



Mgr Joanna Pacyńska

Rozprawa doktorska w ramach programu doktoratu wdrożeniowego

**Opracowanie nowych procedur badawczych oznaczania pozostałości
leków w produktach żywnościowych wraz z ich walidacją
i wdrożeniem w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu
Weterynarii w Poznaniu**

Development of new research procedures for determining drug residues in food
products along with their validation and implementation in the laboratory of the
Provincial Veterinary Inspectorate in Poznań

przedstawiona Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne

Wydziału Chemii UAM

celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Przemysław Niedzielski

Praca została wykonana w Wojewódzkim Inspektoracie Weterynarii w Poznaniu
oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań 2025

Składam serdeczne podziękowania

Dyrekcji Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu, w szczególności
Wielkopolskiemu Wojewódzkiemu Lekarzowi Weterynarii Pani Dominice Kmet
za możliwość realizacji pracy doktorskiej w formule programu
„Doktorat wdrożeniowy”

Promotorowi Panu prof. dr hab. Przemysławowi Niedzielskiemu
za wyrozumiałość oraz nieocenioną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy

Koleżankom i kolegom z pracy w szczególności
Kierownikowi Pracowni Badań Chemicznych Pani mgr Agnieszce Kopydłowskiej
za wsparcie, motywację oraz cenne rady

Mojej rodzinie w szczególności Tomkowi
oraz przyjaciołom, za wsparcie i wiarę we mnie

Szczególnie dziękuję Rodzicom to dzięki Wam mogłam tyle osiągnąć

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli.....	9
1. Wstęp	13
2. Antybiotyki	14
2.1. β -laktamy	16
2.2. Aminoglikozydy	19
2.3. Makrolidy	21
2.4. Sulfonamidy	24
2.5. Chinolony (fluorochinolony).....	27
2.6. Tetracykliny	29
2.7. Linkozamidy	30
2.8. Diaminopirymidyny	31
2.9. Pleuromutyliny	32
3. Ekstrakcja, oczyszczanie i techniki analizy antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego	33
3.1. Ekstrakcja i oczyszczanie	34
3.1.1. Ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE).....	34
3.1.2. QuEChERS.....	36
3.1.3. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)	40
3.2. Wykrywanie i oznaczanie antybiotyków: techniki analityczne.....	52
4. Cel pracy	66
5. Część doświadczalna	69
5.1. Stosowany sprzęt i wyposażenie laboratoryjne, odczynniki oraz wzorce antybiotyków	69
5.1.1. Sprzęt i wyposażenie laboratoryjne	69
5.1.2. Odczynniki	70
5.1.3. Substancje wzorcowe antybiotyków	70

5.2.	Przygotowanie roztworów podstawowych antybiotyków	72
5.3.	Procedura badawcza oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w tkankach zwierzęcych i produktach spożywczych metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas	75
5.3.1.	Oczyszczanie próbek i przygotowanie do analizy LC-MS/MS	82
5.3.2.	Warunki analizy LC-MS/MS oraz ich optymalizacja	84
5.3.3.	Optymalizacja warunków ekstrakcji	91
5.3.4.	Ocena skuteczności metody – krzywe wzorcowe i chromatogramy	102
5.4.	Procedura badawcza oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w jajach metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas	110
5.4.1.	Oczyszczanie próbek i przygotowanie do analizy LC-MS/MS	113
5.4.2.	Warunki analizy LC-MS/MS oraz ich optymalizacja	114
5.4.3.	Optymalizacja warunków ekstrakcji	118
5.4.4.	Ocena skuteczności metody – krzywe wzorcowe i chromatogramy	125
5.5.	Procedura badawcza oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w miodach metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas	131
5.5.1.	Oczyszczanie próbek i przygotowanie do analizy LC-MS/MS	135
5.5.2.	Warunki analizy LC-MS/MS oraz ich optymalizacja	138
5.5.3.	Optymalizacja warunków ekstrakcji	143
5.5.4.	Ocena skuteczności metody – krzywe wzorcowe i chromatogramy	151
6.	Walidacja opracowanych procedur badawczych	157
6.1.	Plan walidacji i założenia projektowe	158
6.2.	Liniowość sygnału	159
6.3.	Selektywność	161
6.4.	Precyzja, powtarzalność, odtwarzalność, poprawność	162
6.5.	Decyzyjna wartość graniczna – $CC\alpha$	171
6.6.	Zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych – $CC\beta$	175
6.7.	Względny efekt matrycowy	178

SPIS TREŚCI

6.8.	Odporność.....	180
6.9.	Stabilność	183
6.10.	Budżet niepewności	184
6.11.	Raport z walidacji.....	187
7.	Wdrożenie opracowanych procedur badawczych.....	191
8.	Badania rutynowe próbek rzeczywistych w latach 2020-2024	198
8.1.	Próbki tkanki mięśniowej	200
8.2.	Próbki mleka.....	210
8.3.	Próbki jaj	213
8.4.	Próbki miodów	216
8.5.	Próbki nerek.....	218
9.	Podsumowanie	220
10.	Streszczenie	228
11.	Summary.....	229
	Bibliografia	230
	Spis ilustracji.....	243
	Spis tabel.....	244
	Spis wykresów	247
	Spis dokumentów.....	248
	Aneks	249

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

MRL – ang. Maximum Residue Limit – najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości weterynaryjnego produktu leczniczego, który jest prawnie dozwolony w żywności lub paszy dla zwierząt

DNA – ang. Deoxyribonucleic Acid – kwas deoksyrybonukleinowy

tRNA – ang. Transfer RNA – transportujący (transferowy) kwas rybonukleinowy

LLE – ang. Liquid-Liquid Extraction – ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz

MeCN – ang. Acetonitrile – acetonitryl

MeOH – ang. Methanol - metanol

UPLC–MS/MS – ang. Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry - ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas

DMSO – ang. Dimethyl sulfoxide – dimetylosulfotlenek

EDTA – ang. Ethylenediaminetetraacetic acid – kwas etylenodiaminotetraoctowy

Na₂EDTA – ang. Disodium ethylenediaminetetraacetate – dwusodowa sól kwasu etylenodiaminotetraoctowego

TCA – ang. Trichloroacetic Acid – kwas trichlorooctowy

QuEChERS – ang. quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe – szybka, tania, łatwa, efektywna, elastyczna, bezpieczna; metoda używana do szybkiego i taniego przygotowywania próbek do analizy

MgSO₄ – ang. magnesium sulfate – siarczanu magnezu

NaCl – ang. sodium chloride – chlorek sodu

SPE – ang. Solid-phase extraction – ekstrakcja do fazy stałej

d-SPE – ang. dispersive Solid-Phase Extraction – dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej

- PSA** – ang. Primary-Secondary Amines – pierwszorzędowa-drugorzędowa amina
- C18** – ang. Octadecyl silica – krzemionka oktadecylowa
- LC** – ang. Liquid chromatography – chromatografia cieczowa
- GC** – ang. Gas chromatography – chromatografia gazowa
- MS** – ang. Mass spectrometry – spektrometria mas
- Na₂SO₄** – ang. sodium sulfate – siarczan sodu
- NaH₂PO₄** – ang. monosodium phosphate – diwodorofosforan sodu
- RP** – ang. Reversed Phase – faza odwrócona
- NP** – ang. Normal Phase – faza normala
- IE** – ang. Ion Exchange – sorbenty jonowymienne
- MIP** – ang. Molecularly Imprinted Polymers – polimery odciskane molekularnie
- IMS** – ang. Immunosorbents – immunosorbenty
- SCX** – ang. Strong Cation Exchange – silna wymiana kationów
- WCX** – ang. Weak Cation Exchange – słaba wymiana kationów
- SAX** – ang. Strong Anion Exchange – silna wymiana anionów
- WAX** – ang. Weak Anion Exchange – słaba wymiana anionów
- SDVB** – ang. Styrene divinylbenzene – polimer styren-diwinylbenzen
- HFBA** – ang. Heptafluorobutyric acid – kwas heptafluoromasłowy
- KH₂PO₄** – ang. Potassium dihydrogen phosphate – diwodorofosforan potasu
- MCX** – ang. Mixed-Mode Cation Exchange – wymiana kationów w trybie mieszanym
- UV** – ang. Ultraviolet Detector – detektor ultrafioletowy, detektor UV
- HPLC** – ang. High-Performance Liquid Chromatography – wysokosprawna chromatografia cieczowa
- UV-DAD** – ang. Ultraviolet Diode Array Detector – detektor UV z matrycą diodową
- FLD** – ang. Fluorescence Detector – detektor fluorescencyjny

LC-MS – ang. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, technika LC-MS.

ESI – ang. Electrospray Ionization – jonizacja typu elektrospray

APCI – ang. Atmospheric Pressure Chemical Ionization – jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym

HRMS – ang. High-Resolution Mass Spectrometry – wysokorozdzielcza spektrometria mas

TOF – ang. Time of Flight – analizator czasu przelotu

Q-TOF – ang. Quadrupole Time of Flight – kwadrupol z analizatorem czasu przelotu

QqQ – ang. Triple Quadrupole – system analizatorów kwadrupolowych

SIM – ang. Selected Ion Monitoring – monitorowanie wybranych jonów

MRM – ang. Multiple Reaction Monitoring – monitorowanie wielu reakcji

SRM – ang. Selected Reaction Monitoring – monitorowanie wybranych reakcji

Q – ang. Quadrupole – analizator kwadrupolowy

UHPLC – ang. Ultra-High Performance Liquid Chromatography – ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa

UPLC – ang. Ultra-Performance Liquid Chromatography – ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa

HILIC – ang. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – chromatografia cieczowa z interakcją hydrofilową

HSS C18 – ang. High Strength Silica C18 – krzemionka o wysokiej wytrzymałości, faza C18

HSS T3 – ang. High Strength Silica T3 – krzemionka o wysokiej wytrzymałości, faza T3

BEH C18 – ang. Bridged Ethyl Hybrid C18 – hybrydowy materiał krzemionkowy mostkowany etylowo, faza C18

HEPES – ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid – kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy

WYAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

CC α – ang. Decision Limit – decyzyjna wartość graniczna

CC β – ang. Detection Capability for Screening – zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych

PCA – Polskie Centrum Akredytacji

IS – ang. Internal Standard – standard wewnętrzny

RT – ang. Retention Time – czas retencji

CV – ang. Cone Voltage – napięcie na stożku,

CE – ang. Collision Energy – energia kolizyjna

MMPR – ang. Minimum Method Performance Requirements – minimalne wymagania dla metody analitycznej

EURL – ang. European Union Reference Laboratories – Laboratoria Referencyjne Unii Europejskiej

CRM – ang. Certified Reference Material – certyfikowany materiał odniesienia

LCL – ang. Lowest Calibrated Level – najniższy skalibrowany poziom

STC – ang. Screening Target Concentration – docelowe stężenie przesiewowe

1. Wstęp

Kontrolowanie obecności szkodliwych i niepożądanych substancji jest jedną z kluczowych czynności mających na celu zapewnienie żywności o wysokiej jakości i bezpiecznej dla konsumenta. Zapewnienie bezpieczeństwa żywności jest fundamentalnym elementem ochrony zdrowia publicznego. Obejmuje ono wszystkie działania, które gwarantują, że żywność jest wolna od szkodliwych substancji chemicznych, w tym pozostałości leków (np. antybiotyków, leków przeciwwrobaczych, kokcydiostatyków, kortykosteroidów, niesterydowych leków przeciwzapalnych, neuroleptyków). Obecność niepożądanych substancji chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego wynika nie tylko ze skażenia środowiska, ale również z działań człowieka. Leki stosowane w hodowli zwierząt, mogą pozostawać w mięsie, mleku, jajach oraz innych produktach pochodzenia zwierzęcego, a ich obecność może mieć bezpośredni, negatywny wpływ na zdrowie ludzi [1].

Wśród leków stosowanych w hodowli zwierząt dominują antybiotyki, takie jak aminoglikozydy, β -laktamy (np. penicyliny i cefalosporyny), tetracykliny, makrolidy, linkozamidy, pleuromutyliny, sulfonamidy, fluorochinolony, diaminopirymidyny, fenikole i peptydy. Niestety, pozostałości tych antybiotyków w produktach zwierzęcych mogą mieć niekorzystny wpływ na zdrowie ludzi. Mogą wywoływać reakcje alergiczne, a także mieć potencjalne działanie mutagenne i kancerogenne. Ponadto, długotrwałe spożywanie nawet niewielkich ilości antybiotyków z żywnością może prowadzić do rozwoju szczepów bakterii opornych na leczenie [2, 3]. Konsekwencje używania dużych ilości antybiotyków w produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego mogą być również bardzo rozległe, ponieważ ich resztki mogą trafiać do ścieków komunalnych wraz z moczem [4].

Ryzyko pojawienia się drobnoustrojów chorobotwórczych odpornych na antybiotyki oraz wzrastająca świadomość konsumentów w zakresie bezpieczeństwa żywności przyczyniły się do stworzenia przepisów regulujących bezpieczeństwo żywności i żywienia. Specjaliści z tej dziedziny mają obowiązek monitorowania jakości i zapewniania dostępu do zdrowej żywności [5].

Stosowanie antybiotyków przy produkcji mięsa jest praktycznie nieuniknione, dlatego Unia Europejska ustanowiła normy określające maksymalne limity pozostałości

(MRL) leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego [3]. Wykaz leków weterynaryjnych wraz z ich wartościami MRL znajduje się w Tabeli I Rozporządzenia Komisji (UE) 37/2010. Maksymalne limity pozostałości różnią się w zależności od rodzaju leku, gatunku zwierzęcia, typu tkanki oraz rodzaju produktu pochodzenia zwierzęcego. Substancje przeciwbakteryjne mają przypisane odpowiednie wartości MRL, które określają taki maksymalny poziom pozostałości, który jest uznany za bezpieczny dla konsumentów w danym produkcie pochodzenia zwierzęcego. Należy zwrócić uwagę na fakt, że nie dla wszystkich leków wymienionych w tym rozporządzeniu, stosowanych w praktyce weterynaryjnej, wyznaczono wartości MRL [6]. Przykładem może być doksycyklina, dla której nie ustalono limitu pozostałości dla mleka oraz jaj. W związku z tym, nie powinno się stosować tego antybiotyku u zwierząt, których mleko lub jaja są przeznaczone do spożycia przez ludzi [6]. Przestrzeganie tych limitów jest kluczowe dla minimalizacji zagrożeń zdrowotnych dla konsumentów oraz kontroli oporności na antybiotyki. W tym celu zarówno międzynarodowe, jak i krajowe organizacje utworzyły odpowiednie programy kontroli żywności, które mają za zadanie nadzorować przestrzeganie tych norm, aby zapewnić bezpieczeństwo produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego dostępnych na rynku. Wykrycie i potwierdzenie pozostałości zakazanego leku weterynaryjnego lub przekroczenie dla niego dopuszczalnej wartości MRL w produktach pochodzenia zwierzęcego skutkuje uruchomieniem odpowiednich działań administracyjnych [7].

2. Antybiotyki

Termin „antybiotyki” odnosi się do leków, które mogą mieć naturalne, półsyntetyczne lub syntetyczne pochodzenie i wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze lub przeciw Pasożytnicze [8]. Antybiotyki są jedną z kluczowych grup leków w medycynie. Pełnią one istotną rolę w leczeniu infekcji bakteryjnych, ratując życie wielu ludzi na całym świecie. Wprowadzenie leczenia antybiotykami znacząco obniżyło śmiertelność w wyniku chorób zakaźnych.

Historia antybiotyków zaczyna się w 1929 roku, kiedy Alexander Fleming zauważył, że grzyb *Penicillium notatum* hamuje wzrost bakterii *Streptococcus* [9]. To przełomowe odkrycie zrewolucjonizowało medycynę, prowadząc do stworzenia penicyliny – pierwszego antybiotyku.

Niektóre rodzaje antybiotyków są dopuszczone do stosowania w leczeniu zwierząt i można je podzielić na kilka grup w oparciu o ich strukturę chemiczną (np. β -laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, sulfonamidy, chinolony, tetracykliny, linkozamidy, diaminopirymidyny, pleuromutyliny, które zostaną szczegółowo przedstawione w kolejnych podrozdziałach) lub mechanizm działania. W obrębie jednej grupy znajdują się związki o podobnej strukturze chemicznej i najczęściej o zbliżonym mechanizmie działania. Jednak właściwości antybiotyków w obrębie nawet jednej klasy mogą się różnić, co jest spowodowane obecnością różnych łańcuchów bocznych w cząsteczce [10].

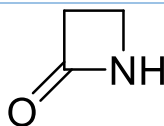
Podział antybiotyków ze względu na mechanizm działania obejmuje [11]:

- Inhibitory metabolizmu komórkowego – jest to grupa substancji przeciwbakteryjnych, która powoduje zakłócanie procesów metabolicznych komórek bakteryjnych. Jednym z przykładów może być blokowanie syntezy kwasu foliowego, co w rezultacie powoduje zakłócenia w syntezie DNA. Najbardziej znanymi antybiotykami działającymi w ten sposób są sulfonamidy.
- Inhibitory syntezy ściany komórkowej – jest to grupa substancji przeciwbakteryjnych, które zakłócają syntezę ściany komórkowej bakterii na różnych etapach jej formowania. Ściana komórkowa stanowi istotny element strukturalny bakterii, nadający jej kształt oraz chroniący przed wpływami zewnętrznymi. Najbardziej znanymi substancjami działającymi w ten sposób są antybiotyki należące do grupy β -laktamów.
- Substancje przeciwbakteryjne uszkodzające błonę komórkową – do tej grupy należą antybiotyki, które oddziałując na błonę komórkową bakterii, zmieniają jej przepuszczalność. Błona komórkowa oprócz zapewnienia integralności komórki, kontroluje również transport substancji do i z komórki bakteryjnej. Przykładami antybiotyków działających w ten sposób są polimyksyny.
- Inhibitory syntezy białek – to grupa substancji przeciwbakteryjnych, która zaburza wytwarzanie białek niezbędnych dla przeżycia komórki. Hamowanie syntezy białek jest najpowszechniejszym celem działania antybiotyków spośród wszystkich znanych mechanizmów. Do tej grupy antybiotyków należą aminoglikozydy, tetracykliny, makrolidy.

- Inhibitory syntezy kwasów nukleinowych – to grupa antybiotyków, która dzięki hamowaniu transkrypcji oraz replikacji kwasów nukleinowych uniemożliwia komórce bakteryjnej podział oraz syntezę kluczowych białek. Do tej grupy należą np. fluorochinolony [11].

2.1. β -laktamy

β -laktamy to grupa naturalnych lub półsyntetycznych antybiotyków, które w swojej strukturze zawierają charakterystyczny pierścień β -laktamowy, składający się z 3 atomów węgla oraz 1 atomu azotu, który jest wysoce reaktywny (**Rysunek 1**)[12].

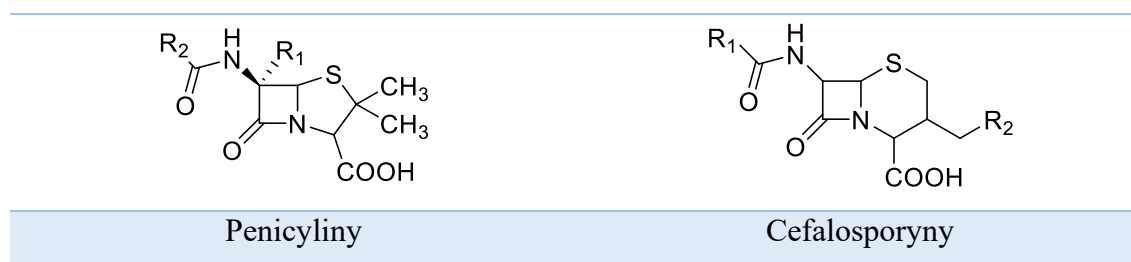


Rysunek 1. Pierścień β -laktamowy

Antybiotyki z grupy β -laktamów wpływają na zahamowanie syntezy ściany komórkowej bakterii, co skutkuje śmiercią tych mikroorganizmów. Wśród β -laktamów można wyróżnić kilka podgrup, z których dwie najważniejsze to penicyliny oraz cefalosporyny [13]. Stanowią one największą grupę antybiotyków i są najczęściej stosowane w praktyce klinicznej. W medycynie weterynaryjnej antybiotyki β -laktamowe są wykorzystywane do leczenia różnorodnych infekcji bakteryjnych u wielu gatunków zwierząt, w tym u zwierząt domowych (psów i kotów) [14].

Penicyliny, są pozyskiwane zarówno z naturalnych, jak i półsyntetycznych źródeł. Ich podstawową strukturą jest kwas 6-aminopenicylinowy, który składa się z pierścienia β -laktamowego połączonego z pierścieniem tiazolidynowym (**Rysunek 2**). Reaktywny charakter struktury pierścieniowej sprawia, że penicyliny łatwo ulegają degradacji. W kwaśnym środowisku i w temperaturze pokojowej pierścień β -laktamowy przekształca się, ulegając hydrolizie. Ma to istotne znaczenie kliniczne z powodu kwaśnego pH w żołądku [15]. Naturalne penicyliny są wytwarzane przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Penicillium*. Różnorodność penicylin wynika z modyfikacji w pozycji 6 pierścienia kwasu 6-aminopenicylinowego. Zmiany w łańcuchu bocznym wpływają na różnice w działaniu przeciwbakteryjnym oraz właściwościach farmakokinetycznych penicylin [4]. Dzięki tym modyfikacjom penicyliny mają różne zdolności zwalczania

bakterii oraz różnią się pod względem wchłaniania, metabolizmu i wydalania w organizmie.

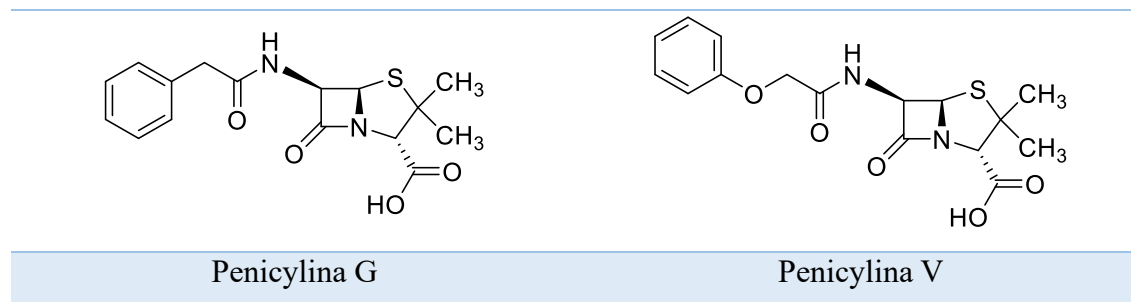


Rysunek 2. Antybiotyki β -laktamowe

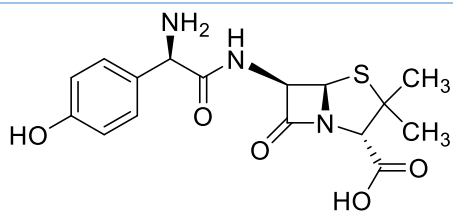
Do antybiotyków z grupy penicylin (**Rysunek 3**) należą m.in: penicylina G, penicylina V, amoksycylina, ampicylina, oksacylina, kloksacylina, nafcylina, dikloksacylina.

Cefalosporyny stanowią dużą grupę antybiotyków β -laktamowych, które pod względem budowy chemicznej i mechanizmu działania przypominają penicyliny, oferują jednak znacznie szerszy zakres aktywności przeciwbakteryjnej. Cefalosporyny są półsyntetycznymi antybiotykami β -laktamowymi, których prekursorem jest kwas 7-aminocefalosporynowy (**Rysunek 2**). Cefalosporyny są kategoryzowane według generacji, które zazwyczaj odpowiadają kolejności ich rozwoju i spektrum aktywności przeciwbakteryjnej [16]. Pierwsza generacja cefalosporyn jest najbardziej skuteczna przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, podczas gdy kolejne generacje, aż do piątej, wykazują zwiększoną skuteczność wobec bakterii Gram-ujemnych i lepszą odporność na mechanizmy oporności bakterii [10, 17].

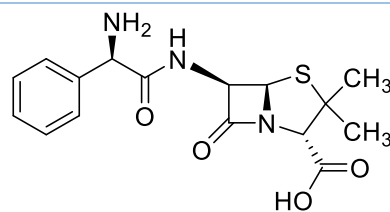
Do antybiotyków z grupy cefalosporyn (**Rysunek 4**) należą m.in: cefapiryna, ceftiofur, cefkwinom, cefalonium, cefazolina, cefaleksyna, cefoperazon.



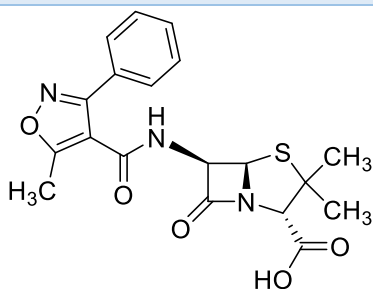
WSTĘP TEORETYCZNY



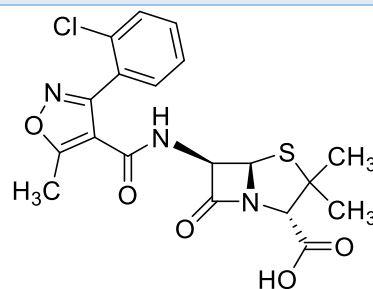
Amoksycylina



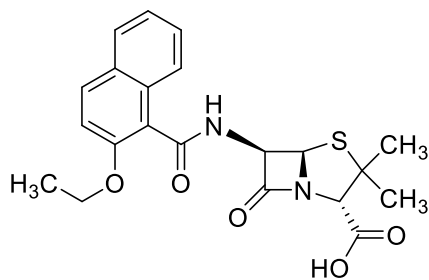
Ampicylina



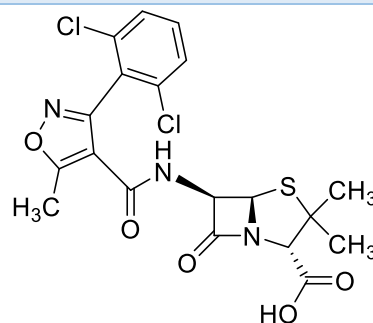
Oksacylina



Kloksacylina

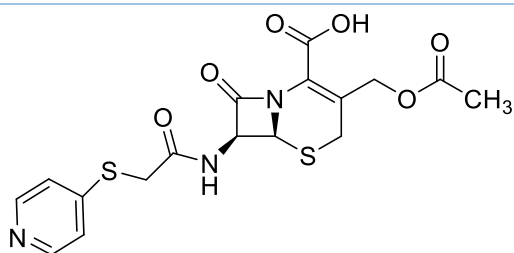


Nafcylina

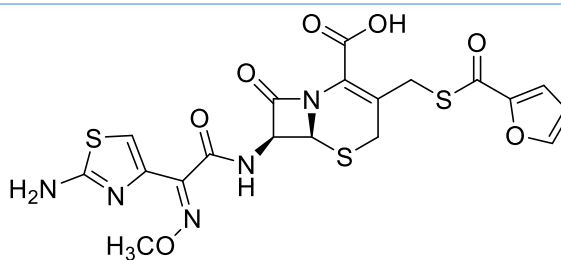


Dikloksacylina

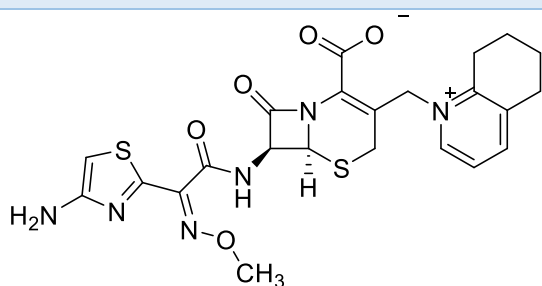
Rysunek 3. Przykłady antybiotyków z grupy penicylin



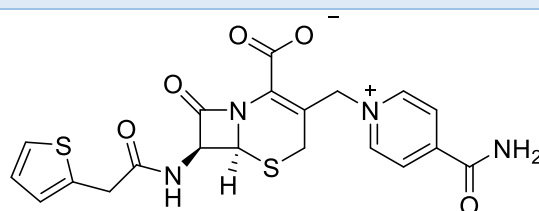
Cefapiryna



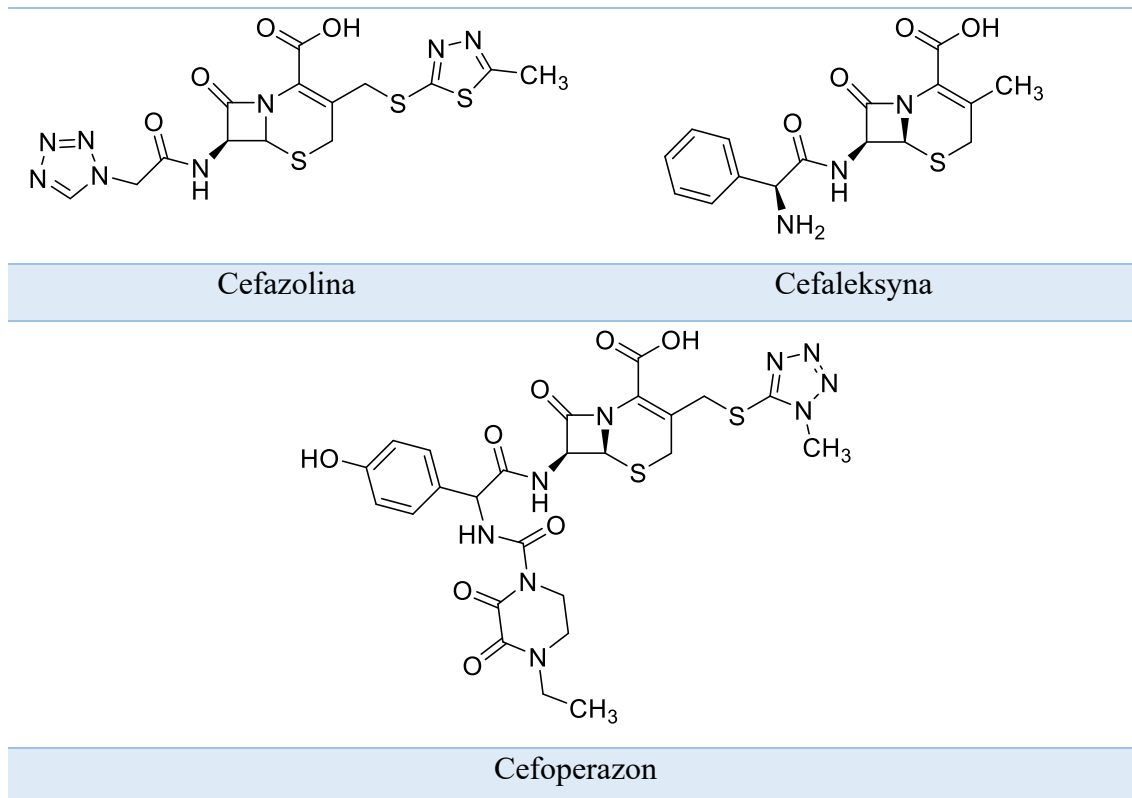
Ceftiofur



Cefkwinom



Cefalonium



Rysunek 4. Przykłady antybiotyków z grupy cefalosporyn

2.2. Aminoglikozydy

Aminoglikozydy to grupa antybiotyków charakteryzująca się obecnością aminocyklicznego pierścienia, zazwyczaj 2-deoksystreptaminą, do którego przyłączone są co najmniej dwa aminocukry poprzez wiązanie glikozydowe (**Rysunek 5**) [18].

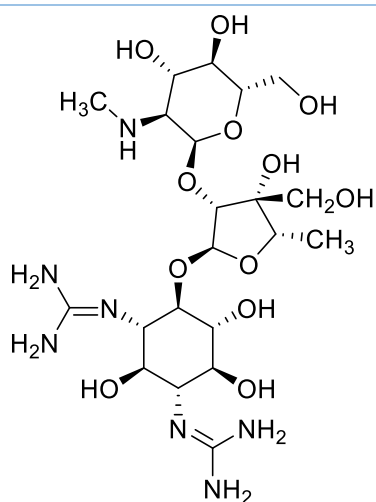
Aminoglikozydy działają poprzez wiązanie się z rybosomem bakteryjnym, który jest kluczowym elementem procesu syntezy białek. Poprzez zakłócanie tego procesu, aminoglikozydy skutecznie hamują wzrost bakterii, co prowadzi do ich śmierci. Ten mechanizm działania czyni je silnymi środkami bakteriobójczymi [19]. Są one szeroko stosowane w medycynie weterynaryjnej oraz przy produkcji żywności ponieważ, oprócz działania terapeutycznego, mogą poprawić także wchłanianie składników odżywczych zawartych w paszy dla zwierząt [4].

Aminoglikozydy są klasyfikowane na podstawie różnic w strukturze ich cząsteczek, szczególnie układu podstawników na pierścieniu deoksystreptaminy, który stanowi kluczowy element tych antybiotyków. Taka klasyfikacja strukturalna jest istotna, ponieważ determinuje mechanizm działania leków, ich spektrum działania oraz podatność na bakteryjne mechanizmy oporności. Do najważniejszych grup należą

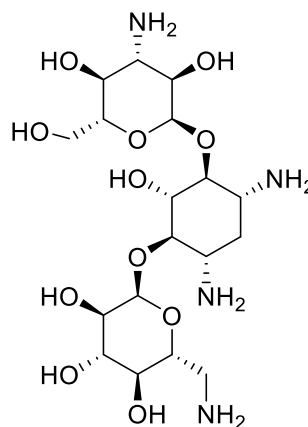
antybiotyki z deoksystreptaminą 4,5-disubstytuowaną (np. neomycyna) oraz z deoksystreptaminą 4,6-disubstytuowaną (np. kanamycyna) (**Rysunek 5**) [20].

Wysoka toksyczność aminoglikozydów sprzyja leczeniu poważnych infekcji, jednakże poziom toksyczności różni się w zależności od rodzaju aminoglikozydu. Bardziej toksyczne aminoglikozydy, takie jak neomycyna, są stosowane wyłącznie miejscowo lub doustnie, ponieważ ich podanie ogólnoustrojowe może wywołać poważne działania niepożądane. Z kolei aminoglikozydy o niższej toksyczności, takie jak gentamycyna, są wykorzystywane w leczeniu sepsy wywołanej przez bakterie Gram-ujemne [10]. Niewłaściwe lub długotrwałe stosowanie aminoglikozydów może prowadzić do akumulacji pozostałości, które dostają się do organizmu człowieka poprzez łańcuch pokarmowy, co potencjalnie stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzi, powodując ototoksyczność i nefrotoksyczność [4].

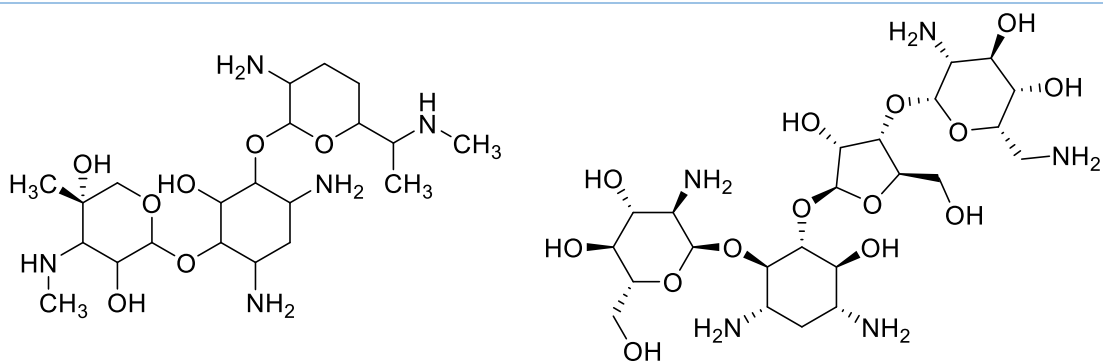
Do aminoglikozydów (**Rysunek 5**) należą m.in: dihydrostreptomycyna, kanamycyna, paromomycyna, gentamycyna, neomycyna, spektynomycyna, streptomycyna.



Dihydrostreptomycyna

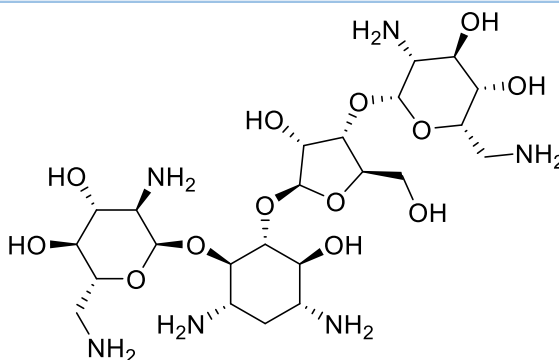


Kanamycyna A

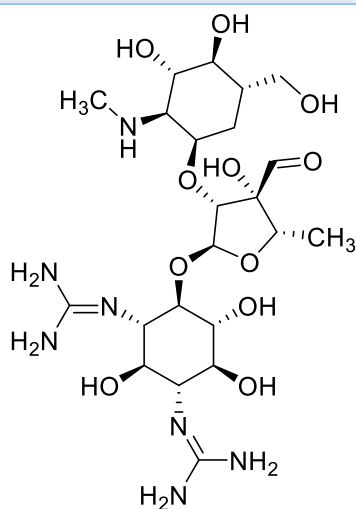


Gentamycyna

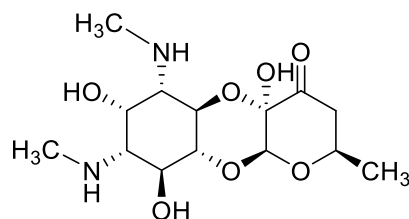
Paromomycyna



Neomycyna



Streptomycyna



Spektynomycyna

Rysunek 5. Przykłady antybiotyków z grupy aminoglikozydów

2.3. Makrolidy

Makrolidy to grupa antybiotyków, która obejmuje naturalne związki wytwarzane przez bakterie (np. erytromycyna produkowana przez *Streptomyces erythraeus*) oraz ich półsyntetyczne pochodne. Charakteryzują się dużymi makrocyklicznymi pierścieniami

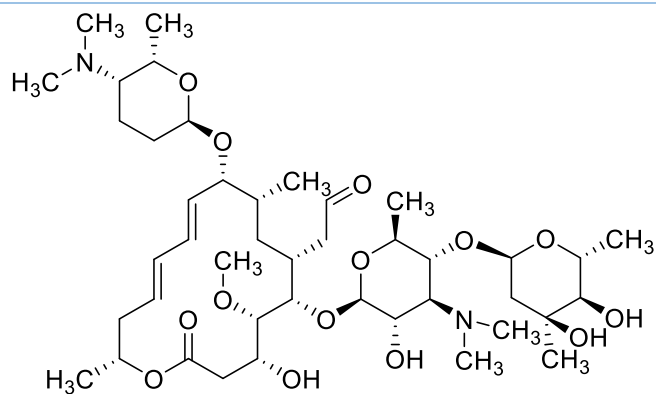
laktonowymi, składającymi się z 14, 15 lub 16 atomów. Do tych pierścieni przyłączone są jeden lub więcej cukrów za pomocą wiązań glikozydowych (**Rysunek 6**). Makrolidy można sklasyfikować na podstawie liczby atomów w pierścieniach makrocyklicznych, pozwala to na lepsze zrozumienie ich różnorodności strukturalnej oraz potencjalnych różnic w mechanizmie działania i spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej [21].

Przykłady dwóch naturalnych makrolidów to erytromycyna, która jest makrolidem o 14-członowym pierścieniu, oraz spiramycyna, będąca makrolidem o 16-członowym pierścieniu. Natomiast tylmikozyne jest półsyntetycznym antybiotykiem makrolidowym o 16-członowym pierścieniu, uzyskiwanym poprzez chemiczną modyfikację desmykozyne, naturalnie występującego makrolidu. Ciekawym przykładem jest tulatromycyna będąca również półsyntetycznym antybiotykiem. Składa się on z mieszaniny makrolidów o różnych rozmiarach pierścieni: około 10% stanowi makrolid o 13-członowym pierścieniu, a 90% makrolid o 15-członowym pierścieniu. Taka unikalna kompozycja zapewnia tulatromycynie szerokie spektrum działania [10].

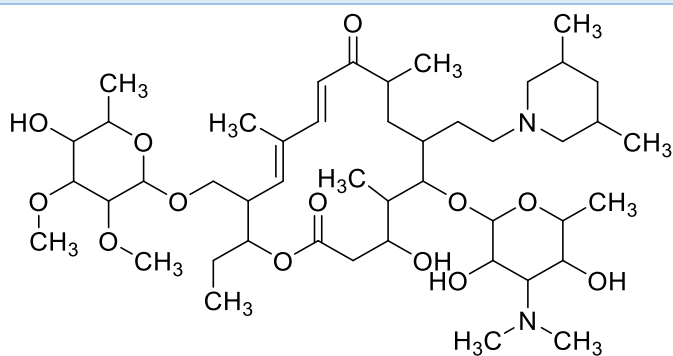
Makrolidy wykazują działanie bakteriostatyczne (hamujące rozwój bakterii), jednak przy wyższych stężeniach mogą działać bakteriobójczo na bardziej podatne mikroorganizmy. Mechanizm ich działania polega na zahamowaniu syntezy białek poprzez wiązanie się z podjednostką 50S rybosomu. To wiązanie blokuje reakcje transpeptydacji lub translokacji, co skutkuje zahamowaniem syntezy białek i w efekcie zatrzymaniem wzrostu komórek [10].

Makrolidy, ze względu na skuteczne wchłanianie przy podawaniu doustnym, wykazują wysoką zdolność przenikania do tkanek oraz szerokie spektrum działania, są powszechnie stosowane jako antybiotyki pierwszego wyboru w leczeniu bakteryjnych zakażeń układu oddechowego [22]. Jest to grupa antybiotyków powszechnie wykorzystywanych również w weterynarii do leczenia infekcji dróg oddechowych oraz chorób jelitowych u zwierząt takich jak bydło, owce, świnie i drób [18]. Antybiotyki makrolidowe są także używane jako stymulatory wzrostu (dodatki do pasz) u zwierząt hodowlanych lub są bezpośrednio dodawane do żywności (mleka) w celu przedłużenia jej trwałości [23].

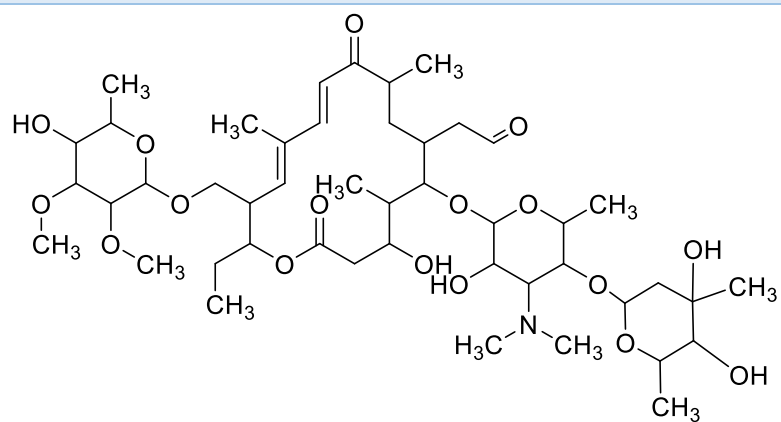
Do makrolidów (**Rysunek 6**) należą m.in: spiramycyna, tylmikozyne, tylozyna, erytromycyna, tulatromycyna, jozamycyna.



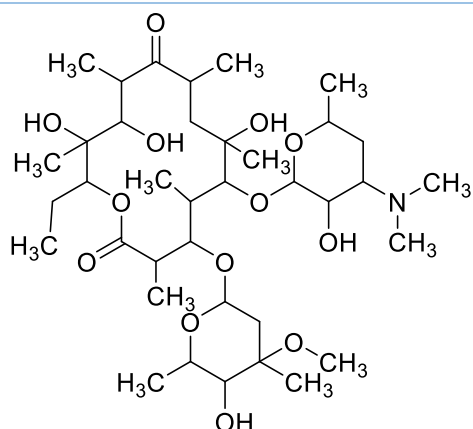
Spiramycyna



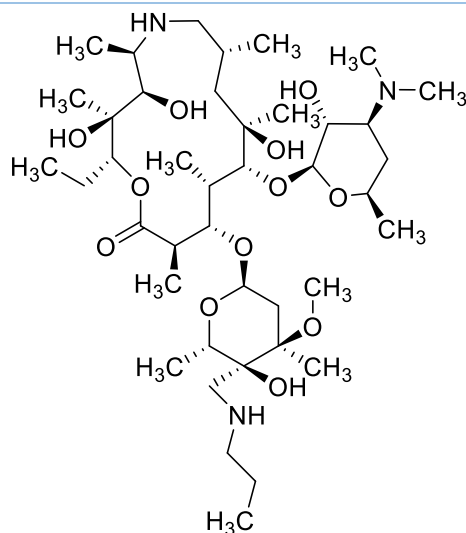
Tylmikozyzna



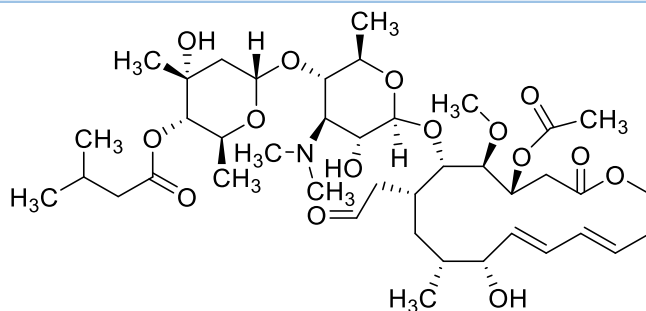
Tylozyzna



Erytromycyna A



Tulatromycyna



Jozamycyna

Rysunek 6. Przykłady antybiotyków z grupy makrolidów

2.4. Sulfonamidy

Sulfonamidy stanowią grupę syntetycznych związków chemicznych, które charakteryzują się działaniem bakteriostatycznym. Cechą charakterystyczną tej grupy antybiotyków jest obecność grupy sulfonamidowej w ich strukturze chemicznej. Grupa funkcyjna sulfonamidowa składa się z grupy sulfonowej połączonej z grupą aminową (**Rysunek 7**) [16].

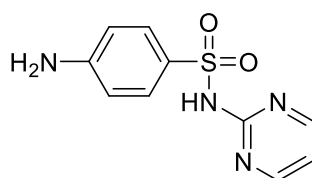
Sulfonamidy są substancjami, które hamują szlak biochemiczny kwasu foliowego w bakteriach, co jest niezbędnym procesem dla ich przetrwania. Działają jako analogi kwasu p-aminobenzoowego (PABA), konkurując z nim w syntezie kwasu foliowego. Szlak ten odpowiada za syntezę kwasów nukleinowych. Poprzez ingerencję w ten proces, sulfonamidy skutecznie hamują wzrost i rozmnażanie się bakterii [24, 25]. Stanowią one ważną klasę antybiotyków o szerokim spektrum działania. Są bardzo skuteczne

przeciwko bakteriom gram-dodatnim oraz niektórym bakteriom gram-ujemnym. Grupa ta wykazuje także aktywność hamującą w stosunku do niektórych grzybów. Sulfonamidy były pierwszymi środkami chemioterapeutycznymi wykorzystywanymi do leczenia zakażeń bakteryjnych u ludzi [25].

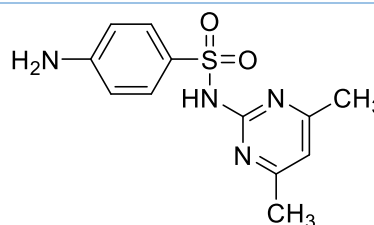
W praktyce weterynaryjnej sulfonamidy są stosowane w leczeniu i zapobieganiu chorobom u zwierząt hodowlanych, domowych oraz ryb [13]. W procesie produkcji żywności sulfonamidy są dodawane do paszy i wody, a także stosowane w formie preparatów doustnych lub infuzji dopochwowych. Z uwagi na ich toksyczne właściwości, jedynie niewielka liczba sulfonamidów jest dopuszczona do stosowania w produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego [10]. Analiza obecności sulfonamidów w żywności wykazuje ich potencjalne działanie rakotwórcze [18].

Sulfonamidy nie są biodegradowalne, co sprawia, że stanowią istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Mogą prowadzić do zwiększenia oporności na antybiotyki oraz powodować choroby układu pokarmowego i oddechowego. Działania niepożądane związane ze stosowaniem leków sulfonamidowych, takie jak biegunka, wymioty, zawroty i bóle głowy, kandydoza i niedobór kwasu foliowego, wskazują na konieczność ostrożnego podejścia do ich stosowania [25]. W dużych dawkach mogą wywoływać poważne reakcje alergiczne, w tym zespół Stevensa-Johnsona i toksyczną nekrolizę naskórka, które należą do najpoważniejszych i najbardziej zagrażających życiu stanów [26].

Do sulfonamidów (**Rysunek 7**) należą m.in: sulfadiazyna, sulfametazyna, sulfametoksypirydazyna, sulfamonometoksyna, sulfadoksyna, sulfachinoksalina, sulfadimetoksyna, sulfametoksazol, sulfatiazol, sulfamerazyna, sulfaguanidyna, sulfacetamid, sulfachloropirydazyna, sulfapirydyna, sulfisoksazol, sulfachloropirazyna.

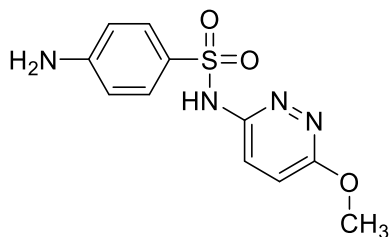


Sulfadiazyna

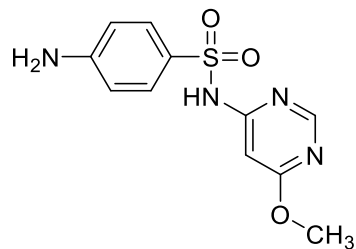


Sulfametazyna

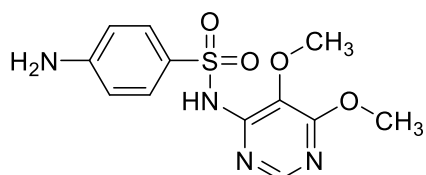
WSTĘP TEORETYCZNY



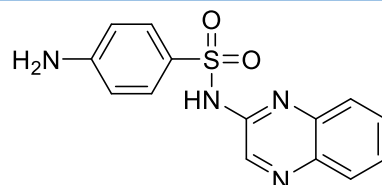
Sulfametoksypirydazyna



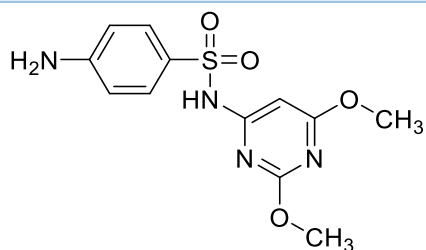
Sulfamonometoksyna



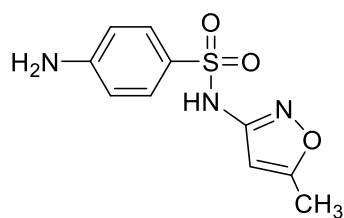
Sulfadoskina



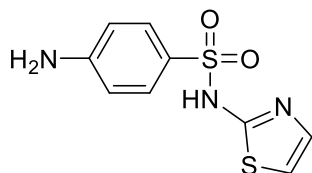
Sulfachinoksalina



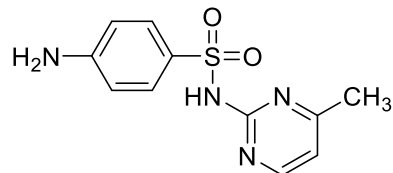
Sulfadimetoksyna



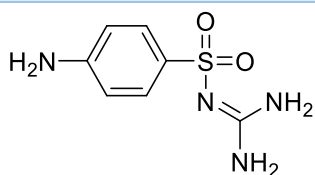
Sulfametoksazol



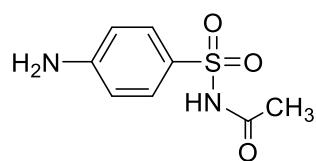
Sulfatiazol



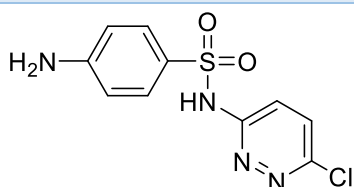
Sulfamerazyna



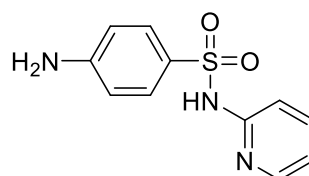
Sulfaguanidyna



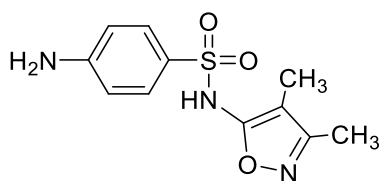
Sulfacetamid



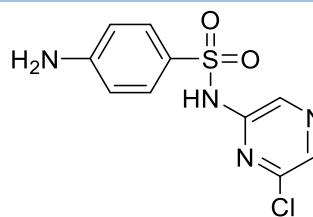
Sulfachloropirydazyna



Sulfapirydyna



Sulfisoksazol



Sulfachloropirazyna

Rysunek 7. Przykłady antybiotyków z grupy sulfonamidów

2.5. Chinolony (fluorochinolony)

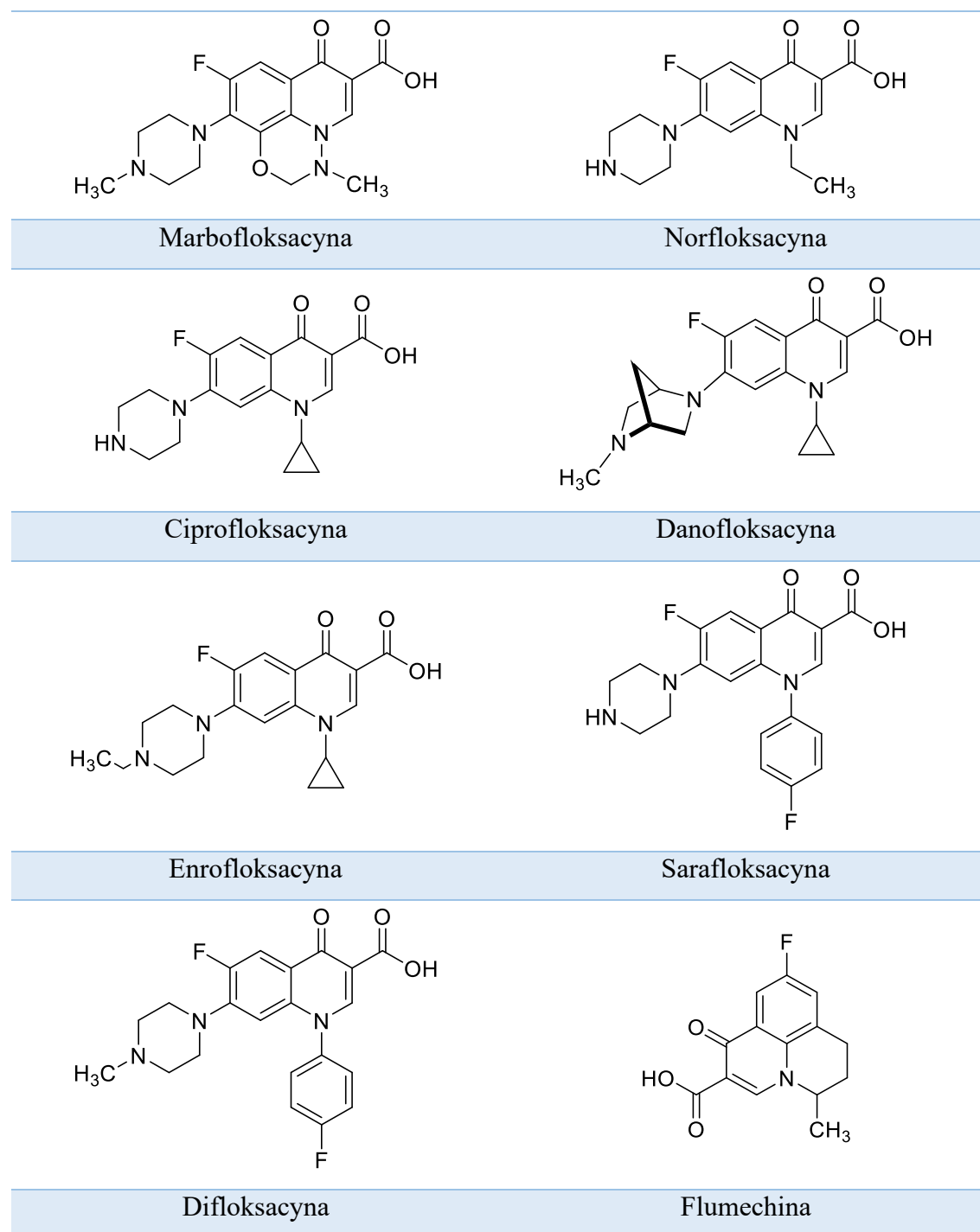
Chinolony to grupa syntetycznych antybiotyków, które charakteryzują się szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego. Podstawowym elementem budowy chemicznej chinolonów jest pierścień chinolinowy, heterocykliczny związek aromatyczny zawierający atom azotu (**Rysunek 8**). Fluorochinolony, które mają atom fluoru w pozycji 6 pierścienia chinolinowego, wykazują zwiększoną skuteczność i rozszerzone spektrum działania przeciwbakteryjnego. Odkrycie kwasu nalidyksowego w 1962 roku zapoczątkowało rozwój klasy antybiotyków chinolonowych. Kwas nalidyksowy został zidentyfikowany jako produkt uboczny podczas badań chemicznych nad nowymi związkami przeciwmalarycznymi. Kolejne modyfikacje strukturalne chinolonów, obejmujące różne pozycje na pierścieniu podstawowym, mają na celu dalsze zwiększenie skuteczności, poszerzenie spektrum działania oraz znaczną poprawę profilu bezpieczeństwa tych związków, co jest niezwykle istotne dla ich klinicznego zastosowania [27].

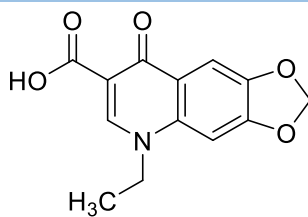
Chinolony mają działanie przeciwbakteryjne zarówno na bakterie gram-dodatnie, jak i gram-ujemne. Jako antybiotyki bakteriobójcze, zakłócają procesy replikacji i transkrypcji DNA w komórkach bakteryjnych, co prowadzi do ich śmierci. Ich działanie polega na selektywnym hamowaniu aktywności enzymów bakteryjnych, takich jak gyraza DNA i topoizomeraza II [28].

Fluorochinolony są główną grupą antybiotyków wykorzystywanych w weterynarii zarówno u zwierząt hodowlanych, jak i domowych. Często stosuje się je w przemyśle hodowlanym oraz w akwakulturze do leczenia schorzeń układu oddechowego, pokarmowego oraz moczowego. Niemniej jednak, ich szerokie zastosowanie budzi niepokój, ponieważ pozostałości tych antybiotyków można znaleźć w żywności, co prowadzi do ich przedostawania się do organizmu człowieka poprzez łańcuch

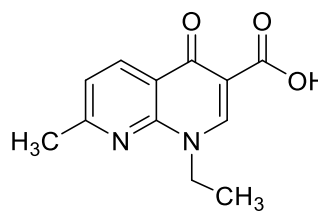
pokarmowy. Mogą one być bezpośrednio toksyczne lub powodować powstawanie patogenów opornych na leczenie, co stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego [13].

Do fluorochinolonów (**Rysunek 8**) należą m.in: marbofloksacyna, norfloksacyna, ciprofloksacyna, danofloksacyna, enrofloksacyna, sarafloksacyna, difloksacyna, flumechina, kwas oksolinowy, kwas nalidyksowy.





Kwas oksolinowy



Kwas nalidyksowy

Rysunek 8. Przykłady antybiotyków z grupy fluorochinolonów

2.6. Tetracykliny

Tetracykliny stanowią dużą grupę naturalnych lub półsyntetycznych antybiotyków o szerokim spektrum działania. Ich skuteczność przeciwko zarówno bakteriom Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym sprawia, że są one wszechstronnie stosowane w leczeniu różnych chorób zakaźnych.

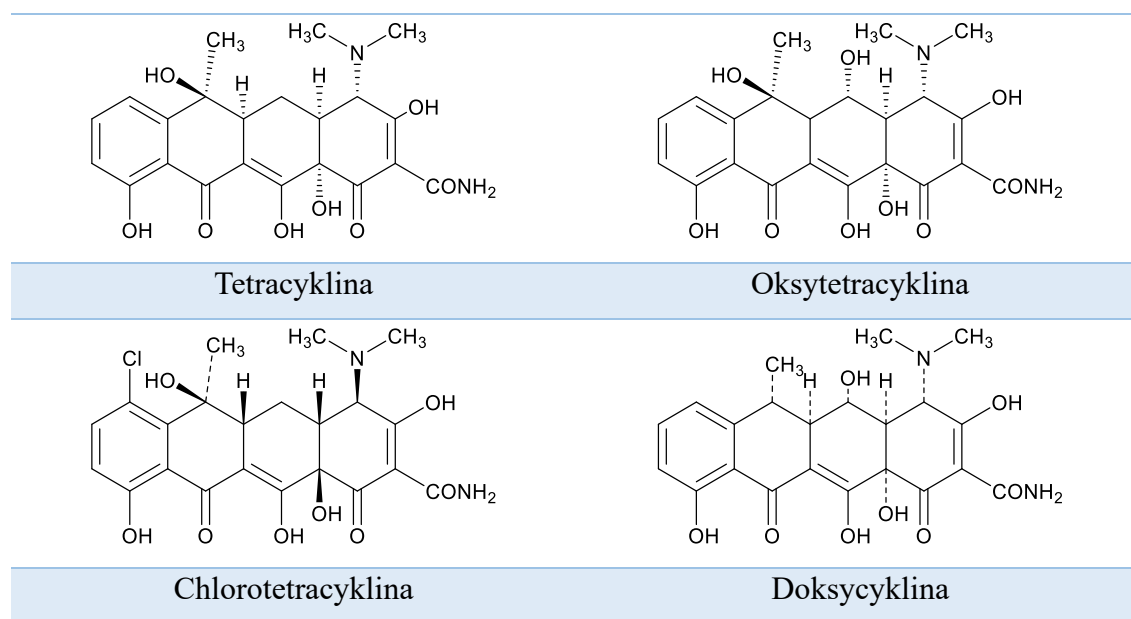
Charakterystyczną cechą antybiotyków tetracyklinowych jest ich unikalna struktura molekularna, która odgrywa kluczową rolę w aktywności przeciwbakteryjnej. Rdzeń strukturalny tych związków składa się z sztywnego szkieletu czterech pierścieni, określanych jako pierścienie A, B, C i D, co stanowi podstawowy element ich szerokiego spektrum działania przeciwbakteryjnego (**Rysunek 9**). Ponadto, tetracykliny zawierają grupy funkcyjne, takie jak grupy hydroksylowe, aminowe lub alkilowe, umiejscowione na górnej i dolnej stronie cząsteczki, które są niezbędne dla ich aktywności [29].

Tetracykliny działają przeciwbakteryjnie przez hamowanie syntezy białek. Wiążąc się z rybosomami bakteryjnymi, zakłócają przyłączanie tRNA do rybosomu, co skutkuje zatrzymaniem procesu syntezy białek [10].

Tetracykliny są wykorzystywane w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej do leczenia oraz zapobiegania zakażeniom bakteryjnym. W przemyśle rolniczym służą jako dodatki do pasz, wspomagając wzrost zwierząt. Skutecznie zwalczają różnorodne mikroorganizmy, w tym riketsje (wewnątrzkomórkowe bakterie) oraz pasożyty amebowe (pierwotniaki wywołujące pełzakowicę) [16].

Intensywne stosowanie tetracyklin przyczyniło się do rozwoju oporności bakteryjnej, co stanowi wyzwanie dla terapii antybiotykowej. Dlatego ważne jest odpowiedzialne stosowanie tetracyklin, aby zminimalizować ryzyko rozwoju oporności i zachować ich skuteczność w leczeniu zakażeń bakteryjnych.

Do tetracyklin (**Rysunek 9**) należą m.in: tetracyklina, oksytetracyklina, chlorotetracyklina, doksycyklina.



Rysunek 9. Przykłady antybiotyków z grupy tetracyklin

2.7. Linkozamidy

Antybiotyki linkozamidowe mają naturalne pochodzenie. Termin linkomycyna pochodzi od miasta Lincoln w Nebrasce, gdzie w próbkach gleby po raz pierwszy wyizolowano *Streptomyces lincolnensis*. Klindamycyna jest natomiast półsyntetyczną pochodną linkomycyny [30].

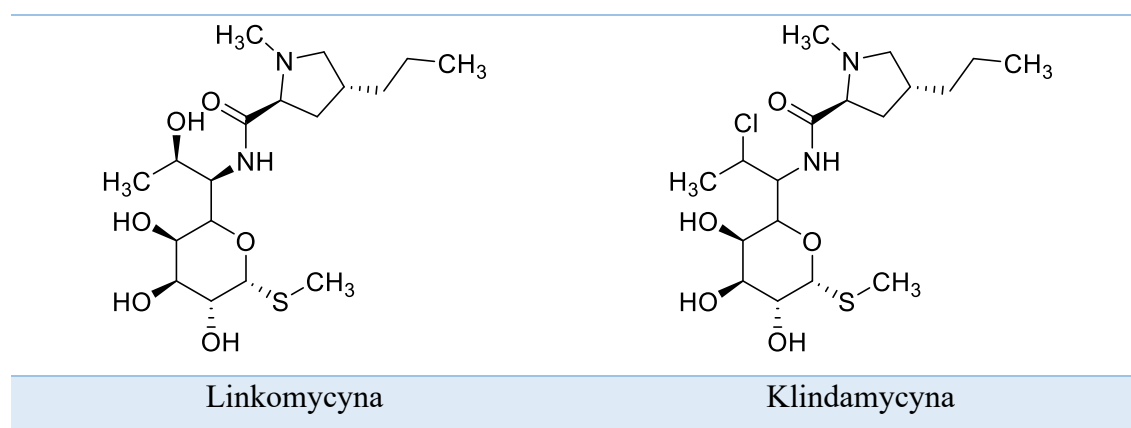
Struktura chemiczna linkozamidów składa się ze specyficznego aminokwasu, trans-N-metylo-4-n-L-proliny (kwas propylhygrynowy), połączonego wiązaniem peptydowym z cukrem 6-amino-6,8-dideoksy-1-tio-D-erytro- α -D-galakopiranozydem (metylotiolinkozamid) [31, 32].

Antybiotyki linkozamidowe hamują syntezę białek poprzez interakcję z podjednostkami 50S rybosomów bakteryjnych, co prowadzi do zahamowania aktywności peptydylotransferazy. W rezultacie dochodzi do zakłócenia procesu włączania aminokwasów do rosnących łańcuchów peptydowych [10]. Linkozamidy, choć należą do niewielkiej grupy antybiotyków, są niezwykle ważne ze względu na ich skuteczność wobec wielu patogenów. Działają one głównie przeciwko gram-dodatnim

ziarniakom (takim jak gronkowce i paciorkowce) oraz niektórym bakteriom wewnątrzkomórkowym (np. *Chlamydia* i *Rickettsia*) [33].

Linkozamidy są istotnymi środkami przeciwbakteryjnymi używanymi do leczenia wielu typowych zakażeń u bydła i świń. W Europie powszechnie stosuje się produkty zawierające te związki w połączeniu z innymi antybiotykami, które dodawane są do paszy. Zarówno leczenie poprzez paszę, jak i stosowanie długodziałających zastrzyków powoduje utrzymywanie się niskich stężeń substancji czynnej przez dłuższy czas. To stwarza potencjalne zagrożenie związane z rozwojem oporności na antybiotyki [34].

Do linkozamidów (**Rysunek 10**) należą m.in.: linkomycyna, klindamycyna.



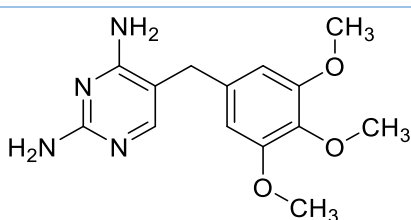
Rysunek 10. Przykłady antybiotyków z grupy linkozamidów

2.8. Diaminopirymidyny

Do antybiotyków diaminopirymidynowych należy trimetoprim (2,4-diamino-5-(3' 4' 5' -trimethoxybenzyl)-pyrimidine (**Rysunek 11**), który został opracowany przez Hitchingsa i jego współpracowników w latach 50 XX wieku [35].

Trimetoprim działa poprzez wiązanie się z enzymem reduktazą dihydrofolianową, co blokuje przemianę kwasu dihydrofoliowego w kwas tetrahydrofoliowy, który jest kluczowym prekursorem w szlaku syntezy tymidyny. Jego niedobór prowadzi do zatrzymania syntezy DNA bakterii [36]. Dzięki znacznie większemu powinowactwu do bakteryjnej reduktazy dihydrofolianowej niż do ludzkiej, trimetoprim skutecznie powstrzymuje wzrost bakterii, minimalizując jednocześnie wpływ na ludzkie komórki [11, 37].

W medycynie trimetoprim stosuje się głównie w połączeniu z sulfonamidem o nazwie sulfametoksazol. Takie połączenie jest dostępne na rynku farmaceutycznym pod różnymi nazwami handlowymi np. Bactrim. Od wprowadzenia połączenia tych dwóch antybiotyków do praktyki klinicznej w 1968 roku, lek ten jest szeroko stosowany w leczeniu różnych infekcji. Ta kombinacja antybiotyków działa bakteriostatycznie poprzez synergistyczne hamowanie dwóch kluczowych etapów w syntezie kwasów nukleinowych bakterii. Trimetoprim hamuje reduktazę dihydrofolianową, a sulfametoksazol blokuje syntetazę dihydropteroanianową, co skutecznie eliminuje mikroorganizmy [35].



Trimetoprim

Rysunek 11. Trimetoprim - antybiotyk z grupy diaminopirymidyn

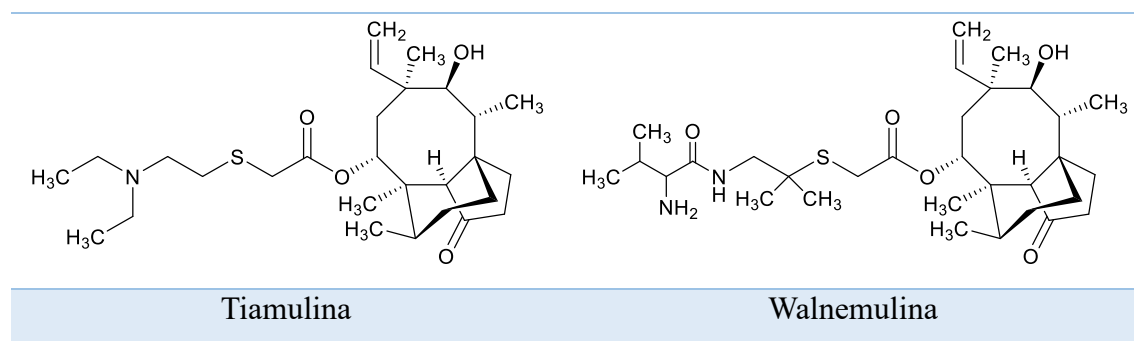
2.9. Pleuromutyliny

Pleuromutiliny to półsyntetyczne pochodne trójcyklicznego diterpenoidu, znanego jako pleuromutilina, której nazwa pochodzi od grzyba *Pleurotus mutilus*, produkującego ten związek [38]. Pochodnymi pleuromutyliny są tiamulina i walnemulina (**Rysunek 12**), które są stosowane wyłącznie w weterynarii. Tiamulina została dopuszczona do stosowania w medycynie weterynaryjnej w 1979 roku, natomiast walnemulina w 1999 roku [39].

Jest to klasa antybiotyków, które selektywnie hamują syntezę białek bakteryjnych, poprzez wiązanie się z określonymi miejscami na podjednostce 50S rybosomu. Dzięki temu procesowi synteza białek bakteryjnych zostaje zahamowana, co skutecznie hamuje wzrost i rozmnażanie się bakterii [40].

Tiamulina i walnemulina zostały wprowadzone w medycynie weterynaryjnej do leczenia infekcji płucnych i jelitowych wywołanych przez *Mycoplasma spp.*, *Brachyspira spp.* i *Lawsonia intracellularis* u świń, drobiu i królików. Mimo że pleuromutiliny są

stosowane w weterynarii przez ponad trzy dekady, rozwój oporności na te antybiotyki był rzadkością. Można to przypisać kilku czynnikom, w tym specyficznemu mechanizmowi działania tych związków oraz faktowi, że nie były one używane do zwiększania produkcji zwierząt hodowlanych, na przykład jako stymulatory wzrostu lub do poprawy wydajności pasz, w przeciwieństwie do innych antybiotyków, takich jak tetracykliny, penicyliny czy sulfonamidy [38, 41].



Rysunek 12. Przykłady antybiotyków z grupy pleuromutylin

3. Ekstrakcja, oczyszczanie i techniki analizy antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego

W celu uzyskania miarodajnych wyników, konieczne jest przeprowadzenie ekstrakcji i oczyszczenia analitów z badanej próbki. Są to kluczowe etapy w oznaczaniu antybiotyków w żywności, które mogą być źródłem błędów, a także stanowić przeszkodę dla rozwoju metod [42]. Wybór odpowiedniej techniki ekstrakcji i metod oczyszczania zależy od rodzaju analitów, matrycy oraz wymagań stawianych przez wybraną technikę analityczną.

Kolejnym etapem jest wybór odpowiedniej techniki analitycznej. Wszystkie te etapy analizy są niezbędne dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności, umożliwiają precyzyjne określenie stężenia leków w żywności oraz potwierdzenie, czy ich pozostałość jest zgodna z obowiązującymi normatywami. Wszystko to razem stanowi podstawę monitorowania pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego.

3.1. Ekstrakcja i oczyszczanie

Złożoność matryc próbek żywności oraz różnorodne właściwości fizykochemiczne substancji przeciwbakteryjnych (rozpuszczalność, stabilność, polarność), stanowią ogromne wyzwanie dla opracowania uniwersalnej metody analitycznej. Aby usunąć substancje zakłócające i zminimalizować wpływ matrycy żywności na dokładność analizy, stosuje się różne techniki ekstrakcji oraz oczyszczania. Muszą one być dostosowane do właściwości antybiotyków oraz rodzaju badanej żywności, co pozwala na uzyskanie precyzyjnych i miarodajnych wyników [43].

W analizie pozostałości antybiotyków w żywności stosuje się różne metody ekstrakcji, z których każda posiada swoje specyficzne zalety i wady. Najczęściej wykorzystywane metody zostaną omówione w dalszej części pracy.

3.1.1. Ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE)

Ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE) jest jedną z najstarszych technik przygotowywania próbek i nadal jest często stosowana w analizie próbek biologicznych. LLE polega na przenoszeniu analitu rozpuszczonego w fazie wodnej do drugiej fazy ciekłej (rozpuszczalnika niemieszanego się z wodą), wykorzystując współczynnik podziału oktanol-woda (stosunek stężeń tej substancji w oktanolu do jej stężenia w wodzie w stanie równowagi). Metoda ta ma jednak kilka wad. Może prowadzić do tworzenia się emulsji. Wymaga także użycia dużych objętości próbek oraz toksycznych rozpuszczalników organicznych, co prowadzi do produkcji dużych ilości zanieczyszczeń środowiskowych i sprawia, że LLE jest kosztowna, czasochłonna i szkodliwa dla środowiska. Ponadto, metoda ta nie nadaje się do związków hydrofilowych [44, 45].

Często używanymi rozpuszczalnikami stosowanymi do ekstrakcji są: acetonitryl (MeCN), metanol (MeOH) oraz octan etylu. Acetonitryl zapewnia wysokie odzyski, a jednocześnie charakteryzuje się niskimi stężeniami współekstrahowanych składników matrycy. Dodatkowo denaturuje białka i inaktywuje enzymy. Z kolei stosowanie metanolu i octanu etylu prowadzi do ekstrakcji większej ilości dodatkowych składników matrycy. W analizie wieloskładnikowej zawsze istnieje konieczność znalezienia kompromisu między stopniem odzysku a czystością ekstraktów próbek [46, 47].

Na przestrzeni lat powstało wiele kluczowych metod ekstrakcji antybiotyków z próbek biologicznych z zastosowaniem różnych rozpuszczalników. Poniżej przedstawiono wybrane przykłady zastosowań techniki LLE w różnych badaniach naukowych.

Han i współpracownicy [48] zastosowali ekstrakcję acetonitrylem do jednoczesnego oznaczania 38 pozostałości antybiotyków weterynaryjnych w surowym mleku przy użyciu techniki UPLC–MS/MS. Wśród analizowanych związków znalazły się β -laktamy, fluorochinolony, tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy, trimetoprim oraz linkomycyna. Podobne podejścia z wykorzystaniem acetonitrylu przy ekstrakcji zastosowano w innych badaniach m.in. do wykrywania różnych grup antybiotyków (makrolidów, β -laktamów, sulfonamidów, aminoglikozydów, tetracyklin, linkozamidów, diaminopirymidyn) w mleku [49-51] oraz mięśniach [52, 53], β -laktamów w mleku [54], makrolidów w jajach [55], makrolidów i linkozamidów w mleku i tkance mięśniowej [56].

Kolejnym przykładem może być opracowana przez Bortolotte i współpracowników [57] prosta, wydajna i szybka metoda ekstrakcji 25 leków przeciwbakteryjnych (β -laktamów, chinolonów, makrolidów, sulfonamidów, trimetoprimu, tetracyklin oraz amfenikoli) z wykorzystaniem acetonitrylu i roztworu EDTA (kwas (etylenodiamino)tetraoctowy) 0,1 M jako rozpuszczalników do ekstrakcji. Podobną metodę, wykorzystującą acetonitryl i EDTA, zastosował również Desmarchelier z współpracownikami [58] do ekstrakcji tetracyklin i ich epimerów z różnych matryc, takich jak mięso, ryby i owoce morza, różne produkty mleczne, mleko modyfikowane oraz tłuszcz.

W przypadku ekstrakcji β -laktamów zastosowanie metanolu może powodować degradację tych antybiotyków, a acetonitryl nie jest efektywnym rozpuszczalnikiem do ich ekstrakcji metodą LLE [59, 60]. Dlatego Rocco oraz jego współpracownicy [59] odkryli, że użycie mieszanki wody i acetonitrylu oraz dimetylosulfotlenku (DMSO) może być skuteczną alternatywą dla rozwiązania tego problemu. Tym sposobem udowodnili, że można skutecznie ekstrahować jednocześnie 30 antybiotyków β -laktamowych z mięśni wołowych (odzyski wynosiły od 69% do 143%).

Sun i współpracownicy [61] opracowali metodę ekstrakcji amoksycyliny i ampicyliny z jaj. W swojej procedurze zastosowali LLE przy użyciu acetonitrylu oraz dichlorometanu. Dodatkowo, użyli ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami.

Granelli i inni [62] opracowali metodę, w której próbki (tkanka mięśniowa) były ekstrahowane techniką LLE z wykorzystaniem 70% metanolu. Metoda ta obejmowała dziewiętnaście związków z pięciu różnych klas antybiotyków: tetracyklin, sulfonamidów, chinolonów, β -laktamów oraz makrolidów.

Metoda LLE może również obejmować związki jonowe, które mogą być ekstrahowane przez niepolarne rozpuszczalniki organiczne za pomocą techniki par jonowych. Technika ta polega na przekształcaniu dodatnio naładowanych substancji w obojętne, niepolarne związki w obecności anionów organicznych. Podobnie, ujemnie naładowane substancje mogą być przekształcane w neutralne związki w obecności kationów organicznych. Ten proces sprawia, że związki jonowe rozpuszczają się w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, co pozwala na ich skuteczną ekstrakcję z roztworów wodnych [63].

