $H$  (t.y. maksimalų efektyvumą), intervalas yra labai siauras, todėl net ir nedidelis judrios fazės greičio padidėjimas susijęs su ženkliu efektyvumo praradimu. Tuo tarpu 1,7  $\mu\text{m}$  dalelėms net ir 2-3-kartinis judrios fazės greičio padidėjimas efektyvumo beveik neįtakoja.

Akivaizdu, kad perspektyviausias būdas padidinti efektyvumą, o tuo pačiu ir atskyrimo atrankumą bei greitį – sorbento dalelių mažinimas. Tai ir buvo viena iš ryškiausių ESCh metodo vystymosi tendencijų 1960-1985 m. Pvz., iki 1970 m. rinkoje dominavo 30-40  $\mu\text{m}$ , 1970-1985 m. – 10-20  $\mu\text{m}$ , o nuo 1985 - jau 3,5-5  $\mu\text{m}$  dalelių dydžio sorbentai [4]. Tačiau paskutinius 20 metų jokių esminių pokyčių šioje srityje nebuvo. Kokios priežastys stabdė sorbentų vystymą paskutinius 20 metų? Pagrindinė problema – smarkiai išaugantis slėgis prieš kolonėlę. Slėgis prieš kolonėlę ( $\Delta P$ ) susijęs su sorbento dalelių dydžiu [5]:

$$\Delta P \propto \frac{1}{d_p^2}$$

Taigi, sumažinus sorbento daleles dvigubai, slėgis išaugs net 4 kartus. Tradiciniai ESCh prietaisai leidžia dirbti slėgyje iki 400 barų, tuo tarpu naudojant 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  dalelių skersmens sorbentus standartinėse kolonėlose (10-20 cm ilgio ir 3-4,6 mm vidinio skersmens) slėgis išauga iki 800-2000 barų. Tokių slėgių neatlaiko nei chromatografijos aparatūra (siurbiai, mėginio įleidimo sistemos), nei tradicinėmis technologijomis sintetinami porėti sorbentai. Pavieniai tyrimai naudojant nekomercinę labai aukšto slėgio ESCh įrangą bei neporėtus ir todėl mechaniškai patvarius mažo dalelių dydžio sorbentus buvo atliekami jau nuo 1995 m. Bene ryškiausią pėdsaką paliko amerikiečių mokslininko Jorgenson grupės darbai [6-8], kuriuose buvo nuodugniai tyrinėjamas atskyrimas siaurose kapiliarinėse kolonėlose (30-100  $\mu\text{m}$  skersmens), užpildytose neporėtu 1,5  $\mu\text{m}$  dalelių dydžio sorbentu silikagelio pagrindu. Autoriams pavyko pasiekti labai greitus (<5 min) ir efektyvius (iki 300000 teorinių lėkštelių) organinių junginių mišinių atskyrimus, tačiau slėgiai prieš kolonėlę siekė net 4000-7000 bar. Be to,

neporėti sorbentai pasižymi nedidele talpa mėginiui ir silpnu analičių sulaikymu, todėl nėra labai tinkami praktiniams tikslams. Tuo tarpu porėtų sorbentų mechaninis patvarumas nepakankamas net ir 600-1000 bar slėgiams.

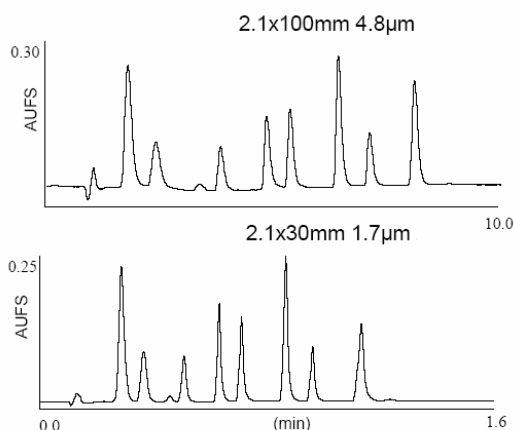
2003 m. Waters firma pasiūlė [9] naujos kartos porėtą ir mechanškai labai patvarų etilsiloksano/silikagelio hibridinį sorbentą (BEH). Tyrimai parodė [10], kad šis sorbentas net ir 4500 bar slėgyje puikiai išlaiko savo savybes. Ir jau 2004 m. [11] Waters firma pristatė komercinę ultraefektyviosios skysčių chromatografijos (UESCh) sistemą Acquity-UPLC, sudarytą iš:

- naujos kartos 1000 bar maksimalaus slėgio binarinio siurblio;
- automatinės mėginio įleidimo sistemos, pritaikytos dideliems slėgiams;
- sumažinto detektoriaus celės tūrio bei sistemos „tuščio“ tūrio;
- dideliems slėgiams atsparių, porėtų 1,7  $\mu\text{m}$  dalelių dydžio BEH tipo sorbentų, modifikuotų oktadecilo, oktilo arba fenilo ligandais.

Jei lyginsime UESCh ir ESCh metodus to paties ilgio kolonėlėms, sorbento dalelių dydį sumažinus nuo 5 iki 1,7  $\mu\text{m}$ , teoriškai efektyvumas turėtų padidėti 3 kartus, atrankumas pagerėti 1,7 karto ir detektavimo jautris padidėti 1,7 karto. Be to, padidinus judrios fazės tekėjimo greitį (tai padaryti leidžia 2,5 karto didesnis maksimalus darbinis slėgis) atskyrimą UESCh metodu galime pagreitinti iki 9 kartų be didesnių efektyvumo nuostolių [12].

Pirmieji darbai buvo skirti visapusiškam naujos UESCh sistemos tyrinėjimui siekiant įvertinti jos privalumus ir trūkumus. Belgų ir britų mokslininkų darbe [13] buvo lyginamas modelinių mišinių atskyrimas UESCh metodu su 1,7  $\mu\text{m}$  sorbentu ir ESCh metodu su 3,5 ir 5  $\mu\text{m}$  sorbentais. Buvo nustatyta, kad aukščiau išvardintos charakteristikos UESCh metode realiai pagerėja mažiau nei tai numato teorija. Pvz., lyginant su 5  $\mu\text{m}$  sorbentu atskyrimo trukmė sumažinama tik 4,5 kartus, o efektyvumas pagerėja 2,6 karto. Tai siejama su efektyvumą mažinančių šiluminių efektų (dėl stipriau pasireiškiančių trinties jėgų) sustiprėjimu mažesnėmis dalelėmis užpildytose kolonėlėse. Tačiau kitų autorių darbuose [14-16] buvo parodyta, kad daugeliu atveju, teisingai parinkus sąlygas UESCh metodu galima pagreitinti atskyrimą net iki 7-8 kartų. Taip pat pažymimos dar ir žymiai mažesnės (2-8 kartus)

tirpiklių sąnaudos UESCh metode. 1.3 pav. palygintas modelinio mišinio atskyrimas ESCh ir UESCh metodais. Matome, kad trigubai trumpesnė UESCh



kolonėlė leidžia pilnai atskirti 8 junginių mišinį maždaug 7,5 karto greičiau.

**1.3 pav.** Modelinio mišinio atskyrimo ESCh ir UESCh metodais palyginimas (Nepublikuoti Waters duomenys).

Kai jau įprasta chromatografinėi analizei, pirmiausiai UESCh metodas buvo pradėtas taikyti problematiškiausiose srityse, būtent biocheminiams (proteomikos ir metabolizmo) tyrimams, kuriuose tiriami labai sudėtingi mėginiai ir todėl reikalingas didelis efektyvumas bei aukšta skiriamoji geba [17-20]. Vėliau pasirodė eilė darbų skirtų farmaciniais [15, 21, 22], aplinkosauginiams [23, 24], maisto kokybės [25-27] ir kt. tyrimams.

**1.1 lentelė**

Komeraciniai mechaniškai patvarūs mažo dalelių dydžio sorbentai

Firma	Komeracinis pavadinimas	Dalelių skersmuo, µm
Agilent	Zorbax Rapid Resolution	1,8
Bischoff	TPP Ace	1,8
Eprogen	Micra NPS ODS	1,5
Grace (Alltech)	VisionHT, Rocket, and Expedite	1,5
Interchim	TSKgel Super ODS	2,0
Sepax	GP Series	1,8
Sepax	Proteomix™ SCX	1,7
Shimadzu	Pathfinder	1,5
Supelco	Acentis Express	2,7
Thermo Electron	Hypersil Gold	1,9
Waters	Acquity BEH	1,7
YMC	Ultra-Fast	2,0

Apibendrinant galime konstatuoti, kad tiek ir paties UESCh metodo ypatumų, tiek ir jo taikymo galimybių tyrimai dar tik įgauna pagreitį, todėl artimiausiu metu tikėtinas ryškus proveržis šioje srityje. Tai patvirtina ir toks faktas, kad naujausiais duomenimis eilė firmų jau gamina mechanškai patvarius mažo dalelių dydžio sorbentus ultraefektyviajai skysčių chromatografijai (1.1 lentelė).

### 1.1.2. Aukštatemperatūrė skysčių chromatografija

Ilgą laiką atskyrimai ESCh metodu buvo atliekami 20-50 °C temperatūrose. Pirmasis fundamentalus darbas apie temperatūros įtaką bei galimybes atlikti atskyrimus ESCh metodu aukštesnėse (100-200 °C) temperatūrose buvo publikuotas 1988 m. [28]. Slėgis prieš kolonėlę aprašomas lygtimi:

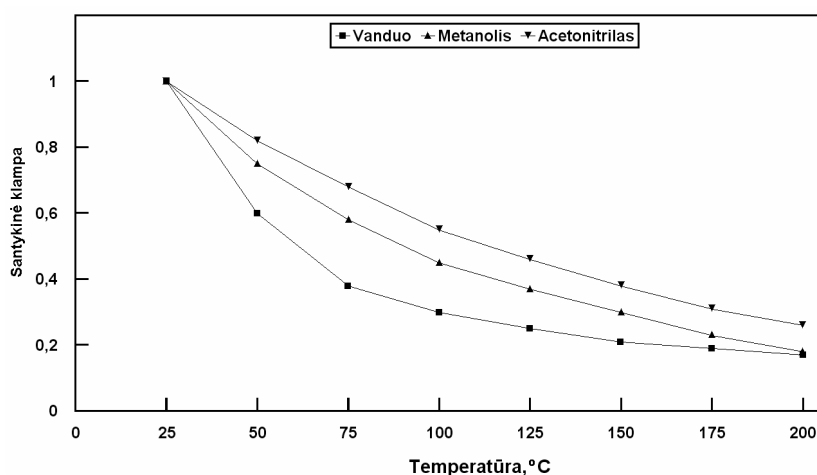
$$\Delta P = \frac{\varphi \cdot \eta \cdot L}{d_p^2} \cdot u$$

Čia  $\varphi$  – kolonėlės „pasipriešinimo“ faktorius;  $\eta$  – judrios fazės klampa;  $L$  – kolonėlės ilgis;  $u$  – judrios fazės linijinis tekėjimo greitis.

Matome, kad slėgis prieš kolonėlę priklauso ir nuo judrios fazės klamos, kuri, savo ruožtu, ženkliai sumažėja aukštesnėse temperatūrose. Iš 1.4 pav. pateiktų trijų tirpiklių santykinių klampų ( $\eta/\eta_{25^\circ\text{C}}$ ) priklausomybių nuo temperatūros matyti, kad padidinus temperatūrą nuo kambario iki 200 °C, jų klampa sumažėja maždaug 4-5 kartus. Tai leidžia naudoti mažesnio dydžio sorbentus (padidinti efektyvumą) ir/arba didesnę judrios fazės greitį (pagreitinti atskyrimą) išvengiant ženklaus slėgio padidėjimo. Be to, aukštesnėje temperatūroje analičių difuzija judrioje fazėje greitesnė. Tai pagreitina masių mainus tarp fazių ir papildomai dar padidina efektyvumą bei pagreitina atskyrimą.

Tačiau dar pakankamai ilgą laiką aukštatemperatūrės skysčių chromatografijos vystymą bei komercializaciją stabdė kelios problemos [29, 30]. Visų pirma, tradiciniai modifikuoti sorbentai silikagelio pagrindu yra termiškai nestabilūs ir aukštesnėse temperatūrose ( $\geq 60$  °C) labai pagreitėja siloksaninių ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ) grupių hidrolizė. Kita problema - papildomas smailių

išsiplėtimas aukštose temperatūrose dėl radialinio temperatūros gradiento kolonėlėje, kadangi į termostatuojamą kolonėlę patekusi judri fazė greičiau išyla prie kolonėlės sienelių nei kolonėlės centre. Galiausiai, žinodami, kad daugelio analizių stabilumas aukštesnėse temperatūrose sumažėja, nemaža dalis chromatografijos specialistų iš anksto buvo nusiteikę skeptiškai šio metodo atžvilgiu. Analizių terminio nestabilumo mitas buvo galutinai išklaidytas Carr'o ir bendraautorių darbuose [31, 32], kuriuose atlikus nuodugnius tyrimus įrodyta, kad net ir termiškai nelabai stabilūs junginiai būdami aukštoje temperatūroje tik kelias minutes išlieka nepakitę.



**1.4 pav.** Tirpiklių santykinų klampų priklausomybės nuo temperatūros.

Pirmieji sorbentai darbui aukštose temperatūrose buvo sukurti prieš 10 metų cirkonio pagrindu [33]. Šiuo metu jau galima įsigyti oktadecilu, polibutadienu ir anglimi modifikuotų cirkonio sorbentų, pasižyminčių ypač geru terminiu stabilumu. Agilent firma susintetino atsparų hidrolizei silikagelio sorbentą, kurio paviršiuje prijungti atitinkami ligandai (C18, C8, CN ar kt.) su dviem izobutilo funkcinėmis grupėmis (vietoje metilo) ligando šonuose, sferiškai apsaugojančiomis silikagelio matricą nuo hidrolizės [34]. Tačiau priešingai cirkonio sorbentams, šis sorbentas gali būti eksploatuojamas tik palyginti neaukštoje temperatūroje (iki 90 °C). Šiuo metu jau visa eilė firmų parduoda sorbentus darbui aukštose temperatūrose (1.2 lentelė).

## 1.2 lentelė

Komeraciniai sorbentai aukštatemperatūrei skysčių chromatografijai [34]

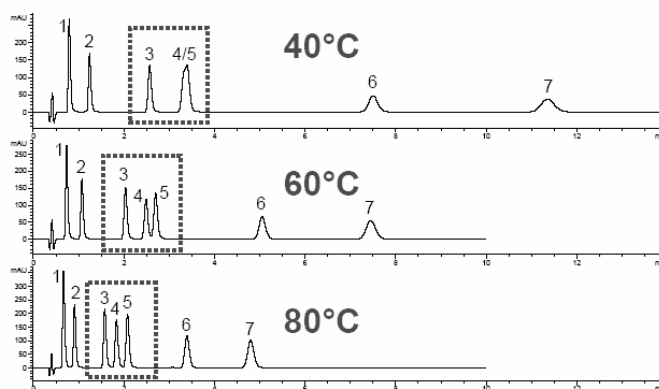
Firma	Sorbento matrica (funkcinės grupės)	Maksimali temperatūra, °C
Agilent	Sferiškai apsaugotas silikagelis (C18, C8, CN, fenilo)	90
Hamilton	Stireno-divinilbenzeno kopolimeras	150
Jordi	Poli-divinilbenzenas	150
Shimadzu	Polimere įkapsuliuotas silikagelis (C18, CN, fenilo)	200
Thermo Electron	Porėta grafitinė anglis	200
ZirChrom	Cirkonis (C18, polibutadienas)	150
Separations	Cirkonio-anglies kompozitas (C18)	200
Waters	Etilsiloksano-silikagelio hibridas (C18, C8)	80

Iki 2007 m. pabaigos buvo komercializuotos tik dvi sistemos aukštatemperatūrei skysčių chromatografijai: Metaloxm 200C (ZirChrom Separations) ir Polartherm™ 9000 (Selerity). Būtina pažymėti, kad šios sistemos – tai tik papildomi įrenginiai, suderinami su bet koku šiuolaikiniu ESCh prietaisu. Nemažai pastangų buvo įdėta siekiant išvengti smailių išsiplėtimo dėl radialinio temperatūros gradiento kolonėlėje. Buvo nustatyta [35], kad temperatūros gradientas visiškai eliminuojamas tik tuomet, kai į kolonėlę patenkančios judrios fazės temperatūra yra ne daugiau kaip 5 °C žemesnė už kolonėlės temperatūrą. Tokiu būdu, dirbant aukštose temperatūrose tarp mėginio įleidimo ir kolonėlės būtinas specialus judrios fazės pašildymo (*preheater*) įrenginys. Kita techninė problema – greitas judrios fazės temperatūros sumažinimas (<80 °C) prieš jai patenkant į detektorius (masių spektrometriniam detektoriumi aušinimas nereikalingas). Paprasčiausias būdas – patalpinti kapiliaro dalį tarp kolonėlės ir detektoriaus į ledo vonią – buvo naudojamas atliekant tyrimus su namų darbo įranga. Komeracinėse sistemose aušinimui naudojama amerikiečių mokslininkų patentuota sistema [36], pagrįsta šilumos mainais tarp priešinga kryptimi cirkuliuojančių atšaldytos judrios fazės kapiliaro išorėje ir karštos kapiliaro viduje. Maksimali tokių



sistemų darbinė temperatūra – 200 °C. Aukštesnės temperatūros nenaudojamos dėl judrios fazės perėjimo į superkritinį būvį.

Kaip jau buvo minėta, dirbant aukštesnėse temperatūrose su ta pačia kolonėle pagreitėja atskyrimas, sumažėja slėgis prieš kolonėlę, padidėja efektyvumas ir pagerėja atrankumas [37]. Tai iliustruoja 1.5 pav. palygintas pesticidų mišinio atskyrimas identiškose (kolonėlė, judri fazė, jos greitis) sąlygose trijose skirtingose temperatūrose.

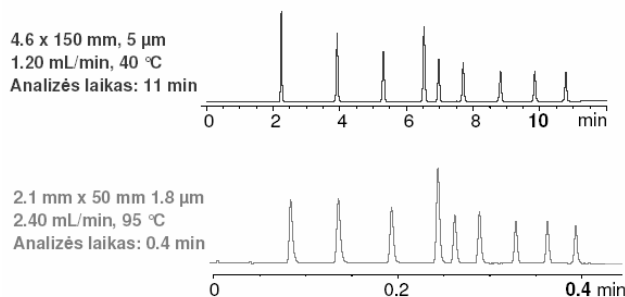


**1.5 pav.** Pesticidų atskyrimo prie skirtingų temperatūrų palyginimas (Dr. Pat Sandra nepublikuoti duomenys).

Be to, padidinus temperatūrą, galima papildomai padidinti efektyvumą mažinant sorbento dalelių dydį, tačiau išvengiant žybaus slėgio padidėjimo bei papildomai pagreitinti atskyrimą trumpinant/siaurinant kolonėlę ir/arba didinant judrios fazės greitį. Tai iliustruoja 1.6 pav. palygintos modelinio mišinio chromatogramos, gautos standartinėse ESCh sąlygose 40 °C temperatūroje ir trigubai trumpesnėje ir siauresnėje kolonėlėje su mažesnio dydžio dalelėmis ir dvigubai didesniu judrios fazės greičiu 95 °C temperatūroje. Pasiektas efektas - 27 kartų greitesnis atskyrimas neviršijant ribinio (400 bar) slėgio bei išlaikant puikų atskyrimo atrankumą.

Reikėtų pabrėžti, kad didinant temperatūrą mažėja vandens dielektrinė konstanta (nuo 80,1 prie 20 °C iki 34,5 prie 200 °C), t.y. vandens poliškumas aukštesnėse temperatūrose sumažėja [38]. Jei normaliomis sąlygomis grynas vanduo nenaudojamas judria faze dėl labai nedidelės išstūmimo jėgos, tai

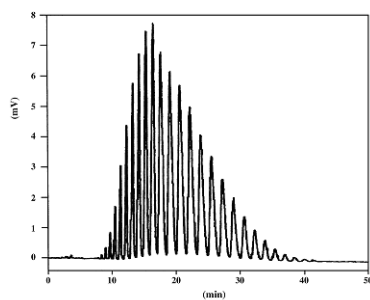
aukštesnėse temperatūrose jo išstūmimo jėga išauga (pvz., 150 °C temperatūroje vandens išstūmimo jėga prilygsta 50:50 v/v H<sub>2</sub>O-MeOH mišinio išstūmimo jėgai kambario temperatūroje [39]) ir grynas vanduo jau puikiai tinka judria faze. Tokiu būdu išvengiama brangių ir toksiškų organinių tirpiklių (metanolio, acetonitrilo) panaudojimo bei atveriamą galimybę detektavimui naudoti puikiai užsirekomendavusį dujų chromatografijoje (DCh) neįprastą vandeniu liempnos jonizacinį detektorius [40].



**1.6 pav.** Modelinio mišinio chromatogramos, gautos standartinėse ESCh sąlygose 40 °C temperatūroje ir trigubai trumpesnėje ir siauresnėje kolonėlėje su mažesnio dydžio dalelėmis ir dvigubai didesniu judrios fazės greičiu 95 °C temperatūroje (Nepublikuoti Agilent duomenys).

Galiausiai, greta jau paminėtų privalumų būtina pažymėti, kad aukštatemperatūroje skysčių chromatografijoje atsiranda papildoma galimybė įtakoti sudėtingų mišinių atskyrimą naudojant temperatūros gradientą [41]. Tai ypač aktualu atskiriant didelės molekulinės masės junginius, kurių atskyrimas tradiciniais ESCh variantais dažnai labai komplikotas dėl smarkiai sulėtėjančių masių mainų tarp fazių. 1.7 pav. pavaizduotas polietilenglikolių atskyrimas naudojant unikalų (įprastai atskyrimo metu temperatūra didinama) temperatūros mažėjimo gradientą [42].

Kadangi aukštatemperatūroje skysčių chromatografija dar tik pirmojoje savo vystymosi stadijoje (metodo ypatumų ir galimybių tyrimas), kalbėti apie metodo taikymą konkrečioms analizinėms problemoms spręsti dar anksti. Keletą pavyzdžių galime rasti neseniai publikuotoje apžvalgoje [37].



**1.7 pav.** Polietilenglikolių atskyrimas naudojant linijinį temperatūros mažėjimo gradientą nuo 90 iki 25 °C [42].

Lyginant UESCh ir aukštatemperatūrės skysčių chromatografijos sistemas susidaro išpūdis (beje teisingas), kad aukštatemperatūrė skysčių chromatografija yra lankstesnis ir todėl pranašesnis metodas. Tačiau UESCh sistemą papildžius atitinkamais priedais (kolonėlės termostatu, judrios fazės šildymo įrenginiu ir aušinimo sistema) ji tampa hibridine ultraefektyviosios+aukštatemperatūrės skysčių chromatografijos sistema su dar platesnėmis galimybėmis. Tuo tarpu tradicinę aukštatemperatūrę skysčių chromatografijos sistemą transformuoti į ultraefektyviają+aukštatemperatūrę nėra techninių galimybių.

### 1.1.3. Masių spektrometrinis detektavimas

Nuo pat pirmųjų komercinių chromatografų atsiradimo viena iš didžiausių analitikų svajonių buvo chromatografijos apjungimas su MS detektoriumi. Galime išskirti bent kelias tokio susidomėjimo priežastis. MS detektoriumi išmatuojama analitės molekulinė masė ir tai labai supaprastina junginių identifikavimą. Be to, unikalus MS detektoriaus atrankumas dažnai įgalina identifikuoti ir nustatyti chromatografiškai nevisiškai atskiriamus arba net neatskiriamus junginius. Galiausiai, naudojant MS detektorių vidiniu standartu galime naudoti izotopais žymėtus (pvz., deuteruotus) analičių analogus ir tokiu būdu labai pagerinti kiekybinio nustatymo tikslumą. DCh-MS sistemos buvo komercializuotos jau 1967 m., o maždaug nuo 1975-1980 m. DCh-MS tapo rutininio metodu be kurio neapsiejo nei viena rimtesnė analizės laboratorija

[43]. Tuo tarpu ESCh metodo apjungimas su MS buvo žymiai problematiškesnis, todėl ESCh-MS išvirtino analizėje tik praėjusio dešimtmečio pabaigoje [44]. ESCh metodo apjungimą su MS apsunkino du pagrindiniai dalykai. Šiame metode naudojamos skystos, dažniausiai turinčios vandens judrios fazės, pumpuojamos per kolonėlę 0,5 -1,5 ml/min greičiais. Tuo tarpu MS detektoriumi buvo būtina dujinė fazė giliame vakuume ( $\sim 1,33 \cdot 10^{-4}$  Pa). Akivaizdu, kad labai greitai ir efektyviai išgarinti ar pašalinti iš sistemos tokius skysčio srautus techniškai sudėtinga. Kita problema – didžioji dalis analizių, tiriamų ESCh metodu yra mažai lakios ir/arba termiškai labilios, tad jų jonizacijai netiko DCh-MS metoduose naudojami elektronų smūgio bei cheminės jonizacijos šaltiniai. Plačiau su ESCh-MS metodo istorija galima susipažinti apžvalgoje [45]. Nedetalizuodami tik paminėsime, kad pagrindinis lūžis metodo komercializavimo kelyje įvyko maždaug 1988-1990 m., atsiradus atmosferos slėgio cheminės jonizacijos (APCI) ir elektrosrauto jonizacijos (ESI) šaltiniams.

Masių spektrometras susideda iš trijų pagrindinių dalių: jonizacijos šaltinio, masių analizatoriaus ir detektoriaus. Kadangi tiek DCh-MS, tiek ir ESCh-MS naudojamuose detektoriuose (elektronų daugintuvai, fotodaugintuvai) principinių naujovių nėra, trumpai apžvelgsime tik šiuo metu ESCh metode naudojamų MS detektorių jonizacijos šaltinius bei masių analizatorius.

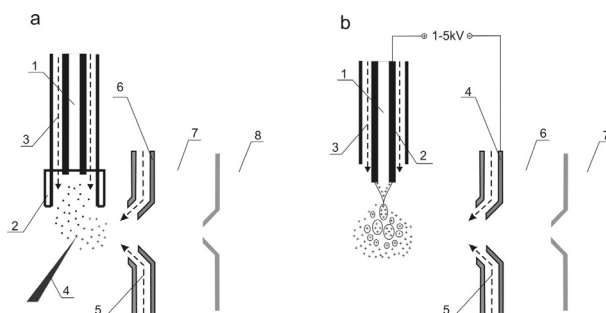
**Jonizacijos šaltiniai.** Kaip jau buvo minėta, didelis skysčio srautas ištekantis iš kolonėlės negali būti tiesiogiai įleidžiamas į vakuumo zoną, kuri būtina daugeliui MS jonizacijos šaltinių [46]. Todėl po kelis dešimtmečius trukusio eiškojimų ir bandymų laikotarpio šiuo metu ESCh-MS metode naudojami du pagrindiniai jonizacijos šaltiniai - APCI ir ESI. Jų principinės schemos pavaizduotos 1.8 pav. Abiejų jonizacijos šaltinių konstrukcija įgalina jonizuoti analites atmosferos slėgyje [47, 48]. APCI (1.8 a pav.) šaltinyje ištekanti iš kapiliaro judri fazė yra sumaišoma su lygiagrečiu dujų srautu, susidarę pūslai yra išgarinami leidžiant juos per kaitinimo elementą. Susidarę garai nukreipiami link vainikinio išlydžio adatos kuriai suteiktas kelių kV potencialas. Čia elektronų veikiamos judrios fazės tirpiklio molekulės S

protonizuojamos/deprotonizuojamos susidarant teigiamiems  $[S+H]^+$  arba neigiamiems  $[S-H]^-$  jonams, kurie reaguoja su analitės molekulėmis M ir jas protonizuoja arba deprotonizuoja:



Priešingą krūvį turintis elektrodas nukreipia jonizuotas analites į tarpinio vakuumo zoną, iš kur jos toliau patenka į masių analizatoriaus sektorius.