Przykładem zastosowania tej techniki jest ekstrakcja polarnych aminoglikozydów, jak w badaniu Abbasi i współpracowników [64], którzy wyekstrahowali dihydrostreptomycynę z nerek za pomocą roztworu kwasu 1-heksanosulfonowego. Technika ta okazała się skuteczna, co podkreśla jej potencjalne zastosowanie w analizie chemicznej.

Kolejnym przykładem jest analiza aminoglikozydów z tkanki mięśniowej cielej, którą przeprowadzili Babin i Fortier [65], wykorzystując LLE z kwasem trichlorooctowym (TCA) do ekstrakcji tych związków. Podobne podejścia z wykorzystaniem TCA przy ekstrakcji zastosowano w innych badaniach m.in.: do wykrywania różnych grup antybiotyków (aminoglikozydów, tetracyklin, linkozamidów, fluorochinolonów) w mleku [49], aminoglikozydów w mleku i w mięśniach [66], fluorochinolonów, aminoglikozydów, β -laktamów, makrolidów, sulfonamidów i tetracyklin w rybach [67].

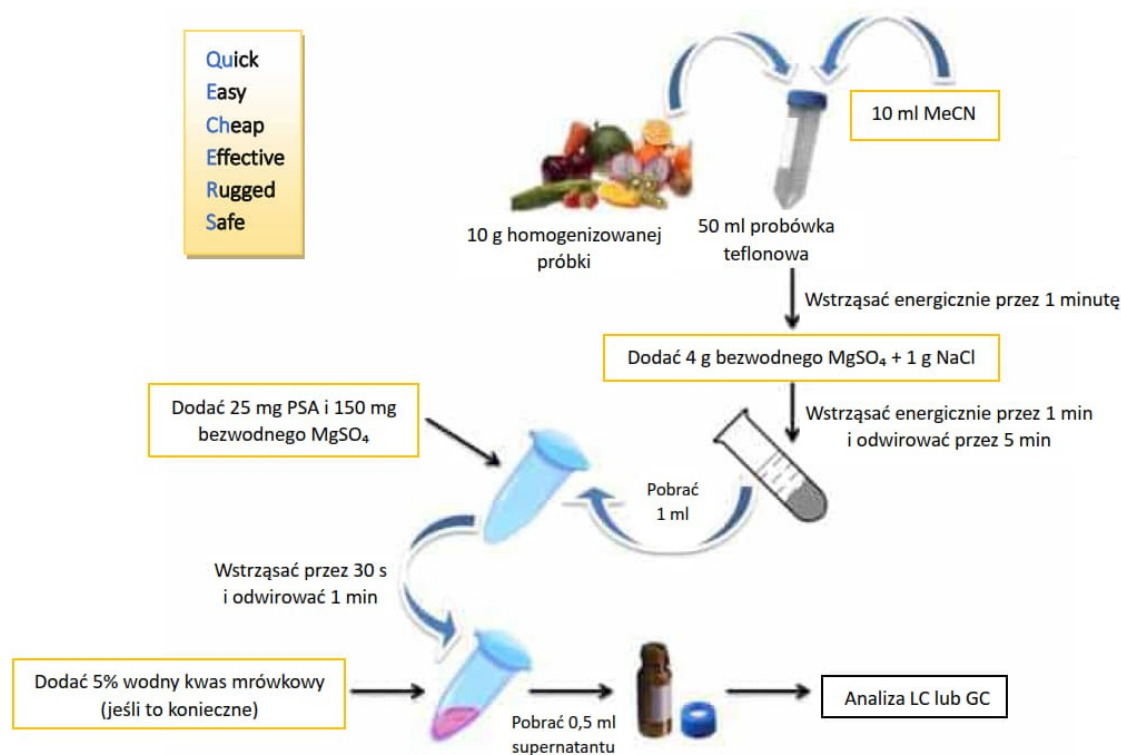
3.1.2. QuEChERS

Metoda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – szybka, łatwa, tania, skuteczna, odporna i bezpieczna) opiera się na technikach ekstrakcji ciecz-

ciecz i jest nowoczesnym podejściem do przygotowywania próbek, powszechnie stosowanym w analizie pozostałości pestycydów w żywności [68, 69]. Metoda ta została po raz pierwszy zaprezentowana w 2002 roku przez Anastassiadesa na Europejskim Warsztacie ds. Pozostałości Pestycydów w Rzymie [70], a opublikowana w 2003 roku [71]. Na początku była stosowana głównie do wykrywania pozostałości pestycydów w owocach i warzywach [69]. Dzięki swoim zaletom, które mają cechy „zielonej chemii”, metoda QuEChERS szybko się rozwinęła, obejmując ekstrakcję różnych grup zanieczyszczeń, takich jak m.in. antybiotyki, z różnych matryc i stanowi ekologiczną alternatywę dla tradycyjnych etapów przygotowywania próbek. Metoda ta pozwala zminimalizować zagrożenia dla środowiska i zdrowia pracowników na wszystkich etapach analizy chemicznej, oferując jednocześnie szybkie i energooszczędne rozwiązania bez spadku wydajności [72].

Metoda QuEChERS składa się z dwóch głównych etapów: ekstrakcji oraz oczyszczania. W pierwszym etapie próbkę wytrząsa się z acetonitrylem z dodatkiem soli, najczęściej bezwodnego siarczanu magnezu ($MgSO_4$) i bezwodnego chlorku sodu ($NaCl$), aby wspomóc oddzielenie wody od fazy organicznej. Następnie faza organiczna jest oczyszczana za pomocą techniki ekstrakcji do fazy stałej w układzie dyspersyjnym (d-SPE). W tej metodzie używa się połączenia sorbentów PSA (amina pierwszorzędowa i drugorzędowa) oraz C18 (krzemionka oktadecylowa), co pozwala na usunięcie kwasów tłuszczowych i innych składników oraz bezwodny $MgSO_4$ stosowany do zredukowania pozostałej w ekstrakcie wody. Uzyskane ekstrakty są gotowe do analizy instrumentalnej za pomocą chromatografii cieczowej (LC) i gazowej (GC) połączonych ze spektrometrią mas (MS) [73-75]. Schemat kluczowych etapów oryginalnej techniki QuEChERS został przedstawiony na **Rysunek 13**.

Kluczowe parametry tej metody mogą być łatwo modyfikowane i optymalizowane w celu poprawy wydajności ekstrakcji. W zależności od specyfiki badanych próbek, modyfikacji mogą podlegać takie czynniki jak: np. rozpuszczalniki (rodzaj i ilość), warunki ekstrakcji (ilość i rodzaj soli), rodzaj sorbentów, warunki oczyszczania (stosunek sorbentów do ekstraktu) [76]. Dzięki łatwości modyfikacji i zastosowania różnych warunków analizy, metoda QuEChERS może być z powodzeniem wykorzystywana do wykrywania pozostałości antybiotyków w różnych matrycach odzwierzęcych. Oto kilka przykładów jej zastosowania.



Rysunek 13. Schemat kluczowych etapów oryginalnej techniki QuEChERS

Stubbings i Bigwood [77] opracowali metodę oznaczania pozostałości sulfonamidów i fluorochinolonów w mięśniach kurczaka. Do ekstrakcji zastosowali 1% kwas octowy w acetonitrylu oraz bezwodny siarczan sodu, co poprawiło wydajność ekstrakcji fluorochinolonów. Ekstrakty były następnie oczyszczane metodą dSPE przy użyciu sorbentu Bondesil NH_2 .

Podobnie, Aguilera-Luiz i in. [78] opracowali metodę ekstrakcji sulfonamidów, chinolonów, makrolidów i tetracyklin z próbek mleka za pomocą acetonitrylu z 1% kwasem octowym, z dodatkiem EDTA, aby zwiększyć odzysk makrolidów i tetracyklin. Ekstrakty były analizowane bez dalszego oczyszczania. Analogiczną metodę ekstrakcji tych grup antybiotyków z mleka opracował także Vidal i in. [79], natomiast Parab i Amritkar [80] zoptymalizowali ją dla 10 sulfonamidów.

Jednak już do analizy miodu i mleczka pszczelego [81], gdzie ekstrakcję również przeprowadzono przy użyciu zakwaszonego acetonitrylu, EDTA, Na_2SO_4 i NaCl, konieczne było dodatkowe oczyszczanie ekstraktów za pomocą sorbentów PSA i C18 w celu absorpcji cukrów, kwasów organicznych i pigmentów z ekstrahowanych próbek. Dzięki zastosowaniu takiej metody udało się przeanalizować takie grupy antybiotyków jak: sulfonamidy, fluorochinolony, makrolidy, tetracykliny i trimetoprim. Podobnie,

w badaniach dotyczących krewetek [82], w których analizowano pozostałości sulfonamidów i trimetoprimu, zastosowano MeCN z kwasem octowym oraz te same sole Na_2SO_4 i NaCl , a do oczyszczania użyto wyłącznie sorbentu PSA.

Do wyekstrahowania antybiotyków często stosuje się również acetonitryl z kwasem mrówkowym, co pozwala na skuteczne wyizolowanie badanych substancji z różnych matryc. Na przykład Lombardo-Agüi i in. [83] opracowali metodę ekstrakcji fluorochinolonów z mleka wykorzystując MeCN z dodatkiem 5% kwasu mrówkowego oraz buforu NaH_2PO_4 , a następnie oczyszczając ekstrakty przy użyciu zestawu do ekstrakcji Agilent SampliQ EN QuEChERS oraz sorbentów C18 oraz MgSO_4 . Natomiast, Chen i in. [84] do oznaczenia 16 β -laktamów w mięśniach kurczaka zastosowali MeCN z 0,1% kwasem mrówkowym, a oczyszczanie przeprowadzili za pomocą C18, PSA oraz bezwodnego MgSO_4 . W innym przypadku, do analizy fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, aminoglikozydów, makrolidów i linkozamidów w jajach i mleku, zastosowano MeCN z 3,35% kwasem mrówkowym, Na_2SO_4 , NaCl i octanem sodu, a oczyszczanie przeprowadzono z użyciem Na_2SO_4 , PSA i C18 [85]. Ponadto, MeCN z 5% kwasem mrówkowym, MgSO_4 i octanem sodu wykorzystano do ekstrakcji fluorochinolonów, makrolidów, sulfonamidów i trimetoprimu z ryb, a oczyszczanie przeprowadzono przy użyciu sorbentów C18 i MgSO_4 [86]. W przypadku mięśni (od bydła, świń, kurczaków), jajek oraz mleka do ekstrakcji tetracyklin, β -laktamów i makrolidów, Nakajima i in. uzyskali najlepszą wydajność stosując Na_2EDTA oraz roztwór acetonitrylu z 5% kwasem mrówkowym i metanolem (8:2), bez konieczności oczyszczania ekstraktu [87].

Kolejnym wariantem metody QuEChERS jest zastosowanie mieszaniny acetonitrylu i wody do ekstrakcji antybiotyków. Na przykład, w analizie cefalosporyn z mięsa bydła zastosowano mieszaninę $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (80:20, v/v), a po ekstrakcji oczyszczanie przeprowadzono za pomocą sorbentów PSA i C18 oraz MgSO_4 [88]. Podobną technikę zastosowano do ekstrakcji różnych grup antybiotyków, takich jak tetracykliny, aminoglikozydy, fluorochinolony, linkozamidy, sulfonamidy oraz β -laktamy, z ryb (tilapia), gdzie ekstrahentem była mieszanina MeCN z H_2O (84:16) z dodatkiem EDTA i 1% kwasu octowego. Po tym etapie, ekstrakty oczyszczano za pomocą PSA, MgSO_4 oraz Z-Sep+ (tlenek cyrkonu) [89]. Podobna procedura została zastosowana również do analizy 34 sulfonamidów i ich metabolitów w łososiu [90].

W literaturze można również znaleźć przykłady zastosowania samego acetonitrylu do ekstrakcji różnych antybiotyków z różnych matryc. Na przykład, w surowym mleku bydlęcym analizowano fluorochinolony, makrolidy, linkozamidy, tetracykliny, β -laktamy, sulfonamidy oraz trimetoprim, stosując ekstrakcję za pomocą MeCN, a następnie oczyszczanie przy użyciu sorbentu C18 [91]. W przypadku ryb ekstrakcję pięciu tetracyklin również przeprowadzono przy użyciu MeCN, ale z dodatkiem siarczanu amonu, a oczyszczanie przeprowadzono również za pomocą sorbentu C18 [92]. Kolejnym przykładem jest analiza 23 β -laktamów w jajach, surowym mleku, mleku modyfikowanym, a także produktach mięsnych i rybnych, w tym żywności dla niemowląt, gdzie zastosowano ekstrakcję za pomocą MeCN z dodatkiem Na_2SO_4 i NaCl oraz oczyszczanie z użyciem Na_2SO_4 i C18 [93].

Podsumowując, elastyczność metody QuEChERS (umożliwiająca modyfikację etapów ekstrakcji i oczyszczania), pozwala na skuteczne badanie różnych antybiotyków w wielu matrycach. Dzięki temu metoda ta stale się rozwija i zyskuje na znaczeniu w analizie pozostałości antybiotyków.

3.1.3. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE, z ang. Solid Phase Extraction) jest jedną z kluczowych technik przygotowania próbek w chemii analitycznej. Szczególnie przydatna w analizie śladowych ilości substancji, takich jak farmaceutyki, pestycydy czy innych zanieczyszczeniach organicznych w różnych matrycach [63].

SPE to metoda izolacji i koncentracji analitów z cieczy lub ekstraktów próbek stałych, polegająca na sorpcji analitów na fazie stałej, a następnie ich elucji. SPE umożliwia wzbogacanie śladowych ilości, oczyszczanie próbki oraz wymianę medium. Początkowo opracowana jako alternatywa dla ekstrakcji ciecz-ciecz, metoda ta wyróżnia się niskimi kosztami, krótszym czasem analizy, dobrą selektywnością dzięki dużemu wyborowi stałych sorbentów oraz mniejszym zużyciem rozpuszczalników. SPE jest również łatwa do automatyzacji [94, 95].

Techniki SPE charakteryzują się pewnymi ograniczeniami, takimi jak mniej stabilne właściwości sorpcyjne w porównaniu z rozpuszczalnikami, zmienność sorbentów z chemicznie modyfikowanymi powierzchniami (różnice między kolejnymi partiami sorbentu) oraz wyższy poziom zanieczyszczeń wynikających z materiałów

używanych w produkcji. Dodatkowo, SPE może być podatna na zatykanie złoza przez zawiesiny obecne w próbce [94].

Na początku lat 80 wprowadzenie jednorazowych wkładów zawierających sorbenty chemicznie związane na bazie krzemionki zrewolucjonizowało technikę SPE, czyniąc ją szeroko stosowaną w laboratoriach. Typowa kolumnienka SPE (**Rysunek 14**), ma formę krótkiej kolumny, przypominającej otwarty cylinder strzykawki, wypełnionej sorbentem o nominalnej wielkości cząstek od 20 do 60 μm . Sorbent ten jest umieszczony pomiędzy dwoma filtrami (porowatymi plastikowymi lub metalowymi sitami), które zapobiegają przedostawaniu się drobnych cząstek do próbki. Obecnie dostępne są liczne sorbenty, zarówno selektywne, jak i nieselektywne, co umożliwia szerokie zastosowanie techniki SPE w różnych dziedzinach [96]. Najczęściej stosowane są wkłady SPE zawierające 500 mg materiału w strzykawkach o pojemności 3 lub 5 ml, które służą do oczyszczania dużych objętości próbek środowiskowych, z których przewiduje się zatrzymanie około 25 mg analitów [97]. **Rysunek 15** przedstawia zdjęcie przykładowego zestawu do SPE.



Rysunek 14. Budowa pojedynczej kolumnienki SPE



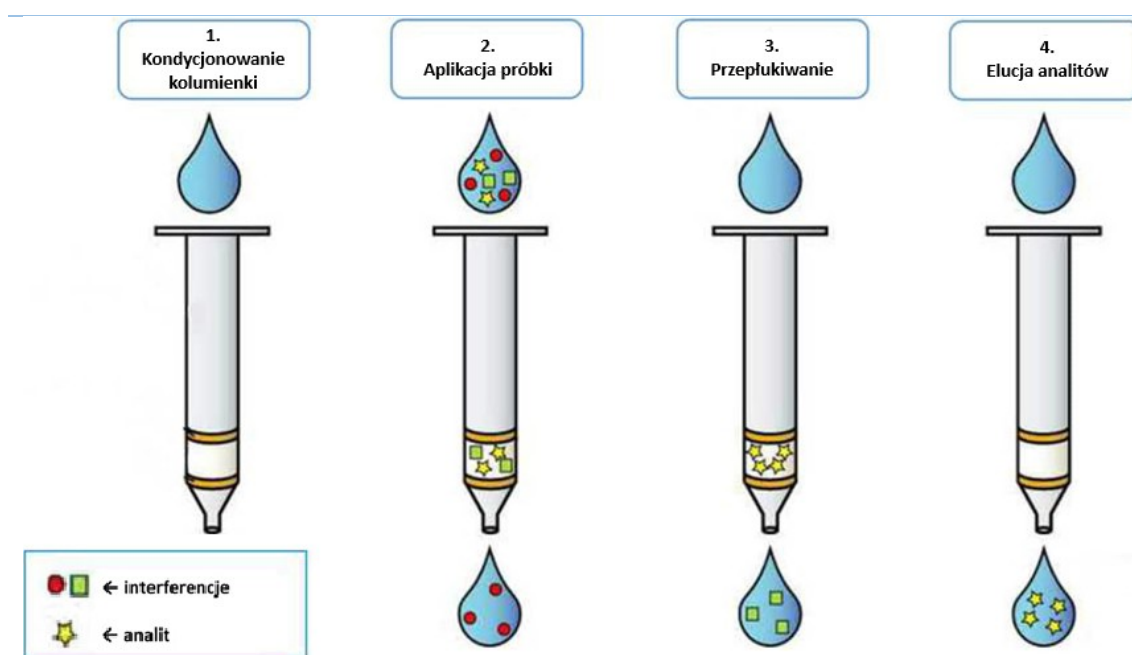
Rysunek 15. Typowy aparat stosowany podczas ekstrakcji do fazy stałej

Proces SPE składa się z kilku etapów (**Rysunek 16**) [98, 99]:

- Kondycjonowanie sorbentu – Przed rozpoczęciem ekstrakcji sorbent jest kondycjonowany odpowiednim rozpuszczalnikiem, aby zapewnić optymalne warunki sorpcji analitów. Proces ten pozwala na zwilżenie materiału oraz usunięcie zanieczyszczeń i powietrza z kolumny. Rozpuszczalnik kondycjonujący dobiera się w zależności od rodzaju sorbentu; dla sorbentów odwróconych faz, takich jak krzemionka związana z oktadecylem, często stosuje się metanol, a następnie wodę lub bufor. Ważne jest, aby sorbent nie wysychał między kondycjonowaniem a aplikacją próbki, ponieważ może to obniżyć skuteczność zatrzymywania analitów. W przypadku wyschnięcia sorbentu konieczne jest jego ponowne kondycjonowanie.
- Aplikacja próbki – Próbkę rozpuszczoną w odpowiednim rozpuszczalniku jest wprowadzana do kolumny SPE, gdzie anality sorbują się na powierzchni stałego sorbentu. W zależności od systemu objętości mogą wynosić od 1 ml do 1 l. Próbkę nanosi się grawitacyjnie, przy pomocy pompy, podciśnienia lub automatycznie. Przepływ powinien być wystarczająco wolny, aby skutecznie zatrzymać anality, ale nie zbyt wolny, aby uniknąć długiego czasu trwania procesu. Podczas tego etapu

część składników matrycy może przechodzić przez sorbent, co umożliwia wstępne oczyszczenie próbki.

- Przepłukiwanie – Po etapie sorpcji, kolumnienka jest przepłukiwana rozpuszczalnikiem o niskiej sile eluowania w celu usunięcia niepożądanych substancji i interferentów pochodzących z matrycy. Dzięki temu na sorbencie pozostają jedynie anality lub substancje o podobnych właściwościach, co zwiększa selektywność metody i czystość analizowanej frakcji. Następnie, resztki rozpuszczalnika przemywającego usuwa się przez suszenie strumieniem powietrza.
- Elucja analitów – Ostatni etap polega na desorpcji analitów z sorbentu za pomocą odpowiednio dobranego rozpuszczalnika. Proces ten umożliwia wypłukanie analitów z kolumnienki do dalszej analizy, jednocześnie pozostawiając zatrzymane składniki matrycy na sorbencie. Objętość używanego do elucji rozpuszczalnika powinna być tak dobrana, aby zapewnić wysokie odzyski analitów przy minimalnym rozcieńczeniu. Należy również odpowiednio dostosować prędkość przepływu, aby zapewnić efektywną elucję. W celu uzyskania lepszych rezultatów zaleca się podzielenie rozpuszczalnika na dwie części i umożliwienie jego wchłonięcia przez materiał sorpcyjny przed rozpoczęciem elucji.



Rysunek 16. Etapy procesu ekstrakcji do fazy stałej

Kluczowym elementem w metodzie SPE jest wybór sorbentu, ponieważ to od niego zależą główne parametry, takie jak selektywność czy powinowactwo. Efektywność procesu SPE w dużej mierze zależy od odpowiedniego dopasowania sorbentu do charakterystyki analizowanego związku oraz matrycy, w której się on znajduje. Decyzja o wyborze sorbentu powinna być oparta na właściwościach fizykochemicznych analitów oraz specyfice matrycy próbki, które definiują charakter oddziaływań zachodzących między analitem a sorbentem [46]. Istotną rolę podczas ekstrakcji analitów z próbek odgrywają różne mechanizmy, takie jak siły dyspersyjne (van der Waalsa), wiązania wodorowe, interakcje dipol-dipol czy oddziaływania elektrostatyczne (wymiana jonowa) [100].

Do najczęściej stosowanych sorbentów, które oferuje metoda SPE, należą krzemionka, sorbenty polimerowe oraz nowoczesne sorbenty. Metoda ta oferuje szeroki wybór sorbentów, w tym [101]:

- sorbenty stosowane w fazie odwróconej (RP) – **Tabela 1**
- sorbenty noszące nazwę faz normalnych (NP) – **Tabela 2**
- sorbenty jonowymienne (IE) – **Tabela 3**
- sorbenty typu mixed-mode
- funkcjonalizowane żywice polimerowe – **Tabela 4**
- immunosorbenty (IMS)
- polimery odciskane molekularnie (MIP).

Tabela 1. Przykłady sorbentów stosowanych w fazie odwróconej w SPE [97, 101]

FAZA ODWRÓCONA (RP)					
Rodzaj sorbentu	Struktura chemiczna	Docelowy analit	Roztwory Kondycjonowanie	Przemywanie	Eluowanie
Oktadecyl (C ₁₈)	-(CH ₂) ₁₇ CH ₃	Słabo niepolarny Umiarkowanie niepolarny	MeOH/H ₂ O MeCN/H ₂ O (o odpowiednim pH)	Polarne rozpuszczalniki o odpowiednim pH	Silnie niepolarne rozpuszczalniki (heksan, chloroform)
Oktyl (C ₈)	-(CH ₂) ₇ CH ₃	Niepolarny			oraz rozpuszczalniki od polarnych do umiarkowanie polarnych
Etyl (C ₂)	-CH ₂ CH ₃				
Cykloheksyl	-CH ₂ CH ₂ -				
Fenyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -				

WSTĘP TEORETYCZNY

Tabela 2. Przykłady sorbentów stosowanych w fazie normalnej w SPE [97, 101]

FAZA NORMALNA (NP)					
Rodzaj sorbentu	Struktura chemiczna	Docelowy analit	Roztwory		
			Kondycjonowanie	Przemywanie	Eluowanie
Cyano (CN)	$-(CH_2)_3CN$	Posiada polarne grupy funkcyjne, takie jak grupy hydroksylowe, karbonylowe, aminowe, podwójne wiązania oraz związki z heteroatomami.	Niepolarne rozpuszczalniki (heksan, chloroform)	Niepolarne rozpuszczalniki	Silnie polarny eluent np. metanol
Amino (NH ₂)	$-(CH_2)_3NH_2$				
Diol (COHCOH)	$-(CH_2)_3OCH_2CH_2OH$				
Żel krzemionkowy	$-SiOH$				
Florisil®	Mg_2SiO_3				
Alumina	Al_2O_3				

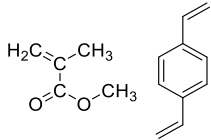
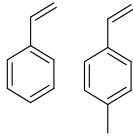
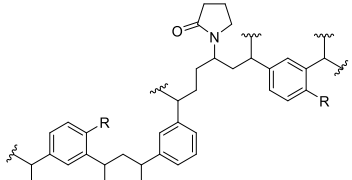
Tabela 3. Przykłady sorbentów jonowymiennych stosowanych w SPE [97, 101]

SORBENTY JONOWYMIENNE (IE) – wymiana kationów					
Rodzaj sorbentu	Struktura chemiczna	Docelowy analit	Roztwory		
			Kondycjonowanie	Przemywanie	Eluowanie
SCX Sulfonowy	Kwas propano-sulfonowy $-(CH_2)_3SO_2OH$	Anality o ładunku dodatnim	Woda lub bufor $pH > 7$ ($pH = pK_a - 2$)	$pH = pK_a - 2$	Eluent o sile jonowej, $pH = pK_a + 2$
	Kwas benzeno-sulfonowy $-(CH_2)_3-SO_2OH$				
WCX Kwas karboksylowy	$-(CH_2)_2COOH$				
SORBENTY JONOWYMIENNE (IE) – wymiana anionów					
Rodzaj sorbentu	Struktura chemiczna	Docelowy analit	Roztwory		
			Kondycjonowanie	Przemywanie	Eluowanie
SAX Czwarto-rzędowa grupa amoniowa	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	Anality o ładunku ujemnym	Woda lub bufor $pH < 7$ ($pH = pK_a + 2$)	$pH = pK_a + 2$	Eluent o wysokiej sile jonowej, $pH = pK_a - 2$
WAX Pierwszo-, drugo-, lub trzeciorzędowa amina	$-NH_2$				
	$-NHR$				
	$-NR_2$				

Sorbenty typu mixed-mode wykorzystują zarówno grupy hydrofobowe, jak i jonowymiennne na swojej powierzchni. Grupy hydrofobowe mogą obejmować od krótkich łańcuchów (np. C2) do wysoce retencyjnych (np. C18), a grupy jonowymiennne mogą mieć właściwości kationowymiennne lub anionowymiennne. Eluent powinien zawierać niepolarne rozpuszczalniki oraz odpowiednie bufor, kwasy lub

zasady, aby wypłukać anality zatrzymane dzięki interakcjom hydrofobowym i jonowymiennym [97, 102].

Tabela 4. Przykłady sorbentów polimerowych stosowanych w SPE [63]

SORBENTY POLIMEROWE		
Rodzaj sorbentu	Właściwości	Eluowanie
Metakrylan diwinylobenzenu 	Sorbenty te charakteryzują się większą powierzchnią specyficzną niż fazy związane RP/NP, co pozwala na stosowanie mniejszej ilości materiału sorpcyjnego.	Metanol, acetonitryl (w zależności od typu analitu)
Styren diwinylobenzen (SDVB) 	- Umożliwiają izolację i oczyszczanie szerokiego spektrum związków chemicznych. - Mogą być efektywnie stosowane w ekstrakcji w szerokim zakresie wartości pH, w tym przy ekstremalnych pH. - Nie wymagają wstępnego kondycjonowania za pomocą rozpuszczalników przed użyciem.	
Kopolimerowy adsorbent oparty na pirolidynie  Oasis HLB: R= H Oasis MCX: R= SO₃⁻ Oasis MAX: R= N⁺(CH₃)₂(C₄H₉)		

Immunosorbenty znajdują zastosowanie w medycynie, biologii i technologii żywności, natomiast ich wykorzystanie do analiz próbek środowiskowych jest stosunkowo nowym trendem. Ograniczenia te wynikają z trudności w tworzeniu przeciwciał, które są selektywne dla małych cząsteczek. Immunosorbenty są cenione za wysoką selektywność, umożliwiającą jednoczesną ekstrakcję, koncentrację i oczyszczanie złożonych matryc [103].

Polimery z odciskiem molekularnym (MIP) to syntetyczne materiały, które precyzyjnie kodują informacje molekularne, takie jak kształt i orientacja grup funkcyjnych. Dzięki temu mogą selektywnie wiązać się z określonymi cząsteczkami, co czyni je idealnymi do zastosowania w analizie konkretnych związków. Ostatnio MIP są powszechnie stosowane do przygotowania próbek złożonych matryc środowiskowych. Do ich zalet należą stabilność temperaturowa i pH, możliwość wielokrotnego użycia, krótszy czas przygotowania oraz trwałość. Dzięki specyficznym interakcjom powinowactwa, MIP zapewniają wyższą skuteczność oczyszczania niż tradycyjne sorbenty SPE [102, 103].

Możliwość dostosowania parametrów, takich jak rodzaj sorbentu, skład eluentu i warunki oczyszczania, sprawia, że SPE jest szeroko stosowana w analizie pozostałości antybiotyków w różnych matrycach. Oto przykłady jej zastosowania w badaniach nad antybiotykami.

W literaturze często wykorzystuje się kolumny Oasis HLB ze względu na ich zdolność do zatrzymywania zarówno związków polarnych, jak i niepolarnych, co sprawia, że są one skuteczne w analizie różnych antybiotyków. Na przykład, Becker i in. [104] opracowali metodę wykorzystującą kolumny SPE Oasis HLB (60 mg, Waters) do oznaczania 15 antybiotyków β -laktamowych w próbkach mleka, mięśni i nerek. Próbki rozpuszczano w 0,05 M buforze fosforanowym (pH 8,5), a kolumny przygotowano przez przepłukanie metanolem, wodą oraz tym samym buforem. Po nałożeniu próbek na kolumny, przemywano je buforem fosforanowym i wodą, a następnie elucję przeprowadzano za pomocą 3 ml mieszaniny acetonitrylu i wody w stosunku 1:1 (v/v).

Kolejnym przykładem zastosowania kolumnienek Oasis HLB jest metoda opisana przez Heller i in. [105] do oznaczania tetracyklin, fluorochinolonów, β -laktamów i sulfonamidów w jajkach. Próbki jajek przygotowywano przez dodanie roztworu bursztynianu sodu (chelatuje jony metali mogące zakłócać ekstrakcję tetracyklin). Kolumny przygotowano przez przepłukanie metanolem i wodą, a po nałożeniu supernatantu na kolumny, przemywano je wodą. Elucję analitów w tym wypadku przeprowadzano za pomocą 3 ml metanolu.

Do ekstrakcji pozostałości leków (penicylin, cefalosporyn, sulfonamidów, tetracyklin, makrolidów, linkozamidów, fluorochinolonów, niesteroidowych leków przeciwzapalnych, polipeptydów, benzoimidazoli i leków antyhistaminowych) z próbek mleka, grupa badawcza pod kierownictwem Turnipseed [106] również wykorzystwała kolumnienki Oasis HLB. Próbki mleka przygotowywano w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego w wodzie. Kolumny kondycjonowano acetonitrylem, a następnie roztworem 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie/MeCN (95:5). Po nałożeniu ekstraktów z próbek, kolumny przemywano roztworem 0,1% kwasu mrówkowego, a eluowanie przeprowadzano za pomocą MeCN.

Kolumny SPE Oasis HLB wykorzystano również do ekstrakcji pozostałości antybiotyków (fluorochinolonów, sulfonamidów, tetracyklin i makrolidów) z próbek

miodu. Próbkę miodu rozpuszczano w 10 ml roztworu Na_2EDTA o pH 4. Kolumny przygotowano poprzez przepłukanie najpierw metanolem, następnie acetonitrylem, a potem dwukrotnie wodą. Po nałożeniu supernatantu na kolumny, przemywano je ponownie wodą. Elucję analitów przeprowadzano kolejno przy użyciu metanolu, acetonitrylu oraz 0,04% roztworu wodorotlenku amonu w metanolu [107].

Kolumnienki SPE Oasis HLB zostały wykorzystane także przez Zhu i współpracowników [108] do utworzenia układu tandemowego, aby zoptymalizować proces oczyszczania próbek. Pierwszą kolumnę HLB kondycjonowano metanolem, wodą i roztworem 0,2 M HFBA, natomiast drugą kolumnę dodatkowo wodnym roztworem NaOH o pH 8,5. Próbkę były ekstrahowane za pomocą 5% roztworu TCA oraz 0,2 M HFBA, a następnie załadowane na pierwszą kolumnę. Eluat z pierwszej kolumny, którego pH dostosowano do 8,5 został przeniesiony na drugą kolumnę. Obie kolumny były przepłukiwane wodą. Elucja analitów przeprowadzona została za pomocą mieszaniny acetonitrylu i 0,15 M HFBA w stosunku 4:1 (v/v). Za pomocą tej metody wyekstrahowano 15 pozostałości aminoglikozydów z tkanek wieprzowych.

Ponadto, do zastosowań opisanych powyżej, kolumnienki SPE Oasis HLB zostały również wykorzystane do ekstrakcji 100 leków weterynaryjnych z różnych matryc mięśni, gdzie elucję przeprowadzano za pomocą mieszaniny acetonitrylu i buforu bursztynianowego [47]. Wykorzystano je także do oznaczania antybiotyków makrolidowych w tkankach kurczaka, gdzie elucję przeprowadzano za pomocą metanolu [109]. Dodatkowo, kolumnienki te posłużyły do ekstrakcji 76 leków weterynaryjnych z 13 różnych klas z mięśni wołowych, przy czym elucję analitów przeprowadzano za pomocą 10% wodnego roztworu kwasu mrówkowego oraz acetonitrylu [110]. Kolejnym przykładem jest zastosowanie Oasis HLB do ekstrakcji 29 antybiotyków z ośmiu klas z próbek moczu i mięśni świń, gdzie elucję przeprowadzano przy użyciu metanolu [111]. Kolumnienki Oasis HLB zastosowano także do ekstrakcji 16 antybiotyków z mięsa kaczek, gdzie elucję przeprowadzano sekwencyjnie za pomocą metanolu, acetonitrylu oraz roztworu amoniaku w metanolu [112]. Kolumnienki te zostały także użyte do ekstrakcji amoksycyliny z tkanek wieprzowych, a elucję przeprowadzano przy użyciu acetonitrylu [113]. Wykorzystano je również do analizy tygecykliny, tetracyklin i ich 4-epimerowych pochodnych w mięśniach kurczaka, gdzie elucję przeprowadzano za pomocą mieszaniny metanolu i octanu etylu w stosunku 1:9 [114]. Te przykłady pokazują, jak wszechstronne zastosowanie mają kolumnienki Oasis HLB w analizie pozostałości

różnych leków weterynaryjnych w różnych matrycach, co potwierdza ich przydatność w badaniach bezpieczeństwa żywności.

Do ekstrakcji pozostałości leków, takich jak sulfonamidy i fluorochinolony, grupa badawcza pod kierownictwem He i współpracowników [115] zastosowała kolumny Oasis PRiME HLB, nowoczesny typ fazy SPE, który nie wymaga tradycyjnego kondycjonowania i mycia przed elucją. Do próbek dodawano 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w mieszaninie MeCN/H₂O (90:10, v/v). Próbkę poddawano ultradźwiękowej ekstrakcji, a następnie odwirowywano. Otrzymany supernatant przepuszczano przez kolumny Oasis PRiME HLB (3 cc, 60 mg) bez konieczności wcześniejszego kondycjonowania kolumny. Po naniesieniu próbki kolumny nie wymagały również przemywania ani elucji innym rozpuszczalnikiem. Eluaty zbierano do probówek wirówkowych do dalszej analizy.

W celu oznaczania 11 antybiotyków fluorochinolonowych w mięsie drobiowym i jajach próbki poddano ekstrakcji docelowych związków. Następnie, aby usunąć tłuszcze i fosfolipidy, zastosowano metodę oczyszczania przy użyciu przepływowego SPE, wykorzystując sorbent Oasis PRiME HLB, podobnie jak w poprzednim przykładzie. Procedura składała się z dwóch głównych etapów. W pierwszym etapie roztwór ekstrakcyjny nakładano na wkłady SPE z Oasis PRiME HLB, po czym zbierano wszystkie eluaty [116].

Guo i in. [117] opracowali metodę oznaczania spektynomycyny i linkomycyny w mięśniach drobiowych i wieprzowych z użyciem kolumnienek Oasis PRiME HLB. W tym przypadku zastosowano pełną procedurę SPE, obejmującą wszystkie etapy: kondycjonowanie, załadowanie próbki, przepłukiwanie oraz elucję. Próbkę były rozpuszczane w buforze KH₂PO₄ (0,01 M, pH 4), następnie pH doprowadzono do 5,8 i dodano laurylosiarczan sodu, aby zmienić polarność roztworu. Kolumnienki kondycjonowano metanolem, wodą dejonizowaną i buforem laurylosiarczanu sodu (0,02 M). Po naniesieniu próbki na kolumnienki, przepłukiwano je trzykrotnie 3 ml wody dejonizowanej, a następnie eluowano metanolem.

W badaniach nad oznaczaniem sulfonamidów, chinolonów i benzoimidazoli w mleku krowim zastosowano metodę ekstrakcji za pomocą zakwaszonego acetonitrylu, a następnie próbki oczyszczano przy użyciu kolumnienek Oasis MCX. Po ekstrakcji supernatant odparowywano do sucha, a następnie pozostałość rozpuszczano w roztworze

0,10 M kwasu solnego przed dalszym etapem oczyszczania. Kolumny Oasis MCX kondycjonowano metanolem oraz roztworem 0,10 M kwasu solnego. Po naniesieniu próbki na kolumnę SPE, przeprowadzano przemywanie roztworem 0,10 M kwasu solnego oraz metanolem. Na koniec elucję przeprowadzano za pomocą 10% amoniaku w acetonitrylu [118].

Do analizy antybiotyków w złożonych matrycach stosuje się także kolumnienki Strata-X, polimerowe sorbenty chemicznie modyfikowane, które zapewniają wysoką selektywność i odporność chemiczną. Przykładem ich zastosowania jest wyekstrahowanie leków weterynaryjnych, takich jak benzoimidazole, makrolidy, penicyliny, chinolony, sulfonamidy, pirymidyny, tetracykliny, nitroimidazole, środki uspokajające, jonofory, amfenikole oraz niesteroidowe leki przeciwzapalne, z próbek mleka. W celu przeprowadzenia analizy mleko mieszano z acetonitrylem, aby wytrącić białka. Po odwirowaniu supernatant rozcieńczano wodą. Rozcieńczoną próbkę nanoszono na kolumnienkę Strata-X, którą kondycjonowano metanolem i wodą, przemywano wodą, a następnie anality eluowano metanolem [119].

W celu analizy antybiotyków β -laktamowych, w tym penicylin, cefalosporyn i karbapenemów, w mięśniach drobiu zastosowano kolumnienki Strata-X. Próbkę ekstrahowano, a fazę wodną o pH 7,2 przeznaczono do oczyszczania metodą SPE. Kolumnienki Strata-X kondycjonowano metanolem i wodą. Następnie na kolumnienki naniesiono ekstrakt, a kolumnienki przemyto mieszaniną metanolu i wody (1:9, v/v). Antybiotyki β -laktamowe eluowano z kolumnienek za pomocą mieszaniny metanolu i acetonitrylu (50:50, v/v) [120].

Strata-X-CW jest sorbentem typu słabego wymiennicza kationowego, który znalazł zastosowanie w analizie leków przeciwbakteryjnych, takich jak: aminoglikozydy, β -laktamy, fluorochinolony, makrolidy, sulfonamidy, trimetoprim oraz tetracykliny, w próbkach ryb, co opisali Gbylik i in [121]. Otrzymany po ekstrakcji próbek supernatant przeznaczono do oczyszczania na kolumnienkach Strata-X-CW, które wcześniej kondycjonowano metanolem, wodą i 0,02 M HFBA. Kolumnienki suszono pod próżnią, a następnie eluowano za pomocą 2% kwasu mrówkowego w metanolu (dwukrotnie po 3 ml).

Strata SCX to sorbent wykorzystywany do analizy sulfonamidów w różnych matrycach, w tym w próbkach jajek. Do fazy organicznej uzyskanej po ekstrakcji dodano

lodowaty kwas octowy, a powstałą mieszaninę przeniesiono na kolumnienkę Strata SCX, którą uprzednio kondycjonowano n-heksanem oraz mieszaniną kwasu octowego w chloroformie i acetonie. Po naniesieniu próbki kolumnienkę przemywano wodą, a następnie metanolem. Sulfonamidy eluowano za pomocą mieszaniny metanolu i amoniaku (97,5:2,5, v/v).

W literaturze znajdziemy również przykład zastosowania kolumnienek C18 do oznaczania 141 pozostałości leków weterynaryjnych z 18 różnych klas. Po ekstrakcji z użyciem mieszaniny acetonitrylu z wodą, supernatant przepuszczano przez kolumnienki C18, które wcześniej kondycjonowano mieszaniną acetonitrylu i wody (80:20, v/v). Po naniesieniu próbki ekstrakt zbierano i odparowywano [122].

Kolumnienki MIP są coraz częściej wykorzystywane do analizy antybiotyków w różnych matrycach. Przykładem jest zastosowanie kolumnienek MIP w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczową z detekcją UV (HPLC-UV) do oznaczania trzech sulfonamidów: sulfametazyny, sulfamerazyny i sulfatiazolu w próbkach mięsa wieprzowego i drobiowego. Ta technika pozwala na selektywne wyodrębnienie i precyzyjne oznaczenie stężeń tych sulfonamidów [123]. Innym przykładem zastosowania MIP jest analiza sulfamerazyny w wodzie stawowej i różnych gatunkach ryb [102]. Kolejny przykład to zastosowanie polimerów odciskanych molekularnie do oznaczania spiramycyny w mleku owczym [124]. MIP wykorzystane były także do analizy antybiotyków fluorochinolonowych, takich jak norfloksacyna, ciprofloksacyna, danofloksacyna oraz enrofloksacyna w wodach środowiskowych i próbkach moczu. Dzięki ich selektywności możliwe było wykrywanie i oznaczanie tych substancji nawet w obecności innych zanieczyszczeń [125].

W literaturze można znaleźć przykłady zastosowania immunosorbentów do analizy antybiotyków. W jednym z badań zastosowano immunosorbenty z przeciwciałami do selektywnej ekstrakcji i oczyszczania 10 chinolonów, takich jak marbofloksacyna, norfloksacyna, ciprofloksacyna, lomefloksacyna, danofloksacyna, enrofloksacyna, difloksacyna, sarafloksacyna, kwas oksolinowy i flumechina, z mięśni kurczaka, a następnie przeprowadzono oznaczanie za pomocą HPLC [126]. Inny przykład obejmuje wykorzystanie immunosorbentów z szerokospecyficznymi przeciwciałami do jednoczesnej ekstrakcji i oczyszczania antybiotyków chinolonowych i sulfonamidowych z tkanek mięśni zwierząt. W tym badaniu immunosorbenty użyto

do analizy różnych antybiotyków, takich jak enrofloksacyna, ciprofloksacyna, norfloksacyna, flumechina, pefloksacyna metanosulfonian, sarafloksacyna, difloksacyna, ofloksacyna, lomefloksacyna, enoksacyna, danofloksacyna, kwas oksolinowy, marbofloksacyna oraz sulfonamidów takich jak sulfametoksazol, sulfadiazyna, sulfapyrydyna, sulfatiazol, sulfametizol i sulfamonometoksyna [127].

Podsumowując, zastosowanie metod SPE (Solid-Phase Extraction) oraz różnorodność dostępnych sorbentów, takich jak np. kolumnienki Oasis HLB, Strata-X, Strata SCX, C18 czy MIP, umożliwiają skuteczną ekstrakcję i oczyszczanie różnych antybiotyków w wielu matrycach. Ze względu na swoją wszechstronność i zdolność do selektywnego wyodrębniania analitów, metody SPE zyskują na znaczeniu i stają się nieodzownym elementem w analizie pozostałości antybiotyków.

3.2. Wykrywanie i oznaczanie antybiotyków: techniki analityczne

Po zakończeniu procesów ekstrakcji i oczyszczania, kolejnym i kluczowym etapem jest analiza próbek w celu wykrycia obecności antybiotyków oraz określenia ich stężeń. Ze względu na zróżnicowane właściwości fizykochemiczne antybiotyków, konieczne jest zastosowanie odpowiednich technik analitycznych, aby zapewnić ich identyfikację oraz ilościowe oznaczenie w badanych próbkach.

Metody wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności dzielą się na dwie główne grupy. Pierwsza obejmuje metody przesiewowe, które szybko wykrywają obecność antybiotyków (metody mikrobiologiczne, szybkie zestawy testowe). Choć metody te nie dostarczają dokładnych wyników ilościowych, ich zaletą są szybkość oraz niskie zużycie odczynników. Dzięki temu są tanie i łatwe do przeprowadzenia, co umożliwia wstępną selekcję próbek i zmniejsza potrzebę stosowania bardziej zaawansowanych analiz [128].

Drużga kategoria obejmuje metody ilościowe i/lub potwierdzające, które umożliwiają jednoznaczną identyfikację antybiotyków oraz określenie ich stężenia w badanej próbce [128]. Do tej grupy należą techniki chromatograficzne, takie jak chromatografia cieczowa, która może być stosowana z różnymi typami detektorów, w tym detektorem ultrafioletowym (UV) [123, 129, 130], z matrycą diodową (UV-DAD) [23, 131], detektorem fluorescencyjnym (FLD) [64, 126, 132-138] oraz spektrometrią mas (MS), a także chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią mas [117, 139].

Najczęściej stosowaną metodą ilościową i potwierdzającą w analizie antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego jest połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS).

W technice LC-MS możemy zastosować liczne rozwiązania, takie jak różne źródła jonów, analizatory mas oraz tryby akwizycji danych. Dodatkowo możliwe jest wykorzystanie różnorodnych kolumn chromatograficznych oraz dostosowanie innych parametrów instrumentalnych w zależności od specyficznych wymagań analizowanych związków [140].

Elektrosprej (ESI), czyli jonizacja typu elektrorozpylanie, jest jednym z najpowszechniej używanych źródeł jonów (tryb jonów dodatnich, jak i ujemnych). Technika ta jest stosowana zarówno do oznaczania małych cząsteczek, jak i dużych biomolekuł o masie przekraczającej 1000 Da. W ESI proces jonizacji zachodzi w fazie ciekłej, a jony z roztworu są przenoszone do fazy gazowej poprzez odparowanie. Kluczowym elementem procesu jest przyłożenie napięcia w zakresie 3–6 kV pomiędzy kapilarą, przez którą przepływa roztwór, a elektrodą, co powoduje tworzenie naładowanych kropeł. Ciecz zostaje rozbita na drobne krople, co jest wspomagane przez zastosowanie gazu suszącego oraz nebulizującego, np. azotu. ESI charakteryzuje się łagodnymi warunkami, dzięki czemu idealnie nadaje się do oznaczania związków nietrwałych i wrażliwych na ciepło [141].

Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) to popularna technika jonizacji w LC-MS, stosowana do analizy małych cząsteczek (do 1500 Da) bez konieczności ich derywatyzacji. W APCI jonizacja zachodzi w fazie gazowej pod ciśnieniem atmosferycznym, w wyniku oddziaływań z wyładowaniami elektrody. Próbką ciekłą jest rozpylana za pomocą wysokiej temperatury i gazu, np. azotu, który ulega jonizacji i reaguje z cząsteczkami analitu, tworząc jony. APCI jest skuteczna w oznaczaniu związków rozpuszczalnych w niepolarnych rozpuszczalnikach i sprawdza się przy związkach odpornych na wysoką temperaturę [142].

W spektrometrii mas stosuje się różne analizatory mas. Coraz większe znaczenie zyskują wysokorozdzielcze analizatory mas (HRMS) takie jak Orbitrap [52, 84, 89, 90, 143], analizator czasu przelotu TOF [47, 82, 119, 122] oraz Q-TOF [66, 144]. Układy tandemowych spektrometrów mas (MS/MS), które zawierają dwa analizatory i komorę kolizyjną (potrójny kwadrupol QqQ), są najczęściej wykorzystywane w oznaczaniu

pozostałości antybiotyków w żywności [48, 50, 51, 53-62, 65, 67, 77-81, 86-88, 91-93, 102, 104-116, 118, 120, 121, 145, 146]. Liczne przykłady wskazują na to, że LC–MS/MS jest kluczową techniką do wykrywania oraz ilościowego oznaczania pozostałości antybiotyków w żywności [147].

W spektrometrii mas wyróżniamy różne tryby akwizycji danych:

- tryb pełnego skanowania (Full Scan) [148],
- monitorowanie wybranych jonów (SIM – Selected Ion Monitoring) [149],
- monitorowanie wybranych reakcji (MRM – Multiple Reaction Monitoring) [150],
- monitorowanie wybranych reakcji (SRM – Selected Reaction Monitoring) [151].

Szczególnie ważnym elementem w ilościowym oznaczaniu antybiotyków w żywności jest tryb monitorowania wybranych reakcji. W trybie MRM możliwe jest jednocześnie monitorowanie wielu jonów prekursora oraz produktów ich fragmentacji jednocześnie, co pozwala na analizę dużej liczby substancji w jednym cyklu pomiarowym. Dodatkowo, zdefiniowanie więcej niż jednego jonu fragmentacyjnego w analizatorze Q3 zwiększa pewność detekcji i identyfikacji poszukiwanych substancji [142]. W trybie MRM pierwszy kwadrupol (Q1) selekcjonuje jony prekursora o określonej wartości m/z , które następnie ulegają fragmentacji w komorze kolizyjnej (Q2) w obecności gazu kolizyjnego (argon lub azot). Trzeci kwadrupol (Q3) selektywnie przepuszcza jony produktów o określonych wartościach m/z . Ta wysoka selektywność umożliwia precyzyjną detekcję związków w złożonych matrycach, takich jak żywność [152].

W analizach LC-MS/MS stosuje się różne techniki chromatograficzne, takie jak HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa), UHPLC (ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa) oraz UPLC (ultrasprawna chromatografia cieczowa), które różnią się między sobą nie tylko ciśnieniem pracy, ale także rodzajem stosowanych kolumn. Kolumny w UHPLC i UPLC charakteryzują się mniejszą średnicą cząstek wypełniających, co umożliwia lepszą separację i szybsze analizy w porównaniu do klasycznych kolumn HPLC [140].

Kolumny chromatograficzne różnią się rodzajem fazy stacjonarnej, a wybór odpowiedniej zależy od oznaczanych związków. Najczęściej stosowane są kolumny typu C18 (faza odwrócona), które są efektywne w rozdzielaniu związków niepolarnych i umiarkowanie polarnych. Kolumny C8, dzięki krótszym łańcuchom węglowodorowym, lepiej nadają się do rozdzielania substancji o niższej polarności. Kolumny HILIC sprawdzają się w rozdzielaniu związków polarnych. Kolumny HSS C18, HSS T3 oraz BEH C18 są często stosowane w technikach wysokociśnieniowych, takich jak UPLC. Kolumny HSS C18 charakteryzują się wysoką wytrzymałością i stabilnością w trudnych warunkach, natomiast HSS T3 zapewniają lepszą retencję związków o szerokim zakresie polarności. Kolumny BEH C18 oferują doskonałą stabilność chemiczną i termiczną, co pozwala na pracę w szerokim zakresie pH [153, 154].

Tabela 5 zawiera przykłady przygotowania próbek (oczyszczanie, ekstrakcja), zastosowanej techniki analitycznej, w tym kolumn chromatograficznych i fazy ruchomej, oraz sprzętu użytego w analizie.

Tabela 5. Przykłady metodyk przygotowania próbek, zastosowanych kolumn chromatograficznych, faz ruchomych oraz sprzętu analitycznego

Antybiotyki	Matryca	Przygotowanie próbek	Technika analityczna	
Penicyliny	Tkanka mięśniowa i nerki wieprzowe	Próbki (2 g) zhomogenizowano w buforze fosforanowym (2 ml, 200 mM, pH 6,0). Dodano standard wewnętrzny, inkubowano (30 min, temp. pokojowa), dodano bufor fosforanowy (40 ml, 100 mM, pH 8,0), mieszano (30 s), dodano piperydynę (300 µl), mieszano (5 min), dodano kwas fosforowy (100 µl), mieszano, ogrzewano w łaźni wodnej (85°C, 5 min), schłodzono. Probki odwirowano (2700×g, 10 min). Supernatanty przefiltrowano przez watę do probówek. Oczyszczono na kolumnkach Oasis® HLB (60 mg, 3 cm ³), kondycjonowano (2 ml MeOH, 2 ml H ₂ O i 2 ml buforu fosforanowego 100 mM, pH 8,0). Probki naniesiono (10 ml) i następnie przemyto (2×2 ml H ₂ O), wysuszono, eluowano (3 ml MeOH/H ₂ O; 80/20, v/v). Odparowano (do sucha, 60°C w strumieniu azotu) i rozpuszczono ponownie (500 µl, 2% MeCN).	LC-MS/MS (ESI -) <u>Kolumna</u> Waters Symmetry C ₁₈ (3.0 x 150 mm; 5 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,2% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,2% kwas mrówkowy w MeCN/H ₂ O (9/1, v/v)	[155]
	Mleko	Została zastosowana metoda dla tkanek wieprzowych z kilkoma modyfikacjami. Do próbek mleka (4 g) dodano standardy wewnętrzne. Dodano bufor fosforanowy (40 ml, 100 mM, pH 8,0), mieszano (30 s), dodano piperydynę (300 µl), mieszano (5 min), dodano kwas fosforowy (100 µl), mieszano. Probki odwirowano (2700×g, 10 min). Supernatanty przefiltrowano przez watę do probówek. Po kondycjonowaniu kolumnek SPE naniesiono ekstrakt (20 ml). Ostateczny osad rozpuszczono w 2% MeOH (200 µl).		

WSTĘP TEORETYCZNY

β-laktamy	Mleko krowie	MIP (100 mg) kondycjonowano (3 ml MeOH, 3 ml H ₂ O). Supernatant odizolowano i usunięto. Dodano próbki mleka (2 ml) oraz wodny roztwór kwasu solnego (18 ml) o pH 5. Próbkę poddano ultradźwiękom (5 min). Roztwór supernatantu odrzucono. MIP-y przemyto H ₂ O (3 ml). Antybiotyki elucjonowano z MIP-ów (3x1 ml roztworu MeOH z 5% kwasem octowym). Każdy etap elucji poddano ultradźwiękom przez 30 s. Eluat połączono oraz odparowano (w strumieniu azotu w 40°C). Pozostałość rozpuszczono w 1 ml roztworu MeOH z 0,1% kwasem mrówkowym. Eluat przefiltrowano (0,45 μm) i wstrzyknięto do systemu LC-MS/MS.	LC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Waters Symmetry C ₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) <u>Faza ruchoma</u> Izokrat: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O:MeOH (40:60, v/v)	[156]
Aminoglikozydy β-laktamy Linkozamidy Makrolidy Fluoro-chinolony Sulfonamidy Tetracykliny	Tkanka mięśniowa kurczaka	Próbkę (5 g) naważono do próbówki wirówkowej, dodano roztwór ekstrakcyjny (10 ml; wodny roztwór 2% kwasu trichlorooctowego z MeCN w stosunku objętościowym 1:1), mieszano przez 30 s. Następnie próbkę wytrząsano przez 10 min. Odwirowano (3400 obr./min, 5 min). Supernatant przeniesiono do próbówki wirówkowej, dodano heksan (5 ml), mieszano (1 min), a następnie odwirowano (2400 obr./min, 5 min). Warstwę heksanową odrzucono. Próbkę (200 μl) przeniesiono do próbówki wirówkowej i rozcieńczono 10% kwasem mrówkowym (800 μl) w roztworze H ₂ O:MeCN (1:9, v/v). Ekstrakt przefiltrowano przez nylonowy filtr strzykawkowy (0,2 μm) i przeznaczono do analizy.	LC-MS/MS ESI + <u>Kolumna</u> SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm × 100 mm; 3.5 μm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 50mM mrówczan amonu w H ₂ O (pH 2.5) B: MeCN	[157]
Fluoro-chinolony Penicyliny Cefalosporyny	Mleko krowie	Próbkę (2 g) naważono do próbówki. Dodano 0,5 ml roztworu fosforanowego 0,2M o pH 10. Próbkę odwirowano, a następnie przeprowadzono oczyszczanie na SPE (wkłady Oasis HLB). Kolumnienki kondycjonowano MeOH (1 ml), H ₂ O (1 ml) oraz roztworem fosforanowym 0,1M o pH 10 (1 ml). Naniesiono supernatant. Wkład przemyto H ₂ O (3 ml). Anality eluowano MeOH (2 ml). Ekstrakt przekazano do analizy.	LC-MS/MS (ESI +) UPLC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna (LC-MS/MS)</u> Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (5 μm, 4.6 x 150 mm) Prekolumna Akady Kromasil C8 (4.6 x 15 mm; 5 μm) <u>Kolumna (UPLC-MS/MS)</u> Waters Acquity UPLC BEH Shield RP 18 (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O	[158]

WSTĘP TEORETYCZNY

			B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN	
β-laktamy	mleko	Próbkę mleka (2 ml) ekstrahowano z 4 ml MeCN. Do próbki dodano 1 ml MeCN i mieszano przez 10 s. Ten krok powtórzono jeszcze 3 razy. Mieszano przez 20 minut, dodano chlorek sodu (1g) i ponownie mieszano przez 20 minut. Następnie próbkę odwirowano (5 minut, 5000×g, 5°C). Pobrano 1 ml supernatantu do analizy LC-MS/MS.	LC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Phenomenex Synergy C ₁₈ (3.0 x 150 mm; 4 μm) Prekolumna Phenomenex C ₁₈ (3.0 x 4.0 mm; 5 μm) <u>Faza ruchoma</u> A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN	[54]
Cefalosporyny	Tkanka mięśniowa wołowa	Próbkę mięśniową (4 g) zhomogenizowano. Dodano mieszaninę standardu wewnętrznego, pozostawiono w ciemności przez 30 minut. Dodano mieszaninę MeCN i H ₂ O (15 ml; 80:20, v/v), mieszano przez 2 minuty, a następnie odwirowano (5 minut, 3500 obr./min). Oczyszczanie metodą QuEChERS: Do zestawów SPE typu dyspersyjnego (150 mg sorbentu PSA, 150 mg sorbentu C ₁₈ oraz 900 mg MgSO ₄) dodano roztwory ekstraktu (10 ml), wytrząsano przez 5 minut, a następnie odwirowano (5 minut, 3500 obr./min). Zebrano 5 ml roztworu, który odparowano, a następnie rozpuszczono w 200 μl H ₂ O. Oczyszczanie metodą SPE: Do ekstraktu acetonitrylowego dodano nasycony roztwór NaCl (4 ml), a następnie odparowano. Dodano roztwór fosforanowy (pH 5) do uzyskania końcowej objętości 30 ml. Wkłady ENV+ kondycjonowano: MeOH (2 ml), H ₂ O (2 ml) oraz roztwór fosforanu sodu jednowodnego (2 ml, pH 5). Próbkę naniesiono na wkład i przemyto roztworem fosforanowym (3 ml, pH 5) oraz H ₂ O (1 ml). Elucjonowano mieszaniną MeCN, MeOH i H ₂ O (4 ml; 45:45:10, v/v/v). Następnie odparowano i rozpuszczono w 200 μl H ₂ O.	LC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C ₈ (4.6 x 150 mm; 5 μm) Prekolumna Akady Kromasil C ₈ (4.6 x 15 mm; 5 μm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN	[88]
Penicyliny	Tkanka mięśniowa wieprzowa, wołowa, drobiowa	Próbki (4 g) zhomogenizowano i umieszczono w probówkach wirówkowych, dodano roztwory penicylin i standard wewnętrzny. Dodano 2 ml H ₂ O, mieszano przez 1 minutę, dodano 20 ml MeCN i ponownie mieszano przez 1 minutę. Następnie próbki odwirowano (5 minut, 3500 obr./min, 25°C). Do ekstraktu acetonitrylowego dodano 2 ml nasyconego roztworu NaCl, a następnie odparowano w strumieniu azotu. Dodano 25 ml buforu fosforanowego (50mM, pH 5-8,5). Oczyszczanie przeprowadzono za pomocą kolumny Isolute ENV+ (200 mg, 3 ml), którą kondycjonowano MeOH (2 ml), H ₂ O (2 ml) i buforem fosforanowym (2 ml, pH 5,0).	LC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C ₈ (4.6 x 150 mm) precolumna Akady Kromasil C ₈ (4.5 x 20 mm)	[159]

WSTĘP TEORETYCZNY

		Próbki naniesiono na kolumnę, a następnie przemyto (3 ml buforu fosforanowego pH 5,0 oraz 1 ml H ₂ O), osuszono i eluowano (2 ml MeOH oraz 2 ml MeCN). Następnie próbki odparowano i rozpuszczono w 200 µl H ₂ O, a na koniec odwirowano (13000 obr./min, 5 min).	<u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN	
Penicyliny	Tkanka mięśniowa wołowa, mleko krowie	Próbki wołowiny (10 g) zhomogenizowano i mieszało z roztworem aceton:acetonitryl (20 ml; 4:1, v/v). Do próbki mleka (3 ml) dodano roztwór aceton:acetonitryl (6 ml; 5:1, v/v). Następnie próbki odwirowano (4500 obr./min, 20 minut) i odparowano (37°C w atmosferze azotu). Do próbek dodano bufor fosforanowy (1 ml, pH 8) oraz 100mmol/l bromek tetrabutylamoniowy (600 µl). Dodano nasycony siarczan amonu oraz MeCN (2 ml), a objętość uzupełniono do 10 ml H ₂ O. Mieszano i pozostawiono do całkowitego rozdzielania faz. Górną warstwę bezpośrednio wstrzyknięto do systemu HPLC.	HPLC-PDA <u>Kolumna</u> Waters Xbridge™ C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) <u>Faza ruchoma</u> Izokrat (75:25, v/v) A: 5mmol ⁻¹ bufor fosforanowy (pH 6.6) B: MeCN	[160]
Penicyliny Cefalosporyny	Mleko	Kondycjonowano kolumnienki Oasis HLB (2 ml MeOH, 2 ml H ₂ O). Sorbent przeniesiono do szklanej zlewki, dodano próbkę mleka (500 µl) oraz połowę ilości z tuby QuEChERS (125 mg), mieszano i wstawiono do łaźni ultradźwiękowej. Próbkę przeniesiono do pustego zbiornika kolumnienki SPE, sprężono, osuszono pod próżnią, przemyto (5 ml wody z 7% acetonem), a następnie eluowano (1 ml MeOH, 2 ml MeCN). Odparowano do sucha w strumieniu azotu w łaźni wodnej (35°C). Rozpuszczono w 500 µl H ₂ O. Pobrano 20 µl i wstrzyknięto do systemu HPLC.	HPLC-PDA <u>Kolumna</u> MZ- Analysentechnik Inertsil ODS-3 (5 µm, 250 × 4 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,05M octan amonu B: MeCN	[161]
Penicyliny	Sum	Próbkę (4 g) naważono do 80 ml próbki. Dodano 20 ml MeCN:H ₂ O (9:1). Próbkę zhomogenizowano, a następnie przeprowadzono ekstrakcję na wytrząsarce orbitalnej (5 minut). Próbkę odwirowano (4000×g, 15 minut, w 4°C). Supernatant przefiltrowano przez filtr nylonowy o porowatości 0,45 µm. Przesącz (0,25 ml) połączono z buforem cytrynianowo-fosforanowym (4,75 ml, pH 7,6) i przefiltrowano przez filtr nylonowy o porowatości 0,45 µm. Użyto systemu on-line SPE. Wkłady C18 kondycjonowano MeOH (2 ml; przepływ 5 ml/min) oraz H ₂ O (2 ml; przepływ 2 ml/min). Przesącz rozcieńczono w stosunku 1:100 i zaaplikowano (1 ml) na wkład C18. Anality eluowano (2,5 ml H ₂ O).	On-line SPE LC-MS/MS (ESI -) <u>Kolumna</u> Phenomenex Synergy Max (150x4.6 mm; 4 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient A: 2mM mrówczan amonu i 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: MeCN	[162]
β-laktamy	Tkanka mięśniowa drobiowa	Próbki (2,5 g) zhomogenizowano i dodano standard wewnętrzny (200 µl). Dodano roztwór boranowy (10 ml) oraz piperydynę (500 µl), wytrząsano (5 s) i inkubowano w łaźni wodnej (1 godzina, 60°C). Następnie schłodzono (10 minut, temp. pokojowa). Dodano n-heksan (10 ml) i po wytrząsaniu (5 minut)	LC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Waters Acquity UPLC CSH C ₁₈	[120]

WSTĘP TEORETYCZNY

		próbkę odwirowano (3500×g, 15 minut). Warstwę wodną przeniesiono do czystej próbówki i zneutralizowano (pH 7,2) za pomocą kwasu octowego (25%) i/lub amoniaku (2,5%). Kolumnienki SPE Phenomenex Strata-X (200 mg, 6 ml) wykondycjonowano (5 ml MeOH, 5 ml H₂O). Próbkę naniesiono na kolumnienki i przemyto (5 ml MeOH/H₂O; 1:9, v/v), osuszono (5 minut), eluowano (5 ml MeOH/MeCN; 50:50, v/v). Próbkę odparowano (45°C) i rozpuszczono ponownie w 500 µl 1% roztworu piperydyny w wodzie.	(2.1×100 mm, 1.7 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,0032 % amoniaku w H₂O B: 0,0032 % amoniaku w H₂O/MeCN (1:9, v/v)	
β-laktamy	Mleko owcze	Próbki (5 ml) zhomogenizowano i przeniesiono do próbówki. Dodano MeCN (5 ml), mieszano przez 1 minutę. Próbkę odwirowano (3500 obr./min, 20 minut, 4°C). Supernatant przefiltrowano przez filtr strzykawkowy (0,45 µm, Millex-HN). Kolumnienki SPE C18 Spe-ed kondycjonowano (5 ml MeCN, 5 ml H₂O, każda z faz przepuszczana dwukrotnie pod próżnią przez 15 s). Eluowano (2×3 ml mieszaniny buforu fosforanowego pH 3,4 i MeCN, 30:70, v/v). Odparowano i rozpuszczono w 500 µl dejonizowanej H₂O. Pobrano 100 µl do analizy.	HPLC-DAD <u>Kolumna</u> Scharlau Supelcosil LC 18 DB 5 µm (15 cm x 4.6 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 25mM buforu fosforanowego (pH 3,4) B: MeCN	[131]
β-laktamy	Mleko krowie	Próbkę (2 ml) umieszczono w próbówce wirówkowej. Analitę ekstrahowano 4 ml MeCN, dodając go w trzech etapach (2 ml, 1 ml, 1 ml) i ręcznie mieszając. Próbkę umieszczono w poziomym mieszalniku na 15 minut. Następnie odwirowano (5 minut, 4000xg, 5°C). Supernatant przeniesiono do próbówki zawierającej C18 (w ilości co najmniej 100 mg). Próbkę mieszano (15 s), a następnie odwirowano (5 minut, 4000xg). Supernatant przeniesiono do czystej próbówki i schłodzono w zamrażarce (-17°C, 20 minut). Próbkę ponownie odwirowano (10 minut, 4000xg, 0°C). Supernatant przeniesiono do próbówki i odparowano w łaźni wodnej (≤45°C) w strumieniu azotu. Objętość rozpuszczalnika zredukowano do około 500 µl. Końcowa objętość roztworu wynosiła 1 ml (uzyskana poprzez dodanie dejonizowanej wody). Ekstrakt przeniesiono do fiolki HPLC.	LC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Angela Technologies DuraShell RP (C18, 100 x 2.1 mm, 3 µm, 150Å) Prekolumna Phenomenex C18 (4 x 3.0 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H₂O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeOH	[163]
Fluorochinolony β-laktamy	Mleko krowie	Próbki mleka poddano liofilizacji. Próbkę (1 g) zmieszano z roztworem standardowym wzorców. Dodano bufor cytrynianowo-fosforanowy (3 ml, pH 6) i mieszano przez 1 minutę. Następnie dodano mieszaninę MeCN:MeOH (12 ml, 70:30; v/v), mieszano (2 minuty), sonikowano przez 20 minut, a następnie odwirowano (3 minuty, 4109×g). Supernatant przeniesiono do próbówki zawierającej 300 mg sorbentu dyspersyjnego (PSA) oraz 900 mg bezwodnego MgSO₄, wytrząsano (1 minuta), ponownie odwirowano (1 minuta, 4109×g). Ekstrakt odparowano do sucha (40°C) i rozpuszczono w 1 ml	UHPLC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Waters Acquity UPLC BEH™ C18 (1.7 µm; 2.1 × 100 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient:	[164]

WSTĘP TEORETYCZNY

		mieszaniny roztworu mrówczanu amonu (50mM, pH 4) i MeOH (80:20; v/v). Odwirowano (15 minut, 16300×g) i wstrzyknięto do systemu LC.	A: mrówczan amonu 50mM, pH 4 B: MeOH	
Cefalosporyny	Mleko	Próbki mleka (30 g) odwirowano (30 minut, 10800×g, 35°C). Z odtłuszczonego mleka (frakcja środkowa) pobrano 1 g i rozcieńczono do 10 ml w 0,05 M buforze fosforanowym (pH 7,5). MIP-y (20 mg) załadowano do wkładów do ekstrakcji SPE. Wkłady kondycjonowano (10 ml MeOH i 10 ml buforu fosforanowego 0,05M o pH 7,5). Próbki (10 ml) naniesiono na wkłady i przepuszczono przez nie (stały przepływ 0,50 ml/min). Wkłady przepłukano (5 ml mieszaniny MeOH i buforu HEPES 0,1 M, pH 7,5; 2:98 v/v). Anality eluowano (1 ml mieszaniny MeOH zawierającego 0,1% kwas trifluorooctowy). Pobrano 200 µl i rozcieńczono (800 µl H ₂ O). Przekazano do analizy.	UHPLC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Waters Acquity UPLC BEH™ C18 (1.7 µm; 1.0 × 150 mm) <u>Faza ruchoma</u> Izokrat: H ₂ O : MeCN : HCOOH (74,9 : 25 : 0,1; v/v/v)	[165]
β-laktamy	Tkanka mięśniowa wieprzowa	Próbkę (2 g) zhomogenizowano. Sorbent (Oasis HLB) wstępnie kondycjonowano (10 ml MeCN, H ₂ O, 5 ml 2% roztworu NaCl). Do próbki dodano sorbent (3 g) wymieszano i przeniesiono do szklanej kolumny. Kolumnę przemyto (6 ml n-heksanu). Anality eluowano (8 ml MeCN i H ₂ O, oba roztwory zawierały 0,1% kwasu mrówkowego; 50:50). Dodano octan etylu (6 ml), mieszano przez 1 minutę. Następnie próbkę odwirowano (3000×g; 10 minut). Proces ten powtórzono dwukrotnie. Supernatant osuszono (50°C). Pozostałość rozpuszczono w 2 ml mieszaniny MeCN i H ₂ O (10:90, v/v).	UPLC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> ACQUITY UPLC HSS T3 C ₁₈ (1.7 mm, 2.1 x 100 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN	[166]
β-laktamy Diaminopirymidyny Linkozamidy Makrolidy Pleuromutyliny Fluorochinolony Sulfonamidy Tetracykliny	Tkanka mięśniowa	Do próbki (0,5 g) dodano 0,1M EDTA (100 µl). Tkanek mięśniową ekstrahowano mieszaniną MeCN i H ₂ O (3 ml, 80/20, v/v). Próbkę wytrząsano i odwirowano. Przeprowadzono drugą ekstrakcję z użyciem MeCN (3 ml). Zebrane ekstrakty odparowano i rozpuszczono w 1,5 ml 0,2M octanu amonu. Po odwirowaniu próbkę przekazano do analizy.	LC-HRMS/MS ESI+ <u>Kolumna</u> Agilent Technologies Poroshell 120 EC-C18 (100 × 3.0 mm; 2.7 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: MeOH	[167]
β-laktamy	Tkanka mięśniowa wołowa	Próbki o masie (2 g) naważono do probówek wirówkowych. Dodano 100 µl roztworu standardu wewnętrznego oraz roztworu roboczego. Próbki pozostawiono na 15 minut. Dodano 1,9 ml H ₂ O oraz 8 ml MeCN. Próbki zhomogenizowano (20 s) i odwirowano (15 minut; 2842×g, 4°C). Supernatant przeniesiono do probówki zawierającej 500 mg sorbentu C18, mieszano (40 s), a następnie	UHPLC-MS/MS ESI + <u>Kolumna</u> CHS C ₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.7 µm)	[59]

WSTĘP TEORETYCZNY

		odwirowano (15 minut, 2842×g, 4°C) i odparowano w strumieniu azotu (40°C). Kończącą objętość uzupełniono wodą do 1 ml. Ekstrakty przefiltrowano przez filtry strzykawkowe PTFE (0,2 µm). Ekstrakt przeniesiono do fiolek autosamplera.	<u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,01% kwas mrówkowy i 0,2mM octan amonu w H ₂ O B: 0,01% kwas mrówkowy w MeCN	
β-laktamy	Tkanka mięśniowa karczaka	Próbki tkanki (2 g) umieszczono w probówkach ekstrakcyjnych QuEChERS, dodano MeCN zawierający 0,1% kwasu mrówkowego (15 ml), wytrząsano i odwirowano (3000×g, 10 minut). Warstwę acetonitrylu przeniesiono do próbówki oczyszczającej QuEChERS, wytrząsano i ponownie odwirowano (3000×g, 5 minut). Supernatant przeniesiono do szklanej próbówki i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Rozpuszczono ponownie w 2 ml mieszaniny MeCN:H ₂ O (10:90, v/v). Otrzymany roztwór przefiltrowano przez nylonową membranę (0,22 µm) i poddano analizie.	UPLC-Q-Orbitrap-MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Waters HSS T3 C ₁₈ (1.7 µm, 2.1× 100 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN	[84]
β-laktamy Fluorochinolony Linkomycyna Makrolidy Sulfonamidy Tetracykliny	Ryby, krewetki, węgorze	Tkanekę (2 g) umieszczono w próbówce. Dodano mieszaninę wzorców, pozostawiono na 5 minut. Tkanekę ekstrahowano za pomocą 8 ml 0,2% kwasu p-toluenosulfonowego jednowodnego i 2% lodowatego kwasu octowego w acetonitrylu. Mieszano vortexem (30 min, 2500 obr./min), następnie odwirowano (7 min, 4°C, min). Ekstrakt (3 ml) przeniesiono na kolumnienki Oasis PRiME HLB 6 cc (200 mg). Próbkę przepuszczono przez wkłady, a pozostały ekstrakt odparowano prawie do sucha (N ₂ , 55°C). Ekstrakt rozpuszczono w 400 µl 10% acetonitrylu w wodzie (v/v). 300 µl ekstraktu przeniesiono do fiołki autosamplera.	LC-Q-Orbitrap HRMS (HESI +) <u>Kolumna</u> Supelco Ascentis Express C18 (7.5 cm × 2.1 mm, 2.7 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: MeCN	[168]
Penicyliny Cefalosporyny Fluorochinolony Tetracykliny Linkomycyna Sulfonamidy Makrolidy Trimetoprim	Tkanka mięśniowa, mocz od świni (tuczniki)	Mocz: próbkę (5 ml) odwirowano (2500×g, 4°C, 5 min). Kolumnienki Oasis HLB (3 ml, 60 mg) kondycjonowano (3 ml MeOH, 3 ml 0,5 M HCl, 3 ml H ₂ O). Próbkę naniesiono na wkłady, które następnie przemyto (3 ml H ₂ O; 3 ml mieszaniny MeOH:H ₂ O 20:80, v/v). Anality eluowano (5 ml MeOH), a eluat odparowano do sucha. Ekstrakt rozpuszczono ponownie w 200 µl mieszaniny MeOH:H ₂ O, 10:90, v/v. Mięśnie: próbkę (1 g) wzbogacono standardem. Anality ekstrahowano (5 ml buforu McIlvaine'a, pH 4). Dodano kwas trichlorooctowy (100 µl, 20%), próbkę mieszano, sonikowano (10 min), a następnie odwirowano (2500×g, 4°C, 10 min). Supernatant przeniesiono do próbówki i odtłuszczono (2 x 3 ml n-heksanu). Warstwę n-heksanową usuwano po każdym odwirowaniu (2500×g, 5 min). Próbkę oczyszczono i ekstrahowano pod próżnią na wkładach Oasis HLB.	HPLC-MS/MS (ESI +/-) <u>Kolumna</u> Synergi Hydro-RP (150 x 2.0 mm, 4 µm) prekolumnna Phenomenex C18 (4x3.0mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: MeOH	[111]

WSTĘP TEORETYCZNY

		Wkłady kondycjonowano (3 ml MeOH, 3 ml H ₂ O). Próbkę naniesiono na wkłady, które następnie przemyto (2 x 3 ml mieszaniny MeOH:H ₂ O, 5:95, v/v). Anality eluowano (5 ml MeOH), przeniesiono do próbki i odparowano do sucha. Ekstrakt rozpuszczono ponownie w 200 µl mieszaniny MeOH:H ₂ O, 10:90, v/v.		
β-laktamy	Jaja, surowe mleko, przetwory mleczne, mleko modyfikowane, produkty na bazie mięsa i ryb, w tym żywność dla dzieci	Próbki (1 g) naważono do probówek (50 ml). Dodano bufor fosforanowy (15 ml, 500mM, pH 9,2). Probki zhomogenizowano za pomocą ceramicznego miksera. Wytrząsano mechanicznie przez 3 minuty. Następnie dodano MeCN (30 ml) i ponownie wytrząsano przez 1,5 minuty. Dodano mieszaniny soli QuEChERS i wytrząsano przez kolejne 3 minuty. Probki odwirowano (10 minut, 4000×g, temp. pokojowa). Supernatanty (8 ml) przeniesiono do probówek (15 ml) zawierających dyspersyjne sorbenty SPE. Probówki wytrząsano (1,5 min), a następnie odwirowano (4000×g, 5 min, temp. pokojowa). Supernatanty (5 ml) odparowano w strumieniu azotu (35°C), do objętość 0,5 ml. Dodano wodę (0,6 ml), a następnie mieszaninę ponownie odparowano, osiągając końcową objętość 0,5 ml. Ekstrakty przeniesiono do polipropylenowych probówek, odwirowano (17000×g, 10 min, 4°C) i przefiltrowano przez filtr PTFE (0,45 µm). Dalsza analiza została przeprowadzona metodą LC-MS/MS.	LC-MS/MS (ESI +/-) <u>Kolumna</u> prekolumna Waters Acquity BEH VanGuard (2.1 × 5 mm, 1.7µm) Waters Acquity BEH C18 (2.1 ×100 mm, 1.7 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0.5mM mrówczanu amonu i 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,5mM mrówczanu amonu i 0,1% kwas mrówkowy w MeOH	[169]
Aminoglikozydy β-laktamy Makrolidy Fluorochinolony Sulfonamidy Tetracykliny	Ryby	Próbkę (2 g) naważono do próbki wirówkowej. Dodano standard wewnętrzny (200 µl) oraz dejonizowaną wodę (800 µl). Próbkę mieszano (30 s) i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 10 minut. Następnie dodano 5% kwas trichlorooctowy (8 ml). Próbkę homogenizowano przez 20 sekund, umieszczono na wytrząsarce (10 minut), a następnie odwirowano (2700×g, 4°C, 12 minut). Ekstrakt przefiltrowano przez membranę PVDF (4 µm) przed analizą LC-MS/MS.	LC-MS/MS (ESI+) <u>Kolumna</u> Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (150 x 4.6 mm, 1.8 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% HFBA w wodzie B: MeCN	[49, 67]
β-laktamy	Surowe mleko	Sorbent SPE kondycjonowano H ₂ O (2 ml) i MeOH (2 ml), a następnie przeniesiono do szklanej zlewki. Dodano próbkę mleka (500 µl), roztwór standardowy antybiotyków (500 µl) oraz 125 mg zawartości tuby QuEChERS. Przeprowadzono homogenizację z użyciem sonikacji w łaźni ultradźwiękowej (10 minut). Próbkę przeniesiono do pustego wkładu i sprężono. Złoże sorbentu przemyto dwukrotnie (5 ml H ₂ O z 1% acetonem). Anality eluowano (2 ml MeOH). Probki przefiltrowano przez filtry strzykawkowe PVDF (13 mm × 0,45 µm)	HPLC-DAD <u>Kolumna</u> MZ- Analysentechnik Perfectsil ODS-2 (5 µm, 250 × 4mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient:	[170]

WSTĘP TEORETYCZNY

		i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Pozostałości rozpuszczono w 500 µl H ₂ O. Otrzymane próbki (100 µl) przeniesiono do systemu HPLC.	A: 0,05M octan amonu B: MeCN	
Fluorochinolony Sulfonamidy Tetracykliny Makrolidy β-laktamy Aminoglikozydy Linkomycyna Tiamulina	Tkanki wołowe: nerka, wątroba, mięśnie	Próbki (2 g) naważono, następnie dodano mieszaninę MeCN i H ₂ O (4/1; v/v; 10 ml). Wyrzäsano 5 minut. Próbki odwirowano (4150 obr./min, 3 minuty, temperatura pokojowa). 407 µl ekstraktu przeniesiono do fiolki autosamplera. Dodano 273 µl wodnego roztworu odczynnika 1-heptanosulfonianu (146,5mM) oraz 50 µl mieszaniny MeCN i H ₂ O (7/3, v/v). Dalsza analiza została przeprowadzona metodą LC-MS/MS.	LC-MS/MS (ESI +/-) <u>Kolumna</u> Waters Acquity HSS T3 (10 x 2.1mm, 1.8 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN:MeOH 1:1 (v:v)	[171]
β-laktamy Diaminopirymidyny Linkozamidy Makrolidy Pleuromutyliny Fluorochinolony Sulfonamidy Tetracykliny	Tkanka mięśniowa, mleko	Próbki (1,5 g) naważono do próbowki. Do próbek z tkanką mięśniową dodano 100 µl 0,1M EDTA. Próbki ekstrahowano mieszaniną MeCN i H ₂ O (3 ml, 80/20, v/v). Próbki mleka ekstrahowano z użyciem 0,1M EDTA (1 ml) oraz MeCN (3 ml). Obie matryce poddano drugiej ekstrakcji z MeCN (3 ml). Próbki odwirowano, ekstrakty odparowano, a następnie rozpuszczono w 1,5 ml roztworu octanu amonu (0,2M). Do systemu LC wstrzyknięto 10 µl próbki.	LC-MC/MC (ESI +) <u>Kolumna</u> Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 100 mm; 2.7 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: MeOH	[167, 172, 173]
Penicyliny Cefalosporyny Makrolidy Tetracykliny Fluorochinolony Sulfonamidy Aminoglikozydy Pleuromutyliny Diaminopirymidyny Linkozamidy	Pióra kurze	Próbkę (0,2 g) umieszczono w polipropylenowej próbowce i dodano standardy wewnętrzne. Dodano 1 ml 0,02M kwasu szczawowego (pH 4). Próbkę mieszano przez 3 minuty. Następnie dodano 0,5 ml 0,1M Na ₂ EDTA i mieszano przez kolejne 3 minuty. Dodano 8 ml MeCN i wyrzäsano przez 30 minut. Próbkę odwirowano (10 minut, 4200×g). Supernatant przepuszczono przez kolumnienki OASIS HLB, a ekstrakty odparowano do sucha w atmosferze azotu (40°C). Pozostałość rozpuszczono w 0,025% HFBA w wodzie (0,5 ml). Próbki przefiltrowano przez filtr PVDF (0,22 µm). Następnie przeprowadzono analizę metodą UHPLC-MS/MS.	UHPLC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Agilent ZORBAX SB-C18 (50 mm x 2.1 mm x 1.8 µm) Prekolumna Phenomenex octadecyl guard (2 x 4 mm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: MeCN B: 0,025% HFBA w H ₂ O	[174]
β-laktamy	Mięso, nerki, wątroba, boczki, mleko, jaja	Opcja I: Próbkę (1 g), MeCN (2 g), NaCl (0,5 g) i EDTA (40 mg) umieszczono w próbowce wirówkowej. Próbki mieszano przez 5 minut, następnie odwirowano (5 minut, 2700 obr./min). Warstwę acetonitrylu zebrano i odparowano do sucha (40°C, N ₂). Pozostałość rozpuszczono w MeOH	UHPLC-Q-TOF <u>Kolumna</u> Waters Acquity UPLC BEH C18 (30 x 2.1 mm)	[175]

WSTĘP TEORETYCZNY

	miód	(50 µl) i H ₂ O (950 µl), mieszano przez 5 minut, a następnie przefiltrowano przez filtr membranowy. Opcja II: Próbkę miodu (1 g) rozpuszczono w H ₂ O (1 ml). Do próbki dodano kwas bursztynowy (12 mg), EDTA (40 mg) i H ₂ O (2 ml), umieszczono w probówce wirówkowej (15 ml) i wymieszano. Dodano MeCN (2 ml) i siarczan amonu (2 mg), mieszano przez 5 minut, a następnie odwirowano (5 minut przy 2700 obr./min). Warstwę acetonitrylu zebrano i odparowano do sucha (40°C, N ₂). Do pozostałości dodano MeOH (50 µl) i H ₂ O (950 µl), mieszano przez 5 minut, a następnie przefiltrowano przez filtr membranowy.	<u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: 0,1% kwas mrówkowy w MeCN	
Ceftiofur	Mleko, tkanka mięśniowa wołowa, wieprzowa kurza	Próbki mleka (10 g) zmieszano z mieszaniną wzorców, dodano zakwaszony acetonitryl (4 ml, pH 4) i odwirowano (10 minut, 3000 obr./min). Supernatant odparowano, a następnie rozpuszczono w 10 ml H ₂ O. Próbki mięśni (5 g) zmieszano z mieszaniną wzorców, dodano MeCN (3 ml). Próbki wymieszano i odwirowano (10 minut, 3000 obr./min). Supernatanty odparowano i rozpuszczono w H ₂ O (10 ml). MIP-y (120 mg) załadowano do wkładów SPE. Kolumnienki kondycjonowano (10 ml MeOH, 10 ml H ₂ O). Przygotowane wodne roztwory próbek (10 ml) naniesiono na wkłady i eluowano (1,5 ml mieszaniny MeOH:H ₂ O, 70:30, v/v). Eluaty analizowano za pomocą HPLC-UV.	HPLC-UV <u>Kolumna</u> C18 (4.6 × 150 mm) <u>Faza ruchoma</u> Izokrat: acetonitryl : 0,2 % kwas octowy w wodzie (30/70, v/v)	[176]
Penicyliny Cefalosporyny Makrolidy Tetracykliny Fluorochinolony Sulfonamidy Aminoglikozydy Pleuromutyliny Diaminopirymidyny Linkozamidy	jaja	Naważono próbkę (1,5 g) do polipropylenowej próbówki i wzbogacono standardem. Dodano 0,5 ml 0,1M Na ₂ EDTA oraz mieszaninę MeCN i H ₂ O (4:1, v/v; 3 ml) z 0,05% kwasem mrówkowym. Próbkę wytrząsano i odwirowano. Supernatant przeniesiono do próbówki. Ekstrakcję powtórzono z użyciem MeCN (3 ml), próbkę wytrząsano, odwirowano i sonikowano przez 10 minut. Supernatanty połączono i odparowano (40°C; N ₂). Pozostałość rozpuszczono w 1,5 ml 0,2M octanu amonu i odwirowano (14000×g, 30 min, 4°C). Do systemu LC-HRMS wstrzyknięto 5 µl próbki.	LC-Q-Orbitrap HRMS <u>Kolumna</u> Agilent Technologies Poroshell 120 EC-C18 32k (100 x 3 mm; 2.7 µm) <u>Faza ruchoma</u> [167] Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O B: MeOH	[177]
β-laktamy Makrolidy Tetracykliny Fluorochinolony Sulfonamidy Pleuromutyliny Linkozamidy	Mleko: krowie, owcze, kozie	Próbkę (1 g) umieszczono w probówce. Dodano 0,1 M EDTA (100 µl) oraz MeCN z 2% kwasem mrówkowym (4 ml). Próbkę mieszano przez 30 sekund, a następnie odwirowano (6000 obr./min, 5°C, 10 minut). Supernatant naniesiono na kolumnienki SPE Oasis HLB PRiME, który wcześniej kondycjonowano (3 ml MeCN). Oczyszczony ekstrakt (100 µl) przeniesiono do fiolki i rozcieńczono (900 µl roztworu 0,2M octanu amonu i metanolu, 9:1, v/v).	LC-Orbitrap- HRMS <u>Kolumna</u> Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 x 3 mm; 2.7 µm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,1% kwas mrówkowy w H ₂ O	[178]

WSTĘP TEORETYCZNY

			B: MeOH	
β-laktamy Makrolidy Fluorochinolony Sulfonamidy	Tkanka mięśniowa kurza	Próbkę (2 g) umieszczono w probówce wirówkowej, wzbogacono wzorcami i wytrząsano przez 1 minutę. Pozostawiono na 20 min (temperatura pokojowa). Dodano rozpuszczalnik ekstrakcyjny (10 ml, MeCN:MeOH, 10:20, v/v), wymieszano, poddano sonikacji przez 15 minut i odwirowano (3500 obr./min, 5 minut). Górną warstwę supernatantu (1 ml) przefiltrowano przez nylonowy filtr strzykawkowy (0,2 μm) i odparowano do sucha w temperaturze 35°C za pomocą wyparki rotacyjnej. Pozostałość rozpuszczono w 1 ml MeOH. Próbkę (20 μl) wstrzyknięto do systemu LC-UV.	LC-UV <u>Kolumna</u> Phenomenex Hypersil BDS-C18 (3 μm, 100mm x 4 mm) <u>Faza ruchoma</u> Izokrat: 0,05M Na ₂ HPO ₄ :MeCN : MeOH (70:10:20), pH 8	[179]
β-laktamy	Tkanka mięśniowa kurza, produkty wodne, mleko oraz jaja	Próbkę (1 g) umieszczono w polipropylenowej probówce wirówkowej. Dodano mieszaninę MeCN:H ₂ O (12 ml, 75:25, v/v) i mieszano przez 3 minuty. Roztwór odwirowano (5 minut, 10000 obr./min, 4°C), supernatant (9 ml) przeniesiono do próbki zawierającej 300 mg sorbentu C18. Próbkę mieszało vortexem przez 30 sekund i ponownie odwirowano (5 minut, 10000 obr./min, 4°C). Supernatant (6 ml) przeniesiono do próbki i odparowano do sucha w strumieniu azotu (40°C). Pozostałość rozpuszczono w 1 ml mieszaniny MeCN:0,1% kwas mrówkowy (1:9, v/v). Ekstrakt mieszało (10 sekund), a następnie przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PTFE (0,2 μm). Przekazano do analizy UPLC-MS/MS.	UPLC-MS/MS (ESI +) <u>Kolumna</u> Agilent ZORBAX SB-Aq column (2.1 × 150 mm, 3.5 μm) <u>Faza ruchoma</u> Gradient: A: 0,4% kwas mrówkowy w H ₂ O B: MeCN	[180]

W analizie żywności pochodzenia zwierzęcego, szczególnie pod kątem wykrywania pozostałości antybiotyków, najczęściej stosuje się technikę LC-MS/MS. Wynika to z jej zdolności do oznaczania stężeń i identyfikacji wielu związków w skomplikowanych matrycach (np. tkanka mięśniowa, miód, mleko, jaja). Dzięki jednoczesnemu monitorowaniu jonów prekursora i produktów ich fragmentacji, technika ta charakteryzuje się wysoką czułością oraz selektywnością, co umożliwia analizę nawet śladowych ilości antybiotyków. Z tego względu LC-MS/MS stanowi standard w laboratoriach zajmujących się monitorowaniem i kontrolowaniem żywności, zapewniając wysoki poziom bezpieczeństwa i jakości produktów pochodzenia zwierzęcego.

4. Cel pracy

Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej było opracowanie i wdrożenie wieloskładnikowych procedur oznaczania pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego, z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Opracowane procedury miały na celu umożliwienie oznaczania antybiotyków z różnych grup chemicznych, takich jak tetracykliny, β -laktamy (penicyliny i cefalosporyny), makrolidy, linkozamidy, pleuromutyliny, aminoglikozydy, sulfonamidy, fluorochinolony oraz diminopirymidyny, w kluczowych matrycach. Zgodnie z obowiązującymi dokumentami prawnymi, wytypowano leki weterynaryjne oraz matryce, takie jak mięśnie, nerki, mleko, miód i jaja, które miały być wdrożone do badań w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii **Tabela 6**.

Tabela 6. Wytypowane antybiotyki i matryce

GRUPA	ZWIĄZKI		MATRYCA
Tetracykliny	oksytetracyklina 4-epioksytetracyklina tetracyklina 4-epitetracyklina	chlorotetracyklina 4-epichlorotetracyklina doksycyklina	mięśnie nerka mleko jaja miód
Linkozamidy	linkomycyna		mięśnie nerka mleko jaja miód
Aminoglikozydy	spektynomycyna streptomycyna dihydrostreptomycyna kanamycyna A	paromomycyna neomycyna gentamycyna	mięśnie mleko nerka
	streptomycyna		miód
Fluorochinolony	marbofloksacyna norfloksacyna ciprofloksacyna danofloksacyna enrofloksacyna	sarafloksacyna difloksacyna kwas oksolinowy kwas nalidyksowy flumechina	mięśnie nerka mleko jaja miód
Sulfonamidy	sulfaguanidyna sulfadiazyna sulfametoksypiryda- zyna sulfametazyna sulfatiazol sulfamonometoksyna	sulfadoksyna sulfachinoksalina sulfadimetoksyna sulfametoksazol sulfamerazyna	mięśnie nerka mleko jaja miód
	sulfacetamid sulfachloropiryda-zyna sulfapirydyna	sulfisoksazol sulfachloropirazylna	miód

CEL PRACY

β -laktamy	amoksycylina ampicylina penicylina G penicylina V oksacylina kloksacylina nafecylina dikloksacylina	cefapiryna ceftiofur cefkwinom cefalonium cefazolina cefaleksyna cefoperazon	mięśnie nerka mleko jaja
Makrolidy	tylozyna erytromycyna spiramycyna	tylmikozyna jozamycyna tulatromycyna	mięśnie nerka mleko jaja
	tylozyna	erytromycyna	miód
Pleuromutyliny	tiamulina		mięśnie jaja
Diaminopirymidyny	trimetoprim		mięśnie nerka miód

Kluczowym etapem było dobranie technik ekstrakcji antybiotyków, które zapewnią skuteczną separację analitów, minimalizację efektu matrycy oraz zwiększenie czułości oznaczeń. Przeprowadzono optymalizację parametrów chromatograficznych oraz warunków detekcji w spektrometrii mas z zastosowaniem źródła jonów ESI.

W ramach badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej zaplanowano walidację opracowanych procedur oznaczania pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego, zgodnie z wymogami normy EN/PN ISO 17025 oraz Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808. Walidacja była kluczowym etapem w procesie wdrażania procedur i obejmowała szczegółową ocenę kilku kluczowych parametrów m.in.:

- decyzyjna wartość graniczna – $CC\alpha$
- zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych – $CC\beta$
- powtarzalność
- odtwarzalność
- odporność metody
- odzysk
- efekt matrycy
- niepewność pomiaru.

Kolejnym celem było wdrożenie opracowanych procedur badawczych w akredytowanym Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu,

CEL PRACY

co wymagało uzyskania akredytacji w Polskim Centrum Akredytacji (PCA). Proces ten obejmował audyty wewnętrzne, zewnętrzne, a także audyt Unii Europejskiej, weryfikujące zgodność procedury z normą EN/PN ISO 17025 [181] oraz obowiązującymi regulacjami prawnymi w Polsce i Unii Europejskiej.

5. Część doświadczalna

5.1. Stosowany sprzęt i wyposażenie laboratoryjne, odczynniki oraz wzorce antybiotyków

5.1.1. Sprzęt i wyposażenie laboratoryjne

- Chromatograf cieczowy (Acquity UPLC H-Class) sprzężony z tandemowym spektrometrem mas (LC-ESI-MS/MS) – Waters Xevo TQ
- Chromatograf cieczowy (Acquity UPLC I-Class) sprzężony z tandemowym spektrometrem mas (LC-ESI-MS/MS) – Waters Xevo TQ-XS
- Kolumna chromatograficzna Waters Acquity UPLC HSS C18; 1,8 μ m; 2,1 x 100mm
- Filtr do kolumny chromatograficznej 0,2 μ m; 2,1 mm – Waters.
- Waga analityczna o działce elementarnej 0,0001 g – Radwag
- Waga laboratoryjna o działce elementarnej 0,001 g – Sartorius
- Wirówka z chłodzeniem – MPW
- Mieszadło laboratoryjne typu Vortex – IKA
- Wytrząsarka laboratoryjna o ruchu posuwisto-zwrotnym – Heidolph
- Pipety automatyczne – Eppendorf
- Wyparka obrotowa – Heidolph
- Blok grzejny (zestaw do odparowywania w strumieniu azotu) – Cole-Parmer
- Zestaw do ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z pompką próżniową – J.T. Baker
- pH-metr – WTW
- Łaźnia ultradźwiękowa – Polsonic
- Urządzenie do rozdrabniania próbek (homogenizator, blender, maszynka do mielenia mięsa)
- System do oczyszczania wody – ELGA LabWater
- Szkło laboratoryjne
- Probówki wirówkowe polipropylenowe
- Strzykawki 2 ml

- Igły do strzykawek
- Filtry strzykawkowe (0,45 µm, 13mm, PVDF)

5.1.2. Odczynniki

- Ultraczysta woda (18,2 MΩ cm⁻¹) była wytwarzana na miejscu przy użyciu systemu do oczyszczania wody
- Acetonitryl do LC-MS (min. 99,95%) – Chemsolve, Polska
- Metanol do LC-MS (min. 99,95%) – Chemsolve, Polska
- Kwas trichlorooctowy – MERCK, Niemcy
- Kwas heptafluorobutyłowy (HFBA) – Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone
- Kwas mrówkowy (98-100%), LC-MS – Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone
- Kwas octowy 99-100%, LC-MS – Chemlab, Belgia
- Kwas szczawiowy – Chempur, Polska
- Na₂EDTA – Chempur, Polska
- Bezwodny siarczan magnezu – Chempur, Polska
- Wodorotlenek sodu czda – Chempur, Polska
- Octan sodu trihydrat – Chemsolve, Polska
- Kolumnienki SPE Oasis HLB (200mg/6ml) – Waters, Stany Zjednoczone
- Kolumnienki SPE Strata-X (100mg/6ml) – Phenomenex, Stany Zjednoczone
- Kolumnienki SPE SCX (500mg/3ml) – Phenomenex, Stany Zjednoczone

5.1.3. Substancje wzorcowe antybiotyków

Substancje wzorcowe były zgodne z międzynarodowymi normami, w tym ISO 17034 [182], ISO 17025 oraz ISO 9001[183]. Warunki ich przechowywania zostały zapewnione zgodnie z wymaganiami określonymi w certyfikatach dostawców, aby zagwarantować stabilność i niezmienność właściwości chemicznych oznaczanych związków.

- β-laktamy:

trihydrat amoksycyliny, sól potasowa penicyliny G, sól potasowa penicyliny V, monohydrat soli sodowej oksacyliny, monohydrat soli sodowej kloksacyliny, sól sodowa nafcyliny, monohydrat soli sodowej dikloksacyliny, siarczan cefkwinomu, sól sodowa cefazoliny, monohydrat cefaleksyny – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

ampicylina, hydrat cefalonium, dwuwodny cefoperazon – Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

cefapiryna – Toronto Research Chemicals, Kanada

sól sodowa ceftiofuru – HPC Standards GmbH, Niemcy

- Aminoglikozydy:

dichlorowodorek pentahydrat spektynomycyny, siarczan streptomycyny, seskwisiarczan dihydrostreptomycyny, siarczan kanamycyny, siarczan paromomycyny, siarczan neomycyny, siarczan gentamycyny – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

- Makrolidy:

fosforan tylozyny, erytromycyna, spiramycyna, tylmikozyne, tulatromycyna A – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

jozamycyna – Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

- Fluorochinolony:

marbofloksacyna, norfloksacyna, ciprofloksacyna, danofloksacyna, enrofloksacyna, chlorowodorek sarafloksacyny, chlorowodorek difloksacyny, kwas oksolinowy, kwas nalidyksowy, flumechina – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

- Tetracykliny:

chlorowodorek oksytetracykliny, 4-epioksy-tetracyklina, chlorowodorek tetracykliny, chlorowodorek 4-epitetracyklina, chlorowodorek chlorotetracykliny, chlorowodorek 4-epichlorotetracykliny – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

monohydrat doksy-cykliny – Glentham Life Sciences, Wielka Brytania

- Linkozamidy:

chlorowodorek monohydrat linkomycyny – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

- Pleuromutyliny:

tiamulina – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

- Diaminopirymidyny:

trimetoprim – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

- Sulfonamidy:

sulfatiazol, sulfaguanidyna, sulfamerazyna, sulfadiazyna, sulfametazyna, sulfametoksazol, sulfadoksyna, sulfadimetoksyna, sulfachinoksalina, sulfametoksypirydazyna, sulfacetamid, sulfapirydyna, sulfisoksazol, sulfachloropirydazyna, monohydrat soli sodowej sulfachloropirazyny, sulfametizol, sulfafenazol (standard wewnętrzny) – Dr. Ehrenstorfer, Niemcy

sulfamonometoksyna – Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

5.2. Przygotowanie roztworów podstawowych antybiotyków

Przygotowano roztwory podstawowe o stężeniu 1000 µg/ml, uwzględniając postać chemiczną oraz czystość substancji określoną w certyfikacie.

- Roztwory podstawowe β-laktamów

Dla amoksycyliny, ampicyliny, penicyliny G, penicyliny V, oksacyliny, kloksacyliny, nafcyliny, dikloksacyliny, cefapiryny, cefkwinomu, cefazoliny, cefaleksyny sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml, oddzielnie dla każdego analitu. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono mieszaniną metanol : woda (1:1, v/v) do kreski. Roztwory zachowywały właściwości metrologiczne przez 3 miesiące, przechowywano je w temperaturze ≤ -18°C.

Dla ceftiofuru i cefalonium sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml, oddzielnie dla każdego analitu. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono mieszaniną metanol : acetonitryl : woda (1:1:1, v/v/v) do kreski. Roztwory zachowywały właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano je w temperaturze ≤ -18°C.

Dla cefoperazonu sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono mieszaniną acetonitryl : woda (1:1, v/v) do kreski. Roztwór zachowywał właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano go w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwory podstawowe aminoglikozydów

Dla spektynomycyny, streptomycyny, dihydrostreptomycyny, kanamycyny A, paromomycyny, neomycyny, gentamycyny sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml, oddzielnie dla każdego analitu. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono do kreski mieszaniną woda : acetonitryl : kwas octowy (78:20:2, v/v/v). Roztwory zachowywały właściwości metrologiczne przez 3 miesiące i przechowywano je w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwory podstawowe makrolidów

Dla tylozyny, erytromycyny, spiramycyny, tylmikozy, jozamycyny, tulatromycyny sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml, oddzielnie dla każdego analitu. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono metanolem do kreski. Roztwory zachowywały właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano je w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwory podstawowe fluorochinolonów

Dla marbofloksacyny, norfloksacyny, ciprofloksacyny, danofloksacyny, enrofloksacyny, sarafloksacyny, difloksacyny, kwasu oksolinowego, kwasu nalidyksowego, flumechiny sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml, oddzielnie dla każdego analitu. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono do kreski roztworem 1M NaOH w metanolu. Roztwory zachowywały właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano je w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwory podstawowe tetracyklin

Dla oksytetracykliny, 4-epioksy-tetracykliny, tetracykliny, 4-epitetacykliny, chlorotetracykliny, 4-epichlorotetracykliny, doksycykliny sporządzono roztwór

wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml, oddzielnie dla każdego analitu. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono do kreski metanolem. Roztwory zachowywały właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano je w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwór podstawowy dla antybiotyku z grupy linkozamidów

Dla linkomycyny sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono metanolem do kreski. Roztwór zachowywał właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano go w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwór podstawowy dla antybiotyku z grupy pleuromutylin

Dla tiamuliny sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono metanolem do kreski. Roztwór zachowywał właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano go w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwór podstawowy dla antybiotyku z grupy diaminopirymidyn

Dla trimetoprimu sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono metanolem do kreski. Roztwór zachowywał właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano go w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- Roztwory podstawowe sulfonamidów

Dla sulfamonometoksyny, sulfaguanidyny, sulfadiazyny, sulfatiazolu, sulfametazyny, sulfametoksypirydazyny, sulfadoksyny, sulfamerazyny, sulfadimetoksyny, sulfametoksazolu, sulfacetamidu, sulfisoksazolu, sulfapirydyny, sulfachloropirydazyny, sulfachloropirazyny, sulfametizolu sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml, oddzielnie dla każdego analitu. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono do kreski metanolem. Roztwory zachowywały właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano je w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

Dla sulfachinoksaliny sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 µg/ml. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej

i uzupełniono mieszaniną acetonitryl : metanol (1:1, v/v) do kreski. Roztwór zachowywał właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano go w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

Dla sulfafenazolu (IS) sporządzono roztwór wzorcowy o stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$. Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 10 mg czystej substancji wzorcowej i uzupełniono metanolem do kreski. Roztwór zachowywał właściwości metrologiczne przez 12 miesięcy i przechowywano go w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

5.3. Procedura badawcza oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w tkankach zwierzęcych i produktach spożywczych metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas

Celem tej procedury jest przedstawienie metody oznaczania pozostałości różnych grup antybiotyków i chemioterapeutyków w materiałach biologicznych, takich jak mięśnie i nerki różnych gatunków zwierząt oraz mleko. Obecność tych substancji w produktach pochodzenia zwierzęcego wymaga szczególnej kontroli, ponieważ przekroczenie dopuszczalnych limitów może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Dlatego też zawartość antybiotyków w tych produktach nie może przekraczać wartości MRL określonych w przepisach prawnych. Nie wszystkie antybiotyki mają ustalony MRL co oznacza, że ich obecność w żywności jest niedozwolona. Przykładem może być sarafloksacyna, która nie ma ustalonej wartości MRL w mięśniach, nerkach i mleku. Innym przykładem jest doksyCYklina, która ma wyznaczone wartości MRL dla mięśni i nerek, a nie posiada MRL dla mleka. W przypadku substancji przeciwbakteryjnych, dla których wartości MRL różnią się w zależności od gatunku zwierzęcia, dla celów metody uśredniano tę wartość i wybrano najniższą (np. tilmikozyna w mięśniach).

Poziom wzbogacenia próbek został dostosowany zgodnie z obowiązującymi limitami MRL określonymi w Rozporządzeniu (UE) nr 37/2010 [6] oraz wytycznymi „Krajowego Planu kontroli pozostałości zakazanych lub niedopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych oraz weterynaryjnych produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego, opartymi na analizie ryzyka”. Plan ten jest wydawany raz w roku przez Główny Inspektorat Weterynarii.

Opracowana procedura oznaczania antybiotyków opierała się na zastosowaniu dwóch odrębnych podejść ekstrakcyjnych, dostosowanych do właściwości chemicznych poszczególnych grup antybiotyków. Dla związków takich jak β -laktamy, makrolidy, pleuromutyliny, sulfonamidy, fluorochinolony oraz diaminopirymidyny, optymalnym rozpuszczalnikiem okazał się acetonitryl (ekstrakcja MeCN), który zapewnił skuteczną ekstrakcję tych związków z badanych matryc. Z kolei dla grup takich jak tetracykliny, aminoglikozydy i linkozamidy, lepsze wyniki osiągnięto, stosując kwas trichlorooctowy (ekstrakcja TCA). Zastosowanie dwóch różnych metod pozwala na dopasowanie procesu ekstrakcji do właściwości poszczególnych grup związków, co gwarantuje dokładność i powtarzalność wyników.

I. Przygotowanie roztworów roboczych do wzbogacenia próbek

Roztwór roboczy standardu wewnętrznego (IS) sulfafenazolu (2 $\mu\text{g/ml}$) w wodzie przygotowywano na bieżąco. W tym celu pobierano 20 μl roztworu podstawowego sulfafenazolu o stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$ do kolbki miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski.

Przygotowanie roztworów roboczych związków odbywało się na bieżąco, z uwzględnieniem odpowiednich wartości MRL oraz rodzaju matrycy. Do kolbki miarowej o pojemności 50 ml i 10 ml dodawano odpowiednie ilości wzorców, zgodnie z wartościami podanymi w tabeli (**Tabela 7** – tkanka mięśniowa, **Tabela 8** – mleko, **Tabela 9** – nerka) po czym uzupełniano wodą destylowaną do kreski.

Tabela 7. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – tkanka mięśniowa

Tkanka mięśniowa – ekstrakcja MeCN			
	Związek	MRL/ przyjęta wartość	Przygotowanie roztworu
1	Cefalonium	20	20 μl x 1000 $\mu\text{g/ml}$ do 50 ml
2	Penicylina V	25	25 μl x 1000 $\mu\text{g/ml}$ do 50 ml
3	Sarafloksacyna	30	30 μl x 1000 $\mu\text{g/ml}$ do 50 ml
4	Amoksycylina	50	50 μl x 1000 $\mu\text{g/ml}$ do 50 ml
5	Ampicylina	50	
6	Penicylina G	50	
7	Cefapiryna	50	
8	Cefkwinom	50	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

9	Cefazolina	50	50 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
10	Cefoperazon	50	
11	Tylmikozyzna	50	
12	Trimetoprim	50	
13	Tulatromycyna	50	
14	Tiamulina	50	
15	Sulfaguanidyna	100	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
16	Sulfadiazyna	100	
17	Sulfametoksypirydazyna	100	
18	Sulfametazyna	100	
19	Sulfatiazol	100	
20	Sulfamonometoksyna	100	
21	Sulfadoksyna	100	
22	Sulfachinoksalina	100	
23	Sulfadimetoksyna	100	
24	Sulfametoksazol	100	
25	Sulfamerazyna	100	
26	Tylozyna	100	
27	Norfloksacyna	100	
28	Ciprofloksacyna	100	
29	Enrofloksacyna	100	30 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
30	Danofloksacyna	100	
31	Kwas oksolinowy	100	40 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
32	Kwas nalidyksowy	100	
33	Marbofloksacyna	150	
34	Cefaleksyna	200	
35	Erytromycyna	200	
36	Spiramycyna	200	
37	Flumechina	200	60 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
38	Jozamycyna	200	
39	Oksacylina	300	
40	Kloksacylina	300	60 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
41	Nafcylina	300	
42	Dikloksacylina	300	
43	Difloksacyna	300	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

44	Ceftiofur	1000	200 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
Tkanka mięśniowa – ekstrakcja TCA			
	Związek	MRL/ przyjęta wartość	Przygotowanie roztworu
1	Gentamycyna	50	50 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
2	Kanamycyna A	100	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
3	Linkomycyna	100	
4	Oksytetracyklina (suma oksytetracyklina i 4-epioksytetracyklina)	100	
5	Tetracyklina	100	
6	4-epitetracyklina	100	
7	Chlorotetracyklina	100	
8	4-epichlorotetracyklina	100	60 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
9	Doksycyklina	100	
10	Spektynomycyna	300	100 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
11	Streptomycyna	500	
12	Dihydrostreptomycyna	500	
13	Paromomycyna	500	
14	Neomycyna	500	

Tabela 8. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – mleko

Mleko – ekstrakcja MeCN			
	Związek	MRL/ przyjęta wartość	Przygotowanie roztworu
1	Amoksycylina	4	4 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
2	Ampicylina	4	
3	Penicylina G	4	
4	Penicylina V	4	
5	Cefkwinom	20	20 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
6	Cefalonium	20	
7	Oksacylina	30	30 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
8	Kloksacylina	30	
9	Nafcylina	30	30 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
10	Dikloksacylina	30	
11	Danofloksacyna	30	
12	Erytromycyna	40	40 µl x 1000 µg/ml do 50 ml

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

13	Cefazolina	50	50 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
14	Cefoperazon	50	
15	Tylmikozyzna	50	
16	Tylozyna	50	
17	Jozamycyna	50	
18	Difloksacyna	50	
19	Kwas oksolinowy	50	
21	Kwas nalidyksowy	50	
21	Flumechina	50	60 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
22	Cefapiryna	60	
23	Marbofloksacyna	75	75 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
24	Ceftiofur	100	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
25	Cefaleksyna	100	
26	Sulfaguanidyna	100	
27	Sulfadiazyna	100	
28	Sulfametoksypirydazyna	100	
29	Sulfametazyna	100	
30	Sulfatiazol	100	
31	Sulfamonometoksyna	100	
32	Sulfadoksyna	100	
33	Sulfachinoksalina	100	
34	Sulfadimetoksyna	100	
35	Sulfametoksazol	100	
36	Sulfamerazyna	100	
37	Norfloksacyna	100	
38	Ciprofloksacyna	100	
39	Enrofloksacyna	100	
40	Sarafloksacyna	100	
41	Spiramycyna	200	40 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
Mleko – ekstrakcja TCA			
	Związek	MRL/ przyjęta wartość	Przygotowanie roztworu
1	Paromomycyna	100	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
2	Gentamycyna	100	
3	Oksytetracyklina (suma oksytetracyklina i 4-epioksytetracyklina)	100	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4	Tetracyklina	100	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
5	4-epitetracyklina	100	
6	Chlorotetracyklina	100	
7	4-epichlorotetracyklina	100	
8	Doksycyklina	100	
9	Linkomycyna	150	30 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
10	Kanamycyna A	150	
11	Spektynomycyna	200	40 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
12	Streptomycyna	200	
13	Dihydrostreptomycyna	200	
14	Neomycyna	1500	300 µl x 1000 µg/ml do 10 ml

Tabela 9. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – nerka

Nerka – ekstrakcja MeCN			
	Związek	MRL/ przyjęta wartość	Przygotowanie roztworu
1	Penicylina V	25	25 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
2	Amoksycylina	50	50 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
3	Ampicylina	50	
4	Penicylina G	50	
5	Trimetoprim	50	
6	Cefapiryna	100	
7	Cefalonium	100	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
8	Cefazolina	100	
9	Cefoperazon	100	
10	Jozamycyna	100	
11	Tylozyna	100	
12	Sarafloksacyna	100	
13	Sulfaguanidyna	100	
14	Sulfadiazyna	100	
15	Sulfametoksypirydazyna	100	
16	Sulfametazyna	100	
17	Sulfatiazol	100	
18	Sulfamonometoksyna	100	
19	Sulfadoksyna	100	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

20	Sulfachinoksalina	100	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
21	Sulfadimetoksyna	100	
22	Sulfametoksazol	100	
23	Sulfamerazyna	100	
24	Kwas oksolinowy	150	30 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
25	Kwas nalidyksowy	150	
26	Marbofloksacyna	150	
27	Danofloksacyna	200	40 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
28	Enrofloksacyna	200	
29	Cefkwinom	200	
30	Erytromycyna	200	
31	Norfloksacyna	200	
32	Ciprofloksacyna	200	50 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
33	Tylmikozyzna	250	
34	Kloksacylina	300	
35	Nafcylina	300	
36	Oksacylina	300	60 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
37	Spiramycyna	300	
38	Dikloksacylina	300	
39	Difloksacyna	600	
40	Cefaleksyna	1000	200 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
41	Flumechina	1000	
42	Tulatomycyna	3000	600 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
43	Ceftiofur	6000	1200 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
Nerka – ekstrakcja TCA			
	Związek	MRL/ przyjęta wartość	Przygotowanie roztworu
1	Oksytetracyklina (suma oksytetracyklina i 4-epioksytetracyklina)	600	120 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
2	Tetracyklina	600	
3	4-epitetracyklina	600	
4	Chlorotetracyklina	600	
5	4-epichlorotetracyklina	600	
6	Doksycyklina	600	
7	Gentamycyna	750	150 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
8	Streptomycyna	1000	200 µl x 1000 µg/ml do 10 ml

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

9	Dihydrostreptomycyna	1000	200 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
10	Paromomycyna	1500	300 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
11	Linkomycyna	1500	
12	Kanamycyna A	2500	500 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
13	Spektynomycyna	5000	1000 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
14	Neomycyna	5000	

II. Przygotowanie i przechowywanie próbek do badań

Próbki mięśni, nerek i mleka, pobrane do badań przez Inspekcję Weterynaryjną (próbki pobierane z województwa wielkopolskiego, zachodniopomorskiego i lubuskiego), po zarejestrowaniu i nadaniu numeru badania były dzielone na dwie części. Jedną część (B), oznakowaną numerem badania i kierunkiem badania, przechowuje się w zamrażarce, aby nie uległa zniszczeniu ani zepsuciu, a druga część (A) została zhomogenizowana. Po homogenizacji próbki były przechowywane w zamrażarce do dnia analizy.

III. Próbki matrycowe wolne od leków przeciwbakteryjnych

Próbki, w których wcześniej nie stwierdzono obecności leków przeciwbakteryjnych, zostały zachowane do późniejszego wykorzystania przy tworzeniu zarówno próbek ślepych, jak i wzbogaconych. Próbki te posłużyły jako materiał odniesienia, umożliwiając monitorowanie ważności wyników oraz zapewnienie, że nie doszło do zanieczyszczeń podczas procesu analizy.

5.3.1. Oczyszczanie próbek i przygotowanie do analizy LC-MS/MS

I. Ekstrakcja MeCN – oznaczanie β-laktamów, makrolidów, pleuromutylin, sulfonamidów, fluorochinolonów oraz diaminopirymidyn

Do każdej serii próbek mięśni, nerek lub mleka dodano próbkę odczynnikową, ślepa matrycową oraz trzy próbki fortyfikowane, postępując z nimi w taki sam sposób, jak z próbkami badanymi. Próbkę odczynnikową przygotowano, odważając $(2,00 \pm 0,01)$ g wody do polipropylenowych probówek wirówkowych o pojemności 50 ml. Próbka ślepa – odważono $(2,00 \pm 0,01)$ g materiału wolnego od leków przeciwbakteryjnych, również umieszczonego w probówkach wirówkowych o tej samej pojemności. Dla próbek badanych odważono $(2,00 \pm 0,01)$ g próbki, natomiast próbki

fortyfikowane zostały przygotowane poprzez odważenie ($2,00 \pm 0,01$) g czystej próbki wolnej od leków przeciwbakteryjnych (matrycy). Do każdej analizowanej próbki, z wyjątkiem próbki odczynnikowej, dodano 100 μl wzorca wewnętrznego o stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$. Do próbek fortyfikowanych dodano odpowiednią ilość mieszaniny wzorców według wartości, które przedstawia **Tabela 10**. Zawartość każdej próbki została dokładnie wymieszana na vortexie, odstawiona na około 10 minut, a następnie przystąpiono do etapu ekstrakcji.

Tabela 10. Sposób przygotowania próbek fortyfikowanych

Fortyfikat	Naważka (matryca) [g]	Ilość roztworu wzorcowego [μl]	Ilość roztworu IS (2 $\mu\text{g/ml}$) [μl]
Próbka odczynnikowa	2,00 (woda)	0	0
Próbka ślepa	2,00	0	100
Fortyfikat 0,5 MRL	2,00	50	100
Fortyfikat 1,0 MRL	2,00	100	100
Fortyfikat 1,5 MRL	2,00	150	100
Kontrola odzysku	2,00	100	100

Do każdej próbki dodano 8 ml MeCN. Zawartość wymieszano na vortexie przez 30 sekund, a następnie wytrząsano przez około 10 minut. Próbki wirowano przez 10 minut przy szybkości 4500 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Następnie pobrano po 6 ml supernatantu do kolbek okrągłodennych o pojemności 50 ml i całość odparowano do sucha na wyparce obrotowej w temperaturze 45°C . Po odparowaniu suchą pozostałość rozpuszczono w 0,6 ml 0,025% HFBA, wymieszano na vortexie i przesączono przez filtr strzykawkowy (0,45 μm , 13 mm, PVDF) do fiołki. Próbki zostały przeznaczone do analizy LC-MS/MS.

II. Ekstrakcja TCA – oznaczanie tetracykliny, aminoglikozydów, linkozamidów

Do każdej serii próbek mięśni, nerek lub mleka dodano próbkę odczynnikową, ślepa matrycową oraz trzy próbki fortyfikowane, postępując z nimi w taki sam sposób, jak z próbkami badanymi. Próbkę odczynnikową przygotowano, odważając ($2,00 \pm 0,01$) g wody do polipropylenowych probówek wirówkowych o pojemności

50 ml. Próbką ślepa składała się z $(2,00 \pm 0,01)$ g materiału wolnego od leków przeciwbakteryjnych, również umieszczonego w probówkach wirówkowych o tej samej pojemności. Dla próbek badanych odważono $(2,00 \pm 0,01)$ g próbki. Próbki fortyfikowane zostały przygotowane poprzez odważenie $(2,00 \pm 0,01)$ g czystej próbki wolnej od leków przeciwbakteryjnych (matrycy). Do każdej analizowanej próbki, z wyjątkiem próbki odczynnikowej, dodano 100 μ l standardu wewnętrznego o stężeniu 2 μ g/ml. Do próbek fortyfikowanych dodano odpowiednią ilość mieszaniny wzorców według wartości, które przedstawia **Tabela 10**. Zawartość każdej probówki została dokładnie wymieszana na vortexie, odstawiona na około 10 minut, a następnie przystąpiono do etapu ekstrakcji.

Do próbek dodano 6 ml 5% roztworu TCA. Zawartość mieszano na vortexie przez 30 sekund, a następnie wytrząsano przez 10 minut. Próbki wirowano przez 10 minut przy szybkości 4500 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Następnie pobrano 1 ml supernatantu i przesączono go przez filtr strzykawkowy (0,45 μ m, 13 mm, PVDF) do fiolki. Próbki zostały przeznaczone do analizy LC-MS/MS.

5.3.2. Warunki analizy LC-MS/MS oraz ich optymalizacja

Analizy przeprowadzono za pomocą ultrawysokosprawnego chromatografu cieczowego Acquity UPLC H-Class sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Xevo TQ, firmy Waters (Stany Zjednoczone).

Detektor mas pracował z wykorzystaniem źródła jonizacji typu elektrospray w trybie dodatniej jonizacji (ESI+), a dane zbierane były w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM). Parametry systemu zoptymalizowano w celu uzyskania jak najlepszej jonizacji dla analizowanych substancji przeciwbakteryjnych. Z dostępnej literatury naukowej uzyskano wartość m/z dla jonów macierzystych oraz dla jonów potomnych.

Do optymalizacji parametrów przygotowano pojedyncze roztwory wszystkich antybiotyków o stężeniu 0,1 μ g/ml w metanolu o czystości LC/MS i bezpośrednio wstrzykiwano je do źródła jonizacji. Warunki dla każdego z antybiotyków były optymalizowane indywidualnie. Na początku ustalono optymalne parametry dla jonu macierzystego w celu uzyskania dla niego maksymalnej intensywności sygnału, a następnie przy włączonym gazie kolizyjnym dobierano odpowiednie warunki dla jonów potomnych.

W trakcie optymalizacji sprawdzono różne napięcia na kapilarze, temperaturę źródła oraz gazu desolwatacyjnego, a także przepływy gazów. Ostatecznie wybrano wspólne ustawienia, najbardziej optymalne dla wszystkich oznaczanych w danej metodzie antybiotyków.

Dla grupy antybiotyków, oznaczanych po ekstrakcji acetonitrylem napięcie na kapilarze wynosiło 3,0 kV, temperatura źródła była ustawiona na 150°C, a gaz desolwatacyjny (azot) ogrzewano do temperatury 550°C. Przepływ gazu w stożku ustawiono na 50 l/h, natomiast gazu desolwatacyjnego na 1100 l/h, co zapewniło odpowiednie odparowanie rozpuszczalnika. Przepływ gazu zderzeniowego (argonu) wynosił 0,15 ml/min.

Natomiast dla antybiotyków oznaczanych po ekstrakcji kwasem trichlorooctowym napięcie kapilary wynosiło 1,0 kV, temperatura źródła została ustawiona na 150°C, a gaz desolwatacyjny ogrzewano do temperatury 500°C. Przepływ gazu w stożku wynosił 50 l/h, natomiast gazu desolwatacyjnego 1000 l/h. Przepływ gazu zderzeniowego wynosił dla tej analizy 0,20 ml/min.

Parametry, takie jak napięcie na stożku (cone) oraz energia kolizyjna, zostały indywidualnie zoptymalizowane dla każdego antybiotyku. W trakcie optymalizacji wybrano po dwa jony fragmentacyjne dla każdego antybiotyku – jon ilościowy, do ilościowego oznaczenia oraz jon potwierdzający. Metoda MRM dla antybiotyków po ekstrakcji MeCN została podzielona na cztery przedziały czasowe z opóźnieniem między skanami oraz między kanałami wynoszącym 0,1 sekundy. Dla związków po ekstrakcji TCA na dwa przedziały czasowe również z opóźnieniem między skanami oraz między kanałami wynoszącym 0,1 sekundy. Dane te, wraz z czasami retencji (RT), jonem macierzystym oraz jonami potomnymi, zostały przedstawione w tabelach: **Tabela 11** – związki po ekstrakcji MeCN oraz **Tabela 12** – związki po ekstrakcji TCA.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 11. Parametry dla związków po ekstrakcji MeCN

RT – czas retencji, CV – napięcie na stożku, CE – energia kolizyjna, MRM – przedziały czasowe:
1 = (0,00 – 4,70 min); 2 = (6,50 – 10,00 min); 3 = (4,90 – 7,55 min); 4 = (4,20 – 6,30 min)

Związek	RT (min)	Jon macierzysty (m/z)	Jony potomne (m/z)	CV (V)	CE (eV)	MRM
Marbofloksacyna	4,57	363,1	320,1/345,2	30	15/20	4
Norfloksacyna	4,67	320,1	233,0/302,1	30	25/20	4
Ciprofloksacyna	4,76	332,1	231,0/314,1	30	35/20	4
Danofloksacyna	4,87	358,1	255,0/340,1	35	35/20	4
Enrofloksacyna	4,97	360,0	286,0/342,1	35	35/20	4
Sarafloksacyna	5,26	386,1	368,1/348,0	33	22/32	4
Difloksacyna	5,31	400,1	356,2/382,1	35	18/20	3
Kwas oksolinowy	6,41	262,1	244,1/216,0	30	20/28	3
Kwas nalidyksowy	7,47	233,1	187,0/215,1	20	20/20	2
Flumechina	7,69	262,1	202,0/244,11	30	33/18	2
Sulfaguanidyna	2,10	215,1	108,0/156,0	25	22/14	1
Sulfadiazyna	4,15	251,1	108,0/156,0	27	22/14	1
Sulfametoksypirydazyna	5,17	281,1	156,05/108,0	30	17/25	4
Sulfametazyna	4,99	279,1	108,0/156,0	30	25/18	4
Sulfatiazol	4,40	256,1	156,0/108,0	30	14/22	1
Sulfamonometoksyna	5,59	281,1	108,0/156,0	30	25/18	4
Sulfadoksyna	6,00	311,1	156,01/108,01	30	18/25	3
Sulfachinoksalina	6,83	301,1	108,0/156,0	30	24/17	3
Sulfadimetoksyna	6,83	311,1	156,0/108,0	35	20/25	3
Sulfametoksazol	6,14	254,1	108,0/156,0	30	24/17	3
Sulfamerazyna	4,65	265,1	108,0/156,0	30	24/17	4
Amoksycylina	3,57	366,1	349,1/208,1	15	9/13	1
Ampicylina	4,55	350,1	106,0/160,0	22	15/12	4
Penicylina G	7,31	335,1	176,0/160,0	18	12/13	2
Penicylina V	7,81	351,1	114,0/160,0	15	35/12	2
Oksacylina	8,11	402,1	243,1/160,0	18	12/14	2

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Kloksacylina	8,51	436,1	160,0/277,1	18	12/15	2
Nafcylina	8,72	415,1	171,0/199,0	15	35/15	2
Dikloksacylina	9,12	470,0	160,0/311,0	18	12/13	2
Cefapiryna	3,92	424,1	124,0/152,0	25	40/22	1
Ceftiofur	6,32	524,1	125,0/241,1	25	40/20	3
Cefkwinom	4,11	530,1	125,0/134,0	16	50/25	1
Cefalonium	4,59	459,1	152,0/337,1	20	20/10	4
Cefazolina	5,19	455,0	323,1/156,0	20	10/15	4
Cefaleksyna	4,57	348,1	158,0/106,0	20	8/25	4
Cefoperazon	5,80	646,1	143,0/530,2	20	30/12	3
Tylozyna	6,76	916,5	174,1/772,5	45	42/29	3
Erytromycyna	6,56	734,6	158,0/576,5	32	27/18	3
Spiramycyna	5,34	843,7	174,1/540,0	45	33/30	3
Tylmikozyzna	5,91	869,6	174,11/696,6	45	45/44	3
Jozamycyna	7,83	828,6	174,0/229,1	45	35/30	2
Tulatromycyna	4,83	806,6	158,1/577,4	35	42/25	4
Trimetoprim	4,60	292,0	231,0/262,0	35	23/25	4
Tiamulina	7,26	494,0	119,0/192,0	25	44/24	2
Sulfafenazol IS	6,97	315,1	156,0	40	20	3

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 12. Parametry dla związków po ekstrakcji TCA

RT – czas retencji, CV – napięcie na stożku, CE – energia kolizyjna, MRM – przedziały czasowe:
1 = (1,00 – 6,00 min); 2 = (1,00 – 5,00 min)

Związek	RT (min)	Jon macierzysty (m/z)	Jony potomne (m/z)	CV (V)	CE (eV)	MRM
Oksytetracyklina	3,02	461,2	426,2/443,3	25	20/12	1
4-epioksytetracyklina	3,02	461,2	426,2/443,3	25	20/12	2
Tetracyklina	3,36	445,3	410,2/427,2	25	18/13	1
4-epitetracyklina	3,18	445,3	410,2/427,2	25	18/13	2
Chlorotetracyklina	4,17	479,2	444,2/462,2	25	22/19	1
4-epichlorotetracyklina	3,87	479,2	444,2/462,2	25	22/19	2
Doksycyklina	4,36	445,3	428,2/154,0	25	19/27	1
Linkomycyna	2,53	407,3	126,0/359,3	33	26/18	1
Spektynomycyna	1,99	351,1	333,1/207,1	25	19/21	1
Streptomycyna	2,49	582,3	263,1/246,1	45	37/35	1
Dihydrostreptomycyna	2,51	584,3	263,1/246,1	45	37/35	1
Kanamycyna A	2,86	485,3	163,0/205,1	30	26/22	1
Paromomycyna	3,18	616,5	163,0/293,1	45	32/21	1
Neomycyna	3,38	615,5	161,0/455,3	45	32/25	1
Gentamycyna	3,24	478,4 450,4	322,2 322,2	35 24	14 14	1
Sulfafenazol IS	4,57	315,1	156,0	40	20	1

System UPLC składał się z autosamplera wyposażonego w tacki łącznie na 96 fiolek, degazera, pompy binarnej, wstrzykiwacza oraz termostatu do kolumn chromatograficznych. Do rozdzielania oznaczanych antybiotyków wykorzystano kolumnę chromatograficzną Acquity UPLC HSS C18 (2,1 x 100 mm; 1,8 µm) firmy Waters, z filtrem (0,2 µm; 2,1 mm) firmy Waters.

W celach optymalizacji warunków rozdzielania antybiotyków na kolumnie chromatograficznej, obejmującej dobór faz ruchomych oraz odpowiedniego gradientu, przygotowano w fiołce mieszaninę wzorcową wszystkich oznaczanych antybiotyków o stężeniu 0,1 µg/ml w 0,025% HFBA. Pozwoliło to na ogólne określenie warunków rozdzielania tych związków. W przypadkach, gdzie pojawiały się dwa piki

odpowiadające temu samemu związkowi przeprowadzano dodatkowo analizę pojedynczego wzorca. Dotyczyło to szczególnie antybiotyków z grupy sulfonamidów, fluorochinolonów oraz tetracyklin o takich samych jonach potomnych.

W trakcie optymalizacji przeprowadzono testy z czterema różnymi układami faz ruchomych:

1. Faza A: 0,2% kwas mrówkowy w wodzie; Faza B: metanol
2. Faza A: 0,2% kwas mrówkowy w wodzie; Faza B: acetonitryl
3. Faza A: 0,2% kwas mrówkowy w wodzie; Faza B: 0,2% kwas mrówkowy w acetonitrylu
4. Faza A: 0,025% HFBA w wodzie; Faza B: acetonitryl

W zależności od zastosowanego układu faz ruchomych, aby zapewnić jak najlepsze rozdzielanie oznaczanych antybiotyków optymalizowano również parametry gradientu elucji. Testowano również różne temperatury dla kolumny chromatograficznej, ponieważ ma ona istotny wpływ na czasy retencji oraz stabilność analitów.

W wariancie 1 zastosowanie jako fazy B metanolu nie zapewniło dostatecznego rozdzielania oznaczanych związków. Piki były szersze oraz zaobserwowano efekt ogonowania. Zastosowanie metanolu spowodowało także znaczny wzrost ciśnienia w układzie chromatograficznym. Po zastąpieniu metanolu acetonitrylem zauważono poprawę w rozdzieleniu antybiotyków oraz symetryczne piki. Jednak najlepsze rezultaty czyli odpowiednie rozdzielanie analitów oraz powtarzalność czasów retencji dla fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, tiamuliny i trimetoprimu uzyskano w wariancie, gdzie zarówno do fazy wodnej, jak i organicznej dodano kwas mrówkowy czyli wariant 3. Zastosowanie kwasu mrówkowego poprawiło jonizację, zwiększając intensywność sygnału oraz zapewniło dobre rozdzielanie związków.

Dla antybiotyków z grupy tetracyklin, aminoglikozydów oraz dla linkomycyny najlepsze okazało się zastosowanie kwasu heptafluoromasłowego (HFBA) jako odczynnika do par jonowych. Użycie HFBA było konieczne do tworzenia pary jonowych z aminoglikozydami. Umożliwiło to ich skuteczną retencję oraz rozdzielanie. Chociaż HFBA może powodować tłumienie sygnału w spektrometrii mas, jednak jego dodatek okazał się niezbędny w przypadku analizy aminoglikozydów. W celu ograniczenia tłumienia sygnału dla pozostałych antybiotyków przetestowano także niższe stężenie

HFBA. Niższe stężenia minimalnie poprawiały jonizację pozostałych antybiotyków, ale spowodowały przyspieszenie elucji aminoglikozydów z kolumny chromatograficznej, co spowodowało ich częściowe nakładanie się z innymi związkami. Najbardziej optymalnym stężeniem był 0,025% HFBA, który zapewnił satysfakcjonujące rozdzielanie antybiotyków oraz dobrą odpowiedź MS dla wszystkich oznaczanych związków.

Dla ekstrakcji z MeCN opracowano gradient, w którym fazą ruchomą A był 0,2% kwas mrówkowy w wodzie, a fazą B 0,2% kwas mrówkowy w acetonitrylu. Temperatura kolumny w trakcie analizy wynosiła 30°C, a przepływ 0,3 ml/min. Początkowy gradient do 1 minuty wynosił 99,5% dla fazy A, później zmieniał się do 9 minuty do 40%, do 9,5 minuty osiągał 0% dla fazy A i ponownie wzrastał do 11 minuty do 99,5%. Stabilizacja kolumny trwała 2 minuty, a łączny czas analizy wynosił 13 minut **Tabela 13**. Objętość nastrzyku wynosiła 10 µl.

Tabela 13. Gradient dla związków po ekstrakcji acetonitrylem

Czas (min)	Przepływ (ml/min)	Faza A 0,2% kwas mrówkowy w H ₂ O (%)	Faza B 0,2% kwas mrówkowy w MeCN (%)	Krzywa
0	0,30	99,5	0,5	-
1,0	0,30	99,5	0,5	6
9,0	0,30	40,0	60	6
9,5	0,30	0,0	100	6
11,0	0,30	99,5	0,5	11
13,0	0,30	99,5	0,5	-

Dla ekstrakcji z TCA opracowano gradient, w którym fazą ruchomą A był 0,025% HFBA w wodzie, a fazą B acetonitryl. Temperatura kolumny w trakcie analizy wynosiła 30°C, a przepływ 0,3 ml/min. Początkowy gradient do 0,5 minuty wynosił 85% dla fazy A, później zmieniał się do 6 minuty do 50%, do 7 minuty osiągał 0% dla fazy A i ponownie wzrastał do 8 minuty do 85%. Stabilizacja kolumny trwała 2 minuty, a łączny czas analizy wynosił 10 minut **Tabela 14**. Objętość nastrzyku wynosiła 10 µl.

Tabela 14. Gradient dla związków po ekstrakcji kwasem trichlorooctowym

Czas (min)	Przepływ (ml/min)	Faza A 0,025% HFBA w H ₂ O (%)	Faza B MeCN (%)	Krzywa
0	0,30	85,0	15,0	-
0,5	0,30	85,0	15,0	6
6,0	0,30	50,0	50,0	6
7,0	0,30	0,0	100,0	6
8,0	0,30	85,0	15,0	11
10	0,30	85,0	15,0	-

5.3.3. Optymalizacja warunków ekstrakcji

Celem optymalizacji warunków ekstrakcji było opracowanie miarodajnej procedury analitycznej oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w matrycach takich jak mleko, mięśnie, nerki.

Głównym kryterium było uzyskanie jak najwyższych odzysków dla oznaczanych analitów. Jest to kluczowe aby zapewnić miarodajne wyniki badań, zwłaszcza w przypadku matryc biologicznych. Istotnym aspektem było także zminimalizowanie efektów matrycy, które mogą zakłócać analizę, generując interferencje lub fałszywe wyniki. Dobra powtarzalność i dokładność były kolejnymi kluczowymi parametrami uwzględnionymi podczas opracowywania procedury. Spełnienie tych kryteriów jest niezbędne do zastosowania procedury w rutynowych analizach kontrolnych. W ramach badań przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu optymalizację kluczowych parametrów.

Wyzwanie jakim jest ekstrakcja różnych grup antybiotyków wynika głównie z różnorodnych właściwości chemicznych tych związków. W części teoretycznej przedstawione zostały różne metody oznaczania antybiotyków w żywności m.in. wykorzystanie metody QuEChERS. W praktyce, jednak najczęściej stosuje się ekstrakcję z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych, najczęściej acetonitrylu. W przypadku polarnych antybiotyków, takich jak aminoglikozydy, stosuje się ekstrakcję za pomocą wodnych roztworów kwasu, najczęściej kwasu trichlorooctowego.

Podjęto próby ekstrakcji antybiotyków z żywności stosując acetonitryl jako rozpuszczalnik, gdyż ma on potwierdzone w literaturze wszechstronne zastosowanie dla ekstrakcji różnych grup substancji przeciwbakteryjnych. Acetonitryl dodatkowo denaturuje białka i dobrze oczyszcza matrycę, co jest istotne w złożonych próbkach biologicznych. Drugim wyborem do badań były wodne roztwory kwasu trichlorooctowego ze względu na konieczność skutecznej ekstrakcji antybiotyków aminoglikozydowych. Przetestowano dwa stężenia tego kwasu: 2% TCA, 5% TCA.

Jak już wcześniej opisano w pracy, próbki mięśni, nerek i mleka zostały zebrane przez Inspekcję Weterynaryjną, dostarczone do laboratorium Zakładu Higieny Weterynaryjnej w obniżonej temperaturze, a po podziale i homogenizacji przechowywane w warunkach zamrożenia. Probki, przed przystąpieniem do analizy i naważenia, rozmrażano i ponownie homogenizowano (z wyjątkiem mleka).

Optymalizację metody rozpoczęto od badań mięśni bydła, kurcząt i świń. Jako podstawę do przeprowadzenia badań wykorzystano procedurę, którą opracował Gauguin-Juhel z współpracownikami [49] do ekstrakcji antybiotyków z mleka oraz Błądek z współpracownikami [184] do ekstrakcji antybiotyków z mięśni. Do każdego doświadczenia przygotowano po 6 próbek z każdego rodzaju mięśni (1,2 – bydło; 3,4 – kurczak, 5,6 – świnia). Podzielono je na trzy grupy odpowiadające poziomom stężeń 0,5MRL, 1 MRL oraz 1,5MRL (po 2 próbki z każdego rodzaju mięśni na poziom). Dodatkowo przygotowano dla każdego rodzaju mięśni próbkę ślepą.

Doświadczenie 1

Probki odważono po $(2,00 \pm 0,01)$ g do polipropylenowych probówek wirówkowych. Do każdej próbki dodano po 100 μ l wzorca wewnętrznego (sulfafenazol) o stężeniu 2 μ g/ml oraz sporządzoną mieszaninę wszystkich wzorców na odpowiednich poziomach stężeń w objętościach: 50 μ l dla 0,5 MRL, 100 μ l dla 1 MRL i 150 μ l dla 1,5 MRL. Do przygotowanej próbki ślepej dodano wyłącznie 100 μ l wzorca wewnętrznego. Zawartości probówek dokładnie wymieszano i odczekano 10 minut. Następnie do próbek dodano po 8 ml MeCN i mieszano na mieszadle (typu Vortex) przez 30 sekund. W celu zwiększenia efektywności ekstrakcji antybiotyków z matrycy próbki dodatkowo wytrząsano na wytrząsarce przez 10 minut. Po tym etapie próbki wirowano przez 10 minut w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$ przy szybkości 4500 obr./min. Pobrano 6 ml supernatantu i odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w 6 ml 0,025% HFBA. Następnie próbki przesączono przez filtr strzykawkowy PVDF (0,45 μ m, 13 mm) do fiolki w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń i uzyskania klarownego roztworu. Tak przygotowane próbki poddano analizie.

Doświadczenie 2

Etap przygotowania próbek był analogiczny jak w Doświadczeniu 1, z wyjątkiem sposobu odparowania próbek. W tym doświadczeniu 6 ml supernatantu zostało odparowanych z wykorzystaniem wyparki obrotowej nastawionej również na 45°C zamiast na bloku grzewczym w strumieniu azotu. Pozostałe kroki pozostawiono bez zmian. Zmieniono sposób odparowywania, aby zapewnić bardziej równomierne odparowanie rozpuszczalnika.

Doświadczenie 3

Podobnie jak w poprzednio opisanych doświadczeniach, próbki odważono po (2,00 $\pm$ 0,01) g do polipropylenowych probówek wirówkowych. Do każdej próbki badanej oraz próbki ślepej dodano po 100 μ l wzorca wewnętrznego oraz do próbek badanych dodatkowo odpowiednie objętości mieszaniny wzorców (50 μ l, 100 μ l, 150 μ l). Zawartości probówek dokładnie wymieszano i odczekano 10 minut. W tym doświadczeniu, ze względu na konieczność oznaczania aminoglikozydów wykorzystano ekstrakcje kwasem trichlorooctowym. Do każdej próbki dodano po 6 ml 5% TCA, wymieszano na mieszadle typu Vortex (30 sekund), wytrząsano (10 minut) i odwirowano (10 minut, $\leq$ 4°C, 4500 obr./min). Tak jak w przytoczonych powyżej publikacjach, spróbowano pobrać 1 ml supernatantu i bez zateżania przesączyć przez filtr strzykawkowy PVDF (0,45 μ m, 13 mm) do fiolki i poddać je analizie.

Doświadczenie 4

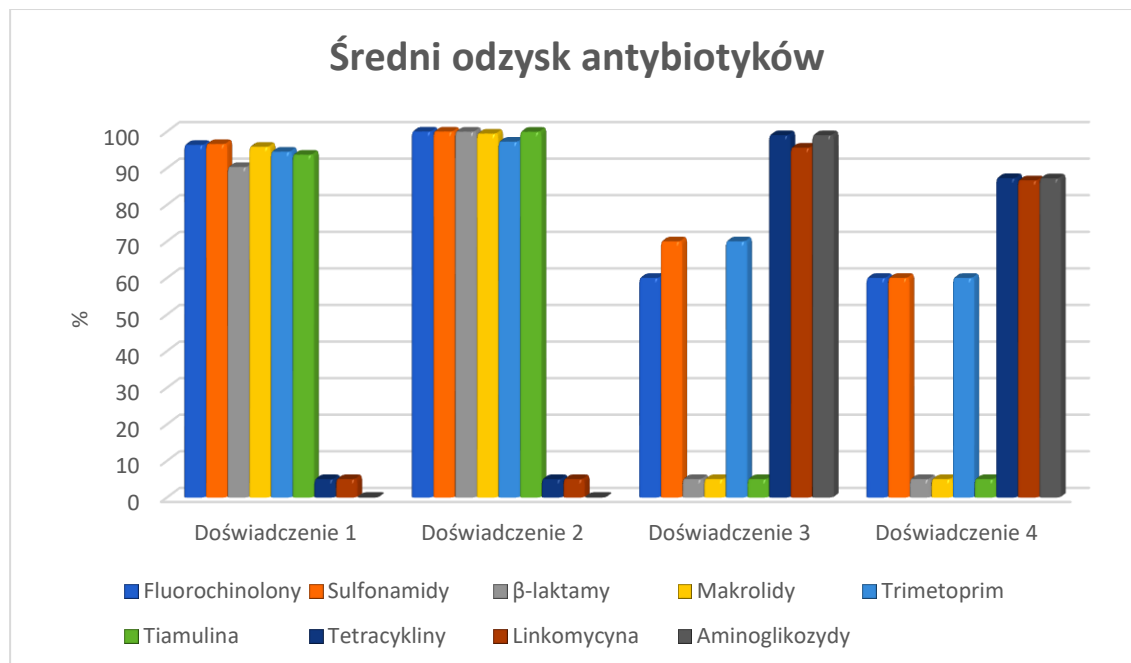
Etap przygotowania próbek był analogiczny jak w Doświadczeniu 3, z wyjątkiem użycia rozpuszczalnika. W tym przypadku zamieniono 5% TCA na 6 ml 2% TCA. Pozostałe etapy pozostawiono bez zmian. Zmieniono stężenie rozpuszczalnika w celu sprawdzenia, czy mniejsze zakwaszenie próbek wpłynie na efektywność ekstrakcji antybiotyków.

Po przeanalizowaniu próbek ze wszystkich opisanych doświadczeń za pomocą techniki LC-MS/MS porównano uzyskane wyniki odzysku antybiotyków na wszystkich

poziomach stężeniach (0,5 MRL, 1 MRL, 1,5 MRL). Dokonano analizy wpływu zastosowanego rozpuszczalnika do ekstrakcji antybiotyków oraz przygotowania próbek mięśni na wartości odzysku uzyskane podczas analizy. Uwzględniono także wpływ rodzaju matrycy oraz stężenia analitów.

Wyniki uzyskane z doświadczeń przedstawiono w tabelach: **Tabela A 1, Tabela A 2, Tabela A 3, Tabela A 4. Wykres 1** przedstawia, jak kształtowały się średnie odzyski poszczególnych grup antybiotyków w każdym doświadczeniu. Można zauważyć, że warunki zastosowane w Doświadczeniach 1 i 2 były optymalne dla części grup badanych antybiotyków, w tym dla fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, trimetoprimu i tiamuliny. Dla tetracyklin i linkomycyny zaobserwowano niewystarczającą ekstrakcję, natomiast dla aminoglikozydów nie uzyskano w tych doświadczeniach żadnych wyników, co było zgodne z literaturą wskazującą na nieskuteczność zastosowania acetonitrylu dla tej grupy związków. Na wykresie można także zauważyć, że zmiana rozpuszczalnika (acetonitrylu) na kwas trichlorooctowy (w Doświadczeniach 3 i 4) znacząco poprawiła wydajność ekstrakcji dla tetracyklin oraz linkomycyny, a także umożliwiła wyekstrahowanie aminoglikozydów z próbek mięśni z bardzo dobrą wydajnością.

Wykres 1. Średni odzysk antybiotyków w czterech doświadczeniach – porównanie grup



W tabeli poniżej przedstawiono porównanie wyników dla Doświadczeń 1 i 2 (**Tabela 15**), w których metody były optymalne dla ekstrakcji antybiotyków z grupy

fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, trimetoprimu i tiamuliny. Minimalne wyższe odzyski uzyskano w Doświadczeniu 2, w którym zmieniono sposób odparowania. Bardziej równomierne odparowywanie rozpuszczalnika na wyparce próżniowej poprawiło i tak już bardzo dobrą wydajność ekstrakcji. Ponadto, użycie wyparki próżniowej skróciło znacznie czas odparowania próbki do około 15 minut.

Metody ekstrakcji antybiotyków z zastosowaniem acetonitrylu zarówno z odparowaniem rozpuszczalnika na bloku grzejmym jak i na wyparce próżniowej okazały się prawidłowe dla tych grup antybiotyków. Ostatecznie zdecydowano się na zastosowanie wyparki próżniowej ze względu na minimalne lepsze wyniki odzysku, zwłaszcza widoczne dla związków z grupy β -laktamów, skrócenie czasu analizy oraz bardziej kontrolowany proces odparowywania.

W bardziej szczegółowych tabelach (**Tabela A 1 i Tabela A 2**) można zauważyć, że uzyskane stężenia antybiotyków w trzech różnych gatunkach (bydło, kurczak, świnia) nie różniły się od siebie znacząco. Nie zaobserwowano także znaczących różnic w odzyskach pomiędzy badanymi trzema poziomami stężeń.

Tabela 15. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 1 i Doświadczeniu 2

Związek	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)
DOŚWIADCZENIE 1		DOŚWIADCZENIE 2		
Marbofloksacyna	96,7	96,4	101	100
Norfloksacyna	97,3		97,9	
Ciprofloksacyna	96,3		101	
Danofloksacyna	96,1		101	
Enrofloksacyna	94,4		101	
Sarafloksacyna	96,2		98,6	
Difloksacyna	98,2		101	
Kwas oksolinowy	96,1		99,6	
Kwas nalidyksowy	96,1		100	
Flumechina	96,1		102	
Sulfaguanidyna	97,2	96,6	99,8	101
Sulfadiazyna	98,0		100	
Sulfametoksypyridazyna	95,3		102	
Sulfametazyna	96,0		101	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Sulfatiazol	95,7		101	
Sulfamonometoksyna	98,2		101	
Sulfadoksyna	97,1		102	
Sulfachinoksalina	93,8		99,3	
Sulfadimetoksyna	96,9		101	
Sulfametoksazol	95,8		101	
Sulfamerazyna	98,7		102	
Amoksyacylina	90,6		97,6	
Ampicylina	90,8		98,1	
Penicylina G	92,1		101	
Penicylina V	92,3		101	
Oksacylina	88,9		102	
Kloksacylina	89,4		99,2	
Nafcylina	88,2		99,2	
Dikloksacylina	96,1	90,3	100	100
Cefapiryna	90,7		98,2	
Ceftiofur	91,3		102	
Cefkwinom	88,2		99,5	
Cefalonium	88,2		99,4	
Cefazolina	89,4		99,9	
Cefaleksyna	88,3		97,9	
Cefoperazon	90,4		99,8	
Tylozyna	96,9		101	
Erytromycyna	94,5		96,5	
Spiramycyna	97,9	95,8	101	99,4
Tylmikozyzna	99,0		101	
Jozamycyna	96,6		101	
Tulatromycyna	90,2		96,1	
Trimetoprim	94,5	94,5	97,2	97,2
Tiamulina	93,7	93,7	99,8	99,8
Tetracykliny	Niski odzysk (<50%)		Niski odzysk (<50%)	
Linkomycyna	Niski odzysk (<50%)		Niski odzysk (<50%)	
Aminoglikozydy	Związki nie zostały wyekstrahowane		Związki nie zostały wyekstrahowane	

Porównanie wyników otrzymanych w Doświadczeniach 3 i 4 przedstawiono w kolejnej tabeli (**Tabela 16**). Warunki ekstrakcji, obejmujące użycie kwasu trichlorooctowego (TCA), okazały się optymalne dla tetracyklin, linkomycyny oraz aminoglikozydów. W doświadczeniach tych zbadano także wpływ stężenia kwasu na efektywność ekstrakcji, porównując działanie 5% TCA oraz 2% TCA. Wyższe stężenia wyekstrahowanych antybiotyków w analizowanych próbkach otrzymano po ekstrakcji próbek mięśni kwasem o wyższym stężeniu (5% TCA w Doświadczeniu 3). Zaobserwowano, że zastosowanie 2% TCA zmniejszyła wartość odzysku, co potwierdza, że niższe stężenie kwasu było mniej skuteczne w ekstrakcji tych grup antybiotyków. Uzyskane wyniki udowadniają, że 5% TCA jest odpowiedni dla ekstrakcji z tkanki mięśniowej antybiotyków z grupy tetracyklin, aminoglikozydów oraz linkomycyny.

Tak jak w poprzednich doświadczeniach, wyniki uzyskane w Doświadczeniu 3 oraz 4 przedstawiono w tabelach: **Tabela A 3** i **Tabela A 4**. Uzyskane stężenia tetracyklin, aminoglikozydów i linkomycyny w trzech różnych gatunkach (bydło, kurczak, świnia) były na zbliżonym poziomie. Nie zaobserwowano również znaczących różnic w odzyskach pomiędzy badanymi trzema poziomami stężeń.

Tabela 16. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 3 i Doświadczeniu 4

Związek	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)
	DOŚWIADCZENIE 3		DOŚWIADCZENIE 4	
Oksytetracyklina	98,7	99,0	89,5	87,3
4-epioksytetracyklina	99,3		89,4	
Tetracyklina	100		83,7	
4-epitetracyklina	97,9		82,3	
Chlorotetracyklina	99,5		90,3	
4-epichlorotetracyklina	99,8		89,9	
Doksycyklina	97,6	98,6	85,9	86,7
Linkomycyna	98,6		86,7	
Spektynomycyna	100		83,5	87,2
Streptomycyna	102		82,6	
Dihydrostreptomycyna	97,5		84,6	
Kanamycyna A	96,8		91,2	
Paromomycyna	98,4		92,2	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Neomycyna	98,5		91,6	
Gentamycyna	99,9		84,7	
Fluorochinolony	Odzysk około 60%		Odzysk około 60%	
Sulfonamidy	Odzysk około 70%		Odzysk około 60%	
β -laktamy	Niski odzysk (<50%)		Niski odzysk (<50%)	
Makrolidy	Niski odzysk (<50%)		Niski odzysk (<50%)	
Trimetoprim	Odzysk około 70%		Odzysk około 60%	
Tiamulina	Niski odzysk (<50%)		Niski odzysk (<50%)	

Kolejnym etapem badań było przetestowanie wybranych metod ekstrakcji acetonitrylem i kwasem trichlorooctowym na mleku krowim oraz nerkach bydła i świń. Celem badań było sprawdzenie, czy opracowane warunki ekstrakcji dla mięśni, są również odpowiednie dla mleka oraz nerek, matryc o odmiennych właściwościach fizykochemicznych niż tkanka mięśniowa. Testy przeprowadzono osobno dla mleka i osobno dla nerki.

Dla mleka i nerek przygotowano po 6 próbek na każdy poziom, dla nerek były to 3 próbki od bydła i 3 próbki od świń. Tak jak dla mięśni podzielono je na trzy grupy odpowiadające poziomom stężeń 0,5 MRL, 1 MRL oraz 1,5 MRL. Dla każdej matrycy przygotowano także próbkę ślepą, aby wykluczyć ewentualne zanieczyszczenie pochodzące od tła.

Do każdej próbki badanej oraz próbki ślepej dodano po 100 μ l wzorca wewnętrznego, natomiast do próbek badanych dodano także odpowiednie objętości mieszaniny wzorców (50 μ l, 100 μ l, 150 μ l) zgodnie z wyznaczonymi poziomami stężeń. Następnie przeprowadzono badania zgodne z Doświadczeniem 2 oraz 3. Testowano grupy antybiotyków, odpowiadające zastosowanej metodzie ekstrakcji. W Doświadczeniu 2, czyli ekstrakcji z zastosowaniem MeCN, oznaczano fluorochinolony, sulfonamidy, β -laktamy, makrolidy, natomiast w Doświadczeniu 3 (ekstrakcja 5% TCA) oznaczano tetracykliny, linkozamidy (linkomycynę) i aminoglikozydy. W mleku nie oznaczano trimetoprimu, tiamuliny oraz tulatromycyny, a w nerce nie oznaczano tiamuliny. W trakcie prowadzenia badań oraz walidacji antybiotyki te nie były uwzględnione w planach monitoringowych oraz wytycznych Głównego Lekarza Weterynarii.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Wyniki badań ekstrakcji antybiotyków w mleku i nerkach na poszczególnych poziomach stężeń przedstawiono w tabelach: **Tabela A 5** oraz **Tabela A 6**. Wyniki uzyskanych średnich stężeń zestawiono w tabelach: **Tabela 17** i **Tabela 18**. Pozwoliło to ocenić opracowane metody ekstrakcji dla mleka i nerek oraz porównać ich skuteczność w różnych matrycach. Wizualne porównanie skuteczności ekstrakcji antybiotyków z testowanych matryc (mięśnie, mleko i nerki) przedstawia **Wykres 2**.