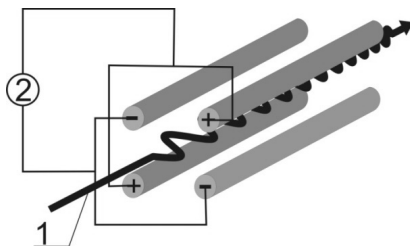
Labai panašus ir ESI šaltinio veikimo principas (1.8 b pav). Iš kolonėlės išeinantis jūdris fazės srautas nukreipiamas į plieninį kapiliarą kuriam suteikiama aukšta įtampa. Lygiagretus dujų srautas išpurškia jūdrią fazę su joje ištirpusiomis jonizuotomis analitėmis lašelių pavidalu. Priklausomai nuo kapiliaro įtampos poliškumo, lašelių paviršius įgyja teigiamą arba neigiamą krūvį. Toliau veikiamas dujų tirpiklis lašeliuose garuoja ir lašeliai traukiasi. Krūvio tankis lašelyje palaipsniui didėja, o stūmos jėgos tarp krūvių auga, kol galiausiai lašas sprogsta (vyksta taip vadinamas „Kulono sproginimas“) susidarant mažesniems lašeliams. Šis procesas kartojasi kol analizė pilnai pereina į dujinį būvį. Įprastai ESI jonizacijos metu susidaro poliprotoniniai  $[M+nH]^{n+}$  bei monoprotiniai  $[M+H]^+$  arba  $[M-H]^-$  jonai. Tolesnė proceso eiga analogiška APCI metodui.



**1.8 pav.** APCI jonizacijos šaltinio principinė schema (a): 1 – jūdris fazė iš ESCh; 2 – kaitinimo elementas; 3 – išpurškimo dujos; 4 – vainikinio išlydžio adata; 5 – dujų užsklanda; 6 – jonus pritraukiantis elektrodas; 7 – tarpinio vakuumo zona; 8 – analizatoriaus sektorius. ESI jonizacijos šaltinio principinė schema (b): 1 – jūdris fazė iš ESCh; 2 – jonizacijos/išpurškimo kapiliaras; 3 – išpurškimo dujos; 4 – jonus pritraukiantis elektrodas; 5 – dujų užsklanda; 6 – tarpinio vakuumo zona; 7 – analizatoriaus sektorius.

Abu jonizacijos šaltiniai puikiai papildo vienas kitą. ESI geriau tinka jonizuotoms bei labai polinėms neutralioms analitėms, kurių molekulinės masės viršija 1000, o optimalūs judrios fazės srautai - 0,01-1 ml/min. Tuo tarpu APCI labiau tinkama mažos ir vidutinės molekulinės masės, nepolinėms arba vidutiniškai polinėms analitėms, o optimalūs judrios fazės srautai - 1-2 ml/min.

**Masių analizatoriai. Kvadrupolinis masių analizatorius** yra vienas iš paprasčiausių ir seniausiai naudojamų MS analizatorių, sukurtas 6-ajame XX a. dešimtmetyje [49]. Jis sudarytas iš keturių vienodų, lygiagrečiai vienas kitam išdėstytų metalinių strypų (1.9 pav.). Strypai prijungti prie kintamos (dažnis artimas radiobangų dažniams) bei nuolatinės įtampos generatoriaus. Strypams, esantiems vienas priešais kitą suteikiama vienodo ženklo įtampa. Tokiu būdu sudaromas aukšto dažnio kintamas elektrinis laukas. Jonas, patekęs į šį lauką pradeda virpėti plokštumoje, statmenoje jo judėjimo kryptčiai. Jei elektrinio lauko stipris atitinka jono energiją, kuri priklauso nuo jo  $m/z$  santykio, toks jonas praskrenda tarp strypų ir gali būti užregistruotas. Priešingu atveju jis atsitrenkia į kažkurį iš strypų ir neregistruojamas. Taigi, keičiant elektrinio lauko amplitudę yra atliekamas  $m/z$  skenavimas [46].

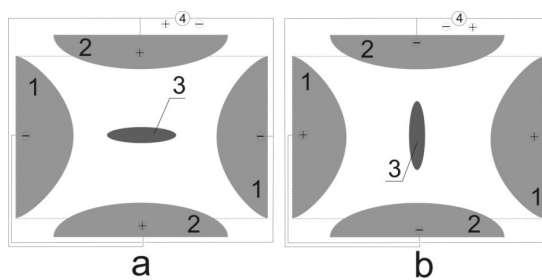


**1.9 pav.** Kvadrupolinio masių analizatoriaus principinė schema. 1 - jonų kelias per analizatorių, 2 - kintamos bei nuolatinės įtampos generatoriai.

Kvadrupoliniai masių analizatoriai nepasižymi itin didele skiriamąja geba bei masių skenavimo tikslumu. Skenuojant per analizatorių tam tikru laiko momentu praleidžiami tikslai tam tikro  $m/z$  diapazono jonai, o siaurinant šį diapazoną (didinant skiriamąją gebą) nustatymo jautris krenta. Įprastas  $m/z$

diapazonas - 25-2000, o pasiekiamas skenavimo greitis iki 4000 (m/z)/s. Dėl nesudėtingos konstrukcijos tai vieni pigiausių spektrometrų.

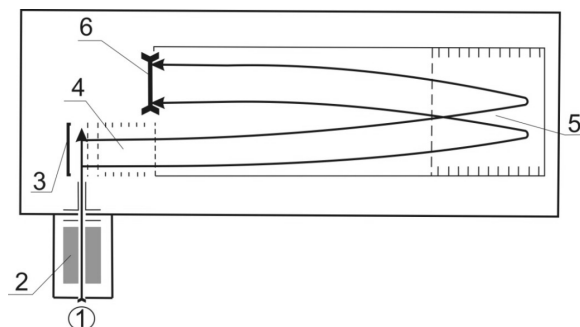
**Kvadrupolinė jonų gaudyklė** (QIT) veikia panašiu principu kaip ir aukščiau aptartas kvadrupolinis masių analizatorius [49]. Pagrindinis skirtumas yra prietaiso geometrijoje ir skenavimo principu (1.10 pav.). QIT sudaro žiedinis elektrodas ir du vertikalieji elektrodai, išdėstyti virš žiedinio elektrodo ir po juo. Patekę į analizatoriaus sektorių, jonai yra kaupiami elektriniame lauke. Derinant kintamos bei nuolatinės įtampos vertes ant žiedinio ir vertikaliųjų elektrodų pasiekama, kad visi jonai įgytų stabilias skriejimo elektriniame lauke trajektorijas. Helio dujos, užpildančios gaudyklės vidų, padeda jonams išsklaidyti perteklinę energiją ir taip papildomai juos stabilizuoja. Po to, keičiant elektrinio lauko stiprį, jonai yra emituojami jų m/z didėjimo tvarka. Panaudojus papildomą radiodažnių įtampą ant vertikaliųjų elektrodų atliekamas osciliacinis skenavimas, kai skirtingo m/z jonai osciliuoja skirtinga amplitude, taip palikdami gaudyklės modulį. Osciliacinio skenavimo principas gali būti panaudotas specifinei m/z frakcijai izoliuoti gaudyklėje, o suderinus jį su elektrinio lauko kitimu specifinių jonų galima fragmentuoti. Kintant elektriniam laukui, kinta ir jonų greitis, o dideliu greičiu skriejantys jonai susidūrę su dujų atomais fragmentuojasi. Šis reiškinys vadinamas susidūrimu indukuota disocijacija. Taip izolavus konkretų joną ir jį fragmentavus, pasiekiamos MS<sup>n</sup> (tandeminė masių spektrometrija, n - fragmentacijų skaičius) sąlygos.



**1.10 pav.** Kvadrupolinės jonų gaudyklės principinė schema. 1 – žiedinis elektrodas, 2 – vertikalieji elektrodai, 3 – supaprastintas katijonų kelias gaudyklėje, kai a) žiedinis elektrodas įkrautas neigiamai, b) žiedinis elektrodas įkrautas teigiamai; 4 – kintamos bei nuolatinės įtampos generatorius

Dėl „kvantuoto“ jonų skenavimo mechanizmo QIT yra pakankamai jautrus analizatorius. Tačiau jo dinaminis diapazonas nėra labai platus: maksimalus sulaikomų gaudyklėje jonų skaičius siekia maždaug  $10^5$  ir dirbant su sudėtingesnės matricos mėginiais nemažą jos talpos dalį užima matricos jonai. Dėl šios priežasties jonų gaudyklė labiau tinkama kokybiniais matavimams. Be to, gaudyklės savybė atlikti kelių etapų fragmentavimą suteikia daug papildomos informacijos apie analičių struktūrą. Jonų gaudyklės skiriamoji geba ir  $m/z$  matavimo tikslumas priklauso nuo skenavimo greičio: skenuojat itin lėtai galima pasiekti labai gerą skiriamąją gebą, tačiau tai ne visada suderinama su chromatografija, kuriai reikalingas greitis. Įprastas chromatografijai QIT analizatoriaus  $m/z$  diapazonas - 15-3000, o pasiekiamas skenavimo greitis iki 5000 ( $m/z$ )/s.

Vienas paprasčiausių **lėkio trukmės masių analizatorius** (TOF) sukurtas 1946 m., tačiau tik apie 1990 m., pritaikius ortogonalus greitinimo technologiją (1.11 pav.), pasirodė pirmieji TOF tipo masių spektrometrai su nuolatinio veikimo jonų šaltiniais [50, 51].



**1.11 pav.** Ortogonalus lėkio trukmės masių analizatorius. 1 – jonai ateinatys iš jonizacijos šaltinio, 2 – fokusuojanti optika, 3 – nukreipiantis elektrodas, 4 – greitintuvas, 5 – reflektorius, 6 – detektorius.

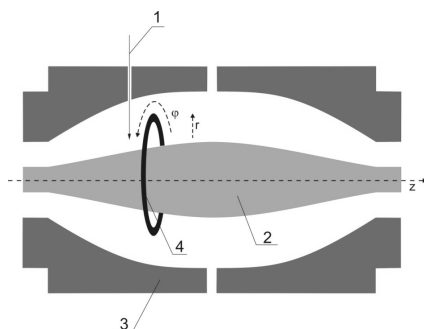
Pradiniu laiko momentu visi vienodo krūvio jonai išskridę iš greitintuvo turės tą pačią kinetinę energiją, tačiau dėl skirtingos masės skries skirtingais greičiais. Todėl jiems skriejant vakuume be elektrinio lauko, detektorių jie pasieks skirtingu laiku, kuris priklausys nuo jono  $m/z$  vertės. Tokio spektrometro skiriamoji geba yra tiesiog proporcinga jonų skriejimo kelio



ilgiui. Siekiant prailginti jonų kelią, sukurti prietaisai reflektoriais atspindintys jonų srautą. TOF masių spektrometrai yra vieni greičiausių prietaisų – jie neturi teorinės greičio ir masių skenavimo diapazono ribos. Tai aukštos skiriamosios gebos masių analizatoriai, pasižymintis geru  $m/z$  matavimo tikslumu bei dideliu jautriu. Tačiau, kadangi visi (analitės ir pašaliniai) jonai patenka į detektorius, detektoriai greitai persipildo ir tai labai susiaurina dinaminį  $m/z$  matavimo diapazoną.

**Jonų ciklotroninio rezonanso** ir „Orbitrap“ technologijomis pagrįsti masių analizatoriai pasižymi didžiausia skiriamąja geba ir geriausiu  $m/z$  matavimo tikslumu [52]. Abi technologijos yra labai panašios, tik Furje transformuotojo jonų ciklotroninio rezonanso (FTICR) analizatoriaus pagrindas yra stiprus magnetas, o „Orbitrap“ prietaise - elektrinis laukas. Trumpai aptarsime tik patį naujausią (2000 m.) „Orbitrap“ tipo analizatorių [53]. Patekę į „Orbitrap“ modulį (1.12 pav.) jonai orientuojami elektriniu lauku taip, kad pradėtų sukis aplink centrinį elektrodą. Centrinis elektrodas nėra cilindrinis, todėl jo potencialas nėra vienodas kiekviename jo taške. Tai sukelia jonų rezonavimą z-ašyje. Lauką sukuriantys elektrodai dėl šio rezonanso registruoja srovės atsiradimus. Taip gaunamas įvairių dažnių srovės stiprių atvaizdas. Srovės stiprių dažnis yra atvirkščiai proporcingas  $m/z$ , o amplitudė priklauso nuo jonų skaičiaus. Taigi papildomai transformavus gautus duomenis Furje eilute gaunamas spektras. Kadangi jonai pagaunami ne vienkartiniam pamatavimui, o sumuojami jų virpesiai užduotame laiko intervale, tokiu principu paremtas masių analizatorius yra pakankamai jautrus bei pasižymi labai didele skiriamąja geba ir puikiu masių matavimo tikslumu. Tačiau norint pasiekti didelę skiriamąją gebą bei  $m/z$  tikslumą, reikalinga ilga skenavimo trukmė, o tai ne visada tenkina chromatografinės sistemos reikalavimus.

1.3 lentelėje palygintos ESCh-MS metode naudojamų masių analizatorių charakteristikos.



**1.12 pav.** „Orbitrap“ analizatoriaus principinė schema: 1 – jonai, patenkantys į analizatorių, 2 – centrinis elektrodas, 3 – lauką sukuriantys ir osciliacijas registruojantys elektrodai, 4 – jonai besisukantys aplink centrinį elektrodą.

**1.3 lentelė**

Masių analizatorių charakteristikų palyginimas [46]

Parametras	Vertinimas				
	TOF	Kvadrupolis	QIT	Orbitrap	FTICR
Skiriamoji geba	maža-didelė	maža-vidutinė	maža-didelė	l. didelė	didžiausia
m/z tikslumas	geras	prastas	blogas-vidutinis	l. geras	l. geras
Jautris	didelis	didelis	didelis	vidutinis	vidutinis
Dinaminis diapazonas	vidutinis	platus	siauras-vidutinis	vidutinis	vidutinis
Kiekybinės analizės galimybės	vidutinės-geros	l. geros	blogos	vidutinės	vidutinės
Greitis	greitas	vidutinis-greitas	vidutinis-greitas	lėtas-vidutinis	lėtas-vidutinis
Naudojimas	paprastas-vidutinis	paprastas	paprastas	vidutinis	sudėtingas

**Tandeminė masių spektrometrija.** Su ESCh komplektuojamuose MS detektoriuose naudojami analičių jonizacijos būdai yra palyginti „švelnūs“, t.y. juose analizės nefragmentuojamos arba fragmentuojamos minimaliai. Tokiu atveju patikimai nustatoma tik analizės molekulinė masė, tačiau jos struktūros nustatymas komplikotas arba apskritai neįmanomas. Siekiant gauti patikimos informacijos ir apie analičių struktūrą buvo pasiūlyta tandeminė masių spektrometrija (MS/MS arba MS<sup>n</sup>) [54, 55]. MS/MS procese struktūrinė informacija yra surenkama panaudojant keletą nuoseklių operacijų su konkrečiais jonais: jono izoliavimas, jo fragmentavimas, fragmento

izoliavimas, tolesnis jo fragmentavimas, skenavimas. Galime išskirti du pagrindinius MS/MS variantus: MS/MS laike ir MS/MS erdvėje. Paprasčiausias MS/MS laike pavyzdys – aukščiau aptartas QIT masių analizatorius. Analogiškas galimybes teoriškai turi ir Orbitrap bei FTICR tipo masių analizatoriai, tačiau juose, siekiant maksimalios skiriamosios gebos ir norint sufragmentuoti turimus jonus, gali pasireikšti jonų nestabilumo efektas [53]. MS/MS erdvėje atliekama su keliais tarpusavyje sujungtais masių analizatoriais [56]. Paprasčiausias to pavyzdys - trigubo kvadrupolio masių spektrometras (QqQ). Pirmasis ir trečiasis (Q1 ir Q3) kvadrupoliai yra aktyvūs, galintys dirbti tiek statiniu, tiek ir skenuojančiu režimais, o antras kvadrupolis (q) yra pasyvus. Jis pripildytas inertinių dujų, o jo paskirtis pagreitinti jonus taip, kad jie, susidūrę su inertinėmis dujomis, fragmentuotųsi. MS/MS erdvėje sistema nėra apribota tik fragmentų skenavimu, operuojant skirtingais Q1 ir Q3 darbo režimais gaunama skirtinga informacija (1.4 lentelė).

**1.4 lentelė**

MS/MS erdvėje skenavimo režimai naudojant QqQ tipo masių spektrometrą

Režimas	Tikslas	Eksperimento eiga
Produkto skenavimas	Nustatyti kokie fragmentai susidaro iš pasirinkto jono	Q1 filtruoja tik pasirinktą joną, Q3 skenuoja fragmentus
Prekursoriaus skenavimas	Nustatyti iš kokių jonų susidaro jiems bendras fragmentas	Q1 skenuoja visus įeinančius jonus, Q3 filtruoja tik reikiamą fragmentą
Neutralaus atskilimo skenavimas	Nustatyti jonus iš kurių galėtų atsikilti dominantis neutralus fragmentas	Q1 ir Q3 skenuoja su neutraliai masei lygiu masių skirtumu
Pasirinktos reakcijos stebėjimas (SRM) arba daugialypių reakcijų stebėjimas (MRM)	Stebėti numatytą skilimą laike	Q1 filtruoja tik pradinį joną, Q3 - tik fragmentą

Kiekybiniam matavimams svarbiausias yra SRM skenavimas. Tai susiję su kvadrupolinio prietaiso konstrukciniais ypatumais. Skenuojančiame režime kvadrupolis nėra toks jautrus kaip statiniame. Be to, toks darbo režimas yra labai greitas ir galima užregistruoti be galo daug reakcijų per labai trumpą

laiko tarpą. Kadangi kvadrupolinis masių filtras nepasižymi didele skiriamąja geba, šis trūkumas sukompensuojamas pasitelkiant pagrindinio jono ir tik jam būdingo fragmento filtravimus [46].

## **1.2. Maisto sauga Europos Sąjungoje**

ES, kaip ir kitose pasaulio šalyse maisto sauga įgauna vis didesnę reikšmę. Siekiant užtikrinti saugaus maisto mainus (prekybą), pasaulinė prekybos organizacija inicijavo tarptautinį sanitarinių ir fitosanitarinių priemonių susitarimą, kuris leidžia kiekvienos šalies vyriausybei nusistatyti moksliskai pagrįstus reikalavimus maisto saugai savo šalyje, atsižvelgiant į kitų tarptautinių organizacijų siūlymus/rekomendacijas. Susitarimas įgalioja kiekvieną jį pasirašiusią šalį, užtikrinti, kad maistas jos rinkoje yra saugus, nepriklausomai nuo to, ar jis pagamintas šalies viduje, ar importuotas iš trečiųjų šalių [57]. ES vadovaudamasi šiuo susitarimu taip pat privalo vykdyti vidinę ir importuojamo maisto kontrolę veterinarinių vaistų likučių ir augimo skatintojų atžvilgiu. Kontrolės pagrindu yra laikomos tarybos direktyvos 96/22/EC [58] ir 96/23/EC [59], reglamentuojančios oficialios kontrolės principus, ir reikalavimus. Direktyva [58] nustato augimo endrogeninių ar tireostatinių poveikį turinčių medžiagų kontrolę, o direktyva [59] apibrėžia bendrą likučių stebėsenos politiką suskirstydama farmakologiškai aktyvias medžiagas į dvi grupes: A grupė – direktyvoje [58] išvardintos medžiagos įskaitant ES tarybos reglamento 2377/90/EEC IV priede [60] išvardintas medžiagas, B grupė – veterinariniai vaistai ir kiti teršalai (1.5 lentelė).

Pagal šį suskirstymą yra sudaromi kiekvienos valstybės kenksmingų likučių stebėsenos planai kiekvienai analičių grupei priskiriant atitinkamą kiekį mėginių. Kartu su vidinės produkcijos stebėsenos planais sudaromos ir importuojamo maisto kontrolės taisyklės. Direktyvoje nurodoma, kokios likučių grupės, kokiose gyvūnų rūšyse privalo būti nustatytos, taip pat privaloma tikrinti ir pašarus, kuriais tie gyvūnai yra šeriami. Siekiant užtikrinti lengvesnį nesankcionuoto medžiagų pavartojimo atvejo radimą arba vaisto vartojimo pažeidimą (po gydymo neišlauktas vaisto pašalinimo periodas)

pradėtas vykdyti tikslinių ir įtariamų mėginių ėmimas. Inspektorius veterinaras privalo vadovaudamasis savo praktika ir žiniomis, vertindamas potencialią riziką imti mėginius taip, kad būtų sudaroma kuo didesnė tikimybė surasti vieną ar kitą medžiagą. Tikslinis mėginys - toks iš gyvulio paimtas mėginys, kai pagal išorinius požymius (ligotas, neproporcingai pagal amžių išsivystęs gyvulys ir pan.) galima spėti, kad buvo vartoti kažkokie preparatai. Įtariamasis mėginys - mėginys, imamas iš ūkio, kuriame jau buvo nustatytas neleistinas pavartojimas arba kai yra kitas pagrindas sugriežtinti kontrolę [61]. Šie mėginiai imami tiek iš gyvų, tiek ir iš paskerstų gyvūnų. Paimti mėginiai keliauja į paskirtas, atsakingas laboratorijas, kurios privalo kompetentingai įvykdyti tyrimus. Siekiant užtikrinti vienodą kompetencijos lygį visose šalyse, ES komisijos sprendimu [62] buvo sukonkretinti reikalavimai laboratorijoms atliekančioms tyrimus. Vadovaujantis šiuo sprendimu visos laboratorijos atliekančios oficialią gyvūninės kilmės kontrolę savo šalyje privalo:

- Turėti įdiegtą kokybės sistemą pagal ISO 17025 ir būti akredituotos pagal tą patį standartą tarptautiniu mastu pripažįstamų akreditacijos tarnybų.
- Sėkmingai dalyvauti tiek komercinėse, tiek ES referentinių laboratorijų organizuojamose palyginamųjų tarplaboratorių tyrimų programose.
- Vykdyti tyrimus tik metodais tenkinančiais žemiau aprašytus komisijos sprendimo reikalavimus.
- Sekti ir koordinuoti likučių stebėseną, taip pagelbstinti kitoms su šia užduotimi susijusioms tarnyboms.

Jei stebėsenos metu mėginiuose yra aptinkama medžiaga, kurios koncentracija viršija DLK (arba bet kokio kiekio radimas uždraustai naudoti medžiagai), o medžiagos identifikavimas yra neįmanomas, tuomet mėginys, kartu su visa maisto partija iš kurios jis paimtas, yra laikomas neatitinkančiu saugos reikalavimų. Jei toks atvejis pasitaiko ir aptinkamas kaltininkas taikomos sankcijos: piniginės baudos, galimybės naudotis ES parama netekimas 12-kai mėnesių, ūkininko licencijos atėmimas, sankcijos prieš veterinarijos gydytoją, kriminalinė byla prieš atsakingą asmenį, įskaitant galimą laisvės suvaržymą.

1.5 lentelė

Kontroliuojamų medžiagų skirstymas 96/23/EC direktyvoje [59].

Grupė	Pagrindinės medžiagos
A1 - stilbenai	Dieetlsilbestrolis, dienoestrolis, heksaestrolis
A2 – tireostatikai	5-metil-2-tiouracilas, tapazolas, 2-tiouracilas
A3 – steroidai	Trembolonas, testosteronas, 17-β-oestradiolis, stanozololas, 16-OH-stanozololas, medroksiprogesteronas, prednizolonas
A4 – rezorcininės rūgšties laktonai	Zeranolis, taleranolis
A5 – β-agonistai	Klenbuterolis, salbutamolis, terbutalinas, raktopaminas
A6 – medžiagos nurodytos reglamento 2377/90/EEC IV priede	Chloramfenikolis, nitrofurantai, nitroimidazolai, dapsonas
B1 – antibakterinės medžiagos	Kvinolonai, sulfonamidai, tetraciklinai, aminoglikozidai, β-laktamai
B2 1. Antihelmintikai 2. Kokcidiostatikai 3. Karbamatai, peritroidai 4. Raminantieji 5. Nesteriodiniai priešuždegiminiai 6. Kitos farmakologiškai aktyvios medžiagos	Kiti veterinariniai vaistai Tiabendazolas, Abamektinas, moksidektinas, Salinomycinas, diklazurilis, nikarbazinas Permetrinas, aldikarbas, karbarilis Azaperonas, karazololas, ksilazinas Fluniksinas, paracetamolis, aspirinas, fenilbutazonas ketoprofenas, ibuprofenas, diklofenakas,
B3 1. Chloro organiniai junginiai 2. Fosforo organiniai junginiai 3. Cheminiai elementai 4. Mikotoksinai 5. Dažikliai 6. Kiti	Kitos medžiagos, ir aplinkos teršalai DDT, HCB, PCDD, PCDF Metidacionas, pirazofosas, diazinonas Švinas, kadmis Ochratoksinas A, aflatoksinas M1 Malachito žaliasis, leukomalachito žaliasis

**Vaistų patekimas į maisto produktus.** Pirmasis vaistinių medžiagų patekimo į maistą kelias – pašarai. Daugelis pašarų ir jų priedų gaminami specialiai į juos dedant vaistų ar kitų farmakologiškai aktyvių medžiagų, nes tai pats paprasčiausias būdas gydyti gyvūnus. Jei vaistą galima naudoti gydymui arba prevenciniais tikslais, tuomet po gydymo būtina išlaukti visą vaisto pašalinimo iš organizmo periodą. Priešingu atveju yra didelė tikimybė, kad jis liks organizme ir jo koncentracija viršys DLK. Neretai pašarų gamintojai naudoja tuos pačius malūnus gaminti tiek gydymui skirtus, tiek paprastus

pašarus, taip užteršdami pastaruosius. Pvz., gaminant pašarą kuriame turi būti 125 mg/kg sulfadiazino, kitoje, jau paprasto pašaro partijoje buvo randamos iki 2 mg/kg sulfadiazino koncentracijos. Ši problema dar aktualesnė nitroimidazolų grupės vaistams, kadangi jie priskirti uždraustoms naudoti medžiagoms. McEvoy [63] pateikia daug atvejų, kai netgi mažesnės nei terapinės veikliosios medžiagos koncentracijos pašaruose pereina į apčiuopiamus likučius kiaušiniuose ir raumenyje.

Kitas vaistų patekimo į maistą kelias - aplinkos tarša [64]. Tai ypač opi problema žuvų ūkiams, kadangi gydant žuvis vaistų likučiai gali kauptis dumble ir taip pereiti į sveikų žuvų organizmą, arba, pakeitus tvenkiniuose vandenį, užkrėsti laukines žuvis. Neretai gyvulininkystės atliekos yra naudojamos laukams tręšti (mėšlas, girdyklų nuotėkos ir pan.) taip užteršdamos laukuose auginamas kultūras.

Gydyti gyvuliai taip pat gali pernešti veterinarinių vaistų likučius kitiems gyvuliams. Kennedy su bendraautoriais [64] savo apžvalgoje pateikia keletą tai įrodančių tyrimų. Aprašomi tyrimai buvo atlikti tiek su vaistais, turinčiais DLK (sulfametazinas, chlortetraciklinas), tiek su draudžiamais naudoti vaistais (furazolidonas, klenbuterolis). Pagrindinis pernašos šaltinis - nepakankamai išvalomi gardai. Sveikų gyvūnų kontaktas su gydytų gyvūnų mėšlo ir šlapimo likučiais gali per labai trumpą laiką (6–24 val.) sukaupti vaisto koncentraciją, viršijančią DLK.

**Tyrimų metodams keliami reikalavimai.** Pagrindiniai reikalavimai/kriterijai vaistų likučių nustatymo metodams yra surašyti ES komisijos leidinyje [62]. Tyrimų metodai skirstomi į apžvalginius metodus ir patvirtinamuosius:

- Apžvalginiais (angl. *screening*) laikomi tokie metodai, kurie nesuteikia jokios struktūrinės informacijos apie analitę, tačiau yra labai greiti (pvz., biosensoriai, imunofermentiniai metodai). Naudojami atrinkti teigiamus (užkrėstus) mėginius, kurie po to analizuojami patvirtinamaisiais metodais.
- Patvirtinamieji (angl. *confirmatory*) metodai suteikia pilną arba papildomą informaciją apie nustatomos medžiagos struktūrą ir užtikrina vienareikšmį

analitės identifikavimą. Tai metodai paremti spektrinių medžiagų savybių matavimu (IR, UV-matomos šviesos, masių spektrometrija).