Wykres 2. Porównanie średnich odzysków antybiotyków w mleku, nerkach i mięśniach

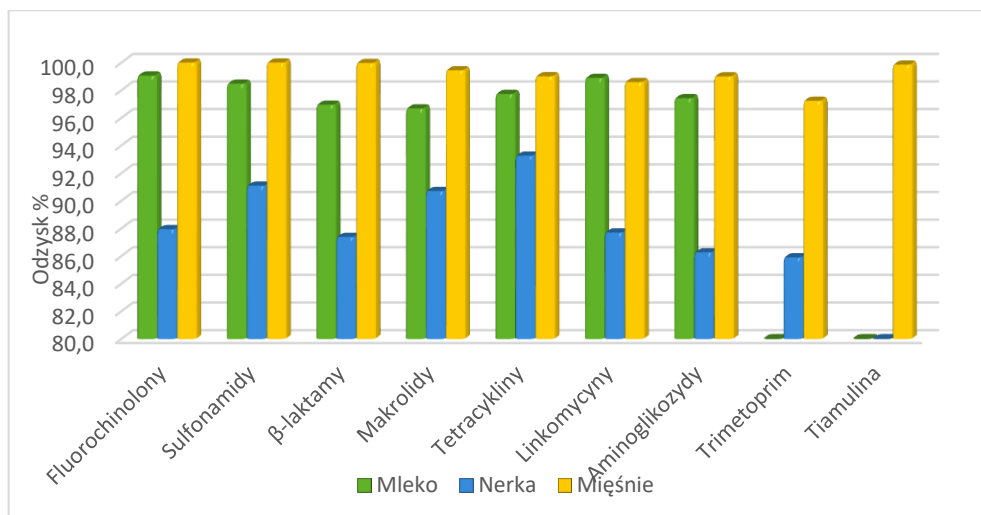


Tabela 17. Uzyskane odzyski ekstrakcji antybiotyków z mleka krowiego

Związek	Odzysk (%)	Związek	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)
Fluorochinolony				
Marbofloksacyna	98,5	Sarafloksacyna	99,8	99,1
Norfloksacyna	97,7	Difloksacyna	101	
Ciprofloksacyna	99,7	Kwas oksolinowy	98,8	
Danofloksacyna	97,9	Kwas nalidyksowy	98,8	
Enrofloksacyna	99,7	Flumechina	99,2	
Sulfonamidy				
Sulfaguanidyna	97,4	Sulfadoksyna	98,9	98,6
Sulfadiazyna	98,4	Sulfachinoksalina	98,4	
Sulfametoksypyridazyna	98,0	Sulfadimetoksyna	98,5	
Sulfametazyna	100	Sulfametoksazol	100	
Sulfatiazol	99,0	Sulfamerazyna	97,9	
Sulfamonometoksyna	98,1			
β-laktamy				
Amoksycylina	95,8	Cefapiryna	99,1	97,0
Ampicylina	98,4	Ceftiofur	97,7	
Penicylina G	93,8	Cefkwinom	94,9	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Penicylina V	98,2	Cefalonium	95,9	
Oksacylina	97,1	Cefazolina	97,8	
Kloksacylina	98,5	Cefaleksyna	95,8	
Nafcylina	98,4	Cefoperazon	97,6	
Dikloksacylina	95,2			
Makrolidy				
Tylozyna	96,1	Tylmikozyzna	96,2	96,7
Erytromycyna	96,5	Jozamycyna	96,9	
Spiramycyna	97,7			
Tetracykliny				
Oksytetracyklina	98,2	Chlorotetracyklina	98,1	97,7
4-epioksytetracyklina	97,3	4-epichlorotetracyklina	97,3	
Tetracyklina	97,8	Doksycyklina	97,4	
4-epitetracyklina	97,9			
Linkozamidy				
Linkomycyna	98,9			98,9
Aminoglikozydy				
Spektynomycyna	98,2	Paromomycna	97,2	97,4
Streptomycyna	97,8	Neomycyna	98,3	
Dihydrostreptomycyna	96,3	Gentamycyna	96,7	
Kanamycyna A	97,5			

Tabela 18. Uzyskane odzyski ekstrakcji antybiotyków z nerek

Związek	Odzysk (%)	Związek	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)
Fluorochinolony				
Marbofloksacyna	89,6	Sarafloksacyna	88,5	87,9
Norfloksacyna	91,3	Difloksacyna	87,5	
Ciprofloksacyna	86,6	Kwas oksolinowy	87,9	
Danofloksacyna	85,6	Kwas nalidyksowy	87,8	
Enrofloksacyna	85,8	Flumechina	88,8	
Sulfonamidy				
Sulfaguanidyna	92,1	Sulfadoksyna	91,9	91,1
Sulfadiazyna	92,8	Sulfachinoksalina	90,4	
Sulfametoksypirydazyna	92,5	Sulfadimetoksyna	89,6	
Sulfametazyna	89,7	Sulfametoksazol	90,0	
Sulfatiazol	90,6	Sulfamerazyna	91,2	
Sulfamonometoksyna	91,3			
β-laktamy				
Amoksycylina	86,1	Cefapiryna	87,6	87,4
Ampicylina	86,8	Ceftiofur	91,3	
Penicylina G	85,0	Cefkwinom	87,9	
Penicylina V	87,4	Cefalonium	84,6	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Oksacylina	88,6	Cefazolina	89,6	
Kloksacylina	87,2	Cefaleksyna	86,7	
Nafcylina	87,7	Cefoperazon	86,8	
Dikloksacylina	87,5			
Makrolidy				
Tylozyna	88,7	Tylmikozyzna	94,1	90,7
Erytromycyna	91,1	Jozamycyna	89,5	
Spiramycyna	90,1	Tulatromycyna	90,4	
Diaminopirymidyny				
Trimetoprim	85,9			85,9
Tetracykliny				
Oksytetracyklina	90,8	Chlorotetracyklina	95,2	93,3
4-epioksytetracyklina	91,7	4-epichlorotetracyklina	94,2	
Tetracyklina	95,4	Doksycyklina	91,3	
4-epitetracyklina	94,3			
Linkozamidy				
Linkomycyna	87,7			87,7
Aminoglikozydy				
Spektynomycyna	85,8	Paromomycna	86,2	86,3
Streptomycyna	87,2	Neomycyna	86,8	
Dihydrostreptomycyna	86,1	Gentamycyna	84,0	
Kanamycyna A	87,8			

W doświadczeniach z próbkami mleka krowiego uzyskano dobre i powtarzalne odzyski dla badanych substancji przeciwbakteryjnych, co potwierdza efektywność opracowanych metod ekstrakcji oraz to, że matryca mleka nie wpływa istotnie na skuteczność ekstrakcji w porównaniu do próbek mięśni. W przypadku nerek od bydła i świń uzyskane odzyski antybiotyków kształtowały się na nieco niższym poziomie niż w mięśniach i mleku, co może wynikać z różnic w składzie matrycy, które mogą oddziaływać z antybiotykami i zmniejszać skuteczność ekstrakcji tych związków. Mimo to, zastosowane metody ekstrakcji pozwoliły na uzyskanie akceptowalnych odzysków dla próbek nerek.

Próbki ślepe przygotowane dla każdego rodzaju matrycy (mięśnie, mleko, nerki) potwierdziły brak zanieczyszczenia tła zarówno dla ekstrakcji acetonitrylem jak i kwasem trichlorooctowym. Jest to dowód na to, że obie metody ekstrakcji dostatecznie minimalizują wpływ matrycy, co jest istotnym aspektem w analizach LC-MS/MS.

Podsumowując celem tych badań było opracowanie metody ekstrakcji, która zapewni powtarzalne i akceptowalne odzyski dla wymaganych w badaniach żywności

pochodzenia zwierzęcego antybiotykach. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń ostatecznie wybrano dwa optymalne podejścia, dostosowane do różnych matryc, takich jak mięśnie (różne gatunki zwierząt), mleko oraz nerki (bydłęce i świńskie). Dla fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, trimetoprimu i tiamuliny optymalną metodą okazało się zastosowanie warunków z Doświadczenia 2, czyli ekstrakcja acetonitrylem i odparowanie na wyparce próżniowej. Dla tetracyklin, aminoglikozydów i linkomycyny najlepsze wyniki uzyskano w Doświadczeniu 3, w którym zastosowano 5% roztwór TCA. Zastosowanie tych dwóch metod ekstrakcji antybiotyków pozwoliło uzyskać powtarzalne i wysokie odzyski dla wszystkich wymienionych grup antybiotyków, a także potwierdziło ich uniwersalność dla trzech różnych matryc: mięśni, mleka i nerek.

5.3.4. Ocena skuteczności metody – krzywe wzorcowe i chromatogramy

W celu oceny skuteczności opracowanej metody przygotowano próbki mięśni, do których dodano wzorzec wewnętrzny oraz odpowiednie ilości wzorców antybiotyków, tak aby uzyskać stężenia odpowiadające trzem poziomom: 0,5 MRL, 1 MRL oraz 1,5 MRL, przygotowano także próbkę ślepą. Mieszaninę wzorcową przygotowano zgodnie z **Tabela 7**, a ilości wzorców dodano do próbek mięśni zgodnie z **Tabela 10**. Następnie przeprowadzono dwie opracowane metody ekstrakcji (MeCN oraz TCA). Przygotowane próbki poddano analizie LC-MS/MS w zoptymalizowanych warunkach.

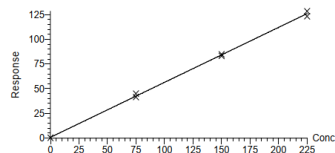
Na wykresach (**Wykres 3**) przedstawiono krzywe wzorcowe dla każdego antybiotyku, utworzone w programie MassLynx (Waters) na podstawie analizy próbek fortyfikowanych. W oznaczeniach zastosowano metodę ze wzorcem wewnętrznym. Liniowość uzyskanych krzywych wzorcowych oceniono na podstawie współczynnika korelacji $r \geq 0,98$, wartość ta została przyjęta jako kryterium oceny. Dla wszystkich substancji przeciwbakteryjnych uzyskano satysfakcjonujące wyniki, co potwierdza prawidłowe warunki analizy LC-MS/MS, a także prawidłową liniowość w wymaganym zakresie stężeń.

Tabela 19 przedstawia chromatogramy dla poszczególnych antybiotyków. Potwierdzają one dobre rozdzielenie oraz intensywność sygnału dla poszczególnych związków.

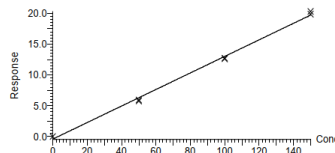
Wykres 3. Wykresy krzywych wzorcowych dla analizowanych antybiotyków

Antybiotyki po ekstrakcji MeCN

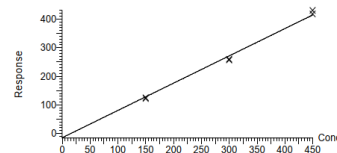
Compound name: Marbofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.999371$, $r^2 = 0.998743$
Calibration curve: $0.55865 \cdot x + 0.439858$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



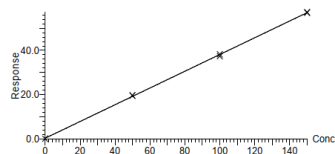
Compound name: Danofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998504$, $r^2 = 0.997011$
Calibration curve: $0.134249 \cdot x + 0.407805$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



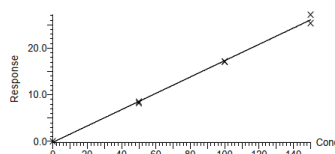
Compound name: Difloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.997134$, $r^2 = 0.994276$
Calibration curve: $0.953312 \cdot x + 14.822$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



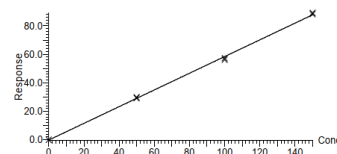
Compound name: Norfloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.999846$, $r^2 = 0.999692$
Calibration curve: $0.379388 \cdot x + 0.186122$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



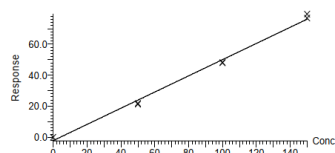
Compound name: Enrofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998659$, $r^2 = 0.997321$
Calibration curve: $0.17505 \cdot x + 0.194897$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



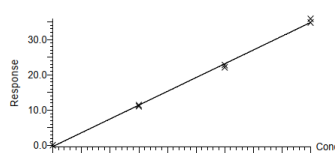
Compound name: Kwas oksolinowy
Correlation coefficient: $r = 0.999507$, $r^2 = 0.999015$
Calibration curve: $0.585782 \cdot x + 0.196442$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



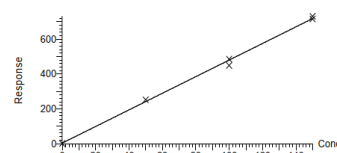
Compound name: Ciprofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.997142$, $r^2 = 0.994292$
Calibration curve: $0.522398 \cdot x + 2.18444$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



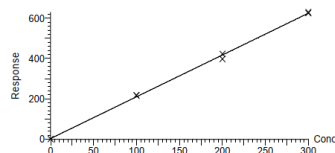
Compound name: Sarafloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.999089$, $r^2 = 0.998178$
Calibration curve: $0.780875 \cdot x + 0.308181$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



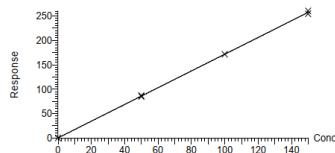
Compound name: Kwas naldiksyowy
Correlation coefficient: $r = 0.998751$, $r^2 = 0.997504$
Calibration curve: $4.76891 \cdot x + 2.8522$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



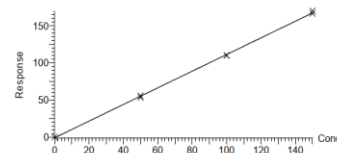
Compound name: Flumechina
Correlation coefficient: $r = 0.999330$, $r^2 = 0.998660$
Calibration curve: $2.07469 \cdot x + 2.45537$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



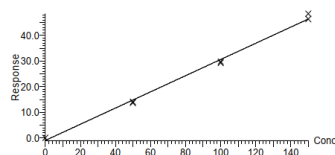
Compound name: Sulfametoksypyridazyna
Correlation coefficient: $r = 0.999868$, $r^2 = 0.999736$
Calibration curve: $1.71476 \cdot x + 0.13184$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



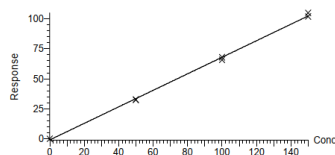
Compound name: Sulfamonometoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.999754$, $r^2 = 0.999509$
Calibration curve: $1.12062 \cdot x + 0.805632$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



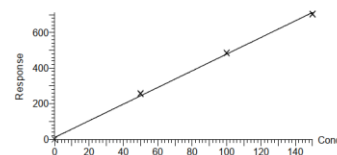
Compound name: Sulfaguandyna
Correlation coefficient: $r = 0.997917$, $r^2 = 0.995838$
Calibration curve: $0.315591 \cdot x + 0.951146$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



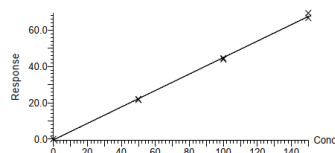
Compound name: Sulfametazyna
Correlation coefficient: $r = 0.999381$, $r^2 = 0.998763$
Calibration curve: $0.688119 \cdot x + 0.952969$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



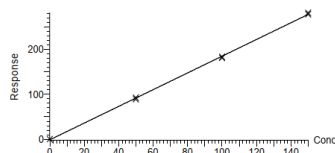
Compound name: Sulfadoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.999272$, $r^2 = 0.998544$
Calibration curve: $4.68027 \cdot x + 10.571$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



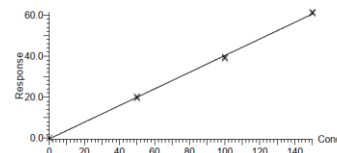
Compound name: Sulfadiazyna
Correlation coefficient: $r = 0.999459$, $r^2 = 0.998919$
Calibration curve: $0.453375 \cdot x + 0.440861$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Sulfatiazol
Correlation coefficient: $r = 0.999774$, $r^2 = 0.999548$
Calibration curve: $1.85882 \cdot x + 1.30808$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

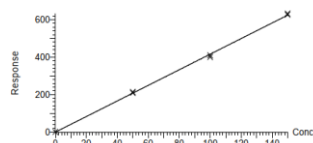


Compound name: Sulfachinoksalina
Correlation coefficient: $r = 0.999526$, $r^2 = 0.999052$
Calibration curve: $0.406131 \cdot x + 0.354911$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

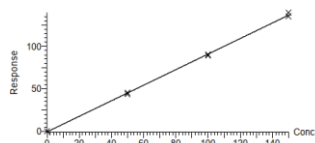


CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

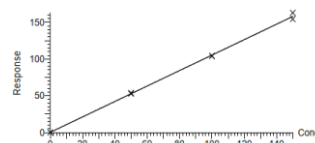
Compound name: Sulfadimetoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.999526$, $r^2 = 0.999051$
Calibration curve: $4.16143 \cdot x + -0.710054$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



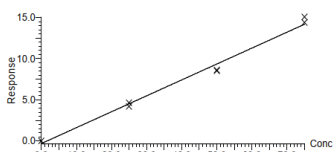
Compound name: Sulfametoksazol
Correlation coefficient: $r = 0.999612$, $r^2 = 0.999225$
Calibration curve: $0.915678 \cdot x + -0.64298$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



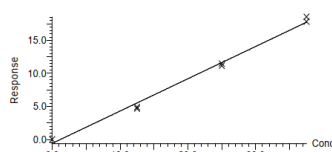
Compound name: Sulfamerazyina
Correlation coefficient: $r = 0.999239$, $r^2 = 0.998478$
Calibration curve: $1.05285 \cdot x + 0.0469339$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



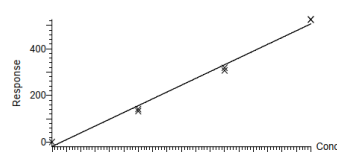
Compound name: Amoksyacylina
Correlation coefficient: $r = 0.994844$, $r^2 = 0.989913$
Calibration curve: $0.193525 \cdot x + -0.323421$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



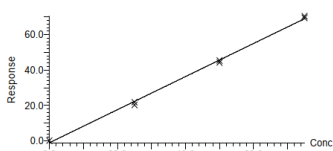
Compound name: Penicylina V
Correlation coefficient: $r = 0.996342$, $r^2 = 0.992697$
Calibration curve: $0.488915 \cdot x + -0.596811$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



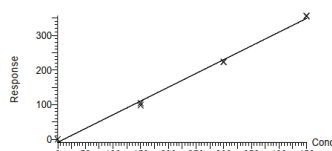
Compound name: Nafacylina
Correlation coefficient: $r = 0.995211$, $r^2 = 0.990445$
Calibration curve: $1.1673 \cdot x + -18.9846$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



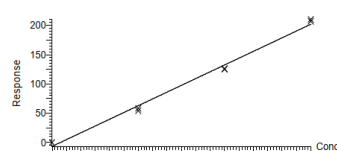
Compound name: Ampicylina
Correlation coefficient: $r = 0.998957$, $r^2 = 0.997915$
Calibration curve: $0.935378 \cdot x + -1.10762$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



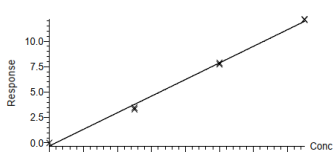
Compound name: Oksacylina
Correlation coefficient: $r = 0.998289$, $r^2 = 0.996580$
Calibration curve: $0.792895 \cdot x + -7.98649$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



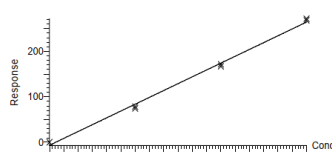
Compound name: Dikloksacylina
Correlation coefficient: $r = 0.996174$, $r^2 = 0.992363$
Calibration curve: $0.463429 \cdot x + -6.68913$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



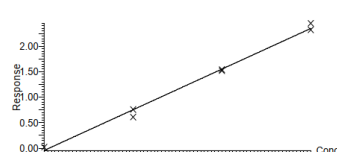
Compound name: Penicylina G
Correlation coefficient: $r = 0.998209$, $r^2 = 0.996421$
Calibration curve: $0.163174 \cdot x + -0.290771$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



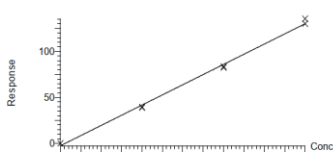
Compound name: Kloksacylina
Correlation coefficient: $r = 0.998013$, $r^2 = 0.996029$
Calibration curve: $0.601537 \cdot x + -4.65802$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



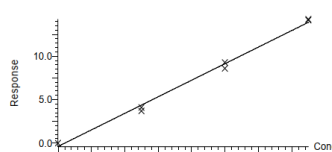
Compound name: Cefaprylina
Correlation coefficient: $r = 0.996996$, $r^2 = 0.994002$
Calibration curve: $0.0319364 \cdot x + -0.0446846$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



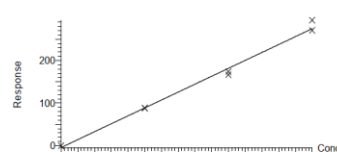
Compound name: Cefitior
Correlation coefficient: $r = 0.998189$, $r^2 = 0.996382$
Calibration curve: $0.0884704 \cdot x + -2.55843$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



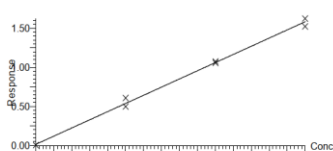
Compound name: Cefazolina
Correlation coefficient: $r = 0.997041$, $r^2 = 0.994091$
Calibration curve: $0.190333 \cdot x + -0.386061$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



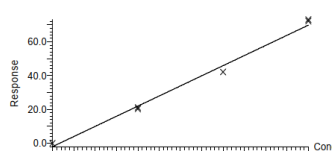
Compound name: Tylozyna
Correlation coefficient: $r = 0.995711$, $r^2 = 0.991441$
Calibration curve: $1.85927 \cdot x + -4.21841$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



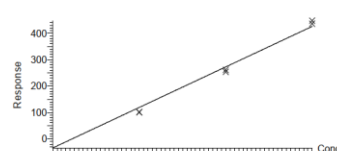
Compound name: Cefkwinom
Correlation coefficient: $r = 0.997750$, $r^2 = 0.995506$
Calibration curve: $0.0209334 \cdot x + 0.0148698$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



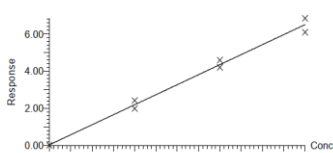
Compound name: Cefaleksyna
Correlation coefficient: $r = 0.995202$, $r^2 = 0.990427$
Calibration curve: $0.239434 \cdot x + -2.00139$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



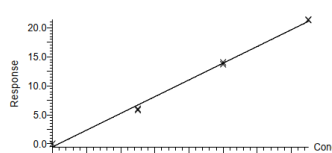
Compound name: Erytromycyna
Correlation coefficient: $r = 0.991862$, $r^2 = 0.983790$
Calibration curve: $1.53409 \cdot x + -34.1906$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



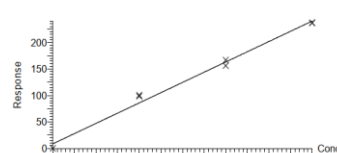
Compound name: Cefalonium
Correlation coefficient: $r = 0.995085$, $r^2 = 0.990193$
Calibration curve: $0.216199 \cdot x + 0.0256047$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Cefoperazon
Correlation coefficient: $r = 0.998136$, $r^2 = 0.996275$
Calibration curve: $0.288166 \cdot x + -0.516611$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

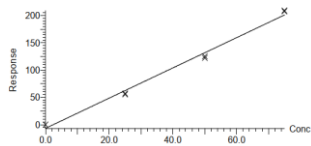


Compound name: Spiramycyna
Correlation coefficient: $r = 0.995035$, $r^2 = 0.990094$
Calibration curve: $0.773492 \cdot x + 8.48934$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

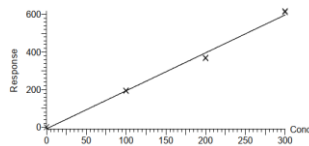


CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

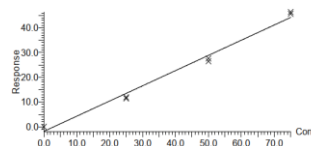
Compound name: Tylnikozyna
Correlation coefficient: $r = 0.995676$, $r^2 = 0.991371$
Calibration curve: $2.77392 \cdot x + -6.84832$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



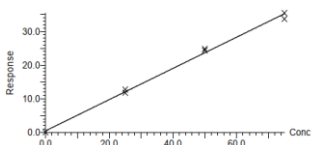
Compound name: Jozamycyna
Correlation coefficient: $r = 0.997212$, $r^2 = 0.994432$
Calibration curve: $2.02139 \cdot x + -8.62589$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



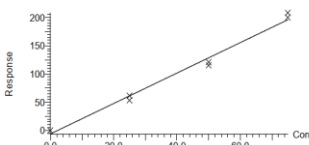
Compound name: Tulatromycyna
Correlation coefficient: $r = 0.994200$, $r^2 = 0.988434$
Calibration curve: $0.613966 \cdot x + -1.82141$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Trimetoprim
Correlation coefficient: $r = 0.998041$, $r^2 = 0.996086$
Calibration curve: $0.464266 \cdot x + 0.439225$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

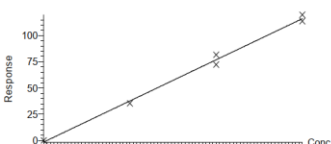


Compound name: Tiamulina
Correlation coefficient: $r = 0.994022$, $r^2 = 0.988079$
Calibration curve: $2.69434 \cdot x + -6.0216$
Response type: Internal Std (Ref 45), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

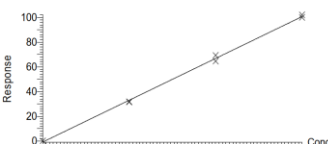


Antybiotyki po ekstrakcji TCA

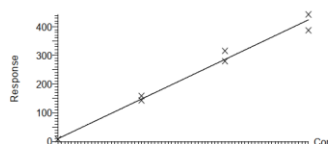
Compound name: Oksytetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.997475$, $r^2 = 0.994956$
Calibration curve: $0.783256 \cdot x + -1.47121$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



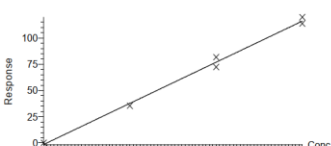
Compound name: 4-epitetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.997183$, $r^2 = 0.998408$
Calibration curve: $0.676026 \cdot x + -0.772897$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



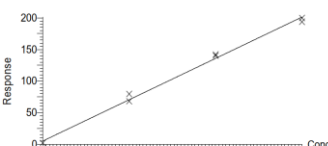
Compound name: Doksyacyklina
Correlation coefficient: $r = 0.992576$, $r^2 = 0.985208$
Calibration curve: $2.76128 \cdot x + 9.96257$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



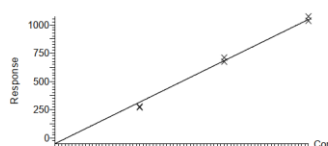
Compound name: 4-epioksyketyrtetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.997475$, $r^2 = 0.994956$
Calibration curve: $0.783256 \cdot x + -1.47121$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



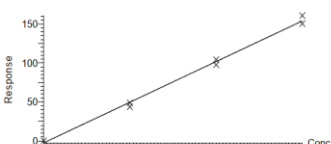
Compound name: Chlorotetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.997183$, $r^2 = 0.998408$
Calibration curve: $1.30904 \cdot x + 5.04973$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Linkomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.992134$, $r^2 = 0.992284$
Calibration curve: $7.31286 \cdot x + -49.6762$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



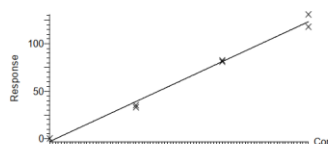
Compound name: Tetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.997606$, $r^2 = 0.995218$
Calibration curve: $1.04324 \cdot x + -2.49394$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



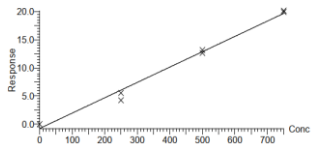
Compound name: 4-epichlorotetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.995297$, $r^2 = 0.990615$
Calibration curve: $0.160897 \cdot x + 0.981117$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



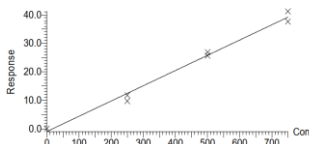
Compound name: Spektynomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.995568$, $r^2 = 0.991156$
Calibration curve: $0.280527 \cdot x + -2.97447$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



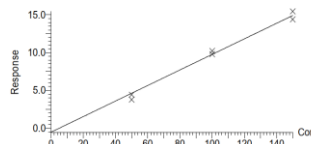
Compound name: Streptomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.994557$, $r^2 = 0.989144$
Calibration curve: $0.027486 \cdot x + -0.755093$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



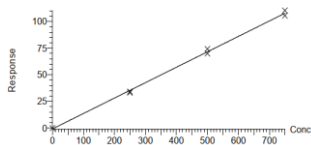
Compound name: Dihydrostreptomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.995181$, $r^2 = 0.990385$
Calibration curve: $0.0535056 \cdot x + -0.954445$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



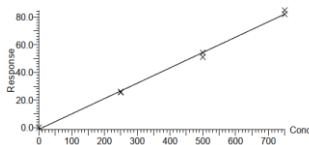
Compound name: Kanamycyna
Correlation coefficient: $r = 0.995484$, $r^2 = 0.990988$
Calibration curve: $0.102946 \cdot x + -0.530535$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Paromomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.998933$, $r^2 = 0.997867$
Calibration curve: $0.144914 \cdot x + -0.895442$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Neomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.998532$, $r^2 = 0.997066$
Calibration curve: $0.110844 \cdot x + -1.09567$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Gentamycyna
Correlation coefficient: $r = 0.994272$, $r^2 = 0.988576$
Calibration curve: $0.0733187 \cdot x + -0.169498$
Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

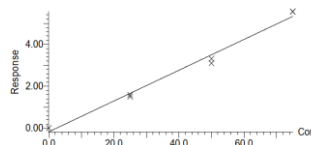
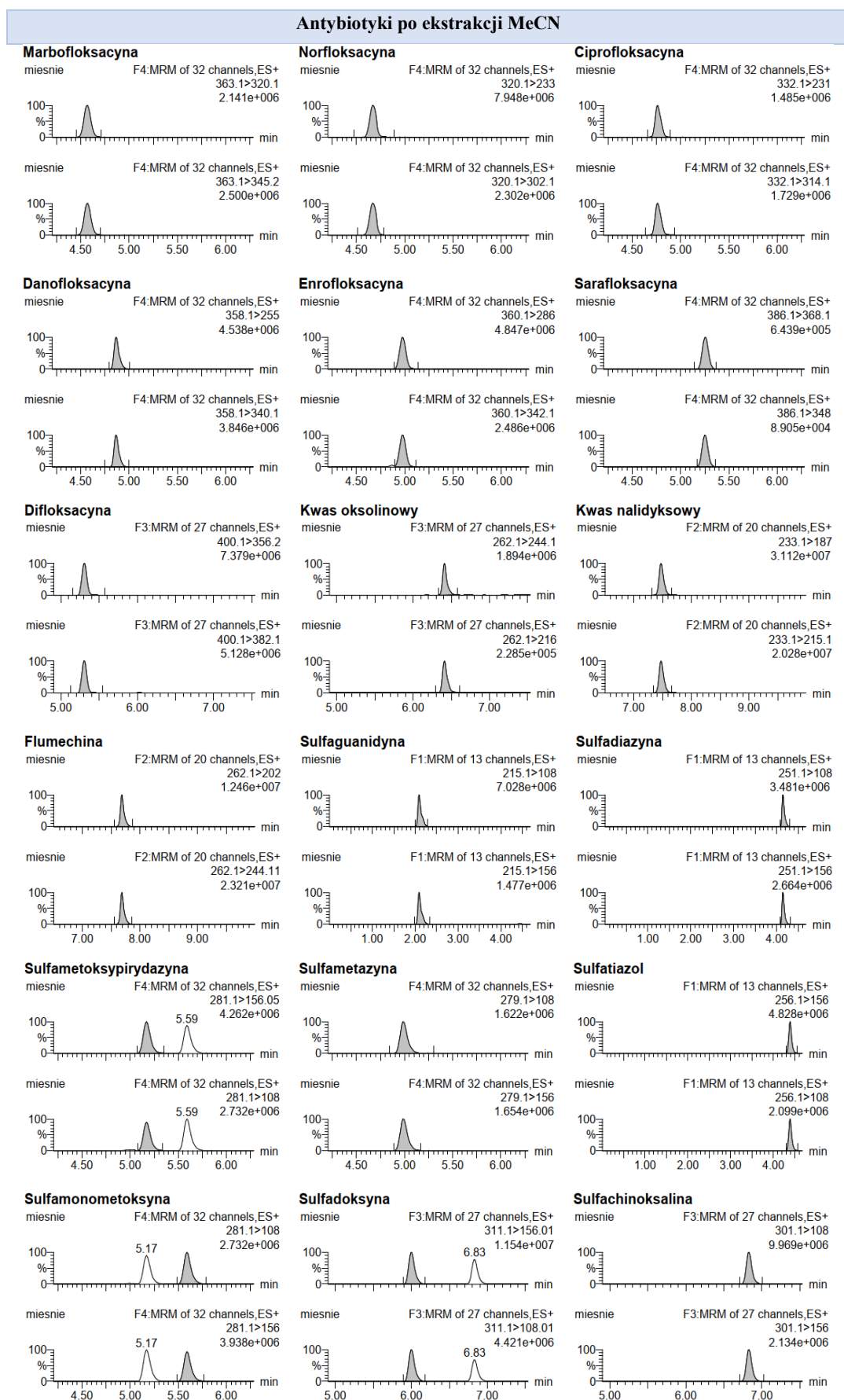
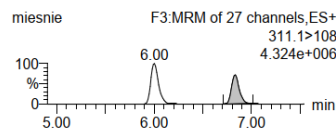
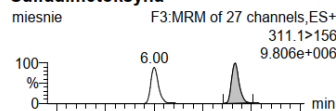


Tabela 19. Chromatogramy oznaczanych antybiotyków – matryca mięsne

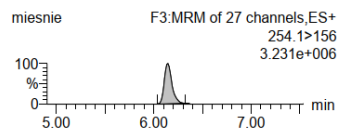
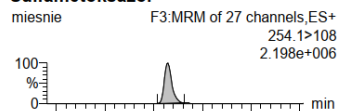


CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

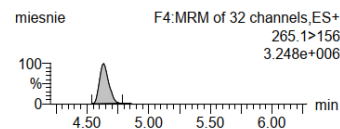
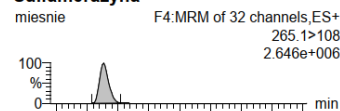
Sulfadimetoksyna



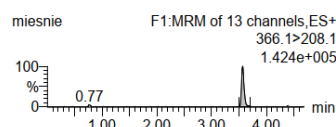
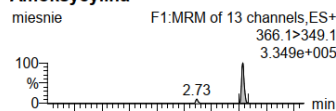
Sulfametoksazol



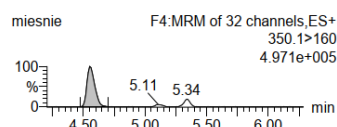
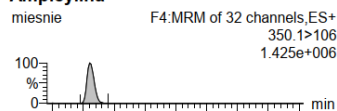
Sulfamerazyna



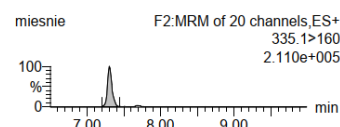
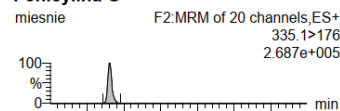
Amoksylicyna



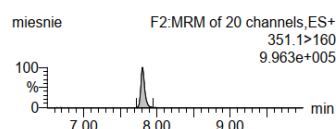
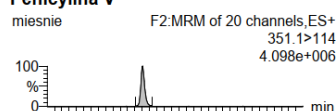
Ampicylina



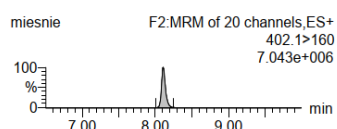
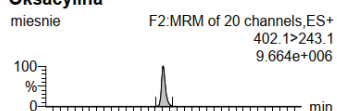
Penicylina G



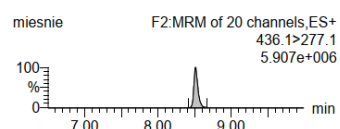
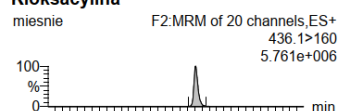
Penicylina V



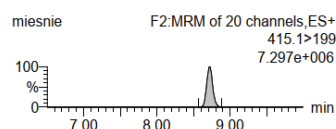
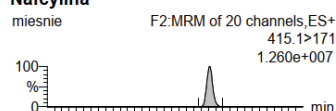
Oksacylina



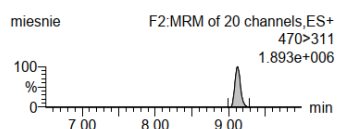
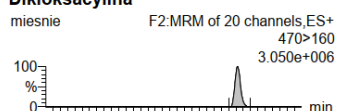
Kloksacylina



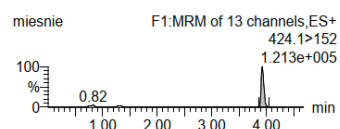
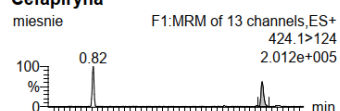
Nafcylicyna



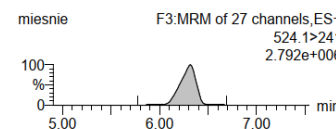
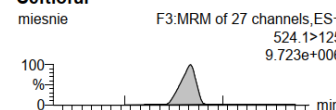
Dikloksacylina



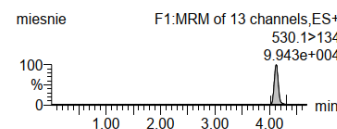
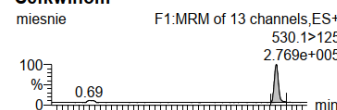
Cefapiryna



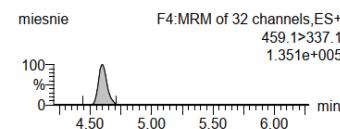
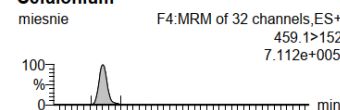
Ceftiofur



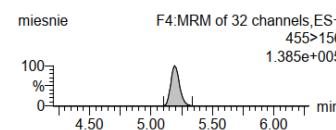
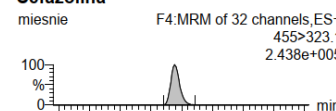
Cefkwinom



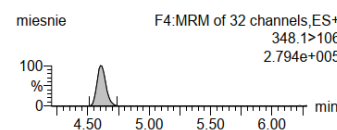
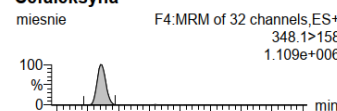
Cefalonium



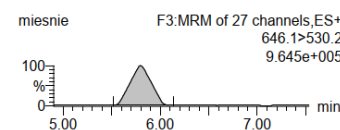
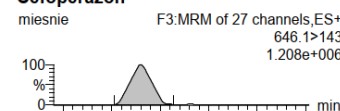
Cefazolina



Cefaleksyna

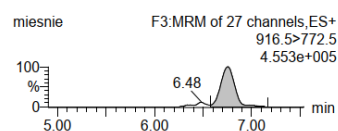
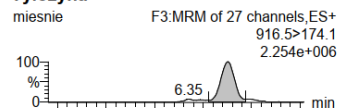


Cefoperazon

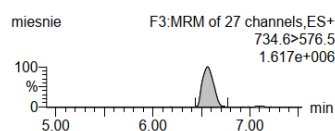
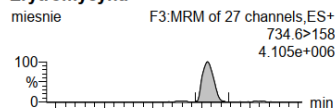


CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

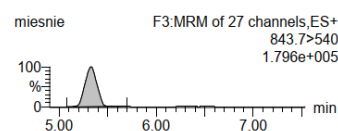
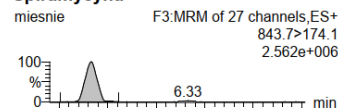
Tylozyna



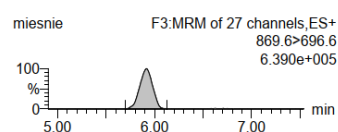
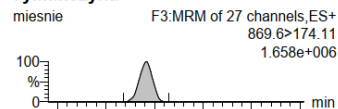
Erytromycyna



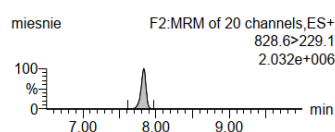
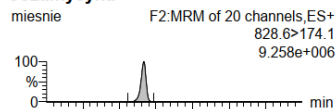
Spiramycyna



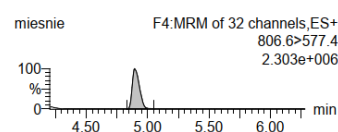
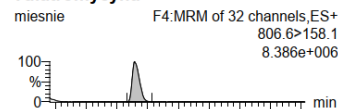
Tylmikozyzna



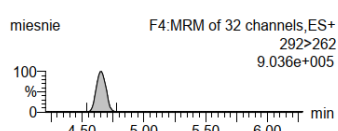
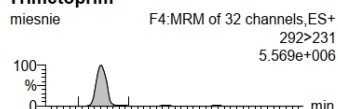
Jozamycyna



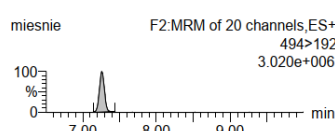
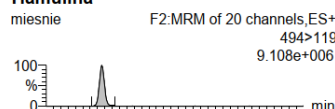
Tulatromycyna



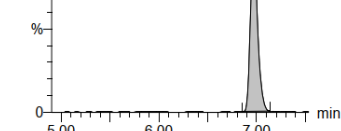
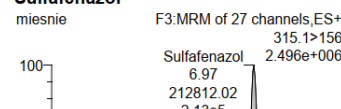
Trimetoprim



Tiamulina

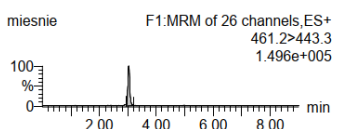
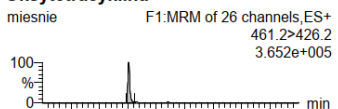


Sulfafenazol

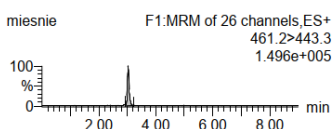
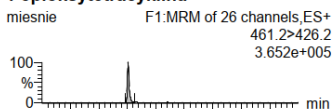


Antybiotyki po ekstrakcji TCA

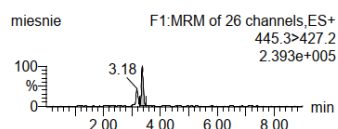
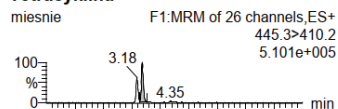
Oksytetracyklina



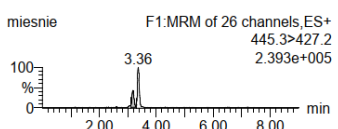
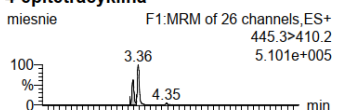
4-epioksyetetracyklina



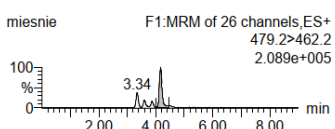
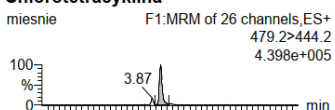
Tetracyklina



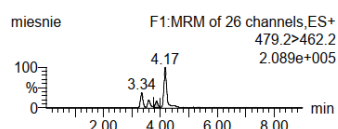
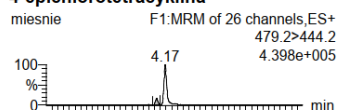
4-epitetracyklina



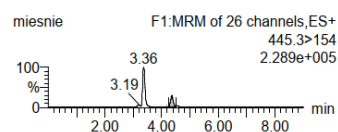
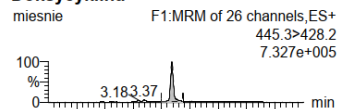
Chlorotetracyklina



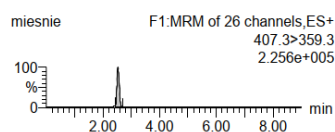
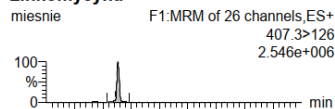
4-epichlorotetracyklina



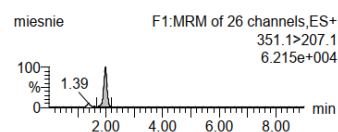
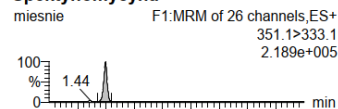
Doksycyklina

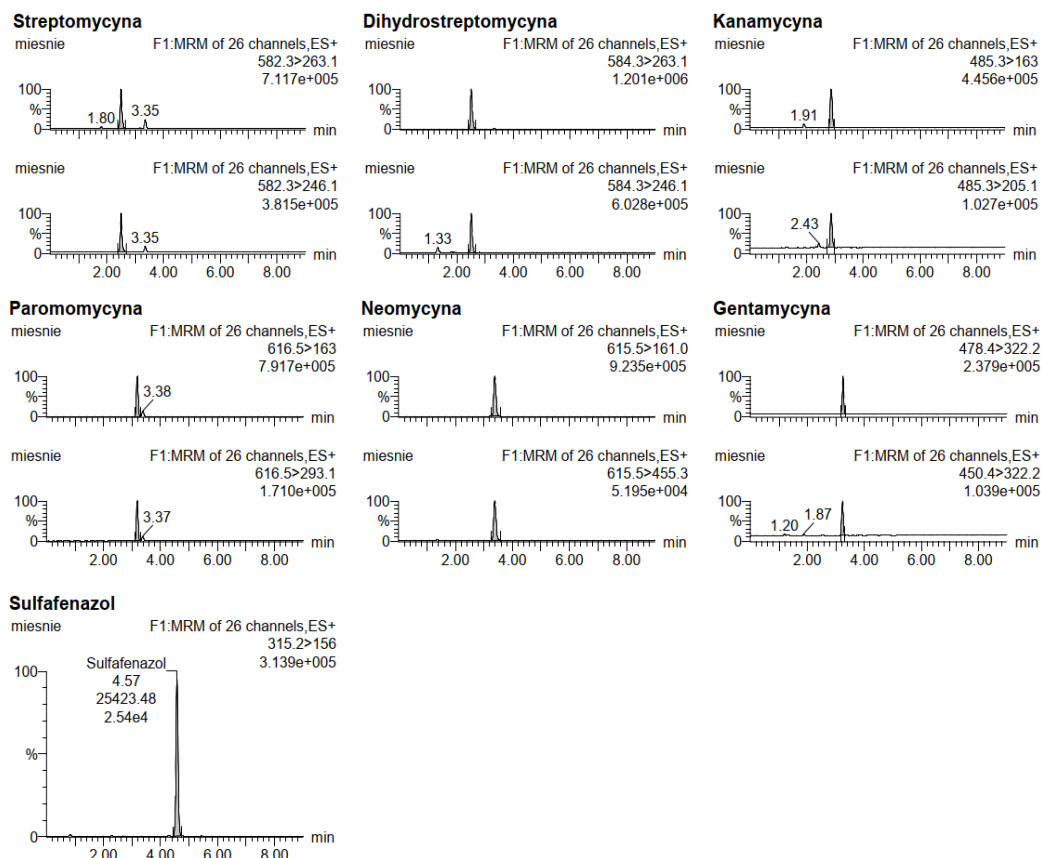


Linkomycyna



Spektynomycyna





Wszystkie oznaczane substancje przeciwbakteryjne, za wyjątkiem oksytetracykliny i 4-epioksytetracykliny, udało się skutecznie rozdzielić. Zoptymalizowana metoda nie pozwala na rozdzielenie tych dwóch związków, a wymagany MRL zgodnie z „Rozporządzenie Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji pod względem maksymalnych limitów pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego”[6], wynosi dla ich sumy 100 µg/kg dla mięśni i mleka, a dla nerek 600 µg/kg. Dlatego do próbek fortyfikowanych dodawano jedynie oksytetracyklinę na poziomach odpowiadającym MRL.

Podczas optymalizacji procedury przeprowadzono również osobne doświadczenia dla 4-epioksytetracykliny w celu sprawdzenia poprawności jej ekstrakcji. Pozwoliło to na ocenę odzysków i potwierdzenie, że metoda ekstrakcji kwasem trichlorooctowym jest odpowiednia.

5.4. Procedura badawcza oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w jajach metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas

Celem tej procedury jest przedstawienie metody oznaczania pozostałości antybiotyków i chemioterapeutyków w jajach. Obecność antybiotyków w jajach spożywanych przez ludzi może stanowić poważne zagrożenie dla ich zdrowia. W przypadku tej matrycy wartości MRL są wyznaczone tylko dla kilku antybiotyków, w tym dla penicyliny V, tylozyny, erytromycyny, linkomycyny oraz tetracyklin z wyjątkiem doksycykliny. Pozostałe antybiotyki są niedozwolone do stosowania. Przyjęte wartości MRL na potrzeby opracowania i walidacji metody określono zgodnie z wytycznymi krajowymi.

Opracowana procedura oznaczania antybiotyków w jajach opierała się tym razem na zastosowaniu jednej ekstrakcji dla wszystkich wymaganych związków, w przeciwieństwie do procedury zastosowanej dla mięśni, mleka oraz nerek, gdzie wykorzystano dwa podejścia. W przypadku jaj konieczne jest kontrolowanie antybiotyków z grupy β -laktamów, makrolidów, pleuromutylin, sulfonamidów, fluorochinolonów, tetracyklin oraz linkozamidów.

I. Przygotowanie roztworów roboczych do wzbogacenia próbek

Roztwór roboczy wzorca wewnętrznego (IS) sulfafenazolu (2 $\mu\text{g/ml}$) w wodzie przygotowywano na bieżąco. W tym celu pobierano 20 μl roztworu podstawowego sulfafenazolu o stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$ do kolbki miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski.

Przygotowanie roztworów roboczych antybiotyków odbywało się na bieżąco, z uwzględnieniem odpowiednich wartości MRL lub przyjętych wartości. Do kolbki miarowej o pojemności 50 ml i 10 ml dodawano odpowiednie ilości wzorców, zgodnie z wartościami podanymi w tabeli (**Tabela 20**), po czym uzupełniano wodą destylowaną do kreski.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 20. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – jaja

	Związek	MRL/ przyjęta wartość	Przygotowanie roztworu
1	Penicylina V	25	12,5 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
2	Amoksycylina	50	25 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
3	Ampicylina	50	
4	Penicylina G	50	
5	Oksacylina	50	
6	Kloksacylina	50	
7	Nafcylina	50	
8	Dikloksacylina	50	
9	Cefapiryna	50	
10	Ceftiofur	50	
11	Cefkwinom	50	
12	Cefalonium	50	
13	Cefazolina	50	
14	Cefaleksyna	50	
15	Cefoperazon	50	
16	Sulfaguanidyna	50	
17	Sulfadiazyna	50	
18	Sulfametoksypyridazyna	50	
19	Sulfametazyna	50	
20	Sulfatiazol	50	
21	Sulfamonometoksyna	50	
22	Sulfadoksyna	50	
23	Sulfachinoksalina	50	
24	Sulfadimetoksyna	50	
25	Sulfametoksazol	50	
26	Sulfamerazyna	50	
27	Spiramycyna	50	
28	Tylmikozyzna	50	
29	Jozamycyna	50	
30	Marbofloksacyzna	50	
31	Norfloksacyzna	50	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

32	Ciprofloksacyna	50	25 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
33	Enrofloksacyna	50	
34	Danofloksacyna	50	
35	Sarafloksacyna	50	
36	Difloksacyna	50	
37	Kwas oksolinowy	50	
38	Kwas nalidyksowy	50	
39	Flumechina	50	
40	Doksycyklina	50	75 µl x 1000 µg/ml do 50 ml
41	Linkomycyna	50	
42	Erytromycyna	150	20 µl x 1000 µg/ml do 10 ml
43	Tylozyna	200	
44	Oksytetracyklina (suma oksytetracyklina i 4-epioksytetracyklina)	200	
45	Tetracyklina	200	
46	4epi-tetracyklina	200	
47	Chlorotetracyklina	200	
48	4epi-chlorotetracyklina	200	
49	Tiamulina	1000	100 µl x 1000 µg/ml do 10 ml

II. Przygotowanie i przechowywanie próbek do badań

Próbki jaj pobrane do badań przez Inspekcję Weterynaryjną z województwa wielkopolskiego, zachodniopomorskiego oraz lubuskiego, po zarejestrowaniu i nadaniu numeru badania były homogenizowane i dzielone na dwie części. Jedną część (B), oznakowaną numerem badania i kierunkiem badania, przechowuje się w zamrażarce, aby nie uległa zniszczeniu ani zepsuciu, a drugą część (A) przeznaczoną do analizy, do dnia badania również przechowuje się w zamrażarce, ale innej niż część B.

III. Próbki matrycowe wolne od leków przeciwbakteryjnych

Próbki jaj, w których wcześniej nie stwierdzono obecności leków przeciwbakteryjnych, zostały zachowane do późniejszego wykorzystania przy tworzeniu zarówno próbek ślepych, jak i próbek wzbogaconych. Próbki te posłużyły jako materiał odniesienia, umożliwiając monitorowanie ważności wyników oraz zapewnienie, że nie doszło do zanieczyszczeń podczas procesu analizy.

5.4.1. Oczyszczanie próbek i przygotowanie do analizy LC-MS/MS

Do każdej serii próbek jaj dodano próbkę odczynnikową, ślepa matrycową oraz trzy próbki fortyfikowane, postępując z nimi w taki sam sposób, jak z próbkami badanymi. Próbkę odczynnikową przygotowano, odważając $(1,00 \pm 0,01)$ g wody do polipropylenowych probówek wirówkowych o pojemności 50 ml. Próbką ślepa – odważono $(1,00 \pm 0,01)$ g materiału wolnego od antybiotyków, również do probówek wirówkowych o tej samej pojemności. Dla próbek badanych odważono $(1,00 \pm 0,01)$ g próbki, natomiast próbki fortyfikowane zostały przygotowane poprzez odważenie $(1,00 \pm 0,01)$ g czystej próbki wolnej od antybiotyków (matrycy). Do każdej analizowanej próbki, z wyjątkiem próbki odczynnikowej, dodano 100 μ l wzorca wewnętrznego o stężeniu 2 μ g/ml. Natomiast do próbek fortyfikowanych dodano odpowiednią ilość mieszaniny wzorców według wartości, które przedstawia **Tabela 21**. Zawartość każdej probówki po wymieszaniu na mieszadle (Vortex), została odstawiona na około 15 minut. Po tym czasie przystąpiono do etapu ekstrakcji.

Tabela 21. Sposób przygotowania próbek fortyfikowanych - matryca jaja

Fortyfikat	Naważka (matryca) [g]	Ilość roztworu wzorcowego [μ l]	Ilość roztworu IS (2 μ g/ml) [μ l]
Próbka odczynnikowa	1,00 (woda)	0	0
Próbka ślepa	1,00	0	100
Fortyfikat 0,5 MRL	1,00	50	100
Fortyfikat 1,0 MRL	1,00	100	100
Fortyfikat 1,5 MRL	1,00	150	100
Kontrola odzysku	1,00	100	100

Do każdej próbki dodano 1 ml 0,02 M roztworu kwasu szczawiowego w wodzie (pH 4), a następnie dodano do próbek po 0,5 ml 0,1 M roztworu Na₂EDTA w wodzie. Probki wymieszano na mieszadle typu Vortex i dodano do każdej po 8 ml acetonitrylu. Zawartość probówek mieszano ponownie przez 30 sekund, a następnie wytrząsano przez 10 minut na wytrząsarce. Probki wirowano przez 10 minut przy szybkości 4500 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Po odwirowaniu supernatanty naniesiono bez uprzedniego

kondycjonowania na polimeryczne kolumnienki Oasis HLB (200mg/6ml), a oczyszczone ekstrakty zbierano do kolbek okrągłodennych o pojemności 50 ml. Całość odparowano do sucha na wyparce próżniowej w temperaturze 45°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml 0,025% HFBA i wymieszano na mieszadło typu Vortex. Otrzymane ekstrakty przesączono przez filtr strzykawkowy (0,45 µm, 13 mm, PVDF) do probówek z dnem stożkowym i ponownie wirowano przez 15 minut przy szybkości 2000 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}$. Odwirowane ekstrakty przeniesiono do fiolek i przeznaczano do analizy chromatograficznej LC-MS/MS.

5.4.2. Warunki analizy LC-MS/MS oraz ich optymalizacja

Analizy przeprowadzono za pomocą ultrawysokosprawnego chromatografu cieczonego Acquity UPLC H-Class sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Xevo TQ, firmy Waters (Stany Zjednoczone), stosowanego również w opisanych wcześniej procedurach oznaczania antybiotyków w mięśniach, mleku i nerkach.

Detektor mas pracował z wykorzystaniem źródła jonizacji typu elektro spray w trybie dodatniej jonizacji (ESI⁺), a dane zbierane były w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM).

W metodzie tej wykorzystano dane z wcześniejszej optymalizacji dla analizy próbek mięśni, mleka i nerek. Przyjęto parametry systemu detektora masowego z pierwszej metody analizy. Podjęto próbę połączenia wszystkich antybiotyków analizowanych w tej metodzie w jedną procedurę analityczną poprzez włączenie do niej tetracyklin i linkomycyny, które w poprzednich badaniach oznaczano przy użyciu drugiej metody.

W ostatecznie wybranej metodzie napięcie na kapilarze wynosiło 3,0 kV, temperatura źródła była ustawiona na 150°C, a gaz desolwacyjny (azot) ogrzewano do temperatury 550°C. Przepływ gazu w stożku ustawiono na 50 l/h, natomiast gazu desolwacyjnego na 1100 l/h. Przepływ gazu zderzeniowego (argonu) wynosił 0,15 ml/min.

Dla większości antybiotyków oznaczanych w tej procedurze wykorzystano wcześniej zoptymalizowane parametry takie jak napięcie na stożku (cone) oraz energia kolizyjna. Ponieważ tetracykliny i linkomycyna były wcześniej oznaczane w innych warunkach, konieczne było ponowne sprawdzenie tych parametrów. W tym celu

przygotowano pojedyncze roztwory tych antybiotyków o stężeniu 0,1 µg/ml w metanolu o czystości LC/MS i bezpośrednio wstrzykiwano je do źródła jonizacji. Warunki dla każdego z tych antybiotyków były optymalizowane indywidualnie. Ustalono optymalne parametry dla jonu macierzystego, a następnie przy włączonym gazie kolizyjnym dobrano odpowiednie warunki dla jonów potomnych.

Metoda MRM dla wszystkich oznaczanych w tej metodzie antybiotyków została podzielona na dwadzieścia przedziałów czasowych, z opóźnieniem między skanami oraz między kanałami wynoszącym 0,1 sekundy. Dane te, wraz z czasami retencji (RT), jonem macierzystym oraz jonami potomnymi, zostały przedstawione w tabeli (**Tabela 22**).

Tabela 22. Parametry dla antybiotyków - matryca jaja

RT – czas retencji, CV – napięcie na stożku, CE – energia kolizyjna, MRM – przedziały czasowe:

1 = (3,70 – 4,70 min); 2 = (5,90 – 7,50 min); 3 = (4,60 – 5,55 min); 4 = (6,45 – 7,40 min); 5 = (4,95 – 6,80 min); 6 = (4,30 – 5,10 min); 7 = (7,00 – 8,20 min); 8 = (7,40 – 8,50 min); 9 = (8,30 – 9,00 min); 10 = (1,60 – 2,50 min); 11 = (7,00 – 8,50 min); 12 = (3,75 – 5,00 min); 13 = (5,55 – 6,90 min); 14 = (4,30 – 5,60 min); 15 = (5,00 – 6,10 min); 16 = (6,00 – 7,30 min); 17 = (3,30 – 4,00 min); 18 = (8,10 – 8,90 min); 19 = (8,70 – 9,50 min); 20 = (1,00 – 9,50 min)

Związek	RT (min)	Jon macierzysty (m/z)	Jony potomne (m/z)	CV (V)	CE (eV)	MRM
Marbofloksacyna	4,58	363,1	345,2/320,1	30	20/15	6
Norfloksacyna	4,68	320,1	233,0/302,1	30	25/20	6
Ciprofloksacyna	4,77	332,1	231,0/314,1	30	35/20	14
Danofloksacyna	4,86	358,1	255,0/340,1	35	35/20	3
Enrofloksacyna	4,98	360,0	286,0/342,1	35	35/20	14
Sarafloksacyna	5,25	386,1	368,1/348,0	33	22/32	5
Difloksacyna	5,30	400,1	382,1/356,2	35	20/18	15
Kwas oksolinowy	6,39	262,1	244,1/216,0	30	20/28	2
Kwas nalidyksowy	7,47	233,1	215,1/187,0	20	20/20	11
Flumechina	7,67	262,1	202,0/244,1	30	33/18	11
Sulfaguanidyna	2,08	215,1	108,0/156,0	25	22/14	10
Sulfadiazyna	4,15	251,1	108,0/156,0	27	22/14	12
Sulfametoksypirydazyna	5,17	281,1	108,0/156,05	30	25/17	3
Sulfametazyna	4,99	279,1	108,0/156,0	30	25/18	14
Sulfatiazol	4,38	256,1	108,0/156,0	30	22/14	1
Sulfamonometoksyna	5,59	281,1	108,0/156,0	30	25/18	15

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Sulfadoksyna	6,00	311,1	108,01/156,01	30	25/18	5
Sulfachinoksalina	6,83	301,1	156,0/108,0	30	24/17	4
Sulfadimetoksyna	6,02	311,1	108,0/156,0	35	25/20	13
Sulfametoksazol	6,14	254,1	108,0/156,0	30	24/17	13
Sulfamerazyna	4,65	265,1	108,0/156,0	30	24/17	14
Amoksyacylina	3,58	366,1	208,1/349,1	15	13/9	17
Ampicylina	4,57	350,1	106,0/160,0	22	15/12	14
Penicylina G	7,29	335,1	176,0/160,0	18	12/13	7
Penicylina V	7,79	351,1	114,0/160,0	15	35/12	11
Oksacylina	8,09	402,1	243,1/160,0	18	12/14	8
Kloksacylina	8,51	436,1	277,1/160,0	18	15/12	18
Nafcylina	8,72	415,1	171,0/199,0	15	35/15	9
Dikloksacylina	9,12	470,0	160,0/311,0	18	12/13	19
Cefapiryna	3,92	424,1	124,0/152,0	25	40/22	1
Ceftiofur	6,32	524,1	125,0/241,1	25	40/20	16
Cefkwinom	4,11	530,1	125,0/134,0	16	50/25	1
Cefalonium	4,59	459,1	152,0/337,1	20	20/10	6
Cefazolina	5,19	455,0	156,0/323,1	20	15/10	3
Cefaleksyna	4,57	348,1	106,0/158,0	20	25/8	6
Cefoperazon	5,80	646,1	143,0/530,2	20	30/12	5
Tylozyna	6,76	916,5	174,1/772,5	45	42/29	4
Erytromycyna	6,54	734,6	158,0/576,5	32	27/18	4
Spiramycyna	5,34	843,7	174,1/540,0	45	33/30	15
Tylmikozyzna	6,11	869,6	696,6/174,11	45	44/45	2
Jozamycyna	7,83	828,6	174,0/229,1	45	35/30	8
Tiamulina	7,26	494,0	119,0/192,0	25	44/24	20
Oksytetracyklina	4,77	461,2	426,2/443,3	25	20/12	14
4-epioksytetracyklina	4,77	461,2	426,2/443,3	25	20/12	14
Tetracyklina	4,98	445,3	410,2/427,2	25	18/13	3

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4-epitetrazyklina	4,78	445,3	410,2/427,2	25	18/13	3
Chlorotetracyklina	5,67	479,2	444,2/462,2	25	22/19	5
4-epichlorotetracyklina	5,34	479,2	444,2/462,2	25	22/19	5
Doksycyklina	4,99	445,3	428,2/154,0	25	19/27	14
Linkomycyna	4,20	407,3	126,0/359,3	33	26/18	12
Sulfafenazol IS	6,97	315,1	156,0	40	20	4

Do analizy zastosowano ten sam system UPLC, co w badaniach próbek mięśni, mleka i nerek. Składał się on z autosamplera wyposażonego w tacki na 96 fiolek, degazera, pompy binarnej, wstrzykiwacza oraz termostatu do kolumn chromatograficznych. Rozdzielenie oznaczanych antybiotyków przeprowadzono także na kolumnie chromatograficznej Acquity UPLC HSS C18 (2,1 x 100 mm; 1,8 μ m) firmy Waters, z filtrem (0,2 μ m; 2,1 mm) firmy Waters.

W celu optymalizacji separacji antybiotyków na kolumnie chromatograficznej, która obejmowała dobór faz ruchomych oraz gradientu przygotowano w fiole mieszaninę wzorcową wszystkich oznaczanych w tej metodzie antybiotyków o stężeniu 0,1 μ g/ml w 0,025% HFBA. W przypadkach, gdzie pojawiały się dwa piki odpowiadające temu samemu związkowi przeprowadzano dodatkowo analizę pojedynczego wzorca (sulfonamidy i tetracykliny).

Podczas optymalizacji sprawdzono metodę LC ustawioną dla matrycy mięśni, mleka i nerek (ekstrakcja MeCN), w której oznaczano wszystkie substancje przeciwbakteryjne uwzględnione w analizie jaj, z wyjątkiem tetracyklin i linkomycyny. W nowej metodzie zmieniono przedziały czasowe MRM, co pozwoliło na zwiększenie czułości analizy. Oceniono zachowanie wszystkich oznaczanych antybiotyków, w warunkach zastosowanej fazy ruchomej oraz gradientu elucji. Zastosowane warunki chromatograficzne obejmowały fazę A: 0,2% kwas mrówkowy w wodzie oraz fazę B: 0,2% kwas mrówkowy w acetonitrylu. Uzyskane wyniki wykazały dobrą separację pików oraz odpowiednią intensywność sygnału, co pozwoliło na zastosowanie tej metody do analizy antybiotyków w jajach.

Dokładny schemat warunków chromatograficznych był następujący: fazą ruchomą A był 0,2% kwas mrówkowy w wodzie, a fazą B 0,2% kwas mrówkowy w acetonitrylu. Temperatura kolumny w trakcie analizy wynosiła 30°C, a przepływ

0,3 ml/min. Początkowy gradient do 1 minuty wynosił 99,5% dla fazy A, później zmieniał się do 9 minuty do 40%, do 9,5 minuty osiągał 0% dla fazy A i ponownie wzrastał do 11 minuty do 99,5%. Stabilizacja kolumny trwała 2 minuty, a łączny czas analizy wynosił 13 minut **Tabela 23**. Objętość nastroju wynosiła 10 µl.

Tabela 23. Gradient faz ruchomych dla oznaczania antybiotyków w jajach

Czas (min)	Przepływ (ml/min)	Faza A 0,2% kwas mrówkowy w H ₂ O (%)	Faza B 0,2% kwas mrówkowy w MeCN (%)	Krzywa
0	0,30	99,5	0,5	-
1,0	0,30	99,5	0,5	6
9,0	0,30	40,0	60,0	6
9,5	0,30	0,0	100,0	6
11,0	0,30	99,5	0,5	11
13,0	0,30	99,5	0,5	-

5.4.3. Optymalizacja warunków ekstrakcji

Celem optymalizacji warunków ekstrakcji było opracowanie miarodajnej procedury analitycznej oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w jajach kurzych.

Głównym kryterium było uzyskanie jak najwyższych odzysków dla oznaczanych antybiotyków, gdyż jest to kluczowe, aby zapewnić miarodajne wyniki badań. Ważnym aspektem było także zminimalizowanie efektów matrycy, które mogą zakłócać analizę, generując interferencje lub fałszywe wyniki. Ważnymi elementami uwzględnionymi podczas opracowywania procedury było uzyskanie dobrej powtarzalności oraz dokładności. Spełnienie tych kryteriów jest niezbędne do zastosowania opracowanej procedury oznaczania antybiotyków w jajach w rutynowych analizach kontrolnych.

Ponieważ procedura obejmuje oznaczanie różnych grup antybiotyków, kluczowe było znalezienie jednej metody ekstrakcji, która zapewni optymalne odzyski dla wszystkich oznaczanych związków. Ostateczny wybór opierał się na metodzie ekstrakcji, która dawała najlepsze odzyski w całym zakresie oznaczanych antybiotyków, a nie tylko dla jednej grupy, nawet jeśli inne podejścia mogły dawać wyższe odzyski dla pojedynczych grupy antybiotyków.

Wyzwanie jakim jest ekstrakcja różnych grup antybiotyków wynika głównie z różnych właściwości chemicznych tych związków. W skład jajka wchodzi białko i żółtko, które znacząco różnią się składem chemicznym, a zarazem różnym powinowactwem do antybiotyków. Białko stanowi środowisko polarne, ponieważ jest bogate w glikoproteiny, natomiast żółtko jest środowiskiem niepolarnym zawierającym lipoproteiny [185]. Ze względu na różnice w polarności, pozostałości antybiotyków po podaniu kurze niosce mogą się w nich znacząco różnić. Aby uzyskać reprezentatywną próbkę do analizy leków weterynaryjnych, konieczne jest dokładne homogenizowanie jajek. Zgodnie z Instrukcją Głównego Lekarza Weterynarii, reprezentatywną próbkę do badań stanowi 12 zhomogenizowanych jaj [7].

Podobnie jak w przypadku innych matryc, do ekstrakcji antybiotyków z jaj stosuje się różne metody, takie jak QuEChERS [169] czy SPE [186]. Najczęściej jednak wykorzystuje się ekstrakcję (LLE) z użyciem rozpuszczalników organicznych, głównie acetonitrylu lub jego mieszaniny z wodą [175, 177].

Podjęto próby ekstrakcji substancji przeciwbakteryjnych z jaj, stosując jako rozpuszczalnik acetonitryl, ponieważ w przypadku wcześniej badanych matryc okazał się skuteczny. Przetestowano również ekstrakcję z zastosowaniem metody typu QuEChERS, oceniając odzysk analitów oraz skuteczność oczyszczania próbek jaj. W literaturze podkreśla się dodatek buforu podczas ekstrakcji antybiotyków z jaj [187] ze względu na pH tej matrycy, które może utrudniać skuteczną izolację tych związków. Istotne jest jednak dobranie optymalnego pH dla wszystkich analizowanych grup antybiotyków, ponieważ niektóre z nich, jak makrolidy, nie są stabilne w $\text{pH} < 4$ [186]. Dodatkowo, aby zapobiec tworzeniu kompleksów tetracyklin z jonami metali obecnymi w matrycy, zastosowano w podjętych próbach ekstrakcji wodny roztwór Na_2EDTA [188].

Próbki jaj (każda próba składająca się z 12 jaj) zostały zebrane przez Inspekcję Weterynaryjną, dostarczone do laboratorium Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu, następnie po homogenizacji zostały podzielone i przechowywane w warunkach zamrożenia. Przed przystąpieniem do analizy próbki rozmrażano, ponownie homogenizowano i naważono.

Jako podstawę do badań wykorzystano kilka opracowanych procedur, w tym metodę ekstrakcji antybiotyków z paszy [189], metody opracowane dla ekstrakcji antybiotyków z jaj [177, 190-192], czy metody wykorzystujące technikę Quechers [193-

196]. Do każdego badania przygotowano po 6 próbek jaj na każdy poziom. Podzielono je na trzy grupy odpowiadające poziomom stężeń 0,5 MRL, 1 MRL oraz 1,5 MRL. Przygotowano także próbkę ślepą, aby wykluczyć ewentualne zanieczyszczenie pochodzące od tła.

Doświadczenie 1

Próbki odważono po $(1,00 \pm 0,01)$ g do polipropylenowych probówek wirówkowych. Do każdej próbki dodano po 100 μ l wzorca wewnętrznego (sulfafenazol) o stężeniu 2 μ g/ml oraz sporządzoną mieszaninę wszystkich wzorców na odpowiednich poziomach stężeń w objętościach: 50 μ l dla 0,5 MRL, 100 μ l dla 1 MRL i 150 μ l dla 1,5 MRL. Do przygotowanej próbki ślepej dodano wyłącznie 100 μ l wzorca wewnętrznego. Zawartości probówek dokładnie wymieszano i odczekano 15 minut. Do każdej próbki dodano 1 ml 0,02 M roztworu kwasu szczawowego w wodzie (pH 4), a następnie dodano do próbek po 0,5 ml 0,1 M roztworu Na_2EDTA w wodzie. Probki wymieszano na mieszadle typu Vortex i dodano do każdej po 8 ml acetonitrylu. Zawartość probówek mieszano ponownie przez 30 sekund, a następnie wytrząsano przez 10 minut na wytrząsarce. Probki wirowano przez 10 minut przy szybkości 4500 obr./min w temperaturze $\leq 4^\circ\text{C}$. Całość przeniesiono do kolbek okrągłodennych na 50 ml i odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml 0,025% HFBA i wymieszano na mieszadle typu Vortex. Otrzymano jednak bardzo mętny roztwór, który pozostał taki mimo prób filtracji za pomocą filtra strzykawkowego (0,45 μ m, 13 mm, PVDF) i nie mógł zostać nastrzyknięty do aparatu.

Doświadczenie 2

Etap przygotowania próbek był analogiczny jak w Doświadczeniu 1 do momentu wirowania próbek po ekstrakcji. Po przeanalizowaniu literatury dodano etap dodatkowego oczyszczania próbek na kolumnienkach SPE. Po odwirowaniu próbki naniesiono bez uprzedniego kondycjonowania na polimeryczne kolumnienki Oasis HLB (200mg/6ml), a oczyszczone ekstrakty zbierano do kolbek okrągłodennych o pojemności 50 ml. Całość odparowano do sucha na wyparce próżniowej w temperaturze $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml 0,025% HFBA i wymieszano na mieszadle typu Vortex. Otrzymane ekstrakty przesączono przez filtr strzykawkowy (0,45 μ m, 13 mm, PVDF) w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń i uzyskania klarownego roztworu, do probówek z dnem stożkowym. Następnie ponownie wirowano przez 15 minut

przy szybkości 2000 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}$. Odwirowane ekstrakty przeniesiono do fiolek i poddano analizie.

Doświadczenie 3

Próbki odważono po $(10,00 \pm 0,01)$ g do polipropylenowych probówek wirówkowych o pojemności 50 ml. Do każdej próbki dodano 100 μ l wzorca wewnętrznego (sulfafenazol) o stężeniu 2 μ g/ml oraz sporządzoną mieszaninę wszystkich wzorców na odpowiednich poziomach stężeń w objętościach: 50 μ l dla 0,5 MRL, 100 μ l dla 1 MRL i 150 μ l dla 1,5 MRL. Do przygotowanej próbki ślepej dodano wyłącznie 100 μ l wzorca wewnętrznego. Zawartości probówek dokładnie wymieszano i odstawiono na 15 minut. Do każdej próbki dodano 10 ml 0,1 M roztworu Na_2EDTA w wodzie i wytrząsano przez 1 minutę na mieszadłe typu Vortex, następnie dodano po 10 ml 1% kwasu octowego w acetonitrylu i ponownie wytrząsano przez 1 minutę. Do próbek dodano 4,00 g bezwodnego siarczanu magnezu i 1,00 g octanu sodu, a następnie natychmiast wytrząsano energicznie przez 1 minutę. Próbki wirowano przez 10 minut przy szybkości 4500 obr./min w temperaturze $\leq -10^{\circ}\text{C}$. Pobrano po 1 ml supernatantu do probówki, dodano 1 ml 0,025% HFBA, wymieszano, a następnie przesączono przez filtr strzykawkowy PVDF (0,45 μ m, 13 mm) do fiolek. Tak przygotowane próbki poddano analizie.

Po przeanalizowaniu próbek z Doświadczenia 2 i Doświadczenia 3 techniką LC-MS/MS porównano odzyski antybiotyków na wszystkich poziomach stężeń (0,5 MRL, 1 MRL, 1,5 MRL). Przeprowadzono analizę wpływu zastosowanej procedury oznaczania oraz stężenia analitów na uzyskane wyniki.

Szczegółowe wyniki odzysków oznaczanych antybiotyków w jajach na poszczególnych poziomach stężeń przedstawiono w tabelach: **Tabela A 7** i **Tabela A 8**, natomiast średnie odzyski z obydwóch doświadczeń zestawiono w **Tabela 24**. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na porównanie metody ekstrakcji rozpuszczalnikami połączonej z oczyszczaniem na kolumnkach z metodą typu QuEChERS. Wizualne porównanie wyników odzysków dla oznaczanych grup antybiotyków w matrycy jaj przedstawia **Wykres 4**.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

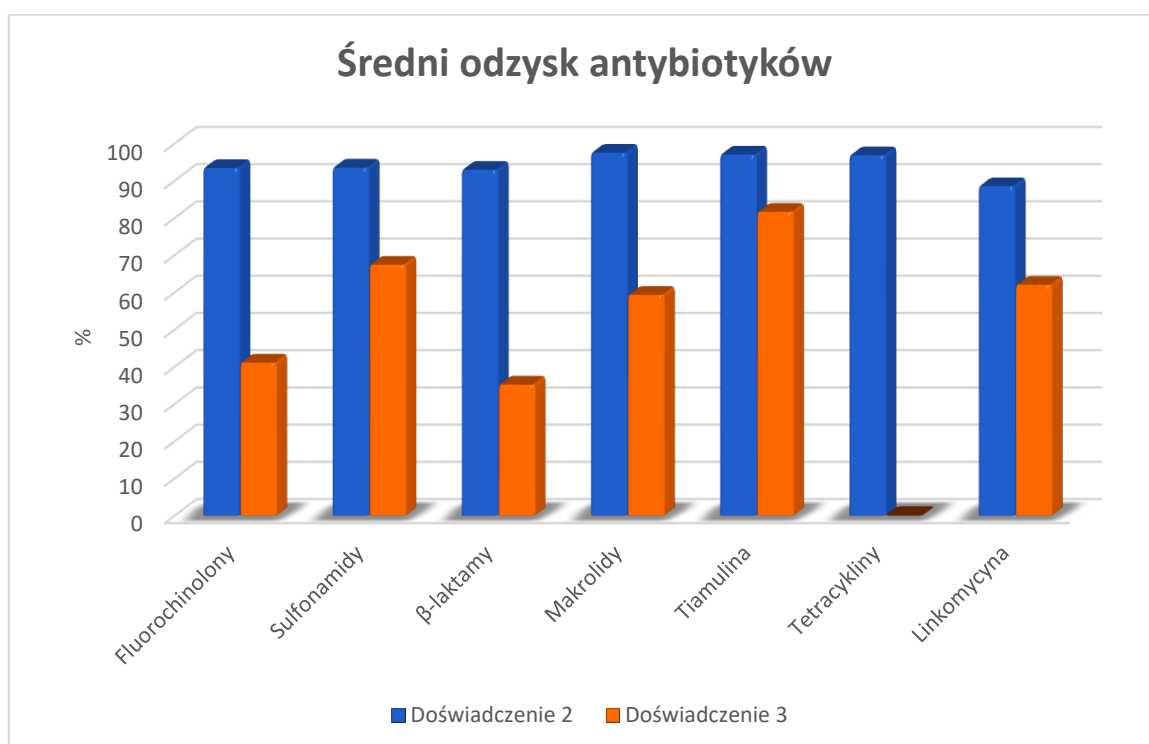
Tabela 24. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 2 i Doświadczeniu 3 (matryca jaja)

Związek	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)
	DOŚWIADCZENIE 2		DOŚWIADCZENIE 3	
Marbofloksacyna	95,1	93,4	42,1	41,1
Norfloksacyna	89,8		37,2	
Ciprofloksacyna	95,5		6,69	
Danofloksacyna	87,4		21,9	
Enrofloksacyna	92,2		7,08	
Sarafloksacyna	93,9		27,8	
Difloksacyna	95,3		56,6	
Kwas oksolinowy	94,1		64,7	
Kwas nalidyksowy	96,1		54,4	
Flumechina	94,9		92,9	
Sulfaguanidyna	93,3	93,5	68,7	67,4
Sulfadiazyna	98,7		74,1	
Sulfametoksypirydazyna	90,4		76,7	
Sulfametazyna	95,2		75,8	
Sulfatiazol	91,9		61,5	
Sulfamonometoksyna	94,9		59,3	
Sulfadoksyna	93,4		71,6	
Sulfachinoksalina	88,5		67,9	
Sulfadimetoksyna	93,0		48,1	
Sulfametoksazol	92,8		62,0	
Sulfamerazyna	96,7		75,3	
Amoksycylina	92,2	92,9	25,9	35,2
Ampicylina	93,6		38,0	
Penicylina G	88,6		42,5	
Penicylina V	95,3		46,6	
Oksacylina	96,0		54,1	
Kloksacylina	96,7		42,8	
Nafcylina	96,3		42,7	
Dikloksacylina	96,5		53,6	
Cefapiryna	90,5		19,2	
Ceftiofur	93,4		43,8	
Cefkwinom	91,0		17,3	
Cefalonium	88,9		22,3	
Cefazolina	93,4		18,5	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Cefaleksyna	90,1		24,6	
Cefoperazon	90,4		36,3	
Tylozyna	98,3	97,5	57,0	59,3
Erytromycyna	95,0		47,9	
Spiramycyna	96,8		48,9	
Tylmikozyzna	101		69,2	
Jozamycyna	96,2		73,6	
Tiamulina	97,0	97,0	81,6	81,6
Oksytetracyklina	98,4	96,8	Niski odzysk (<10%)	
4-epioksytetracyklina	96,8			
Tetracyklina	94,3			
4-epitetracyklina	95,3			
Chlorotetracyklina	95,3			
4-epichlorotetracyklina	98,0			
Doksycyklina	99,7			
Linkomycyna	88,5	88,5	62,0	62,0

Wykres 4. Średni odzysk antybiotyków z matrycy jaja – porównanie Doświadczenia 2 i Doświadczenia 3



Porównanie metod ekstrakcji substancji przeciwbakteryjnych z jaj wykazało istotne różnice w poziomie odzysku tych związków. Procedura oparta na ekstrakcji acetonitrylem i oczyszczaniu na kolumnkach Oasis HLB charakteryzowała się

wysokim odzyskiem dla wszystkich oznaczanych antybiotyków. Średni odzysk utrzymywały się na wysokim poziomie, przekraczając 80%. Nie zaobserwowano również znaczących różnic w odzyskach pomiędzy badanymi trzema poziomami stężeń. Oznacza to, że metoda ta jest skuteczna i dobrze dostosowana do analizy szerokiego spektrum antybiotyków, zapewniając dobrą ekstrakcję i minimalizując ryzyko strat analitów. W przypadku metody typu QuEChERS uzyskane wartości odzysku były niskie oraz bardziej zróżnicowane, nawet pomiędzy antybiotykami należącymi do tej samej grupy. Odzysk rzadko przekraczał 70%, a w przypadku tetracyklin wynosił poniżej 10%. Dodatkowo doksycyklina nie została wyekstrahowana, co potwierdza ograniczenia tej metody w oznaczaniu tej grupy antybiotyków. Analiza wykresu pozwala także zauważyć, że tylko tiamulina wykazuje względnie dobrą ekstrakcję w metodzie QuEChERS, jednak mimo to jej odzysk jest niższy niż w Doświadczeniu 2.

Wyniki te wskazują, że metoda ekstrakcji z użyciem acetonitrylu z dodatkiem buforu i Na_2EDTA oraz oczyszczania na kolumnkach Oasis HLB zapewnia skuteczne odzyski dla różnych grup antybiotyków, co czyni ją bardziej uniwersalnym podejściem w oznaczaniu pozostałości tych związków w żywności. Takie rezultaty są zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują, że ekstrakcja oparta na acetonitrylu, z dodatkiem Na_2EDTA i buforem o odpowiednim pH, jest kluczowa dla skutecznego odzysku antybiotyków o różnych właściwościach chemicznych.

Mimo że w literaturze są opisane inne metody typu QuEChERS skutecznie zastosowane do ekstrakcji antybiotyków z różnych matryc oraz różnych grup związków, ich skuteczność może być zależna od różnych parametrów, takich jak analizowane związki, charakterystyka matrycy czy warunki ekstrakcji. Natomiast zastosowana w Doświadczeniu 3 procedura z wykorzystaniem QuEChERS, mimo że jest odpowiednia dla tiamuliny, wymaga dalszej optymalizacji dla tej konkretnej matrycy i oznaczanych antybiotyków. W obecnej formie nie zapewnia dostatecznej ekstrakcji antybiotyków w jajach, co wyklucza jej zastosowanie w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu do oznaczania pozostałości tych substancji. Konieczne byłoby dopracowanie warunków ekstrakcji oraz sposobu oczyszczania próbki, aby metoda mogła zapewnić odpowiednią skuteczność ekstrakcji oznaczanych antybiotyków.

Próbki ślepe przygotowane dla matrycy jaj potwierdziły brak zanieczyszczenia tła dla metody ekstrakcji acetonitrylem z dodatkiem buforu i Na_2EDTA oraz oczyszczania

na kolumnienkach Oasis HLB. Wyniki te wskazują, że zastosowana procedura skutecznie minimalizuje wpływ matrycy, co jest kluczowym aspektem w analizach LC-MS/MS.

Podsumowując, celem tych badań było opracowanie metody ekstrakcji, która zapewni powtarzalne i wysokie odzyski dla antybiotyków oznaczanych w jajach. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń jako optymalne podejście wybrano metodę ekstrakcji acetonitrylem z dodatkiem buforu i Na₂EDTA oraz oczyszczaniem otrzymanego ekstraktu na kolumnienkach Oasis HLB. Procedura ta zapewniła wysokie i powtarzalne odzyski dla fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, tiamuliny, tetracyklin i linkomycyny, co potwierdzają wyniki uzyskane w Doświadczeniu 2. Zastosowanie tej procedury pozwoliło uzyskać powtarzalne i wysokie odzyski dla wszystkich wymienionych grup antybiotyków.

5.4.4. Ocena skuteczności metody – krzywe wzorcowe i chromatogramy

W celu oceny skuteczności opracowanej procedury oznaczania antybiotyków w jajach przygotowano próbki jaj, do których dodano wzorzec wewnętrzny oraz odpowiednie ilości wzorców antybiotyków, tak aby uzyskać stężenia odpowiadające trzem poziomom: 0,5 MRL, 1 MRL oraz 1,5 MRL, przygotowano także próbkę ślepą. Mieszaninę wzorcową przygotowano zgodnie z **Tabela 20**, a ilości wzorców dodano do próbek jaj zgodnie z **Tabela 21**. Następnie przeprowadzono opracowaną metodę ekstrakcji. Przygotowane próbki poddano analizie LC-MS/MS w zoptymalizowanych warunkach.

Na wykresach (**Wykres 5**) przedstawiono krzywe wzorcowe dla każdego oznaczanego w procedurze antybiotyku, utworzone w programie MassLynx (Waters) na podstawie analizy próbek fortyfikowanych. W oznaczeniach zastosowano metodę ze wzorcem wewnętrznym. Liniowość uzyskanych krzywych wzorcowych oceniono na podstawie współczynnika korelacji $r \geq 0,98$, wartość ta została przyjęta jako kryterium oceny. Dla wszystkich oznaczanych związków uzyskano satysfakcjonujące wyniki, co potwierdza prawidłowe warunki analizy LC-MS/MS, a także prawidłową liniowość w wymaganym zakresie stężeń.

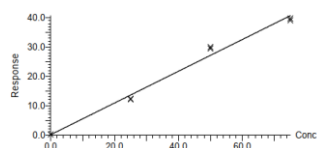
Tabela 25 przedstawia chromatogramy dla oznaczanych antybiotyków. Potwierdzają one dobre rozdzielenie związków oraz intensywność sygnału.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

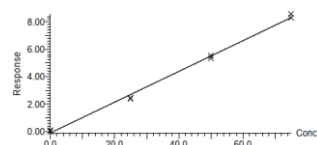
Wykres 5. Wykresy krzywych wzorcowych dla oznaczanych antybiotyków w jajach

Antybiotyki oznaczane w jajach

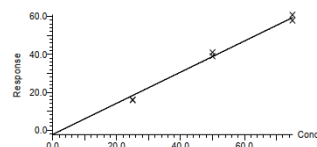
Compound name: Marbofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.995304$, $r^2 = 0.990630$
Calibration curve: $0.542303 \cdot x + 0.0609907$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



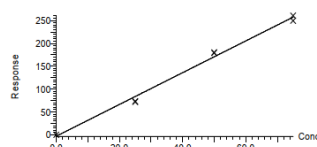
Compound name: Danofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998401$, $r^2 = 0.996804$
Calibration curve: $0.112138 \cdot x + -0.109328$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



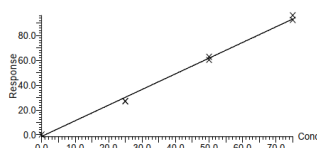
Compound name: Diftloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.995995$, $r^2 = 0.992007$
Calibration curve: $0.822404 \cdot x + -2.28449$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



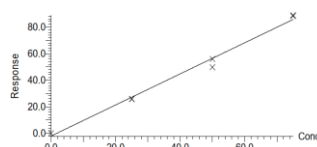
Compound name: Flumechina
Correlation coefficient: $r = 0.997186$, $r^2 = 0.994380$
Calibration curve: $3.47182 \cdot x + -2.93508$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



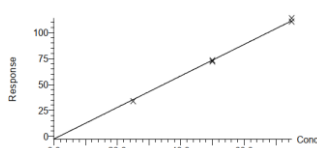
Compound name: Sulfametoksypyridazyna
Correlation coefficient: $r = 0.998427$, $r^2 = 0.996857$
Calibration curve: $1.26368 \cdot x + -1.3674$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



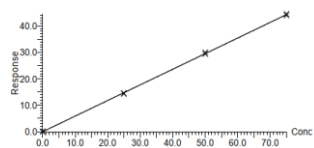
Compound name: Sulfamonometoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.995682$, $r^2 = 0.991383$
Calibration curve: $1.16977 \cdot x + -2.09044$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



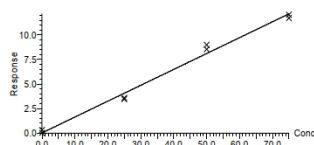
Compound name: Sulfadimetoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.999064$, $r^2 = 0.998129$
Calibration curve: $1.52037 \cdot x + -2.52303$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



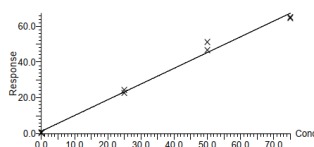
Compound name: Norfloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.999904$, $r^2 = 0.999809$
Calibration curve: $0.592027 \cdot x + -0.0517352$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



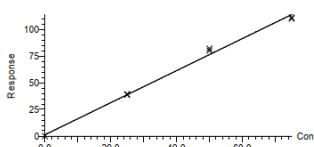
Compound name: Enrofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.993363$, $r^2 = 0.990748$
Calibration curve: $0.161819 \cdot x + 0.00841822$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



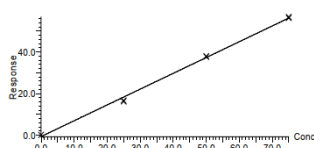
Compound name: Kwas oksohinowy
Correlation coefficient: $r = 0.995446$, $r^2 = 0.990914$
Calibration curve: $0.880234 \cdot x + 1.27311$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



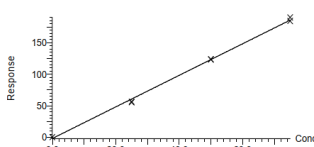
Compound name: Sulfaguanidyna
Correlation coefficient: $r = 0.997868$, $r^2 = 0.995740$
Calibration curve: $1.50629 \cdot x + 1.17527$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



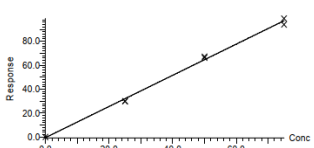
Compound name: Sulfametazyna
Correlation coefficient: $r = 0.998904$, $r^2 = 0.997810$
Calibration curve: $0.757968 \cdot x + -0.598718$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



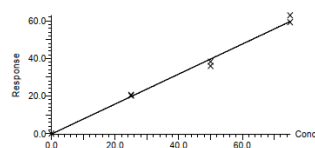
Compound name: Sulfadoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.999141$, $r^2 = 0.998283$
Calibration curve: $2.50761 \cdot x + -2.05236$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



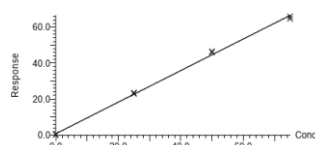
Compound name: Sulfametoksazol
Correlation coefficient: $r = 0.998719$, $r^2 = 0.997439$
Calibration curve: $1.3007 \cdot x + -0.431649$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



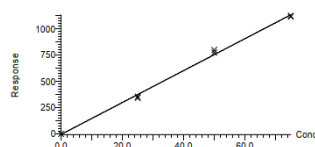
Compound name: Ciprofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.997073$, $r^2 = 0.994155$
Calibration curve: $0.798738 \cdot x + -0.253739$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



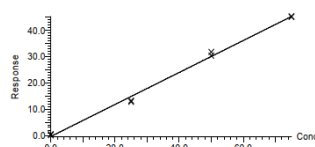
Compound name: Sarafloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998998$, $r^2 = 0.997997$
Calibration curve: $0.878384 \cdot x + 0.684599$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



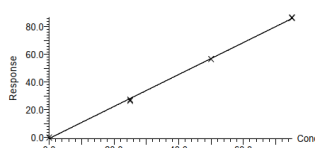
Compound name: Kwas naldyksowy
Correlation coefficient: $r = 0.998754$, $r^2 = 0.997510$
Calibration curve: $15.1725 \cdot x + -4.1832$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



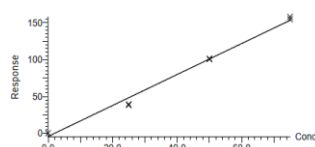
Compound name: Sulfadiazyna
Correlation coefficient: $r = 0.998096$, $r^2 = 0.996195$
Calibration curve: $0.609577 \cdot x + -0.407074$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



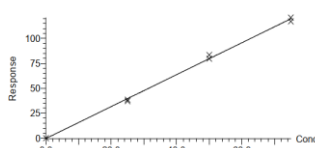
Compound name: Sulfatiazol
Correlation coefficient: $r = 0.999710$, $r^2 = 0.999421$
Calibration curve: $1.15421 \cdot x + -0.623307$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Sulfachinoksalina
Correlation coefficient: $r = 0.996134$, $r^2 = 0.992284$
Calibration curve: $2.09625 \cdot x + -4.07046$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

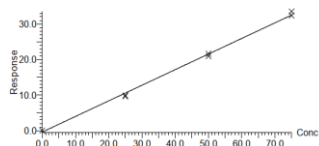


Compound name: Sulfamerazyna
Correlation coefficient: $r = 0.999244$, $r^2 = 0.998489$
Calibration curve: $1.60047 \cdot x + -0.329498$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

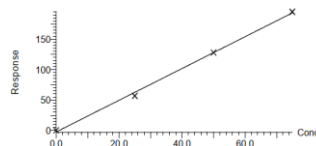


CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

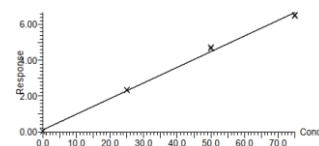
Compound name: Amokscycylina
Correlation coefficient: $r = 0.998918$, $r^2 = 0.997838$
Calibration curve: $0.438967 \cdot x + -0.411025$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



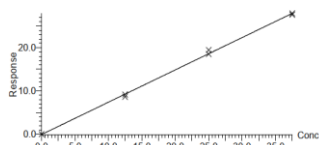
Compound name: Ampicylina
Correlation coefficient: $r = 0.999036$, $r^2 = 0.998073$
Calibration curve: $2.61676 \cdot x + -2.59582$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



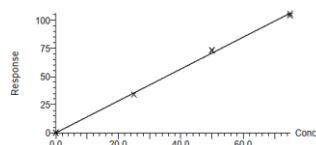
Compound name: Penicylina G
Correlation coefficient: $r = 0.998218$, $r^2 = 0.996438$
Calibration curve: $0.0875984 \cdot x + 0.108346$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



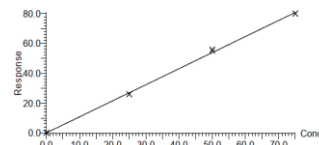
Compound name: Penicylina V
Correlation coefficient: $r = 0.999426$, $r^2 = 0.998853$
Calibration curve: $0.746207 \cdot x + -0.0595067$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



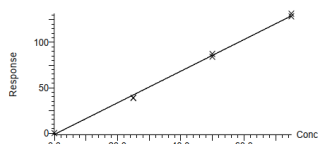
Compound name: Oksacylina
Correlation coefficient: $r = 0.999329$, $r^2 = 0.998659$
Calibration curve: $1.41882 \cdot x + -0.0643084$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



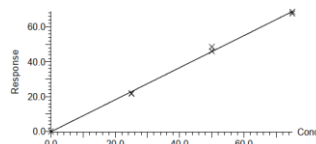
Compound name: Kloksacylina
Correlation coefficient: $r = 0.999462$, $r^2 = 0.998923$
Calibration curve: $1.07935 \cdot x + -0.0348518$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



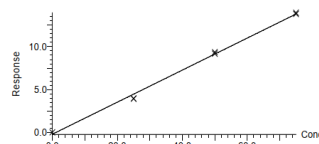
Compound name: Nafcylina
Correlation coefficient: $r = 0.999151$, $r^2 = 0.998302$
Calibration curve: $1.73961 \cdot x + -1.40408$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



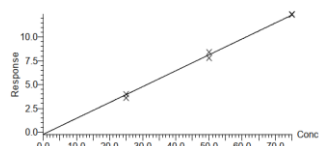
Compound name: Dikloksacylina
Correlation coefficient: $r = 0.999152$, $r^2 = 0.998305$
Calibration curve: $0.918996 \cdot x + -0.13814$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



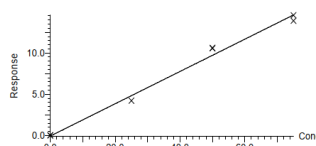
Compound name: Cefapiiryna
Correlation coefficient: $r = 0.998583$, $r^2 = 0.997169$
Calibration curve: $0.186433 \cdot x + -0.189619$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



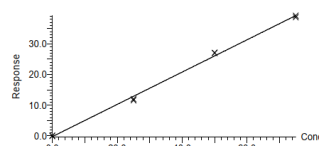
Compound name: Cefiofur
Correlation coefficient: $r = 0.998569$, $r^2 = 0.997141$
Calibration curve: $0.167099 \cdot x + -0.224226$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



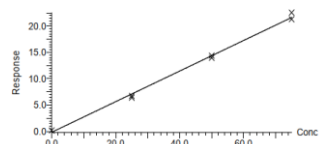
Compound name: Cefkwinom
Correlation coefficient: $r = 0.995149$, $r^2 = 0.990321$
Calibration curve: $0.195682 \cdot x + -0.0623431$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



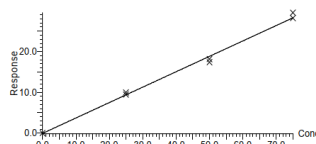
Compound name: Cefalonium
Correlation coefficient: $r = 0.998791$, $r^2 = 0.997584$
Calibration curve: $0.526062 \cdot x + -0.238906$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



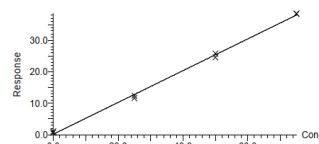
Compound name: Cefazolina
Correlation coefficient: $r = 0.998455$, $r^2 = 0.996913$
Calibration curve: $0.290237 \cdot x + -0.147832$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



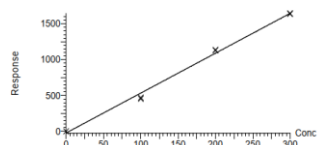
Compound name: Cefaleksyna
Correlation coefficient: $r = 0.997904$, $r^2 = 0.995812$
Calibration curve: $0.377758 \cdot x + -0.0760252$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



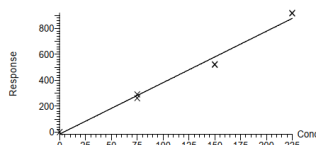
Compound name: Cefoperazon
Correlation coefficient: $r = 0.999030$, $r^2 = 0.998061$
Calibration curve: $0.505677 \cdot x + 0.150657$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



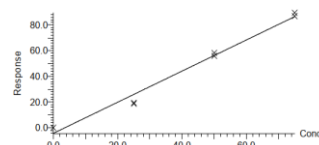
Compound name: Tylozyna
Correlation coefficient: $r = 0.997889$, $r^2 = 0.995782$
Calibration curve: $5.55792 \cdot x + 22.11$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



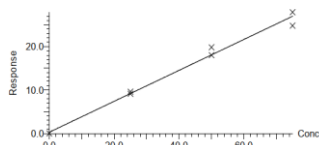
Compound name: Erytromycyna
Correlation coefficient: $r = 0.994777$, $r^2 = 0.989581$
Calibration curve: $3.96574 \cdot x + -15.1599$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



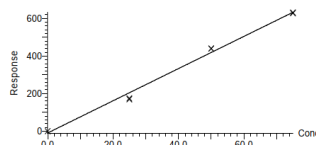
Compound name: Spiramycyna
Correlation coefficient: $r = 0.992140$, $r^2 = 0.984342$
Calibration curve: $1.21022 \cdot x + -4.26102$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



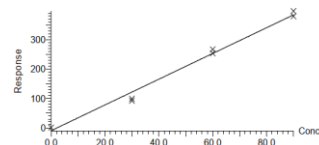
Compound name: Tylimikozyna
Correlation coefficient: $r = 0.995313$, $r^2 = 0.990648$
Calibration curve: $0.356195 \cdot x + 0.271923$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Jozamycyna
Correlation coefficient: $r = 0.987071$, $r^2 = 0.994150$
Calibration curve: $8.5656 \cdot x + -9.57966$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

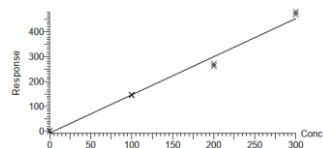


Compound name: Tiamulina
Correlation coefficient: $r = 0.995124$, $r^2 = 0.990273$
Calibration curve: $4.38196 \cdot x + -9.83546$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

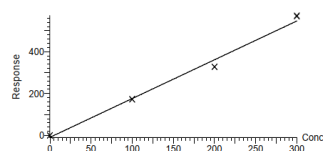


CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

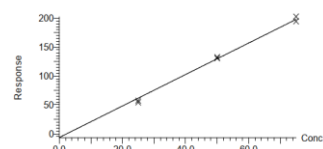
Compound name: Oksytetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.994021$, $r^2 = 0.988077$
Calibration curve: $1.5353 \cdot x + -7.0053$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



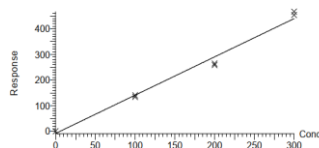
Compound name: 4-epitetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.995512$, $r^2 = 0.991045$
Calibration curve: $1.85095 \cdot x + -8.73458$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



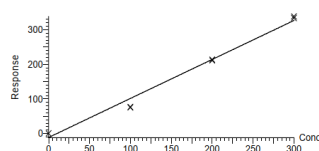
Compound name: Doksyacyklina
Correlation coefficient: $r = 0.997729$, $r^2 = 0.995464$
Calibration curve: $2.7272 \cdot x + -6.55449$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



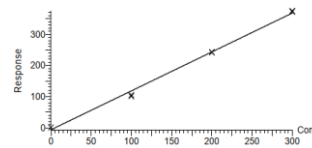
Compound name: 4-epioksytetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.994628$, $r^2 = 0.989284$
Calibration curve: $1.49485 \cdot x + -8.09013$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



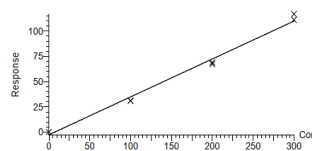
Compound name: Chlorotetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.993836$, $r^2 = 0.987909$
Calibration curve: $1.12624 \cdot x + -11.1851$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Tetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.998169$, $r^2 = 0.996341$
Calibration curve: $1.24961 \cdot x + -6.75842$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: 4-epichlorotetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.995996$, $r^2 = 0.992009$
Calibration curve: $0.374734 \cdot x + -2.59853$
Response type: Internal Std (Ref 27), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Linkomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.998445$, $r^2 = 0.996892$
Calibration curve: $14.1639 \cdot x + -15.3609$
Response type: Internal Std (Ref 25), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

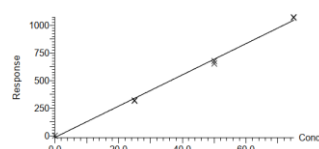
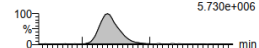


Tabela 25. Chromatogramy oznaczanych antybiotyków – matryca jaja

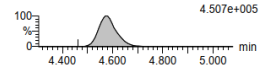
Antybiotyki oznaczane w jajach

Marbifloksacylina

jaja F6.MRM of 8 channels, ES+
363.1>345.2
5.730e+006

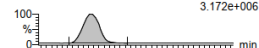


jaja F6.MRM of 8 channels, ES+
363.1>320.1
4.507e+005

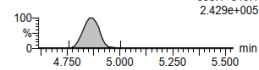


Danofloksacylina

jaja F3.MRM of 10 channels, ES+
358.1>255
3.172e+006



jaja F3.MRM of 10 channels, ES+
358.1>340.1
2.429e+005

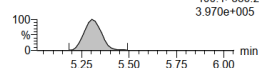


Difloksacylina

jaja F15.MRM of 6 channels, ES+
400.1>382.1
5.065e+005



jaja F6.MRM of 6 channels, ES+
400.1>356.2
3.970e+005

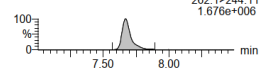


Flumechina

jaja F11.MRM of 6 channels, ES+
262.1>202
3.777e+006



jaja F11.MRM of 6 channels, ES+
262.1>244.1
1.676e+006

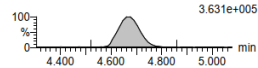


Norfloksacylina

jaja F6.MRM of 8 channels, ES+
320.1>233
1.538e+006

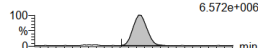


jaja F6.MRM of 8 channels, ES+
320.1>302.1
3.631e+005

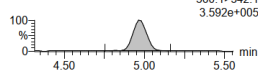


Enrofloksacylina

jaja F14.MRM of 16 channels, ES+
360.1>286
6.572e+006



jaja F5.MRM of 16 channels, ES+
360.1>342.1
3.592e+005

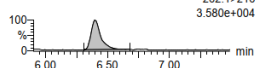


Kwas oksolinowy

jaja F2.MRM of 4 channels, ES+
262.1>244.1
3.118e+005



jaja F2.MRM of 4 channels, ES+
262.1>216
3.580e+004

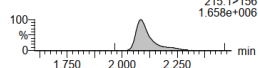


Sulfaguanidyna

jaja F10.MRM of 2 channels, ES+
215.1>108
3.442e+006

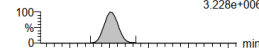


jaja F10.MRM of 2 channels, ES+
215.1>156
1.658e+006

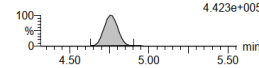


Ciprofloksacylina

jaja F14.MRM of 16 channels, ES+
332.1>231
3.228e+006



jaja F5.MRM of 16 channels, ES+
332.1>314.1
4.423e+005

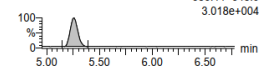


Sarafloksacylina

jaja F5.MRM of 10 channels, ES+
386.1>368.1
2.826e+005

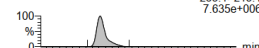


jaja F5.MRM of 10 channels, ES+
386.1>348.0
3.018e+004

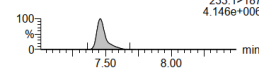


Kwas nalidyksowy

jaja F11.MRM of 6 channels, ES+
233.1>215.1
7.635e+006

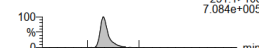


jaja F11.MRM of 6 channels, ES+
233.1>187
4.146e+006

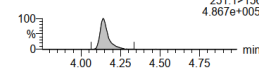


Sulfadiazyna

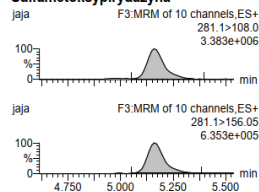
jaja F12.MRM of 4 channels, ES+
251.1>108
7.084e+005



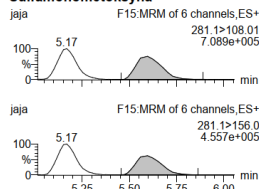
jaja F12.MRM of 4 channels, ES+
251.1>156
4.867e+005



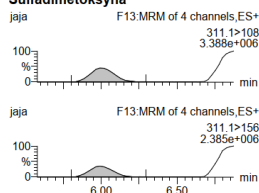
Sulfametoksypiridazyna



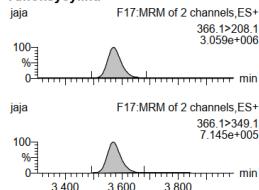
Sulfamonometoksyna



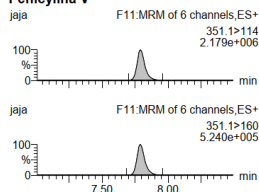
Sulfadimetoksyna



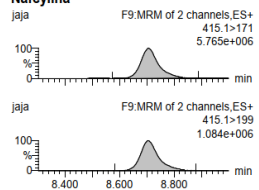
Amoksyacylina



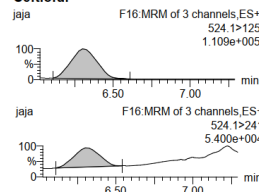
Penicylina V



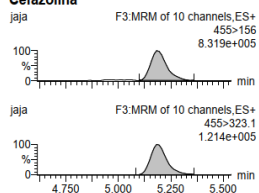
Nafcylina



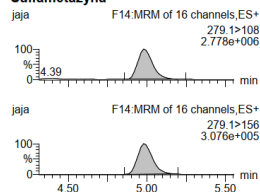
Ceftiofur



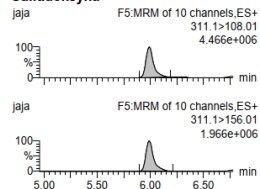
Cefazolina



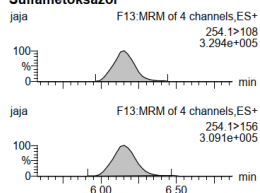
Sulfametazyna



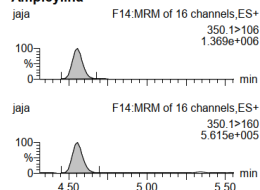
Sulfadoksyna



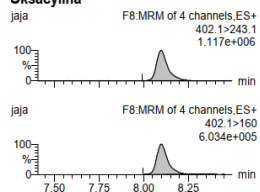
Sulfametoksazol



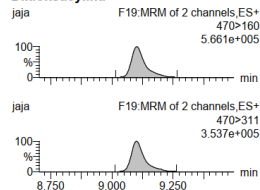
Ampicylina



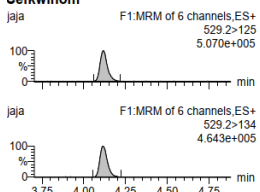
Oksacylina



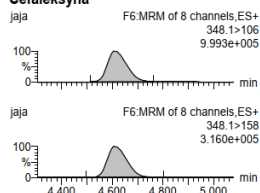
Dikloksacylina



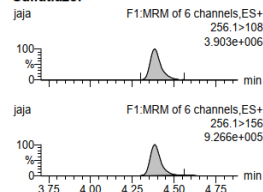
Cefkwinom



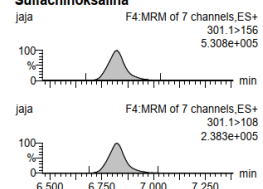
Cefaleksyna



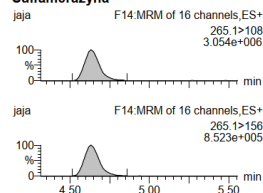
Sulfatiazol



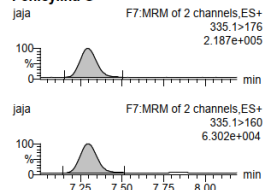
Sulfachinoksalina



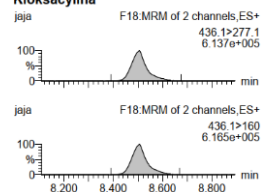
Sulfamerazyna



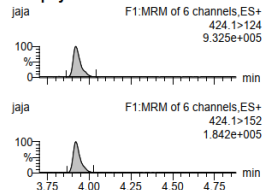
Penicylina G



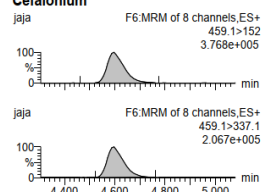
Kloksacylina



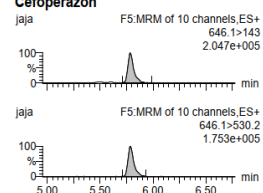
Cefapiryna

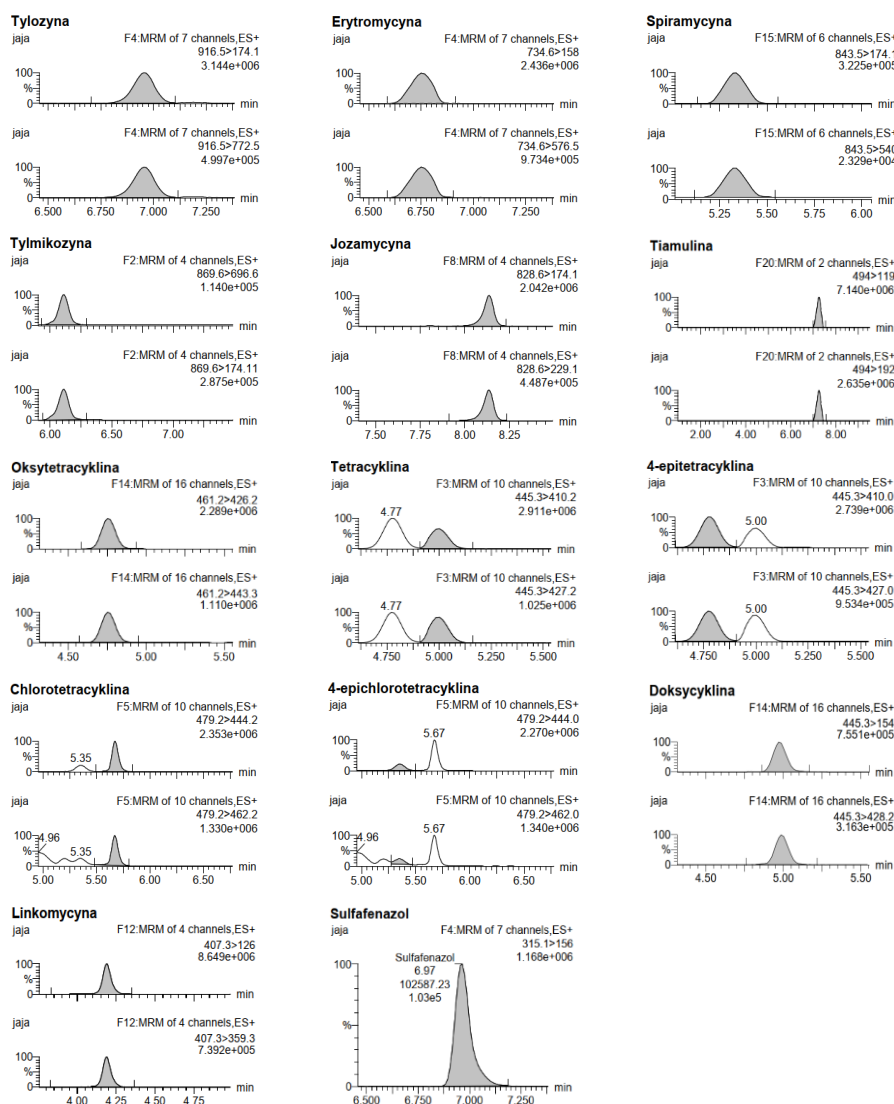


Cefalonium



Cefoperazon





Wszystkie oznaczane w tej procedurze antybiotyki, za wyjątkiem oksytetracykliny i 4-epioksy-tetracykliny, udało się skutecznie rozdzielić. Podobnie jak w poprzedniej procedurze, zoptymalizowana metoda nie pozwala na ich rozdzielenie. Wymagany MRL zgodnie z „Rozporządzenie Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji pod względem maksymalnych limitów pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego”[6], wynosi dla ich sumy 200 µg/kg dla jaj. Dlatego do próbek fortyfikowanych dodawano jedynie oksytetracyklinę na poziomach odpowiadającym MRL.

Podczas optymalizacji procedury przeprowadzono również odrębne doświadczenia dla 4-epioksy-tetracykliny w celu oceny skuteczności jej ekstrakcji. Wyniki potwierdziły, że opracowana procedura jest dla niej odpowiednia.

5.5. Procedura badawcza oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w miodach metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas

Celem tej procedury jest opracowanie metody oznaczania pozostałości różnych grup antybiotyków i chemioterapeutyków w miodzie, który jest naturalnym produktem bogatym w cukry proste, enzymy, minerały i przeciwutleniacze.

Miód jest bardzo ważnym produktem spożywczym oraz leczniczym, jednak jego bezpieczeństwo może być zagrożone przez pozostałości antybiotyków i chemioterapeutyków stosowanych w pszczelarstwie. Leki te są wykorzystywane do leczenia chorób bakteryjnych pszczół, takich jak zgnilec amerykański i europejski oraz nosemoza [197]. Antybiotyki pomagają chronić pszczoły przed tymi chorobami, jednak ich niewłaściwe stosowanie może prowadzić do kumulacji substancji przeciwbakteryjnych w miodzie, co stwarza zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Ponieważ dla miodu nie zostały określone wartości MRL (maksymalnych limitów pozostałości) w Rozporządzeniu (UE) nr 37/2010, obecność antybiotyków w tym produkcie jest niedozwolona. Oznacza to, że każda wykryta ilość tych substancji powyżej granicy wyznaczonej w walidacji skutkuje wynikiem dodatnim dla badanego miodu. Dla oznaczanych antybiotyków w miodach przyjęto wartości MMPR (Minimalne Wymagania dla Metod Analitycznych), wyznaczone przez EURL (Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej), które określają minimalne stężenia, które powinny być oznaczone w przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych [198], przy czym MMPR nie jest limitem prawnym tak jak przytaczany w poprzednich procedurach MRL. Zalecane wartości MMPR dla antybiotyków w miodzie wynoszą:

- Tetracykliny – 10 µg/kg
- Sulfonamidy – 10 µg/kg
- Streptomycyna – 20 µg/kg
- Makrolidy:
 - Erytromycyna – 20 µg/kg
 - Tylozyna – 10 µg/kg

Opracowana procedura oznaczania substancji przeciwbakteryjnych opierała się na zastosowaniu dwóch metod ekstrakcji. Dla związków takich jak makrolidy, fluorochinolony, tetracykliny, aminoglikozydy i linkozamidy najbardziej efektywną

metodą jest ekstrakcja na kolumnkach SPE Strata-X z dodatkiem par jonowych (HFBA). Z kolei dla sulfonamidów oraz trimetoprimu (grupa diaminopirymidyny) optymalnym rozwiązaniem jest ekstrakcja na kolumnkach Oasis HLB z zastosowaniem kwasu octowego. Zastosowanie dwóch metod ekstrakcji pozwala na optymalne dopasowanie procesu do właściwości chemicznych oznaczanych związków.

I. Przygotowanie roztworów roboczych do wzbogacenia próbek

Roztwór roboczy standardu wewnętrznego (IS) sulfafenazolu ($2\text{ }\mu\text{g/ml}$) w wodzie przygotowywano na bieżąco. W tym celu pobrano $20\text{ }\mu\text{l}$ roztworu podstawowego sulfafenazolu o stężeniu $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ do kolbki miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski.

Przygotowanie roztworów roboczych odbywało się na bieżąco. Ponieważ dla miodu nie określono wartości MRL, dla wszystkich oznaczanych związków dążono do osiągnięcia niskich wartości stężeń, poniżej $10\text{ }\mu\text{g/kg}$. Do kolbki miarowej o pojemności 10 ml dodawano po $100\text{ }\mu\text{l}$ roztworów podstawowych o stężeniu $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$, a następnie uzupełniano wodą dejonizowaną do kreski. Z przygotowanej mieszaniny wzorców o stężeniu $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ pobrano 1 ml do kolbki miarowej o pojemności 10 ml i również uzupełniano wodą (**Tabela 26 i Tabela 27**).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 26. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – miody ekstrakcja na kolumnienkach Strata X

Miody – ekstrakcja kolumnienki Strata-X			
	Związek	Przyjęta wartość stężenia $\mu\text{g/kg}$	Przygotowanie roztworu
1	Tylozyna	10	$100 \mu\text{l} \times 1000 \mu\text{g/ml}$ do 10 ml  $1 \text{ ml} \times 10 \mu\text{g/ml}$ do 10 ml
2	Erytromycyna	10	
3	Ciprofloksacyna	10	
4	Marbofloksacyna	10	
5	Norfloksacyna	10	
6	Danofloksacyna	10	
7	Enrofloksacyna	10	
8	Sarafloksacyna	10	
9	Difloksacyna	10	
10	Kwas oksolinowy	10	
11	Kwas nalidyksowy	10	
12	Flumechina	10	
13	Doksycyklina	10	
14	Oksytetracyklina (suma oksytetracyklina i 4-epioksytetracyklina)	10	
15	Tetracyklina	10	
16	4-epitetracyklina	10	
17	Chlorotetracyklina	10	
18	4-epichlorotetracyklina	10	
19	Linkomycyna	10	
20	Streptomycyna	10	

Tabela 27. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – miody ekstrakcja na kolumnienkach Oasis HLB

Miody – ekstrakcja kolumnienki Oasis HLB			
	Związek	Przyjęta wartość stężenia µg/kg	Przygotowanie roztworu
1	Trimetoprim	10	100 µl x 1000 µg/ml do 10ml ↓ 1 ml x 10 µg/ml do 10 ml
2	Sulfatiazol	10	
3	Sulfamerazyna	10	
4	Sulfametazyna	10	
5	Sulfametoksazol	10	
6	Sulfamonometoksyna	10	
7	Sulfadimetoksyna	10	
8	Sulfaguanidyna	10	
9	Sulfadiazyna	10	
10	Sulfametoksypyridazyna	10	
11	Sulfadoksyna	10	
12	Sulfachinoksalina	10	
13	Sulfacetamid	10	
14	Sulfachloropirydazyna	10	
15	Sulfapirydyna	10	
16	Sulfisoksazol	10	
17	Sulfachloropirazylna	10	
18	Sulfametizol	10	

II. Przygotowanie i przechowywanie próbek do badań

Próbki miodu, pobrane do badań przez Inspekcję Weterynaryjną (z województw wielkopolskiego, zachodniopomorskiego, lubuskiego, kujawsko-pomorskiego oraz miody z inspektoratów granicznych – importowane), po zarejestrowaniu i nadaniu numeru badania były dzielone na dwie części. Jedna część (B), oznakowana numerem badania i kierunkiem badania, była przechowywana w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, aby zapobiec jej zniszczeniu lub zepsuciu. Próbkę tą była zachowywana do analiz potwierdzających. Druga część (A) oznakowana numerem badania i kierunkiem badania była przechowywana w innym miejscu, również w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, do momentu przeprowadzenia analizy.

III. Próbkę matrycowe wolne od leków przeciwbakteryjnych

Próbki miodów, w których wcześniej nie stwierdzono obecności antybiotyków, zostały zachowane do późniejszego wykorzystania przy tworzeniu zarówno próbek ślepych, jak i wzbogaconych. Probki te posłużyły jako materiał odniesienia, umożliwiając monitorowanie ważności wyników oraz zapewnienie, że nie doszło do zanieczyszczeń podczas procesu analizy.

5.5.1. Oczyszczanie próbek i przygotowanie do analizy LC-MS/MS

I. Ekstrakcja na kolumnkach Strata-X – oznaczanie makrolidów, fluorochinolonów, tetracyklin, linkozamidów i aminoglikozydów w miodzie

Do każdej serii próbek miodów dodano próbkę odczynnikową, ślepą matrycową oraz cztery próbki fortyfikowane, postępując z nimi w taki sam sposób, jak z próbkami badanymi. Próbkę odczynnikową przygotowano, odważając ($2,00 \pm 0,01$) g wody do polipropylenowej probówki wirówkowej o pojemności 50 ml. Probka ślepa – odważono ($2,00 \pm 0,01$) g materiału wolnego od leków przeciwbakteryjnych, również do polipropylenowej probówki wirówkowej o tej samej pojemności. Probki badane – odważono ($2,00 \pm 0,01$) g próbki do polipropylenowych probówek wirówkowych o tej samej pojemności. Probki fortyfikowane zostały przygotowane poprzez odważenie ($2,00 \pm 0,01$) g czystej próbki wolnej od leków przeciwbakteryjnych (matrycy). Do każdej analizowanej próbki, z wyjątkiem próbki odczynnikowej, dodano 20 μ l wzorca wewnętrznego o stężeniu 2 μ g/ml. Do próbek fortyfikowanych dodano odpowiednią ilość mieszaniny wzorców według wartości, które przedstawia **Tabela 28**. Zawartość każdej probówki została dokładnie wymieszana na mieszadle (typu Vortex), odstawiona na około 30 minut, a następnie przystąpiono do etapu ekstrakcji.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 28. Sposób przygotowania próbek fortyfikowanych - matryca miody

Fortyfikat	Naważka (matryca) [g]	Ilość roztworu wzorcowego [μ l]	Ilość roztworu IS (2 μ g/ml) [μ l]
Próbka odczynnikowa	2,00 (woda)	0	0
Próbka ślepa	2,00	0	20
Próbka fortyfikowana 5 μ g/kg	2,00	10	20
Próbka fortyfikowana 10 μ g/kg	2,00	20	20
Próbka fortyfikowana 15 μ g/kg	2,00	30	20
Próbka fortyfikowana 20 μ g/kg	2,00	40	20
Kontrola odzysku	2,00	20	20

Do każdej próbki dodano 18 ml 0,1 M octanu sodu (pH 6) oraz 2 ml 0,2 M HFBA. Zawartość wymieszano na mieszadle typu Vortex, a następnie próbki umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 30 minut, po czym wytrząsano na wytrząsarce przez następne 10 minut. Próbkę wirowano przez 10 minut przy szybkości 4500 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

Kondycjonowanie kolumnienek SPE Strata-X (100mg/6ml) przeprowadzono poprzez ich kolejno przemycie:

- 5 ml metanolu
- 5 ml wody
- 5 ml 0,02 M roztworu HFBA

Na wykondycjonowane złoża kolumnienek naniesiono uzyskany supernatant. Po przejściu ekstraktu przez złożę, kolumnienki przemyto dwukrotnie po 5 ml wody, następnie suszono pod próżnią przez 10 minut. Anality eluowano dwukrotnie po 3 ml mieszaniną MeCN:0,025% HFBA (9+1; V_1+V_2). Otrzymany eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu w bloku grzejmym w temperaturze $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Suchą pozostałość rozpuszczono w 500 μ l roztworu 0,025% HFBA i wymieszano na mieszadle. Otrzymane ekstrakty przeniesiono do probówek z dnem stożkowym (typu eppendorf) i ponownie wirowano przez 10 minut przy szybkości 2000 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}$. Odwirowane ekstrakty przeniesiono do fiolek i przeznaczano do analizy chromatograficznej LC-MS/MS.

II. Ekstrakcja na kolumnienkach Oasis HLB – oznaczanie diaminopirymidyn i sulfonamidów w miodzie

Do każdej serii próbek miodów dodano próbkę odczynnikową, ślepą matrycową oraz cztery próbki fortyfikowane, postępując z nimi w taki sam sposób, jak z próbkami badanymi. Próbkę odczynnikową przygotowano, odważając ($2,00 \pm 0,01$) g wody do polipropylenowej probówki wirówkowej o pojemności 50 ml. Próbką ślepą – odważono ($2,00 \pm 0,01$) g materiału wolnego od leków przeciwbakteryjnych do polipropylenowej probówki wirówkowej o pojemności 50 ml. Dla próbek badanych odważono ($2,00 \pm 0,01$) g próbki do polipropylenowych probówek wirówkowych o tej samej pojemności. Próbki fortyfikowane zostały przygotowane poprzez odważenie ($2,00 \pm 0,01$) g czystej próbki wolnej od leków przeciwbakteryjnych (matrycy). Do każdej analizowanej próbki, z wyjątkiem próbki odczynnikowej, dodano 20 μ l wzorca wewnętrznego o stężeniu 2 μ g/ml. Do próbek fortyfikowanych dodano odpowiednią ilość mieszaniny wzorców według wartości, które przedstawia **Tabela 28**. Zawartość każdej probówki została dokładnie wymieszana na mieszadle (typu Vortex), odstawiona na około 30 minut, a następnie przystąpiono do etapu ekstrakcji.

Do każdej próbki dodano 15 ml 2% kwasu octowego. Zawartość wymieszano na mieszadle, a następnie umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na około 30 minut, następnie wytrząsano na wytrząsarce przez kolejne 10 minut. W kolejnym kroku próbki wirowano przez 10 minut przy szybkości 4500 obr./min w temperaturze $\leq 10^{\circ}\text{C}$.

Kondycjonowanie kolumnienek SPE Oasis HLB (200mg/6ml), przeprowadzono poprzez ich przemycie kolejno:

- 5 ml acetonitrylu
- 5 ml wody

Na wykondycjonowane złoża kolumnienek naniesiono uzyskane supernatanty. Po przejściu ekstraktu przez złożę, kolumnienki przemyto 5 ml wody i suszono pod próżnią przez 10 minut. Anality eluowano dwukrotnie po 2,5 ml acetonitrylu. Otrzymany eluat odparowano do sucha pod azotem w bloku grzejmym w temperaturze $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Suchą pozostałość rozpuszczono w 0,5 ml roztworu 0,025% HFBA, wymieszano na mieszadle, a następnie przeniesiono do fiolek i przeznaczano do analizy chromatograficznej LC-MS/MS.

5.5.2. Warunki analizy LC-MS/MS oraz ich optymalizacja

Analizy przeprowadzono za pomocą ultrawysokosprawnego chromatografu cieczowego Acquity UPLC I-Class sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Xevo TQ-XS, firmy Waters (Stany Zjednoczone).

Detektor mas pracował z wykorzystaniem źródła jonizacji typu elektrospray w trybie dodatniej jonizacji (ESI+), a dane rejestrowano w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM). Parametry systemu zostały zoptymalizowane w celu uzyskania maksymalnej efektywności jonizacji oznaczanych antybiotyków. Wartości m/z dla jonów macierzystych oraz jonów potomnych zostały określone na podstawie dostępnej literatury naukowej.

W celu optymalizacji parametrów przygotowano pojedyncze roztwory wszystkich antybiotyków o stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ w metanolu o czystości LC/MS, które następnie bezpośrednio wstrzykiwano do źródła jonizacji. Optymalizacja warunków dla każdego antybiotyku była przeprowadzana indywidualnie. W pierwszej kolejności określono optymalne parametry dla jonu macierzystego, aby uzyskać maksymalną intensywność sygnału, a następnie, przy włączonym gazie kolizyjnym, dostosowano warunki dla jonów potomnych.

Podczas optymalizacji sprawdzano różne wartości napięcia na kapilarze, temperaturę źródła i gazu desolvacyjnego oraz przepływy gazów. Ostatecznie dobrano wspólne parametry, które zapewniały najlepszą jonizację dla wszystkich oznaczanych w metodzie antybiotyków.

Dla obu metod ekstrakcji, obejmujących wszystkie oznaczane w tej procedurze związki, zastosowano jednolite parametry pracy detektora. Napięcie na kapilarze ustawiono na 1,0 kV, temperatura źródła wynosiła 150°C, a gaz desolvacyjny (azot) był podgrzewany do 550°C. Przepływ gazu w stożku ustalono na 150 l/h, natomiast gazu desolvacyjnego na 1100 l/h. Przepływ gazu zderzeniowego (argon) wynosił 0,15 ml/min.

Parametry, takie jak napięcie na stożku (cone) oraz energia kolizyjna, zostały indywidualnie dostosowane dla każdego antybiotyku. W procesie optymalizacji, podobnie jak w poprzednich procedurach, wybrano po dwa jony fragmentacyjne

dla każdego związku – jon ilościowy, wykorzystywany do oznaczeń ilościowych, oraz jon potwierdzający, służący do potwierdzenia obecności analitu.

Metoda MRM dla antybiotyków poddanych ekstrakcji na kolumnkach Strata-X (fluorochinolony, makrolidy, linkozamidy, tetracykliny, aminoglikozydy) została podzielona na dwadzieścia dwa przedziały czasowe, przy czym dla każdego związku przypisano jeden kanał MRM, co zapewniało najlepszą selektywność oznaczeń. Opóźnienie między skanami oraz między kanałami wynosiło 0,003 sekundy. Dla antybiotyków ekstrahowanych na kolumnkach Oasis HLB (sulfonamidy, diaminopirymidyny) zastosowano dziewiętnaście przedziałów czasowych, również z opóźnieniem 0,003 sekundy między skanami i kanałami. Wszystkie dane, w tym czasy retencji (RT), jony macierzyste oraz jony potomne, zostały przedstawione w tabelach (**Tabela 29, Tabela 30**).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 29. Parametry dla związków po ekstrakcji SPE – Strata-X

RT – czas retencji, CV – napięcie na stożku, CE – energia kolizyjna, MRM – przedziały czasowe:
 1-2, 4-12, 14-19, 22 = (1,00 – 8,00 min); 3 = (3,00 – 8,00 min); 13 = (4,00 – 8,00 min); 20 = (2,00 – 3,60 min); 21 = (4,00 – 8,00 min)

Związek	RT (min)	Jon macierzysty (m/z)	Jony potomne (m/z)	CV (V)	CE (eV)	MRM
Marbofloksacyna	2,90	363,1	320,1/345,2	30	15/22	9
Norfloksacyna	2,89	320,1	233,0/302,1	30	25/18	5
Ciprofloksacyna	3,00	332,1	231,0/314,1	32	33/19	6
Danofloksacyna	3,11	358,1	255,0/340,1	35	37/24	7
Enrofloksacyna	3,31	360,0	286,0/342,1	35	33/21	8
Sarafloksacyna	3,73	386,1	348,0/368,1	33	33/23	10
Difloksacyna	3,82	400,1	356,2/382,1	35	19/23	11
Kwas oksolinowy	3,72	262,1	216,0/244,1	31	27/21	3
Kwas nalidyksowy	4,99	233,1	187,0/215,1	20	22/21	1
Flumechina	5,26	262,1	202,0/244,11	30	30/20	2
Tylozyna	5,48	916,5	174,1/772,5	40	39/27	22
Erytromycyna	5,29	734,6	158,0/576,5	30	25/19	21
Linkomycyna	2,55	407,3	126,0/359,3	33	25/18	12
Oksytetracyklina	3,04	461,2	426,2/443,3	26	19/12	16
4-epioksytetracyklina	3,04	461,2	426,2/443,3	26	19/12	17
Tetracyklina	3,37	445,3	410,2/427,2	25	20/15	14
4-epitetracyklina	3,18	445,3	410,2/427,2	25	20/15	15
Chlorotetracyklina	4,20	479,2	444,2/462,2	24	24/20	18
4-epichlorotetracyklina	3,88	479,2	444,2/462,2	24	24/20	19
Doksycyklina	4,41	445,3	154,0/428,2	25	29/21	13
Streptomycyna	2,56	582,3	246,1/263,1	43	35/33	20
Sulfafenazol IS	4,37	315,1	156,0	39	21	4

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 30. Parametry dla związków po ekstrakcji SPE - Oasis HLB

RT – czas retencji, CV – napięcie na stożku, CE – energia kolizyjna, MRM – przedziały czasowe:

1 = (0,50 – 1,5 min); 2 = (1,30 – 2,00 min); 3-4 = (1,00 – 4,00 min); 5 = (3,20 – 4,50 min); 6-7 = (1,00 – 3,00 min); 8 = (2,00 – 5,00 min); 9-10 = (1,00 – 4,00 min); 11 = (1,00 – 2,70); 12 = (2,60 – 4,00 min); 13-14 = (2,00 – 6,00 min); 15 = (2,00 – 5,00 min); 16 = (3,00 – 6,00 min); 17-18 = (2,00 – 6,00 min); 19 = (1,00 – 7,00 min)

Związek	RT (min)	Jon macierzysty (m/z)	Jony potomne (m/z)	CV (V)	CE (eV)	MRM
Sulfatiazol	1,83	256,1	108,0/156,0	29	23/14	6
Sulfamerazyna	2,10	265,1	108,0/156,0	31	25/19	7
Sulfametazyna	2,43	279,1	108,0/156,0	30	26/20	10
Sulfametoksazol	3,41	254,1	108,0/156,0	31	24/18	5
Sulfamonometoksyna	2,86	281,1	108,0/156,0	30	24/17	12
Sulfadimetoksyna	4,21	311,1	108,0/156,0	30	25/20	17
Sulfaguanidyna	1,08	215,1	108,0/156,0	23	20/15	1
Sulfadiazyna	1,74	251,1	108,0/156,0	26	23/16	4
Sulfametoksypirydazyna	2,49	281,1	108,0/156,0	29	25/18	11
Sulfadoksyna	3,32	311,1	108,0/156,0	29	24/19	18
Sulfachinoksalina	4,25	301,1	108,0/156,0	29	22/18	16
Sulfacetamid	1,61	215,2	92,0/156,0	19	26/11	2
Sulfachloropirydazyna	3,10	285,4	92,0/156,0	29	27/14	13
Sulfapirydyna	1,97	250,2	92,0/156,0	24	28/17	3
Sulfisoksazol	3,66	268,2	108,0/156,0	22	26/14	8
Sulfachloropirazyna	4,14	285,4	108,0/156,0	27	27/14	14
Sulfametizol	2,44	271,0	156,0/92,0	30	12/26	9
Trimetoprim	3,07	292,0	231,0/262,0	35	23/25	15
Sulfafenazol IS	4,39	315,1	156,0	39	21	19

System UPLC I-Class składał się z autosamplera wyposażonego w tacki łącznie na 96 fiolek, degazera, pompy binarnej, wstrzykiwacza oraz termostatu do kolumn chromatograficznych. Do rozdzielania oznaczanych antybiotyków wykorzystano kolumnę chromatograficzną Acquity UPLC HSS C18 (2,1 x 100 mm; 1,8 µm) firmy Waters, z filtrem (0,2 µm; 2,1 mm) firmy Waters.

W celu optymalizacji warunków rozdzielania antybiotyków dla obu metod przygotowania próbek, obejmującej dobór faz ruchomych oraz gradientu, przygotowano mieszaninę wzorcową wszystkich oznaczanych antybiotyków w stężeniu 0,1 µg/ml w 0,025% HFBA. Pozwoliło to na określenie optymalnych warunków rozdzielania oznaczanych związków. W przypadkach, gdy pojawiały się dwa piki odpowiadające temu samemu analitowi, przeprowadzano dodatkową analizę pojedynczego wzorca. Dotyczyło to szczególnie sulfonamidów, fluorochinolonów i tetracyklin.

Podczas optymalizacji metody LC dla oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w miodzie zastosowano fazę ruchomą opracowaną dla matrycy mięśni, która składała się z 0,025% HFBA w wodzie (faza A) oraz acetonitrylu (faza B). Wybór ten był konieczny ze względu na oznaczanie streptomycyn. Nie testowano innych składów faz ruchomych, natomiast przeprowadzono optymalizację gradientu elucji. Uzyskane wyniki potwierdziły odpowiednie rozdzielenie pików oraz właściwą intensywność sygnału, co umożliwiło zastosowanie tej metody do oznaczania antybiotyków w miodzie.

Dzięki zastosowaniu tych samych faz ruchomych do analizy próbek przygotowanych dwoma różnymi procedurami ekstrakcji antybiotyków w miodzie, możliwe było jednoczesne przeprowadzanie analizy z użyciem tego samego aparatu. Takie podejście skróciło całkowity czas analizy, zamiast dwóch oddzielnych dni wszystkie oznaczenia mogły zostać wykonane w jednym dniu, co przyspieszyło proces badawczy.

Szczegółowe warunki chromatograficzne przedstawiały się następująco: fazą ruchomą A był 0,025% HFBA w wodzie, a fazą B acetonitryl. Temperatura kolumny w trakcie analizy wynosiła 35°C, a przepływ 0,3 ml/min. Początkowy gradient wynosił 85% dla fazy A i zmieniał się do 6,5 minuty do 50%, do 8 minuty osiągał 0% dla fazy A i ponownie wzrastał do 9 minuty do 85%. Stabilizacja kolumny trwała 2 minuty, a łączny czas analizy wynosił 11 minut (**Tabela 31**). Objętość nastrzyku wynosiła 10 µl.

Tabela 31. Gradient faz ruchomych dla oznaczania antybiotyków w miodach

Czas (min)	Przepływ (ml/min)	Faza A 0,025% HFBA w H ₂ O (%)	Faza B MeCN (%)	Krzywa
0	0,30	85,0	15,0	-
6,5	0,30	50,0	50,0	6
8,0	0,30	0,0	100,0	6
9,0	0,30	85,0	15,0	11
11,0	0,30	85,0	15,0	-

5.5.3. Optymalizacja warunków ekstrakcji

Celem optymalizacji warunków ekstrakcji było opracowanie miarodajnej procedury analitycznej oznaczania pozostałości antybiotyków i chemioterapeutyków w miodzie.

Głównym kryterium było uzyskanie jak najwyższych odzysków dla oznaczanych antybiotyków w miodzie, co jest kluczowe dla zapewnienia miarodajnych wyników badań. Ważnym zadaniem było również zminimalizowanie efektów matrycy, które mogłyby zakłócać analizę poprzez generowanie interferencji lub fałszywych wyników. Podczas opracowywania procedury uwzględniono także uzyskanie odpowiedniej powtarzalności oraz dokładności. Spełnienie tych kryteriów było niezbędne do wdrożenia opracowanej metody do rutynowych analiz kontrolnych miodu.

Podobnie jak w przypadku innych matryc, ekstrakcja różnych grup antybiotyków z miodu stanowi wyzwanie ze względu na jego złożony skład chemiczny. Miód zawiera ponad 300 różnych związków chemicznych [199]. Główną grupę stanowią cukry, które łącznie odpowiadają za około 77% składu miodu, przy czym dominującymi są fruktoza oraz glukoza. [199]. Ze względu na obecność cukrów, antybiotyki mogą się z nimi wiązać, co dodatkowo utrudnia ich ekstrakcję. Oprócz tego w miodzie występują białka, kwasy organiczne, aminokwasy, enzymy, flawonoidy, antocyjany i witaminy [200]. Z tego względu, aby ograniczyć wpływ matrycy na wyniki analizy konieczne jest zastosowanie odpowiednich technik oczyszczania przed analizą.

Podobnie jak w przypadku innych matryc, do ekstrakcji antybiotyków z miodu stosuje się różne metody, jednak najczęściej wykorzystywaną techniką jest ekstrakcja

SPE [201-205]. W ostatnich latach również coraz częściej stosuje się metody QuEChERS [81, 206]. Aby ułatwić proces ekstrakcji, próbki miodu są często rozpuszczane w wodzie lub odpowiednim roztworze przed zastosowaniem właściwej procedury oczyszczania [207].

Dobór optymalnej metody ekstrakcji substancji przeciwbakteryjnych z miodu stanowi wyzwanie ze względu na złożoną matrycę oraz zróżnicowane właściwości chemiczne oznaczanych związków. Na podstawie przeanalizowanych publikacji przyjęto założenie o zastosowaniu dwóch odrębnych metod w zależności od grupy antybiotyków. Sulfonamidy oraz trimetoprim ekstrahowano przy użyciu dwóch różnych typów kolumn SPE: SCX [205] oraz Oasis HLB [203]. Natomiast pozostałe antybiotyki (fluorochinolony, makrolidy, tetracykliny, linkozamidy i aminoglikozydy), oznaczano z wykorzystaniem kolumny Strata-X [208].

W literaturze podkreśla się, że w przypadku sulfonamidów, które mogą tworzyć kompleksy z cukrami w miodzie, konieczne jest zastosowanie hydrolizy kwasowej w celu ich rozbicia [207]. Tölgyesi [209] wykazał skuteczność zastosowania 2% kwasu octowego w oznaczaniu sulfonamidów oraz trimetoprimu, dlatego w doświadczeniach wypróbowano go do przeprowadzenia hydrolizy. Kwasu octowego nie zastosowano jednak podczas ekstrakcji pozostałych grup antybiotyków, ponieważ makrolidy (erytromycyna, tylozyna) są wrażliwe na środowisko kwaśne [200]. Z uwagi na wysoką polarność aminoglikozydów, w procedurze ekstrakcji zastosowano dodatek odczynnika jonowego (HFBA), który poprzez tworzenie par jonowych z fazą stacjonarną zwiększa ich retencję oraz odzysk [210].

Próbki miodu zostały zebrane przez Inspekcję Weterynaryjną, dostarczone do Laboratorium Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu, następnie podzielone i do momentu badania przechowywane w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Doświadczenia przeprowadzono, uwzględniając przeanalizowaną literaturę oraz metodykę opracowaną w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach.

Do każdego doświadczenia przygotowano po sześć próbek miodu: dwie próbki miodu akacjowego, dwie próbki miodu gryczanego i dwie próbki miodu rzepakowego, na każdy poziom stężenia. Próbki podzielono na trzy grupy odpowiadające poziomom stężeń: 5 µg/kg, 10 µg/kg oraz 15 µg/kg. Dodatkowo przygotowano próbkę ślepą w celu wykluczenia ewentualnego zanieczyszczenia pochodzącego z tła.

Doświadczenie 1

Próbki odważono po $(2,00 \pm 0,01)$ g do polipropylenowych próbek wirówkowych. Do każdej próbki dodano 20 μl wzorca wewnętrznego (sulfafenazolu) o stężeniu 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oraz sporządzoną mieszaninę wzorców z grupy fluorochinolonów, makrolidów, tetracyklin, linkozamidów i aminoglikozydów na odpowiednich poziomach stężeń, w objętościach: 10 μl dla 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 μl dla 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 30 μl dla 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Do próbki ślepej dodano wyłącznie 20 μl wzorca wewnętrznego. Po dokładnym wymieszaniu próbek odczekano 30 minut. Następnie do każdej próbki dodano 18 ml 0,1 M octanu sodu w wodzie (pH 6) oraz 2 ml 0,2 M HFBA. Próbki mieszano na mieszadle typu Vortex, po czym umieszczono je w łaźni ultradźwiękowej na 30 minut, a następnie wytrząsano przez 10 minut na wytrząsarce. Kolejnym krokiem było wirowanie próbek przez 10 minut przy 4500 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

Kolumnienki Strata-X (100mg/6ml) kondycjonowano kolejno: 5 ml metanolu, 5 ml wody dejonizowanej oraz 5 ml 0,02 M roztworu HFBA. Na wykondycjonowane kolumny naniesiono supernatant. Po przejściu ekstraktu przez złożę kolumny przemyto dwukrotnie 5 ml wody, a następnie suszono pod próżnią przez 10 minut. Po wysuszeniu analizy eluowano dwukrotnie przy użyciu 3 ml mieszaniny MeCN:0,025% HFBA (9+1; V1+V2). Zebrany eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 500 μl roztworu 0,025% HFBA, wymieszano na mieszadle, a następnie przeniesiono do próbek z dnem stożkowym i wirowano przez 10 minut przy 2000 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Uzyskane ekstrakty przeniesiono do fiolek i przeznaczono do analizy chromatograficznej LC-MS/MS.

Doświadczenie 2

Próbki odważono po $(2,00 \pm 0,01)$ g do polipropylenowych próbek wirówkowych. Do każdej próbki dodano 20 μl wzorca wewnętrznego (sulfafenazolu) o stężeniu 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oraz sporządzoną mieszaninę sulfonamidów oraz trimetoprimu na odpowiednich poziomach stężeń, w objętościach: 10 μl dla 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 μl dla 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 30 μl dla 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Do próbki ślepej dodano wyłącznie 20 μl wzorca wewnętrznego. Po dokładnym wymieszaniu próbek odczekano 30 minut. Następnie do każdej próbki dodano 15 ml 2 % kwasu octowego w wodzie. Próbki mieszano na mieszadle typu Vortex, po czym umieszczono je w łaźni ultradźwiękowej na 30 minut, a następnie wytrząsano

przez 10 minut na wytrząsarce. Kolejnym krokiem było wirowanie próbek przez 10 minut przy 4500 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

Kolumnienki SCX (500mg/3ml) kondycjonowano kolejno: 5 ml metanolu oraz 5 ml 2% kwasu octowego. Na wykondycjonowane złoża naniesiono supernatant. Po przejściu ekstraktu przez złożę kolumnienki przemyto 5 ml 2% kwasu octowego, następnie 5 ml metanolu i suszono pod próżnią przez 10 minut. Anality eluowano dwukrotnie, stosując po 2,5 ml mieszaniny acetonitrylu i 25% amoniaku (95+5; V_1+V_2). Zebrany eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 500 μl roztworu 0,025% HFBA, wymieszano na mieszadle, a następnie przeniesiono do probówek z dnem stożkowym i wirowano przez 10 minut przy 2000 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Uzyskane ekstrakty przeniesiono do fiolek i przeznaczono do analizy chromatograficznej LC-MS/MS.

Doświadczenie 3

Procedura przygotowania próbek do etapu kondycjonowania była identyczna jak w Doświadczeniu 2. W tej części badania zastosowano jednak kolumnienki Oasis HLB (200 mg/6 ml).

Kolumnienki Oasis HLB (200 mg/6 ml) kondycjonowano kolejno 5 ml acetonitrylu oraz 5 ml wody. Po naniesieniu supernatantu i przejściu ekstraktu przez złożę, kolumnienki przemyto 5 ml wody, a następnie anality eluowano dwukrotnie 2,5 ml acetonitrylu. Zebrany eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 500 μl roztworu 0,025% HFBA, wymieszano na mieszadle, a następnie przeniesiono do probówek z dnem stożkowym i wirowano przez 10 minut przy 2000 obr./min w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Uzyskane ekstrakty przeniesiono do fiolek i przeznaczono do analizy chromatograficznej LC-MS/MS.

Po przeanalizowaniu próbek z Doświadczenia 1, Doświadczenia 2 i Doświadczenia 3 techniką LC-MS/MS sprawdzono i porównano odzyski antybiotyków na wszystkich poziomach stężeń. Przeprowadzono analizę wpływu zastosowanej procedury oznaczania, stężenia analitów, zastosowanych kolumnienek SPE oraz rodzaju miodu na uzyskane wyniki.

Szczegółowe wyniki odzysków oznaczanych substancji przeciwbakteryjnych w miodach na poszczególnych poziomach stężeń przedstawiono w tabelach: **Tabela A 9**,

Tabela A 10, Tabela A 11. Natomiast średnie odzyski z Doświadczenia 1 zestawiono w **Tabela 32**, a odzyski z Doświadczeń 2 i 3 przedstawiono w **Tabela 33**. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na porównanie skuteczności różnych kolumnienek SPE stosowanych do ekstrakcji antybiotyków z miodu. W badaniach wykorzystano kolumnienki Strata-X, Oasis HLB oraz SCX.

Tabela 32. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 1 (matryca miody)

Związek	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)
DOŚWIADCZENIE 1		
Marbofloksacyna	95,9	93,1
Norfloksacyna	92,6	
Ciprofloksacyna	94,5	
Danofloksacyna	93,3	
Enrofloksacyna	96,7	
Sarafloksacyna	91,8	
Difloksacyna	94,1	
Kwas oksolinowy	89,9	
Kwas nalidyksowy	89,3	
Flumechina	93,3	
Tylozyna	89,5	90,1
Erytromycyna	90,8	
Oksytetracyklina	94,6	93,8
4-epioksytetracyklina	94,5	
Tetracyklina	93,5	
4-epitetracyklina	93,4	
Chlorotetracyklina	93,0	
4-epichlorotetracyklina	94,1	
Doksycyklina	93,3	96,2
Linkomycyna	96,2	
Streptomycyna	88,8	88,8

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

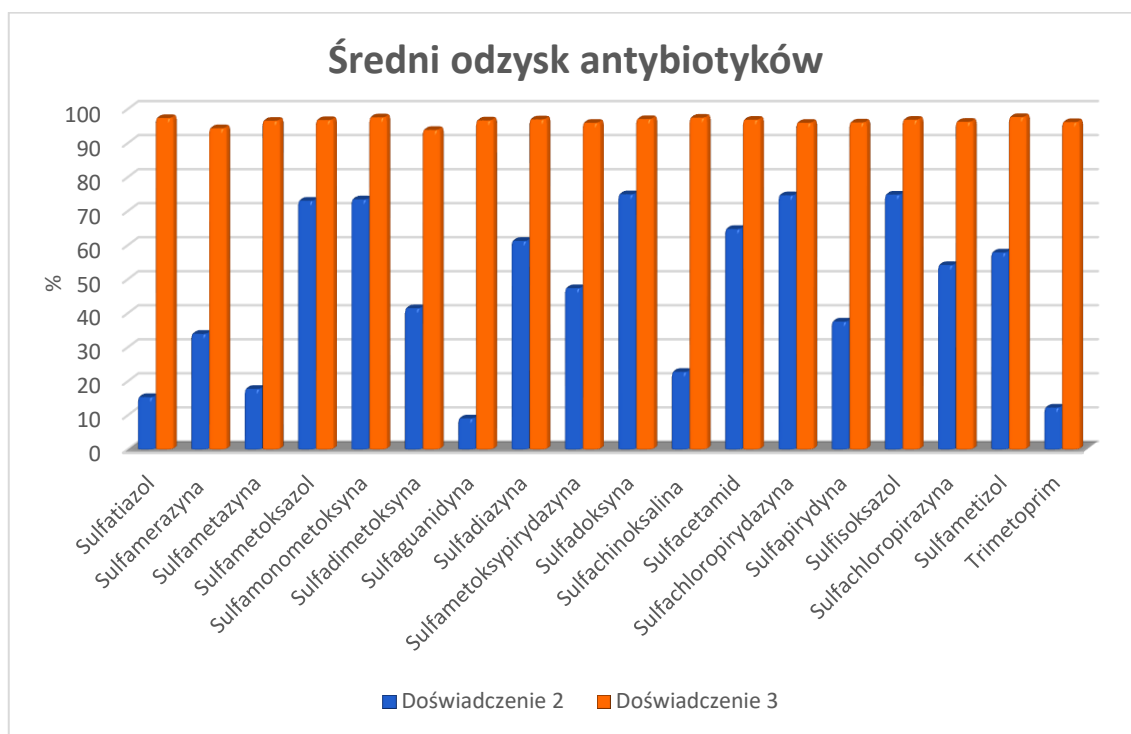
Tabela 33. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 2 i Doświadczeniu 3 (matryca miody)

Związek	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)	Odzysk (%)	Średni odzysk (%)
	DOŚWIADCZENIE 2		DOŚWIADCZENIE 3	
Sulfatiazol	15,3	Z uwagi na duży rozrzut wyników nie policzono średniego odzysku dla tej grupy związków	97,3	96,4
Sulfamerazyna	33,9		94,3	
Sulfametazyna	17,7		96,5	
Sulfametoksazol	73,0		96,7	
Sulfamonometoksyna	73,4		97,5	
Sulfadimetoksyna	41,4		93,8	
Sulfaguanidyna	9,03		96,6	
Sulfadiazyna	61,2		96,9	
Sulfametoksypyridazyna	47,3		95,9	
Sulfadoksyna	74,9		97,0	
Sulfachinoksalina	22,7		97,4	
Sulfacetamid	64,7		96,8	
Sulfachloropiridazyna	74,6		95,9	
Sulfapirydyna	37,5		96,0	
Sulfisoksazol	74,8		96,8	
Sulfachloropirazyna	54,1		96,2	
Sulfametizol	57,8		97,6	
Trimetoprim	12,2	12,2	96,1	96,1

Wykres 6. Średni odzysk antybiotyków z matrycy miodu – Doświadczenie 1



Wykres 7. Średni odzysk antybiotyków z matrycy miodu – porównanie Doświadczenia 2 i Doświadczenia 3



W Doświadczeniu 1, które obejmowało oznaczanie antybiotyków z grup fluorochinolonów, tetracyklin, makrolidów, linkozamidów i aminoglikozydów, uzyskano wysokie odzyski, mieszczące się w zakresie od 88,8% dla streptomycyny do 96,7% dla enrofloksacyny. Wszystkie oznaczane w tym doświadczeniu antybiotyki wykazały porównywalny poziom odzysku, co potwierdza dobrą skuteczność tej metody ekstrakcji i oczyszczania na kolumnkach Strata-X dla tych związków. Średnie wartości odzysku dla oznaczanych antybiotyków zostały również przedstawione na wykresie (**Wykres 6**). Metoda z zastosowaniem kolumniek Strata-X zapewniła skuteczną ekstrakcję i oczyszczanie fluorochinolonów, tetracyklin, makrolidów, linkozamidów i aminoglikozydów, potwierdza to jej przydatność do rutynowego oznaczania pozostałości tych antybiotyków w miodzie i jest zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na ich przydatność w tego typu oznaczeniach.

Doświadczenia, podczas których oznaczano sulfonamidy i trimetoprim z wykorzystaniem dwóch różnych kolumniek SPE, wykazały znaczące różnice w skuteczności ekstrakcji tych związków w zależności od zastosowanej kolumny. Odzyski uzyskane w Doświadczeniu 2, gdzie zastosowano kolumnieki SCX, były niskie i zróżnicowane. Żaden związek nie osiągnął założonego poziomu 80%, a w przypadku

niektórych substancji, takich jak sulfatiazol, sulfametazyna, sulfaguanidyna i trimetoprim, odzyski nie przekroczyły 20%. Wyniki te potwierdzają niską skuteczność tej metody oczyszczania dla badanych związków w tej matrycy.

W Doświadczeniu 3, w którym zastosowano kolumnienki Oasis HLB, uzyskane wyniki odzysku były wysokie i wynosiły od 93,8% do 97,6%. Procedura ekstrakcji sulfonamidów i trimetoprimu z użyciem kolumnienek Oasis HLB zapewniła skuteczną ekstrakcję tych związków oraz efektywne oczyszczanie próbki. Różnice w odzyskach uzyskane pomiędzy Doświadczeniem 2 a 3 przedstawiono na wykresie (**Wykres 7**). Ilustruje on wzrost efektywności ekstrakcji po zastosowaniu innego rodzaju kolumnienek SPE. Jak podkreślano w literaturze, wybór odpowiedniej techniki oczyszczania próbki oraz właściwy dobór kolumnienek SPE ma kluczowy wpływ na uzyskane odzyski, zwłaszcza w analizie substancji przeciwbakteryjnych w miodzie.

Procedura zastosowana w Doświadczeniu 3, oparta na oczyszczaniu przy użyciu kolumnienek Oasis HLB, pozwala na skuteczną ekstrakcję sulfonamidów i trimetoprimu, co potwierdza jej przydatność do rutynowych badań pozostałości tych związków w miodzie. Szerokie zastosowanie kolumnienek Oasis HLB w tego typu analizach znajduje również potwierdzenie w literaturze.

Próbki ślepe przygotowane dla matrycy miodu potwierdziły brak zanieczyszczenia tła dla metod oczyszczania zastosowanych w Doświadczeniu 1 i 3. Wyniki te wskazują, że zastosowane procedury skutecznie minimalizują wpływ matrycy, co jest kluczowym aspektem w analizach LC-MS/MS.

Podsumowując, celem tych doświadczeń było opracowanie procedury ekstrakcji, która zapewni powtarzalne i wysokie odzyski substancji przeciwbakteryjnych oznaczanych w miodzie. W wyniku przeprowadzonych badań jako optymalne podejście wybrano oczyszczanie na kolumnienkach Strata-X dla fluorochinolonów, tetracyklin, makrolidów, linkozamidów i aminoglikozydów oraz Oasis HLB dla sulfonamidów i diaminopirymidyn (trimetoprimu). Dodatkowo analiza wyników wykazała, że poziom stężenia oraz rodzaj miodu nie miały wpływu na uzyskane odzyski. Zastosowanie tych dwóch metod pozwoliło uzyskać wysokie i powtarzalne odzyski dla wszystkich wymienionych grup antybiotyków, co potwierdza ich przydatność w rutynowym oznaczaniu pozostałości antybiotyków w miodzie.

5.5.4. Ocena skuteczności metody – krzywe wzorcowe i chromatogramy

W celu oceny skuteczności opracowanej procedury oznaczania antybiotyków w miodach przygotowano próbki miodów, do których dodano wzorzec wewnętrzny oraz odpowiednie ilości wzorców antybiotyków, tak aby uzyskać stężenia odpowiadające czterem poziomom: 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg oraz 20 µg/kg, przygotowano także próbkę ślepą. Mieszaninę wzorcową przygotowano zgodnie z tabelami (**Tabela 26**, **Tabela 27**), a ilości wzorców dodano do próbek miodów zgodnie z **Tabela 28**. Następnie przeprowadzono opracowane procedury ekstrakcji. Przygotowane próbki poddano analizie LC-MS/MS w zoptymalizowanych warunkach.

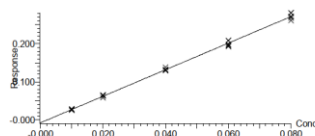
Na wykresach (**Wykres 8**) przedstawiono krzywe wzorcowe dla każdego oznaczanego w procedurze antybiotyku, utworzone w programie MassLynx (Waters) na podstawie analizy próbek fortyfikowanych. W oznaczeniach zastosowano metodę ze wzorcem wewnętrznym. Liniowość uzyskanych krzywych wzorcowych oceniono na podstawie współczynnika korelacji $r \geq 0,98$, wartość ta została przyjęta jako kryterium oceny. Dla wszystkich oznaczanych antybiotyków uzyskano satysfakcjonujące wyniki, co potwierdza prawidłowe warunki analizy LC-MS/MS, a także prawidłową liniowość w wymaganym zakresie stężeń.