### 1.6 lentelė

Oficialūs patvirtinamieji metodai maisto produktų kontrolei [62]

Metodas	1.5 lentelėje išvardintos medžiagos	Reikalavimai
ESCh, DCh su MS detektoriumi	A ir B grupės	Tiktai kartu su chromatografiniu atskyrimu; Tik jei naudojama pilno spektro skenavimo technika; jei ne, B grupei privalomi 3 identifikavimo taškai, A grupei - 4.
ESCh, DCh su IR detektoriumi	A ir B grupės	Tik jei atitinka specifinius IR absorbcijai taikomus reikalavimus
ESCh su pilno skenavimo diodinės matricos detektoriumi	B grupė	Tik jei atitinka specifinius UV absorbcijai taikomus reikalavimus
ESCh su fluorescensiniu detektoriumi	B grupė	Tinka tik molekulėms kurios natūraliai fluorescuoja, arba fluorescuoja po derivatizavimo
Dvimatė plonasluoksnė chromatografija su pilnu UV/Vis skenavimu	B grupė	Dvimatė efektyvioji plonasluoksnė chromatografija ir kochromatografija yra privalomos
DCh su elektronų gaudymo detektoriumi	B grupė	Būtina naudoti dvi skirtingo poliškumo kolonėles
ESCh - imunograma	B grupė	Būtina naudoti dvi skirtingas chromatografines sistemas arba papildomą detektavimo metodą
ESCh-UV/Vis (vieno bangos ilgio) detektorius	B grupė	Būtina naudoti dvi skirtingas chromatografines sistemas arba papildomą detektavimo metodą

Patvirtinamieji metodai ir jiems keliami reikalavimai išvardinti 1.6 lentelėje. Matome, kad patvirtinamaisiais gali būti naudojami tik chromatografiniai metodai su atitinkamais detektoriais. Be to, tyrimų metodo jautriui buvo įvestas kriterijus – minimali reikalaujama efektyvumo riba (angl. *minimum required performance limit*). Remiantis šiuo kriterijumi, analizės metodas konkrečiai analitei privalo užtikrinti ne mažesnę už apibrėžtą jautrį, o



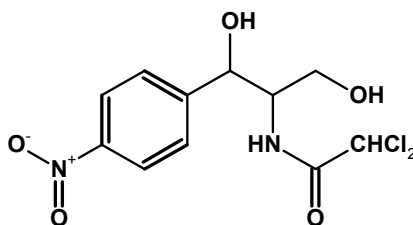
medžiagoms turinčioms DLK - 0,5 DLK. Pvz., chloramfenikoliui minimali reikalaujama efektyvumo riba - 0,3 µg/kg.

### 1.3. Antibiotikų savybės ir nustatymas

Šiame skyriuje trumpai apžvelgsime tik disertaciniame darbe tirtus antibiotikus bei jų nustatymo metodus.

#### 1.3.1. Chloramfenikolis

Chloramfenikolis (CAP) dar žinomas kaip levomicetinas arba chloromicetimas (sisteminis pavadinimas - 2,2-dichlor-N-[(1R,2R)-1-hidroksi-2-hidroksimetil-1-(4-nitrofenetil)]acetamidas) (1.13 pav.). Tai balta kristalinė medžiaga, gerai tirpstanti alkoholiuose (metanolis, etanolis), etilacetate, acetone, bet netirpi benzene ir petrolio eteriye.



1.13 pav. Chloramfenikolio struktūrinė formulė.

CAP yra plataus spektro antibakterinė medžiaga, efektyviai veikianti tiek prieš gram-teigiamas, tiek ir prieš gram-neigiamas bakterijas. Ši vaistą sintetina bakterijos *Streptomyces venezuelae*, tačiau pastaruoju metu gaunamas sintetinant pramoniniu būdu. Vaistas yra labai stiprus antibiotikas ir taikomas gydant sunkius bakterinius susirgimus: salmoneliozę, bakterinį meningitą ir pan. Klinikinėje praktikoje naudojamas nuo 1942 m. CAP pasižymi ir stipriu šalutiniu poveikiu: gali sukelti plastinę anemiją, kaulų čiulpų disfunkciją, kepenų ir širdies darbo sutrikimus naujagimiams [66]. Remdamasi toksikologinių CAP tyrimų duomenimis [67], 1994 m. ES uždraudė naudoti šį vaistą veterinarijoje maistui auginamų gyvūnų gydymui. ES komisijos sprendimu 2003/191/EC [66] CAP nustatymo metodams maiste buvo nustatyta

minimali reikalaujama efektyvumo riba – 0,3 µg/kg, galiojanti visoms matricoms.

**Apžvalginiai CAP nustatymo metodai.** Yra dvi pagrindinės CAP apžvalginių metodų grupės: imunofermentiniai [69-73] ir chromatografiniai [68, 70, 73-77]. Šie metodai taikomi įvairioms matricoms: pienui, raumeniui, jūros gėrybėms, medui ir kt.

Imunofermentiniai metodai yra pagrįsti konkurentinėmis reakcijomis tarp analitės ir peroksidaze arba radioaktyviais izotopais žymėtos analitės bei specialiai analitei ir jos analogams išvestų imunoglobulinų. Metodo analizinis signalas gaunamas tiesiogiai matuojant radioskilimus (RAI) arba fotometriškai matuojant oksiduoto tetrametilbenzidino šviesos absorbciją (ELISA). Šiuo metu kelios firmos parduoda specialius ELISA rinkinius (pvz., “R-Biopharm”, “Eurodiagnostica” ir kt.) CAP nustatymui įvairiose matricose. Standartinės mėginio paruošimo procedūros - ekstrakcija/koncentravimas organiniais tirpikliais (dažniausiai acetonitrilu arba etilacetatu) ir nuriebalinimas heksanu [70-72]. Tačiau darbe [73] buvo parodyta, kad nustatant mažesnes CAP koncentracijas būtinas papildomas ekstraktų valymas. Autoriai pasiūlė kietafazę ekstrakciją oktadecisilikagelio sorbentu.

Kita apžvalginių CAP nustatymo metodų grupė – dujų [70, 75-77] arba skysčių [68, 70, 73, 74] chromatografija. Mėginio paruošimas įprastai apima tris etapus: skysčių-skysčių ekstrakcija, nuriebalinimas ir ekstraktų valymas kietafazės arba skysčių-skysčių ekstrakcijos būdais. Įdomesnis mėginio paruošimas aprašytas darbe [78], kuriame CAP ekstrakcijai iš raumens panaudota kietafazė disperguojamoji ekstrakcija. Šio metodo privalumas - greitas ir daug tirpiklių nereikalaujantis procesas, tačiau tokiai ekstrakcijai būtinas didelis mėginio kiekis. Kitame darbe [76] mėsos ir šlapimo mėginių valymui panaudotas imunoafinės kietafazės ekstrakcijos metodas. Nors tai itin atrankus valymo būdas, tačiau dėl labai brangių kolonėlių jis nėra tinkamas rutininiams tyrimams. Būtina pažymėti, kad nustatant CAP DCh metodu dėl menko lakumo analizė papildomai derivatizuojama blokuojant hidroksi grupes trimetilsilileteriais [70, 75, 76]. Kadangi įprastai naudojamas elektronų

gaudymo detektorius nėra labai atrankus, analizės atrankumas išgaunamas chromatografiškai (kapiliarinės kolonėlės) kartu su mėginio paruošimu. Apibendrinant galima konstatuoti, kad naudojant DCh mažesnes nei 1 µg/kg CAP nustatymo ribos pasiekiamos paprastesnėms matricoms (kiaušiniai, raumuo) ir 1-10 µg/kg - sudėtingesnėms matricoms (šlapimas, kepenys).

ESCh apžvalginiuose metoduose [68, 70, 73, 74], kaip taisyklė, naudojamas UV detektavimas prie 270-290 nm bangos ilgių. Atskyrimas atliekamas atvirkščių fazių chromatografijos režime naudojant C18 kolonėles ir vandens/acetonitrilo arba vandens/metanolio judrias fazes. Deklaruojamos CAP nustatymo ribos svyruoja nuo 0,1 µg/kg [73] iki 10 µg/kg [68, 70, 74]. Skirtingas jautris susijęs su skirtingomis mėginio paruošimo procedūromis. Daugelio darbų autoriai pripažįsta, kad dėl riboto UV detektoriaus atrankumo mėginio paruošimas reikalauja ypač kruopštaus valymo taip apsunkindamas analizę.

Nors chromatografiniai metodai yra atrankesni, tačiau jie neprilygsta analizės greičiu imunofermentiniams metodams, kadangi pastaruosiuose dažniausiai nereikalingas papildomas mėginių valymas bei greitesnė pati analizė.

**Patvirtinamieji CAP nustatymo metodai.** Patvirtinamaisiais metodais CAP nustatymui naudoti dujų arba skysčių chromatografijos metodai su MS detektavimu [79].

Nors nustatant CAP DCh-MS metodu jis yra derivatizuojamas [70, 71, 75, 80, 81], tai netrukdo pilnai jį identifikuoti. CAP derivatizacija atliekama sudarant silileterius. Literatūroje nurodomi įvairūs sililinimo reagentai: trimetilchlorsilanas [70, 75], O'-N-bis-trimetilsilil-trifluoracetamidas [80, 81], heksametildisilazanas [70], N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamidas [71]. Shen ir Jiang darbe [70] buvo palyginta CAP derivatizacija skirtingais reagentais ir konstatuota, kad optimaliausias derivatizavimo reagentas O'-N-bis-trimetilsilil-trifluoracetamidas su 10% trimetilchlorsilano. Kitas svarbus analizės aspektas – jonizacijos tipo ir masių spektrometro pasirinkimas. Paprastai naudojamos dvi jonizacijos rūšys: elektronų smūgio jonizacija (EI)

[70, 81] ir neigiama cheminė jonizacija (NCI) [71, 75, 80]. EI - palyginti "grubus" jonizacijos būdas, duodantis daug smulkių fragmentų. Tuo tarpu NCI žymiai "švelnesnė", todėl naudojant ją CAP molekulė mažiau fragmentuojama. Tai leidžia panaudoti papildomą atrankesnę fragmentavimą pačiame spektrometre [71]. Tokiu būdu pasiekiamas ne tik geresnis atrankumas, bet ir didesnis detektavimo jautris: naudojant NCI - CAP nustatymo ribos  $<0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  [70, 80], o naudojant EI jonizaciją  $\sim 2 \mu\text{g}/\text{kg}$  [81]. Tačiau mažas fragmentacijos laipsnis turi ir savų trūkumų: ne visada įmanoma surinkti pakankamai identifikavimo taškų. CAP nustatymas DCh-MS/MS metodu gali būti atliekama tiek su tandeminiu, tiek su jonų gaudyklės technologija pagrįstu masių spektrometru [71]. Panaudojus švelnią jonizaciją ir kiek įmanoma mažiau fragmentuojant molekulę, siekiama gauti molekulinį joną. Toliau šis jonas izoliuojamas nuo pašalinių matricos jonų ir fragmentuojamas, o susidarę fragmentai registruojami. Tokia analizės eiga užtikrina puikų atrankumą ir didelį analizės jautrį (nustatymo ribos  $<0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Atliekant analizę pakanka registruoti 2 fragmentus, kurie yra specifiniai molekuliniam jonui.

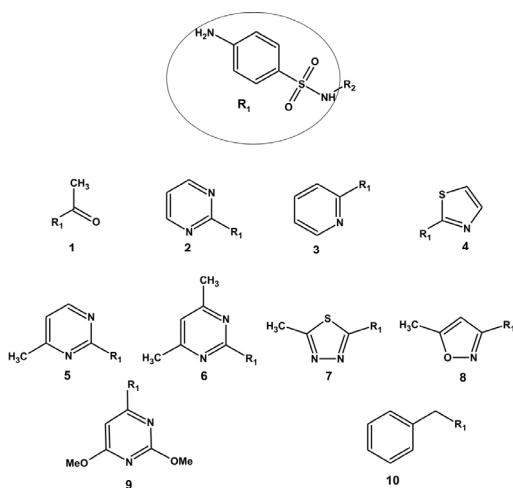
Lyginant su dujų chromatografija, CAP nustatymas ESCh metodu yra paprastesnis dėl suprantamos priežasties – šiuo atveju nereikalinga derivatizacija [71, 81-89]. Taip išvengiama su derivatizacija susijusių problemų, tokių kaip nestabilių ir itin lakių derivatų susidarymas [80, 81] arba nepilna ir sunkiai vykstanti derivatizacija [70]. CAP masių spektrometre jonizuojasi neigiamai sudarydamas  $[\text{M}-\text{H}]^-$  molekulinį joną. Dėl dviejų chloro atomų molekulėje susidaro dvi intensyvios ir specifinės CAP smailės: 321 ir 323 m/z [82, 83]. Šie jonai susidaro naudojant tiek tandeminius, tiek ir paprastus masių spektrometrus. Analizuojant ESCh-MS metodu fragmentacija vykdoma ne analizatoriuje, o jonizacijos šaltinyje ir, kaip jau buvo minėta, tai apriboja metodo jautrį ir atrankumą [86]. Naudojant paprastą masių spektrometrą, siekiant užtikrinti pakankamą identifikavimo taškų skaičių, reikia registruoti 4 jonus (molekulinį joną ir tris fragmentus), tuo tarpu naudojant tandeminį masių spektrometrą užtenka registruoti tik dvi fragmentavimo reakcijas.

ESCh atskyrimas atliekamas atvirkščių fazių chromatografijos režime naudojant C18 kolonėles ir vandens/acetonitrilo arba vandens/metanolio judrias fazes (kartais su buferio priedu) su izokratinu [71, 81-84, 87] arba gradientiniu eliuavimu [85, 88]. Taikant nedidelius judrios fazės srautus (0,2-0,4 ml/min) pasiekiamos idealios sąlygos elektrosrauto jonizacijai. Lyginant publikacijose nurodomus jautrius, galima konstatuoti, jog ESCh metodas yra gerokai jautresnis už dujų chromatografiją. Pvz., Gantverg su kolegomis [81] palygino CAP nustatymą šlapime DCh-MS ir ESCh-MS/MS metodais ir nustatė, kad ESCh-MS/MS yra apie 100 kartų jautresnis (nustatymo ribos šlapime 0,02 µg/kg ir 2 µg/kg, atitinkamai). Panašus jautrių skirtumas nustatytas ir darbe [86]. Šlapimas lyginimui pasirinktas neatsitiktinai: ši matrica laikoma viena iš sudėtingiausių vaistų likučių analizėje.

Didžiausia dalis iki šiol paskelbtų publikacijų skirta CAP nustymui krevetėse ir kitose jūros gėrybėse [80, 82, 85, 87]. Tai sąlygojo 2003 m. Olandijoje ir Vokietijoje užfiksuotas labai padidėjęs teigiamų mėginių skaičius [79]. Publikuoti darbai ir kitoms matricoms: medui [83, 84, 89], raumeniui [81-83], kiaušiniams [75, 86] šlapimui [81, 86]. Nors mėginio paruošimas skirtingoms matricoms nevienodas, nedetalizuodami, paminėsime bendrus mėginio paruošimo aspektus. Įprastai CAP ekstrahuojamas iš mėginių organiniais tirpikliais, organinė fazė garinama iki sausos liekanos, likutis tirpinamas vandenyje/vandeniniuose buferiuose ir valomas kietafazės ekstrakcijos būdu (KFE). Valymui dažniausiai naudojami C18 [71, 81, 84] arba silikagelio [80, 82] sorbentai. Po KFE eliuatai garinami ir derivatizuojami DCh analizei arba tirpinami judrioje fazėje ir nuriebalinami nepoliniu organiniu tirpikliu (pvz., heksanu, toluenu) ESCh analizei. Šlapimo analizė yra sudėtingesnė dėl mėginyje dominuojančios CAP gliukouronido formos [68]. Tokiu atveju, prieš ekstrakciją gliukouronidas yra hidrolizuojamas 1,5 val 40 °C temperatūroje inkubavus mėginį su gliukouronidazės-arilsulfatazės fermentu. Baigiant reikėtų pažymėti, kad CAP nustatymui pieno produktuose publikuotas tik vienas patvirtinamasis ESCh-MS/MS metodas [90], skirtas pieno miltelių tyrimui.

### 1.3.2. Sulfonamidai

Sulfonamidai (SA) – tai sintetiniai antibiotikai, žinomi jau nuo 1932 m. Visi šios klasės junginiai turi bendrą 4-amino-benzensulfonamido substrukūrą (R1 1.14 pav.) Šiai vaistų grupei priskiriama virš 20 junginių. SA yra hidrofolio rūgšties biosintezės inhibitoriai. Jie pasižymi kai kuriomis bendromis cheminėmis savybėmis: tirpūs praskiestose neorganinėse rūgštyse (pvz., HCl), mažai tirpūs nepoliniuose organiniuose tirpikliuose, tirpūs alkoholiuose. Šios medžiagos pasižymi gana dideliu terminiu stabilumu matricoje ir, kaip rodo tyrimai [91], net po terminio mėsos paruošimo nenustatyti statistiškai reikšmingi SA koncentracijų skirtumai žalioje ir termiškai apdorotoje mėsoje.



**1.14 pav.** Bendra sulfonamidų substrukūra ir atskirų junginių pavyzdžiai: 1 – sulfacetamidas (SAC), 2 – sulfadiazinas (SDZ), 3 – sulfapiridinas (SPY), 4 – sulfatiazolas (STZ), 5 – sulfamerazinas (SMR), 6 – sulfametazinas (SMT), 7 – sulfametizolas (SMZ), 8 – sulfametoksazolas (SMX), 9 – sulfadimetoksinas (SDM), 10 – sulfabenzamidas (SBZ).

Veterinarijoje SA naudojami kaip antimikrobiniai preparatai bei augimo skatintojai. Tai vieni plačiausiai naudojamų vaistinių preparatų [92]. Dėl SA kancerogeninių savybių bei dėl to, kad žmogaus organizmas gali nesunkiai adaptuotis jų poveikiui, šie preparatai yra išvardinti komisijos reglamento 2377/90/EEC I priede. DLK išreiškiama kaip visų mėginyje rastų SA suma ir

yra lygi 100 µg/kg. Ši DLK galioja mėšai ir pienui, tuo tarpu bičių ir vištų, kurių kiaušiniai naudojami maistui, gydymui SA naudojimas draudžiamas. Komisijos reglamente 96/23/EC sulfonamidai priskiriami B grupės medžiagoms, todėl, lyginat su CAP, jų patvirtinimui taikomi ne tokie griežti reikalavimai, t.y. galima naudoti ne tik MS pagrįstus identifikavimo metodus.

**Apžvalginiai SA nustatymo metodai.** SA yra bakteriostatiniu veikimu pasižyminčios medžiagos. Tokios savybės leidžia labai paprastai aptikti pirminius SA buvimo požymius. Inkubuojant mėginį lėkštelėse su skirtingoms antibiotikų grupėms jautriomis bakterijomis galima nustatyti ar mėginyje yra antibakterinių medžiagų ir kokios grupei jos priklauso [93]. Specifiškai jautrios bakterijos sulfonamidams - *Bacillus subtilis* [94, 95]. Patvirtinantis reagentas - p-aminobenzoinė rūgštis, konkuruojanti su SA dėl hidrofolio rūgšties inhibavimo. Šis reagentas naudojamas klaidingiems teigiamiems rezultatams atmesti. Laikoma, kad mėginys užterštas sulfonamidais, kai stebima bent 6 mm inhibicijos zona aplink mėginį, o paveikus p-aminobenzoine rūgštimi ji išnyksta. Deja, mikrobiologiniai metodai yra labai jautrūs mėginio matricai ir aplinkoms sąlygoms. Kai kurios matricos gali slopinti antibiotikų sukeltą inhibiciją, net kai jų koncentracija gerokai viršija aptikimo ribą [96].

SA nustatymui yra sukurti ir imunofermentiniai ELISA testai, tačiau komerciškai prieinami ELISA rinkiniai yra skirti tik vienam sulfonamidui arba labai nedidelei jų grupei (2-3 junginiams) [97, 98]. Didesniam SA skaičiui specifinio imunoglobulino sukūrimas problematiškas dėl šalutinių matricos efektų [99, 100].

Taip pat publikuoti apžvalginiai SA nustatymo metodai panaudojant optinius biojutiklius [97, 101-103], įgalinantys vienu metu nustatyti du [102, 103] ir daugiau (iki 8) skirtingų sulfonamidų [101]. Tai labai greiti metodai, kadangi mėginys tiesiog skiedžiamas antikūnio tirpalu ir analizuojamas, o vieno mėginio matavimas užtrunka 5-7 min. Biojutikliais pasiekama 10 µg/kg nustatymo riba sulfametazinui, o kitoms analitėms ji siekia tik 50 µg/kg [101].

**Patvirtinamieji SA nustatymo metodai.** Savo struktūroje turėdami vieną ar kelis aromatinius žiedus sulfonamidai neblogai absorbuoja UV spinduliuotę

(270-290 nm). Ši savybė leidžia juos nustatyti panaudojant ESCh su diodinės matricos detektoriumi [97, 104-110]. Šiais metodais, priklausomai nuo mėginio paruošimo, pasiekiamos iki 10 µg/kg nustatymo ribos. Tačiau dėl didelio analičių hidrofiliškumo analizę apsunkina matricos efektai ir tai verčia ieškoti papildomų priemonių atrankumui pagerinti. Buvo pasiūlyta matematiškai transformuoti chromatografinius/spektrinius duomenis [111] arba po chromatografinio atskyrimo modifikuoti analites rūgščioje terpėje 4-N,N-dimetilamino-bezaldehidu sudarant atitinkamus iminus [104]. Naudojant tokią sistemą absorbcijos maksimumas yra perstumiamas nuo 270-290 nm prie 450 nm. Kitas būdas atrankumui pagerinti - panaudoti fluorescencinį detektorių derivatizavus analites fluorescaminu arba 9-fluorenilmetil-chlorformiatu prieš kolonėlę [112, 113] arba po jos [114, 115]. Derivatizacija fluorescaminu yra gana atranki, kadangi reaguoja tik pirminiai aminai, o nustatymo ribos svyruoja nuo 0,5 µg/kg [112, 114] iki 5-20 µg/kg [113, 116]. Derivatizacija su 9-fluorenilmetil-chlorformiatu nėra tokia atranki, tačiau pasiekiamas panašus nustatymo jautris [115].

Kadangi sulfonamidų negali būti nei meduje, nei kiaušiniuose, labai svarbu juos nustatyti šiose matricose itin jautriai ir gauti pakankamai spektrinės informacijos jiems identifikuoti. Todėl tokių mėginių analizei tinkamiausias ESCh-MS metodas. Publikuotuose darbuose SA detektavimui naudojami kvadrupoliniai tandeminiai [117, 119, 120, 122], kvadrupoliniai [118, 121, 123] arba jonų gaudyklės tipo [99] masių spektrometrai. Nustatymui dažniausiai pasirenkami intensyviausi 108 ir 156 m/z fragmentai. Lyginat su kvadrupoliniais masių spektrometrais, jonų gaudyklės turi trūkumą – siaurą signalo tiesiškumo intervalą. Ši problema sprendžiama kiekybiniam įvertinimui panaudojus papildomą UV detektavimą. Nustatymo ribos siekia 0,5-15 µg/kg dirbant kvadrupoliniais masių spektrometrais [119, 123] ir 2-5 µg/kg dirbant jonų gaudyklėmis [109]. Masių spektrometro privalumas prieš kitus detektorius yra tai, kad nėra būtinas pilnas analičių atskyrimas. Papildomas atrankumas išgaunamas pačiame masių spektrometre skenuojant tik atitinkamus jonus [117, 119]. SA atskyrimo ESCh-MS metoduose sąlygos



praktiškai nesiskiria nuo sąlygų, naudojamų ESCh su tradiciniais detektoriais. Kaip taisyklė, naudojamos C18 kolonėlės ir gradientinė eliucija vandens/acetonitrilo arba vandens/metanolio judriomis fazėmis. Atskyrimo trukmę apsprendžia nustatomų analičių skaičius: nustatant 2-3 analites atskyrimo trukmės dažniausiai neviršija 10 min, tuo tarpu analizuojant didesnę SA skaičių atskyrimo trukmės siekia 20 - 50 min.

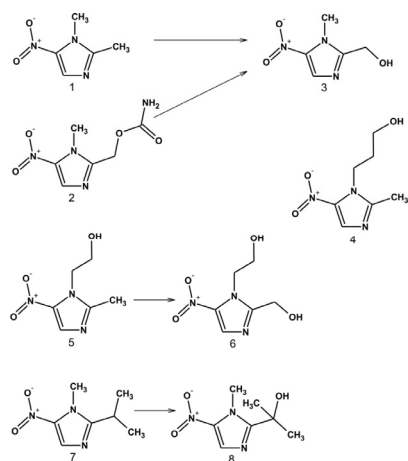
Dėl didelio poliškumo bei mažo lakumo sulfonamidų nustatymas DCh metodu naudojamas labai retai. Tarbin ir kolegų [124] darbe siūloma DCh-MS analizė panaudojant kelių stadijų derivatizaciją: analitės yra metilinamos diazometanu, po to papildomai acilinamos pentafluorpropano rūgšties anhidridu. Autoriaus pasiūlytas metodas yra pakankamai greitas (analizės trukmė 30 min.) ir gana jautrus (nustatymo riba ~25 µg/kg kiekvienam SA), tačiau turi ir trūkumų: diazometanas yra labai nestabilus, todėl jo paruošimas analizei yra sudėtingas, o metilinimo stadijoje kai kurie SA sudaro izomerų mišinius.

**Mėginių paruošimas analizei.** Priklausomai nuo matricos sudėtingumo, SA nustatymui naudojamas skirtingas mėginio paruošimas [97]. Sąlyginai nesudėtingoms vandens ir pieno matricoms siūloma taikyti ultrafiltraciją: pienas skiedžiamas etanoliu, mišinys veikiamas ultragarsu, filtruojamas labai smulkių porų filtru ir filtratas analizuojamas ESCh metodu [110]. Kituose darbuose [121, 125], minėtoms matricoms taikoma kietafazė ekstrakcija. Analizuojant sudėtingesnes matricas (mėsos audiniai, kiaušiniai, medus) būtinas sudėtingesnis mėginio paruošimas. Pvz., darbe [112] SA ekstrakcijai iš mėsos siūloma mėginio porciją ekstrahuoti etilacetatu, o po to - acetonu. Vėliau, nugarinus ir ištirpinus ekstraktus vandenyje, dar kartą ekstrahuoti metileno chloridu. Kai kuriuose darbuose [109, 124, 126]. paskutinėje stadijoje (po ekstrakcijos skysčiais) naudojamas KFE metodas panaudojant atvirkščių fazių (C18) arba jonitines kolonėles. Eilėje darbų [107, 113, 118, 120, 122] mėginių paruošimui siūlomas kietafazės disperguojamosios ekstrakcijos metodas, kuriame mėginys arba jo ekstraktas homogenizuojamas su kieto sorbento porcija, o analitės iš gauto homogeniško mišinio išplaunamos atitinkamu

tirpikliu ar jų mišiniu. Naudojant tokią procedūrą išvengiama emulsijų susidarymo. Pvz., darbe [113] sulfonamidai iš mėsos ekstrahuojami acetonitrilu, o gautas ekstraktas disperguojamas su C18 sorbentu, analitės vėl eliuuojamos acetonitrilu ir analizuojamos. Kituose darbuose mėginys disperguojamas su C18 sorbentu [120] arba su smėliu [118, 122, 123], gautas mišinys talpinamas į termostatuojamą kolonėlę arba pagreitintosios skysčių ekstrakcijos kasetę, iš kurių SA eliuuojami vandeniu aukštoje temperatūroje. Autorių teigimu, taip gaunami itin švarūs ekstraktai net iš labai sudėtingų matricių.

### **1.3.3. Nitroimidazolai**

Nitroimidazolai (NIZ) - 1,2-dialkil-5-nitroimidazolo substrukūrą turintys junginiai (1.15 pav.). Jie neblogai tirpsta vandenyje, alkoholiuose, kai kurie (pvz. IPZ, RNZ) etilacetate, tačiau netirpūs heksane. Taip pat jie gerai tirpsta praskiestose rūgštyse sudarydami druskas. Veterinarijoje ir medicinoje NIZ yra naudojami kaip antibakteriniai agentai arba antibiotikai skirti parazitinių vienaląsčių organizmų sukeltų ligų (pvz. kokcidiozės, dizenterijos) gydymui. Šie vaistai kurį laiką ES reglamente [59] kartu su kitais antikocidiniais vaistais buvo priskirti B2b grupei, tačiau vėliau, dėl gana stipriai išreikštų kancerogeninių savybių, jie buvo perkelti į ES reglamento 2377/90/EEC IV priedą [60] ir visos galiojusios DLK jiems buvo panaikintos. Dėl šių teisinių pakeitimų NIZ yra draudžiami naudoti veterinarijoje gydyti maistui auginamus gyvūnus. NIZ organizme metabolizuojasi: pagrindiniai metabolitai susidaro oksiduojantis 2-alkil grupei ir susidarant 2-hidroksialkil dariniams (1.15 pav.).