Tabela 34 przedstawia chromatogramy dla oznaczanych substancji przeciwbakteryjnych. Potwierdzają one dobre rozdzielenie związków oraz intensywność sygnału.

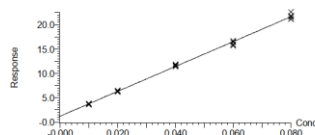
Wykres 8. Wykresy krzywych wzorcowych dla oznaczanych antybiotyków w miodach

Antybiotyki oznaczane w miodach – kolumnienki Starta-X

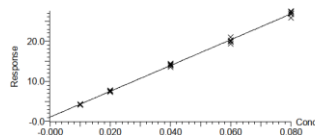
Compound name: Marbofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998984$, $r^2 = 0.997969$
Calibration curve: $3.48711 \cdot x + -0.00776844$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



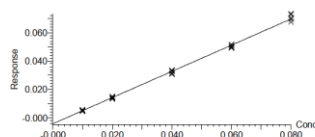
Compound name: Kwas nalidyskowy
Correlation coefficient: $r = 0.999029$, $r^2 = 0.998058$
Calibration curve: $255.335 \cdot x + 1.20055$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



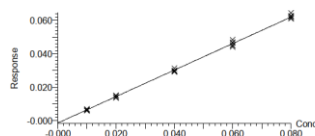
Compound name: Flumechin
Correlation coefficient: $r = 0.999197$, $r^2 = 0.998394$
Calibration curve: $321.476 \cdot x + 1.04399$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



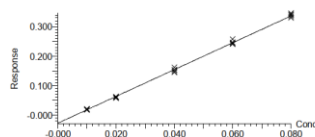
Compound name: Entrofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998772$, $r^2 = 0.997546$
Calibration curve: $0.925126 \cdot x + -0.00433731$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



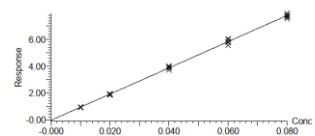
Compound name: Erytromycyna
Correlation coefficient: $r = 0.999056$, $r^2 = 0.998113$
Calibration curve: $0.792729 \cdot x + -0.00143395$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



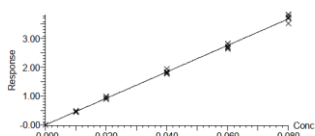
Compound name: Tylozyna
Correlation coefficient: $r = 0.999129$, $r^2 = 0.998258$
Calibration curve: $4.55379 \cdot x + -0.0279149$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



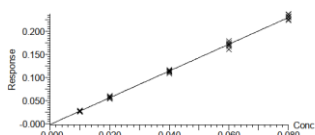
Compound name: 4-epichlorotetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.999373$, $r^2 = 0.998746$
Calibration curve: $97.6492 \cdot x + -0.0366494$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



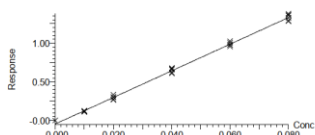
Compound name: Kwas oksolinowy
Correlation coefficient: $r = 0.999182$, $r^2 = 0.998365$
Calibration curve: $46.1034 \cdot x + -0.00117848$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



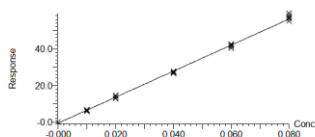
Compound name: Sarafloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.999036$, $r^2 = 0.998073$
Calibration curve: $2.89164 \cdot x + -0.00164302$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



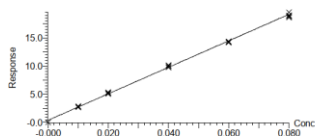
Compound name: Difloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.997842$, $r^2 = 0.995689$
Calibration curve: $17.2008 \cdot x + -0.0465837$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



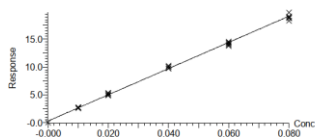
Compound name: Linkomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.999030$, $r^2 = 0.998061$
Calibration curve: $708.671 \cdot x + -0.543154$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



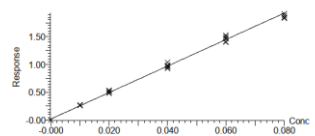
Compound name: Oksytetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.999037$, $r^2 = 0.998075$
Calibration curve: $234.694 \cdot x + 0.377316$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



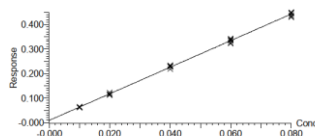
Compound name: 4-epiksyetetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.998888$, $r^2 = 0.997778$
Calibration curve: $235.249 \cdot x + 0.294309$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



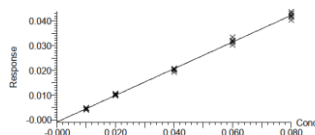
Compound name: Doksydcykina
Correlation coefficient: $r = 0.998551$, $r^2 = 0.997103$
Calibration curve: $23.7942 \cdot x + 0.019042$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



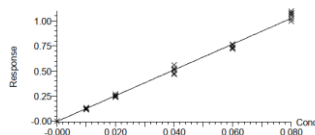
Compound name: Norfloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.999295$, $r^2 = 0.998590$
Calibration curve: $5.42677 \cdot x + 0.00647181$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



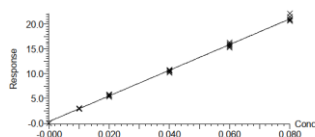
Compound name: Danofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998834$, $r^2 = 0.997669$
Calibration curve: $0.538491 \cdot x + -0.000881509$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



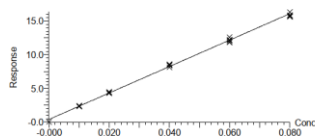
Compound name: Ciprofloksacyna
Correlation coefficient: $r = 0.998217$, $r^2 = 0.996437$
Calibration curve: $12.8441 \cdot x + -0.00284228$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



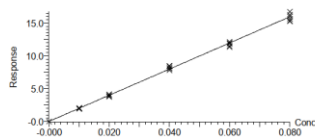
Compound name: Tetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.999038$, $r^2 = 0.998077$
Calibration curve: $258.6 \cdot x + 0.348578$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



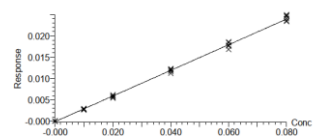
Compound name: 4-epitetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.999063$, $r^2 = 0.998126$
Calibration curve: $196.492 \cdot x + 0.368341$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Chlorotetracyklina
Correlation coefficient: $r = 0.998872$, $r^2 = 0.997745$
Calibration curve: $198.888 \cdot x + 0.0219463$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



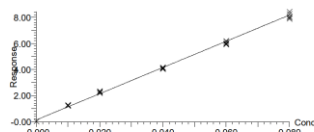
Compound name: Streptomycyna
Correlation coefficient: $r = 0.999018$, $r^2 = 0.998036$
Calibration curve: $0.301047 \cdot x + -0.000144641$
Response type: Internal Std (Ref 22), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



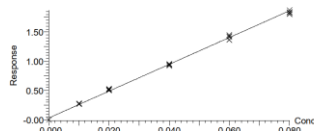
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Antybiotyki oznaczane w miodach – kolumnienki Oasis HLB

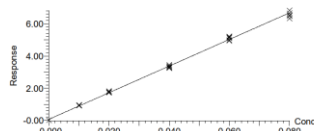
Compound name: Sulfaguanidyna
Correlation coefficient: $r = 0.998263$, $r^2 = 0.996530$
Calibration curve: $100.648 \cdot x + 0.121226$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



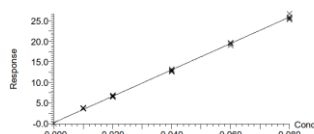
Compound name: Sulfacetamid
Correlation coefficient: $r = 0.998550$, $r^2 = 0.997103$
Calibration curve: $22.866 \cdot x + 0.0329569$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



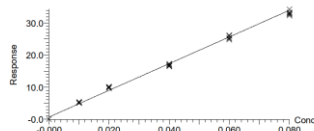
Compound name: Sulfapyridyna
Correlation coefficient: $r = 0.999065$, $r^2 = 0.998132$
Calibration curve: $82.6856 \cdot x + 0.056884$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



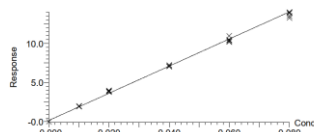
Compound name: Sulfadimetoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.999187$, $r^2 = 0.998376$
Calibration curve: $320.184 \cdot x + 0.227678$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



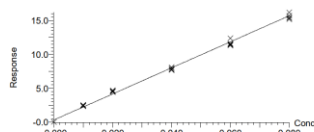
Compound name: Sulfadoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.997014$, $r^2 = 0.994037$
Calibration curve: $417.083 \cdot x + 0.841918$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



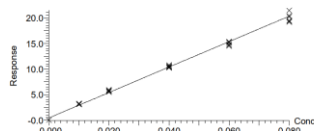
Compound name: Sulfamerazyna
Correlation coefficient: $r = 0.998614$, $r^2 = 0.997230$
Calibration curve: $173.466 \cdot x + 0.167586$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



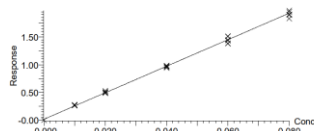
Compound name: Sulfadiazyna
Correlation coefficient: $r = 0.997093$, $r^2 = 0.994195$
Calibration curve: $192.348 \cdot x + 0.294782$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



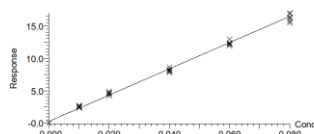
Compound name: Sulfatiazol
Correlation coefficient: $r = 0.997230$, $r^2 = 0.994468$
Calibration curve: $248.818 \cdot x + 0.418608$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



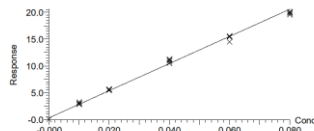
Compound name: Sulfisoksazol
Correlation coefficient: $r = 0.999009$, $r^2 = 0.998018$
Calibration curve: $23.8886 \cdot x + 0.0161967$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



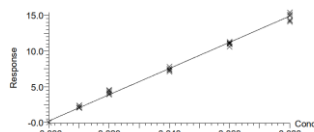
Compound name: Sulfametazyna
Correlation coefficient: $r = 0.997145$, $r^2 = 0.994298$
Calibration curve: $202.409 \cdot x + 0.284755$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



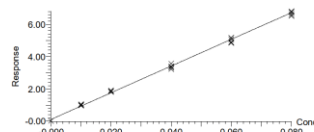
Compound name: Sulfametoksyprydazyna
Correlation coefficient: $r = 0.998100$, $r^2 = 0.996203$
Calibration curve: $253.707 \cdot x + 0.280266$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



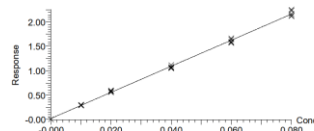
Compound name: Sulfamonometoksyna
Correlation coefficient: $r = 0.997022$, $r^2 = 0.994052$
Calibration curve: $182.952 \cdot x + 0.232606$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



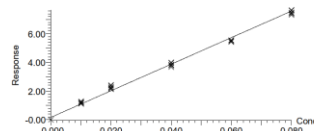
Compound name: Sulfachloropirydazyna
Correlation coefficient: $r = 0.998351$, $r^2 = 0.996705$
Calibration curve: $82.9286 \cdot x + 0.0922918$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



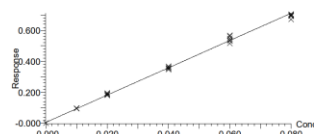
Compound name: Sulfametoksazol
Correlation coefficient: $r = 0.999039$, $r^2 = 0.998078$
Calibration curve: $26.7974 \cdot x + 0.018231$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



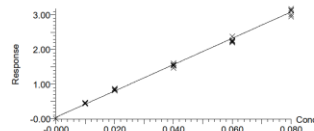
Compound name: Sulfachinoksalina
Correlation coefficient: $r = 0.995767$, $r^2 = 0.991552$
Calibration curve: $92.7367 \cdot x + 0.168009$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Sulfachloropirazyna
Correlation coefficient: $r = 0.999006$, $r^2 = 0.998014$
Calibration curve: $8.81769 \cdot x + 0.00494266$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Sulfamethizol
Correlation coefficient: $r = 0.998254$, $r^2 = 0.996511$
Calibration curve: $38.0662 \cdot x + 0.040948$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Trimetoprim
Correlation coefficient: $r = 0.999002$, $r^2 = 0.998005$
Calibration curve: $9.85014 \cdot x + 0.0114335$
Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

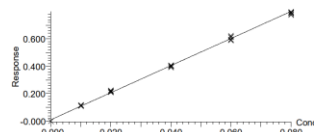
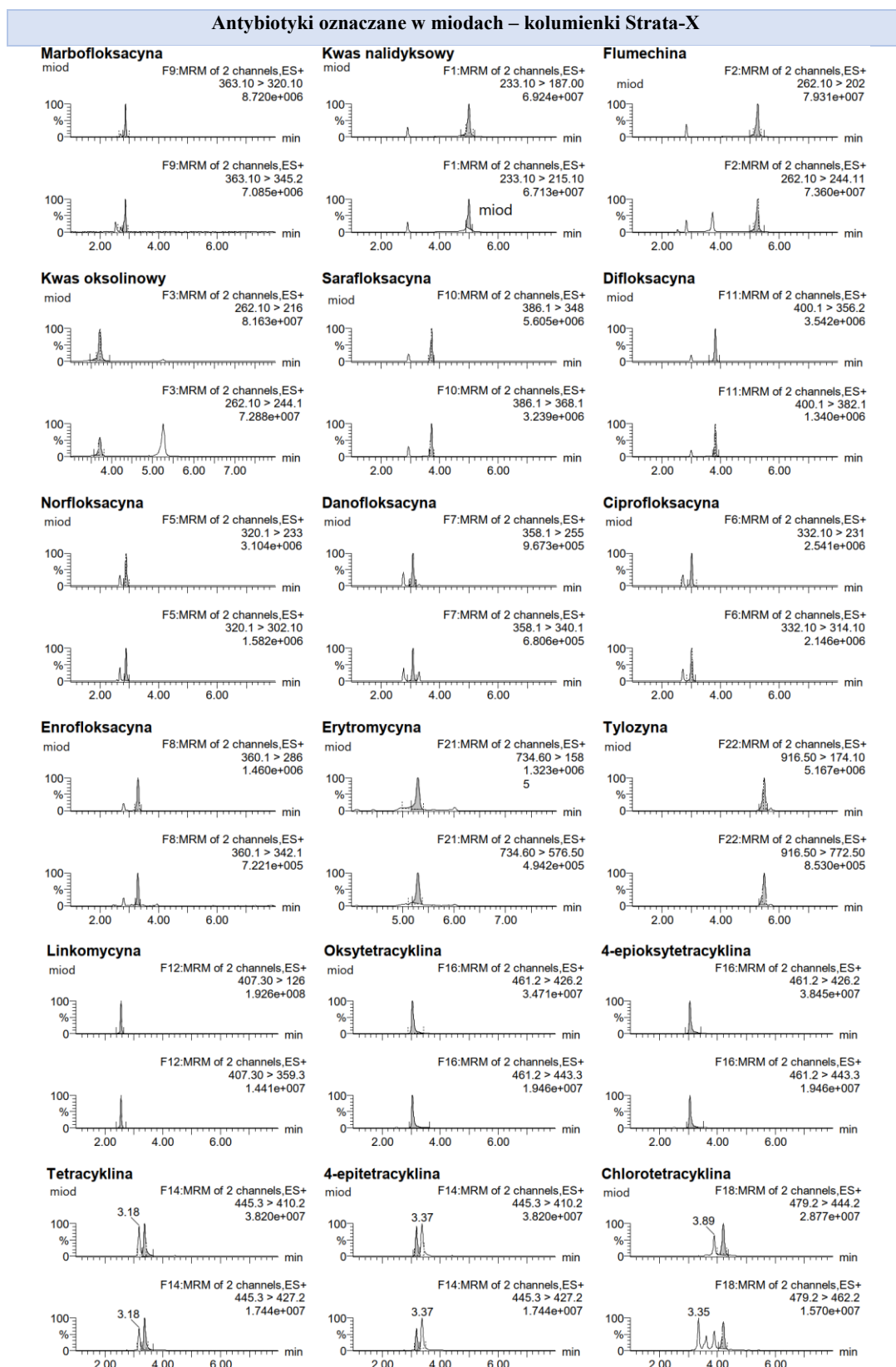
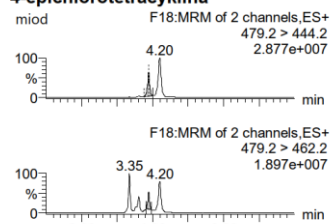


Tabela 34. Chromatogramy oznaczanych antybiotyków – matryca miód

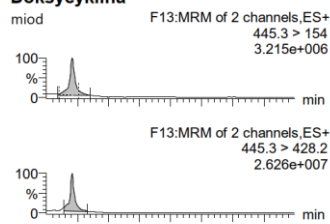


CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

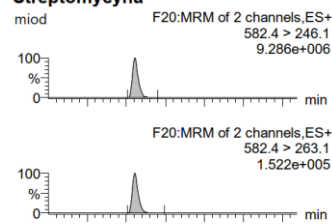
4-epichlorotetracyklina



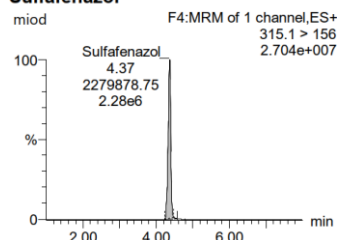
Doksycyklina



Streptomycyna

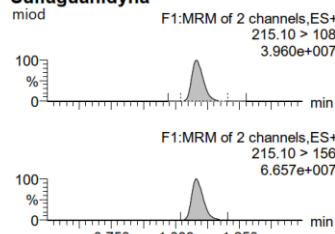


Sulfafenazol

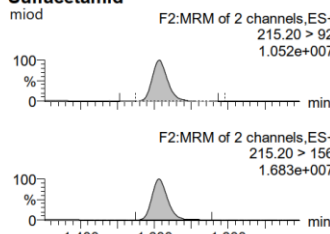


Antybiotyki oznaczane w miodach – kolumnienki Oasis HLB

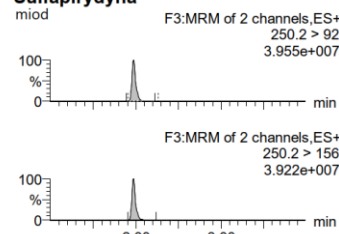
Sulfaguanidyna



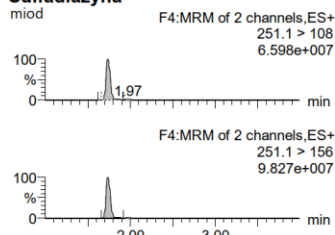
Sulfacetamid



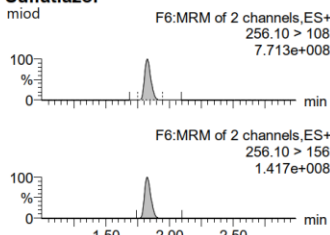
Sulfapyrydyna



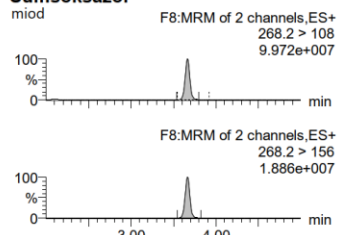
Sulfadiazyna



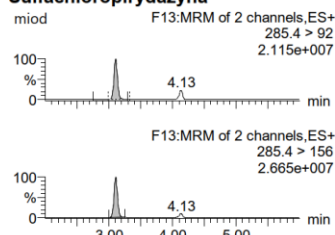
Sulfatiazol



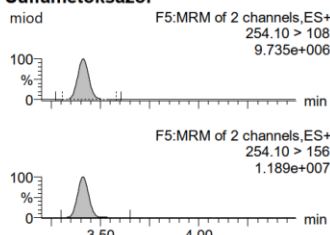
Sulfisoksazol



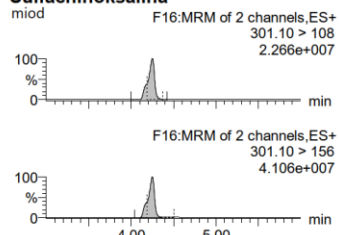
Sulfachloropirydazyna



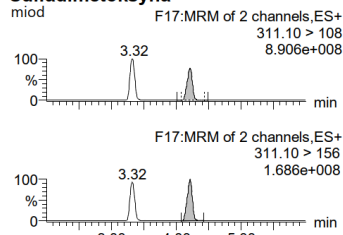
Sulfametoksazol



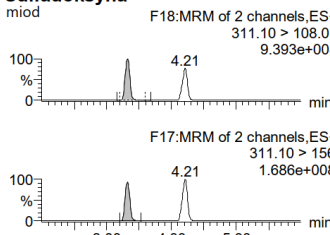
Sulfachinoksalina



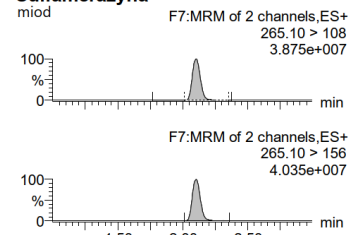
Sulfadimetoksyna

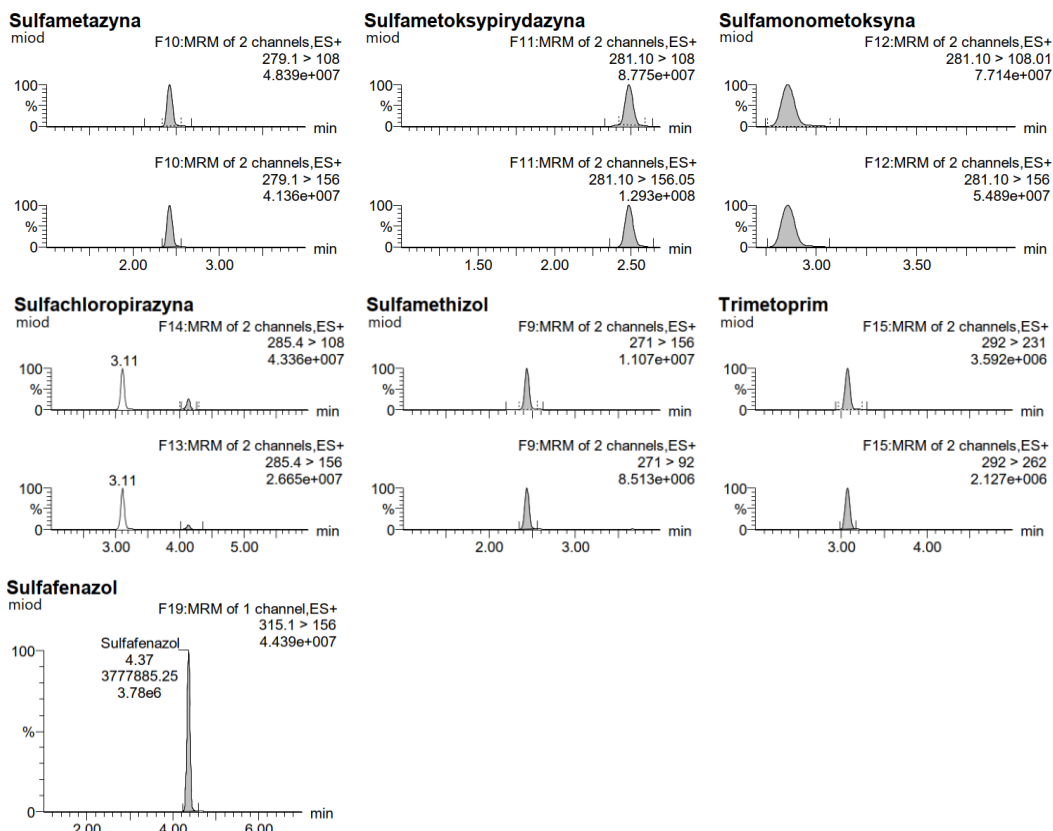


Sulfadoksyna



Sulfamerazyna





Podobnie jak we wcześniejszych procedurach oznaczania antybiotyków w mięśniach, mleku, nerkach i jajach, w miodach udało się skutecznie rozdzielić wszystkie oznaczane antybiotyki, z wyjątkiem oksytetracykliny i 4-epioksy-tetracykliny. Zoptymalizowana metoda nie pozwala na ich rozdzielenie. Do próbek fortyfikowanych dodawano wyłącznie oksytetracyklinę na określonych poziomach w celu oceny skuteczności metody.

Dodatkowo, w ramach optymalizacji procedury przeprowadzono osobne doświadczenia dla 4-epioksy-tetracykliny w celu weryfikacji skuteczności jej ekstrakcji. Uzyskane wyniki potwierdziły, że zastosowana metoda ekstrakcji i oczyszczania z wykorzystaniem kolumnienek Strata-X jest odpowiednia.

6. Walidacja opracowanych procedur badawczych

Podstawowym elementem zapewnienia kompetencji laboratoriów badawczych oraz miarodajności wyników ich badań, jest posiadanie akredytacji zgodnie z normą ISO/IEC 17025 [181]. Wymaga ona stosowania metod, które zostały poddane walidacji i potwierdzone jako spełniające określone kryteria na podstawie danych uzyskanych w jej trakcie [211]. Laboratoria, które zajmują się oznaczaniem pozostałości substancji chemicznych w żywności (m. in. leków weterynaryjnych), muszą spełniać dodatkowo wymagania określone w przepisach unijnych. Unia Europejska w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808, które zastąpiło decyzję 2002/657/WE, określa wymagania dotyczące walidacji metod oznaczania pozostałości weterynaryjnych środków leczniczych [212].

Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 określa minimalne wymagania dla walidacji ilościowych metod przesiewowych oraz ilościowych metod potwierdzających. W przypadku metod przesiewowych wymagane parametry walidacyjne obejmują [212]: zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych ($CC\beta$), poprawność, precyzja, względny efekt matrycowy, selektywność, stabilność i odporność. Natomiast dla metod ilościowych potwierdzających [212]: decyzyjna wartość graniczna ($CC\alpha$), poprawność, precyzja, względny efekt matrycowy, selektywność, stabilność oraz odporność. Wymagane parametry przedstawiono w **Tabela 35**.

Tabela 35. Porównanie wymaganych parametrów walidacyjnych dla metod ilościowych przesiewowych i potwierdzających zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808

Wymagane parametry	Metoda ilościowa przesiewowa	Metoda ilościowa potwierdzająca
$CC\alpha$	-	+
$CC\beta$	+	-
Poprawność	+	+
Precyzja	+	+
Efekt matrycowy	+	+
Specyficzność	+	+
Stabilność	+	+
Odporność	+	+

Źródło: Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 [212]

6.1. Plan walidacji i założenia projektowe

Przed rozpoczęciem walidacji każdej z opracowanych procedur utworzono „Plan walidacji/weryfikacji” na podstawie dokumentacji systemu zarządzania obowiązującego w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu, w tym Instrukcji Ogólnej PO-12.01.00 „Walidacja/weryfikacja metod chemicznych” oraz jej załącznika (Załącznik ZHW PO-12.01.20). Instrukcja została opracowana przez mgr Joannę Pacyńską (Asystent Wiodący), zweryfikowana przez mgr Agnieszkę Kopydłowską (Kierownik Pracowni) i zatwierdzona przez lek. wet. Małgorzatę Pająk-Horowską (Kierownik Zakładu Higieny Weterynaryjnej).

Załącznik „Plan walidacji/weryfikacji” został opracowany w sposób uniwersalny, aby mógł być stosowany do różnych badań prowadzonych w laboratorium, niezależnie od wymagań Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808. Dokument zawiera niezbędne dane dotyczące zaplanowanej walidacji procedury badawczej, w tym podstawowe informacje, takie jak nazwa walidowanej procedury, kierunek badania oraz rodzaj obiektu. Jeśli dostępne były wymagania prawne lub kontrolne, określano ich rodzaj oraz wartość. Ważnym elementem było również precyzyjne określenie parametrów walidacyjnych wyznaczanych w procesie walidacji, w tym: liniowości sygnału, zakresu roboczego, $CC\alpha$, $CC\beta$, precyzji, odtwarzalności, poprawności i niepewności pomiaru, a także kryteriów akceptacji tych parametrów zgodnych z obowiązującymi przepisami. Określony został także zespół walidacyjny oraz planowany termin wykonania walidacji.

Dla walidowanych procedur zostały opracowane również założenia projektowe określające kluczowe elementy wdrażania procedur badawczych. Dokument „Założenia projektowe” zawiera informacje dotyczące zakresu zmian, uzasadnienia prac, wymagań organizacyjno-technicznych oraz osoby odpowiedzialnej za przeprowadzenie walidacji i wdrożenie procedury.

6.2. Liniowość sygnału

Zakres stężeń, dla którego potwierdzono liniowość sygnału – zależność sygnału od stężenia analitu – musi być przedstawiony w walidacji zgodnie z wytycznymi normy ISO 17025 [181].

W celu wyznaczenia liniowości sygnału sporządzono krzywe wzorcowe osobno dla każdego badanego antybiotyku w każdej analizowanej matrycy. Wartości MRL lub wyznaczone poziomy graniczne często różnią się w zależności od matrycy, dlatego liniowość oceniano indywidualnie dla każdego przypadku. Przygotowano pięć poziomów stężeń próbek z dodatkiem wzorca dostosowanych do zakresu oznaczeń oraz poziom zerowy. Analizy przeprowadzono w trzech równoległych seriach.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynniki regresji liniowej [213]:

- a – nachylenie,
- b – przesunięcie,
- R^2 – współczynnik korelacji,

zgodnie z równaniem:

$$y = ax + b$$

gdzie:

- y – sygnał detektora,
- x – stężenie danego antybiotyku.

Uzyskane dane wykorzystano do wykreślenia krzywych wzorcowych, przedstawiających zależność między stężeniem analitu a sygnałem detektora. Za kryterium akceptowalności liniowości przyjęto $R^2 > 0,9899$ [213].

Tabela 36 przedstawia kartę liniowości sygnału – przykładowy antybiotyk amoksycylina w matrycy mleko (procedura oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w mleku) wraz z wynikami i obliczeniami.

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 36. Karta - Liniowość sygnału

ZHW	LINIOWOŚĆ SYGNAŁU PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH				
Nr procedury badawczej/norma:					projekt PBC-101.00.00
Technika analityczna:					LC-MS/MS
Analit:					Amoksycylina
MRL					50 µg/kg
Matryca:					mleko
Poziom stężenia analitu [µg/kg]	Wskazania przyrządu pomiarowego w kolejnych powtórzeniach			Śr. wskazanie przyrządu pomiarowego	Odchylenie standardowe
	I	II	III		
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1	0,0266	0,0265	0,0293	0,0275	0,0016
2	0,0584	0,0632	0,0635	0,0617	0,0029
4	0,1316	0,1324	0,1305	0,1315	0,0009
6	0,1926	0,1942	0,1987	0,1952	0,0032
8	0,2717	0,2714	0,2814	0,2748	0,0057
a				3,4299	
b				-0,0049	
r ²				0,9983	

Liniowość sygnału

$y = 3,4299x - 0,00494$
 $R^2 = 0,9983$

Stężenie

Badania wykonał: J.Pacyńska Opracował: J.Pacyńska

Załącznik ZHW PO-12.01.14; wydanie 3 z dnia 01.04.2022

6.3. Selektywność

W procesie walidacji oceniono również selektywność czyli zdolność do jednoznacznego identyfikowania badanego antybiotyku i odróżniania go od innych związków, które mogą występować w badanej próbce [212].

Przeanalizowano 20 próbek zerowych dla każdej matrycy (mięśnie, nerki, mleko, jaja, miód), aby sprawdzić, czy w obszarze retencji danego antybiotyku występują sygnały mogące utrudnić jego wykrycie lub ilościowe oznaczenie. Analizie poddano mięśnie pochodzące od różnych gatunków zwierząt, takich jak bydło, świnie, drób, konie, ryby i króliki (łącznie 20 próbek). W przypadku nerek badano próbki od bydła i świń, dla jaj analizowano jaja kurze oraz przepiórcze. W przypadku miodu uwzględniono różne jego rodzaje, takie jak lipowy, wielokwiatowy, rzepakowy, gryczany, spadziowy, faceliowy, wrzosowy i akacjowy.

Następnie przeprowadzono badanie dla takiej samej liczby próbek, wzbogacając je substancjami mogącymi zakłócać analizę, aby ocenić, czy mogą one prowadzić do błędnej identyfikacji, utrudniać wykrycie analitu lub wpływać na wynik ilościowego oznaczenia.

W badaniu selektywności danej procedury badawczej wykorzystano także dotychczasowe doświadczenie w pracy z tą procedurą, zdobyte w trakcie jej optymalizacji.

Ze względu na charakter przeprowadzonego badania wnioski z analizy mają charakter wyłącznie opisowy.

Tabela 37 przedstawia kartę oceny selektywności i specyficzności na przykładzie procedury oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w mleku.

Tabela 37. Karta oceny selektywności i specyficzności

ZHW	KARTA OCENY SELEKTYWNOŚCI I SPECYFICZNOŚCI METODY PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH
------------	---

Procedura badawcza/norma: Projekt PBC-101.00.00

Kierunek badania: Antybiotyki i chemioterapeutyki w mleku

Technika badawcza	LC-MS/MS
Czynnik zakłócający	Mieszanina związków

Opis postępowania:

Sprawdzono specyficzność metody chromatografii cieczowej z detekcją masową przy użyciu aparatu Waters Xevo TQ.

Przeanalizowano 20 próbek ślepych mleka, pochodzących z różnych dostaw z trzech województw. W żadnej z próbek nie stwierdzono interferencji, dodatkowych sygnałów ani pików w obszarze retencji docelowego analitu

Następnie wzbogacono próbki matrycowe mieszaniną wzorców (inne leki weterynaryjne), po czym przeanalizowano uzyskane chromatogramy. Nie zaobserwowano interferencji, sygnałów ani dodatkowych pików w regionie retencji docelowego analitu.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz dotychczasowego doświadczenia zdobytego podczas optymalizacji procedury PBC-101.00.00 stwierdzono, że nie występują zakłócenia identyfikacji docelowych analitów. Aparat LC-MS/MS charakteryzuje się wysoką specyficznością i selektywnością w oznaczaniu badanych związków. Obecność użytych substancji nie powoduje uzyskania wyników fałszywie niezgodnych.

Podpis osoby opracowującej: 

Załącznikami do opisu są wykresy lub wydruki.

Załącznik ZHW PO-12.01.01, wydanie 2 z dnia 06.03.2015

6.4. Precyzja, powtarzalność, odtwarzalność, poprawność

Kolejnym wymagany parametrem ocenianym w procesie walidacji była precyzja metody składająca się na powtarzalność oraz odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną.

Powtarzalność metody opisuje stopień zgodności wyników uzyskanych w serii oznaczeń przeprowadzonych w identycznych warunkach analitycznych, obejmujących

tę samą procedurę badawczą, tego samego analityka, to samo wyposażenie laboratoryjne oraz analizę tej samej próbki w krótkim odstępie czasu [212].

W porównaniu do powtarzalności, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna odnosi się do zgodności wyników uzyskanych w zmiennych warunkach analitycznych, obejmujących wykonywanie analiz tą samą procedurą badawczą, przez różnych analityków, z wykorzystaniem innego sprzętu pomiarowego oraz analizę różnych próbek w dłuższym odstępie czasu [212].

W celu oceny powtarzalności metody przeprowadzono badania dla każdej procedury badawczej, obejmując wszystkie badane matryce oraz oznaczane związki. Przeprowadzono trzy serie badań, w których dla każdej serii wykorzystano 18 próbek, po 6 na każdy poziom stężenia. Badanie przeprowadzono w trzech kolejnych dniach, wykonując analizy dzień po dniu. Wszystkie badania wykonano na tej samej próbce matrycowej.

Próbki wzbogacano na trzech poziomach stężeń, dostosowanych do rodzaju analizowanego antybiotyku. Dla antybiotyków posiadających wyznaczony MRL przyjęto poziomy wynoszące 0,5-, 1,0- i 1,5-krotność MRL. W przypadku antybiotyków niedopuszczonych np. antybiotyki w miodach, zastosowano poziomy 1,0-, 2,0- i 3,0-krotności LCL (najniższy poziom skalibrowany).

Przykładem jest oznaczanie amoksycyliny w mleku na poziomach 0,5 MRL, 1,0 MRL oraz 1,5 MRL (MRL dla amoksycyliny w mleku wynosi 4 µg/kg) – wyniki przedstawiono w **Tabela 40**.

Uzyskane wyniki wykorzystano do obliczenia średniego stężenia dla każdego poziomu wzbogacenia, odchylenia standardowego oraz współczynnika zmienności CV%. Przykładowe obliczenia, przeprowadzone zgodnie z wytycznymi Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808, przedstawiono na przykładzie amoksycyliny (**Tabela 40**).

W celu oceny odtwarzalności metody przeprowadzono badania dla każdej procedury badawczej, obejmując wszystkie badane matryce oraz oznaczane antybiotyki. Przeprowadzono trzy serie badań, w których dla każdej serii wykorzystano 18 próbek, po 6 na każdy poziom stężenia. Każda seria była przygotowana z innej próby matrycowej.

Każdorazowo próbki wzbogacano na trzech poziomach stężeń, analogicznie do badania powtarzalności, zgodnie z wytycznymi Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808.

Analizy przeprowadzano w różnych warunkach pomiarowych. W każdej serii badań ekstrakcję antybiotyków wykonywali różni analitycy. Badania przeprowadzono w dłuższym odstępie czasowym, wynoszącym około dwóch tygodni. Wykorzystywano różne urządzenia pomiarowe, takie jak np. wagi. W przypadku oznaczania antybiotyków w mięśniach, nerkach, mleku i jajach zastosowano drugi system LC-MS/MS Xevo TQ, dostępny w pracowni. Do analiz w trzech seriach wykorzystywano również różne partie odczynników.

Uzyskane wyniki wykorzystano do obliczenia średniego stężenia, odchylenia standardowego oraz współczynnika zmienności (CV%). Przykładowe obliczenia, przeprowadzone zgodnie z wytycznymi Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808, przedstawiono w **Tabela 41** na przykładzie amoksycyliny oznaczanej w mleku.

W każdej procedurze badawczej, dla każdej matrycy i związku zbadano także poprawność, czyli zgodność między wartością rzeczywistą (przypisaną), a wartością uzyskaną w wyniku przeprowadzonego badania.

Ze względu na brak dostępności certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM) dla każdego z antybiotyków, analiza CRM nie została przeprowadzona. W tym celu wykorzystano wyniki odzysku uzyskane w badaniu powtarzalności, w których analizowano próbki wzbogacone na różnych poziomach stężeń.

$$\text{Odzysk} = \frac{\text{stężenie oznaczone}}{\text{stężenie dodane}} * 100\%$$

Wyniki otrzymanych stężeń, uwzględnionych w ocenie powtarzalności, były wprowadzane do kart próbek z dodatkiem wzorca (**Tabela 42, Tabela 43, Tabela 44**).

Kryteria akceptowalności współczynnika zmienności (CV) przyjęte w walidacjach na podstawie Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r.[212]

Współczynnik zmienności (CV%) dla analiz przeprowadzanych w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej nie może przekraczać wartości obliczonych na podstawie równania Horwitza [212]:

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad C - \text{ułamek masowy wyrażony jako potęga 10}$$

Jednak dla ułamków masowych poniżej 120 µg/kg równanie Horwitza daje zbyt wysokie wartości, dlatego w Rozporządzeniu przyjęto maksymalne dopuszczalne wartości CV [212] (**Tabela 38**).

Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 określa również kryteria dla współczynnika zmienności (CV) w badaniach prowadzonych w warunkach powtarzalności – jego wartość musi być mniejsza niż 2/3 wartości dopuszczalnej dla odtwarzalności (**Tabela 38**).

Tabela 38. Kryteria akceptowalności współczynnika zmienności

Ułamek masowy	CV % dla powtarzalności	CV % dla odtwarzalności
> 1000 µg/kg	10,6	16
120 µg/kg – 1000 µg/kg	14,6	22
10 µg/kg – 120 µg/kg	16,6*	25*
< 10 µg/kg	20,0*	30*

*wartość ma charakter orientacyjny – należy dążyć do osiągnięcia możliwie jak najniższego poziomu

Źródło: Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 [212]

Kryteria akceptowalności dla poprawności/odzysku przyjęte w walidacjach na podstawie Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r.[212] (Tabela 39)

Tabela 39. Kryteria dla poprawności/odzysku

Ułamek masowy	Odzysk
≤ 1 µg/kg	- 50 % do + 20 %
> 1 µg/kg – 10 µg/kg	- 30 % do + 20 %
≥ 10 µg/kg	-20 % do + 20 %

Źródło: Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 [212]

WALIDACJA I WDROŻENIE

Prezentowany przykład antybiotyku oznaczanego w mleku – amoksycylina – oraz pozostałe antybiotyki we wszystkich walidowanych matrycach spełniły kryteria zarówno dla odtwarzalności, powtarzalności, jak i poprawności (odzysku) na wszystkich badanych poziomach stężeń.

Tabela 40. Karta obliczania powtarzalności

ZHW	KARTA OBLICZANIA POWTARZALNOŚCI										Data:	
	PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH										30.01.2023	
Nr procedury badawczej/norma:				projekt PBC 101.00.00								
Technika analityczna				LC-MS/MS								
Analit:				Amoksycylina								
Matryca:				mleko								
MRL				4 µg/kg								
Poziom wzbogacenia matrycy[µg/kg]												
	2,00 µg/kg	mleko			4,00 µg/kg	mleko			6,00 µg/kg	mleko		
Oznaczone stężenia w kolejnych oznaczeniach[µg/kg]												
Powtórzenia	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	Powtórzenia	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	Powtórzenia	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	
1	1,85	2,03	1,98	1	3,84	3,84	4,03	1	6,05	5,70	5,75	
2	1,94	1,83	1,90	2	3,66	3,89	4,10	2	6,10	6,10	5,85	
3	1,89	1,84	2,05	3	3,95	3,81	4,02	3	5,75	5,92	6,05	
4	1,87	1,88	2,00	4	3,80	3,63	3,99	4	6,07	5,31	5,52	
5	2,01	1,96	2,04	5	3,93	3,93	4,01	5	6,05	5,89	5,97	
6	2,01	2,00	2,02	6	3,98	4,09	3,94	6	5,42	5,68	6,05	
Powtarzalność												
Śr. Stężenie [µg/kg]	1,93	1,92	2,00	Śr. Stężenie [µg/kg]	3,86	3,86	4,02	Śr. Stężenie [µg/kg]	5,91	5,77	5,86	
sr[µg/kg]	0,07	0,09	0,05	sr[µg/kg]	0,12	0,15	0,05	sr[µg/kg]	0,27	0,27	0,20	
CV (%)	3,64	4,54	2,68	CV (%)	3,13	3,89	1,31	CV (%)	4,55	4,71	3,48	
(x sr^2)1/2		0,07				0,12				0,25		
CV od (x sr^2)1/2	3,72%	3,73%	3,59%		2,99%	2,99%	2,87%		4,24%	4,34%	4,27%	
Odzysk (%)	96,28	96,14	99,92	Odzysk (%)	96,43	96,59	100,38	Odzysk (%)	98,46	96,11	97,74	
Badanie wykonał: J.Pacyńska												

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 41. Karta obliczania odtwarzalności

ZHW	KARTA OBLICZANIA ODTWARZALNOŚCI PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH										Data: 07.02.2023											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Nr procedury badawczej/norma:</td> <td>projekt PBC-101.00.00</td> </tr> <tr> <td>Technika analityczna:</td> <td>LC-MS/MS</td> </tr> <tr> <td>Analit:</td> <td>Amoksycylina</td> </tr> <tr> <td>Matryca:</td> <td>mleko</td> </tr> <tr> <td>MRL</td> <td>4 µg/kg</td> </tr> </table>													Nr procedury badawczej/norma:	projekt PBC-101.00.00	Technika analityczna:	LC-MS/MS	Analit:	Amoksycylina	Matryca:	mleko	MRL	4 µg/kg
Nr procedury badawczej/norma:	projekt PBC-101.00.00																					
Technika analityczna:	LC-MS/MS																					
Analit:	Amoksycylina																					
Matryca:	mleko																					
MRL	4 µg/kg																					
Poziom wzbogacenia matrycy[µg/kg]																						
	2,00	µg/kg		4,00	µg/kg		6,00	µg/kg														
Oznaczone stężenia w kolejnych oznaczeniach[µg/kg]																						
Powtórzenia	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	Powtórzenia	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	Powtórzenia	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3											
1	2,01	2,03	1,83	1	4,14	4,17	3,49	1	6,98	6,13	5,24											
2	1,94	2,02	1,78	2	3,76	4,14	3,71	2	6,90	6,61	5,69											
3	1,89	1,92	1,86	3	3,90	3,65	3,20	3	5,57	6,56	5,40											
4	2,17	2,01	1,89	4	4,54	4,23	3,77	4	6,09	6,54	5,65											
5	1,96	2,16	1,53	5	3,81	4,13	3,18	5	6,13	6,78	5,55											
6	1,91	2,06	1,61	6	4,26	3,60	3,73	6	5,81	6,71	5,39											
Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna																						
Śr. Stężenie [µg/kg]	1,92			Śr. Stężenie [µg/kg]	3,86			Śr. Stężenie [µg/kg]	6,10													
sR[µg/kg]	0,16			sR[µg/kg]	0,37			sR[µg/kg]	0,58													
CV (%)	8,57			CV (%)	9,49			CV (%)	9,48													
Odzysk (%)	96,05			Odzysk (%)	96,42			Odzysk (%)	101,59													
Badanie wykonał:	J.Pacyńska J.Chudzicka J.Musiolik																					
	Opracował: J.Pacyńska																					

Załącznik ZHW PO-12.01.06; wydanie 3 z dnia 01.04.2022

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 42. Karta próbek z dodatkiem wzorca – 2 µg/kg

ZHW	KARTA KONTROLNA *** PRÓBEK Z DODATKIEM WZORCA LUB SUBSTANCJI O ZNANEJ ZAWARTOŚCI PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH					NR KARTY ROK	1 2023	
Kierunek badania: amoksycylina Procedura badawcza/norma/instrukcja pracy/akt prawny : Projekt PBC-101.00.00								
L.p.	Data	Nr próbki/ materiał badany	Wartość dodana c ug/kg	Wyniki badania		Wartość uzyskana	Odzysk w %	Osoba wykonująca
				Próbki/ wartość deklaro- wana * $\bar{x}_1$	Próbki wzbogacone/ wartość uzyskana* $\bar{x}_2$			
1	03.01.23	mleko	2,00	0,00	1,85	1,85	92,30	J.Pacyńska
2	"	mleko	2,00	0,00	1,94	1,94	96,95	"
3	"	mleko	2,00	0,00	1,89	1,89	94,25	"
4	"	mleko	2,00	0,00	1,87	1,87	93,45	"
5	"	mleko	2,00	0,00	2,01	2,01	100,40	"
6	"	mleko	2,00	0,00	2,01	2,01	100,30	"
7	04.01.23	mleko	2,00	0,00	2,03	2,03	101,65	J.Pacyńska
8	"	mleko	2,00	0,00	1,83	1,83	91,30	"
9	"	mleko	2,00	0,00	1,84	1,84	91,85	"
10	"	mleko	2,00	0,00	1,88	1,88	94,05	"
11	"	mleko	2,00	0,00	1,96	1,96	97,90	"
12	"	mleko	2,00	0,00	2,00	2,00	100,10	"
13	05.01.23	mleko	2,00	0,00	1,98	1,98	99,00	J.Pacyńska
14	"	mleko	2,00	0,00	1,90	1,90	95,10	"
15	"	mleko	2,00	0,00	2,05	2,05	102,70	"
16	"	mleko	2,00	0,00	2,00	2,00	100,15	"
17	"	mleko	2,00	0,00	2,04	2,04	101,75	"
18	"	mleko	2,00	0,00	2,02	2,02	100,80	"
19								
20								
Średni odzysk:						97,44		
Odchylenie standardowe odzysku:**						3,82		
Uwagi/ Komentarz: wykreślić kartę graficzną, gdy jest to konieczne $\text{Odzysk} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{c} \cdot 100\%$ Opracował: J.Pacyńska * niepotrzebne skreślić ** liczyć tylko, gdy to potrzebne do walidacji metody *** w przypadku wykorzystania karty do walidacji skreślić słowo "kontrolna"								

Załącznik ZHW PO-12.07.04, wydanie 3 z dnia
04.06.2018

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 43. Karta próbek z dodatkiem wzorca – 4 µg/kg

ZHW	KARTA KONTROLNA *** PRÓBEK Z DODATKIEM WZORCA LUB SUBSTANCJI O ZNANEJ ZAWARTOŚCI PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH					NR KARTY ROK	2 2023	
Kierunek badania: amoksycylina Procedura badawcza/norma/instrukcja pracy/akt prawny : Projekt PBC-101.00.00								
L.p.	Data	Nr próbki/ materiał badany	Wartość c ug/kg	Wyniki badania		Wartość uzyskana	Odzysk w %	Osoba wykonująca
				Próbki/ wartość deklaro- wana * $\bar{x}_1$	Próbki wzbogaconej /wartość uzyskana* $\bar{x}_2$			
1	03.01.23	mleko	4,00	0,00	3,84	3,84	95,93	J.Pacyńska
2	"	mleko	4,00	0,00	3,66	3,66	91,40	"
3	"	mleko	4,00	0,00	3,95	3,95	98,73	"
4	"	mleko	4,00	0,00	3,80	3,80	94,88	"
5	"	mleko	4,00	0,00	3,93	3,93	98,30	"
6	"	mleko	4,00	0,00	3,98	3,98	99,38	"
7	04.01.23	mleko	4,00	0,00	3,84	3,84	95,88	J.Pacyńska
8	"	mleko	4,00	0,00	3,89	3,89	97,23	"
9	"	mleko	4,00	0,00	3,81	3,81	95,33	"
10	"	mleko	4,00	0,00	3,63	3,63	90,70	"
11	"	mleko	4,00	0,00	3,93	3,93	98,28	"
12	"	mleko	4,00	0,00	4,09	4,09	102,13	"
13	05.01.23	mleko	4,00	0,00	4,03	4,03	100,68	J.Pacyńska
14	"	mleko	4,00	0,00	4,10	4,10	102,53	"
15	"	mleko	4,00	0,00	4,02	4,02	100,55	"
16	"	mleko	4,00	0,00	3,99	3,99	99,70	"
17	"	mleko	4,00	0,00	4,01	4,01	100,28	"
18	"	mleko	4,00	0,00	3,94	3,94	98,53	"
19								
20								
Średni odzysk:						97,80		
Odchylenie standardowe odzysku:**						3,29		
Uwagi/ Komentarz: wykreślić kartę graficzną, gdy jest to konieczne $\text{Odzysk} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{c} \cdot 100\%$ Opracował: J.Pacyńska								
* niepotrzebne skreślić ** liczyć tylko, gdy to potrzebne do walidacji metody *** w przypadku wykorzystania karty do walidacji skreślić słowo "kontrolna"								

Załącznik ZHW PO-12.07.04, wydanie 3 z dnia
04.06.2018

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 44. Karta próbek z dodatkiem wzorca – 6 µg/kg

ZHW	KARTA KONTROLNA *** PRÓBEK Z DODATKIEM WZORCA LUB SUBSTANCJI O ZNANEJ ZAWARTOŚCI PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH					NR KARTY	3	ROK	2023
Kierunek badania: amoksycylina Procedura badawcza/norma/instrukcja pracy/akt prawny : Projekt PBC-101.00.00									
L.p.	Data	Nr próbki/ materiał badany	Wartość dodana c ug/kg	Wyniki badania		Wartość uzyskana	Odzysk w %	Osoba wykonująca	
				Próbki/ wartość deklaro- wana * $\bar{x}_1$	Próbki wzbogaconej /wartość uzyskana* $\bar{x}_2$				
1	03.01.23	mleko	6,00	0,00	6,05	6,05	100,85	J.Pacyńska	
2	"	mleko	6,00	0,00	6,10	6,10	101,63	"	
3	"	mleko	6,00	0,00	5,75	5,75	95,90	"	
4	"	mleko	6,00	0,00	6,07	6,07	101,20	"	
5	"	mleko	6,00	0,00	6,05	6,05	100,78	"	
6	"	mleko	6,00	0,00	5,42	5,42	90,40	"	
7	04.01.23	mleko	6,00	0,00	5,70	5,70	94,93	J.Pacyńska	
8	"	mleko	6,00	0,00	6,10	6,10	101,68	"	
9	"	mleko	6,00	0,00	5,92	5,92	98,63	"	
10	"	mleko	6,00	0,00	5,31	5,31	88,52	"	
11	"	mleko	6,00	0,00	5,89	5,89	98,18	"	
12	"	mleko	6,00	0,00	5,68	5,68	94,73	"	
13	05.01.23	mleko	6,00	0,00	5,75	5,75	95,78	J.Pacyńska	
14	"	mleko	6,00	0,00	5,85	5,85	97,48	"	
15	"	mleko	6,00	0,00	6,05	6,05	100,75	"	
16	"	mleko	6,00	0,00	5,52	5,52	92,07	"	
17	"	mleko	6,00	0,00	5,97	5,97	99,45	"	
18	"	mleko	6,00	0,00	6,05	6,05	100,88	"	
19									
20									
Średni odzysk:						97,44			
Odchylenie standardowe odzysku:**						4,04			
Uwagi/ Komentarz: wykreślić kartę graficzną, gdy jest to konieczne $\text{Odzysk} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{c} \cdot 100\%$ Opracował: J.Pacyńska * niepotrzebne skreślić ** liczyć tylko, gdy to potrzebne do walidacji metody *** w przypadku wykorzystania karty do walidacji skreślić słowo "kontrolna"									

Załącznik ZHW PO-12.07.04, wydanie 3 z dnia
04.06.2018

6.5. Decyzyjna wartość graniczna – $CC\alpha$

Zoptymalizowane procedury badawcze muszą spełniać wymagania zarówno metod przesiewowych, jak i potwierdzających. W pierwszym etapie badania próbka jest badana metodą przesiewową, której celem jest wykrycie obecności substancji. Jeśli wynik wskazuje na obecność antybiotyku, konieczne jest przeprowadzenie badania potwierdzającego. W tym celu próbka jest badana w dwukrotnym powtórzeniu, a próbki wykorzystywane do krzywej matrycowej są wzbogacane wyłącznie wykrytym antybiotykiem.

Zgodnie z wymogami Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808, obowiązkowym elementem walidacji metod ilościowych potwierdzających jest wyznaczenie decyzyjnej wartości granicznej na potrzeby potwierdzenia – $CC\alpha$.

Decyzyjna wartość graniczna na potrzeby potwierdzenia ($CC\alpha$), jest wartością progową, od której wynik badania z prawdopodobieństwem błędu α uznawany jest za wynik niezgodny. Wartość $1-\alpha$ określa statystyczną pewność, wyrażoną w procentach, że stężenie substancji przekracza ustaloną granicę [212]. Oznacza to, że jeżeli otrzymany wynik jest równy lub przekroczy wartość $CC\alpha$, próbka zawiera oznaczany związek w ilości wykraczającej poza dopuszczalne normy i zostanie uznana za próbkę niezgodną.

Błąd α oznacza ryzyko uznania badanej próbki za niezgodną, podczas gdy faktycznie spełnia ona określone normy [212]. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 precyzuje dopuszczalne wartości tego błędu, które wynoszą maksymalnie 1% dla substancji zakazanych i niedozwolonych oraz 5% dla substancji z ustalonym limitem MRL.

Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 opisuje trzy metody wyznaczania $CC\alpha$, zarówno dla substancji zakazanych, jak i dla substancji objętych limitem. W przypadku walidacji metod oznaczania substancji przeciwbakteryjnych zastosowano pierwszą z wymienionych metod, bazującą na procedurze krzywej wzorcowej zgodnie z normą ISO 11843-1:1997.

W celu obliczenia $CC\alpha$ dla związków niedozwolonych (np. wszystkie antybiotyki oznaczane w miodzie) lub zakazanych (norfloksacyna, kwas nalidyksowy i jozamycyna we wszystkich badanych matrycach) przygotowano próbki na trzech poziomach stężeń (po sześć próbek na każdy poziom). Próbki były fortyfikowane na poziomie LCL

(najniższym skalibrowanym poziomie) oraz powyżej w równych odstępach. Następnie przeprowadzono oznaczenia antybiotyków zgodnie z procedurami badawczymi. Alternatywnie możliwe było wykorzystanie wyników uzyskanych w badaniu odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej, co pozwalało na uniknięcie powielania analiz i zwiększało efektywność procesu.

Na podstawie tych wyników wyznaczono współczynniki: korelacji (R^2), nachylenia (a) oraz przesunięcia (b). Następnie obliczono średni sygnał dla najniższego poziomu ($\bar{y}_{\min}$) oraz odchylenie standardowe $S_{\min}$ dla najniższego poziomu wzbogacenia. Decyzyjną wartość graniczną ($CC\alpha$) obliczono według wzoru:

$$CC\alpha = \frac{2,33 * S_{\min} + \bar{y}_{\min} - b}{a}$$

Obliczenie $CC\alpha$ dla związków niedozwolonych i zakazanych zilustrowano na przykładzie marbofloksacyny w miodzie (**Tabela 45**).

W celu obliczenia $CC\alpha$ dla antybiotyków z wyznaczonym limitem MRL w opracowanych procedurach i dla każdej matrycy przygotowano próbki na dwóch poziomach stężeń (po sześć próbek na każdy poziom), przy czym próbki były fortyfikowane na poziomie MRL oraz powyżej w równych odstępach. Następnie przeprowadzono oznaczenia antybiotyków zgodnie z procedurami badawczymi. Alternatywnie, możliwe było także wykorzystanie wyników uzyskanych w ramach badania odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej, co pozwalało na uniknięcie powielania analiz i zwiększało efektywność procesu.

Na podstawie tych wyników wyznaczono współczynniki: korelacji (R^2), nachylenia (a) oraz przesunięcia (b). Obliczono również średni sygnał dla poziomu stężenia równego MRL ($\bar{y}_{MRL}$) dla każdego poziomu oraz odchylenie standardowe S_{MRL} dla poziomu stężenia równego MRL. Decyzyjną wartość graniczną ($CC\alpha$) obliczono według wzoru:

$$CC\alpha = \frac{1,64 * S_{MRL} + \bar{y}_{MRL} - b}{a}$$

Obliczenie $CC\alpha$ dla związków z wyznaczonym MRL zilustrowano na przykładzie amoksycyliny w mleku (**Tabela 46**).

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 45. Karta obliczania $CC\alpha$ – związki niedozwolone/zakazane

ZHW	KARTY OBLICZANIA $CC\alpha$ NA PODSTAWIE KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ (ZWIĄZKI NIEDOZWOLONE/ZAKAZANE)				Data: 13.05.2022
PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH					
Nr procedury badawczej/norma:		projekt PBC-25.00.00			
Technika analityczna:		LC-MS/MS			
Analit:		Marboflokscyna			
Matryca:		miód			
LCL		2,5 µg/kg			
Sygnały dla poziomu wzbogacenia matrycy [µg/kg]					
Powtórzenia	2,50	5,00	7,50		
1	2,53	5,17	7,63		
2	2,52	5,14	8,11		
3	2,42	4,65	8,06		
4	2,51	5,23	8,04		
5	2,66	5,13	8,28		
6	2,56	4,60	8,21		
Poziom wzbogacenia [µg/kg]	Śr. sygnał	Odtwarzalność CV	s sygnału oparte na CV odtwarzalności	2,33 s	Sygnał + 2,33 s
2,50	2,53	6,80	0,16	0,38	2,92
5,00	4,99	7,54	0,37	0,85	5,84
7,50	8,05	7,61	0,58	1,35	9,40
Krzywa kalibracyjna					
a	1,10	$CC\alpha$ [µg/kg]		2,94	
b	-0,33				
r ²	0,9959				
Badanie wykonał:		Opracował: J.Pacyńska			
Uwagi					

Załącznik ZHW PO-12.01.17, wydanie 5 z dnia 01.04.2022

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 46. Karta obliczania $CC\alpha$ – związku z wyznaczonym MRL

ZHW	LIMIT DECYZYJNY I ZDOLNOŚĆ WYKRYWANIA - WYZNACZANIE METODĄ KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ związki, które mają ustalony maksymalny limit pozostałości MRL				Data: 07.02.2023		
PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH							
Nr procedury badawczej/norma:		projekt PBC-101.00.00					
Technika analityczna:		LC-MS/MS					
Analit:		Amoksylicyna					
Matryca:		mleko					
MRL		4 µg/kg					
Sygnały dla poziomu wzbogacenia matrycy [µg/kg]							
Powtórzenia	2,00	4,00	6,00				
1	2,03	4,17	6,13				
2	2,02	4,14	6,61				
3	1,92	3,65	6,56				
4	2,01	4,23	6,54				
5	2,16	4,13	6,78				
6	2,06	3,60	6,71				
Poziom wzbogacenia [µg/kg]	Średni sygnał	Odtwarzalność CV	s sygnału oparte na CV odtwarzalności	1,64 s	Sygnał + 1,64 s		
2,00	2,03	8,57	0,16	0,27	2,30		
4,00	3,99	9,49	0,37	0,60	4,59		
6,00	6,55	9,48	0,58	0,95	7,50		
Krzywa kalibracyjna							
b	1,13	<table border="1" style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">$CC\alpha$ [µg/kg]</td> <td style="text-align: center;">4,35</td> </tr> </table>				$CC\alpha$ [µg/kg]	4,35
$CC\alpha$ [µg/kg]	4,35						
a	-0,33						
r	0,9969						
r ²	0,9939						
Badanie wykonał:		J.Pacyńska					
Uwagi:		Opracował: J.Pacyńska					

Załącznik ZHW PO-12.01.10, wydanie 5 z dnia 01.04.2022

6.6. Zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych – CC β

Zgodnie z wymogami Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808, obowiązkowym elementem walidacji metod przesiewowych jest wyznaczenie parametru CC β , czyli zdolności wykrywania w badaniach przesiewowych.

Parametr ten określa najmniejszą ilość analitu w próbce, którą można wykryć lub oznaczyć ilościowo w badaniach przesiewowych, uwzględniając ryzyko popełnienia błędu β . W przypadku substancji zakazanych i niedopuszczonych odpowiada najniższemu poziomowi, na którym możliwe jest ich wykrycie lub oznaczenie. Dla substancji dopuszczonych oznacza stężenie poniżej obowiązującego MRL [212].

CC β określono na podstawie analizy 20 próbek ślepych oraz 20 próbek fortyfikowanych na poziomie przesiewowego stężenia docelowego (STC), przy którym wynik badania może klasyfikować próbkę jako niezgodną. Weryfikacja przyjętego poziomu STC miała na celu wykazanie różnicy między sygnałem próbki ślepej a próbki wzbogaconej na poziomie STC. Poziom STC wyznaczono jako połowę wartości MRL dla związków objętych limitem, natomiast dla antybiotyków bez ustalonego MRL na najniższym skalibrowanym poziomie (LCL).

Przeprowadzono badania próbek ślepych oraz fortyfikowanych dla każdej procedury i matrycy. Na podstawie uzyskanych wyników wykonano obliczenia. Obliczono:

- wartość „Threshold” (T), czyli najniższe stężenie analitu, przy którym próbka może zostać sklasyfikowana jako niezgodna [178]

$$T = B + 1,64 \cdot SDb$$

B – średnia wartość sygnału uzyskana dla badanych próbek ślepych

SDb – odchylenie standardowe dla serii próbek ślepych

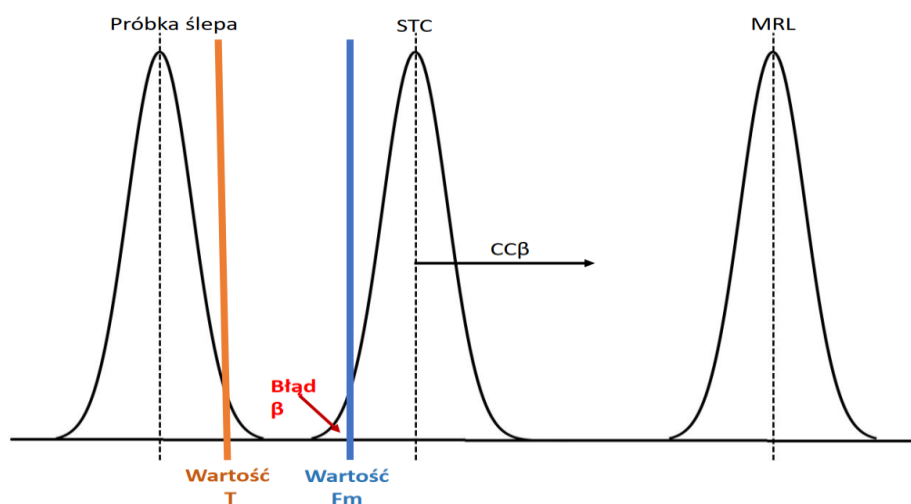
- Wartość „Cut-Off” (Fm), czyli stężenie, które powinno zostać przekroczone przez 95% analizowanych próbek fortyfikowanych [178]

$$Fm = M - 1,64 \cdot SD$$

M – średnia wartość sygnału uzyskana dla badanych próbek fortyfikowanych

SD – odchylenie standardowe dla serii próbek fortyfikowanych na poziomie STC

Rysunek 17 przedstawia graficznie wartości progowe T oraz Fm, które są wykorzystywane do obliczania CC β .



Rysunek 17. Graficzne przedstawienie wartości progowych T i Fm [178]

Po wyliczeniu wartości T oraz Fm dokonano ich porównania. W każdym przypadku wartość Fm była większa od wartości T, co oznacza, że odsetek wyników fałszywie zgodnych był niższy niż 5%, a CC β było mniejsze od stężenia STC. Gdyby jednak wartość Fm była mniejsza od wartości T, oznaczałoby to, że odsetek wyników fałszywie zgodnych przekracza 5%, a CC β przewyższa wartość STC. W takiej sytuacji konieczne byłoby ponowne przeprowadzenie badania, zwiększając poziom fortyfikowania próbek.

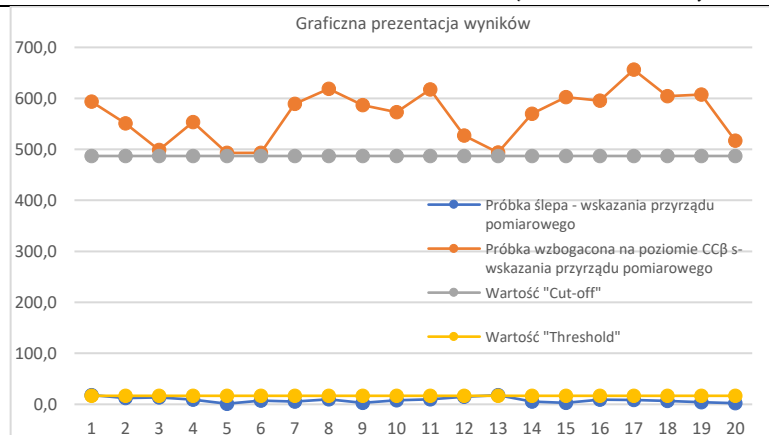
W przeprowadzonych badaniach dla wszystkich oznaczanych antybiotyków w matrycach mięśni, mleka, nerek, miodu i jaj zawsze uzyskiwano wartość Fm wyższą niż T. W związku z tym CC β zostało określone na poziomie założonych przesiewowych stężeń docelowych (STC).

Obliczenie CC β zilustrowano na przykładzie oznaczania amoksycyliny w mleku (Tabela 47).

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 47. Karta obliczania CCβ

ZHW	ZDOLNOŚĆ WYKRYWANIA DO CELÓW PRZESIEWOWYCH PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH		Data: 10.02.2023
Nr procedury badawczej/norma:		projekt PBC-101.00.00	
Technika analityczna		LC-MS/MS	
Analit:		Amoksycyлина	
Matryca:		mleko	
Stężenie próbki wzbogaconej na poziomie STC		2,00	µg/kg
Powtórzenia	Próbka ślepa - wskazania przyrządu pomiarowego	Powtórzenia	Próbka wzbogacona na poziomie CCβ s- wskazania przyrządu pomiarowego
1	18,19	1	593,85
2	12,57	2	551,06
3	13,50	3	498,66
4	9,11	4	553,47
5	1,17	5	493,02
6	7,34	6	493,25
7	5,17	7	589,05
8	9,48	8	618,71
9	2,98	9	586,68
10	8,16	10	572,85
11	9,85	11	617,25
12	15,06	12	527,22
13	18,16	13	493,95
14	5,47	14	570,10
15	3,02	15	602,62
16	9,05	16	595,54
17	8,71	17	656,18
18	6,68	18	604,46
19	3,85	19	607,22
20	2,42	20	517,08
Śr. wskazanie (B)	8,50	Śr. wskazanie (M)	567,11
odch. Stand (SDb)	4,99	odch. Stand (SD)	48,84
CV	58,74	CV	8,61
Wartość "Threshold"		Wartość "Cut-off"	
T= B + 1,64 x SDb		Fm= M-1,64xSD	
16,68		487,01	
Interpretacja wyników			
Walidacja poprawna Fm>T		CCβ = 2,00 µg/kg	
Wykonał: J.Pacyńska		Opracował: J.Pacyńska	
Załącznik ZHW PO-12.01.18 wydanie 3 z dnia 01.04.2022			



6.7. Względny efekt matrycowy

Kolejnym wymaganiem walidacji zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 jest ocena względnego efektu matrycowego. Badanie to pozwala określić, czy składniki matrycy wpływają na oznaczany związek, prowadząc do wzrostu lub obniżenia sygnału analitycznego.

Dla każdej walidowanej matrycy przygotowano 20 różnych próbek ślepych, uwzględniając różne gatunki zwierząt dla mięśni i nerek, różne rodzaje miodów, a także różne partie mleka i jaj. Badania przeprowadzono zgodnie z odpowiednimi procedurami badawczymi, początkowo bez dodatku wzorców oraz wzorca wewnętrznego. Próbkę matrycową wzbogacano odpowiednimi wzorcami i wzorcem wewnętrznym dopiero po ekstrakcji, na wymaganym poziomie MRL lub CC α (dla substancji bez określonego MRL oraz zakazanych). Tak przygotowane próbki poddano analizie chromatograficznej wraz z roztworem wzorcowym o identycznym stężeniu.

Z otrzymanych wyników obliczono względny efekt matrycowy (MF) według wzoru [212]:

$$MF \text{ (wzorzec)} = \frac{\text{powierzchnia piku wzorca MMS}}{\text{powierzchnia piku roztworu wzorcowego}}$$

$$MF \text{ (IS)} = \frac{\text{powierzchnia piku MMS IS}}{\text{powierzchnia piku roztworu IS}}$$

$$MF \text{ (wzorzec znormalizowany dla IS)} = \frac{MF \text{ (wzorzec)}}{MF \text{ (IS)}}$$

MF – względny efekt matrycowy

MMS – wzorzec w ekstrakcji matrycy

MMS IS – wzorzec wewnętrzny w ekstrakcji matrycy

IS – wzorzec wewnętrzny

Według wytycznych z przytoczonego Rozporządzenia obliczony współczynnik zmienności (CV) musi być mniejszy niż 20% dla obliczonego MF (wzorca znormalizowanego dla IS).

Obliczenie względnego efektu matrycowego przedstawiono na przykładzie oznaczania amoksycyliny w mleku (**Tabela 48**).

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 48. Karta oceny względnego efektu matrycowego

ZHW		KARTA OCENY EFEKTU MATRYCY PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH						Data: 13.02.2023		
Nr procedury badawczej/norma:					projekt PBC- 101.00.00					
Technika analityczna:				LC-MS/MS						
Analit:				Amoksylicyna						
Matryca:				mleko						
MRL				4,00 µg/kg						
powierzchnia pików w matrycy wzbogaconej po ekstrakcji		powierzchnia pików IS w matrycy wzbogaconej po ekstrakcji		powierzchnia pików analitu we wzorcu		powierzchnia pików IS we wzorcu				
1	10337	1	2686776	1	9221	1	10769975			
2	9772	2	2828695	2	10805	2	12469975			
3	10274	3	2809066	3	10180	3	10899975			
4	10207	4	2745675	4	9050	4	11589975			
5	10378	5	2785971	5	10221	5	12829975			
6	10389	6	2805045	6	9725	6	11749975			
7	10891	7	2822125	7	9900	7	10999975			
8	10690	8	2751321	8	10050	8	12759975			
9	10619	9	2659054	9	8900	9	9529975			
10	11008	10	2686069	10	10200	10	11879975			
11	10816	11	2732649	11	10100	11	10669975			
12	10918	12	2822852	12	10150	12	12699975			
13	11075	13	2857791	13	9550	13	9929975			
14	10831	14	2797136	14	9750	14	11579975			
15	10614	15	2757470	15	9730	15	11349975			
16	11155	16	2723045	16	10800	16	12999975			
17	10820	17	2780117	17	10080	17	10779975			
18	10974	18	2894698	18	9005	18	11619975			
19	10981	19	2831056	19	10205	19	9999975			
20	11045	20	2823899	20	9150	20	10199975			
MF (wzorzec)			MF (IS)		MF (wzorzec znormalizowany dla IS)				Kalkulacja	
1	1,12	1	0,25	1	4,49	x			4,44	
2	0,90	2	0,23	2	3,99	sd			0,35	
3	1,01	3	0,26	3	3,92	CV			7,81%	
4	1,13	4	0,24	4	4,76					
5	1,02	5	0,22	5	4,68	Wnioski				
6	1,07	6	0,24	6	4,47					
7	1,10	7	0,26	7	4,29	efekt matrycy poniżej 20% - wymagania spełnione				
8	1,06	8	0,22	8	4,93					
9	1,19	9	0,28	9	4,28					
10	1,08	10	0,23	10	4,77					
11	1,07	11	0,26	11	4,18					
12	1,08	12	0,22	12	4,84					
13	1,16	13	0,29	13	4,03					
14	1,11	14	0,24	14	4,60					

WALIDACJA I WDROŻENIE

15	1,09	15	0,24	15	4,49
16	1,03	16	0,21	16	4,93
17	1,07	17	0,26	17	4,16
18	1,22	18	0,25	18	4,89
19	1,08	19	0,28	19	3,80
20	1,21	20	0,28	20	4,36
Badanie wykonał: J.Pacyńska		Opracował:		J.Pacyńska	
Uwagi:					
Załącznik ZHW PO-12.01.24, wydanie 1 z dnia 01.04.2022					

6.8. Odporność

W Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 nie określono metody wyznaczania odporności. Zgodnie z jego wytycznymi, w celu oceny odporności należy wprowadzać jedynie niewielkie zmiany w warunkach analizy i ocenić ich wpływ na wynik.

W Rozporządzeniu 657/2002 [214] zaleca się zastosowanie podejścia Youdena. Metoda ta umożliwia ocenę wpływu siedmiu czynników na wynik analizy poprzez wykonanie ośmiu oznaczeń. W niniejszej pracy zastosowano to podejście do oceny odporności opracowanych procedur badawczych, porównując otrzymane wyniki w różnych warunkach analizy.

Dla każdej procedury wytypowano siedem parametrów, które mogły wpływać na wynik analizy. Następnie przeprowadzono badania zgodnie z procedurami, wprowadzając kombinacje zmienionych parametrów według schematu przedstawionego w **Tabela 49**. Wielkie litery oznaczają niezmienną wartość parametru, natomiast małe litery zmienioną wartość parametru.

Tabela 49. Plan doświadczeń

Parametr	Numer doświadczenia							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Stężenie	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8

Dla procedury oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w tkance, mleku i nerkach w części ekstrakcji acetonitrylem wprowadzono zmiany w następujących parametrach: ilość dodanego MeCN do ekstrakcji (7,8 ml), serię MeCN, temperaturę odparowania (48°C), stężenie roztworu do rozpuszczania (0,022% HFBA), serię kolumny chromatograficznej, stężenie fazy ruchomej A (0,18% HCOOH w wodzie) oraz zmieniono osobę wykonującą badanie. W przypadku procedury z użyciem TCA zmodyfikowano: ilość dodanego TCA (5,8 ml), stężenie roztworu TCA (4,8%), serię TCA, serię filtrów PVDF, serię HFBA, stężenie fazy ruchomej A (0,022% HFBA), serię kolumny chromatograficznej oraz zmieniono osobę wykonującą badanie.

Zmiany w procedurze oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w jajach obejmowały modyfikację następujących parametrów: pH kwasu szczawowego (pH 3,8), ilość dodanego Na₂EDTA (0,4 ml), ilość dodanego MeCN do ekstrakcji (7,8 ml), serię kolumnienek Oasis HLB, temperaturę odparowania (48°C), stężenie roztworu do rozpuszczania (0,022% HFBA) oraz stężenie fazy ruchomej A (0,18% HCOOH w wodzie).

Dla procedury oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w miódach, w pierwszej metodzie ekstrakcji wprowadzono zmiany w następujących parametrach: pH octanu sodu (5,8), stężenie HFBA (0,18 M), seria kolumnienek Strata X, ilość roztworu do elucji (4,8 ml), stężenie HFBA w roztworze do eluowania (MeCN : 0,022 M HFBA), temperatura odparowania (48°C) oraz stężenie roztworu do rozpuszczania (0,022% HFBA). W przypadku drugiej metody ekstrakcji zmieniono stężenie kwasu octowego (1,8%), serię kolumnienek Oasis HLB, ilość roztworu do elucji (4,8 ml), temperaturę odparowania (48°C), stężenie roztworu do rozpuszczania (0,022% HFBA), stężenie fazy ruchomej A (0,022% HFBA), serię kolumny chromatograficznej.

Analizę w różnych kombinacjach przeprowadzono dla 8 serii próbek w dwóch powtórzeniach, wzbogaconych na poziomie MRL lub CC_α. Wyniki analiz posłużyły do przeprowadzenia obliczeń w arkuszu Excel. Wpływ wprowadzonych zmian oceniono na podstawie porównania odchylenia standardowego uzyskanego w badaniu odtwarzalności z odchyleniem standardowym wyznaczonym z przeprowadzonych doświadczeń.

Obliczono wartość $D_{I/i}$ dla każdej kombinacji, czyli różnicę wyników zmiennej I oraz i, poprzez odjęcie średniej z wyników oznaczonych przez wielkie litery od średniej z wyników oznaczonych przez małe litery, według wzoru:

$$D_{I/i} = \frac{W_1 + W_1 + W_1 + W_1}{4} - \frac{W_i + W_i + W_i + W_i}{4}$$

Następnie, na podstawie wszystkich uzyskanych różnic $D_{I/i}$, obliczono odchylenie standardowe $S_{I/i}$ z przeprowadzonych doświadczeń.

$$S_{I/i} = \sqrt{2 * \sum \left(\frac{D_{I/i}^2}{7} \right)}$$

Jeżeli obliczona wartość odchylenia standardowego $S_{I/i}$ z przeprowadzonych doświadczeń przekroczyłaby odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną określoną dla danego antybiotyku w danej procedurze badawczej, wskazywałoby to na istotny wpływ wprowadzonych zmian na wynik analizy. W przeprowadzonych badaniach dla wszystkich antybiotyków uzyskane wartości $S_{I/i}$ były niższe od wyznaczonej odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej.

Jako przykład oceny odporności metody przedstawiono wyniki oznaczania amoksycyliny w mleku (**Tabela 50**).

Tabela 50. Ocena odporności metody

ZHW	KARTA OCENY ODPORNOŚCI METODY PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH				Data: 20.02.2023																																																																																				
Nr procedury badawczej/norma:	projekt PBC-101.00.00																																																																																								
Technika analityczna	LC-MS/MS																																																																																								
Analit:	Amoksycylina																																																																																								
Matryca:	mleko																																																																																								
MRL	4,00 µg/kg																																																																																								
Badany czynnik:																																																																																									
A	MeCN 8 ml	a	MeCN 7,8 ml	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parametr</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A/a</td> <td>A</td> <td>A</td> <td>A</td> <td>A</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> <tr> <td>B/b</td> <td>B</td> <td>B</td> <td>b</td> <td>b</td> <td>B</td> <td>B</td> <td>b</td> <td>b</td> </tr> <tr> <td>C/c</td> <td>C</td> <td>c</td> <td>C</td> <td>c</td> <td>C</td> <td>c</td> <td>C</td> <td>c</td> </tr> <tr> <td>D/d</td> <td>D</td> <td>D</td> <td>d</td> <td>d</td> <td>d</td> <td>d</td> <td>D</td> <td>D</td> </tr> <tr> <td>E/e</td> <td>E</td> <td>e</td> <td>E</td> <td>e</td> <td>e</td> <td>E</td> <td>e</td> <td>E</td> </tr> <tr> <td>F/f</td> <td>F</td> <td>f</td> <td>f</td> <td>F</td> <td>F</td> <td>f</td> <td>f</td> <td>F</td> </tr> <tr> <td>G/g</td> <td>G</td> <td>g</td> <td>g</td> <td>G</td> <td>g</td> <td>G</td> <td>G</td> <td>g</td> </tr> <tr> <td>Stężenie</td> <td>W1</td> <td>W2</td> <td>W3</td> <td>W4</td> <td>W5</td> <td>W6</td> <td>W7</td> <td>W8</td> </tr> </tbody> </table>					Parametr	1	2	3	4	5	6	7	8	A/a	A	A	A	A	a	a	a	a	B/b	B	B	b	b	B	B	b	b	C/c	C	c	C	c	C	c	C	c	D/d	D	D	d	d	d	d	D	D	E/e	E	e	E	e	e	E	e	E	F/f	F	f	f	F	F	f	f	F	G/g	G	g	g	G	g	G	G	g	Stężenie	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8
Parametr	1	2	3	4	5	6	7	8																																																																																	
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a																																																																																	
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b																																																																																	
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c																																																																																	
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D																																																																																	
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E																																																																																	
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F																																																																																	
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g																																																																																	
Stężenie	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8																																																																																	
B	bieżąca seria MeCN	b	inna seria MeCN																																																																																						
C	temp. Odparowywania 45°C	c	temp. Odparowywania 48°C																																																																																						
D	0,025% HFBA	d	0,022% HFBA																																																																																						
E	bieżąca kolumna chromatograficzna	e	inna seria kolumny chromatograficznej																																																																																						
F	faza A (0,2% HCOOH)	f	faza A (0,18% HCOOH)																																																																																						
G	analitik A	g	analitik B																																																																																						
Stężenie analitu z eksperymentów (µg/kg)				Średnia (µg/kg)		Ocena statystyczna wyników																																																																																			
W1	3,85	3,93	3,89		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>D_{I/i}</th> <th>S_{odtw}</th> <th>S_{I/i}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DA/a</td> <td>0,02</td> <td>0,37</td> <td>0,13</td> </tr> <tr> <td>DB/b</td> <td>0,10</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DC/c</td> <td>-0,01</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DD/d</td> <td>-0,07</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DE/e</td> <td>0,17</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DF/f</td> <td>-0,08</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DG/g</td> <td>-0,10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>					D _{I/i}	S _{odtw}	S _{I/i}	DA/a	0,02	0,37	0,13	DB/b	0,10			DC/c	-0,01			DD/d	-0,07			DE/e	0,17			DF/f	-0,08			DG/g	-0,10																																																			
	D _{I/i}	S _{odtw}	S _{I/i}																																																																																						
DA/a	0,02	0,37	0,13																																																																																						
DB/b	0,10																																																																																								
DC/c	-0,01																																																																																								
DD/d	-0,07																																																																																								
DE/e	0,17																																																																																								
DF/f	-0,08																																																																																								
DG/g	-0,10																																																																																								
W2	3,88	3,95	3,92																																																																																						
W3	4,02	4,06	4,04																																																																																						
W4	3,72	3,67	3,70																																																																																						
W5	3,90	3,86	3,88																																																																																						
W6	4,02	4,04	4,03																																																																																						
W7	3,63	3,74	3,68																																																																																						
W8	3,87	3,89	3,88																																																																																						
Uwagi:																																																																																									
Wnioski: zmiany nie mają wpływu na wynik																																																																																									
Badanie wykonał: J.Pacyńska, J.Chudzicka Opracował: J.Pacyńska Załącznik ZHW PO-12.01.14, wydanie 3 z dnia 01.04.2022																																																																																									

6.9. Stabilność

Stabilność związków w matrycach oraz roztworach wzorcowych określa, jak długo pozostają one odporne na degradację podczas przechowywania w odpowiednich warunkach. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 wskazuje, że stabilność analitów nie musi być określana w każdym laboratorium, a do walidacji metod można przyjąć dane dostępne w literaturze naukowej, informacje dostarczane

przez dostawców wzorców (certyfikaty), informacje z Referencyjnych Laboratoriów Unii Europejskiej oraz krajowych laboratoriów.

W niniejszej pracy nie przeprowadzano odrębnych badań stabilności. Oparto się na danych uzyskanych z Państwowego Instytutu Weterynarii – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, Referencyjnego Laboratorium Europejskiego ANSES we Francji [215] oraz dostępnych publikacjach naukowych [216-219] oraz z certyfikatów posiadanych wzorców. Dodatkowo, przed każdą analizą kontroluje się stabilność stosowanych roztworów wzorcowych do fortyfikowania próbek poprzez włączanie ich do każdej serii analiz.

Zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi, stabilność amoksycyliny w roztworze metanol : woda (1:1) została określona w publikacji dotyczącej stabilności antybiotyków [216] i wynosi do 3 miesięcy w temperaturze -18°C . Natomiast badania przeprowadzone przez Gaugain i współpracowników wykazały, że w matrycach biologicznych, takich jak mięśnie przechowywane w temperaturze -18°C , amoksycylina zachowuje stabilność przez 308 dni, a w mleku do 360 dni.

Jednak stabilność różnych antybiotyków w matrycach biologicznych może się znacząco różnić. Przykładem jest stabilność penicyliny G w temperaturze -18°C , która wynosi 18 dni, podobnie jak tylozyny w nerkach. Natomiast w przypadku próbek przechowywanych w temperaturze $4-8^{\circ}\text{C}$, przykładem może być stabilność tilmikozyny w jajach, która jest krótsza niż jeden dzień [217].

W badaniach pozostałości substancji przeciwbakteryjnych przeprowadzanych w Wojewódzkim Inspektoracie Weterynarii w Poznaniu, dąży się do minimalizacji wpływu czynników związanych z przechowywaniem próbek. Oznaczenia wykonywane są tego samego dnia, w którym przeprowadzana jest ekstrakcja, co pozwala na uzyskanie miarodajnych wyników i ograniczenie ryzyka związanego z utratą stabilności oznaczanych antybiotyków.

6.10. Budżet niepewności

Szacowanie niepewności nie jest opisane w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808, ale stanowi wymagania normy ISO/IEC 17025 [181], bazuje na wytycznych zawartych w Przewodniku EUROCHEM/CITAC "Wyrażanie

Niepewności Pomiaru Analitycznego" [220] oraz EA-04/16 Wytycznych EA dotyczących wyrażania niepewności w badaniach ilościowych [221].

Niepewność pomiaru odgrywa kluczową rolę w ocenie miarodajności wyników analitycznych i jej wyznaczenie jest niezbędnym elementem walidacji metod badawczych.

Szacowanie całkowitej niepewności wymaga uwzględnienia wszystkich źródeł niepewności oraz określenia ich wpływu na końcową wartość niepewności pomiarowej. Każdy składnik niepewności jest przedstawiany jako niepewność standardowa $u(x)$ i wyrażony w postaci odchylenia standardowego [213].

Złożona niepewność standardowa $u(y)$ jest sumą wszystkich składników niepewności, wyrażoną jako pierwiastek kwadratowy z ich całkowitej wariancji. Uwzględnia wpływ poszczególnych źródeł niepewności na wynik analizy, co pozwala na dokładniejsze oszacowanie końcowej wartości niepewności pomiarowej [220, 222]. Wyraża ją wzór:

$$u(y) = \sqrt{\sum u(x_i)^2}$$

Niepewność rozszerzona U – określa przedział wartości, w którym z dużym prawdopodobieństwem mieści się rzeczywisty wynik pomiaru. Uwzględnia ona złożoną niepewność standardową pomnożoną przez współczynnik rozszerzenia k , który dla poziomu ufności 95% wynosi 2 [220].

W ramach walidacji procedur badawczych dla każdego oznaczanego antybiotyku opracowano budżet niepewności. Obejmował on szacowanie typu A, czyli ocenę precyzji badania tych samych próbek, analizę błędu systematycznego na podstawie próbek fortyfikowanych. Uwzględniono także szacowanie niepewności wynikającej z kalibracji przyrządu pomiarowego oraz niepewności wynikające ze zmienności między poszczególnymi pomiarami wzorca, wpływu pipety automatycznej, objętości szkła laboratoryjnego, pomiaru masy, oraz niepewność związaną z materiałami odniesienia lub wzorcami.

Wszystkie obliczenia zostały przeprowadzone i zestawione w arkuszach Excel. Dane te posłużyły do opracowania pełnego budżetu niepewności dla każdego oznaczanego związku. Jako przykład przedstawiono budżet niepewności dla oznaczania amoksycyliny w mleku (**Tabela 51**).

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 51. Budżet niepewności

ZHW		BUDŻET NIEPEWNOŚCI POMIARU PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ BADAŃ -		DATA: 20.03.2023
Norma/procedura badawcza:		projekt PBC-101.00.00		
Kierunek badania:		Amoksylicyna		
Opis		wartość x	niepewność standardowa u(x)	względna niepewność standardowa u(x)/x
Precyzja pośrednia jako względne odchylenie standardowe	1. Badania tych samych próbek wielokrotnie	1	0,0217	0,0217
	lub 2. Podwójne testy różnych rodzajów próbek	-	-	-
Dokładność (błąd systematyczny) (Rec)	próbki fortyfikowane	* 0,9802	0,0217	0,0221
precyzja odtwarzalność	badania biegłości/porównania międzylaboratoryjne	-	-	-
Inne		-		
Niepewność wynikająca z kalibracji przyrządu		2,0000	0,0449	0,0224
Niepewność wynikająca ze zmienności między poszczególnymi pomiarami wzorca		0,1151	0,0043	0,0369
Niepewność wynikająca z objętości szkła - kolbki miarowe		10,0000	0,0311	0,0031
Niepewność wynikająca z objętości szkła - pipety miarowe		-	-	-
Niepewność wynikająca z masy		1,0000	0,0006	0,0006
Niepewność związana z materiałami odniesienia lub odczynnikami		98,6000	0,0081	0,0001
Niepewności standardowe pierwiastków		-	-	-
Niepewność wynikająca z pipety automatycznej		200,0000	0,6532	0,0033
Złożona niepewność standardowa $u(y) = \sqrt{u(p)^2 + u(r)^2 + \dots}$		Lub $uc(y) = y \cdot \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \dots}$ $uc(y) = y^{**}$		0,0533
Niepewność rozszerzona U = k · u(y)		U=k · uc(y)		0,1067
* % odzysku podzielony przez 100 ; Dla poziomu ufności 95% K=2				
y^{**} wartość stężenia badanej próbki				
Uwagi/komentarz:				
Opracował: J.Pacyńska				
Załącznik ZHW PO -12.03.11, wydanie 2 z dnia 16.04.2012				

Analiza budżetu niepewności wykazała, że największy wpływ na całkowitą niepewność ma precyzja oznaczeń, dokładność, niepewność związana z kalibracją przyrządu pomiarowego oraz zmienność między poszczególnymi pomiarami wzorca. Jeżeli dany antybiotyk był oznaczany w ramach badań biegłości, ten czynnik również miał istotny wpływ na oszacowaną niepewność. W większości przypadków obliczona niepewność mieściła się w zakresie 10–20%, jednak w przypadku sulfatiazolu w miodzie wyniki badań biegłości przyczyniły się do wzrostu niepewności do 30% (wynik badań biegłości był zadowalający).

6.11. Raport z walidacji

Końcowym i kluczowym dokumentem potwierdzającym proces walidacji oraz skuteczność zastosowanej metody analitycznej jest raport z walidacji. Dokument ten wykazuje, że opracowana procedura badawcza dla danego antybiotyku spełnia wymagania regulacyjne oraz zapewnia precyzyjne, dokładne i powtarzalne wyniki. W przypadku metod stosowanych do oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności, raport walidacyjny musi być zgodny z kryteriami określonymi w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808, a także spełniać wymagania normy ISO/IEC 17025 dotyczącej kompetencji laboratoriów badawczych.

Raport z walidacji zawiera kluczowe informacje dotyczące przeprowadzonego procesu i stanowi potwierdzenie skuteczności opracowanej metody analitycznej. W jego treści uwzględnia się następujące elementy:

- identyfikację procedury badawczej,
- kierunek badania,
- poziom prawny – dla części antybiotyków w zależności od matrycy jest to MRL lub MMPR lub przyjęty poziom dla substancji niedozwolonych lub zakazanych,
- osoby uczestniczące w walidacji,
- zakres roboczy i liniowość metody,
- w przypadku oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w żywności decyzyjną wartość graniczną ($CC\alpha$) i zdolność wykrywania ($CC\beta$),
- charakterystykę krzywej wzorcowej,
- precyzję,

- odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną,
- odzysk (poprawność),
- niepewność rozszerzoną w %,
- ocenę efektu matrycowego,
- ocenę odporności metody.

W ramach każdej procedury badawczej oraz dla każdego oznaczanego w niej antybiotyku, na podstawie przeprowadzonych badań walidacyjnych, opracowano indywidualny raport walidacyjny. Dla procedury oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w mięśniach, mleku i nerkach (projekt procedury PBC-101.00.00) opracowano 58 raportów dla mięśni, 55 dla mleka oraz 57 dla nerek. W przypadku procedury oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w jajach (projekt PBC-106.00.00) opracowano 49 raportów, natomiast dla procedury oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w miodzie (projekt PBC-25.00.00) – 38 raportów walidacyjnych.

Każda procedura badawcza, a także projekt procedury (w przypadku trwającej walidacji), posiada swój kod identyfikacyjny w postaci PBx-00.00.00, gdzie litera oznacza pracownię, a kolejne cyfry odpowiadają numerowi procedury, numerowi załącznika oraz wersji dokumentu. Litera „C” wskazuje na Pracownię Badań Chemicznych. Dzięki takiemu systemowi identyfikacji każda procedura oraz raport walidacyjny mają jednoznaczne oznaczenie, co ułatwia ich przyporządkowanie.

Dla zobrazowania jaki zakres informacji zawiera raport z walidacji, w tabelach (**Tabela 52**, **Tabela 53**), przedstawiono przykładowy raport opracowany dla amoksycyliny oznaczanej w mleku.

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 52. Raport z walidacji strona 1

ZHW	Raport z walidacji/weryfikacji PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH				Strona: 1 Stron: 2
Opis metody					
Procedura badawcza/norma			projekt PBC-101.00.00		
Kierunek badania			Amoksylicyna		
MRL/ML/MMPR/RPA*			4 µg/kg		
Matryca			mleko		
Wypożyczenie pomiarowo-badawcze			Stosowane odczynniki, materiały odniesienia, przyrządy pomiarowe i pomocnicze opisane w procedurze badawczej		
Osoby uczestniczące w walidacji/weryfikacji			Joanna Pacyńska, Jolanta Chudzińska, Justyna Musiolik		
Termin wykonywania badań			Do 31.12.2023		
Metoda akredytowana w zakresie stałym*		Metoda akredytowana w zakresie elastycznym*	Metoda przewidziana do akredytacji w zakresie stałym*	Metoda przewidziana do akredytacji w zakresie elastycznym*	
Walidacja*		Weryfikacja*	Rewalidacja*	Ponowna weryfikacja*	
ELEMENTY WALIDACJI / WERYFIKACJI			WYNIKI		KRYTERIA
Zakres liniowości			1,00-8,00 µg/kg		od ≥ 1,00 µg/kg do ≤ 8,00 µg/kg
Zakres roboczy			2,00-6,00 µg/kg		od CCβ do 1,5 MRL
Granica wykrywalności			-		-
Granica oznaczalności			2,00		= CCβ
Decyzyjna wartość graniczna CCα			4,35		cca>MRL
Zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych CCβ			2,00		ccβ<MRL
Krzywa wzorcowa	Współczynnik korelacji		0,9983		≥0,9899
	b - przecięcie		-0,00494		
	a - nachylenie - czułość		0,0343		
Powtarzalność (%)	wzbogacenie na poziomie 2,00 µg/kg		3,64	4,54	2,68
	wzbogacenie na poziomie 4,00 µg/kg		3,13	3,89	1,31
	wzbogacenie na poziomie 6,00 µg/kg		4,55	4,71	3,48
<20%					

Jeżeli jakiś element nie jest brany do walidacji/weryfikacji w rubryce pustej stawiamy kreskę.

*niepotrzebne skreślić

Załącznik ZHW PO -12.01.22, wydanie 5 z dnia 01.04.2022

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 53. Raport z walidacji strona 2

ZHW	Raport z walidacji/ weryfikacji PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH			Strona:2 Stron:2											
Odtwarzalność wewnętrznlaboratoryjna (%)	wzbogacenie na poziomie 2,00 µg/kg	8,57	<30%												
	wzbogacenie na poziomie 4,00 µg/kg	9,49													
	wzbogacenie na poziomie 6,00 µg/kg	9,48													
Średni odzysk na podstawie próbek fortyfikowanych (%)	Matryca: mleko Wzbogacenie: 2,00 µg/kg	97,4	Średni odzysk % 97,6 ≥70-120%												
	Matryca: mleko Wzbogacenie: 4,00 µg/kg	97,8													
	Matryca: mleko Wzbogacenie: 6,00 µg/kg	97,4													
Inne:	-	-	-												
Badania biegłości/porównania międzylaboratoryjne			-												
Niepewność rozszerzona %			10,7%												
			przyjęto 11 %												
Uwagi 1.efekt matrycy -współczynnik zmienności nie może być większy niż 20% dla MF (wzorca znormalizowanego dla IS). 2.odporność			efekt matrycy poniżej 20% - wymagania spełnione												
			metoda odporna na drobne zmiany parametrów badania												
			Metoda jest właściwa do zamierzonego zastosowania w warunkach laboratoryjnych*												
			Metoda spełnia wyspecyfikowane wymagania*												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;"></td><td style="width: 40%;">Imię i nazwisko</td><td style="width: 40%;">Data</td></tr> <tr> <td>Opracował:</td><td>mgr Joanna Pacyńska</td><td>18.03.2023</td></tr> <tr> <td>Sprawdził:</td><td>mgr Justyna Tomczak</td><td>19.03.2023</td></tr> <tr> <td>Zatwierdził (Kierownik Pracowni)</td><td>mgr Agnieszka Kopydłowska</td><td>20.03.2023</td></tr> </table>					Imię i nazwisko	Data	Opracował:	mgr Joanna Pacyńska	18.03.2023	Sprawdził:	mgr Justyna Tomczak	19.03.2023	Zatwierdził (Kierownik Pracowni)	mgr Agnieszka Kopydłowska	20.03.2023
	Imię i nazwisko	Data													
Opracował:	mgr Joanna Pacyńska	18.03.2023													
Sprawdził:	mgr Justyna Tomczak	19.03.2023													
Zatwierdził (Kierownik Pracowni)	mgr Agnieszka Kopydłowska	20.03.2023													
Jeżeli jakiś element nie jest brany do walidacji/weryfikacji w rubryce pustej stawiamy kreskę. * niepotrzebne skreślić															

Załącznik ZHW PO -12.01.22, wydanie 5 z dnia 01.04.2022

W ramach pracy przeprowadzono pełną walidację trzech projektów procedur badawczych: PBC-101.00.00 (dla mięśni, mleka i nerek), PBC-106.00.00 (dla jaj) oraz PBC-25.00.00 (dla miodu). Łącznie objęto badaniami pięć różnych matryc.

Dla każdego oznaczanego antybiotyku, w każdej z walidowanych matryc spełniono kryteria i wymagania zawarte w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808. Potwierdzono zgodność wszystkich kluczowych parametrów walidacyjnych, takich jak: powtarzalność, odtwarzalność, odzysk (poprawność), CC β oraz CC α . Opracowane procedury badawcze zostały zwalidowane zgodnie z wymaganiami i mogą być wdrożone w rutynowej kontroli pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu.

7. Wdrożenie opracowanych procedur badawczych

Ostatnim etapem po pozytywnym zakończeniu walidacji procedur badawczych było ich formalne wdrożenie do systemu zarządzania jakością obowiązującego w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu.

Projekty procedur badawczych, po pozytywnej ocenie wyników walidacji, zostały zatwierdzone jako obowiązujące procedury przez Kierownika Pracowni – mgr Agnieszkę Kopydłowską. Podstawą do ich zatwierdzenia były raporty z walidacji, które również zostały zatwierdzone przez Kierownika.

Na kolejnych stronach przedstawiono pierwsze strony procedur badawczych opracowanych w ramach niniejszej pracy.

- Procedura PBC-101.00.00 – dla matrycy: mięśnie, mleko i nerki (**Dokument 1**)
- Procedura PBC-106.00.00 – dla matrycy jaj (**Dokument 2**)
- Procedura PBC-25.00.00 – dla matrycy miodów (**Dokument 3**)

Zamieszczone zostały aktualne wersje procedur obowiązujące w momencie pisania pracy. Każda zmiana treści dokumentu wiąże się z nadaniem nowego numeru wydania oraz nową datą jego obowiązywania. Warto zaznaczyć, że procedura PBC-101.00.00 dla mięśni i mleka oraz procedura PBC-106.00.00 zostały pierwotnie zwalidowane zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia (WE) nr 657/2002 (odpowiednio: mięśnie – początek 2020 roku, mleko i jaja – koniec 2020 roku). Po wejściu w życie Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808 konieczne było przeprowadzenie ponownej walidacji zgodnie z nowymi wytycznymi.

Dokument 1. Procedura Badawcza PBC-101.00.00

	Wojewódzki Inspektorat Weterynarii w Poznaniu Zakład Higieny Weterynaryjnej ul. Grunwaldzka 250, 60-166 Poznań tel. 61 868-93-47, fax. 61 868-47-00	PBC- 101.00.00	
	SYSTEM ZARZĄDZANIA	Wydanie: 3	Z dnia : 10.06.2024
Strona: 1 Stron: 18		Egzemplarz : 1	

PROCEDURA BADAWCZA

Za zgodność z oryginałem

podpis *[podpis]* data 09.03.25

Kierownik Pracowni

[podpis]
mgr Agnieszka Kopydłowska

KOD: PBC- 101.00.00

TYTUŁ: Oznaczanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych w tkankach zwierzęcych i produktach spożywczych metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas.

Jest to oficjalny i podlegający ewidencji dokument ZHW
i nie może być zmieniany lub powielany bez zgody wydawcy.

	Imię i Nazwisko	Stanowisko	Data	Podpis
Opracował:	mgr Joanna Pacyńska	Starszy asystent	20.05.2024	<i>[podpis]</i>
Zweryfikował:	mgr Justyna Musiolik	Starszy asystent	24.05.2024	<i>[podpis]</i>
Zatwierdził:	mgr Agnieszka Kopydłowska	Kierownik Pracowni	10.06.2024	<i>[podpis]</i>
Obowiązuje	mgr Agnieszka Kopydłowska	Kierownik Pracowni	10.06.2024	<i>[podpis]</i>

Dokument 2. Procedura Badawcza PBC-106.00.00

	Wojewódzki Inspektorat Weterynarii w Poznaniu Zakład Higieny Weterynaryjnej im. Tadeusza Łosińskiego ul. Grunwaldzka 250, 60-166 Poznań tel. 61 868-93-47, fax. 61 868-47-00	PBC- 106.00.00	
		Wydanie: 3	Z dnia : 09.09.2024
SYSTEM ZARZĄDZANIA		Strona: 1 Stron: 17	Egzemplarz: 1

PROCEDURA BADAWCZA

KOD: PBC- 106.00.00

Za zgodność z oryginałem

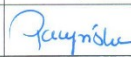
podpis data 09.09.25

Kierownik Pracowni

mgr Agnieszka Kopydłowska

TYTUŁ: Oznaczanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych w jajach metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas

Jest to oficjalny i podlegający ewidencji dokument ZHW
i nie może być zmieniany lub powielany bez zgody wydawcy.

	Imię i Nazwisko	Stanowisko	Data	Podpis
Opracował:	mgr Joanna Pacyńska	Starszy Asystent	19.08.2024	
Zweryfikował:	mgr Katarzyna Piechocka	Asystent	30.08.2024	
Zatwierdził:	mgr Agnieszka Kopydłowska	Kierownik Pracowni	09.09.2024	
Obowiązuje:	mgr Agnieszka Kopydłowska	Kierownik Pracowni	09.09.2024	

Dokument 3. Procedura Badawcza PBC-25.00.00

	Wojewódzki Inspektorat Weterynarii w Poznaniu Zakład Higieny Weterynaryjnej im. Tadeusza Łosinskiego ul. Grunwaldzka 250, 60-166 Poznań tel. 61 868-93-47, fax. 61 868-47-00	PBC- 25.00.00	
	SYSTEM ZARZĄDZANIA	Wydanie: 1	Z dnia : 11.07.2022
		Strona: 1 Stron: 15	Egzemplarz : 1

PROCEDURA BADAWCZA

Za zgodność z oryginałem

podpisano: data: 03.07.25

Kierownik Pracowni

mgr Agnieszka Kopydłowska

KOD: PBC-25.00.00

TYTUŁ: Oznaczanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych w miodzie metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas

Jest to oficjalny i podlegający ewidencji dokument ZHW i nie może być zmieniany lub powielany bez zgody wydawcy.

	Imię i Nazwisko	Stanowisko	Data	Podpis
Opracował:	mgr Joanna Pacyńska	Asystent	20.06.2022	
Zweryfikował:	mgr Katarzyna Piechocka	Asystent	24.06.2022	
Zatwierdził:	mgr Agnieszka Kopydłowska	Kierownik Pracowni	11.07.2022	
Obowiązuje:	mgr Agnieszka Kopydłowska	Kierownik Pracowni	11.07.2022	

Kolejnym krokiem było zgłoszenie procedur badawczych do wprowadzenia na „Listę akredytowanych działań prowadzonych w ramach zakresu elastycznego”. Lista ta, opracowywana przez asystenta wiodącego, jest następnie zatwierdzana przez Kierownika Pracowni i stanowi załącznik do aktualnego Zakresu Akredytacji nr AB 465. Dzięki posiadaniu elastycznego zakresu akredytacji możliwe było wprowadzenie nowych procedur bez konieczności każdorazowego zatwierdzania ich przez Polskie Centrum Akredytacji (PCA). Obecnie na liście akredytowanych działań znajdują się procedury: PBC-101.00.00 dla matryc mięśni i mleka, PBC-106.00.00 dla jaj oraz PBC-25.00.00 dla miodu.

Dodatkowo, aby procedura mogła zostać w pełni wdrożona do badań urzędowych, konieczne było potwierdzenie jej skuteczności w badaniach biegłości organizowanych przez Laboratorium Referencyjne w Puławach lub poprzez audyt przeprowadzony przez to laboratorium. W ramach czteroletniego cyklu akredytacji laboratorium jest również zobowiązane do co najmniej dwukrotnego udziału w badaniach biegłości dotyczących danej procedury badawczej.

Następnie, zgodnie z obowiązującym prawem, Główny Lekarz Weterynarii wyznacza laboratorium do przeprowadzania badań urzędowych w określonym zakresie kierunków i metod.

Od 2020 roku do chwili obecnej w laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu brano udział w kilku badaniach biegłości dotyczących opracowanych procedur oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych.

W 2020 roku przeprowadzono badanie biegłości organizowane przez Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach w zakresie oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mięśniach. Oznaczono antybiotyk z grupy makrolidów – tilmikozynę. Wynik badania został oceniony jako zadowalający.

W 2021 roku przeprowadzono kolejne badania biegłości, których raporty opublikowano w marcu 2022 roku. Organizowane były również przez Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach i dotyczyły oznaczania pozostałości antybiotyków w mleku. Ilościowo oznaczono dwa związki: cefalonium oraz dihydrostreptomycynę. Uzyskane wyniki zostały ocenione jako zadowalające.

W 2022 roku wzięto udział w badaniu biegłości dotyczącym oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w miodzie, organizowanym przez Państwowy Instytut Weterynarii – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach. Oznaczono sulfatiazol oraz doksyceklinę. Wyniki badania zostały ocenione jako zadowalające. Badania odbyły się w trakcie trwania walidacji, dlatego ich wyniki zostały ujęte w walidacji.

W 2023 roku uczestniczono w badaniu biegłości zorganizowanym przez laboratorium referencyjne w Puławach, dotyczącym oznaczania pozostałości antybiotyków w jajach. Oznaczono tetracyklinę oraz enrofloksacynę – oba wyniki uznano za zadowalające.

W 2024 roku wzięto udział w dwóch badaniach biegłości dotyczących oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mięśniach oraz mleku. Badanie dla matrycy mięśni zorganizowane zostały ponownie przez laboratorium referencyjne w Puławach. Oznaczono ilościowo dihydrostreptomycynę oraz sulfametoksazol. Wyniki badania zostały ocenione jako zadowalające.

Drugie badanie, dotyczące oznaczania antybiotyków w mleku, zostało zakupione celowo od niemieckiej firmy DRRR (Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien), która posiada akredytację zgodną z normą ISO/IEC 17043. Wybór tego badania wynikał z konieczności spełnienia wymagań Polskiego Centrum Akredytacji, zgodnie z którymi organizatorzy badań biegłości muszą posiadać odpowiednią akredytację. W ramach badania oznaczono tetracyklinę, a uzyskany wynik został oceniony jako zadowalający.

Opracowane procedury badawcze były wielokrotnie sprawdzane podczas audytów wewnętrznych prowadzonych przez wykwalifikowany personel, a także podczas audytów zewnętrznych, w tym przeprowadzanych przez PCA oraz Państwowy Instytut Weterynarii – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, który szczególną uwagę zwrócił na procedurę PBC-101.00.00 oraz PBC-106.00.00. Zakres audytu obejmował ocenę dokumentacji walidacyjnej, sposób prowadzenia rutynowych badań oraz monitorowanie ważności wyników badań. Przeprowadzone audyty nie wykazały niezgodności i spostrzeżeń, co potwierdza, że opracowane procedury są odpowiednie do zamierzonego celu.

W lutym 2023 roku odbył się również audyt Komisji Europejskiej w Polsce, który dotyczył kontroli pozostałości i zanieczyszczeń w żywności. Audyt objął także Wojewódzki Inspektorat Weterynarii w Poznaniu, gdzie szczegółowo oceniono proces walidacji metod potwierdzających oraz dokumentację sprawozdań z badań. Kontroli poddano m.in. procedurę PBC-101.00.00 oraz PBC-25.00.00. Audytorzy skupili się szczególnie na wynikach dodatnich dla mleka, w którym stwierdzono przekroczenie MRL dla tetracykliny, a także na wynikach dotyczących oznaczenia antybiotyków w mięśniach procedurą PBC-101.00.00. Dodatkowo przeanalizowano dokumentację walidacyjną opracowaną dla matrycy miodu. Audyt nie wykazał żadnych nieprawidłowości, natomiast podkreślono konieczność przeprowadzenia ponownych walidacji zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808 do końca 2025 roku.

Uzyskane zadowalające wyniki badań biegłości potwierdzają prawidłowość opracowanych procedur badawczych. Stanowią one również istotny element dokumentacji wymaganej zarówno przy ubieganiu się o akredytację, jak i podczas corocznych audytów PCA oraz przy zatwierdzaniu metod do stosowania w badaniach. Podczas tych wizyt pozytywnie oceniono nie tylko raporty z walidacji, ale również prawidłowe prowadzenie badań rutynowych, co świadczy o prawidłowym wdrożeniu opracowanych procedur badawczych do rutynowej pracy w laboratorium.

W aneksie przedstawiono certyfikat akredytacji (**Dokument 4**), zakres akredytacji (**Dokument 5**) oraz fragment listy akredytowanych działań dla Pracowni Badań Chemicznych, obejmujący procedury badawcze opisane w niniejszej pracy (**Dokument 6**). Przedstawione dokumenty obowiązują w dniu przygotowywania niniejszej pracy. Dokumenty te potwierdzają wdrożenie procedur badawczych do systemu jakości i ich stosowania w badaniach urzędowych, które zgodnie z obowiązującymi przepisami [223] muszą być objęte akredytacją.

Obecnie analizy nerek nie zostały jeszcze wprowadzone na listę akredytowanych działań w ramach analiz chemicznych, ponieważ w obowiązującym monitoringu urzędowym są one objęte jedynie badaniami mikrobiologicznymi. W przypadku uzyskania wyniku dodatniego, próbki przekazywane są do badań potwierdzających do Państwowego Instytutu Weterynarii – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Po pozytywnym udziale w badaniach biegłości i wyznaczeniu przez

Głównego Lekarza Weterynarii możliwe będzie wprowadzenie nerek do zakresu akredytacji. Przewidywany termin to monitoring próbek od 2026 roku.

8. Badania rutynowe próbek rzeczywistych w latach 2020-2024

Po wdrożeniu procedur badawczych rozpoczęto rutynowe oznaczenia pozostałości antybiotyków w próbkach rzeczywistych dostarczanych do laboratorium. Badane były próbki pochodzące z różnych źródeł: próbki urzędowe (monitoringowe) w ramach Krajowego Planu Monitoringowego, próbki z importu, próbki kierowane do badania potwierdzającego ilościowego po dodatnim wyniku badania jakościowego przeprowadzonego w Pracowni Badań Mikrobiologicznych w Poznaniu, oraz próbki usługowe.

Najliczniejszą liczbę próbek stanowiły próbki monitoringowe, które pochodziły z kilku województw:

- Wielkopolskie
- Zachodniopomorskie
- Lubuskie
- Kujawsko-Pomorskie
- Pomorskie

Liczba badanych próbek w poszczególnych województwach była różna i zależała m.in. od liczby zwierząt hodowlanych, rzeźni i zakładów przetwórczych w danym województwie. Probki pobierane były przez inspektorów według rocznego planu pobierania próbek i dostarczane do laboratorium w odpowiedniej temperaturze, zabezpieczone (koperty bezpieczne, plomby), w ciągu maksymalnie 7 dni od pobrania. Probki były przekazywane wraz ze zleceniem badań, w którym określono kierunki oznaczeń. Z uwagi na obowiązującą zasadę bezstronności, zlecenia nie zawierały informacji o miejscu pobrania. Zamieszczano w nich jedynie podstawowe dane, takie jak: kierunek badania, rodzaj matrycy, rodzaj zwierzęcia, identyfikator zwierzęcia, datę pobrania czy sposób zabezpieczenia próbki.

Próbkami przekazywanymi do badań potwierdzających po badaniach jakościowych, wykonywanych w Pracowni Badań Mikrobiologicznych, były przede wszystkim próbki mleka, mięśni oraz jaj. Pracownia mikrobiologiczna nie wykonuje

badan przesiewowych dla miodu. Przebadano próbki mleka, w których w badaniu przesiewowym wykryto obecność antybiotyków z grupy tetracyklin. W przypadku mięśni najczęściej zgłaszano wykrycie β -laktamów, fluorochinolonów oraz tetracyklin, natomiast w próbkach jaj fluorochinolonów. Po badaniach mikrobiologicznych analizie poddano również próbki nerek, mimo że matryca ta nie została jeszcze formalnie wprowadzona do zakresu akredytacji. Jedna część próbek została przekazana do badań potwierdzających w Laboratorium w Puławach, natomiast druga do Pracowni Badań Chemicznych w celu weryfikacji opracowanej procedury oznaczania antybiotyków w nerkach.

W latach 2020–2024, w ramach procedur badawczych opisanych w niniejszej pracy, przeprowadzono oznaczenia pozostałości antybiotyków w rzeczywistych próbkach dostarczanych do badań. W rozpatrywanym okresie najwięcej badań wykonano dla tkanki mięśniowej (84%), co wynika z jej dominującego udziału w Krajowym Planie Monitoringowym.

Tabela 54 przedstawia dane liczbowe dotyczące przebadanych próbek. We wszystkich rozpatrywanych latach mięśnie stanowiły największy odsetek badanych matryc. Oprócz tkanki mięśniowej badano również próbki jaj, mleka i miodu, a także niewielką liczbę próbek nerek, które nie zostały jeszcze formalnie wprowadzone do zakresu akredytacji. Największą liczbę próbek przebadano w 2023 roku, co było związane ze zwiększonym zakresem monitoringu pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Tabela 54. Liczba próbek przebadanych w latach 2020-2024

Matryca	2020	2021	2022	2023	2024	Suma
Mięśnie	1095	1173	1195	1535	1061	6059
Mleko	24	50	62	104	54	294
Jaja	52	165	162	176	122	677
Miód	0	0	45	83	72	200
Nerki	0	0	5	7	4	16
Suma	1171	1388	1469	1905	1313	7246

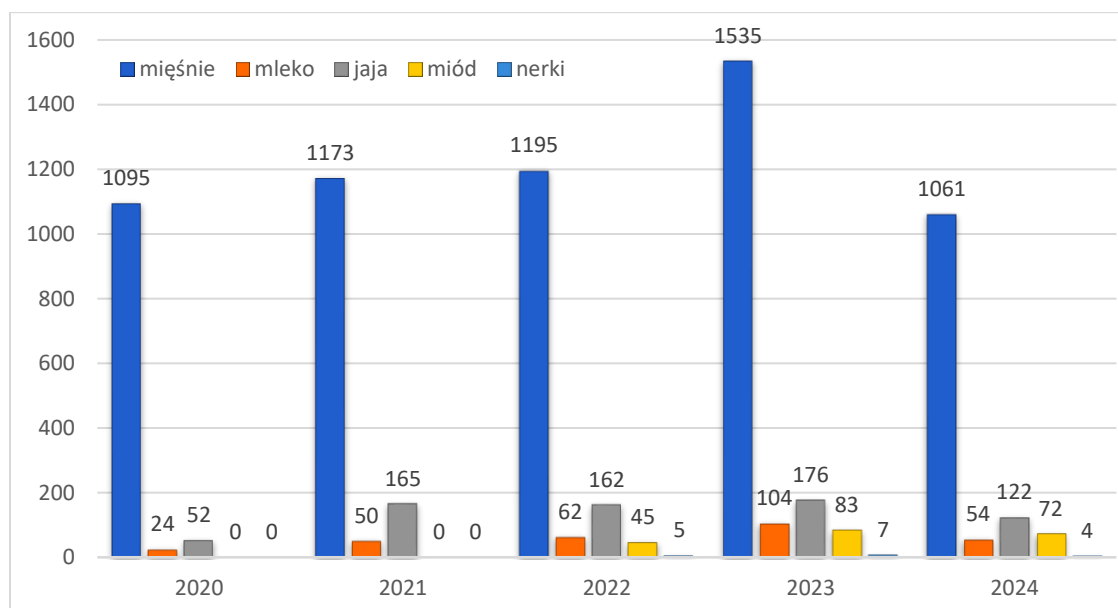
Łącznie w latach 2020–2024 przebadano 7 246 próbek rzeczywistych, z czego:

- 6059 próbek mięśni,

- 294 próbki mleka,
- 677 próbek jaj,
- 200 próbek miodu,
- 16 próbek nerek.

Na poniższym wykresie (**Wykres 9**) zaprezentowano rozkład liczby próbek dla każdej matrycy w poszczególnych latach:

Wykres 9. Liczba próbek badanych w latach 2020-2024



8.1. Próbkę tkanki mięśniowej

Opracowano szczegółową analizę badań próbek mięśni, które stanowiły największy odsetek wszystkich badanych matryc. Dane zestawiono w tabelach: **Tabela 55, Tabela 56, Tabela 57, Tabela 58, Tabela 59**. Dla każdego roku przygotowano osobną tabelę zawierającą liczbę próbek, ich pochodzenie (województwo, próbki z importu lub próbki po badaniach mikrobiologicznych), gatunek zwierzęcia oraz informacje o niezgodnościach, w których wykryto pozostałości substancji przeciwbakteryjnych przekraczające obowiązujące limity. Taka analiza pozwala lepiej zobrazować skalę badań oraz określić, w jakich przypadkach najczęściej dochodziło do przekroczeń dopuszczalnych poziomów.

W 2020 roku (**Tabela 55**) najwięcej próbek mięśni pochodziło z województwa wielkopolskiego. Dominowały próbki mięsa kurcząt, świń i bydła. W badaniach

uwzględniono również próbki z województw zachodniopomorskiego i lubuskiego oraz próbki po jakościowych badaniach mikrobiologicznych, gdzie stwierdzono obecność antybiotyków (próbki z województwa wielkopolskiego), jednak w badaniu ilościowym potwierdzającym wszystkie okazały się zgodne z obowiązującymi normami.

W 2020 roku stwierdzono 3 niezgodne próbki pochodzące z województwa wielkopolskiego. W mięśniach bydła oznaczono tylnikozynę (64 ± 7) $\mu\text{g/kg}$ – MRL wynosi 50 $\mu\text{g/kg}$. W mięśniach kurzych oznaczono doksykynę (124 ± 12) $\mu\text{g/kg}$ – MRL wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$. Natomiast w mięśniach świni oznaczono enrofloksacynę oraz ciprofloksacynę, których suma równa (162 ± 21) $\mu\text{g/kg}$ przekroczyła dopuszczalny poziom – MRL dla sumy enrofloksacyny i ciprofloksacyny wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$.

Tabela 55. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2020 roku

Rok	Województwo	Gatunek	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych
2020	Wielkopolska	bydło	235	1	859	3
		kurczęta	318	1		
		świnie	237	1		
		gęsi	5	0		
		indyki	27	0		
		kaczki	17	0		
		konie	5	0		
		króliki	13	0		
		ryby	2	0		
	Zachodniopomorskie	bydło	2	0	169	
		kurczęta	93	0		
		świnie	72	0		
		ryby	2	0		
	Lubuskie	kurczęta	25	0	63	
		świnie	10	0		
		daniele	2	0		
		indyki	23	0		
		jelenie	2	0		
		ryby	1	0		
próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska		bydło	4	0	4	

W 2021 roku (Tabela 56) również najwięcej próbek mięśni pochodziło z województwa wielkopolskiego. W badaniach uwzględniono także próbki dostarczone z województw zachodniopomorskiego i lubuskiego, próbki po jakościowych badaniach mikrobiologicznych (województwo wielkopolskie) oraz próbki z importu.

W 2021 roku stwierdzono 3 niezgodne próbki pochodzące z województwa wielkopolskiego – dwie próbki mięśni świń oraz jedną próbkę mięśni królika. W obu próbkach mięśni wieprzowych wykryto chlorotetracyklinę oraz 4-epichlorotetracyklinę. Dla sumy tych związków obowiązuje limit MRL wynoszący 100 µg/kg. W pierwszej próbce oznaczono (138 ± 14) µg/kg chlorotetracykliny i (68 ± 7) µg/kg 4-epichlorotetracykliny, natomiast w drugiej wartości (138 ± 14) µg/kg chlorotetracykliny i (74 ± 7) µg/kg 4-epichlorotetracykliny. W mięśniach królika oznaczono tulatromycynę w ilości (2540 ± 381) µg/kg – brak limitu MRL, wynik powyżej wyznaczonego CC α (27 µg/kg) uznawany jest za próbkę dodatnią.

Tabela 56. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2021 roku

Rok	Województwo	Gatunek	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych	
2021	Wielkopolska	bydło	255	0	915	3	
		kurczęta	338	0			
		świnie	244	2			
		gęsi	6	0			
		indyki	31	0			
		kaczki	18	0			
		konie	6	0			
		króliki	15	1			
		ryby	2	0			
	Zachodniopomorskie	bydło	3	0	170		
		kurczęta	99	0			
		świnie	66	0			
		ryby	2	0			
	Lubuskie	kurczęta	25	0	63		
		świnie	7	0			
		indyki	26	0			
		jelenie	4	0			
		ryby	1	0			
	import	świnie	11	0	12		
		kurczęta	1	0			
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	bydło	8	0	13		
		świnie	5	0			

W 2022 roku (**Tabela 57**) ilość próbek kształtowała się na tym samym poziomie, co w poprzednim roku. W badaniach uwzględniono próbki dostarczone z województw wielkopolskiego, zachodniopomorskiego i lubuskiego, próbki po jakościowych badaniach mikrobiologicznych (województwo wielkopolskie) oraz próbki z importu.

W 2022 roku stwierdzono 2 niezgodne próbki pochodzące z województwa wielkopolskiego – dwie próbki mięśni bydła. W pierwszej próbce oznaczono ilościowo enrofloksacynę oraz ciprofloksacynę, których suma równa (163 ± 21) $\mu\text{g/kg}$ przekroczyła dopuszczalny poziom – MRL dla sumy enrofloksacyny i ciprofloksacyny wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$. Druga niezgodna próbka była pierwotnie badana metodą jakościową mikrobiologiczną, w której wykryto obecność antybiotyków z grupy tetracyklin. Badanie potwierdzające przeprowadzone według procedury PBC-101.00.00 potwierdziło obecność tetracyklin – oznaczono ilościowo doksycyklinę (148 ± 15) $\mu\text{g/kg}$ – MRL dla doksycykliny w mięśniach bydlęcych wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$.

Tabela 57. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2022 roku

Rok	Województwo	Gatunek	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych
2022	Wielkopolska	bydło	272	1	943	2
		kurczęta	361	0		
		świnie	230	0		
		gęsi	7	0		
		indyki	30	0		
		kaczki	17	0		
		konie	6	0		
		króliki	18	0		
		ryby	2	0		
	Zachodniopomorskie	bydło	2	0	180	
		kurczęta	114	0		
		świnie	61	0		
		ryby	3	0		
	Lubuskie	kurczęta	24	0	58	
		świnie	6	0		
		indyki	24	0		
		jelenie	3	0		
		ryby	1	0		
	import	świnie	8	0	9	
		ryby	1	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	bydło	3	1	5	
		świnie	2	0		

W 2023 roku (**Tabela 58**) ilość próbek znacząco się zwiększyła. W badaniach uwzględniono próbki dostarczone z tych samych województw co w poprzednich latach, próbki po badaniach mikrobiologicznych (województwo wielkopolskie) oraz próbki pochodzące z importu.

W 2023 roku stwierdzono łącznie 5 próbek niezgodnych. Trzy z nich pochodziły od bydła, jedna od kurcząt, a jedna od konia – wszystkie pobrane były w województwie wielkopolskim. W dwóch mięśniach bydła oznaczono ilościowo enrofloksacynę oraz ciprofloksacynę, których suma wyniosła dla jednej próbki (231 ± 30) $\mu\text{g/kg}$, dla drugiej (426 ± 55) $\mu\text{g/kg}$ – MRL dla sumy enrofloksacyny i ciprofloksacyny wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$. W trzeciej próbce oznaczono amoksycylinę (62 ± 7) $\mu\text{g/kg}$ – MRL wynosi 50 $\mu\text{g/kg}$. Amoksycylinę oznaczono ilościowo również w mięśniach kurcząt w ilości (85 ± 9) $\mu\text{g/kg}$. Natomiast w mięśniach konia oznaczono ilościowo tulatromycynę (37 ± 6) $\mu\text{g/kg}$, dla którego nie wyznaczono MRL. Wynik dla próbki powyżej wyznaczonego w walidacji CC α (27 $\mu\text{g/kg}$) uznawany jest za wynik niezgodny.

Tabela 58. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2023 roku

Rok	Województwo	Gatunek	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych
2023	Wielkopolska	bydło	335	3	1282	5
		kurczęta	568	1		
		świnie	255	0		
		gęsi	9	0		
		indyki	40	0		
		kaczki	36	0		
		konie	9	1		
		króliki	27	0		
		ryby	3	0		
	Zachodniopomorskie	bydło	5	0	162	
		kurczęta	121	0		
		świnie	33	0		
		ryby	3	0		
	Lubuskie	kurczęta	36	0	83	
		świnie	6	0		
		indyki	37	0		
		ryby	4	0		
	import	ryby	2	0	2	
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	bydło	4	0	6	
świnie		2	0			

W 2024 roku (**Tabela 59**) po raz pierwszy dostarczono także próbki z województw kujawsko-pomorskiego i pomorskiego.

W 2024 roku stwierdzono 3 niezgodne próbki pochodzące z województwa wielkopolskiego – 1 próbkę mięśni od bydła oraz 2 próbki mięśni od kurcząt. W próbce

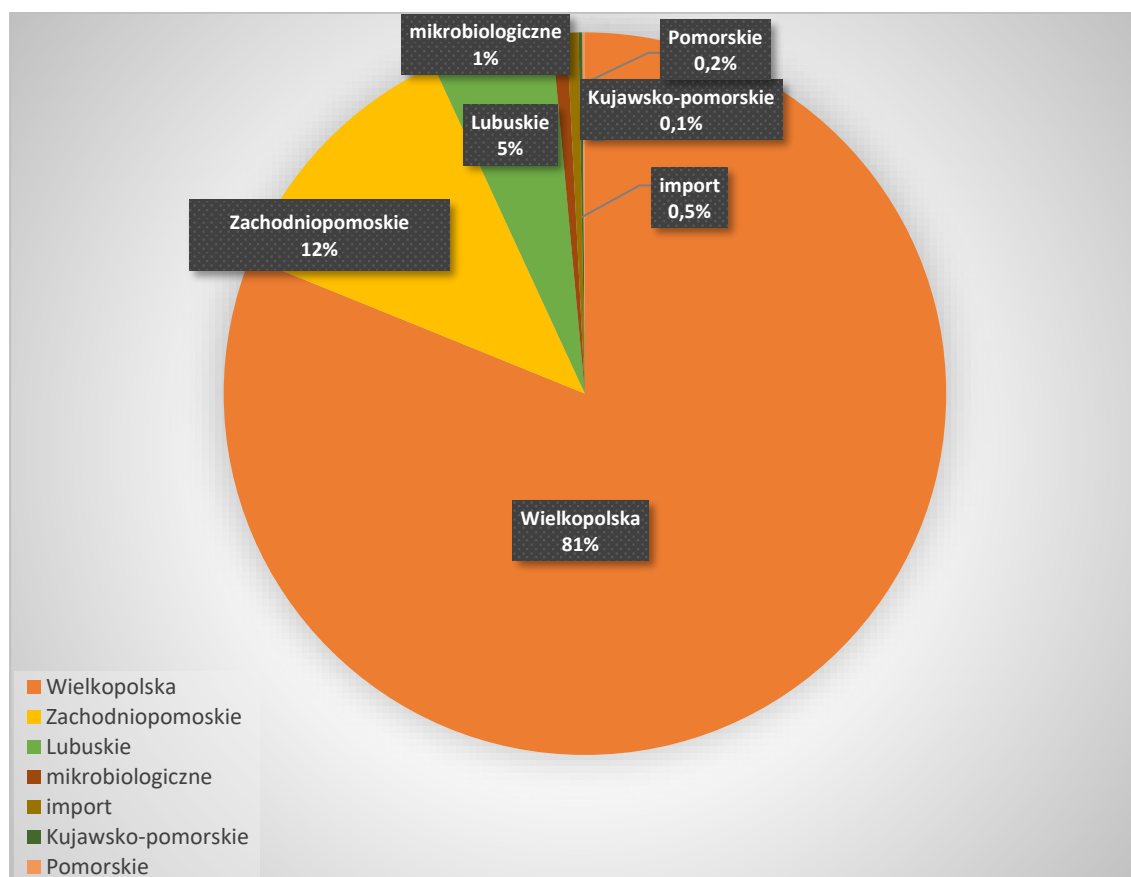
mięsa bydła wykryto obecność enrofloksacyny oraz ciprofloksacyny, których suma wyniosła (372 ± 48) $\mu\text{g/kg}$ – MRL dla sumy enrofloksacyny i ciprofloksacyny wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$. Natomiast 2 próbki mięśni kurcząt zostały przekazane do badań potwierdzających po wcześniejszym wykryciu antybiotyków metodą mikrobiologiczną. W badaniu ilościowym oznaczono w nich doksycyklinę w ilościach (122 ± 12) $\mu\text{g/kg}$ oraz (150 ± 15) $\mu\text{g/kg}$ – MRL dla doksycykliny w mięśniach kurcząt wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$.

Tabela 59. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2024 roku

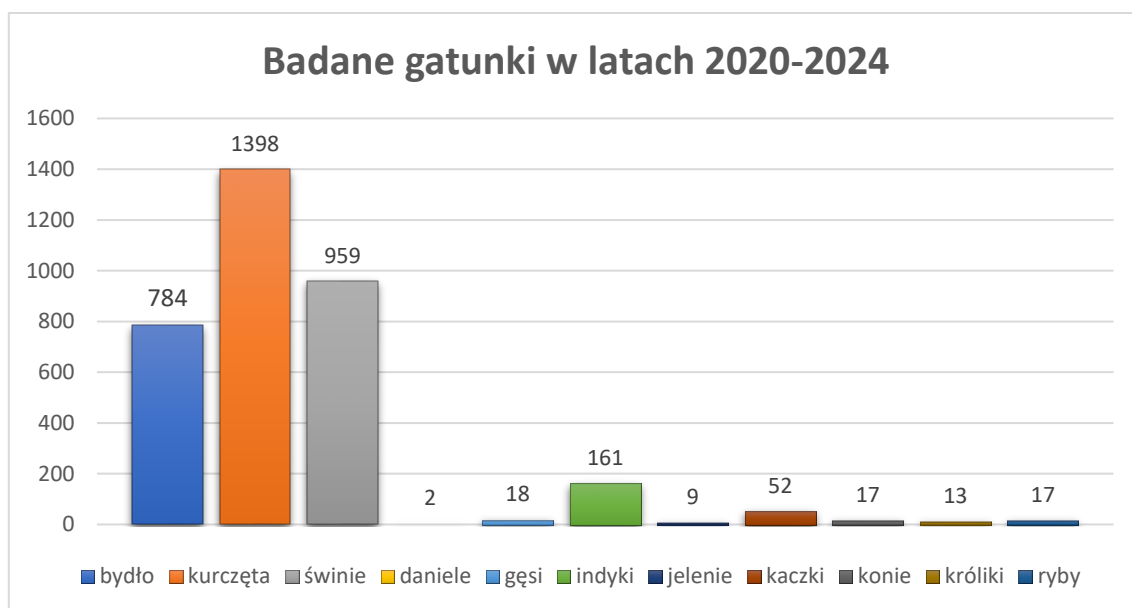
Rok	Województwo	Gatunki	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych
2024	Wielkopolska	bydło	211	1	917	3
		kurczęta	462	0		
		świnie	146	0		
		gęsi	9	0		
		indyki	36	0		
		kaczki	24	0		
		konie	5	0		
		króliki	19	0		
		ryby	5	0		
	Zachodniopomorskie	bydło	4	0	45	
		kurczęta	32	0		
		świnie	5	0		
		indyki	1	0		
		ryby	3	0		
	Lubuskie	kurczęta	28	0	61	
		świnie	3	0		
		daniele	1	0		
		indyki	26	0		
		ryby	3	0		
	Kujawsko-Pomorskie	ryby	4	0	10	
		indyki	6	0		
	Pomorskie	ryby	5	0	7	
		bydło	2	0		
	import	ryby	6	0	9	
		bydło	3	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	bydło	7	0	12	
		kurczęta	2	2		
		świnie	3	0		

Na wykresie (**Wykres 10**) przedstawiono wizualizację pochodzenia próbek mięśni w latach 2020–2024, z podziałem na województwa lub źródła ich pochodzenia. Graficzne przedstawienie danych pozwala łatwiej dostrzec, które regiony dominowały pod względem liczby dostarczanych próbek. Kolejny wykres (**Wykres 11**) prezentuje liczbę przebadanych próbek mięśni poszczególnych gatunków zwierząt w analizowanym okresie. Na jego podstawie można zauważyć, że najczęściej badano mięśnie kurcząt, świń oraz bydła. Stanowią one największy udział we wszystkich analizowanych próbkach.

Wykres 10. Udział procentowy próbek mięśni według pochodzenia (2020–2024)

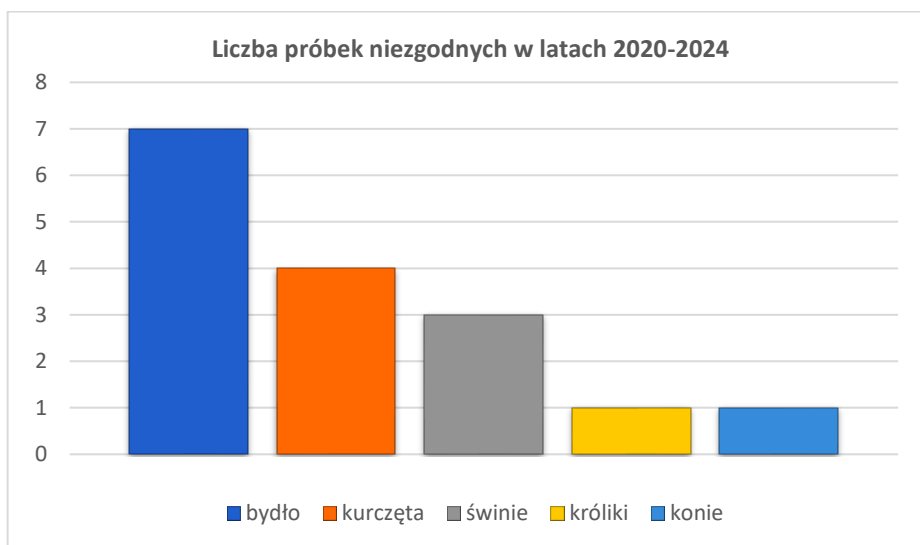


Wykres 11. Badane gatunki zwierząt w latach 2020-2024

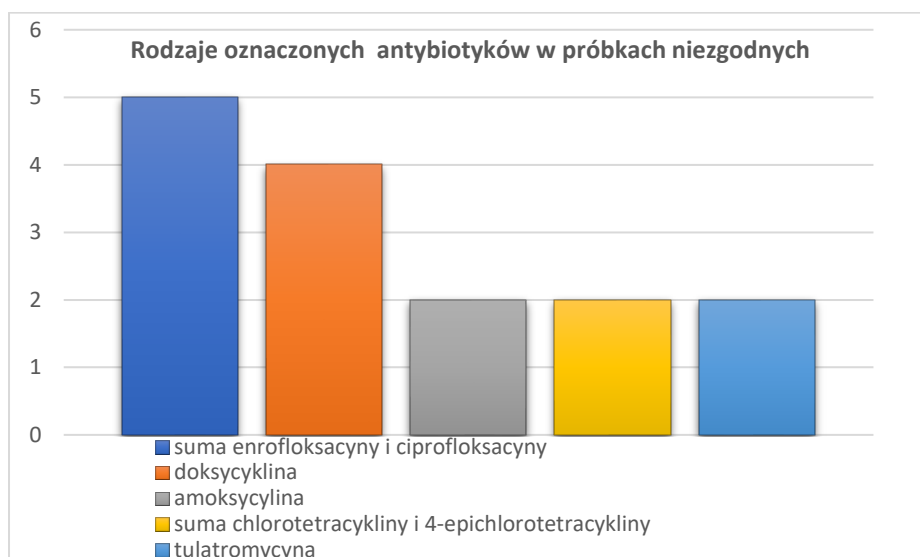


W latach 2020–2024 przebadano łącznie 6059 próbek mięśni różnych gatunków zwierząt. Wśród nich stwierdzono 16 próbek niezgodnych – wszystkie pochodziły z województwa wielkopolskiego. Najwięcej wykrytych próbek niezgodnych to mięśnie bydła – 7. Wykryto również niezgodne próbki mięśni: kurcząt (4), świń (3), królika (1) oraz konia (1) (**Wykres 12**). Najczęściej wykrywanymi substancjami były enrofloksacyna i ciprofloksacyna – łącznie w 5 próbkach, doksycyklina – 4 próbki, amoksycylina – 2, chlorotetracyklina i 4-epichlorotetracyklina – 2 próbki oraz tulatromycyna – 2 próbki (**Wykres 13**).

Wykres 12. Liczba próbek niezgodnych w latach 2020-2024



Wykres 13. Rodzaje oznaczonych antybiotyków w próbkach niezgodnych w latach 2020-2024



W latach 2020–2024, w ramach oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mięśniach procedurą badawczą PBC-101.00.00, odnotowano również próbki, w których stwierdzono obecność antybiotyków w ilościach powyżej CC β , jednak poniżej MRL. Próbki takie nie są uznawane za niezgodne, ponieważ wykryta ilość nie przekracza dopuszczalnego limitu jego pozostałości.

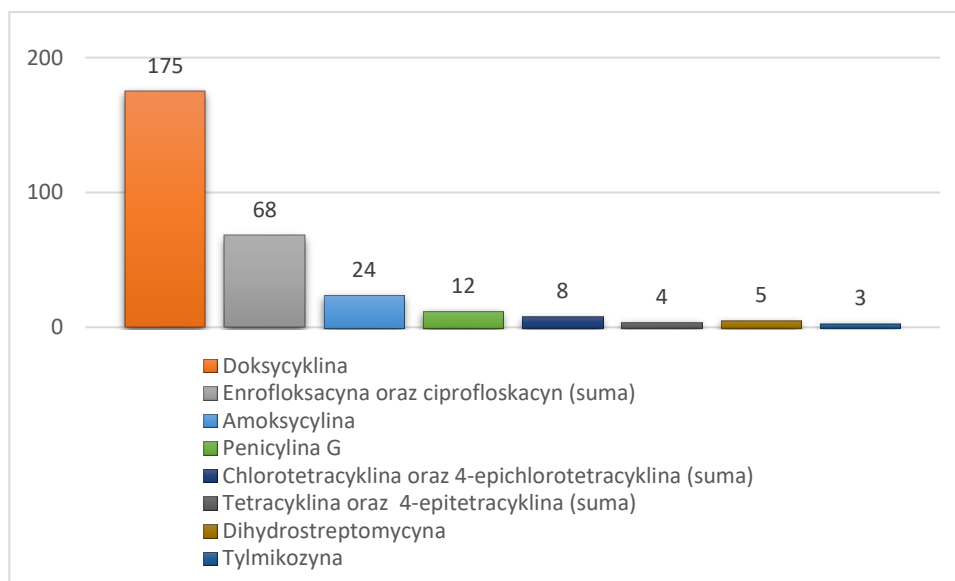
Próbki zgodne, ale z wynikami powyżej wartości CC β są ważne z punktu widzenia prowadzonego nadzoru nad pozostałościami substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Wskazują one na możliwą obecność antybiotyków, co może być efektem nieprzestrzegania przez hodowców wymaganych okresów karencji. Mogły również pochodzić od zwierząt, które były leczone zgodnie z przepisami przez lekarzy weterynarii, ale pozostałości substancji nie zostały jeszcze całkowicie usunięte z ich organizmu.

Tabela 60 oraz **Wykres 14** przedstawiają najczęściej wykrywane antybiotyki w tkance mięśniowej w latach 2020–2024, w próbkach, których stężenia przekraczały wartość CC β , ale mieściły się poniżej limitu MRL.

Tabela 60. Próbki zgodne powyżej CCβ

Antybiotyk	Gatunek	CCβ (μg/kg)	MRL (μg/kg)	Ilość
Doksycyklina	bydło	40	100	94
Doksycyklina	kurczęta	40	100	81
Enrofloksacyna oraz Ciprofloksacyna (suma)	bydło	50	100	68
		50		
Amoksycylina	kurczęta	25	50	24
Penicylina G	kurczęta	25	50	12
Chlorotetracyklina oraz 4-epichlorotetracyklina (suma)	bydło	50	100	8
		50		
Tetracyklina oraz 4-epitetacyklina (suma)	świnie	40	100	4
		50		
Dihydrostreptomycyna	bydło	250	500	4
Dihydrostreptomycyna	świnie	250	500	1
Tylmikozya	bydło	25	50	3

Wykres 14. Najczęściej wykrywane antybiotyki w tkance mięśniowej w latach 2020-2024 – próbki zgodne



Ze względu na częste oznaczanie substancji przeciwbakteryjnych powyżej CCβ konieczne jest monitorowanie takich wyników, które mogą wskazywać na występowanie nieprawidłowości w stosowaniu antybiotyków u zwierząt.

Przeanalizowano również próbki poniżej granicy CCβ. Najwięcej wykryć pozostałości antybiotyków poniżej wartości CCβ dotyczyło próbek bydła, stanowiły one około 60% wszystkich takich przypadków, około 35% pochodziło z mięsa kurcząt, natomiast pozostałe przypadki dotyczyły mięsa świń. Wśród wykrywanych substancji

przeciwbakteryjnych najczęściej pojawiały się: doksycyklina, enrofloksacyna, ciprofloksacyna, tylozyna, amoksycylina oraz tilmikozyna. Rzadziej wykrywano marbofloksacynę, sulfaguanidynę, kwas oksolinowy, erytromycyna, penicylinę G, dihydrostreptomycynę, tiamulinę, trimetoprim, difloksacynę, chlorotetracyklinę, 4-epichlorotetracyklinę tetracyklinę, i 4-epitetracyklinę.

Wyniki oznaczeń poniżej wartości CC β nie są monitorowane, ale pozwalają dostrzec różnorodność stosowanych antybiotyków w hodowli zwierząt. Opracowana procedura badawcza umożliwia oznaczanie śladowych ilości substancji przeciwbakteryjnych. W przypadku zaostreżenia przepisów możliwe będzie szybkie dostosowanie się do niższych granic decyzyjnych i dalsze zapewnianie bezpieczeństwa żywności.

8.2. Próbkę mleka

Opracowano zbiorcze zestawienie badań próbek mleka obejmującą lata 2020–2024. **Tabela 61** zawiera informacje dotyczące liczby próbek, ich pochodzenia (województwo, próbki po jakościowych badaniach mikrobiologicznych). W tabeli zebrano także liczbę próbek niezgodnych, czyli próbek dla których został przekroczony obowiązujący limit pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mleku. Pochodzenie próbek mleka w latach 2020–2024 przedstawiono również graficznie na wykresie kołowym (**Wykres 15**).

Wykres 15. Udział procentowy próbek mleka według pochodzenia (2020–2024)

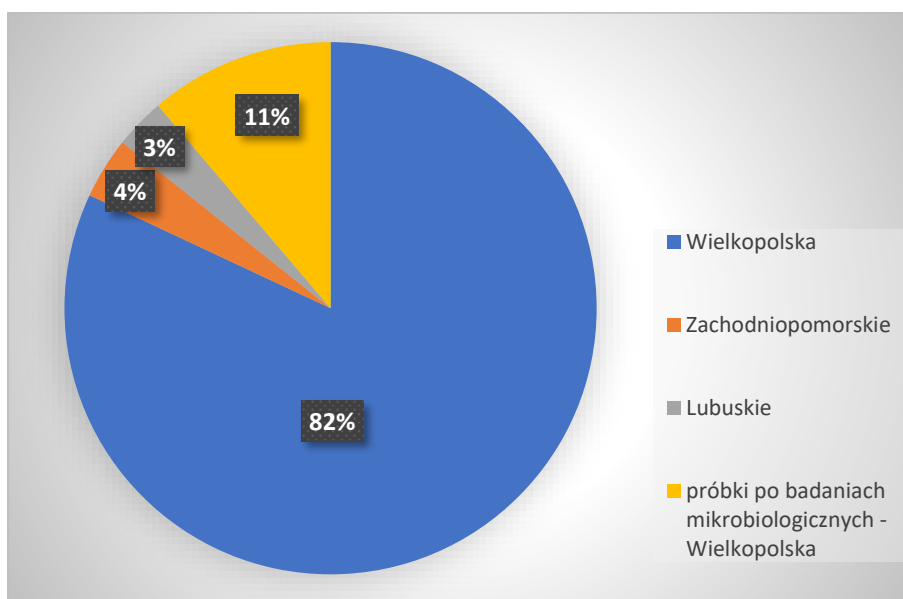


Tabela 61. Zestawienie liczby próbek mleka przebadanych w latach 2020-2024

Rok	Województwo	Matryca	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych
2020	Wielkopolska	mleko	19	0	24	1
	Zachodniopomorskie	mleko	1	0		
	Lubuskie	mleko	1	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	mleko	3	1		
2021	Wielkopolska	mleko	41	0	50	1
	Zachodniopomorskie	mleko	2	0		
	Lubuskie	mleko	2	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	mleko	5	1		
2022	Wielkopolska	mleko	47	0	62	0
	Zachodniopomorskie	mleko	4	0		
	Lubuskie	mleko	2	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	mleko	9	0		
2023	Wielkopolska	mleko	88	0	104	1
	Zachodniopomorskie	mleko	2	0		
	Lubuskie	mleko	3	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	mleko	11	1		
2024	Wielkopolska	mleko	46	0	54	0
	Zachodniopomorskie	mleko	2	0		
	Lubuskie	mleko	1	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	mleko	5	0		

Najwięcej próbek pochodziło z województwa wielkopolskiego. Łącznie z próbkami przekazanymi po badaniach mikrobiologicznych stanowiły one aż 93% wszystkich analizowanych próbek w latach 2020–2024. Wynika to z dobrze rozwiniętego przemysłu mleczarskiego na tym obszarze oraz dużej liczby gospodarstw. Z pozostałych województw dostarczano jedynie pojedyncze próbki, co jest związane z ograniczoną skalą produkcji mleka w tych województwach.

W rozpatrywanym okresie wykryto łącznie 3 próbki mleka, które uznano za niezgodne. Wszystkie próbki pochodziły z Wielkopolski i zostały przekazane do badań potwierdzających po dodatnich wynikach badań mikrobiologicznych.

W próbkach mleka z lat 2020 i 2021 potwierdzono wyniki mikrobiologicznych testów przesiewowych, w których wykryto obecność antybiotyków z grupy β -laktamów. W obu przypadkach oznaczono ilościowo amoksycylinę w stężeniach przekraczających dopuszczalny limit MRL wynoszący 4 $\mu\text{g/kg}$. Uzyskane wyniki to odpowiednio: $(4,7 \pm 0,5) \mu\text{g/kg}$ i $(5,4 \pm 0,6) \mu\text{g/kg}$.

W 2023 roku testy mikrobiologiczne wykazały obecność antybiotyków z grupy tetracyklin. Badania potwierdzające wykazały obecność dwóch substancji: tetracykliny oraz 4-epitetracykliny. MRL dla ich sumy wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$. Oznaczone stężenia wynosiły: tetracyklina – $(89 \pm 13) \mu\text{g/kg}$, 4-epitetracyklina – $(60 \pm 8) \mu\text{g/kg}$.

Połączenie w jednym laboratorium badań mikrobiologicznych z ilościowymi badaniami potwierdzającymi, takimi jak te opisane w niniejszej pracy, pozwala na szybkie potwierdzenie wyników, a przy wykryciu niezgodności skrócenie czasu na podjęcie decyzji urzędowych.

W latach 2020–2024, w ramach oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mleku procedurą badawczą PBC-101.00.00, odnotowano również próbki, w których stwierdzono obecność antybiotyków w ilościach powyżej CC β , jednak poniżej MRL. Próbki takie nie są uznawane za niezgodne, ponieważ wykryta ilość nie przekracza dopuszczalnego limitu pozostałości antybiotyków.

W pozostałych 30 próbkach mleka przekazanych do badań potwierdzających, również wykryto pozostałości antybiotyków z grupy tetracyklin. Oznaczono w nich tetracyklinę oraz 4-epitetracyklinę w stężeniach przekraczających wartości CC β , które wynoszą odpowiednio 6,0 $\mu\text{g/kg}$ i 7,0 $\mu\text{g/kg}$. Wyniki wahały się w przedziale od 8,0 do 40 $\mu\text{g/kg}$, przy czym dominowały wartości zbliżone do 12 $\mu\text{g/kg}$. Dodatkowo, w 2 próbkach stwierdzono obecność amoksycyliny w stężeniach powyżej CC β równego 2,0 $\mu\text{g/kg}$.

Wśród pozostałych próbek, dostarczanych bezpośrednio przez inspektorów w ramach rutynowej kontroli, w około 23 przypadkach również wykryto tetracyklinę oraz

4-epitetrazyklinę w podobnych ilościach, mieszczących się powyżej wartości CC β , ale poniżej wartości MRL.

Zaobserwowane wykrycia pozostałości antybiotyków z grupy tetracyklin w mleku, przekraczające wartości CC β , lecz mieszczące się poniżej limitów MRL, wskazują na potrzebę dalszego monitorowania stosowania substancji przeciwbakteryjnych. Częste wykrycia związków z tej samej grupy mogą świadczyć o ich częstym wykorzystaniu w leczeniu zwierząt mlecznych. Podkreśla to istotną rolę badań pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego w celu kontroli bezpieczeństwa żywności.

Przeanalizowano również próbki mleka, w których wykryto pozostałości antybiotyków poniżej wartości granicy decyzyjnej CC β . Najczęściej oznaczanymi substancjami były tetracyklina oraz 4-epitetrazyklina. W próbkach mleka wykrywano również doksycylinę oraz amoksycylinę. Pojedyncze przypadki dotyczyły wykrycia w próbkach mleka chlorotetracykliny oraz 4-epichlorotetracykliny, neomycyny, kloksacyliny oraz paromomycyny.

Wyniki oznaczeń poniżej wartości CC β w próbkach mleka pokazują różnorodność stosowanych antybiotyków w produkcji mleka. Wdrożona w laboratorium procedura badawcza (PBC-101.00.00) pozwala na wykrycie nawet śladowych ilości substancji przeciwbakteryjnych, co w przypadku zmniejszenia dozwolonych limitów umożliwi szybkie dostosowanie granic wykrywalności, a co za tym idzie odpowiednią kontrolę bezpieczeństwa żywności.

8.3. Próbki jaj

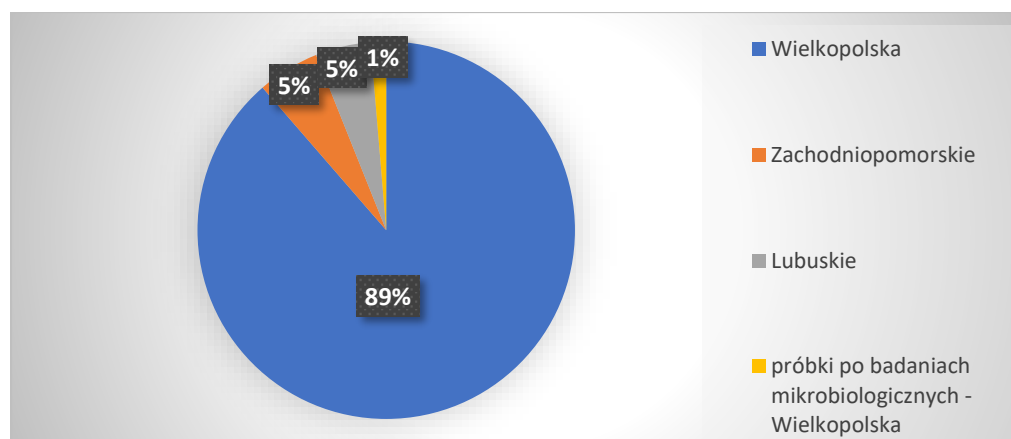
Opracowano zbiorcze zestawienie badań próbek jaj obejmujące lata 2020–2024. **Tabela 62** zawiera informacje dotyczące liczby próbek, ich pochodzenia (województwo, próbki po jakościowych badaniach mikrobiologicznych). Zebrano w niej także liczbę próbek niezgodnych, czyli próbek dla których został przekroczony obowiązujący limit pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w jajach. Pochodzenie próbek w latach 2020–2024 przedstawia również wykres kołowy (**Wykres 16**).

WALIDACJA I WDROŻENIE

Tabela 62. Zestawienie liczby próbek jaj przebadanych w latach 2020-2024

Rok	Województwo	Matryca	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych
2020	Wielkopolska	jaja	48	1	52	2
	Zachodniopomorskie	jaja	0	0		
	Lubuskie	jaja	3	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	jaja	1	1		
2021	Wielkopolska	jaja	145	1	165	2
	Zachodniopomorskie	jaja	10	0		
	Lubuskie	jaja	9	1		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	jaja	1	0		
2022	Wielkopolska	jaja	142	0	162	0
	Zachodniopomorskie	jaja	8	0		
	Lubuskie	jaja	10	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	jaja	2	0		
2023	Wielkopolska	jaja	158	0	176	0
	Zachodniopomorskie	jaja	11	0		
	Lubuskie	jaja	5	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	jaja	2	0		
2024	Wielkopolska	jaja	107	0	122	0
	Zachodniopomorskie	jaja	7	0		
	Lubuskie	jaja	5	0		
	próbki po badaniach mikrobiologicznych - Wielkopolska	jaja	3	0		

Wykres 16. Udział procentowy próbek jaj według pochodzenia (2020–2024)



Podobnie jak w przypadku pozostałych matryc, najwięcej próbek jaj pochodziło z województwa wielkopolskiego. Łącznie z próbkami przekazanymi po badaniach mikrobiologicznych stanowiły one aż 90% wszystkich analizowanych próbek w latach 2020–2024. Wynika to z dużej liczby ferm drobiu oraz intensywnej produkcji jaj w tym regionie. Z innych województw przekazywano tylko pojedyncze próbki, co wskazuje na mniejszą skalę produkcji jaj na tych terenach.

W roku 2020 oraz 2021 wykryto łącznie 4 próbki jaj, które uznano za niezgodne. W pozostałych latach nie odnotowano próbek niezgodnych. Trzy z niezgodnych próbek pochodziły z Wielkopolski, w tym jedna z nich została przekazana do badań potwierdzających po dodatnim wyniku badań mikrobiologicznych. Jedna próbka pochodziła z województwa lubuskiego.

W pierwszej próbce z roku 2020 oznaczono ilościowo enrofloksacynę w stężeniu (39 ± 4) $\mu\text{g/kg}$, natomiast ciprofloksacyna była obecna poniżej wartości $\text{CC}\beta$. Dla enrofloksacyny w tej matrycy nie ustalono wartości MRL, dlatego wynik przekraczający wyznaczoną w procesie walidacji wartość $\text{CC}\alpha$ ($30 \mu\text{g/kg}$) został uznany za niezgodny. Enrofloksacynę oznaczono ilościowo również w próbce z 2021 roku, pochodzącej z województwa wielkopolskiego – (33 ± 3) $\mu\text{g/kg}$. Tak jak w poprzednim przypadku, ciprofloksacyna była obecna w stężeniu poniżej wartości $\text{CC}\beta$.

Dla dwóch kolejnych próbek oznaczono ilościowo antybiotyki z grupy tetracyklin – doksycyklinę, dla którego również nie ma ustalonego MRL. Wartość $\text{CC}\alpha$ wyznaczona w procesie walidacji wynosi: $29 \mu\text{g/kg}$. W próbce przekazanej po badaniach mikrobiologicznych stwierdzono stężenie doksycykliny na poziomie (197 ± 20) $\mu\text{g/kg}$, natomiast w próbce dostarczonej z województwa lubuskiego – (115 ± 12) $\mu\text{g/kg}$.

W 115 próbkach jaj, stanowiących około 17% wszystkich badanych próbek z lat 2020–2024, wykryto obecność pozostałości antybiotyków w stężeniach poniżej wartości $\text{CC}\beta$. Najczęściej wykrywanymi substancjami były enrofloksacyna i ciprofloksacyna (w tej samej liczbie próbek), a następnie doksycyklina, tetracyklina i 4-epitetracyklina, penicylina V, tylozyna oraz flumechina.

Mimo, że poziomy tych substancji nie przekraczały granic decyzyjnych, ich obecność może świadczyć o częstym stosowaniu antybiotyków w produkcji jaj. Wyniki te wskazują na potrzebę dalszego monitorowania pozostałości antybiotyków w jajach oraz wzmocnienie nadzoru nad stosowaniem antybiotyków dla kur niosek.