**1.15 pav.** Nitroimidazolų bei jų metabolitų struktūros: 1 – dimetridazolas (DMZ), 2 – ronidazolas (RNZ), 3 – 1-metil-2-hidroksimetil-5-nitroimidazolas (HMMNI), 4 – ternidazolas (TNZ), 5 – metronidazolas (MNZ), 6 – hidroksimetronidazolas (MNZOH), 7 – ipronidazolas (IPZ), 8 – hidroksiipronidazolas (IPZOH).

**Apžvalginiai NIZ nustatymo metodai.** Literatūroje pavyko rasti tik du apžvalginius NIZ nustatymo metodus. Darbe [127] aprašomas imunofermentinis metodas DMZ, RNZ, MNZ, IPZ ir HMMNI kiaušiniuose ir raumenyje nustatyti. Analitės iš homogenizuotų mėginių ekstrahuojamos acetonitrilu, ekstraktas nugarinamas iki sausos liekanos, likutis tirpinamas MeOH/H<sub>2</sub>O mišinyje, nuriebalinamas heksanu ir analizuojamas. Nustatymo ribos svyruoja nuo 1 µg/kg DMZ iki 40 µg/kg IPZ.

Kitame darbe [128] DMZ, MNZ ir RNZ nustatymui pasiūlytas DCh metodas su azoto-fosforo detektoriumi nenaudojant analičių derivatizacijos. Mėginio paruošimas analogiškas aprašytam aukščiau paminėtame darbe tik ekstraktų valymui papildomai panaudota kietafazės ekstrakcijos procedūra. Šiuo metodu visoms analitėms pasiektos 5 µg/kg nustatymo ribos..

**Patvirtinamieji NIZ nustatymo metodai.** Patvirtinamaisiais metodais NIZ nustatymui naudoti dujų [129-131] arba efektyviosios skysčių [132-140] chromatografijos metodai su MS detektavimu. Kadangi nederivatizuoti NIZ pasižymi mažu lakumu bei terminiu stabilumu, skysčių chromatografija žymiai populiariesnė.

Vokiečių mokslininkų darbuose [129, 130] pasiūlytas septynių NIZ bei jų metabolitų (DMZ, RNZ, MNZ, IPZ, MNZOH, IPZOH ir HMMNI) nustatymas DCh-MS metodu panaudojus neigiamą cheminę jonizaciją. Analitės buvo derivatizuojamos su O,N-bistrimetilsililacetamidu (DMZ nederivatizuojamas). Metodas pasižymi geru jautriu: nustatymo ribos visiems junginiams svyruoja nuo 0,65 iki 2,8 µg/kg. Analogiškas DCh-MS metodas DMZ ir MNZ nustatyti aprašomas ir kitame straipsnyje [131]. Čia autoriai pasiekia 1 µg/kg nustatymo ribas kepenų bei raumens matricose.

1997 m. Cannavan ir Kennedy [132] pirmieji pasiūlė DMZ nustatymą ESCh-MS metodu panaudojant „seną“ šilumos srauto (*thermospray*) jonizacijos šaltinį. Vėlesniuose darbuose [133, 134] optimizuotas didesnio analičių skaičiaus (MNZ, RNZ ir HMMNI) nustatymas. Pasiekiamos nustatymo ribos - 0,5-5 µg/kg. Dėl nedidelės NIZ molekulinės masės sunku MS detektoriuje pasiekti didelį jautrį. Dėl šios priežasties vietoj fragmentacijos jonizacijos šaltinyje prancūzų mokslininkai [133] panaudojo atvirkštinį procesą - klasterių susidarymą tarp analičių ir judria faze naudojamo tirpiklio. Šis procesas padidina detektavimo jautrį, kadangi susidarant klasteriams daugiau jonų patenka į spektrometrą.

Tandeminės masių spektrometrijos panaudojimas išsprendžia jautrio problemas, kadangi kvazimolekuliniai jonai yra fragmentuojami jau analizatoriaus sektoriuje. Iš literatūros duomenų matyti, kad su MS/MS detektoriumi pasiekiamas beveik per eilę geresnis jautris: NIZ nustatymo ribos siekia 0,1-0,5 µg/kg [135-140]. Chromatografiniam atskyrimui dažniausiai naudojamos C18 kolonėlės, nors kai kurie autoriai sėkmingai naudojo ir truputį poliškesnį C8 sorbentą [136, 137]. Nustatant vieną-tris analites (pvz.: DMZ, MNZ, RNZ) įprastai naudojama izokartinė eliuacija, o nustatant didesnę analičių skaičių kartu su metabolitais jau būtinas gradientinis eliuavimas. Kadangi NIZ ir jų metabolitų poliškumų skirtumas pakankamai didelis, net ir gradientiniame režime atskyrimo trukmės siekia 25-30 min. Būtina pažymėti, kad iki šiol nepublikuotas nei vienas darbas, skirtas visų penkių NIZ bei trijų jų metabolitų atskyrimui ir nustatymui.

**Mėginių paruošimas.** Eilėje darbų siūloma ekstrahuoti NIZ iš biologinių mėginių acetonitrilu [134, 136] arba etilacetatu [133, 140]. Tačiau emulsijos susidarymas skatina ieškoti efektyvesnių ekstrakcijos būdų. Polzer ir Gowik [130] rekomenduoja atlikti mėginių hidrolizę su proteaze, ir po to, praskiedus mėginį, jį ekstrahuoti panaudojant diatomitinės žemės sorbentą. Analitės desorbuojamos etilacetato-tretbutilmetileterio mišiniu ir analizuojamos DCh-MS arba ESCh-MS metodais [138]. Sudėtingos matricos (mėsa, kiaušiniai) mėginių ekstraktus būtina papildomai valyti. Šiam tikslui pasiūlyta kietafazė ekstrakcija naudojant silikagelį [132] arba polimerinį hidrofilinės-lipofilinės sąveikos HLB [135] sorbentą. Dėl bazinių imidazolo žiedo savybių (protonizacijos) galima valymui panaudoti katijonitinius sorbentus [137]. Paminėtuose darbuose akcentuojama, kad nustatant NIZ kartu su metabolitais, labai sunku parinkti efektyvią ekstrakcinę sistemą visoms analitėms dėl didesnio hidroksilintų metabolitų MNZOH ir HMMNI poliškumo. Viena naujausių tendencijų kietafazėje ekstrakcijoje - molekulių atspaudų polimeriniai sorbentai, pasižymintis unikaliu atrankumu konkrečiai analitei arba jų grupei. Neseniai publikuotame Mohamed ir bendraautorių darbe [139] NIZ ir metabolitų išskyrimui iš kiaušinio matricos pasiūlytas pačių autorių susintetintas molekulių atspaudų polimerinis sorbentas. Apibendrinus galima konstatuoti, kad iki šiol nėra universalios ir paprastos procedūros efektyviam NIZ ir jų metabolitų išskyrimui iš biologinių mėginių.

## II. EKSPERIMENTO METODIKA

### 2.1. Aparatūra

ESCh atskyrimai buvo atliekami Waters Alliance 2795 (Milford MA, USA) chromatografu, sukomplektuotu iš ketunarės aukšto slėgio siurblių sistemos, automatinės mėginio įleidimo sistemos, termostatuojamų kolonėlių ir tandeminio masių spektrometrinio detektoriaus Quattro Ultima Pt Micromass (Wythenshawe, UK) su elektrosrauto jonizacija (ESI).

UESCh atskyrimai buvo atliekami Waters Acquity UPLC (Milford MA, USA) chromatografu, sukomplektuotu iš ketunarės aukšto slėgio siurblių sistemos, automatinės mėginio įleidimo sistemos, termostatuojamų kolonėlių ir tandeminio masių spektrometrinio detektoriaus Quattro Premier XE (Waters, Manchester, UK) su elektrosrauto jonizacija (ESI). ESI jonizacijos šaltinio parametrai: kapiliaro įtampa 2,5 kV, šaltinio temperatūra 120°C ir desolvacijos dujų temperatūra 350 °C. Duomenys buvo apdorojami MassLynx 4.0 programa.

CAP atskyrimui naudota C<sub>18</sub> SymmetryShield kolonėlė (10 cm × 2,1 mm, dalelių dydis 3,5 μm) sukomplektuota su SymmetryShield C<sub>18</sub> prieškolonėle (1 cm × 2,1 mm, 3,5 μm) (Waters).

SA atskyrimas ESCh metodu buvo atliekamas Phenomenex Aqua C18 kolonėlėje (150 mm×2,0 mm, dalelių dydis 3 μm) (Waters). SA ir nitroimidazolų atskyrimas UESCh metodu buvo atliekamas Acquity BEH C<sub>18</sub> kolonėlėje (100 mm×2,1 mm, dalelių dydis 1,7 μm) (Waters).

### 2.2. Reagentai ir tirpalai

Darbe naudotos šios medžiagos:

Acetonitrilas, gradientinės ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Anglies tetrachloridas, >99,5 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Dietileteris, >99,9 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Etilacetatas, >99,9 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Heksanas, >99,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Metanolis, gradientinės ESCh grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Nitroimidazolai, jų metabolitai ir deuteruoti standartai, >98 % grynumo (Centrinė referentinė laboratorija, Berlynas, Vokietija)

Skrudžių rūgštis, 95,0 % (Sigma-Aldrich, JAV).

Chloramfenikolis, >99,0 % grynumo (Fluka, Šveicarija).

Deuteruotas chloramfenikolis ( $d_5$ -CAP), >98 % grynumo (Kembridžo Izotopų laboratorija, JAV).

Sulfonamidai, >99,0 % grynumo (Sigma, JAV).

Sulfametazinas- $^{13}C_6$ , >98 % grynumo (Kembridžo Izotopų laboratorija, JAV).

Sulfametoksazolas- $^{13}C_6$ , >98 % grynumo (Kembridžo Izotopų laboratorija, JAV).

Trichloracto rūgštis, >99,0 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Trietilaminas, >99,5 % grynumo (Sigma-Aldrich, JAV).

Pirminiai CAP ir  $d_5$ -CAP standartiniai tirpalai (0,1 mg/ml) buvo ruošiami metanolyje ir laikomi tamsiuose induose 4 °C temperatūroje. Pirminiai sulfonamidų ir jų vidinių standartų standartiniai tirpalai (1 mg/ml) buvo ruošiami acetonitrile ir laikomi tamsiuose induose -20 °C temperatūroje. Pirminiai nitroimidazolų, jų metabolitų ir vidinių standartų standartiniai tirpalai (1 mg/ml) buvo ruošiami metanolyje ir laikomi tamsiuose induose -20 °C temperatūroje. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pirminius standartus atitinkamu tirpikliu.

### 2.3. Mėginių paruošimo procedūros

Visi mėginių paruošimo analizei tyrimai buvo atliekami su realių mėginių matricomis be analičių.

**Pieno mėginių paruošimas CAP nustatymui.** Į 10,0 g pieno, pieno miltelių arba išrūgų pridedame 10 ml vandens, centrifuguojame 20 min 3500 g greičiu -4 °C temperatūroje ir nugriebiame riebalus. Į stiklinį mėgintuvėlį imame 3 ml nuriebalinto mėginio, įpilame 6 ml etilacetato, 1 ml 0,6 ng/ml  $d_5$ -CAP ir/arba atinkamos koncentracijos analičių standarto, mišinys purtomas 45 min 200 min<sup>-1</sup> greičiu ir centrifuguojamas. Atskirta organinė fazė išgarinama azoto sraute 50 °C temperatūroje, likutis ištirpinamas 0,5 ml vandens,

pridedama 0,5 ml anglies tetrachlorido/heksano (1:1 v/v) mišinio, ekstrahuojame 5 min ir centrifuguojame 5 min 3500 g greičiu. Vandeninė fazė atskiriama ir analizuojama.

**Kiaušinių ir medaus mėginių paruošimas SA nustatymui.** Į ekstrakcinį indą imame 2,00 g kiaušinio mėginio arba 2,00 g medaus mėginio sumaišyto su 2 ml vandens, pridedame 100 µl vidinių standartų tirpalo (0,1 µg/ml) ir/arba atinkamos koncentracijos analičių standarto. Mišinį purtome 10 min, įpilame 10 ml acetonitrilo, vėl purtome 10 min, centrifuguojame 10 min 3500 g greičiu, dekantuojame, o likutį ekstrahuojame dar kartą su 10 ml acetonitrilo. Ekstraktai apjungiami, išgarinama azoto sraute 50 °C temperatūroje iki sausos liekanos, kuri ištirpinama 20 ml 0,2 mol/l amonio acetato buferyje (pH 5,3), nuriebalinama 5 ml heksano, mišinys centrifuguojamas ir atskirta vandeninė fazė valoma kietafazės ekstrakcijos būdu.

Kietafazės ekstrakcijos patronas Strata-X (Phenomenex) kondicionuojamas 5 ml metanolio, po to 5 ml 0,2 mol/l amonio acetato buferio (pH 5,3). Suleidus ekstraktą, patronas plaunamas 5 ml vandens ir išdžiovinamas vakuumuojant. Analitės desorbuojamos 7 ml acetonitrilo, tirpalas išgarinamas azoto sraute 50 °C temperatūroje iki sausos liekanos, likutis tirpinamas 200 µl 0,05% skruzdžių rūgšties tirpalo, filtruojamas ir analizuojamas.

**Kiaušinių mėginių paruošimas nitroimidazolu ir jų metabolitu nustatymui.** Kadangi nitroimidazolai jautrūs šviesai, visos procedūros atliekamos tamsiuose induose esant geltonam apšvietimui. Į 50 ml polipropileno mėgintuvėlį imame 5,00 g susmulkinto kiaušinio arba 1,00 g kiaušinio miltelių su 4 ml vandens, pridedame 100 µl vidinių standartų tirpalo ir/arba atinkamos koncentracijos analičių standarto ir laikome tamsoje 5 min. Po to įpilame 10 ml 0,2 mol/l natrio acetato buferio (pH 5) ir 10 ml 5% trichloracto rūgšties, mišinį maišome 10 min ir centrifuguojame 10 min 3500 g greičiu. Dekantuojame, likutį vėl ekstrahuojame 5 ml 5% trichloracto rūgšties ir centrifuguojame. Abu ekstraktai apjungiami, tirpalas pašarminamas 5 mol/l NaOH tirpalu iki pH 5 ir valomas kietafazės ekstrakcijos būdu.



Kietafazės ekstrakcijos patronas Strata-X-C (200 mg/6 ml, Phenomenex) kondicionuojamas 5 ml metanolio, po to 5 ml vandens ir 5 ml 0,2 mol/l acetatinio buferio (pH 5,0). Suleidus ekstraktą, patronas plaunamas 5 ml 5% trichloracto rūgšties, 3 ml metanolios ir išdžiovinamas vakuumuojant. Analitės desorbuojamos 7 ml vandens/trietilamino/etilacetato (2,5:2,5:95, v/v) tirpalo, tirpalas išgarinamas azoto sraute 35 °C temperatūroje iki sausos liekanos, likutis tirpinamas 150 µl judrios fazės A, filtruojamas ir analizuojamas.

#### 2.4. Metodų įteisinimo procedūros

Buvo vertinamos šios metodų charakteristikos: atrankumas kitiems veterinariniams vaistams, kalibracinės kreivės tiesiškumas, sprendimo riba ( $CC_{\alpha}$ ), aptikimo geba ( $CC_{\beta}$ ), teisingumas ir glaudumas (pakartojamumas+atkuriamumas) bei metodo atsparumas įvairiems faktoriams. Visi įteisinimo tyrimai buvo atliekami su realiais mėginiais (be analičių), pridedant į juos skirtingus analičių standartų kiekius ir fiksuotus vidinio standarto kiekius.

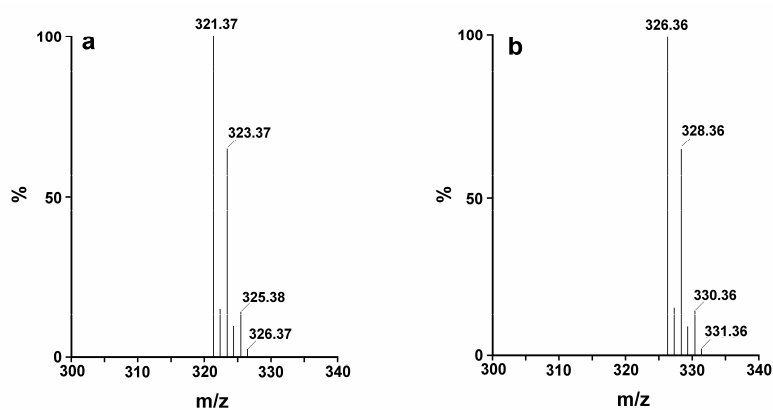
Vietoje analizinėje chemijoje plačiai naudojamų aptikimo ir nustatymo ribų veterinarinių vaistų likučių nustatymo metodams neseniai buvo įvesti sprendimo ribos ( $CC_{\alpha}$ ) ir aptikimo gebos ( $CC_{\beta}$ ) parametrai [62].  $CC_{\alpha}$  – mažiausia vaisto koncentracija, kurią nustačius duotu metodu su  $\alpha$  paklaidos tikimybe galima spręsti, kad mėginys yra teigiamas (užkrėstas).  $CC_{\beta}$  – mažiausia vaisto koncentracija, kurią duotu metodu galima identifikuoti ir/arba kiekybiškai nustatyti realiame mėginyje su  $\beta$  paklaidos tikimybe. Tai reiškia, kad signalas, atitinkantis analitės koncentraciją, mažesnę už  $CC_{\alpha}$  yra laikomas fono triukšmais, o signalas, atitinkantis analitės koncentraciją lygią ar didesnę už  $CC_{\beta}$  leidžia patikimai identifikuoti/nustatyti analitę.  $CC_{\alpha}$  ir  $CC_{\beta}$  vertės buvo nustatomos iš kalibracinių kreivių su  $\alpha = 1\%$  ir  $\beta = 5\%$  paklaidos tikimybėmis:  $CC_{\alpha} = 2,33 \times y$  atkirtos standartinė paklaida;  $CC_{\beta} = CC_{\alpha} + (1,64 \times CC_{\alpha}$  koncentracijos 20-ies matavimų standartinis nuokrypis).

### III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

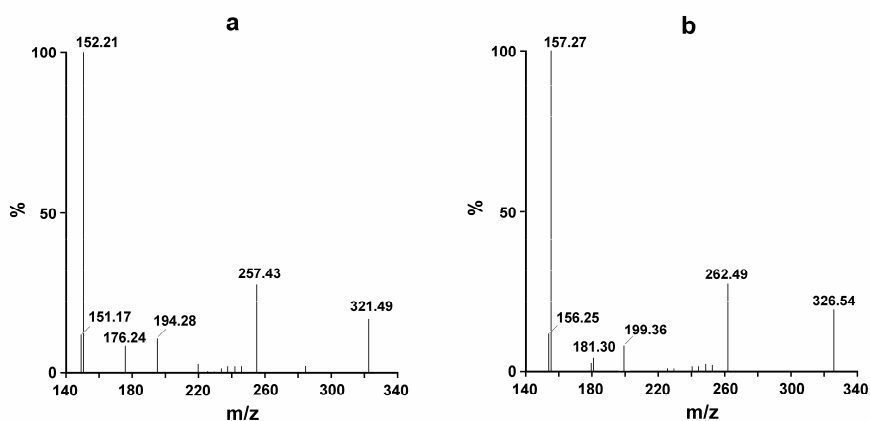
#### 3.1. Chloramfenikolio tyrimai ESCh-MS/MS metodu

##### 3.1.1. MS/MS detektavimo sąlygų parinkimas

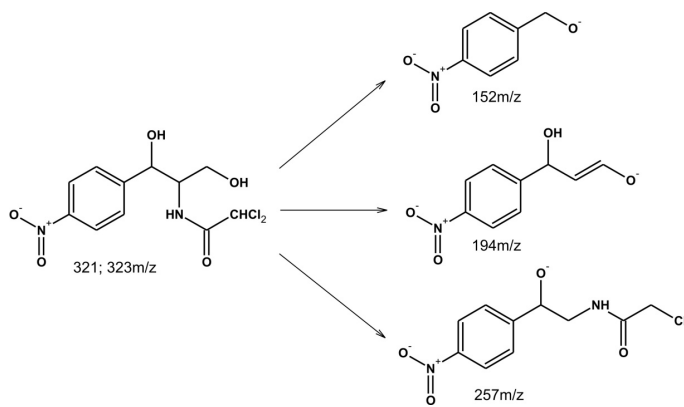
Pagal ES normatyvus [62] analizuojant uždraustus junginius ESCh-MS/MS metodu mažiausiai vienas molekulinis jonas ir dvi jo skilimo reakcijos susidarant dviems skirtingiems fragmentams yra būtini patikimam analitės identifikavimui ir kiekybiniam nustatymui. Siekiant parinkti optimalias MS/MS detektavimo sąlygas buvo išmatuoti chloramfenikolio (CAP) ir vidiniu standartu naudoto penkiais deuterio atomais žymėto *d*<sub>5</sub>-chloramfenikolio (*d*<sub>5</sub>-CAP) standartinių tirpalų masių spektrai esant neigiamai elektrotrauto jonizacijai. Iš 3.1 pav. pateiktų masių spektrų matyti, kad didžiausiu intensyvumu pasižymi *m/z* 321 (CAP) ir *m/z* 326 (*d*<sub>5</sub>-CAP) deprotonuoti molekuliniai jonai (M-H)<sup>-</sup>, kurie ir buvo pasirinkti tolimesniam fragmentavimui. Fragmentavimas vyksta į skaldymo celę praleidžiant tik vieną molekulinį joną, jį skaldant ir registruojant fragmentų skaičių ir jų intensyvumą. 3.2 pav. pavaizduoti šių jonų fragmentavimo masių spektrai. Chloramfenikoliui intensyviausi fragmentai registruojami vykstant skilimams *m/z* 321→152 ir *m/z* 321→257, o deuteruotam junginiui - *m/z* 326→157 ir *m/z* 326→262. Išmatuoti masių spektrai neblogai sutampa ir su kitų autorių darbuose pateikiamais CAP spektrais [82, 83]. Nežymiai skiriasi tik fragmentų intensyvumų santykiai. Remiantis gautais duomenimis 3.3 pav. pavaizduota tikimiausia CAP fragmentacijos schema. Pasirinktos MS/MS detektavimo analizei ir vidiniam standartui sąlygos pateiktos 3.1 lentelėje. Be to, patikrinus atskirai abu grynus junginius (CAP ir *d*<sub>5</sub>-CAP) buvo nustatyta, kad jų signalai visiškai nepersikloja.



**3.1 pav.** Eksperimentiškai išmatuoti CAP (a) ir deuterio atomais žymėto *d*<sub>5</sub>-CAP (b) masių spektrai.



**3.2 pav.** CAP molekulinio jono *m/z* 321 (a) ir *d*<sub>5</sub>-CAP molekulinio jono *m/z* 326 (b) fragmentavimo masių spektrai.



**3.3 pav.** CAP fragmentacijos MS/MS detektoriuje schema.

### 3.1 lentelė

Optimizuoti MS/MS detektavimo parametrai (skenavimo trukmė 0,2 s)

Junginys	Molekulinis jonas ( $m/z$ )	Skilimai ( $m/z$ )	Konusinio filtro įtampa (V)	Skaldymo energija (eV)
CAP	321	321→152 (intensyvesnis)	52	15
		321→257 (mažiau intensyvus)	52	10
$d_5$ -CAP	326	326→157 (intensyvesnis)	54	15
		326→262 (mažiau intensyvus)	54	10

#### 3.1.2. Chromatografinio atskyrimo sąlygų optimizavimas

Eksperto pradžioje buvo ieškoma optimalios judrios fazės sudėties. Kadangi yra žinoma, jog neigiamą jonizaciją skatina nestipriai parūgštinti amonio acetatiniai buferiai, pirmiausiai buvo išbandytas vandeninis 0,025 mol/l amonio acetato buferinis tirpalas su 0,1 mol/l skruzdžių rūgšties priedu gradientiškai eliuuojant su acetonitrilu. Deja, naudojant šią judrią fazę chromatografinėje sistemoje pasireiškė analitės pernašos (angl. *carry-over*) efektas, t.y. po CAP standartinio tirpalo analizės įleidus vandens porciją, jo chromatogramoje taip pat buvo registruojama nedidelė CAP smailė. Tai rodo, kad dalis analitės po atskyrimo lieka chromatografo komponentuose (mėginio įleidimo sistemoje, sujungimo vamzdeliuose ar kolonėlėje). Labiausiai tikėtina tokio efekto priežastis – parūgštintoje judrioje fazėje analitė protonizuojasi ir papildomai adsorbuojasi ant neigiamų krūvių centrų (pvz. disocijavusių likutinių silanolinių grupių).

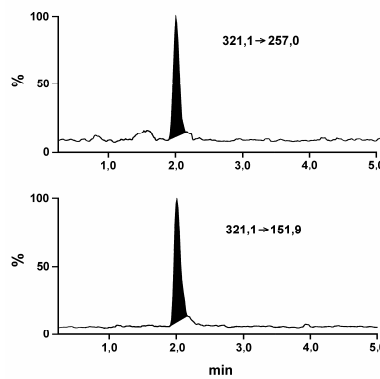
Analitės pernašos efektas buvo visiškai eliminuotas naudojant vandens-acetonitrilo judrią fazę be buferio ir rūgšties priedo. Optimizuoti judrios fazės gradiento parametrai pateikti 3.2 lentelėje, o standartinio CAP tirpalo chromatograma pavaizduota 3.4 pav. Optimizuotose sąlygose CAP eliuojamas per 2 min, o viso atskyrimo ciklo trukmė – 8 min.

### 3.2 lentelė

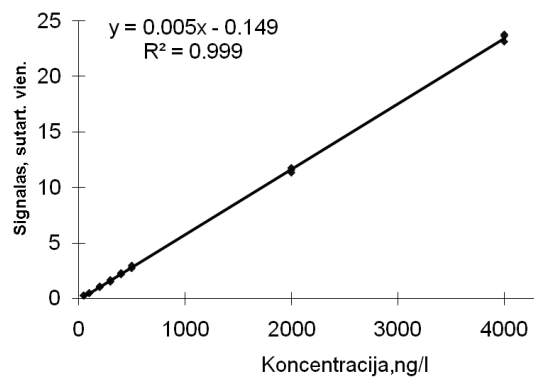
Judrios fazės gradiento formavimo parametrai

Trukmė, min	Vanduo, %	Acetonitrilas, %	Tėkmės greitis, ml/min
0	80	20	0,2
4	40	60	0,2
7	40	60	0,2
8	80	20	0,2

Siekiant parinkti tinkamas CAP priedo koncentracijas optimizuojant mėginio paruošimo procedūrą, buvo išmatuota CAP kalibracinė kreivė (3.5 pav.). Matyti, kad kalibracinė yra tiesinė CAP koncentracijų intervale net iki 4000 ng/l.



3.4 pav. Standartinio CAP tirpalo chromatograma. CAP koncentracija 40 ng/l; injekcijos tūris 20 µl; kolonėlės temperatūra 25 °C.



3.5 pav. CAP kalibracinė kreivė.

### 3.1.3. Ekstrakcija ir ekstraktų valymas

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, šiuolaikinėje biologinių objektų analizėje bene svarbiausiu ir daugiausiai problemų keliančiu etapu yra mėginio paruošimas analizei. Nustatant veterinarinius vaistus dažniausiai jie yra ekstrahuojami skysčių-skysčių ekstrakcijos metodu, o gautas ekstraktas dar papildomai valomas skysčių-skysčių ekstrakcijos arba kietafazės ekstrakcijos (KFE) metodais. Riebioms matricoms būtina ir mėginio nuriebalinimo procedūra.

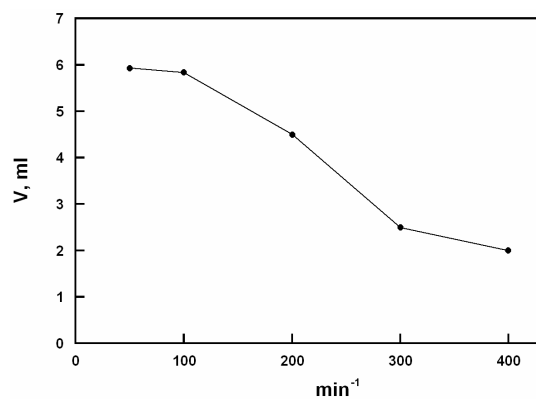
Mėginio paruošimo tyrimams buvo naudojami pieno mėginiai su žinomos koncentracijos CAP priedu. Kadangi analizė yra pakankamai tirpi vandenyje, nuriebalinimas buvo atliekamas praskiedžiant (maždaug 2 kartus) mėginį vandeniui, centrifuguojant 20 min 3500 g greičiu  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje ir nugriebiant riebalus.

CAP ekstrakcijos iš pieno mėginių tyrimams pasirinkome du tirpiklius – dietileterį ir etilacetatą (EtOAc). Preliminariuose tyrimuose į 3 ml nuriebalinto pieno mėginio buvo pridėdami 6 ml atitinkamo tirpiklio, mišinys purtomas 15 min maždaug  $400\text{ min}^{-1}$  greičiu, centrifuguojamas, atskirta organinė fazė išgarinama azoto sraute  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, likutis ištirpinamas vandenyje ir analizuojamas. Absoliučios (be vidinio standarto) CAP išgavos buvo nustatomos palyginus CAP smailės plotą ekstrakto chromatogramoje su atitinkamos koncentracijos standartinio tirpalo chromatogramoje išmatuotu CAP smailės plotu. Nustatyta, kad ekstrahuojant etilacetatu, CAP išekstrahuojamas efektyviau: absoliučios išgavos siekia  $38\pm 10\%$  ekstrahuojant dietilo eteriu ir  $53\pm 9\%$  ekstrahuojant etilacetatu. Deja, ekstrahuojant abiem tirpikliais vyksta dalinis emulsijos susidarymas, todėl dalis ekstrakto, o tuo pačiu ir analizės, po centrifugavimo lieka vandeninėje fazėje (emulsijoje). Dirbant su vidiniu standartu, šis procesas neturi didelės įtakos rezultatų tikslumui, tačiau labai sumažina detektavimo jautrį. Dažniausiai emulsijos susidaro labai intensyviai purtant mėginį ekstrakcijos metu. 3.6 pav. pateikta purtymo greičio įtaka emulsijos susidarymui. Didinant purtymo greitį, po ekstrakto centrifugavimo gaunamos organinės fazės tūris mažėja, t.y. emulsijos

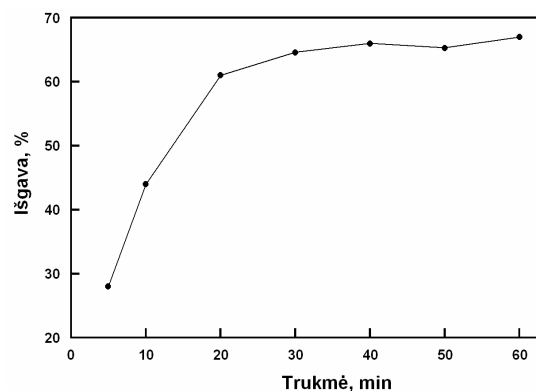
susidarymas stiprėja. Emulsija visiškai nesusidaro esant purtymo greičiams  $\leq 100 \text{ min}^{-1}$ . Deja, mažinant purtymo intensyvumą, padidėja ekstrakcijos trukmė. 3.7 pav. pavaizduota absoliučios CAP išgavos priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės purtant  $200 \text{ min}^{-1}$  greičiu. Šiomis sąlygomis ekstrakcinė pusiausvyra pasiekama per 30-35 min. Sumažinus purtymo greitį dvigubai, ekstrakcijos trukmė padidėja dar maždaug 1,5-1,8 kartus. Tolimesniems tyrimams pasirinkome kompromisines sąlygas - 45 min ekstrakciją  $200 \text{ min}^{-1}$  greičiu. Šiose sąlygose emulsijos susidarymo įtaka nėra labai reikšminga (prarandame tik apie 20% ekstrakto), tačiau apie 1,5 karto sumažiname ekstrakcijos trukmę.

Papildomam biologinių objektų ekstraktų valymui dažniausiai naudojami skysčių-skysčių ekstrakcijos arba KFE metodai. Šios procedūros paskirtis – kuo efektyviau pašalinti iš ekstrakto pašalinius junginius, slopinančius arba blokuojančius analitės signalą ir/arba stipriai sulaikomus chromatografinėje kolonėlėje. Nors KFE metodas yra laikomas pažangesniu ir paskutiniaisiais metais vis dažniau taikomas, mes pasirinkome klasikinę ekstrakciją skysčiais. Pagrindinė tokio pasirinkimo priežastis – skysčių-skysčių ekstrakcija greitesnė, paprastesnė ir pigesnė. Palyginome tris nepolinius ekstrahentus – anglies tetrachloridą, heksaną ir anglies tetrachlorido/heksano mišinį (1:1 v/v). Mėginio valymo efektyvumo tyrimui į pieno mėginio (be analitės) vandeninį ekstraktą (0,5 ml) buvo pridedamas žinomas CAP standarto kiekis, mišinys ekstrahuojamas 5 min 0,5 ml atitinkamo tirpiklio, vandeninė fazė atskiriama ir analizuojama. Mėginio valymo efektyvumas buvo vertinamas lyginant CAP išgavas bei pašalinių smailių skaičių ir intensyvumą chromatogramose (ekstraktų grynumą). Nustatėme, kad su visais trim tirpikliais absoliučios CAP išgavos ( $\geq 90\%$ ) puikiai tenkina reglamento reikalavimus, tačiau valant ekstraktus anglies tetrachlorido/heksano mišiniu, mėginyje lieka mažiau pašalinių junginių.

Galutinė pieno mėginių paruošimo ESCh-MS/MS analizei procedūra pateikta skyrelyje „Eksperimento metodika“.



**3.6 pav.** Po ekstrakto centrifugavimo gaunamos organinės fazės tūrio priklausomybė nuo purtymo greičio. 3 ml nuriebalinto pieno mėginio ekstrahuojama 6 ml EtOAc, ekstrakcijos trukmė – 20 min.



**3.7 pav.** Absoliučios CAP išgavos priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės. CAP koncentracija 0,3 μg/kg. 3 ml nuriebalinto pieno mėginio ekstrahuojama 6 ml EtOAc.

### 3.1.4. Metodo analizinės charakteristikos

Metodo įteisinimas atliktas vadovaujantis ES direktyva 2002/657/EB [62]. Buvo įvertintos šios metodo charakteristikos: atrankumas kitiems veterinariniams vaistams, kalibracinės kreivės tiesiškumas, sprendimo riba ( $CC_{\alpha}$ ), aptikimo geba ( $CC_{\beta}$ ), teisingumas ir glaudumas (pakartojamumas+atkuriamumas).

Metodo atrankumas kitiems veterinariniams vaistams buvo įvertintas 24 pieno mėginius suskirsčius į 6 grupes po 4 mėginius. Į 5-ias grupes mėginių buvo pridėta šių klasių junginių: tetraciklinų, penicilinų, florokvinolonų, sulfonamidų ir benzimidazolų. Pridedami vaistų kiekiai pasirinkti atsižvelgiant



į jų mažiausias leistinas koncentracijas. Kadangi pašalinis vaistas gali būti eliuojamas kartu su analite ir savo rūgštinėmis ar bazinėmis savybėmis skatinti arba slopinti jos jonizaciją, buvo tikrinama kiekvienos klasės junginių įtaka CAP signalo intensyvumui. Atrankumo tyrimo duomenys pateikti 3.3 lentelėje. Nustatytos CAP koncentracijos yra neapibrėžties ribose, todėl galima teigti, kad pašaliniai junginiai CAP signalo neįtakoja.

### 3.3 lentelė

CAP nustatymo piene ESCh-MS/MS metodu atrankumo tyrimo rezultatai

Vaistų grupė (priedo koncentracija)	Junginiai	Mėginys be CAP		Mėginys su 0,300 μg/kg CAP	
		1	2	1	2
Penicilinai (4 μg/kg)	Nafcilinas Oksacilinas Kloksacilinas Dikloksacilinas Penicilinas G Penicilinas V Ampicilinas Amoksicilinas	-	-	0,296 μg/kg	0,319 μg/kg
Sulfonamidai (20 μg/kg)	Sufanilamidas Sulfatiazolas Sulfacetamidas Sulfametazinas Sulfadimetoksinas	-	-	0,292 μg/kg	0,319 μg/kg
Florokvinolonai (30 μg/kg)	Danofloksacinas Enrofloksacinas Norfloksacinas Flumekvinas Sarafloksacinas Cifloksacinas	-	-	0,267 μg/kg	0,287 μg/kg
Tetraciklinai (100 μg/kg)	Tetracilkinas Oksitetraciklinas Chlortetraciklinas Doksiciklinas	-	-	0,296 μg/kg	0,311 μg/kg
Benzimidazolai (10 μg/kg)	Fenbendazolas Albendazolas	-	-	0,305 μg/kg	0,314 μg/kg
Tuščias mėginys	-	-	-	0,321 μg/kg	0,315 μg/kg

Kitos metodo analizinės charakteristikos bei metodo atsparumas įvairiems faktoriams buvo įvertinti alternatyviu būdu panaudojus specialią kompiuterinę

programą InterVal™. Tyrimui pasirinkome keturis faktorius galinčius įtakoti analizės rezultatus, o pagrindiniu faktoriumi – mėginio matricą. Pagrindinis faktorius buvo kaitaliojamas keturiais lygmenimis, o kiti trys faktoriai – dviem lygmenimis (3.4 lentelė). Visi tyrimai buvo atliekami su realiais mėginiais (be analitės), pridodant į juos keturių skirtingų koncentracijų (0,02, 0,10, 0,30 ir 0,60 µg/kg) CAP standarto ir fiksuotą vidinio standarto ( $d_5$ -CAP) koncentraciją. Visas tyrimas buvo suskaidytas į 4 ciklus po 32 analizės kiekvienam ciklui.

Kritinės CAP koncentracijos ( $CC_\alpha$  ir  $CC_\beta$ ) buvo nustatytos grafiškai naudojantis tų pačių serijų rezultatais ir yra lygios 0,050 ( $CC_\alpha$ ) ir 0,066 µg/kg ( $CC_\beta$ ). 3.5 lentelėje pateikti metodo glaudumo (pakartojamumo ir atkuriamumo) bei teisingumo įvertinimo rezultatai keturioms CAP koncentracijoms. Pagal ES nustatytus kriterijus analitės koncentracijoms  $\leq 1$  µg/kg, jos išgavos iš mėginių turi būti 50-120% intervale. Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, metodo teisingumas žymiai viršija minimalius teisingumo reikalavimus.

**3.4 lentelė**

Faktoriai ir jų lygmenys vertinti įteisinant metodą

Faktorius	Faktoriaus lygmenys			
	Pienas	Pieno išrūgos	Pieno miltai	Vanduo
Mėginio matrica (pagrindinis)				
Operatorius	A		B	
Ekstrakcijos tipas	Statinė (16 val)		Dinaminė	
Ekstraktų laikymas	0 dienų		1 diena	

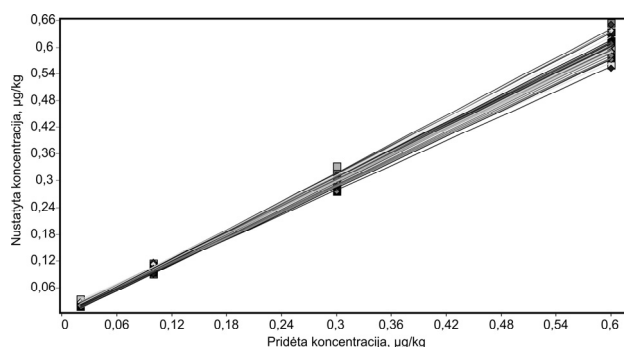
**3.5 lentelė**

CAP nustatymo ESCh-MS/MS metodu pakartojamumo ( $SSN_r$ , %), atkuriamumo ( $SSN_{WR}$ , %) bei teisingumo (išgavos) įvertinimo rezultatai

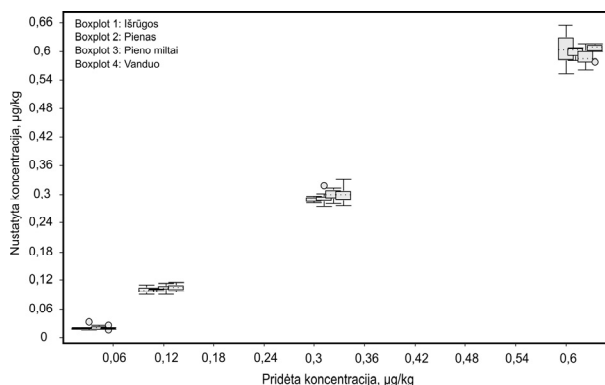
CAP koncentracija, µg/kg	$SSN_r$ , %	$SSN_{WR}$ , %	Išgava, %
0,020	30,0	30,3	105,3
0,100	7,9	8,0	100,8
0,300	3,1	4,2	100,0
0,600	1,7	3,5	99,8

Atlikus visus matavimus buvo įvertinta bendra kalibracinė kreivė ir atskiros kalibracinės kreivės konkreitiems faktoriams. 3.8 pav. pavaizduotos kalibracinės kreivės atskiriems faktoriams iliustruoja CAP matavimo rezultatų

glaudumą. Kalibracinės kreivės konkreitiems faktoriams leidžia greitai ir patikimai identifikuoti, tų faktorių įtaką analizės rezultatams. Iliustracijai, 3.9 pav. pateikta stačiakampė diagrama faktoriui „mėginio matrica“. „Dėžutėmis“ pavaizduoti 25-75% kvantiliai, o „ūseliais“ – didžiausios ir mažiausios rezultatų vertės. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad visoms keturioms matricoms matavimo rezultatų sklaida yra palyginti nedidelė ir labai panaši. Tik didžiausiai CAP koncentracijai išrūgų mėginiams rezultatų sklaida yra didesnė. Tačiau apskaičiuotos *t*-vertės parodė, kad šis sklaidos padidėjimas statistiškai nereikšmingas. Taigi, optimizuotas ESCh-MS/MS metodas puikiai tinka ne tik pieno, bet ir išrūgų bei pieno miltelių mėginiams.



**3.8 pav.** CAP kalibracinės kreivės atskiriems faktoriams (32 matavimai).

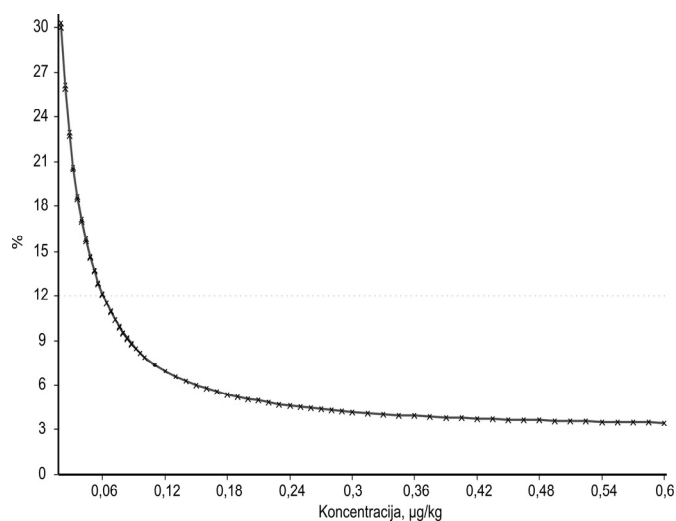


**3.9 pav.** Stačiakampė diagrama, iliustruojanti mėginio matricos įtaką CAP nustatymui.

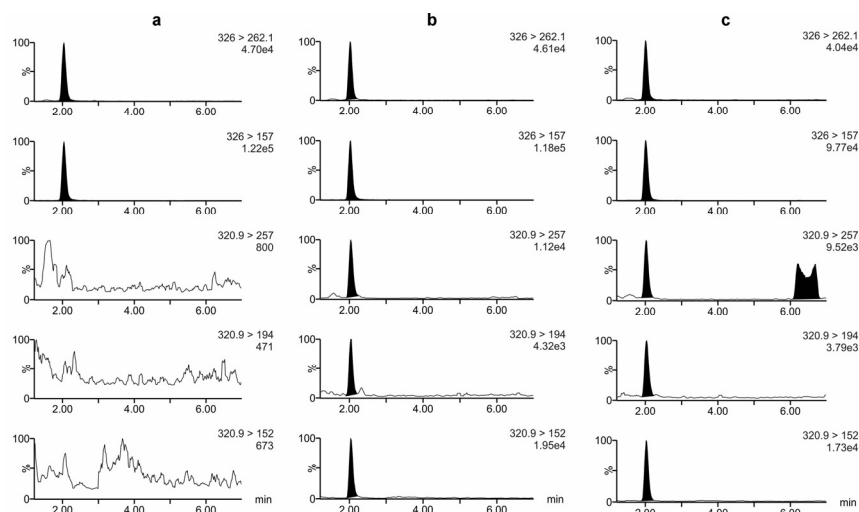
Analogišku būdu buvo įvertinta ir kitų faktorių įtaka ir nustatyta, kad nei vienas iš tyrimų metu vertintų faktorių (operatorius, ekstrakcijos tipas, ekstraktų laikymas) analizės rezultatų reikšmingai neįtakoja.

3.10 pav. parodyta bendros CAP nustatymo neapibrėžties priklausomybė nuo CAP koncentracijos. Kaip ir buvo galima tikėtis, matavimų neapibrėžtis yra palyginti nedidelė (4-7%) ir gana pastovi matuojant didesnes CAP koncentracijas (0,1-0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Tuo tarpu mažesnių CAP koncentracijų srityje, mažėjant analitės koncentracijai matavimų neapibrėžtis staigiai didėja. Bet kuriuo atveju, kritinėms CAP koncentracijoms (0,050 ( $\text{CC}_\alpha$ ) ir 0,066  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\text{CC}_\beta$ )) santykinė matavimų neapibrėžtis neviršija 15% ir tai yra palyginti nedidelė vertė nustatant tokius mažus kiekius biologinėse matricose.

3.11 pav. pavaizduotos pieno mėginio, pieno mėginio su 0,040  $\mu\text{g}/\text{kg}$  CAP standarto priedu ir užteršto chloramfenikoliu pieno miltelių mėginio chromatogramos.



**3.10 pav.** CAP nustatymo ESCh-MS/MS metodu bendros neapibrėžties (%) priklausomybė nuo CAP koncentracijos.



**3.11 pav.** Pieno mėginio (a), pieno mėginio su 0,040 µg/kg CAP priedu (b) ir pieno miltelių mėginio (c) chromatogramos.

### 3.2. Sulfonamidų nustatymo ESCh ir UESCh metodais tyrimas

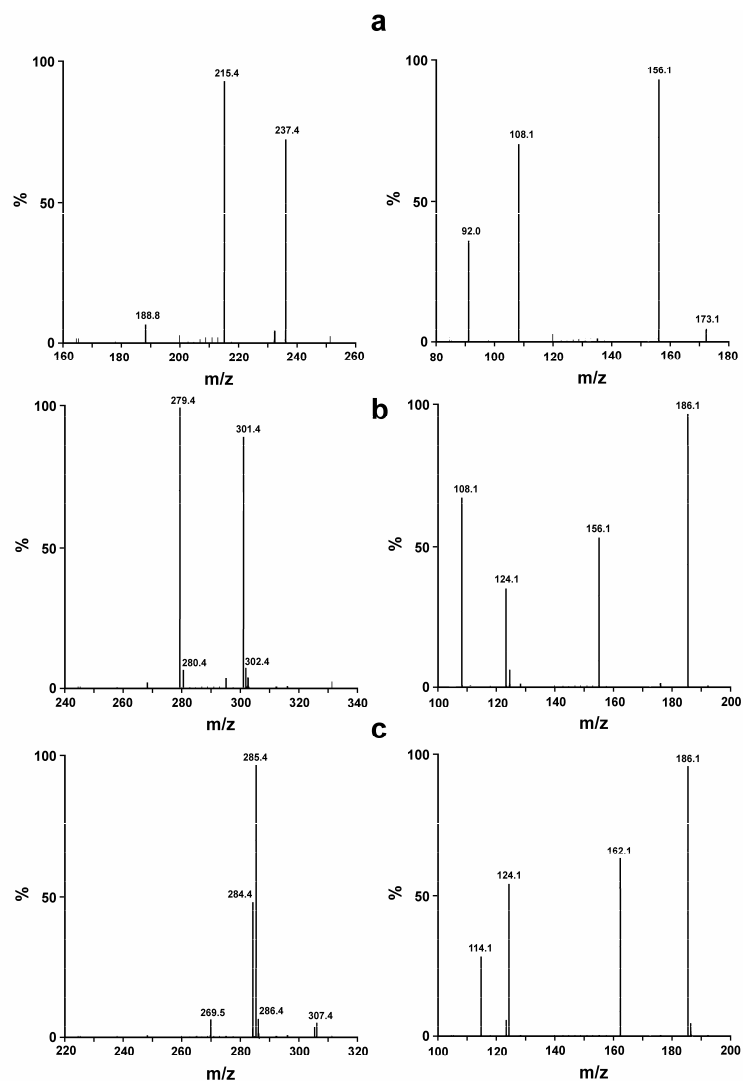
Ši disertacinio darbo dalis skirta sulfonamidų (SA) atskyrimo ir nustatymo medaus ir kiaušinių mėginiuose tyrimams. Kadangi sulfonamidai – didelė (buvo tiriama 10 analičių) panašiomis savybėmis pasižyminčių junginių grupė, jų chromatografinis atskyrimas yra pakankamai komplikotas. Todėl jų atskyrimui palyginome efektyviosios ir ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodus.

#### 3.2.1. MS/MS detektavimo sąlygų parinkimas

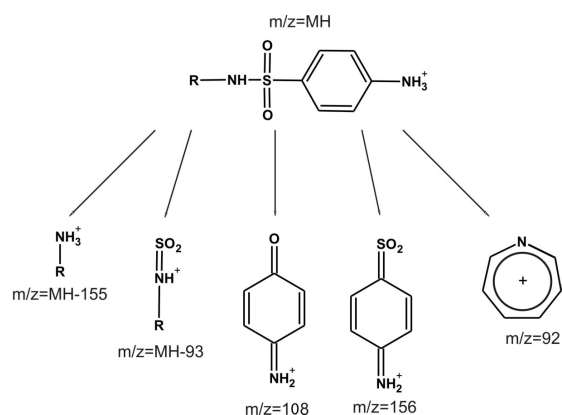
Siekiant parinkti optimalias MS/MS detektavimo sąlygas buvo išmatuoti ir palyginti visų analičių ir vidinių standartų tirpalų masių spektrai parūgštintoje terpėje esant neigiamai ir teigiamai elektrošrauto jonizacijai. Nustatyta, kad visiems junginiams intensyvesni signalai buvo registruojami esant teigiamai jonizacijai. Visų analičių spektrai panašūs ir ganėtinai nesudėtingi: vieninteliai molekuliniai jonai susidarantys rūgščioje terpėje yra protonizuotos molekulės. Iliustracijai, 3.12 pav. parodyti sulfacetamido, sulfametazino ir sulfametazino-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> masių spektrai ir intensyviausio

molekulinio jono fragmentavimo masių spektrai. Visiems SA išskyrus sulfametaziną, teigiamos jonizacijos režime didžiausiu intensyvumu pasižymi  $m/z$  156 ir 108 fragmentai. Tuo tarpu sulfametazinui intensyviausi  $m/z$  186 ir 108 fragmentai. Remiantis gautais duomenimis 3.13 pav. pavaizduota tikimiausia sulfonamidų fragmentacijos schema.

Pasirinktos MS/MS detektavimo analitėms ir vidiniams standartams sąlygos pateiktos 3.6 lentelėje.



**3.12 pav.** Sulfacetamido (a), sulfametazino (b) ir sulfametazino- $^{13}\text{C}_6$  (c) masių spektrai (kairėje) ir intensyviausio molekulinio jono fragmentavimo masių spektrai (dešinėje).



**3.13 pav.** Sulfonamidų fragmentacijos MS/MS detektoriuje schema.

**3.6 lentelė**

Optimizuoti MS/MS detektavimo parametrai sulfonamidams

Junginys (santrumpa)	Molekulinis jonas ( $m/z$ )	Skilimai ( $m/z$ )	Konusinio filtro įtampa (V)	Skaldymo energija (eV)
Sulfacetamidas (SAC)	215	215→156	17	8
		215→108		17
Sulfapiridinas (SPY)	250	250→156	26	17
		250→108		25
Sulfadiazinas (SDZ)	251	251→156	24	14
		251→108		24
Sulfatiazolas (STZ)	256	256→156	25	16
		256→108		24
Sulfamerazinas (SMR)	265	265→156	28	16
		265→108		28
Sulfametoksazolas (SMX)	254	254→156	25	16
		254→108		23
Sulfametoksazolas- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	260	260→162	25	18
Sulfametizolas (SMT)	271	271→156	20	14
		271→108		18
Sulfametazinas (SMZ)	279	279→186	31	18
		279→108		26
Sulfametazinas- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	285	285→186	27	15
Sulfabenzamidas (SBZ)	277	277→156	16	13
		277→108		22
Sulfadimetoksinas (SDM)	311	311→156	31	20
		311→108		30

### 3.2.2. Sulfonamidų atskyrimas ESCh ir UESCh metodais

Pirmiausiai buvo optimizuojamas SA atskyrimas ESCh metodu. Tradiciškai, šių junginių atskyrimas atliekamas atvirkščių fazių chromatografijos režime naudojant rūgščias judrias fazes, skatinančias analičių protonizaciją ir tokiu būdu padidinančias MS detektavimo jautrį matuojant teigiamos elektrosrauto jonizacijos sąlygose.

Optimizuojant judrios fazės sudėtį palyginome įvairias judrių fazių kompozicijas iš acetonitrilo ir/arba metanolio bei vandens su skirtingomis (0,01–0,20%) skruzdžių arba acto rūgšties koncentracijomis. Truputį geresnis MS detektavimo jautris buvo registruojamas judrioje fazėje, naudojant skruzdžių rūgštį. Tai visai logiška, kadangi stipresnė rūgštis efektyviau protonizuoja analites. Didinant skruzdžių rūgšties koncentraciją judrioje fazėje nuo 0,01 iki maždaug 0,04%, visų analičių smailių intensyvumai tolygiai didėja, o toliau rūgštinant – detektavimo jautris nebekinta. Tuo tarpu analičių atskyrimo atrankumui rūgšties koncentracijos įtaka labai nežymi. Optimali skruzdžių rūgšties koncentracija - 0,05%.

Ištyrus organinio tirpiklio (acetonitrilas ir metanolis) prigimties įtaka SA atskyrimo atrankumui ir smailių efektyvumui nustatyta, kad tirpiklio prigimties atrankumo neįtakoja. Tačiau naudojant judria faze tiek acetonitrilo, tiek ir metanolio mišinį su vandeniu daugelio analičių smailių simetriškumas nebuvo labai geras. Papildomais tyrimais nustatėme, kad smailių simetriškumas pagerėja organine faze naudojant acetonitrilą su 5-10% v/v metanolio priedu. Optimizuoti judrios fazės sudėties ir gradientinės eliucijos parametrai pateikti 3.7 lentelėje, o standartinio SA tirpalo chromatograma pavaizduota 3.14a pav. Optimizuotose sąlygose ESCh metodu SA eliuojami per 18 min, o viso atskyrimo ciklo trukmė – 25 min.

Ta pati judrios fazės sudėtis buvo išbandyta ir UESCh sąlygomis. Kadangi UESCh metode maksimalus leistinas slėgis didesnis, judrios fazės greitį padidinome iki 0,5 ml/min bei truputį pakeitėme gradientinės eliucijos parametrus (0 - 2,0 min 98%, 12,0 min 75% ir 14,0 - 16,0 min 98% 0,05% HCOOH tirpalo vandenyje). Standartinio SA tirpalo chromatograma išmatuota

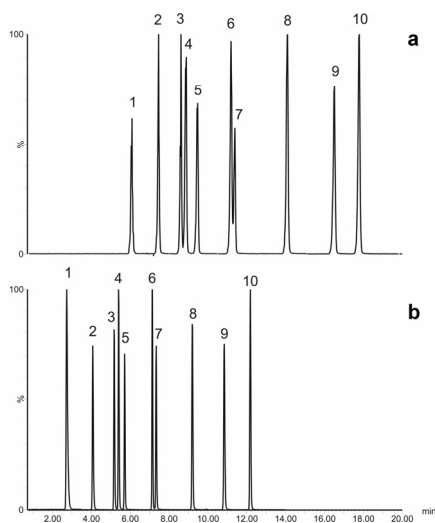


UESCh režime pavaizduota 3.14b pav. Palyginus ESCh ir UESCh metodais gautas chromatogramas akivaizdu, kad UESCh metode daugeliui sulfonamidų smailių efektyvumas dvigubai geresnis bei didesnės skiriamosios gebos. Tai leido pagreitinti SA atskyrimą nepabloginant atskyrimo atrankumo. Be to, dėka geresnio efektyvumo UESCh metodo jautris prilygsta, o kai kurioms analitėms netgi viršija ESCh metodo jautrį, nors pastarajame metode buvo įleidžiamas dvigubai didesnis mėginio tūris.

### 3.7 lentelė

Judrios fazės sudėties ir gradientinės eliucijos formavimo ESCh metode parametrai

Trukmė, min	0,05% HCOOH vandenyje, %	0,05% HCOOH ACN:MeOH (90:10 v/v) mišinyje, %	Tėkmės greitis, ml/min
0	98	2	0,4
2	98	2	0,4
18	70	30	0,4
20	70	30	0,4
21	98	2	0,4
25	98	2	0,4



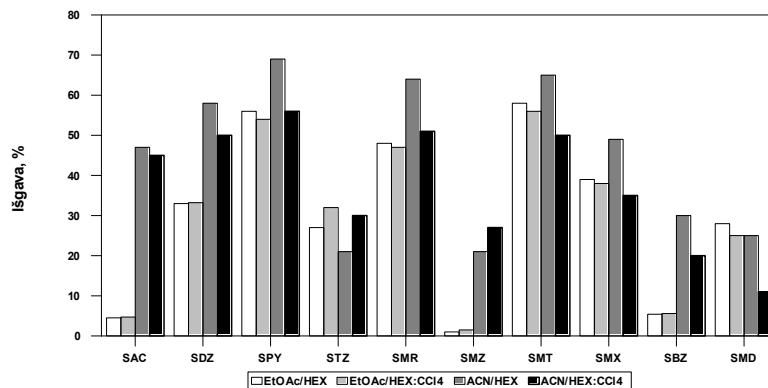
**3.14 pav.** Sulfonamidų atskyrimas ESCh (a) ir UESCh (b) metodais. Kolonėlės temperatūra 40°C. Mėginio tūris 20 µl (a) ir 10 µl (b). Smailės: 1 - sulfacetamidas; 2 - sulfadiazinas; 3 - sulfatiazolas; 4 - sulfapiridinas; 5 - sulfamerazinas; 6 - sulfametazinas; 7 - sulfametizolas; 8 - sulfametoksazolas; 9 - sulfabenzamidas; 10 - sulfadimetoksinas.

### 3.2.3. Kiaušinių ir medaus mėginių paruošimas

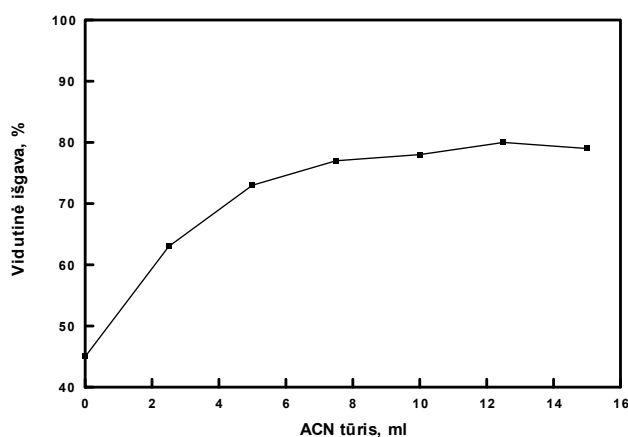
SA ekstrakcijos iš realių mėginių tyrimams buvo pasirinkti du tirpikliai – etilacetatas ir acetonitrilas. Be to, kadangi kiaušinių mėginiuose yra labai daug lipidų, ekstrakcijos procedūra buvo tiriama kompleksiskai kartu su ekstraktų nuriebalinimo procedūra. Nuriebalinimui taip pat lyginome du tirpiklius – heksaną (HEX) ir heksano/anglies tetrachlorido mišinį (1:1 v/v). Preliminariuose tyrimuose 2 g kiaušinio (medaus) mėginio buvo disperguojama 10 min su 2 ml vandens, po to įpilama 10 ml atitinkamo tirpiklio mišinio, mišinys purtomas 10 min ir centrifuguojamas. Atskirtas supernatantas išgarinamas azoto sraute 50 °C temperatūroje, likutis ištirpinamas 20 ml 0,2 mol/l amonio acetato buferio (pH 5,3) ir nuriebalinamas ekstrahuojant su 5 ml atitinkamo tirpiklio. 3.15 pav. palygintos absoliučios SA išgavos gautos ekstrahuojant/nuriebalinant kiaušinio mėginius skirtingais tirpikliais. Deja, kiaušinio mėginiai su EtOAc emulguojasi, o emulsijos susidarymas nepriklauso nuo purtymo greičio. Be to, stipresnėmis bazinėmis savybėmis pasižymintys SAC, SMZ ir SBZ greičiausiai dalinai protonizuojasi vandeninėje fazėje, todėl jų tirpumas EtOAc smarkiai sumažėja. Tuo tarpu acetonitrilas nusodina baltymus bei gerai tirpina ir protonizuotas analites. Septynioms iš dešimties analičių didžiausios absoliučios išgavos buvo gautos ekstrahuojant acetonitrilu bei nuriebalinant gautus ekstraktus heksanu, todėl šie tirpikliai ir buvo pasirinkti tolimesniems tyrimams.

Iš 3.15 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad ekstrahuojant 10 ml acetonitrilo tūriu kai kurių SA (SDZ, STZ, SMZ, SBZ ir SMD) absoliučios išgavos nesiekia net 40%. Todėl siekiant padidinti ekstrakcijos efektyvumą papildomai buvo iširta acetonitrilo tūrio įtaka SA ekstrakcijai. Nustatėme, kad padidinus ACN tūrį iki 20 ml analičių išgavos reikšmingai nepadidėja. Kitas, dažnai efektyvesnis būdas pagerinti ekstrakcijos efektyvumą – po pirmosios ekstrakcijos nupylus ekstraktą mėginio likutį pakartotinai ekstrahuoti nauja tirpiklio porcija. Tyrimo metu buvo didinamas pakartotinei ekstrakcijai imamo ACN tūris (nuo 0 iki 15 ml). 3.16 pav. pateikta ACN tūrio įtaka vidutinei absoliučiai analičių išgavai iš kiaušinio mėginio (atskirų analičių išgavos dėl

vietos stokos nepateiktos). Matome, kad papildoma ekstrakcija su 10 ml ACN padidino vidutinę SA išgavą beveik dvigubai (nuo 45 iki 78%). Šiose sąlygose visų analičių, išskyrus STZ ir SMZ, absoliučios išgavos viršijo 50%. Tuo tarpu pakartotinai ekstrahuojant STZ ir SMZ, jų absoliučios išgavos padidėjo tik nuo 20 iki maždaug 26%.



**3.15 pav.** Ekstrakcijos ir nuriebalinimo tirpiklių prigimties įtaka absoliučioms SA išgavoms iš kiaušinio mėginio. Analčių koncentracija mėginyje – 100 µg/kg.

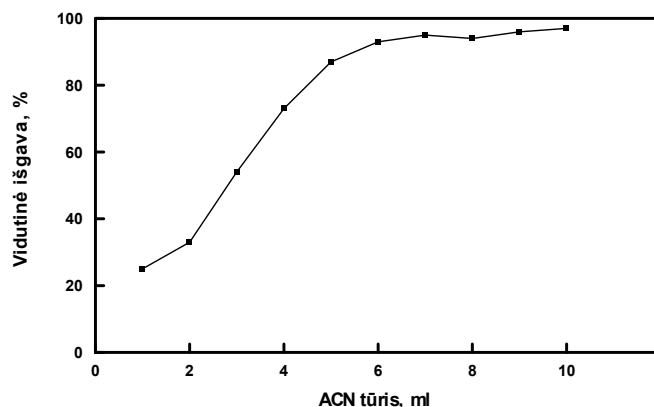


**3.16 pav.** Pakartotinei ekstrakcijai naudojamo acetonitrilo tūrio įtaka vidutinei absoliučiai SA išgavai iš kiaušinio mėginio. Analčių koncentracija mėginiuose – 100 µg/kg.

SA ekstraktų iš biologinių mėginių valymui dažniausiai naudojama kietafazė ekstrakcija nepoliniais [109], poliniais [124] arba katijonitinais sorbentais [126]. Šiame darbe valymui pasirinkome neseniai pasirodžiusi

rinkoje Strata-X sorbentą - stireno-divinilbenzeno kopolimerą su paviršiuje chemiškai prijungtomis specifinėmis (patentuota) funkcinėmis grupėmis. Priklausomai nuo analičių prigimties, šis sorbentas gali sąveikauti su jomis hidrofobine sąveika,  $\pi$ - $\pi$  sąveika ir/arba sudarydamas su analitėmis vandenilinę ryšį. Todėl manipuluojant mėginio pH, desorbcijos tirpiklio prigimtimi ir kt., galima labai efektyviai išvalyti ekstraktus nuo priemaišų.

Mėginio valymo efektyvumo tyrimui į vandeninį kiaušinio (medaus) mėginio (be analitės) ekstrakto tirpalą (20 ml) buvo pridedamas žinomas SA kiekis, mėginys buvo leidžiamas per patroną su aktyvuotu Strata-X sorbentu (200 mg/6 ml), patronas praplaunamas, analitės desorbuojamos, ekstraktas išgarinamas, o likutis tirpinamas 200  $\mu$ l 0.05% vandeninio skruzdžių rūgšties tirpalo ir analizuojamas. Buvo optimizuojamos mėginio pH ir sulfonamidų desorbcijos sąlygos. Nustatėme, kad atrankiausiai (lieka mažiausiai priemaišų) SA adsorbuojami iš truputį parūgštintų (pH<6) tirpalų. SA desorbcijai palyginome metanolį ir acetonitrilą. Efektyviau, t.y. mažesniu tirpiklio tūriu ir atrankiau (mažiau priemaišų) analites desorbuoja acetonitrilas. Galiausiai ištyrėme acetonitrilo tūrio įtaką SA desorbcijai. Iš 3.17 pav. pateiktų matyti, kad kai acetonitrilo tūris viršija 6 ml, vidutinė absoliuti SA išgava siekia 95%. Be to, šiomis sąlygomis visų analičių individualios išgavos didesnės už 80%. Labai panašūs rezultatai buvo gauti ir medaus matriciai.



**3.17 pav.** SA desorbcijai iš patrono su Strata-X sorbentu naudoto acetonitrilo tūrio įtaka vidutinei absoliučiai SA išgavai iš kiaušinio mėginio ekstrakto. Analčių koncentracija ekstrakto – 100  $\mu$ g/l.

Optimizuota SA ekstraktų valymo kietafazės ekstrakcijos metodu procedūra:

1. Patronas su sorbentu plaunamas 5 ml metanolio ir po to 5 ml 0,2 mol/l amonio acetatinio buferio (pH 5,3);
2. Per patroną leidžiame 20 ml ekstrakto ištirpinto 0,2 mol/l amonio acetatiniame buferyje (pH 5,3);
3. Patronas plaunamas 5 ml vandens;
4. Analitės desorbuojamos 7 ml ACN.

Išsami kiaušinių ir medaus mėginių paruošimo SA analizei procedūra pateikta skyrelyje „Eksperimento metodika“.

### 3.2.4. ESCh ir UESCh metodų analizinių charakteristikų palyginimas

Metodo atrankumas kitiems veterinariniams vaistams buvo įvertintas tokiu pat būdu, kaip tai buvo atliekama chloramfenikoliui (žiūr. 3.3 lentelę) ir nustatyta, kad kitų klasių vaistai (CAP, benzimidazolai, florokvinolonai, penicilinai, tetraciklinai, nitroimidazolai) visiškai netrukdo SA nustatymui.

Kitos metodo analizinės charakteristikos bei metodo atsparumas įvairiems faktoriams buvo įvertinti alternatyviu būdu panaudojus specialią kompiuterinę programą InterVal™. Tyrimui pasirinkome penkis faktorius galinčius įtakoti analizės rezultatus, o pagrindiniu faktoriumi – mėginio matricą (3.8 lentelė).

**3.8 lentelė**

Faktoriai ir jų lygmenys vertinti įteisinant metodą

<b>Faktorius</b>	<b>Faktoriaus lygmenys</b>	
Mėginio matrica (pagrindinis)	Medus	Kiaušiniai
Operatorius	A	B
Ekstraktų išgarinimo temperatūra	40 °C	50 °C
Ekstraktų laikymas	0 dienų	1 diena
Analizės metodas	UESCh-MS/MS	ESCh-MS/MS

Pagrindinės analizinės charakteristikos išmatuotos 10 µg/kg SA koncentracijai įvertinus visus faktorius, visus faktorius išskyrus ESCh metodą ir visus faktorius išskyrus UESCh metodą yra palygintos 3.9 lentelėje. Visoms

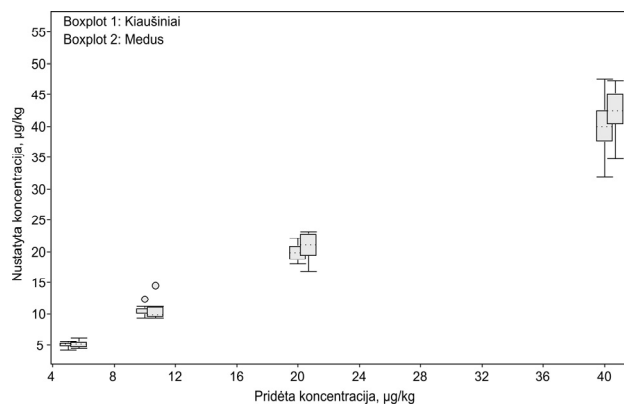
analitėms, išskyrus sulfacetamido nustatymą ESCh metodu ir sulfabenzamido nustatymą abiem metodais, gaunamos ES reikalavimus tenkinančios išgavos (80–110%). Labai panašios išgavos buvo gautos ir kitoms SA koncentracijoms. Nustatymo jautris ( $CC_a$ ) taip pat panašus abiem metodams, nors UESCh metode analizuojami dvigubai mažesni mėginio tūriai. Ryškiausiai UESCh metodo pranašumas pasireiškia analizės rezultatų glaudume. Beveik visoms analitėms UESCh rezultatų santykiniai standartiniai nuokrypiai buvo žymiai mažesni. Geresnį UESCh metodo glaudumą sąlygoja geresnė smailių forma bei greitesnis atskyrimas. Dėl mums nežinomų priežasčių tirtame koncentracijų intervale sulfabenzamidui abiem metodais buvo gautos labai didelės SSN vertės (30-70%), todėl šio junginio kiekybinis nustatymas duotose sąlygose neįmanomas.

Atskirų faktorių lygmenų įtaką SA nustatymo rezultatų sklaidai visame jų koncentracijų intervale iliustruoja 3.18-3.22 pav. pavaizduotos stačiakampės diagramos sulfacetamidui. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad skirtingų mėginio matavimų (3.18 pav.), skirtingų operatorių (3.19 pav.), skirtingų ekstraktų garinimo temperatūrų (3.20 pav.) bei skirtingų ekstraktų laikymo trukmių (3.21 pav.) matavimų rezultatų sklaida yra labai panaši, t.y. šių faktorių kaitaliojimas analizės rezultatų sklaidos reikšmingai neįtakoja. Tik didžiausiai sulfacetamido koncentracijai garinant ekstraktus 40°C temperatūroje rezultatų sklaida yra maždaug 2,5 karto didesnė nei garinant 50°C temperatūroje. Kadangi kitoms analitėms tokia tendencija nebuvo nustatyta, galima teigti jog tai atsitiktinis nukrypimas. Tuo tarpu skirtingais analizės metodais gautų rezultatų sklaidos skirtumai (3.22 pav.) yra gana reikšmingi. Trims iš keturių sulfacetamido koncentracijų UESCh metodas duoda 2-2,5 karto glaudesnius rezultatus nei ESCh metodas. Panašūs rezultatai buvo gauti ir kitiems sulfonamidams.

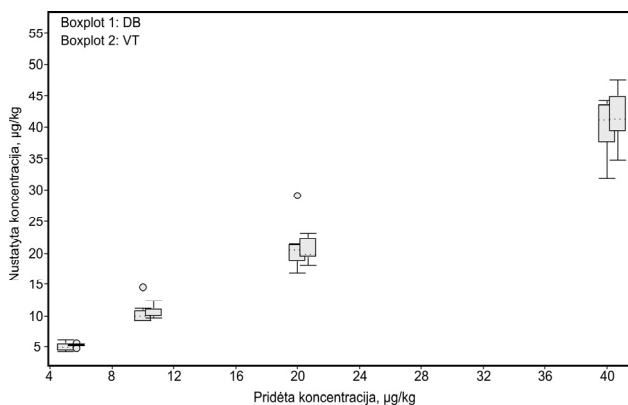
**3.9 lentelė**

Pagrindinės analizinės charakteristikos išmatuotos 10 µg/kg SA koncentracijai įvertinus visus faktorius, visus faktorius išskyrus ESCh metoda ir visus faktorius išskyrus UESCh metoda

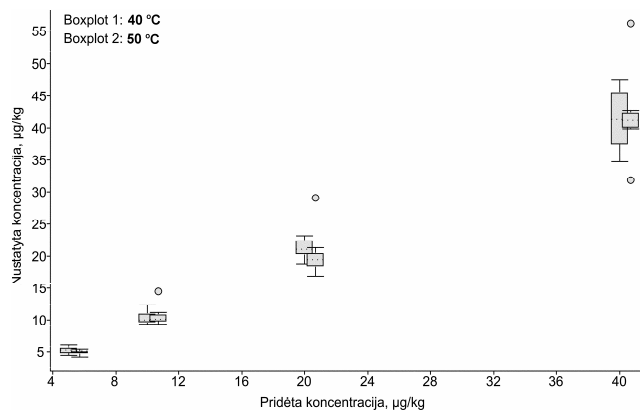
Analitė	CC <sub>α</sub> , µg/kg			Išgava, %			SSN, %		
	Visi faktoriai	UESCh	ESCh	Visi faktoriai	UESCh	ESCh	Visi faktoriai	UESCh	ESCh
SAC	8,96	7,10	10,9	118,2	110,0	125,9	23,2	8,5	29,5
SDZ	9,07	9,43	9,90	104,2	106,6	101,7	14,2	12,1	16,3
STZ	7,75	7,61	8,91	104,5	103,1	105,9	13,4	9,8	16,2
SPY	7,55	7,40	8,36	106,5	103,8	109,1	12,1	8,8	14,4
SMR	7,41	7,25	8,54	100,4	103,2	97,8	11,7	9,3	13,7
SMZ	7,28	7,40	7,89	103,7	104,2	103,2	9,5	8,5	10,6
SMT	9,07	7,87	11,4	100,9	101,3	100,8	14,0	9,1	17,9
SMX	6,66	6,61	7,25	99,6	99,8	99,4	6,0	5,5	6,1
SBZ	19,5	25,5	18,8	97,6	79,7	116,4	52,7	66,9	41,3
SMD	9,78	9,23	11,9	104,8	106,4	103,9	18,5	15,6	21,2



3.18 pav. Mėginio matricos įtaką sulfacetamido nustatymui.

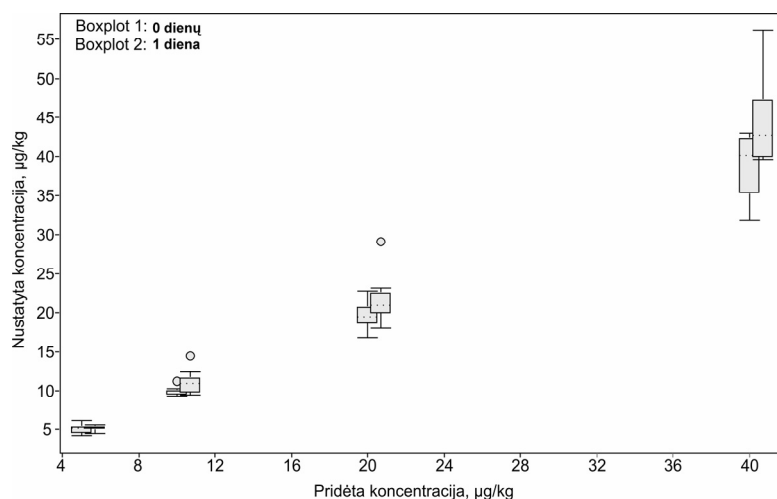


3.19 pav. Operatoriaus įtaką sulfacetamido nustatymui. DB – Daiva Babičienė; VT – Vytautas Tamošiūnas.

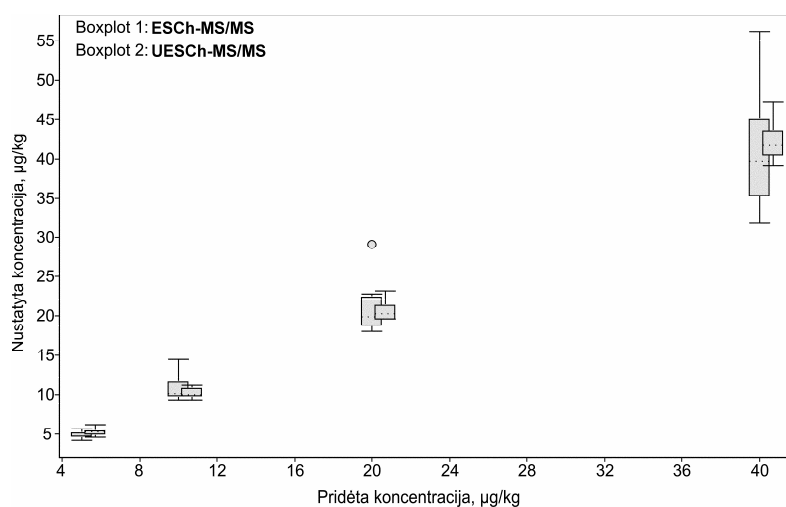


3.20 pav. Ekstrakto išgarinimo temperatūros įtaką sulfacetamido nustatymui.



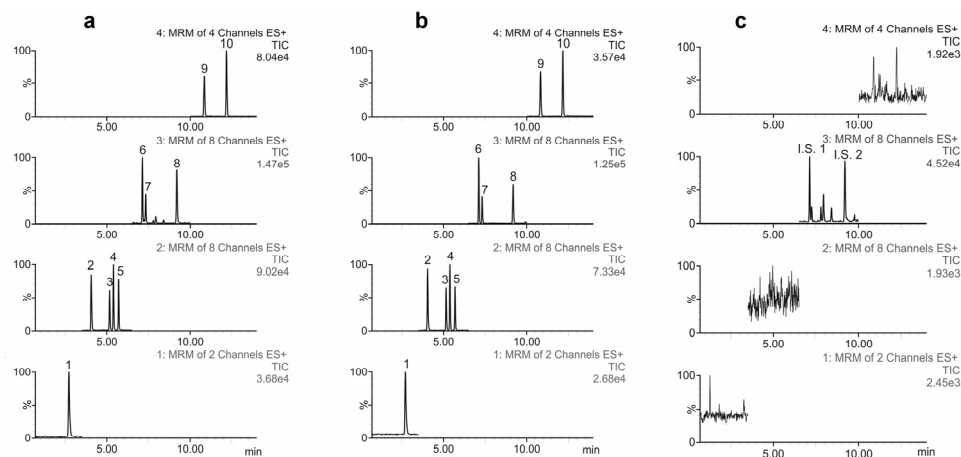


**3.21 pav.** Ekstraktų laikymo įtaką sulfacetamido nustatymui.



**3.22 pav.** Analizės metodo įtaką sulfacetamido nustatymui.

3.23 pav. pateiktos kiaušinio (a) ir medaus (b) mėginių su 5 µg/kg SA priedu bei medaus (c) mėginio su 5 µg/kg vidinių standartų priedu chromatogramos išmatuotos UESCh-MS/MS metodu. Remiantis atliktų tyrimų rezultatais galima konstatuoti, kad tiek ESCh, tiek ir UESCh metodai tenkina minimaliuosius reikalavimus SA nustatymui, tačiau UESCh yra greitesnis, efektyvesnis ir duoda žymiai glaudesnius rezultatus.



**3.23 pav.** Kiaušinio (a) ir medaus (b) mėginių su 5 µg/kg SA priedu bei medaus (c) mėginio su 5 µg/kg vidinių standartų priedu chromatogramos išmatuotos UESCh-MS/MS metodu. 1 - sulfacetamidas; 2 - sulfadiazinas; 3 - sulfatiazolas; 4 - sulfapiridinas; 5 - sulfamerazinas; 6 - sulfametazinas; 7 - sulfametizolas; 8 - sulfametoksazolas; 9 - sulfabenzamidas; 10 – sulfadimetoksinas; I.S.1 - sulfametoksazolas-6C13; I.S.2 = sulfametazinas-6C13.

### 3.3. Nitroimidazolų nustatymas kiaušiniuose UESCh-MS/MS metodu

Dimetridazolas (DMZ, 1,2-dimetil-5-nitroimidazolas), ipronidazolas (IPZ, 1-metil-2-izopropil-5-nitroimidazolas), metronidazolas (MNZ, 1-(2-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazolas), ronidazolas (RNZ, 1-metil-2-(karbamoiloksimetil)-5-nitroimidazolas) ir ternidazolas (TNZ, 1-(3-hidroksiizopropil)-2-metil-5-nitroimidazolas) yra pagrindiniai 5-nitroimidazolų klasės veterinariniai antibiotikai. Kadangi nitroimidazolai biologinėse matricose greitai metabolizuojasi sudarydami hidroksilintus junginius, labai svarbu nustatyti ne tik pirminius junginius, bet ir tris pagrindinius jų metabolitus - 1-metil-2-hidroksimetil-5-nitroimidazolą (MHMNI), 1-(2-hidroksietil)-2-hidroksimetil-5-nitroimidazolą (MNZOH) ir 1-metil-2-(2'-hidroksiizopropil)-5-nitroimidazolą (IPZOH). Remdamiesi aukščiau pateiktais tyrimais nitroimidazolų nustatymui pasirinkome greitesnį ir efektyvesnį UESCh-MS/MS metodą.

### 3.3.1. UESCh atskyrimo ir MS/MS detektavimo sąlygų parinkimas

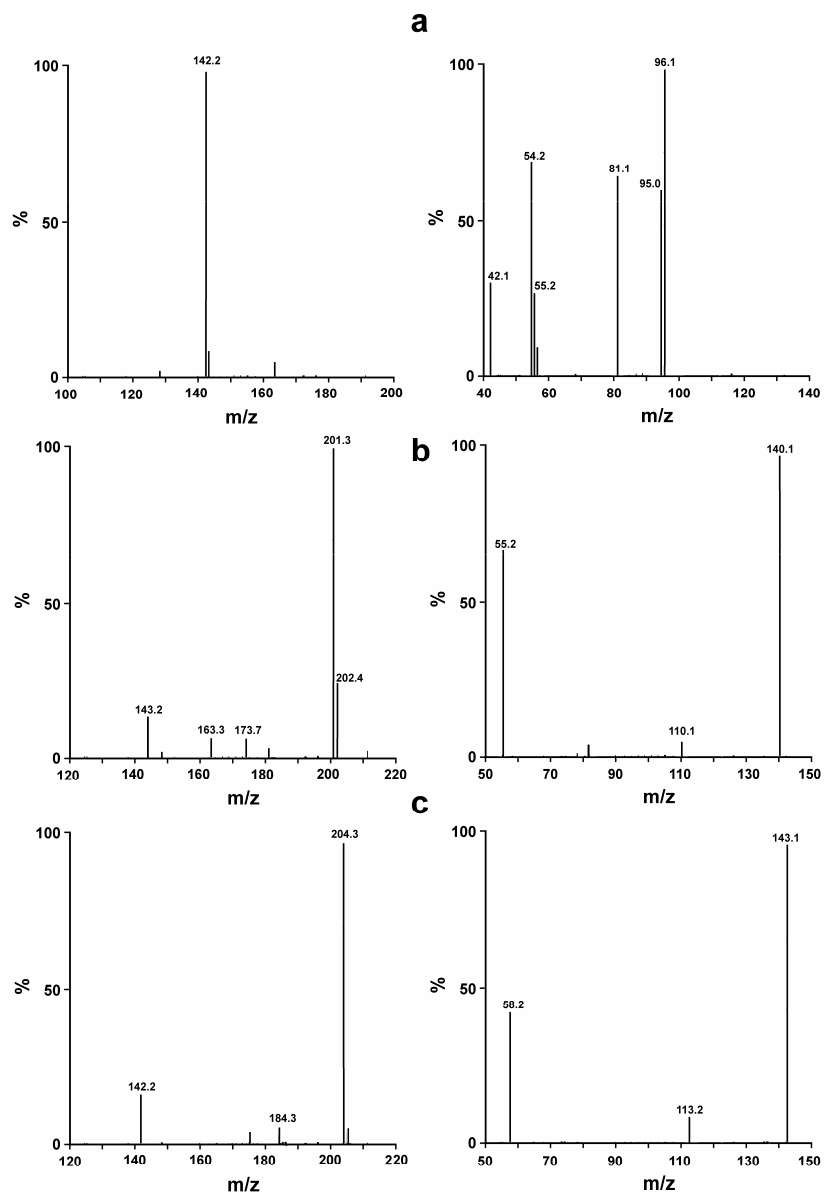
Siekiant parinkti optimalias MS/MS detektavimo sąlygas buvo išmatuoti ir palyginti visų analičių ir deuteruotų vidinių standartų masių spektrai parūgštintoje terpėje naudojant neigiamą ir teigiamą elektrosrauto jonizaciją. Nustatyta, kad visiems junginiams intensyvesni signalai buvo registruojami esant teigiamai jonizacijai susidarant molekuliniais  $(M + H)^+$  jonams. Iliustracijai, 3.24 pav. parodyti DMZ, RNZ ir RNZ-d3 (vidinis standartas) masių spektrai ir intensyviausio molekulinio jono fragmentavimo masių spektrai. Dėl palyginti nedidelės NIZ molekulinės masės nėra bendros fragmentavimo schemas visai analičių grupei. O atskirų analičių fragmentavimo schemas galima rasti Mottier ir bendraautorių darbe [135]. Kiekvienam jungiui buvo parinktos optimaliausios konusinio filtro įtampos ir skaldymo energijos vertės. Pasirinktos MS/MS detektavimo nitroimidazolams, jų metabolitams ir vidiniams standartams sąlygos surašytos 3.10 lentelėje.

Trys MS/MS duomenų kaupimo periodai buvo pasirinkti skirtingoms analitėms: MNZOH - 1,2–2,9 min sulaikymo trukmių intervalas, DMZ, MHMNI, MNZ, TNZ ir RNZ - 2,9–4,6 min sulaikymo trukmių intervalas, IPZ ir IPZOH - 4,6–7,0 min sulaikymo trukmių intervalas.

Nitroimidazolai ir jų metabolitai ESCh metodu įprastai yra atskiriami ant nepolinių sorbentų eliuuojant polinėmis judriomis fazėmis [135-138]. Deja, dėl nemažo analičių poliškumų skirtumo net ir naudojant judrios fazės gradientą jų atskyrimas ESCh metodu yra komplikuoatas. Todėl iki šiol vis dar nėra darbų, skirtų visų penkių nitroimidazolų ir trijų jų metabolitų atskyrimui ir jų nustatymui.

Optimizuojant judrios fazės sudėtį palyginome įvairias judrių fazių kompozicijas iš acetonitrilo ir vandens su skirtingomis (0,01–0,50%) skruzdžių rūgšties koncentracijomis. Deja, izokratinės eliucijos režime gero ir greito atskyrimo nepavyko pasiekti, todėl galiausiai buvo pasirinktas gradientinės eliucijos variantas. Optimizuoti judrios fazės gradiento parametrai pateikti 3.11 lentelėje, o standartinio nitroimidazolų ir jų metabolitų tirpalo chromatograma pavaizduota 3.25 pav. Optimizuotose sąlygose visos analitės eliuojamas per

6,5 min, o viso atskyrimo ciklo trukmė – 12 min. Lyginant su kitomis analitėmis, MNZOH smailė yra ganėtinai išplitusi (priežastis neaiški), tačiau jo nustatymui tai neturi įtakos. Nors DMZ ir RNZ yra neatskiriami, jų molekulinę jonų  $m/z$  vertės skiriasi pakankamai visiškam jų atskyrimui MS/MS detektoriuje.



**3.24 pav.** DMZ (a), RNZ (b) ir RNZ-d3 (c) masių spektrai (kairėje) ir intensyviausio molekulinio jono fragmentavimo masių spektrai (dešinėje).

**3.10 lentelė**

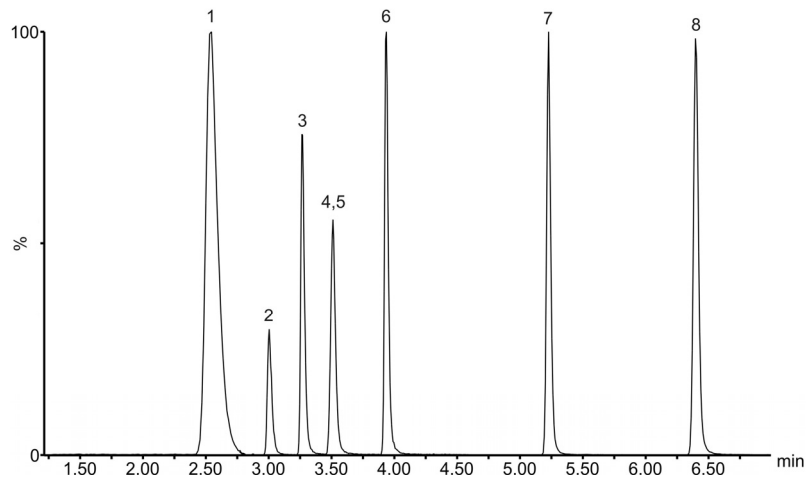
Optimizuoti MS/MS detektavimo parametrai nitroimidazolams, jų metabolitams ir deuteruotiems vidiniams standartams

Junginys	Molekulinis jonas ( $m/z$ )	Skilimai ( $m/z$ )	Konusinio filtro įtampa (V)	Skaldymo energija (eV)
MNZOH	188	188→68 188→144	22	21 13
MHMNI	158	158→55 158→140	23	17 12
TNZ	186	186→82 186→128	26	26 15
MNZ	172	172→82 172→128	24	24 14
DMZ	142	142→54 142→96	28	26 15
RNZ	201	201→55 201→140	16	21 12
IPZOH	186	186→122 186→168	24	25 14
IPZ	170	170→109 170→124	31	24 17
MHMNI-d3	161	161→143	23	13
MNZ-d3	175	175→131	24	14
DMZ-d3	145	145→99	28	16
RNZ-d3	204	204→143	18	12
IPZOH-d3	189	189→171	22	13
IPZ-d3	173	173→112	32	25

**3.11 lentelė**

Judrios fazės gradiento formavimo parametrai

Trukmė, min	0,05% skruzdžių rūgštis vandenyje, %	0,05% skruzdžių rūgštis acetonitrile, %	Tėkmės greitis, ml/min
0	100	0	0,6
1	100	0	0,6
7	75	25	0,6
8	100	0	0,6
12	100	0	0,6



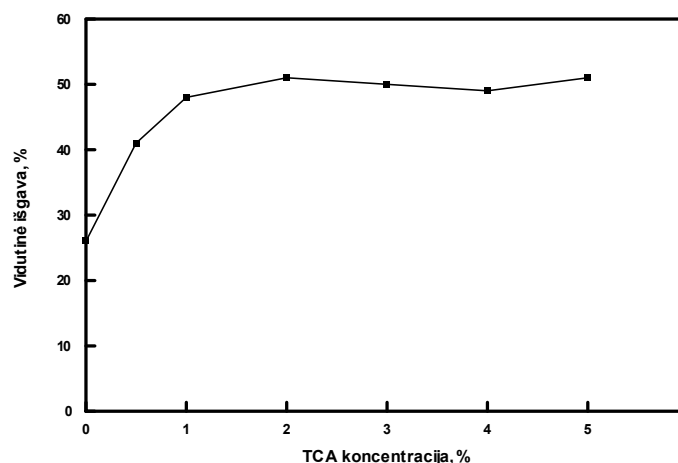
**3.25 pav.** Nitroimidazolų atskyrimas UESCh metodu. Judrios fazės greitis – 0,6 ml/min. Mėginio tūris – 20  $\mu$ l. Smailės: 1 - MNZOH; 2 - HMMNI; 3 - MNZ; 4 - DMZ; 5 - RNZ; 6 - TNZ; 7 - IPZOH; 8 - IPZ.

### 3.3.2. Ekstrakcija ir mėginių valymas

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, nitroimidazolai iš biologinių mėginių ekstrahuojami organiniais tirpikliais (acetonitrilu, EtOAc, toluenu), ekstraktai išgarinami, tirpinami vandenyje ir nuriebalinami heksanu. Tačiau neseniai publikuotame [139] darbe buvo nustatyta, kad nuriebalinant ekstraktus heksanu mažiau poliniai IPZ ir IPZOH taip pat dalinai pereina į organinę fazę, todėl jų nustatymas naudojant minėtą mėginio paruošimo procedūrą yra negalimas.

Šiame darbe ištyrėme nitroimidazolų ekstrakcijos iš kiaušinių mėginių vandeniu galimybes. Rūgščioje terpėje nitroimidazolai protonizuojasi, todėl jų tirpumas parūgštintame vandenyje turėtų labai pagerėti. Pirminiai tyrimai buvo atliekami 5 g homogenizuoto kiaušinio mėginio su analičių standarto priedu ekstrahuojant 10 min su 20 ml vandeninio trichloracto rūgšties (TCA) tirpalo. Pirmiausiai ištyrėme TCA koncentracijos įtaką (3.26 pav.). TCA koncentracijos padidinimas iki 1% padidina vidutinę analičių išgavą beveik dvigubai (nuo 26 iki 48%). Toliau didinant TCA koncentraciją analičių išgavos beveik nebekinta. Ekstrahento tūrio (iki 40 ml) ir ekstrakcijos trukmės (iki 30 min) didinimas ekstrakcijos efektyvumo nepagerino. Papildoma ekstrakcija su

5 ml to paties ekstrahento padidino vidutinę analičių išgavą išgavą iki 68%. Šiose sąlygose visoms analitėms jų absoliučios išgavos viršijo 50%.

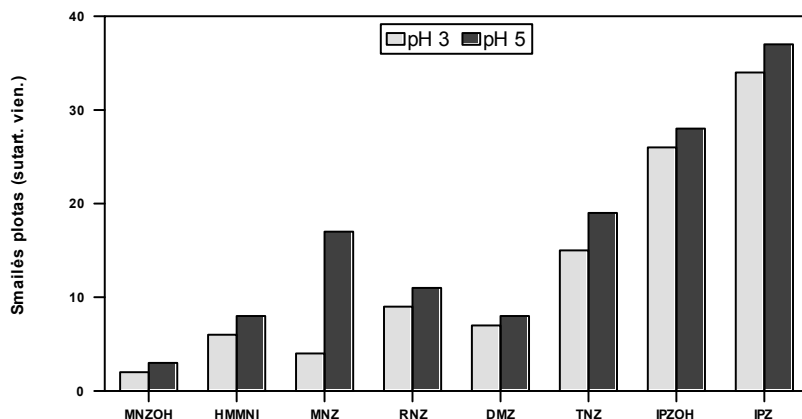


**3.26 pav.** TCA koncentracijos įtaka vidutinei absoliučiai nitroimidazolų ir jų metabolitų išgavai.

Būtina pažymėti, kad ekstrahuojant vandeniniu tirpalu visiškai nereikalingas papildomas ekstraktų nuriebalinimas (lipidai netirpsta vandenyje) bei ekstraktų nugarinimas ir pertirpinimas vandeninėje judrioje fazėje. Tai ženkliai pagreitina ir supaprastina mėginio paruošimo analizei procedūrą.

Vandeninių ekstraktų valymui kietafazės ekstrakcijos būdu išbandėme mišrų polimerinį sorbentą Strata-X-C, pasižymintį ir atvirkščių fazių adsorbcinėmis ir katijonų mainų savybėmis. Buvo optimizuojamos ekstraktų pH ir nitroimidazolų desorbcijos sąlygos. Pagrindiniai optimizavimo kriterijai – maksimalios analičių išgavos ir maksimalus ekstraktų grynumas po valymo. 3.27 pav. palyginti analičių signalų intensyvumai išmatuoti identiškose sąlygose išvalytuose skirtingo rūgštingumo (pH 3 ir 5) kiaušinio ekstraktuose. Truputį didesni nitroimidazolų ir jų metabolitų kiekiai nustatyti mažiau parūgštintuose (pH 5) ekstraktuose. Toliau mažinant (iki pH 1) ekstraktų pH, analičių kiekiai išvalytuose ekstraktuose dar labiau sumažėja. Be to, mažiau parūgštintų ekstraktų tirpalai po valymo buvo gerokai grynnesni (chromatogramose registruojama mažiau pašalinių junginių). Greičiausiai vandeniniuose kiaušinių ekstraktuose yra gerai vandenyje tirpių polinių

(rūgštinių ir/ar baziųjų) pašalinių junginių. Pvz., rūgštinės prigimties junginiai neutralioje ir šarminėje terpėje dominuoja anijoninėje formoje ir nesulaikomi ant KFE sorbento. Parūgštintuose mėginiuose rūgštinės analitės protonizuojasi, todėl yra sorbuojamos/desorbuojamos kartu su nitroimidazolais taip užteršdamos išvalytą mėginį.



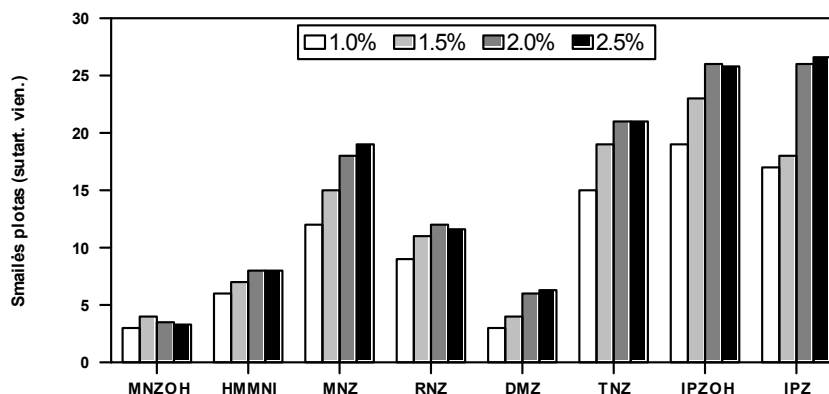
**3.27 pav.** Kiaušinio ekstrakto pH įtaka analičių signalų intensyvumui KFE būdu išvalytuose mėginiuose.

Baziųjų junginių desorbcija tiek iš katijonitinių, tiek iš atvirkščių fazių sorbentų dažniausiai atliekama pašarmintais tirpalais siekiant pilnai deprotonizuoti analites ir taip susilpninti jų sąveiką tiek su katijonitinėmis funkcinėmis grupėmis, tiek ir su likutinėmis silanolinėmis grupėmis. Nitroimidazolų desorbcijai palyginome du mišinius: trietilaminas/vanduo/acetanitrilas ir trietilaminas/vanduo/etilacetatas (2,0:3,0:95, v/v). Nustatėme, kad trietilamino/vandens/etilacetato mišiniu analitės desorbuojamos efektyviau: identiškose sąlygose tuo pačiu tirpiklio tūriu (5 ml) išplaunami didesni analičių kiekiai. Toliau buvo optimizuojama trietilamino koncentracija desorbcijos tirpale. Tyrimas buvo atliekamas desorbuojant analites tirpalais su pastovia (95%,v/v) etilacetato koncentracija keičiant vandens/trietilamino santykį jame. Iš 3.28 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad kai trietilamino koncentracija desorbuojančiame tirpiklyje yra  $\geq 2\%$ , desorbuotų analičių kiekiai reikšmingai nebedidėja. Galutinė



desorbuojančio tirpiklio sudėtis - trietilaminas/vanduo/etilacetatas (2,5:2,5:95, v/v).

Galiausiai ištyrėme desorbcijos tirpiklio tūrio įtaką nitroimidazolų desorbcijai ir nustatėme, kad kai desorbuojančio tirpiklio tūris viršija 6 ml, absoliučios analičių išgavos nebedidėja. Optimizuotose kietafazės ekstrakcijos sąlygose sąlygose visų analičių absoliučios išgavos buvo didesnės už 80%.



**3.28 pav.** Trietilamino kiekio (% v/v) įtaka nitroimidazolų ir jų metabolitų desorbcijai.

### 3.3.3. UESCh-MS/MS metodo įteisinimas

Metodo atrankumas kitiems veterinariniams vaistams buvo įvertintas tokiu pat būdu, kaip tai buvo atliekama chloramfenikoliui (žiūr. 3.3 lentelę) ir nustatyta, kad kitų klasių vaistai (CAP, benzimidazolai, florokvinolonai, penicilinai, tetraciklinai, sulfonamidai) visiškai netrukdo nitroimidazolų ir jų metabolitų nustatymui.

Kitų metodo analizinių charakteristikų bei metodo atsparumo įvairiems faktoriams įvertinimui pasirinkome penkis faktorius galinčius įtakoti analizės rezultatus, o pagrindiniu faktoriumi – mėginio matricą (3.12 lentelė). Ekstraktų valymui kietafazės ekstrakcijos būdu palyginome kitos firmos panašios prigimties KFE sorbentą Oasis MCX (Waters).

Visi tyrimai buvo atliekami su realiais mėginiais (be analitės), pridodant į juos keturių skirtingų koncentracijų (pridedamos koncentracijos atskiroms

analitėms surašytos 3.13 lentelėje) analičių standarto ir fiksuotą deuteruotų vidinių standartų (MHMNI-d3, MNZ-d3 ir RNZ-d3) koncentraciją.

Pagrindinės analizinės charakteristikos įvertinus visus faktorius yra palygintos 3.14 lentelėje. Visoms analitėms gaunami ES reikalavimus tenkinantys išgavų (80–110%), pakartojamumo ir atkuriamumo rezultatai. Panašūs rezultatai buvo gauti ir kitoms analičių koncentracijoms. Toliau buvo įvertinta atskirų faktorių įtaka ir nustatyta, kad nei vienas iš tyrimų metu vertintų faktorių analizės rezultatų reikšmingai neįtakoja.

**3.12 lentelė**

Faktoriai ir jų lygmenys vertinti įteisinant metoda

<b>Faktorius</b>	<b>Faktoriaus lygmuo</b>		
Mėginio matrica (pagrindinis)	Balti kiaušiniai	Rudi kiaušiniai	Kiaušinių milteliai
Operatorius	A		B
Ekstraktų laikymas	0 dienu		1 diena +4°C
KFE sorbentas	Strata-X-C		Oasis MCX
Ekstraktų išgarinimo temperatūra	35 °C		45 °C

**3.13 lentelė**

Standartinių priedų koncentracijos atskiroms analitėms naudotos įteisinant UESCh-MS/MS metoda

<b>Analitė</b>	<b>Koncentracija, µg/kg</b>			
MNZOH	1,0	5,0	10	20
MHMNI	0,5	2,5	5,0	10
TNZ	0,1	0,5	1,0	2,0
MNZ	0,1	0,5	1,0	2,0
DMZ	1,0	5,0	10	20
RNZ	0,5	2,5	5,0	10
IPZOH	0,1	0,5	1,0	2,0
IPZ	0,1	0,5	1,0	2,0

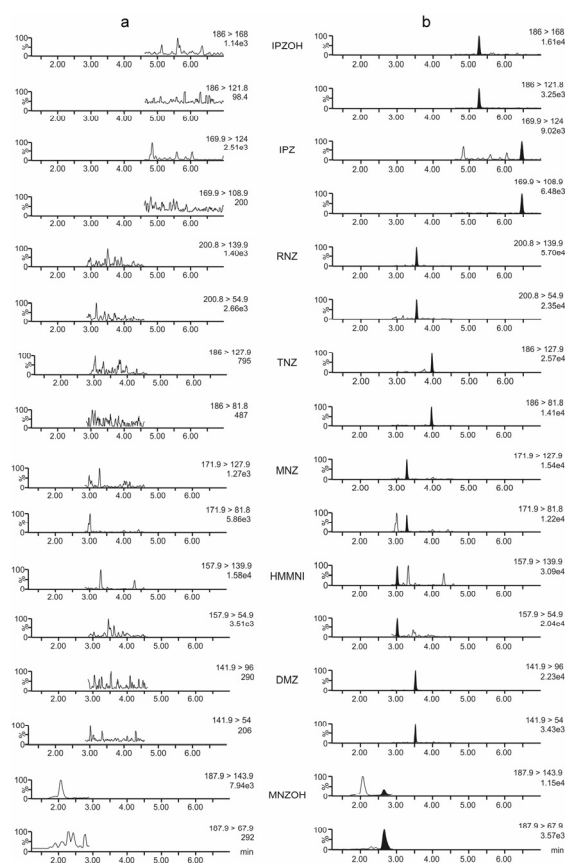
3.29 pav. pavaizduotos kiaušinio mėginio (a) ir kiaušinio mėginio su analičiu priedu (b) chromatogramos išmatuotos UESCh-MS/MS metodu optimizuotose sąlygose. Pagrindinis metodo privalumas lyginant su iki šiol publikuotais metodais – žymiai mažesnė (2-3 kartus) analizės trukmė ir paprastesnis mėginio paruošimas bei galimybė nustatyti visas 8 analites.

### 3.14 lentelė

Sprendimo ribos ( $CC_{\alpha}$ ), aptikimo gebos ( $CC_{\beta}$ ), pakartojamumo ( $SSN_r$ , %), atkuriamumo ( $SSN_{wR}$ , %) ir teisingumo (išgavos) įvertinimo rezultatai nitroimidazolams ir jų metabolitams

Analitė	$CC_{\alpha}$ , $\mu\text{g/kg}$	$CC_{\beta}$ , $\mu\text{g/kg}$	$SSN_r$ , % <sup>a</sup>	$SSN_{wR}$ , % <sup>a</sup>	Išgava, % <sup>a</sup>
MNZOH	2,62	4,29	15,3	20,9	100,6
MHMNI	1,25	1,77	11,5	11,8	95,2
TNZ	0,22	0,32	11,6	13,2	94,6
MNZ	0,30	0,44	16,3	17,3	98,7
DMZ	2,37	3,39	11,8	11,9	100,6
RNZ	1,03	1,42	9,1	11,2	96,9
IPZOH	0,21	0,30	10,3	11,1	93,0
IPZ	0,19	0,26	8,4	9,0	96,2

<sup>a</sup> Išmatuota antrajai standartinio priedo koncentracijai (žiūr. 3.13 lentelę)



**3.29 pav.** Kiaušinio mėginio (a) ir kiaušinio mėginio su analičiu priedu (b) chromatogramos išmatuotos UESCh-MS/MS metodu. Priedų koncentracijos: IPZ, IPZOH, MNZ ir TNZ - 0,22  $\mu\text{g/kg}$ ; RNZ ir MHMNI – 1,1  $\mu\text{g/kg}$ ; DMZ ir MNZOH – 2,2  $\mu\text{g/kg}$ .

### 3.4. Palyginamieji tyrimai ir Lietuviškos maisto produkcijos stebėseną

ESCh/UESCh-MS/MS metodų efektyvumas buvo papildomai įvertintas dalyvaujant palyginamuosiuose tarplaboratoriniuose tyrimuose - analizuojant paliudytasias pamatines medžiagas su tiksliai žinomomis analičių koncentracijomis. CAP nustatymo palyginamieji tyrimai (organizatorius AFSSA-Fougeres) buvo atlikti pieno matricai, kai kurių SA (organizatorius AFSSA-Fougeres) ir NIZ (organizatorius BVL-Berlin) – kiaušinių matricai. Metodo tinkamumo kriterijus - z-vertė, kuri apskaičiuojama:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

$x$  – nustatytoji vertė;  $\mu$  – priskirtoji vertė;  $\sigma$  – priskirtajai vertei apskaičiuotas rezultatų standartinis nuokrypis. Priklausomai nuo gautam rezultatui apskaičiuotos z-vertės, analizės rezultatas vertinamas:

$|z| \leq 2$  – geras rezultatas.

$2 > |z| \geq 3$  – patenkinamas rezultatas.

$|z| > 3$  - nepatenkinamas rezultatas.

3.15, 3.16 ir 3.17 lentelėse pateikti palyginamųjų tarplaboratorių tyrimų rezultatai. Matome, kad visi CAP nustatymo piene ir NIZ nustatymo kiaušiniuose rezultatai priskirtini geriems. Iš penkių sulfonamidų nustatymo rezultatų trys – geri ir du – patenkinami. Tai dar kartą patvirtina, kad šiame darbe optimizuoti antibiotikų išskyrimo iš mėginių ir jų nustatymo metodai puikiai tenkina tokiems metodams keliamus efektyvumo reikalavimus.

Metodai buvo įdiegti Nacionalinėje veterinarijos laboratorijoje (dabar Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas) ir naudojami lietuviškų maisto produktų užterštumo kontrolei. Išsamiausi stebėsenos tyrimai buvo atlikti chloramfenikoliui. 3.30 pav. pateiktos CAP stebėsenos Lietuvoje gaminamuose pieno produktuose 2005-2008 m. atliktų tyrimų ir teigiamų (užterštų chloramfenikoliu) mėginių diagramos. Lyginant tirtų mėginių ir teigiamų mėginių santykius matoma akivaizdi užterštų CAP mėginių mažėjimo tendencija: užterštų mėginių santykinis kiekis sumažėjo nuo maždaug 22%

2005 m. iki 3 % 2008 m. Tai liudija, kad nuolatinė maisto produkcijos kontrolė duoda teigiamą efektą.

Nustatyti chloramfenikolio kiekiai vidutiniškai svyruoja nuo 0,05 – 0,2 µg/kg piene ir 0,2 – 0,5 µg/kg pieno milteliuose ir kituose produktuose. Didžiausia nustatyta koncentracija piene – 80 µg/kg. Šis atvejas neabejotinai yra specialaus chloramfenikolio pridėjimo į pieną pavyzdys.

**3.15 lentelė**

CAP nustatymo piene palyginamųjų tyrimų rezultatai

Mėginys	Priskirtoji vertė, µg/l	Nustatytos vertės, µg/l	z - vertė
1a	0,191±0,031	0,170; 0,170	-0,39
1b	0,191±0,031	0,170; 0,180	-0,50
2	0,484±0,064	0,470; 0,440	-0,27
3	0,000	0,000	

**3.16 lentelė**

Kai kurių SA nustatymo kiaušiniuose palyginamųjų tyrimų rezultatai

Mėginys/analitės	Priskirtoji vertė, µg/kg	Nustatytos vertės, µg/kg	z  – vertė
1a,b/SMZ	31,6±2,2	35;33(a); 32;35(b)	0,43(a); 0,31(b)
2/SDZ	20,6±2,0	31;34	2,49
3/SDZ;SDM	23,2±1,9 SDZ 57,0±2,4 SDM	37; 40 SDZ 55; 60 SDM	2,84 SDZ 0,04 SDM
4a,b	0,000	0,000	

3.31 pav. pavaizduotas 2005 m. tirtų neigiamų/teigiamų chloramfenikoliui pieno produktų mėginių pasiskirstymas mėnesiais. Labai panaši tendencija kartojasi kiekvienais metais. Nuo birželio iki gruodžio mėn. pieno produkcijos gamyba įprastai suintensyvėja, tačiau teigiamų mėginių skaičius ženkliai padidėja tik rugpjūčio-lapkričio mėn. Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad artėjant šaltajam periodui galvijų augintojai imasi nesankcionuotos

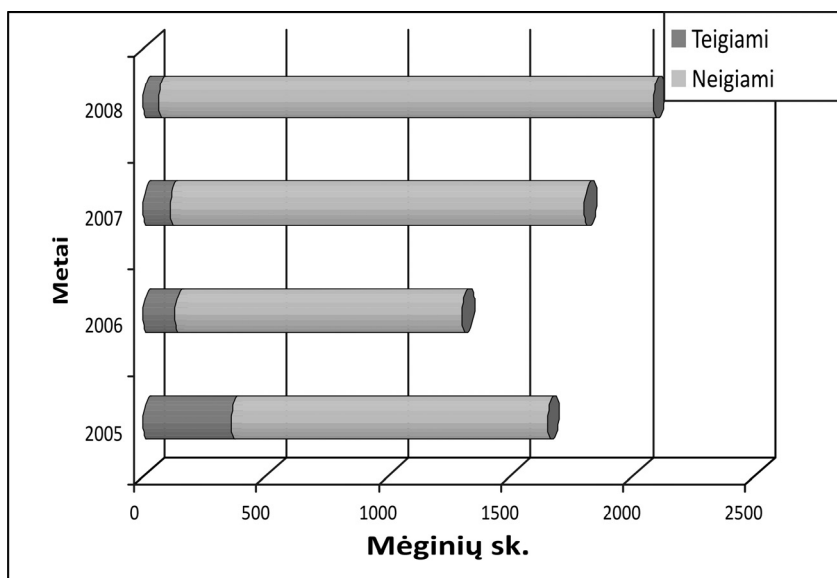
veterinarinės profilaktikos, o gamintojai siekia realizuoti kuo daugiau savo produkcijos ir, tokiu būdu, sėkmingai užbaigti komercines sutartis. Tai skatina juos realizuoti ir nekokybišką produkciją.

**3.17 lentelė**

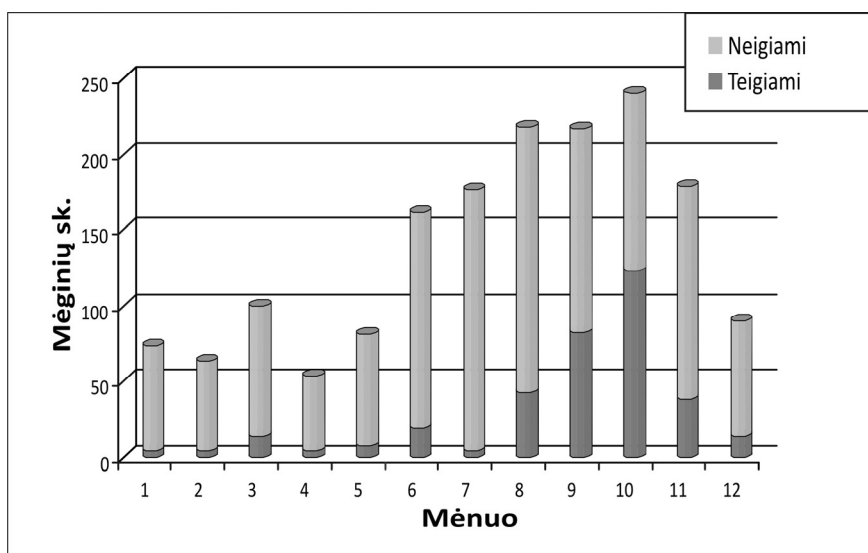
Kai kurių NIZ nustatymo kiaušiniuose palyginamųjų tyrimų rezultatai

Mėginys/anali tės	Priskirtoji vertė, μg/kg	Nustatytos vertės, μg/kg	z  – vertė
1a;b/DMZ, RNZ, HMMNI, MNZ, MNZOH, IPZOH	2,98 DMZ 16,213 HMMNI 9,271 RNZ 9,611 MNZ 8,716 MNZOH 14,497 IPZOH	3,221(a); 3,303(b) 16,989(a); 16,733(b) 8,931(a); 8,904(b) 8,966(a); 8,913(b) 10,994(a); 10,829(b) 16,698(a); 16,113(b)	0,324(a); 0,207(b) 0,200(a); 0,130(b) 0,229(a); 0,283(b) 0,337(a); 0,457(b) 0,517(a); 0,490(b) 0,588(a); 0,310(b)
2/HMMNI, RNZ, MNZ, MNZOH, IPZOH	3,226 HMMNI 1,799 RNZ 1,831 MNZ 1,615 MNZOH 2,792 IPZOH	2,952 1,720 1,684 1,844 2,972	0,535 0,283 0,348 0,307 0,336
3/DMZ, HMMNI, RNZ, MNZ, MNZOH, IPZOH	1,159 DMZ 6,067 HMMNI 3,516 RNZ 3,482 MNZ 3,332 MNZOH 5,668 IPZOH	1,189 6,361 3,401 3,695 4,329 7,060	0,122 0,265 0,290 0,201 0,612 1,236
4	0,000	0,000	

Sulfonamidų ir nitroimidazolų stebėsenos tyrimai buvo pradėti žymiai vėliau, todėl ir tyrimų rezultatai negausūs. 2008 m. buvo atliktas SA nustatymas 17-oje kiaušinių ir 3-juose medaus mėginiuose bei NIZ nustatymas 11-oje kiaušinių mėginių. Nei viename iš tirtų mėginių veterinarinių vaistų likučių nenustatyta.



3.30 pav. CAP stebėsenos Lietuvoje gaminamuose pieno produktuose 2005-2008 m. rezultatai.



3.31 pav. 2005 m. tirtų neigiamų/teigiamų chloramfenikoliui pieno produktų mėginių pasiskirstymas mėnesiais.

## IŠVADOS

1. Ištirtas ir optimizuotas efektyviosios skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos metodas chloramfenikolio nustatymui pieno produktuose. Chloramfenikolio ekstrakcijai iš pieno mėginių palyginus du tirpiklius (dietileterį ir etilacetatą) nustatyta, kad ekstrahuojant etilacetatu, CAP išekstrahuojamas efektyviau: absoliučios išgavos siekia 38% ekstrahuojant dietilo eteriu ir 53% ekstrahuojant etilacetatu. Optimalus tirpiklis mėginių valymui – anglies tetrachlorido/heksano mišinys (1:1 v/v). Įvertinus metodo atrankumą kitiems veterinariniams vaistams, kalibracinės kreivės tiesiškumą, sprendimo ribą, aptikimo gebą, teisingumą ir glaudumą nustatyta, kad metodas gerai tenkina ES reikalavimus, keliamus veterinarinių vaistų likučių nustatymui maisto produktuose.
2. Optimizuotas ir palygintas sulfonamidų atskyrimas efektyviosios ir ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodais. Nustatyta, kad skruzdžių rūgštis efektyviau už acto rūgštį jonizuoja analites ir tai sąlygoja jautresnį jų detektavimą. Naudojant judria faze tiek acetonitrilo, tiek ir metanolio mišinį su vandeniu daugelio analizių smailių simetriškumas nepakankamai geras. Smailių simetriškumas pagerėja organine faze naudojant acetonitrilą su 5-10% v/v metanolio priedu. Nustatyta, kad ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodas yra dvigubai efektyvesnis, atrankesnis ir greitesnis.
3. Ekstrahuojant sulfonamidus etilacetatu iš kiaušinio mėginių susidaro emulsija, o dalies analizių tirpumas dėl protonizacijos sumažėja. Acetonitrilas puikiai nusodina baltymus bei gerai tirpina ir protonizuotas analites. Ekstraktų valymui kietafazės ekstrakcijos metodu ištirtas naujas sorbentas Strata-X, pasižymintis mišria (hidrofobine,  $\pi$ - $\pi$  ir vandenilinio ryšio) sąveika su analitėmis. Atrankiausiai sulfonamidai adsorbuojami iš truputį parūgštintų (pH<6) tirpalų. Desorbcijai palyginus metanolį ir acetonitrilą nustatyta, kad efektyviau, t.y. mažesniu tirpiklio tūriu, analites desorbuoja acetonitrilas.



4. Įvertinus ESCh ir UESCh metodų analizines charakteristikas nustatyta, kad visoms analitėms, išskyrus sulfacetamido nustatymą ESCh metodu ir sulfabenzamido nustatymą abiem metodais, gaunamos ES reikalavimus tenkinančios išgavos (80–110%). Nustatymo jautris taip pat panašus abiem metodams. Beveik visoms analitėms UESCh rezultatų santykiniai standartiniai nuokrypiai buvo žymiai mažesni. Geresnį UESCh metodo glaudumą sąlygoja geresnė smailių forma bei greitesnis atskyrimas.
5. Nitroimidazolų ir jų metabolitų nustatymui kiaušiniuose optimizuotas UESCh-MS/MS metodas. Nustatyta, kad nitroimidazolai puikiai ekstrahuojasi iš kiaušinio matricos vandeniu su trichloracto rūgšties priedu ( $\geq 1\%$ ). Ekstrahuojant vandeniniu tirpalu visiškai nereikalingas papildomas ekstraktų nuriebalinimas (lipidai netirpsta vandenyje) bei ekstraktų nugarinimas ir pertirpinimas vandeninėje judrioje fazėje. Tai ženkliai pagreitina ir supaprastina mėginio paruošimo analizei procedūrą.
6. Nitroimidazolų ekstraktų valymui kietafazės ekstrakcijos būdu ištirtas mišrus polimerinis sorbentas Strata-X-C, pasižymintis ir atvirkščių fazių adsorbcinėmis ir katijonų mainų savybėmis. Maksimalios analičių išgavos bei gryniausios mėginiai gauti valant mažiau parūgštintus (pH 5) ekstraktus. Nitroimidazolų desorbcijai palyginus du mišinius (trietilaminas/vanduo/acetanitrilas ir trietilaminas/vanduo/etilacetatas (2,0:3,0:95, v/v)) nustatyta, kad trietilamino/vandens/etilacetato mišiniu analitės desorbuojamos efektyviau. Kai trietilamino koncentracija desorbuojančiame tirpiklyje siekia  $\geq 2\%$ , pasiekiamas maksimalus desorbcijos efektyvumas.
7. Įvertinus UESCh-MS/MS metodo analizines charakteristikas nustatyta, kad visoms analitėms gaunami ES reikalavimus tenkinantys išgavų (93,0–100,6%), pakartojamumo ( $SSN_r \leq 15,3\%$ ) ir atkuriamumo ( $SSN_{wR} \leq 20,9\%$ ) rezultatai. Pagrindinis metodo privalumas lyginant su iki šiol publikuotais metodais – žymiai mažesnė (2-3 kartus) analizės trukmė ir paprastesnis mėginio paruošimas.

8. Palyginamųjų tarplaboratorinių tyrimų rezultatai parodė, kad šiame darbe optimizuoti antibiotikų išskyrimo iš mėginių ir jų nustatymo metodai puikiai tenkina tokiems metodams keliamus efektyvumo reikalavimus. Metodai įteisinti Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute ir sėkmingai pritaikyti veterinarinių vaistų likučių stebėsenai Lietuvoje gaminamuose maisto produktuose.

## MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS

### MOKSLINIAI STRAIPSNIAI:

1. **V. Tamošiūnas**, J. Petraitis, A. Padarauskas. Chloramphenicol determination in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemija*, Vol. 17 (2006) 25-29.
2. **V. Tamošiūnas**, A. Padarauskas, D. Babičienė, T. Petrėnas. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides in eggs. *Chemija*, Vol. 18, (2007) 20-24.
3. **V. Tamošiūnas**, A. Padarauskas. Comparison of LC and UPLC coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. *Chromatographia*, 67 (2008) 783-788.
4. **V. Tamošiūnas**, A. Padarauskas. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 5-nitroimidazoles and their metabolites in egg. *Central European Journal of Chemistry*, (2009) priimtas publikavimui. DOI: 10.2478/s11532-009-0008-0.

### KONFERENCIJŲ MEDŽIAGOS IR TEZĖS:

1. **V. Tamošiūnas**, A. Padarauskas, A. Tamošiūnienė, A. Kaminskas, J. Petraitis. Determination of chloramphenicol in animal muscle by LC-MS/MS. 1-st Baltic conference on food science and technology FOODBALT - 2006, Kaunas, 2006, 51.
2. **V. Tamošiūnas**, A. Padarauskas, E. Naujalis. Determination of Residual Sulphonamides in Egg and Honey by Ultra-Performance Liquid Chromatography. Thesis of the 4th Nordic Separation Science Society International Conference, Kaunas 26-29 August 2007.
3. **V. Tamošiūnas**, T. Petrėnas, I. Jarmalaitė, J. Petraitis, A. Padarauskas. Determination of nitroimidazole residues in eggs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International conference "EuroResidue VI", The Netherlands, 2008, p. 979-980.

### PADEKA

Dėkoju Lietuvos Valstybiniam Mokslo ir Studijų Fondui už finansinę paramą.

Dėkoju NMVRVI vadovybei ir kolegoms už visapusišką pagalbą atliekant šį darbą.

### Literatūros sąrašas

1. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch. *Practical HPLC method development*. 2nd Edition, New York, John Wiley & Sons, Inc. 1997.
2. J.M. Miller. *Chromatography: concepts and contrasts*. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1988.
3. R.P.W. Scot. *Liquid chromatography column theory*. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1991.
4. U.D. Neue. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. Wiley-VCH, 1997.
5. M. Swartz, B. Murphy. *Am. Lab.*, 37 (3) (2005) 22-27.
6. J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 983-989.
7. J.E. MacNair, K.D. Petel, J.W. Jorgenson. *Anal. Chem.*, 71 (1999) 700-708.
8. A.D. Jerkovich, J.S. Mellors, J.W. Jorgenson. *LC-GC Europe*, 16 (2003) 20-23.
9. K.D. Wyndham, J.E. O'Gara, T.H. Walter, K.H. Glose, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla, P.C. Iraneta. *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6781-678.
10. J. S. Mellors, J.W. Jorgenson. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5441-5450.
11. M. Swartz. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.*, 28 (2005)1253-1263.
12. M. Swartz. *LabPlus Int.*, 18 (3) (2004) 6-9.
13. A. De Villiers, F. Lestremau, R. Szucs, S. Gelebart, F. David, P. Sandra. *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 60-69.
14. Y. Yang, C.C. Hodges. *LC-GC Europe*, 18 (2005) 31-35.
15. S.A.C. Wren, P. Tchelicheff. *J. Chromatogr. A*, 1119 (2006) 140-146.
16. Z. Spacil, L. Novakova, P. Solich. *Talanta*, 76 (2008) 189-199.
17. J. Castro-Perez, R. Plumb, J. Granger, I. Beattie, K. Jancour, A. Wright. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 843-848.
18. I.D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, E.M. Lenz. *J. Chromatogr. B*, 817 (2005) 67-75.

19. D. O'Connor, R. Mortishire-Smith. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 114-121.
20. P.D. Rainville, C.L. Stumpf, J.P. Shockcor, R.S. Plumb, J.K. Nicholson. *J. Proteome Res.*, 6 (2) (2007) 552-558.
21. A.A. Kadav, D.N. Vora. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 48 (2008) 120-126.
22. J. Wang, H. Li, Ch. Jin, Y. Qu, X. Xiao. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47 (2008) 765-770.
23. M. Mezcuca, A. Aguera, J. Lliberia, M.A. Cortes, B. Bago, A.R. Fernandez-Alba. *J. Chromatogr. A*, 1109 (2006) 222-227.
24. M. Ibanez, J.V. Sancho, F. Hernandez, D. McMillan, R. Rao. *Trends Anal. Chem.*, 27 (5) (2008) 481-489.
25. C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell, B.J. Keely. *J. Chromatogr. A*, 1103 (2006) 94-101.
26. A.A.M. Stolker, T. Zuidema, M.W.F. Nielen, *Trends Anal. Chem.*, 26 (10) (2007) 967-979.
27. A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer. *J. Chromatogr. A*, 1194 (2008) 66-79.
28. F.D. Antia, C. Horwath. *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 1-15.
29. T. Greibrokk, Th. Anderson. *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 743-755.
30. J.W. Dolan. *LC-GC North America*, 20 (6) (2002) 525-530.
31. J. Thomson, P.W. Carr. *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1017-1023.
32. Y. Xiqin, M. Lianjia, P.W. Carr. *J. Chromatogr. A*, 1079 (2005) 213-220.
33. J. Li, P.W. Carr. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 837-847.
34. C. Zhu, D.M. Goodall, S.A.C. Wren. *LC-GC Asia*, 8 (1) (2005) 48-59.
35. R.C. Castells, C.B. Castells, M.A. Castells. *J. Chromatogr. A*, 775 (1997) 73-79.
36. T. Garner, C.W. Sims, J.P. Hamberg. US patent 61867A1, 2003.
37. C.V. McNeff, B. Yan, D.R. Stoll, R.A. Henry. *J. Separ. Sci.*, 30 (2007) 1672-1685.
38. Y. Yang, M. Belghazi, A. Lagadec, D.J. Miller, S.B. Hawthorne. *J. Chromatogr. A*, 810 (1998) 149-159.

39. J. Li, P.W. Carr. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2202-2206.
40. D. Guillarme, S. Heinisch, J.Y. Gauvrit, P. Lanteri, J.L. Rocca. *J. Chromatogr. A*, 1078 (2005) 22-27.
41. R. Trones, T. Andersen, T. Greibrokk, D.R. Hegna. *J. Chromatogr. A*, 874 (2000) 65-72.
42. T. Andersen, P. Molander, R. Trones, D.R. Hegna, T. Greibrokk. *J. Chromatogr. A*, 918 (2001) 221-229.
43. F.G. Kitson, B.S. Larsen, C.N. McEwen. *Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide*. San Diego, Academic Press, 1996.
44. R.E. Ardrey. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. Chichester, John Wiley & Sons, 2003.
45. W.M.A. Niessen. *Liquid chromatography-mass spectrometry*. 2nd Edn., New York, Marcel Dekker, 1999.
46. R. Eckman, J. Silberring, A.M. Westman-Brinkmalm, A. Kraj. *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications*. Chichester, John Wiley & Sons, 2008.
47. C. Schmeizeisen-Redeker, L. Bueftering, F.W. Roellgen, F. W., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 90 (1989) 139-150.
48. M. Wilm, M. Mann. *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1-8.
49. W. Paul, H. Steinwedel. 2939952 U.S. patent, 1960.
50. J.H.J. Dawson, M. Guilhaus. *Rapid Comm. Mass Spectr.*, 3 (1989) 155-159.
51. A.N. Verentchikov, W. Ens, K.G. Standing. *Anal. Chem.*, 66 (1994) 126-133.
52. Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham. *J. Mass Spectr.*, 40 (2005) 430-443.
53. A. Makarov. *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1156-1162.
54. K.L. Busch, G.L. Glish, S.A. McLuckey. *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*. New York, VCH, 1988.
55. B. Spengler. *J. Mass. Spectrom.*, 32 (1997) 1019-1036.

56. H. Desaire, J.A. Leary. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11 (2000) 1086-1094.
57. World Trade Organisation. *Agreement of application of sanitary and phytosanitary measures*. Geneva: WTO, 1995.
58. Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. *Official Journal of European Communities*, L125 (1996) 3-9.
59. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of European Communities*, L125 (1996) 10-32.
60. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Communities*, L224 (1990) 1-8.
61. J. Serratos, A. Blass, B. Rigau, B. Montgrel, T. Rigau, M. Tortades, E. Tolosa, C. Aguilar, C. Ribo, J. Balague. *Sci. Techn. Rev.*, 25(2) (2006) 637-653.
62. Commission decision 2002/657/EC 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 (2002) 8.
63. J.D.G. McEvoy. *Anal. Chim. Acta*, 437 (2002) 3-26.
64. G.D. Kennedy, A. Cannavan, R.J. McCracken. *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 37-52.
65. P. Gowik. *Bulletin - International Dairy Federation*, 383 (2003) 52-56.
66. Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance

- limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin, *Official Journal of the European Communities* L71 (2003) 17-18.
67. World Health Organisation. *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. WHO Food Additives series, 23 (1988) 1-71.
  68. A.D. Cooper, J.A. Tarbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer. *Food Additives and Contaminants*, 15(6) (1998) 637-644.
  69. V. Gaudin, N. Caieu, P. Maris. *Food Agric. Immunology*, 15(3-4) (2003) 143-147.
  70. H. Shen, H. Jiang. *Anal. Chim. Acta*, 535 (2005) 33-41.
  71. S. Impens, W. Reybroeck, J. Vercammen, D. Courtheyn, S. Ooghe, K. De Wasch, W. Smedts, H. De Brabander. *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 153-163.
  72. G. Scortichini, L. Annunziata, M.N. Haouet, F. Benedetti, I. Krusteva, R. Galarini. *Anal. Chim. Acta*, 535 (2005) 43-48.
  73. A. Posyniak, J. Zmudzki, J. Neidzielska. *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 307-311.
  74. Meat and meat products - Determination of chloramphenicol content - Method using liquid chromatography. ISO 13493: 1998.
  75. S. Börner, H. Fry, G. Balizs, R. Krockner. *J. AOAC Intern.*, 18(5) (1995) 1153-1160.
  76. Th. Gude, A. Preiss, K. Rubach. *J. Chromatogr. B*, 637(2) (1995) 197-204.
  77. A.P. Pfenning, M.R. Madson, J.E. Roybal, S.B. Turnipseed, S.A. Gonzales, J.A. Hurlbut, G.D. Salmon. *J. AOAC Intern.*, 81(4) (2000) 714-720.
  78. H. Kubala-Drincic, D. Bazulic, J. Sapunar-Postruznik, J. Grubelic, G. Stuhne. *J. Agric. Food Chem.*, 51(4) (2003) 871-875.
  79. A.M. Stolker, U. Brinkman. *J. Chromatogr. A*, 1067 (2005) 15-53.
  80. J. Polzer, R. Hackenberg, C. Stachel, P. Gowik. *Food Additives and Contaminants*, 23 (2006) 1132-1140.



81. A. Gantverg, I. Shishani, M. Hoffman. *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 125-135.
82. P. Mottier, V. Parisod, E. Germaund, P.A. Guy, R.H. Stadler. *J. Chromatogr. A*, 994 (2003) 75-84.
83. M.J. Bogusz, H. Hassan, E. Al-Enazi, Z. Ibrahim, M. Al-Tufail. *J. Chromatogr. B*, 807 (2004) 343-356.
84. D. Quon, M.C. Carson, C. Nochetto, D.N. Heller, D.N. Butterwoth. *J. AOAC Intern.*, 89(2) (2006) 586-593.
85. H.S. Rupp, J.S. Stuart, J.A. Hurlbut. *J. AOAC Intern.*, 88(4) (2005) 1155-1159.
86. V. Hormazabal, M. Yndestad. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 24 (2001) 2477-2486.
87. E. Gikas, P. Kormali, D. Tsipi, A. Tsarbopoulos. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1025-1030.
88. G. Balizs, A. Hewitt. *Anal. Chim. Acta*, 492 (2003) 105-131.
89. A.F. Forti, G. Campana, A. Simonella, M. Multari, G. Scortichini. *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 257-263.
90. Ph.A. Guy, D. Royer, P. Mottier, E. Gremaud, A. Perisset, R.H. Stadler. *J. Chromatogr. A*, 1054 (2004) 365-371.
91. G.H.H. Carillo, E.A. Plascencia, C.G. Barbeitia, M.C.B. Almada, M. *Veterinaria*, 35(2) (2004) 91-100.
92. W.M.A. Niessen. *J. Chromatogr. A*, 812 (1998) 53-75.
93. A.I. Myllyniemi, R. Rannikko, E. Lindfors, A. Niemi. *Analyst*, 126 (2001) 641-646.
94. J. Nouws, H. van Egmond, I. Smulders, G. Loeffen, J. Schouten, H. Stegeman. *Intern. Dairy J.*, 9 (1999) 85-90.
95. P. Aureli, A.M. Ferrini, V. Mannoni. *Food Control.*, 7(3) (1996) 165-168.
96. L. Okerman, K. De Wasch, J. van Hoof. *Analyst*, 123 (1998) 2361-2365.
97. S. Wang, H.I. Zhang, L. Wang, Z.J. Duan, I. Kennedy. *Food Additives and Contaminants*, 2006, Vol. 24, 2, pp. 362-384.

98. H. Zhang, Z. Duan, L. Wang, Y. Zhang, S. Wang. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 4499-4505.
99. P. Cliquet, E. Cox, W. Haasnoot, E. Schacht, B.M. Goddeeris. *Anal. Chim. Acta*, 494 (2003) 21-28.
100. H. Zhang, L. Wang, Y. Zhang, G. Fang, W. Zheng, S. Wang. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 2079-2084.
101. W. Haasnoot, M. Bienenmann-Ploum, F. Kohen. *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 171-180.
102. C. Situ, S.R.H. Crooks, A.G. Baxter, J. Ferguson, C.T. Elliott. *Anal. Chim. Acta*, 473 (2002) 143-149.
103. W. Haasnoot, M. Bienenmann-Ploum, U. Lamminmaki, M. Swanenburg, H. van Rhijn. *Anal. Chim. Acta*, 552 (2005) 87-95.
104. M.M. Aerts, W.M. Beek, U.A. Brinkman. *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 97-112.
105. S. Horii, C. Momma, K. Miyahara, T. Maruyama, M. Matsumoto. *J. AOAC Intern.*, 73(6) (1990) 990-992.
106. M. Gartacos-Cubarsi, M. Castelari, A. Valero, I. Diaz, J.A. Garcia-Requero. *Food Additives and Contaminants*, 23 (2006) 981-987.
107. K. Kishida, N. Furusawa, N. *J. Chromatogr. A*, 937 (2001) 49-55.
108. S. Croubels, P. Wassink, P. De Bracker. *Anal. Chim. Acta*, 473 (2002) 183-194.
109. D.N. Heller, M.A. Ngoh, D. Donoghue, L. Podhorniak, H. Ryghter, M.H. Thomas. *J. Chromatogr. B*, 774 (2002) 39-52.
110. N. Furasawa. *J. Chromatogr. A*, 898 (2000) 185-191.
111. I. Garcia, M.C. Ortiz, L. Sarabia, J.M. Aldama. *Anal. Chim. Acta*, 587 (2007) 222-234.
112. G. Stoev, A. Michailova. *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 37-42.
113. A. Posyniak, J. Zmudski, K. Mitrowska. *J. Chromatogr. A*, 1087 (2005) 259-264.
114. T.A. Gehring, L.G. Rushing, H.C. Thomson. *J. AOAC Intern.*, 78(5) (1995) 1161-1164.

115. Q. Zou, J. Wang, X. Wang, Y. Liu, J. Han, F. Hou, M. Xie. *J. AOAC Intern.*, 91(1) (2008) 252-257.
116. C.D.C. Salisbury, J.C. Sweet, R. Munro. *J. AOAC Intern.*, 87 (5) (2004) 1264-1268.
117. G. Pang, Y. Cao, J. Zhang, G. Jia, C. Fan, X. Li, Y. Liu, Z. Li, Y. Shi. *J. AOAC Intern.*, 88(5) (2005) 1304-1311.
118. S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corsa, M. Nazzari, M.L. Polci. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 4225-4232.
119. M. Sergi, A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, S. Materazzi, R. Curini. *Chromatographia*, 65 (2007) 757-761.
120. A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, M. Sergi, C. Olmi, R. Curini. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 4614-4624.
121. C. Cavaliere, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 558-566.
122. G. Berardi, S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Lagan. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 4537-4543.
123. S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, R. Anal. Chem., 75 (2003) 1798-1804.
124. J.A. Tarbin, P. Clarke, G. Shearer. *J. Chromatography B.*, 729 (1999) 127-138.
125. D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, A. Greco, R. Curini. *Chromatographia*, 63 (2006) 225-232.
126. V. Gamba, C. Terzamo, L. Fioroni, S. Moretti, G. Dusi, R. Galarini. *Anal. Chim. Acta*, (2009) in press.
127. A.C. Huet, L. Mortier, E. Daeseliere, T. Fodey, C. Elliot, P. Delahaut. *Anal. Chim. Acta*, 534 (2005) 157-162.
128. J. Wang. *J. Chromatogr. A*, 918 (2001) 435-438.
129. J. Polzer, C. Stachel, P. Gowik, P. Anal. Chim. Acta, 521 (2004) 189-200.
130. J. Polzer, P. Gowik. *J. Chromatogr. B*, 761 (2001) 47-60.
131. C. Ho, D.W.M. Sin, K.M. Wong, H.P.O. Tang. *Anal. Chim. Acta*, 530 (2005) 23-31.

132. A. Cannavan, C.D. Kennedy. *Analyst*, 122 (1997) 963-966.
133. D. Hurtaud-Pessel, B. Delepine, M. Lauretie. *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 89-98.
134. V. Hormazabal, M. Yndestad. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.*, 24 (2001) 2487-2492.
135. P. Mottier, I. Hure, E. Germaund, P.A. Guy. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 2018-2026.
136. X. Xia. *J. AOAC Intern.*, 89(1) (2006) 94-99.
137. X. Xia, X. Li, S. Zhang, S. Ding, H. Jiang, J. Shen. *Anal. Chim. Acta*, 586 (2007) 394-398.
138. S. Frasselle, V. Derop, J.M. Degroodt, J. Van Loco. *Anal. Chim. Acta*, 586 (2007) 383-393.
139. R. Mohamed, P. Mottier, L. Treguier, J. Richoz-Payot, E. Yilmaz, J. Tabet, P.A. Guy. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 3500-3508.
140. R. Zeleny, S. Harbeck, H. Schimmel. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 249-256