8.4. Próbkę miodów

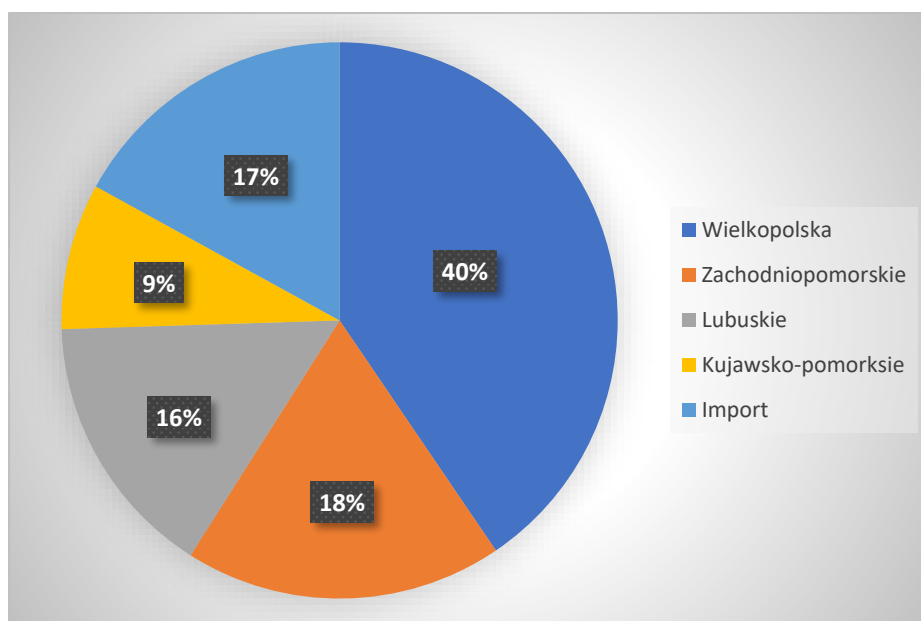
Opracowano zbiorcze zestawienie badań próbek miodu obejmujące lata 2022–2024. **Tabela 63** zawiera informacje dotyczące liczby przebadanych próbek, ich pochodzenia (województwo, próbki z importu dostarczane przez graniczne inspektoraty weterynarii) oraz liczbę próbek niezgodnych, w których stwierdzono przekroczenie wyznaczonych limitów pozostałości antybiotyków w miodzie.

Tabela 63. Zestawienie liczby próbek miodów przebadanych w latach 2022-2024

Rok	Województwo	Matryca	Liczba próbek	Niezgodne	Suma	Suma niezgodnych
2022	Wielkopolska	miody	21	0	45	1
	Lubuskie	miody	8	1		
	Kujawsko-pomorskie	miody	16	0		
	Import	miody	0	0		
2023	Wielkopolska	miody	28	0	83	0
	Zachodniopomorskie	miody	20	0		
	Lubuskie	miody	12	0		
	Kujawsko-pomorskie	miody	1	0		
	Import	miody	22	0		
2024	Wielkopolska	miody	32	0	72	0
	Zachodniopomorskie	miody	17	0		
	Lubuskie	miody	11	0		
	Import	miody	12	0		

Podobnie jak w przypadku pozostałych matryc, najwięcej próbek miodu pochodziło z województwa wielkopolskiego, choć nie była to tak wyraźna przewaga jak w przypadku poprzednich matryc. Zgodnie z danymi przedstawionymi na wykresie (**Wykres 17**), próbki z Wielkopolski stanowiły 40% wszystkich badanych próbek miodu. Pozostałe pochodziły w zbliżonych ilościach z województw: zachodniopomorskiego, lubuskiego oraz kujawsko-pomorskiego. Probki z importu, dostarczone przez Graniczny Inspektorat Weterynarii w Gdańsku, stanowiły 17% wszystkich analizowanych próbek. Wszystkie pochodziły z Chin.

Wykres 17. Udział procentowy próbek miodów według pochodzenia (2022–2024)



W okresie trzech lat prowadzenia rutynowych badań miodu wdrożoną procedurą badawczą PBC-25.00.00 wykryto jedną próbkę niezgodną pochodzącą z województwa lubuskiego, która zawierała trzy antybiotyki z grupy sulfonamidów:

- Sulfacetamid – $(44,4 \pm 4,4)$ $\mu\text{g/kg}$,
- Sulfametazynę – (350 ± 35) $\mu\text{g/kg}$,
- Sulfatiazol – (221 ± 66) $\mu\text{g/kg}$.

Antybiotyki w miodach nie mają określonego limitu MRL dlatego decyduje wartość wyznaczona w walidacji ($\text{CC}\alpha$).

Wszystkie uzyskane wyniki, były powyżej górnego zakresu pomiarowego metody, dlatego próbki zostały wysłane do badań potwierdzających do laboratorium w Puławach, które potwierdziło oznaczone antybiotyki o podobnych wartościach stężeń.

W 8 próbkach miodu, stanowiących około 4% wszystkich przebadanych próbek z lat 2022–2024, wykryto obecność pozostałości antybiotyków w stężeniach poniżej wartości $\text{CC}\beta$.

W 5 próbkach stwierdzono ten sam zestaw sulfonamidów, co w próbce niezgodnej sulfacetamid, sulfametazynę oraz sulfatiazol. W jednej próbce wykryto inny zestaw sulfonamidów: sulfametazynę, sulfadimetoksynę oraz sulfatiazol. W dwóch pozostałych próbkach oznaczono doksycyklinę, również w stężeniach poniżej wartości $\text{CC}\beta$.

W żadnej z próbek miodu pochodzących z Chin nie stwierdzono obecności pozostałości antybiotyków.

W rozpatrywanym okresie (2022–2024) liczba próbek miodu była mniejsza niż w przypadku innych matryc. Dzięki wdrożonej procedurze badawczej w laboratorium, możliwe było oznaczanie pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w niskich stężeniach. Najczęściej wykrywaną grupą substancji były sulfonamidy, co świadczy o stosowaniu ich w leczeniu pszczoł (np. zgnilca amerykańskiego). Dodatkowo w porównaniu do innych matryc, różnorodność wykrywanych antybiotyków w miodzie była zdecydowanie mniejsza.

8.5. Próbki nerek

W latach 2022–2024, mimo że matryca nerek nie została jeszcze wprowadzona do zakresu akredytacji, przeanalizowano łącznie 16 próbek nerek przekazanych po dodatnich wynikach badań mikrobiologicznych, które pochodziły z województwa wielkopolskiego.

Jedna część próbki nerki po badaniach mikrobiologicznych, w których stwierdzono obecność antybiotyków, została przekazana do badań potwierdzających do Laboratorium w Puławach, natomiast druga w ramach weryfikacji wdrażanej procedury trafiła do Pracowni Badań Chemicznych w Poznaniu. Analizy wykazały obecność pozostałości antybiotyków powyżej limitu MRL i wyznaczonego CC α w kilku przypadkach:

- nerka od bydła: neomycyna – (9180 ± 1836) $\mu\text{g/kg}$ – MRL wynosi 9000 $\mu\text{g/kg}$,
- nerka od świni: sulfametazyna (274 ± 69) $\mu\text{g/kg}$ – MRL wynosi 100 $\mu\text{g/kg}$ oraz dihydrostreptomycyna – $(16\,500 \pm 4125)$ $\mu\text{g/kg}$ – MRL wynosi 1000 $\mu\text{g/kg}$,
- nerka od świni: dihydrostreptomycyna – (1500 ± 375) $\mu\text{g/kg}$ – MRL wynosi 1000 $\mu\text{g/kg}$,
- nerka od świni: enrofloksacyna – (2200 ± 440) $\mu\text{g/kg}$ oraz ciprofloksacyna – (1000 ± 200) $\mu\text{g/kg}$ – MRL dla sumy wynosi 300 $\mu\text{g/kg}$.

W pozostałych próbkach wykryto obecność pozostałości substancji przeciwbakteryjnych poniżej wartości granicy decyzyjnej CC β . W sześciu próbkach oznaczono dihydrostreptomycynę w stężeniach poniżej CC β wynoszącej 500 $\mu\text{g/kg}$, natomiast w dwóch próbkach wykryto enrofloksacynę i ciprofloksacynę również w stężeniach poniżej CC β (100 $\mu\text{g/kg}$). W czterech próbkach nie potwierdzono obecności żadnych antybiotyków.

Wszystkie powyższe wyniki zostały potwierdzone w badaniach przeprowadzonych przez laboratorium w Puławach, a oznaczone wartości pozostałości były zbliżone do tych uzyskanych w Pracowni Badań Chemicznych w Poznaniu. Potwierdza to poprawność zastosowanej procedury badawczej oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w nerkach, mimo że procedura nie została jeszcze oficjalnie zatwierdzona i wprowadzona do zakresu badań akredytowanych.

Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność wdrożenia procedury badawczej oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w nerkach do działalności laboratoryjnej. Możliwość przeprowadzenia takich badań na miejscu pozwoliłaby skrócić czas oczekiwania na wyniki, przyspieszyć proces decyzji urzędowych oraz ograniczyć przesyłanie próbek do laboratoriów zewnętrznych.

9. Podsumowanie

W celu opracowania precyzyjnych i miarodajnych procedur badawczych do oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego, w różnych matrycach takich jak mięśnie, mleko, nerki, jaja i miody, konieczna była optymalizacja warunków ekstrakcji dla każdej matrycy oraz parametrów pracy aparatu LC-MS/MS.

W literaturze naukowej opublikowano wiele prac dotyczących opracowania metod wieloskładnikowych, umożliwiających oznaczanie różnych grup antybiotyków oraz innych leków weterynaryjnych w różnych matrycach, z wykorzystaniem różnych technik ekstrakcji oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) [48, 106, 149, 157, 158, 167, 171]. Zainteresowanie tym tematem podkreśla konieczność wdrażania odpowiednio opracowanych i zwalidowanych procedur badawczych w laboratoriach zajmujących się kontrolą bezpieczeństwa żywności.

W niniejszej pracy, dla każdej z badanych matryc przeprowadzono odrębne doświadczenia w celu optymalizacji warunków ekstrakcji. W przypadku mięśni, mleka oraz nerek, zastosowano jednolite podejście analityczne z dwoma odrębnymi procedurami ekstrakcyjnymi dostosowanymi do właściwości fizykochemicznych badanych związków. Dla fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, diaminopirymidyn, oraz pleuromutylin najlepsze wyniki uzyskano przy zastosowaniu ekstrakcji acetonitrylem, po której następowało odparowanie rozpuszczalnika w wyparce próżniowej. Uzyskane odzyski wynosiły od 96 do 102%. Natomiast dla tetracyklin, linkozamidów i aminoglikozydów optymalne okazało się zastosowanie 5% roztworu kwasu trichlorooctowego. Uzyskane wyniki dla odzysku wynosiły od 97 do 102%. Zastosowane podejścia znajdują potwierdzenie w dostępnej literaturze naukowej [49, 184]. W publikacji [49] wykazano możliwość ekstrakcji fluorochinolonów z zastosowaniem 5% kwasu trichlorooctowego, jednak w przeprowadzonych badaniach uzyskano lepsze wyniki dla odzysków przy zastosowaniu acetonitrylu.

W przypadku parametrów związanych z fazą ruchomą, zastosowanie 0,025% kwasu heptafluoromasłowego (HFBA) w oznaczaniu aminoglikozydów okazało się niezbędne. Zastosowanie HFBA jako czynnika tworzącego pary jonowe znajduje potwierdzenie w literaturze, szczególnie w kontekście oznaczania aminoglikozydów

w różnych matrycach biologicznych [184, 191, 210]. Dla rozdziału antybiotyków ekstrahowanych acetonitrylem, najlepsze rezultaty uzyskano przy zastosowaniu fazy ruchomej składającej się z 0,2% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie oraz 0,2% kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Taki układ fazy zapewnił dobrą retencję, symetrię pików oraz rozdzielczość dla większości oznaczanych związków.

W przypadku jaj przeprowadzono próby ekstrakcji z zastosowaniem acetonitrylu z dodatkiem buforu oraz Na₂EDTA, jak również metody typu QuEChERS. Uzyskane wyniki wskazują, że procedura wykorzystująca acetonitryl z dodatkiem buforu i roztworu Na₂EDTA, kompleksującego jony metali, w połączeniu z oczyszczaniem próbek na kolumnkach Oasis HLB, zapewniała dobre i powtarzalne odzyski dla oznaczanych grup antybiotyków. Uzyskane odzyski wynosiły od 89 do 101%. Procedura ta okazała się odpowiednia w przypadku tak złożonej matrycy, jaką są jaja, co znajduje potwierdzenie w literaturze. W pracy [191] opisano podobne podejście ekstrakcyjne z zastosowaniem kolumnek Oasis HLB, również dla oznaczania antybiotyków w jajach i uzyskano w niej również zadowalające wyniki. Natomiast w publikacji [190] do ekstrakcji związków z jaj wykorzystano inne kolumnki oraz dodatek kwasu mrówkowego zamiast buforu, jednak badano w nich oprócz różnych grup antybiotyków również pozostałości innych leków weterynaryjnych – uzyskano zadowalające wyniki.

Mimo że w literaturze opisano skuteczne zastosowanie techniki typu QuEChERS do ekstrakcji substancji przeciwbakteryjnych z różnych matryc [77, 194, 196], zastosowana w doświadczeniu w niniejszej pracy procedura nie zapewniła odpowiednich odzysków dla większości oznaczanych związków w jajach. Biorąc jednak pod uwagę istniejące doniesienia naukowe, procedura ta może być odpowiednia pod warunkiem dalszej optymalizacji warunków ekstrakcji i oczyszczania próbek.

Optymalizując ekstrakcję antybiotyków z miodu, przyjęto założenie o zastosowaniu dwóch odrębnych podejść ekstrakcyjnych. W ramach doświadczeń sulfonamidy i diaminopirymidyny (trimetoprim) ekstrahowano przy użyciu różnych typów kolumn SPE (Oasis HLB oraz SCX). Fluorochinolony, makrolidy, tetracykliny, linkozamidy (linkomycyna) i aminoglikozydy (streptomycyna) z wykorzystaniem kolumnek Strata-X. Na podstawie przeprowadzonych badań jako optymalne podejście wybrano oczyszczanie na kolumnkach Strata-X dla fluorochinolonów, tetracyklin, makrolidów, linkozamidów i aminoglikozydów oraz Oasis HLB dla sulfonamidów

i diaminopirymidyn. Uzyskane odzyski były dobre i powtarzalne, co potwierdza prawidłowość przyjętego podziału procedury ekstrakcji. Średnie odzyski przy zastosowaniu kolumn Strata-X wynosiły: 93% dla fluorochinolonów, 94% dla tetracyklin, 90% dla makrolidów, 96% dla linkozamidów (linkomycyny) oraz 89% dla aminoglikozydów (streptomycyny). Dodatek HFBA okazał się niezbędny przy oznaczaniu streptomycyny z grupy aminoglikozydów, co zostało również udowodnione w dostępnych publikacjach [210]. W przypadku kolumn Oasis HLB uzyskano średni odzysk na poziomie 96% zarówno dla sulfonamidów, jak i diaminopirymidyn (trimetoprimu). Wybór zastosowanych kolumnienek SPE znajduje potwierdzenie w dostępnej literaturze. Zarówno kolumnienki Strata-X oraz kolumnienki Oasis HLB były z bardzo dobrym rezultatem wykorzystywane przez innych autorów w oznaczaniu substancji przeciwbakteryjnych w miodzie. Kolumnienki Oasis HLB [203] sprawdziły się nie tylko w ekstrakcji sulfonamidów, lecz także przy oznaczaniu wybranych tetracyklin oraz flumechiny. Natomiast kolumny Strata-X były wykorzystywane w oznaczaniu związków należących do grup fluorochinolonów, makrolidów, tetracyklin oraz aminoglikozydów również z bardzo dobrymi wynikami [204].

Opracowane procedury badawcze poddano walidacji zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 [212] oraz z uwzględnieniem wymagań normy PN-EN ISO/IEC 17025 [181]. Walidacja objęła wszystkie badane matryce (mięśnie, mleko, nerki, jaja, miody) oraz wytypowane grupy antybiotyków. Dla wszystkich antybiotyków w każdej matrycy oceniono: selektywność, poprawność, powtarzalność, odtwarzalność, liniowość, efekt matrycy, odporność metody, a także wartości $CC\alpha$ oraz $CC\beta$. Wyznaczono także budżet niepewności.

Wszystkie uzyskane podczas walidacji parametry spełniały wymagania zawarte w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 [212], co jest dowodem na poprawność opracowanych procedur badawczych oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w różnych matrycach. Wartości odchylenia standardowego w warunkach powtarzalności oraz odtwarzalności nie przekraczały 13% dla mięśni oraz mleka, 11% dla jaj oraz miodów oraz 10% dla nerek, co jest zgodne z dopuszczalnymi limitami [212].

Otrzymane współczynniki korelacji dla krzywych wzorcowych potwierdzają dobrą liniowość procedur, ponieważ otrzymano wszystkie wartości powyżej $R^2 > 0,9899$ (przyjęte kryterium) [213].

Warto zwrócić uwagę na efekt matrycy, który różnił się w zależności od oznaczanych związków, a przede wszystkim od rodzaju badanej matrycy. Zgodnie z wytycznymi zawartymi w Rozporządzeniu 2021/808 [212], współczynnik zmienności CV dla wskaźnika efektu matrycy (znormalizowanego względem wzorca wewnętrznego) musi być mniejszy niż 20%. We wszystkich zwalidowanych matrycach spełniono ten warunek. Najwyższe wartości CV odnotowano dla kilku antybiotyków oznaczanych w miodach, takich jak streptomycyna, norfloksacyna i erytromycyna – gdzie wynosiły one od 12% do 15%. Dla pozostałych związków i matryc współczynniki zmienności nie przekraczały 10%. Uzyskane wyniki potwierdzają dobrą powtarzalność i stabilność sygnału analitycznego niezależnie od składników matrycy.

W trakcie walidacji opracowanych procedur badawczych wyznaczono także parametry CCA oraz CC β zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 [212]. W przypadku oznaczania substancji przeciwbakteryjnych objętych limitem oraz bez wyznaczonych limitów, wartość CC α wyznaczono zgodnie z pierwszym podejściem opisanym w rozporządzeniu, opartym na metodzie krzywej wzorcowej, zgodnie z normą ISO 11843-1:1997. Wybór tego podejścia pozwala na wyznaczenie CC α w sposób spójny z oceną liniowości i precyzji. Wyznaczone w trakcie walidacji wartości CC α wskazują na możliwość wiarygodnego rozróżniania próbek zgodnych i niezgodnych.

Wartość CC β określano w podejściu przesiewowym, opartym na analizie serii próbek ślepych oraz wzbogaconych, zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808 [212]. W przypadku substancji z wyznaczonym MRL, poziom STC (przesiewowego stężenia docelowego) został wyznaczony jako 50% MRL, zgodnie z wartościami określonymi w Rozporządzeniu (UE) nr 37/2010 [6]. Dla antybiotyków, dla których nie określono MRL, jak na przykład antybiotyki oznaczane w miodzie, STC odpowiadało najniższemu poziomowi kalibracyjnemu. We wszystkich przypadkach uzyskane wartości CC β pozwalały na wyraźne rozróżnienie sygnału próbki ślepej od próbki wzbogaconej, a ich poziomy były niższe niż wyznaczone STC. Wyniki te potwierdzają wysoką czułość opracowanych procedur badawczych

oraz ich przydatność w rutynowej kontroli żywności w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu.

Warto również zwrócić uwagę, że w publikacji [178] przyjęto wyższe wartości STC – na poziomie MRL równym 4 µg/kg – dla niektórych antybiotyków w mleku: amoksycylina, ampicylina, penicylina G i penicylina V. Takie podejście może wpłynąć na zmniejszenie liczby próbek przekazywanych do badań potwierdzających. Podejście z wyznaczeniem połowy MRL zwiększa odsetek badań potwierdzających, ale zwiększa także granice bezpieczeństwa, co jest uzasadnione w przypadku antybiotyków często stosowanych u ludzi jak np. amoksycylina.

W kontekście rutynowego zastosowania wdrożonych procedur badawczych w badaniach urzędowych warto odnieść się do danych opublikowanych w raporcie przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) za rok 2023 wydany w lutym 2025 [224], które obrazują ogólną sytuację w Europie związaną z oznaczaniem pozostałości weterynaryjnych produktów leczniczych w żywności.

Z raportu wynika, że w roku 2023 zostało przebadanych 144 467 próbek pod kątem obecności substancji z grupy B1 (w tym substancji przeciwbakteryjnych), z czego 213 próbek (0,15%) uznano za niezgodne [224].

Występowanie niezgodnych wyników w 2023 roku odnotowano w próbkach pochodzących m.in. od bydła (51 przypadków), świń (31), drobiu (9), koni (1), królików (2), a także w mleku (3), jajach (5) i miodach (19).

W badaniach pozostałości substancji przeciwbakteryjnych prowadzonych w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu z wykorzystaniem wdrożonych procedur badawczych, w roku 2023 stwierdzono łącznie 6 wyników niezgodnych: 3 dla mięśni bydła, 1 dla mięśni kurcząt, 1 dla mleka oraz 1 dla mięśni konia. Na przestrzeni rozpatrywanych lat wykryto ponadto niezgodności w 7 próbkach mięśni bydła, 4 próbkach mięśni kurcząt, 4 próbkach jaj, 3 próbkach mięśni świń, 3 próbkach mleka, 1 próbce mięśni królika, 1 próbce mięśni konia oraz 1 próbce miodu zawierającej aż 3 różne sulfonamidy. Łącznie, podobnie jak w danych EFSA, najwięcej przypadków dotyczyło mięśni bydła. Zbieżność rodzaju i tego jak kształtują się liczby niezgodnych wyników z danymi publikowanymi przez EFSA potwierdza, że wdrożone procedury badawcze są odpowiednie i skuteczne w wykrywaniu groźen związanych

z obecnością pozostałościami substancji przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego.

W odniesieniu do mięśni bydła, w raportach EFSA za 2023 rok najczęściej wykrywano amoksycylinę (3 przypadki, w tym 1 wykryty procedurą wdrożoną w Laboratorium w Poznaniu), penicylinę G (4 przypadki, z czego 1 dotyczył Polski), dihydrostreptomycynę (6 przypadków – 2 z Polski), sumę enrofloksacyny i ciprofloksacyny (3 przypadki – 2 wykryte w Polsce przy użyciu procedury wdrożonej w Laboratorium w Poznaniu), tymikozynę (3 przypadki, w tym 1 z Polski) oraz tulatromycynę (5 przypadków – 2 z Polski).

W przypadku miodów, w 2023 roku odnotowano łącznie 19 próbek niezgodnych w Unii Europejskiej, z czego aż 16 dotyczyło Polski – 84% wszystkich przypadków. Wśród wykrytych związków znalazły się: dihydrostreptomycyna (1 przypadek), sulfacetamid (4 przypadki – wszystkie z Polski), sulfachloropirazyne (3 – wszystkie z Polski), sulfametazyne (4 – wszystkie z Polski), sulfamonometoksyna (2), sulfatiazol (4 – wszystkie z Polski) oraz suma tetracykliny i 4-epitetracykliny (1 przypadek – również z Polski). W 2023 roku w próbkach miodu badanych w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu nie stwierdzono wyników niezgodnych, niezgodne wyniki dla miodów wykryto w roku 2022 gdzie oznaczono sulfacetamid, sulfametazyne oraz sulfatiazol, same substancje, które pojawiły się w raportach EFSA w roku 2023. Podkreśla to skuteczność zastosowanej procedury w oznaczaniu pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności.

W raporcie EFSA za 2023 rok ujęto również próbkę mięśni konia, w której wykryto tulatromycynę, próbkę mleka zawierającą sumę tetracykliny i 4-epitetracykliny, a także próbki mięśni kurcząt z przekroczeniem MRL dla amoksycyliny. Wszystkie te niezgodne wyniki zostały wykazane przez Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu. Stanowi to bezpośrednie potwierdzenie skuteczności wdrożonych procedur badawczych w identyfikowaniu rzeczywistych niezgodności oraz ich znaczenia nie tylko w krajowym, lecz także w europejskim systemie nadzoru nad bezpieczeństwem żywności pochodzenia zwierzęcego.

Wykonane przeze mnie badania pozwoliły na realizację zamierzonych celów pracy. W oparciu o wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej pt. „Opracowanie nowych procedur badawczych oznaczania pozostałości leków w produktach

żywnościowych wraz z ich walidacją i wdrożeniem w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu”, zrealizowanej w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy”, sformułowano następujące wnioski:

1. Opracowano procedurę badawczą oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mięśniach, mleku oraz nerkach (PBC-101.00.00), z zastosowaniem dwóch podejść ekstrakcyjnych: z użyciem acetonitrylu dla fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, pleuromutylin i diaminopirymidyn, oraz z użyciem kwasu trichlorooctowego dla tetracyklin, aminoglikozydów i linkozamidów. Opracowana procedura zapewnia wysokie odzyski analitów i może być z powodzeniem stosowana w rutynowych badaniach kontrolnych w laboratorium.
2. Opracowano procedurę badawczą oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w jajach (PBC-106.00.00). Zastosowano jedno podejście ekstrakcyjne, wspólne dla wszystkich oznaczanych grup związków: fluorochinolonów, sulfonamidów, β -laktamów, makrolidów, pleuromutylin i linkozamidów. Opracowana procedura zapewniła wysoki odzysk analitów, co umożliwia jej zastosowanie w rutynowych badaniach kontrolnych jaj.
3. Opracowano procedurę badawczą oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w miodach (PBC-25.00.00), opartą na dwóch podejściach ekstrakcyjnych z zastosowaniem techniki SPE. Dla fluorochinolonów, makrolidów, aminoglikozydów, tetracyklin i linkozamidów zastosowano kolumnienki Strata-X, natomiast dla sulfonamidów i trimetoprimu zastosowano kolumnienki Oasis HLB. Opracowana procedura zapewniła wysokie odzyski oznaczanych antybiotyków i może być stosowana w rutynowej kontroli jakości miodów.
4. Przeprowadzono optymalizację warunków analizy LC-MS/MS, obejmującą dobranie parametrów chromatograficznych oraz warunków jonizacji i detekcji, która pozwoliła na uzyskanie dobrego rozdzielenia analitów oraz wysokiej czułości oznaczeń. Dla wszystkich oznaczanych antybiotyków, w każdej z analizowanych matryc, potwierdzono liniowość metod. Poprawność opracowanych warunków analitycznych oraz ich przydatność do oznaczania szerokiego zakresu antybiotyków w różnych matrycach żywnościowych potwierdzają przedstawione w pracy chromatogramy oraz krzywe wzorcowe.

5. W Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu przeprowadzono pełną walidację procedur oznaczania substancji przeciwbakteryjnych we wszystkich badanych matrycach, zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808 oraz normy PN-EN ISO/IEC 17025. Wyznaczono wszystkie wymagane parametry walidacyjne, w tym wartości $CC\beta$ i $CC\alpha$, zgodnie z obowiązującymi przepisami dla wszystkich oznaczanych antybiotyków. Otrzymane wyniki spełniają kryteria określone w Rozporządzeniu, co potwierdza przydatność opracowanych procedur.
6. Opracowane i zwalidowane procedury zostały wdrożone do rutynowych badań kontrolnych. Od 2020 roku są stosowane w ramach krajowego planu monitoringu pozostałości leków weterynaryjnych. Dzięki ich zastosowaniu wykryto już szereg niezgodnych wyników dla każdej ze zwalidowanych matryc. Uzyskiwane wyniki badań rutynowych, badań biegłości oraz przeprowadzane audyty potwierdzają poprawność opracowanych i wdrożonych procedur w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu.
7. Opracowane procedury zostały objęte akredytacją PCA, która jest warunkiem koniecznym do wyznaczenia laboratorium do wykonywania badań urzędowych w ramach krajowego monitoringu pozostałości.

10. Streszczenie

Praca doktorska dotyczy oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego. Antybiotyki są powszechnie stosowane w leczeniu chorób u zwierząt, ich niewłaściwe stosowanie może prowadzić do obecności pozostałości w żywności, stanowi to zagrożenie dla zdrowia konsumentów i może przyczyniać się do rozwoju odporności bakterii. Dlatego pozostałości leków weterynaryjnych w żywności, są kontrolowane w ramach krajowych oraz unijnych programów monitorowania bezpieczeństwa żywności pochodzenia zwierzęcego.

W ramach badań opracowano procedury badawcze oznaczania antybiotyków wymaganych w kontroli, należących do różnych grup chemicznych. Procedury oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych opracowano dla mięśni, mleka, nerek, jaj i miodów, z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Przygotowano trzy odrębne procedury badawcze: jedną wspólną dla mięśni, mleka i nerek, drugą dla jaj a trzecią dla miodów. Opracowane procedury obejmowały nie tylko optymalizację procesu ekstrakcji antybiotyków, ale również optymalizację warunków instrumentalnych. Celem było uzyskanie miarodajnej, czulej i selektywnej procedury oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w różnych produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego.

Opracowane procedury zostały poddane walidacji zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808. Określono wszystkie wymagane parametry: $CC\beta$, $CC\alpha$, powtarzalność, odtwarzalność, poprawność, selektywność, liniowość, efekt matrycy oraz odporność metody. Wyznaczono również budżet niepewności pomiaru zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025.

Zwalidowane procedury zostały wdrożone do badań rutynowych w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu oraz objęte systemem akredytacji przez Polskie Centrum Akredytacji. Procedury zostały potwierdzone z dobrym wynikiem poprzez udział w badaniach biegłości, audytach wewnętrznych oraz kontrolach przeprowadzanych przez jednostki unijne i PCA.

Wdrożone procedury są obecnie wykorzystywane w badaniach rutynowych prowadzonych w ramach urzędowej kontroli żywności w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu.

11. Summary

This doctoral dissertation focuses on the determination of residues of antibacterial substances in food products of animal origin. Antibiotics are commonly used in the treatment of animal diseases, however, their improper use may result in the presence of residues in food, posing a risk to consumer health and contributing to the development of bacterial resistance. Therefore, residues of veterinary medicinal products in food are monitored as part of national and European Union food safety control programs.

As part of this study, analytical procedures were developed for the determination of antibiotics required for official control, belonging to various chemical groups. The procedures were designed for muscles, milk, kidneys, eggs, and honey, using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Three separate analytical procedures were established: one common procedure for muscles, milk, and kidneys; a second for eggs; and a third for honey. The developed procedures included not only optimization of the antibiotic extraction process but also optimization of instrumental conditions. The aim was to obtain a reliable, sensitive, and selective procedure for the determination of antibacterial residues in different food products of animal origin.

The developed methods were validated in accordance with the requirements of Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808. All required validation parameters were determined, including $CC\beta$, $CC\alpha$, repeatability, reproducibility, accuracy, selectivity, linearity, matrix effect, and method robustness. Additionally, the measurement uncertainty budget was established in accordance with the requirements of the PN-EN ISO/IEC 17025 standard.

The validated procedures were implemented for routine testing at the Laboratory of the Provincial Veterinary Inspectorate in Poznań and included in the accreditation system by the Polish Centre for Accreditation. These procedures were confirmed through participation in proficiency tests, internal audits, and inspections carried out by EU bodies and the PCA.

The implemented procedures are currently used in routine testing as part of official food control at the Laboratory of the Provincial Veterinary Inspectorate in Poznań.

Bibliografia

1. Posyniak, A., *Występowanie antybiotyków w żywności - aspekty prawne i analityczne kontroli pozostałości*. Życie Weterynaryjne, 2011. **86**(09): p. 717-721.
2. Balcerkiewicz M., B.Z., *Pozostałości substancji aktywnych w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego*. Farmacja Współczesna, 2016. **9**: p. 136-142.
3. Cañada-Cañada, F., A. Muñoz de la Peña, and A. Espinosa-Mansilla, *Analysis of antibiotics in fish samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**(4): p. 987-1008.
4. Peris-Vicente, J., et al., *Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples*. Microchemical Journal, 2022. **177**: p. 107309.
5. Pérez-Rodríguez, M., et al., *An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination*. Talanta, 2018. **182**: p. 1-21.
6. *Rozporządzenie Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji pod względem maksymalnych limitów pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego*. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, 2010.
7. *INSTRUKCJA Głównego Lekarza Weterynarii nr BP.200.1.7.2023, w sprawie zakresu i sposobu realizacji krajowych planów kontroli pozostałości zakazanych lub niedopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych, weterynaryjnych produktów leczniczych, zanieczyszczeń chemicznych, pozostałości pestycydów, dioksyn, furanów, polichlorowanych bifenyli (PCB) i związków perfluorowanych oraz promieniotwórczych izotopów cezu u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego* 2023: Warszawa.
8. Moreno-Bondi, M.C., et al., *An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**(4): p. 921-946.
9. Fleming, A., *On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae*. Br J Exp Pathol. 1929 Jun;10(3):226-36.
10. Reeves, P.T., *Antibiotics: Groups and Properties*, in *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. 2011. p. 1-60.
11. Graham, P., *Chemia medyczna*. PWN, 2019: p. 421.
12. Etebu, E. and I. Ariekpar, *Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives*. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, 2016. **4**: p. 90-101.
13. Samanidou, V.F. and E.N. Evaggelopoulou, *Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(16): p. 2549-2569.
14. Bargańska, Ż., J. Namieśnik, and M. Ślebioda, *Determination of antibiotic residues in honey*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(7): p. 1035-1041.
15. Martín, J.F., R.V. Ullán, and C. García-Estrada, *Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis*. Microb Biotechnol, 2010. **3**(3): p. 285-99.
16. Samanidou, V. and S. Nisyrliou, *Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(11): p. 2068-2090.
17. Percival, K.M., *Antibiotic Classification and Indication Review for the Infusion Nurse*. J Infus Nurs, 2017. **40**(1): p. 55-63.
18. Di Corcia, A. and M. Nazzari, *Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products*. Journal of Chromatography A, 2002. **974**(1): p. 53-89.
19. Begg, E.J. and M.L. Barclay, *Aminoglycosides--50 years on*. Br J Clin Pharmacol, 1995. **39**(6): p. 597-603.

20. McGlinchey, T.A., et al., *A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **624**(1): p. 1-15.
21. Kanfer, I., M.F. Skinner, and R.B. Walker, *Analysis of macrolide antibiotics*. *J Chromatogr A*, 1998. **812**(1-2): p. 255-86.
22. Wang, J., et al., *Should Airway Interstitial Fluid Be Used to Evaluate the Pharmacokinetics of Macrolide Antibiotics for Dose Regimen Determination in Respiratory Infection?* *Antibiotics (Basel)*, 2023. **12**(4).
23. García-Mayor, M.A., et al., *Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk*. *J Chromatogr A*, 2006. **1122**(1-2): p. 76-83.
24. Fanning, S., J. Wang, and N. Leonard, *Veterinary Drugs Residues: Antibacterials*, in *Encyclopedia of Food Safety*, Y. Motarjemi, Editor. 2014, Academic Press: Waltham. p. 39-44.
25. Ovung, A. and J. Bhattacharyya, *Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions*. *Biophys Rev*, 2021. **13**(2): p. 259-272.
26. Shah, T.J., M. Moshirfar, and P.C. Hoopes, *"Doctor, I have a Sulfa Allergy": Clarifying the Myths of Cross-Reactivity*. *Ophthalmology and Therapy*, 2018. **7**(2): p. 211-215.
27. Martinez, M., P. McDermott, and R. Walker, *Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals*. *The Veterinary Journal*, 2006. **172**(1): p. 10-28.
28. Sharma, P.C., A. Jain, and S. Jain, *Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects*. *Acta Pol Pharm*, 2009. **66**(6): p. 587-604.
29. Tariq, S., S.F.A. Rizvi, and U. Anwar, *Tetracycline: Classification, Structure Activity Relationship and Mechanism of Action as a Theranostic Agent for Infectious Lesions-A Mini Review*. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2018.
30. Spížek, J. and T. Řezanka, *Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications*. *Biochemical Pharmacology*, 2017. **133**: p. 20-28.
31. Matzov, D., et al., *Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(17): p. 10284-10292.
32. Kagan, F. and M.F. Grostic, *Mass spectra of lincomycin, lincomycin analogs and degradation products*. *Organic Mass Spectrometry*, 1972. **6**(11): p. 1217-1223.
33. Leclercq, R., *Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications*. *Clinical Infectious Diseases*, 2002. **34**(4): p. 482-492.
34. Pyörälä, S., et al., *Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance*. *The Veterinary Journal*, 2014. **200**(2): p. 230-239.
35. Burchall, J.J., *Trimethoprim and Pyrimethamine*, in *Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents*, J.W. Corcoran, et al., Editors. 1975, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 304-320.
36. Brogden, R.N., et al., *Trimethoprim: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Use in Urinary Tract Infections*. *Drugs*, 1982. **23**(6): p. 405-430.
37. Burchall, J.J., *Mechanism of Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole—II*. *The Journal of Infectious Diseases*, 1973. **128**(Supplement_3): p. S437-S441.
38. Paukner, S. and R. Riedl, *Pleuromutilins: Potent Drugs for Resistant Bugs-Mode of Action and Resistance*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017. **7**(1).
39. Sader, H.S., et al., *Antimicrobial activity of the investigational pleuromutilin compound BC-3781 tested against Gram-positive organisms commonly associated with acute bacterial skin and skin structure infections*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(3): p. 1619-23.

40. Schwarz, S., et al., *Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(11).
41. van Duijkeren, E., et al., *Pleuromutilins: use in food-producing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(8): p. 2022-31.
42. Ridgway, K., S.P. Lalljie, and R.M. Smith, *Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods*. J Chromatogr A, 2007. **1153**(1-2): p. 36-53.
43. Marazuela, M.D. and S. Bogialli, *A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods*. Analytica Chimica Acta, 2009. **645**(1): p. 5-17.
44. Nováková, L. and H. Vlcková, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation*. Anal Chim Acta, 2009. **656**(1-2): p. 8-35.
45. Bitas, D., et al., *Food Sample Preparation for the Determination of Sulfonamides by High-Performance Liquid Chromatography: State-of-the-Art*. Separations, 2018. **5**(2): p. 31.
46. Stolker, A.A.M. and M. Danaher, *Sample Preparation: Extraction and Clean-Up*, in *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. 2011. p. 125-152.
47. Kaufmann, A., et al., *Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1194**(1): p. 66-79.
48. Han, R.W., et al., *Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS*. Food Chemistry, 2015. **181**: p. 119-126.
49. Gaugain-Juhel, M., et al., *Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2009. **26**(11): p. 1459-71.
50. Bousova, K., H. Senyuva, and K. Mittendorf, *Multiresidue automated turbulent flow online LC-MS/MS method for the determination of antibiotics in milk*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2012. **29**(12): p. 1901-12.
51. Magon, T., et al., *Simultaneous Determination of Four Antibiotics in Raw Milk by UPLC-MS/MS Using Protein Precipitation as Sample Preparation: Development, Validation, and Application in Real Samples*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2018. **29**.
52. Hurtaud-Pessel, D., T. Jagadeshwar-Reddy, and E. Verdon, *Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2011. **28**(10): p. 1340-51.
53. Freitas, A., J. Barbosa, and F. Ramos, *Multi-residue and multi-class method for the determination of antibiotics in bovine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Meat Sci, 2014. **98**(1): p. 58-64.
54. Jank, L., et al., *β -lactam antibiotics residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid–liquid extraction method*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2012. **29**(4): p. 497-507.
55. Bogialli, S., et al., *Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(40): p. 6810-6815.
56. Jank, L., et al., *High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS)*. Talanta, 2015. **144**: p. 686-95.

57. Bortolotte, A.R., et al., *A simple and high-throughput method for multiresidue and multiclass quantitation of antimicrobials in pangasius (Pangasionodon hypophthalmus) fillet by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2019. **1124**: p. 17-25.
58. Desmarchelier, A., et al., *Determination of five tetracyclines and their epimers by LC-MS/MS based on a liquid-liquid extraction with low temperature partitioning*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2018. **35**(4): p. 687-695.
59. Di Rocco, M., et al., *Development and validation of a quantitative confirmatory method for 30 β -lactam antibiotics in bovine muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2017. **1500**: p. 121-135.
60. Wang, K., et al., *A Simple and Fast Extraction Method for the Determination of Multiclass Antibiotics in Eggs Using LC-MS/MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(24): p. 5064-5073.
61. Sun, L., et al., *Quantitative analysis of amoxicillin, its major metabolites and ampicillin in eggs by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Food Chemistry, 2016. **192**: p. 313-318.
62. Granelli, K., et al., *Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2009. **637**(1-2): p. 87-91.
63. Kinsella, B., et al., *Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(46): p. 7977-8015.
64. Abbasi, H. and K.-E. Hellenäs, *Modified determination of dihydrostreptomycin in kidney, muscle and milk by HPLC⁺*. Analyst, 1998. **123**(12): p. 2725-2727.
65. Babin, Y. and S. Fortier, *A high-throughput analytical method for determination of aminoglycosides in veal tissues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with automated cleanup*. J AOAC Int, 2007. **90**(5): p. 1418-26.
66. Arsand, J.B., et al., *Determination of aminoglycoside residues in milk and muscle based on a simple and fast extraction procedure followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and time of flight mass spectrometry*. Talanta, 2016. **154**: p. 38-45.
67. Guidi, L.R., et al., *A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish*. Talanta, 2017. **163**: p. 85-93.
68. Greenlees, K.J., L.G. Friedlander, and A. Boxall, *Antibiotic Residues in Food and Drinking Water, and Food Safety Regulations*, in *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. 2011. p. 111-123.
69. Zhang, C., et al., *The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019. **118**: p. 517-537.
70. Anastassiades, M., S. Lehotay, and D. Štajnbaher, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues*. 2003: p. 231-241.
71. Anastassiades, M., et al., *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. J AOAC Int, 2003. **86**(2): p. 412-31.
72. Nannou, C., et al., *QuEChERS—A Green Alternative Approach for the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Environmental and Food Samples*, in *Green Analytical Chemistry: Past, Present and Perspectives*, J. Płotka-Wasyłka and J. Namieśnik, Editors. 2019, Springer Singapore: Singapore. p. 395-430.
73. Lehotay, S.J., *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues*, in *Pesticide Protocols*, J.L. Martínez Vidal and A.G. Frenich, Editors. 2006, Humana Press: Totowa, NJ. p. 239-261.

74. Bruzzoniti, M.C., et al., *QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(17): p. 4089-116.
75. Wilkowska, A. and M. Biziuk, *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*. Food Chemistry, 2011. **125**(3): p. 803-812.
76. Perestrelo, R., et al., *QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends*. Analytica Chimica Acta, 2019. **1070**: p. 1-28.
77. Stubbings, G. and T. Bigwood, *The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach*. Anal Chim Acta, 2009. **637**(1-2): p. 68-78.
78. Aguilera-Luiz, M.M., et al., *Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2008. **1205**(1-2): p. 10-6.
79. Martínez Vidal, J.L., et al., *Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(7): p. 2777-2790.
80. Parab, S.R. and P.N. Amritkar, *Development and Validation of a Procedure for Determination of Sulfonamide Residues in Pasteurized Milk Using Modified QuEChERS Method and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2012. **95**(5): p. 1528-1533.
81. Jin, Y., et al., *Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Chem, 2017. **221**: p. 1298-1307.
82. Villar-Pulido, M., et al., *Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry*. Talanta, 2011. **85**(3): p. 1419-1427.
83. Lombardo-Agüí, M., et al., *Comparison of different sample treatments for the analysis of quinolones in milk by capillary-liquid chromatography with laser induced fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(30): p. 4966-4971.
84. Chen, Q., et al., *Quantification of 16 β -lactams in chicken muscle by QuEChERS extraction and UPLC-Q-Orbitrap-MS with parallel reaction monitoring*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017. **145**: p. 525-530.
85. Zhou, J., et al., *Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk*. Journal of Chromatography A, 2018. **1532**: p. 20-29.
86. Aissaoui, Y., et al., *Determination of Multiclass Antibiotics in Fish Muscle Using a QuEChERS-UHPLC-MS/MS Method*. Foods, 2024. **13**(7): p. 1081.
87. Nakajima, T., et al., *Screening Assay of Residual Antibiotics in Livestock Samples by LC-MS/MS*. Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), 2012. **53**(2): p. 91-97.
88. Pérez-Burgos, R., et al., *Quechers methodologies as an alternative to solid phase extraction (SPE) for the determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 2012. **899**: p. 57-65.
89. Jia, W., et al., *High-throughput untargeted screening of veterinary drug residues and metabolites in tilapia using high resolution orbitrap mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2017. **957**: p. 29-39.
90. Jia, W., L. Shi, and X. Chu, *Untargeted screening of sulfonamides and their metabolites in salmon using liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry*. Food Chemistry, 2018. **239**: p. 427-433.

91. Schwaiger, B., J. König, and C. Lesueur, *Development and Validation of a Multi-class UHPLC-MS/MS Method for Determination of Antibiotic Residues in Dairy Products*. Food Analytical Methods, 2018. **11**(5): p. 1417-1434.
92. Grande-Martínez, Á., et al., *Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018. **155**: p. 27-32.
93. Bessaire, T., et al., *Screening of 23 β -lactams in foodstuffs by LC-MS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2018. **35**(4): p. 662-674.
94. Poole, C.F. and S.K. Poole, *Principles and Practice of Solid-Phase Extraction*. Comprehensive Sampling and Sample Preparation, 2012. **2**: p. 273-297.
95. Poole, C.F., *New trends in solid-phase extraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(6): p. 362-373.
96. Poole, C.F., *Chapter 12 Principles and practice of solid-phase extraction*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2002, Elsevier. p. 341-387.
97. Badawy, M.E.I., et al., *A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis*. Analytical Sciences, 2022. **38**(12): p. 1457-1487.
98. Camel, V., *Solid-phase extraction*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2003, Elsevier. p. 393-457.
99. Piet Franke, J. and R.A. de Zeeuw, *Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **713**(1): p. 51-59.
100. Wells, M.J.M., *Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids*, in *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. 2003. p. 37-138.
101. Buszewski, B. and M. Szultka, *Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2012. **42**(3): p. 198-213.
102. Guo, L., et al., *Analysis of sulfamerazine in pond water and several fishes by high-performance liquid chromatography using molecularly imprinted solid-phase extraction*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(6): p. 2291-2298.
103. Alexander, C., et al., *Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003*. Journal of Molecular Recognition, 2006. **19**(2): p. 106-180.
104. Becker, M., E. Zittlau, and M. Petz, *Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2004. **520**(1): p. 19-32.
105. Heller, D.N., et al., *Development of Multiclass Methods for Drug Residues in Eggs: Hydrophilic Solid-Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis of Tetracycline, Fluoroquinolone, Sulfonamide, and β -Lactam Residues*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(15): p. 5267-5278.
106. Turnipseed, S.B., et al., *Multi-class, multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(10): p. 1467-80.
107. Vidal, J.L., et al., *Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(5): p. 1760-7.
108. Zhu, Z., et al., *Development of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Method for Simultaneous Determination of 15 Aminoglycoside Residues in Porcine Tissues*. Food Analytical Methods, 2016. **9**(9): p. 2587-2599.
109. Salikin, J. and A. Abdullah, *Determination of macrolide antibiotics in chicken tissues by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. AIP Conference Proceedings, 2013. **1571**(1): p. 702-709.

110. Dasenaki, M.E., C.S. Michali, and N.S. Thomaidis, *Analysis of 76 veterinary pharmaceuticals from 13 classes including aminoglycosides in bovine muscle by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2016. **1452**: p. 67-80.
111. Chiesa, L.M., et al., *Antibiotic use in heavy pigs: Comparison between urine and muscle samples from food chain animals analysed by HPLC-MS/MS*. Food Chemistry, 2017. **235**: p. 111-118.
112. Zheng, W., et al., *Development and validation of a solid-phase extraction method coupled with LC–MS/MS for the simultaneous determination of 16 antibiotic residues in duck meat*. Biomedical Chromatography, 2019. **33**(5): p. e4501.
113. Zhang, C., et al., *Rapid determination of amoxicillin in porcine tissues by UPLC-MS/MS with internal standard*. Journal of Food Composition and Analysis, 2020. **92**: p. 103578.
114. Guo, Y., et al., *Concurrent Determination of Tigecycline, Tetracyclines and Their 4-Epimer Derivatives in Chicken Muscle Isolated from a Reversed-Phase Chromatography System Using Tandem Mass Spectrometry*. Molecules, 2022. **27**(19): p. 6139.
115. He, J., et al., *The Rapid Analysis of Antibiotics in Animal Meat and Egg Using a Novel SEP Method and UPLC–MS/MS*. Chromatographia, 2017. **80**(9): p. 1329-1342.
116. Lu, Z., et al., *A pass-through solid-phase extraction clean-up method for the determination of 11 quinolone antibiotics in chicken meat and egg samples using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Microchemical Journal, 2019. **151**: p. 104213.
117. Guo, Y., et al., *Detection and determination of spectinomycin and lincomycin in poultry muscles and pork by ASE-SPE-GC–MS/MS*. Journal of Food Composition and Analysis, 2021. **101**: p. 103979.
118. Hou, X.-L., et al., *Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk*. Journal of Chromatography B, 2014. **962**: p. 20-29.
119. Stolker, A.A., et al., *Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS*. Anal Bioanal Chem, 2008. **391**(6): p. 2309-22.
120. Berendsen, B.J.A., et al., *Comprehensive analysis of β -lactam antibiotics including penicillins, cephalosporins, and carbapenems in poultry muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(24): p. 7859-7874.
121. Gbylik, M., et al., *Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013. **30**(6): p. 940-948.
122. Li, X., et al., *Untargeted multi-residue method for the simultaneous determination of 141 veterinary drugs and their metabolites in pork by high-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2020. **1634**: p. 461671.
123. He, J., et al., *Molecularly Imprinted Polymer Online Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography–UV for the Determination of Three Sulfonamides in Pork and Chicken*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(9): p. 2919-2925.
124. García Mayor, M.A., et al., *Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer for the determination of spiramycin in sheep milk*. Food Chemistry, 2017. **221**: p. 721-728.
125. Barahona, F., et al., *Molecularly imprinted polymer-hollow fiber microextraction of hydrophilic fluoroquinolone antibiotics in environmental waters and urine samples*. Journal of Chromatography A, 2019. **1587**: p. 42-49.

126. Zhao, S., et al., *Developing and Optimizing an Immunoaffinity Cleanup Technique for Determination of Quinolones from Chicken Muscle*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(2): p. 365-371.
127. Li, C., et al., *Development of an immunoaffinity column method using broad-specificity monoclonal antibodies for simultaneous extraction and cleanup of quinolone and sulfonamide antibiotics in animal muscle tissues*. J Chromatogr A, 2008. **1209**(1-2): p. 1-9.
128. Wang, J. and S.B. Turnipseed, *Chemical Analysis: Quantitative and Confirmatory Methods*, in *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. 2011. p. 187-226.
129. Al-Afy, N., et al., *Determination of three tetracyclines in bovine milk using magnetic solid phase extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC*. Journal of Chromatography B, 2018. **1092**: p. 480-488.
130. Hlabangana, L. and S. Memeza, *Ion-pair isocratic simultaneous determination of broad spectrum antibiotics in environmental samples by HPLC with UV detection*. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2018. **10**: p. 104-111.
131. Cámara, M., et al., *An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk*. Food Chemistry, 2013. **141**(2): p. 829-834.
132. Rambla-Alegre, M., et al., *Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC*. Food Chemistry, 2010. **123**(4): p. 1294-1302.
133. Cherif, K., et al., *Analysis of danofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin and sarafloxacin in honey using micellar liquid chromatography and validation according to the 2002/657/EC decision*. Anal. Methods, 2015. **7**.
134. Tayeb-Cherif, K., et al., *Use of micellar liquid chromatography to analyze oxolinic acid, flumequine, marbofloxacin and enrofloxacin in honey and validation according to the 2002/657/EC decision*. Food Chemistry, 2016. **202**: p. 316-323.
135. Terrado-Campos, D., et al., *Determination of oxolinic acid, danofloxacin, ciprofloxacin, and enrofloxacin in porcine and bovine meat by micellar liquid chromatography with fluorescence detection*. Food Chemistry, 2017. **221**: p. 1277-1284.
136. Peris-Vicente, J., et al., *Validation of a procedure to quantify oxolinic acid, danofloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in selected meats by micellar liquid chromatography according to EU Commission Decision 2002/657/EC*. ELECTROPHORESIS, 2017. **38**(16): p. 2011-2017.
137. Peris-Vicente, J., et al., *A rapid and reliable assay to determine flumequine, marbofloxacin, difloxacin, and sarafloxacin in commonly consumed meat by micellar liquid chromatography*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019. **99**(3): p. 1375-1383.
138. Zhang, X., et al., *Determination of eight quinolones in milk using immunoaffinity microextraction in a packed syringe and liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography B, 2017. **1064**: p. 68-74.
139. Tang, Y., et al., *Qualitative and quantitative determination of tilmicosin in poultry eggs by gas chromatography tandem mass spectrometry after derivatization with acetic anhydride*. Food Chemistry, 2022. **384**: p. 132572.
140. Janiszewska, D., M. Szultka-Młyńska, and B. Buszewski, *Analityka antybiotyków β -laktamowych w układzie in silico, in vitro oraz in vivo*. Wiadomości Chemiczne, 2022. **76**(3-4): p. 109-127.
141. Balizs, G. and A. Hewitt, *Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2003. **492**(1): p. 105-131.
142. Sudera P., A.B.-K., Silberring J., *Spektrometria mas*. 2016, Wydawnictwo AGH, Kraków. 61-64.

143. Chiesa, L., et al., *Validated multiclass targeted determination of antibiotics in fish with high performance liquid chromatography–benchtop quadrupole orbitrap hybrid mass spectrometry*. Food Chemistry, 2018. **258**: p. 222-230.
144. Moreno-González, D., et al., *Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples*. Journal of Chromatography A, 2017. **1510**: p. 100-107.
145. Jank, L., et al., *High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid–liquid extraction technique and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis (LC–MS/MS)*. Talanta, 2015. **144**: p. 686-695.
146. Park, S.Y., et al., *Simultaneous detection of residues of 34 beta-lactam antibiotics in livestock and fish samples through liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Science and Biotechnology, 2024. **33**(6): p. 1467-1486.
147. Chen, J., G.-G. Ying, and W.-J. Deng, *Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019. **67**(27): p. 7569-7586.
148. van der Heeft, E., et al., *Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(3): p. 451-463.
149. Kim, K.-R. and H.-R. Yoon, *Rapid screening for acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by gas chromatography-mass spectrometry in the selected-ion monitoring mode*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996. **682**(1): p. 55-66.
150. Białk-Bielińska, A., et al., *Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC–MS/MS*. Talanta, 2009. **80**(2): p. 947-953.
151. Fagerquist, C.K. and A.R. Lightfield, *Confirmatory analysis of β -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(7): p. 660-671.
152. Mani, D.R., S.E. Abbatiello, and S.A. Carr, *Statistical characterization of multiple-reaction monitoring mass spectrometry (MRM-MS) assays for quantitative proteomics*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**(16): p. S9.
153. Barros, S.C., A.S. Silva, and D. Torres *Multiresidues Multiclass Analytical Methods for Determination of Antibiotics in Animal Origin Food: A Critical Analysis*. Antibiotics, 2023. **12**, DOI: 10.3390/antibiotics12020202.
154. Núñez, O., et al., *New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis*. J Chromatogr A, 2012. **1228**: p. 298-323.
155. van Holthoon, F., et al., *Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2010. **396**(8): p. 3027-40.
156. Zhang, X., et al., *Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(32): p. 3421-6.
157. Chiao Chan, C., et al., *Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle*. Anal Chim Acta, 2010. **682**(1-2): p. 117-29.
158. Junza, A., et al., *Comparative study of the LC–MS/MS and UPLC–MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk, and validation*

- according to the regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography B*, 2011. **879**(25): p. 2601-2610.
159. Macarov, C.A., et al., *Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC–MS/MS*. *Food Chemistry*, 2012. **135**(4): p. 2612-2621.
 160. Kukusamude, C., et al., *High performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of penicillin residues in beef and milk using ion-paired extraction and binary water–acetonitrile mixture*. *Talanta*, 2012. **92**: p. 38-44.
 161. Karageorgou, E.G., V.F. Samanidou, and I.N. Papadoyannis, *Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of β -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection*. *Journal of Separation Science*, 2012. **35**(19): p. 2599-2607.
 162. Maggi, L., et al., *On-line Solid-Phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography–Ion Trap Tandem Mass Spectrometry for Determination of Penicillins in Catfish*. *Food Analytical Methods*, 2012. **5**(5): p. 1047-1053.
 163. Jank, L., et al., *High-throughput method for the determination of residues of β -lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015. **32**(12): p. 1992-2001.
 164. Dorival-García, N., et al., *Simultaneous determination of quinolone and β -lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC–MS/MS analysis*. *Food Control*, 2016. **60**: p. 382-393.
 165. Baeza, A.N., et al., *Multiresidue analysis of cephalosporin antibiotics in bovine milk based on molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2016. **1474**: p. 121-129.
 166. Huang, Z., et al., *Determination of 15 β -lactam antibiotics in pork muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Food Control*, 2016. **66**: p. 145-150.
 167. Moretti, S., et al., *Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat*. *J Chromatogr A*, 2016. **1429**: p. 175-88.
 168. Turnipseed, S.B., et al., *Wide-Scope Screening Method for Multiclass Veterinary Drug Residues in Fish, Shrimp, and Eel Using Liquid Chromatography–Quadrupole High-Resolution Mass Spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017. **65**(34): p. 7252-7267.
 169. Bessaire, T., et al., *Screening of 23 β -lactams in foodstuffs by LC-MS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction*. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018. **35**(4): p. 661-673.
 170. Karageorgou, E., et al. *Detection of β -Lactams and Chloramphenicol Residues in Raw Milk—Development and Application of an HPLC-DAD Method in Comparison with Microbial Inhibition Assays*. *Foods*, 2018. **7**, DOI: 10.3390/foods7060082.
 171. Lehotay, S.J. and A.R. Lightfield, *Simultaneous analysis of aminoglycosides with many other classes of drug residues in bovine tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an ion-pairing reagent added to final extracts*. *Anal Bioanal Chem*, 2018. **410**(3): p. 1095-1109.
 172. Giusepponi, D., et al., *Transfer of a Multiclass Method for over 60 Antibiotics in Food from High Resolution to Low Resolution Mass Spectrometry*. *Molecules*, 2019. **24**(16).
 173. Moretti, S., et al., *Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk*. *J Mass Spectrom*, 2016. **51**(9): p. 792-804.
 174. Gajda, A., et al., *Multi-residues UHPLC–MS/MS analysis of 53 antibacterial compounds in poultry feathers as an analytical tool in food safety assurance*. *Journal of Chromatography B*, 2019. **1104**: p. 182-189.

175. Amelin, V.G., D.S. Bol'shakov, and I.V. Podkolzin, *Rapid Screening and Determination of Residual Amounts of β -Lactam Antibiotics in Foods by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Chemistry, 2020. **75**(9): p. 1177-1188.
176. Cheng, G., et al., *A highly sensitive and selective method for the determination of ceftiofur sodium in milk and animal-origin food based on molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with HPLC-UV*. Food Chemistry, 2021. **347**: p. 129013.
177. Paoletti, F., et al., *Development and validation of a multiclass confirmatory method for the determination of over 60 antibiotics in eggs using liquid-chromatography high-resolution mass spectrometry*. Food Control, 2021. **127**: p. 108109.
178. Salis, S., et al., *Analytical Approaches in Official Food Safety Control: An LC-Orbitrap-HRMS Screening Method for the Multiresidue Determination of Antibiotics in Cow, Sheep, and Goat Milk*. Molecules, 2022. **27**(19).
179. Lakew, A., et al., *Development and validation of liquid chromatography method for simultaneous determination of multiclass seven antibiotic residues in chicken tissues*. BMC Chemistry, 2022. **16**(1): p. 5.
180. Wu, J., et al., *Determination of β -lactam antibiotics in animal derived foods by modified QuEChERS coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Food Composition and Analysis, 2023. **122**: p. 105437.
181. PN-EN ISO/IEC 17025:2017 *Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących*.
182. PN-EN ISO 17034:2017. *Ogólne wymagania dotyczące kompetencji producentów materiałów odniesienia*.
183. PN-EN ISO 9001:2015 *Systemy zarządzania jakością – Wymagania*.
184. Bładek, T., et al., *MULTI-CLASS PROCEDURE FOR ANALYSIS OF ANTIBACTERIAL COMPOUNDS IN ANIMAL TISSUES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY*. Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy, 2011. **55**: p. 741-748.
185. Kan, C.A. and M. Petz, *Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(12): p. 6397-403.
186. Wang, J., D. Leung, and F. Butterworth, *Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(6): p. 1857-65.
187. Nikolaidou, K.I., V.F. Samanidou, and I.N. Papadoyannis, *Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Seven Tetracycline Antibiotics Residues in Chicken Muscle and Egg Yolk According to 2002/657/EC*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008. **31**(14): p. 2141-2158.
188. Capriotti, A.L., et al., *Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg*. J Chromatogr A, 2012. **1268**: p. 84-90.
189. Gómez-Pérez, M.L., et al., *Analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry: comparison between time-of-flight and Orbitrap*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2015. **32**(10): p. 1637-46.
190. Piatkowska, M., P. Jedziniak, and J. Zmudzki, *Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Food Chemistry, 2016. **197**: p. 571-580.
191. Bładek, T., et al., *Multi-Class Procedure for Analysis of Antibacterial Compounds in Eggs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Veterinary Research, 2012. **56**(3): p. 321-327.
192. Wang, J. and D. Leung, *Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight*

- mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. **21**(19): p. 3213-3222.
193. Stubbings, G. and T. Bigwood, *The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, EAsy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **637**(1): p. 68-78.
 194. Garrido Frenich, A., et al., *Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2010. **661**(2): p. 150-160.
 195. Romero-González, R., A. Garrido Frenich, and J.L. Martínez Vidal, *Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 2008. **76**(1): p. 211-25.
 196. Hou, X., et al., *Application of a multiclass screening method for veterinary drugs and pesticides using HPLC-QTOF-MS in egg samples*. *Food Chemistry*, 2020. **309**: p. 125746.
 197. Rodrigues, H., et al., *Antibiotics in honey: a comprehensive review on occurrence and analytical methodologies*. *Open Res Eur*, 2024. **4**: p. 125.
 198. EURL, *EURL GUIDANCE ON MINIMUM METHOD PERFORMANCE REQUIREMENTS (MMPRs) FOR SPECIFIC PHARMACOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN SPECIFIC ANIMAL MATRICES*. wrzesień 2020.
 199. Kujawski, M.W. and J. Namieśnik, *Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(9): p. 785-793.
 200. Zhang, Y., et al., *Antibiotic residues in honey: A review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2019. **110**: p. 344-356.
 201. Debayle, D., G. Dessalces, and M.F. Grenier-Loustalot, *Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS*. *Anal. Bioanal. Chem*, 2008. **391**: p. 1011.
 202. Galarini, R., et al., *Multiclass determination of 27 antibiotics in honey*. *Food Control*, 2015. **48**: p. 12-24.
 203. Kaufmann, A., et al., *Quantitative LC/MS-MS Determination of Sulfonamides and Some Other Antibiotics in Honey*. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2019. **85**(4): p. 853-860.
 204. Lopez, M.I., et al., *Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS*. *J. Agric. Food Chem.*, 2008. **56**: p. 1553.
 205. Maudens, K.E., G.F. Zhang, and W.E. Lamber, *Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection*. *J. Chromatogr., A*, 2004. **1047**: p. 85.
 206. Shendy, A.H., et al., *Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey*. *Food Chemistry*, 2016. **190**: p. 982-989.
 207. Jakšić, S.M., et al., *Methods of Determination of Antibiotic Residues in Honey*. *Journal of Analytical Chemistry*, 2018. **73**(4): p. 317-324.
 208. Lopez, M.I., et al., *Multiclass Determination and Confirmation of Antibiotic Residues in Honey Using LC-MS/MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(5): p. 1553-1559.
 209. Tölgyesi, Á., et al., *ANALYSIS OF SULFONAMIDE RESIDUES IN REAL HONEY SAMPLES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE AND TANDEM MASS SPECTROMETRY DETECTION*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2013. **36**(8): p. 1105-1125.

210. Tölgyesi, Á., et al., *Determination of Antimicrobial Residues in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. Food Analytical Methods, 2018. **11**(8): p. 2043-2055.
211. Kaufmann, A., *Validation of multiresidue methods for veterinary drug residues; related problems and possible solutions*. Analytica Chimica Acta, 2009. **637**(1): p. 144-155.
212. ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r. w sprawie wydajności metod analitycznych w odniesieniu do pozostałości substancji farmakologicznie czynnych stosowanych u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, oraz interpretacji wyników, jak również w sprawie metod stosowanych do pobierania próbek oraz uchylające decyzje 2002/657/WE i 98/179/WE. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, 21.5.2021.
213. Bulska, E., *Metrologia chemiczna: sztuka prowadzenia pomiarów*. 2008: Wydawnictwo Malamut.
214. Commission Decision 2002/657/EEC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Commun.: p. 8.
215. <https://sitesv2.anses.fr/en/minisite/eurl-fougères/table-stability-some-antimicrobials-stock-standard-solutions-version-01-%E2%80%9393>.
216. Berendsen, B.J., I.J. Elbers, and A.A. Stolker, *Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2011. **28**(12): p. 1657-66.
217. Lehotay, S.J., et al., *Stability study of selected veterinary drug residues spiked into extracts from different food commodities*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2023. **40**(9): p. 1198-1217.
218. Desmarchelier, A., et al., *Stability study of veterinary drugs in standard solutions for LC-MS/MS screening in food*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2018. **35**(4): p. 696-706.
219. Gaugain, M., M.P. Chotard, and E. Verdon, *Stability study for 53 antibiotics in solution and in fortified biological matrixes by LC/MS/MS*. J AOAC Int, 2013. **96**(2): p. 471-80.
220. Ellison, S., et al., *Eurachem/CITAC Guide CG4. Quantifying Measurement Uncertainty in Analytical Measurement*. 2000.
221. EA, EA-4/16 G: 2003 Wytyczne EA dotyczące wyrażania niepewności w badaniach ilościowych. 2003.
222. POLLAB, *Biuletyn informacyjny nr 2/37/2002 - Przewodnik EUROCHEM/CITAC*. 2002.
223. ROZPORZĄDZENIE (WE) NR 882/2004 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, 30.4.2004.
224. Authority, E.F.S., S. Salvatore, and M.V. Ferrer, *Report for 2023 on the results from the monitoring of residues of veterinary medicinal products in live animals and animal products*. EFSA Supporting Publications, 2025. **22**(2): p. 9297E.

Spis ilustracji

Rysunek 1. Pierścień β -laktamowy	16
Rysunek 2. Antybiotyki β -laktamowe	17
Rysunek 3. Przykłady antybiotyków z grupy penicylin	18
Rysunek 4. Przykłady antybiotyków z grupy cefalosporyn	19
Rysunek 5. Przykłady antybiotyków z grupy aminoglikozydów	21
Rysunek 6. Przykłady antybiotyków z grupy makrolidów	24
Rysunek 7. Przykłady antybiotyków z grupy sulfonamidów	27
Rysunek 8. Przykłady antybiotyków z grupy fluorochinolonów	29
Rysunek 9. Przykłady antybiotyków z grupy tetracyklin	30
Rysunek 10. Przykłady antybiotyków z grupy linkozamidów	31
Rysunek 11. Trimetoprim - antybiotyk z grupy diaminopirymidyn	32
Rysunek 12. Przykłady antybiotyków z grupy pleuromutylin	33
Rysunek 13. Schemat kluczowych etapów oryginalnej techniki QuEChERS	38
Rysunek 14. Budowa pojedynczej kolumny SPE	41
Rysunek 15. Typowy aparat stosowany podczas ekstrakcji do fazy stałej	42
Rysunek 16. Etapy procesu ekstrakcji do fazy stałej	43
Rysunek 17. Graficzne przedstawienie wartości progowych T i Fm [178]	176

Spis tabel

Tabela 1. Przykłady sorbentów stosowanych w fazie odwróconej w SPE [97, 101]	44
Tabela 2. Przykłady sorbentów stosowanych w fazie normalnej w SPE [97, 101]	45
Tabela 3. Przykłady sorbentów jonowymiennych stosowanych w SPE [97, 101]	45
Tabela 4. Przykłady sorbentów polimerowych stosowanych w SPE [63]	46
Tabela 5. Przykłady metodyk przygotowania próbek, zastosowanych kolumn chromatograficznych, faz ruchomych oraz sprzętu analitycznego	55
Tabela 6. Wytypowane antybiotyki i matryce	66
Tabela 7. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – tkanka mięśniowa	76
Tabela 8. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – mleko	78
Tabela 9. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – nerka	80
Tabela 10. Sposób przygotowania próbek fortyfikowanych	83
Tabela 11. Parametry dla związków po ekstrakcji MeCN	86
Tabela 12. Parametry dla związków po ekstrakcji TCA	88
Tabela 13. Gradient dla związków po ekstrakcji acetonitrylem	90
Tabela 14. Gradient dla związków po ekstrakcji kwasem trichlorooctowym	91
Tabela 15. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 1 i Doświadczeniu 2	95
Tabela 16. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 3 i Doświadczeniu 4	97
Tabela 17. Uzyskane odzyski ekstrakcji antybiotyków z mleka krowiego	99
Tabela 18. Uzyskane odzyski ekstrakcji antybiotyków z nerek	100
Tabela 19. Chromatogramy oznaczanych antybiotyków – matryca mięśnie	106
Tabela 20. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – jaja	111
Tabela 21. Sposób przygotowania próbek fortyfikowanych - matryca jaja	113
Tabela 22. Parametry dla antybiotyków - matryca jaja	115
Tabela 23. Gradient faz ruchomych dla oznaczania antybiotyków w jajach	118
Tabela 24. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 2 i Doświadczeniu 3 (matryca jaja)	122
Tabela 25. Chromatogramy oznaczanych antybiotyków – matryca jaja	128
Tabela 26. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – miody ekstrakcja na kolumnkach Strata X	133
Tabela 27. Ilości wzorców dodawane do roztworów roboczych – miody ekstrakcja na kolumnkach Oasis HLB	134
Tabela 28. Sposób przygotowania próbek fortyfikowanych - matryca miody	136
Tabela 29. Parametry dla związków po ekstrakcji SPE – Strata-X	140
Tabela 30. Parametry dla związków po ekstrakcji SPE - Oasis HLB	141
Tabela 31. Gradient faz ruchomych dla oznaczania antybiotyków w miodach	143
Tabela 32. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 1 (matryca miody)	147
Tabela 33. Uzyskane odzyski w Doświadczeniu 2 i Doświadczeniu 3 (matryca miody)	148

Tabela 34. Chromatogramy oznaczanych antybiotyków – matryca miód.....	154
Tabela 35. Porównanie wymaganych parametrów walidacyjnych dla metod ilościowych przesiewowych i potwierdzających zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808.....	157
Tabela 36. Karta - Liniowość sygnału.....	160
Tabela 37. Karta oceny selektywności i specyficzności.....	162
Tabela 38. Kryteria akceptowalności współczynnika zmienności.....	165
Tabela 39. Kryteria dla poprawności/odzysku.....	165
Tabela 40. Karta obliczania powtarzalności.....	166
Tabela 41. Karta obliczania odtwarzalności.....	167
Tabela 42. Karta próbek z dodatkiem wzorca – 2 µg/kg.....	168
Tabela 43. Karta próbek z dodatkiem wzorca – 4 µg/kg.....	169
Tabela 44. Karta próbek z dodatkiem wzorca – 6 µg/kg.....	170
Tabela 45. Karta obliczania CC α – związki niedozwolone/zakazane.....	173
Tabela 46. Karta obliczania CC α – związki z wyznaczonym MRL.....	174
Tabela 47. Karta obliczania CC β	177
Tabela 48. Karta oceny względnego efektu matrycowego.....	179
Tabela 49. Plan doświadczeń.....	180
Tabela 50. Ocena odporności metody.....	183
Tabela 51. Budżet niepewności.....	186
Tabela 52. Raport z walidacji strona 1.....	189
Tabela 53. Raport z walidacji strona 2.....	190
Tabela 54. Liczba próbek przebadanych w latach 2020-2024.....	199
Tabela 55. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2020 roku.....	201
Tabela 56. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2021 roku.....	202
Tabela 57. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2022 roku.....	203
Tabela 58. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2023 roku.....	204
Tabela 59. Zestawienie liczby próbek mięśni z 2024 roku.....	205
Tabela 60. Próbkki zgodne powyżej CC β	209
Tabela 61. Zestawienie liczby próbek mleka przebadanych w latach 2020-2024.....	211
Tabela 62. Zestawienie liczby próbek jaj przebadanych w latach 2020-2024.....	214
Tabela 63. Zestawienie liczby próbek miodów przebadanych w latach 2022-2024.....	216
 Tabela A 1. Wyniki z Doświadczenia 1.....	 249
Tabela A 2. Wyniki z Doświadczenia 2.....	252
Tabela A 3. Wyniki z Doświadczenia 3.....	255
Tabela A 4. Wyniki z Doświadczenia 4.....	257
Tabela A 5. Wyniki analizy mleka krowiego (ekstrakcja MeCN oraz TCA).....	258

Tabela A 6. Wyniki analizy nerek (ekstrakcja MeCN oraz TCA)	262
Tabela A 7. Wyniki z Doświadczenia 2 (matryca jaja)	266
Tabela A 8. Wyniki z Doświadczenia 3 (matryca jaja)	270
Tabela A 9. Wyniki z Doświadczenia 1 (matryca miody).....	273
Tabela A 10. Wyniki z Doświadczenia 2 (matryca miody).....	275
Tabela A 11. Wyniki z Doświadczenia 3 (matryca miody).....	276

Spis wykresów

Wykres 1. Średni odzysk antybiotyków w czterech doświadczeniach – porównanie grup	94
Wykres 2. Porównanie średnich odzysków antybiotyków w mleku, nerkach i mięśniach	99
Wykres 3. Wykresy krzywych wzorcowych dla analizowanych antybiotyków	103
Wykres 4. Średni odzysk antybiotyków z matrycy jaja – porównanie Doświadczenia 2 i Doświadczenia 3	123
Wykres 5. Wykresy krzywych wzorcowych dla oznaczanych antybiotyków w jajach	126
Wykres 6. Średni odzysk antybiotyków z matrycy miodu – Doświadczenie 1	148
Wykres 7. Średni odzysk antybiotyków z matrycy miodu – porównanie Doświadczenia 2 i Doświadczenia 3	149
Wykres 8. Wykresy krzywych wzorcowych dla oznaczanych antybiotyków w miodach	152
Wykres 9. Liczba próbek badanych w latach 2020-2024	200
Wykres 10. Udział procentowy próbek mięśni według pochodzenia (2020–2024)	206
Wykres 11. Badane gatunki zwierząt w latach 2020-2024	207
Wykres 12. Liczba próbek niezgodnych w latach 2020-2024	207
Wykres 13. Rodzaje oznaczonych antybiotyków w próbkach niezgodnych w latach 2020-2024	208
Wykres 14. Najczęściej wykrywane antybiotyki w tkance mięśniowej w latach 2020-2024 – próbki zgodne	209
Wykres 15. Udział procentowy próbek mleka według pochodzenia (2020–2024)	210
Wykres 16. Udział procentowy próbek jaj według pochodzenia (2020–2024)	214
Wykres 17. Udział procentowy próbek miodów według pochodzenia (2022–2024)	217

Spis dokumentów

Dokument 1. Procedura Badawcza PBC-101.00.00	192
Dokument 2. Procedura Badawcza PBC-106.00.00	193
Dokument 3. Procedura Badawcza PBC-25.00.00	194
Dokument 4. Certyfikat Akredytacji Nr AB 465	278
Dokument 5. Zakres Akredytacji Laboratorium Badawczego	279
Dokument 6. Lista akredytowanych działań prowadzonych w ramach zakresu elastycznego.....	283

Aneks

Tabela A 1. Wyniki z Doświadczenia 1

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Fluorochinolony											
Marbifloksacyna	mięśnie	75	80,6	68,6	71,1	70,8	73,0	71,5	96,8	96,7	96,4
		150	134	147	138	139	143	155	95,1		
		225	213	226	246	214	211	215	98,2		
Norfloksacyna	mięśnie	50	51,2	52,0	48,5	48,1	48,2	43,9	97,3	97,3	
		100	107	91,2	93,4	102	95,3	95,0	97,4		
		150	134	151	149	143	143	155	97,3		
Ciprofloksacyna	mięśnie	50	47,1	51,1	52,2	47,2	51,6	49,4	99,5	96,3	
		100	92,1	96,1	97,3	93,3	102	95,7	96,0		
		150	145	132	139	134	136	155	93,5		
Danofloksacyna	mięśnie	50	47,1	46,3	52,1	48,5	50,8	48,3	97,7	96,1	
		100	85,9	98,9	95,2	95,5	96,5	98,6	95,1		
		150	145	145	155	138	147	128	95,4		
Enrofloksacyna	mięśnie	50	48,8	46,9	49,8	47,5	51,0	48,1	97,4	94,4	
		100	92,4	92,1	93,3	85,0	94,8	93,4	91,8		
		150	136	152	140	141	131	147	94,1		
Sarafloksacyna	mięśnie	15	15,9	14,5	15,0	13,8	12,9	12,3	93,8	96,2	
		30	27,4	30,1	29,5	33,7	30,7	26,5	98,8		
		45	42,2	46,5	41,3	44,5	41,3	43,1	95,9		
Difloksacyna	mięśnie	150	150	147	148	153	144	162	100	98,2	
		300	318	298	272	301	308	267	98,0		
		450	422	432	395	434	469	445	96,2		
Kwas oksolinowy	mięśnie	50	45,5	48,7	51,1	51,0	45,0	45,0	95,4	96,1	
		100	95,6	95,9	103,0	96,9	90,0	92,9	95,7		
		150	130	144	159	151	142	148	97,1		
Kwas nalidyksowy	mięśnie	50	43,7	50,9	50,2	47,1	42,7	52,1	95,6	96,1	
		100	92,6	93,1	89,9	105	100	100	96,9		
		150	140	136	147	153	150	138	96,0		
Flumechina	mięśnie	100	85,1	94,5	92,4	90,5	101	98,1	93,7	96,1	
		200	204	190	198	200	191	195	98,0		
		300	280	293	308	285	292	282	96,6		
Sulfonamidy											
Sulfaguanidyna	mięśnie	50	47,5	50,2	42,6	48,9	51,5	49,0	96,6	97,2	
		100	92,9	96,5	95,1	96,0	96,8	96,5	95,6		
		150	150	149	150	148	150	146	99,3		
Sulfadiazyna	mięśnie	50	47,6	50,8	52,5	48,5	51,5	44,3	98,4	98,0	
		100	99,6	94,1	101	97,7	100	96,8	98,2		
		150	150	141	151	149	145	140	97,3		
Sulfametoksypyridazyna	mięśnie	50	51,2	45,1	45,9	52,1	45,0	47,2	95,5	95,3	

		100	101	95,2	96,5	95,1	92,3	94,5	95,8		
		150	147	143	140	136	133	152	94,5		
Sulfametazyna	mięśnie	50	48,7	45,8	49,0	45,8	50,5	48,8	96,2		
		100	95,6	94,3	99,2	94,6	97,2	100	96,8	96,0	
		150	149	144	140	139	135	147	94,9		
Sulfatiazol	mięśnie	50	51,0	49,3	48,1	43,0	49,0	40,1	93,5		
		100	94,7	96,9	101	94,6	99,6	98,0	97,5	95,7	
		150	147	145	145	140	141	148	96,3		
Sulfamonometoksyna	mięśnie	50	52,9	48,7	47,0	51,1	46,7	50,0	98,7		
		100	94,3	101	97,5	103	99,0	94,9	98,3	98,2	
		150	142	146	148	147	144	151	97,4		
Sulfadoksyna	mięśnie	50	53,4	50,2	54,0	51,6	50,5	49,3	103		
		100	92,7	101	97,8	99,5	93,4	98,9	97,1	97,1	
		150	132	150	140	139	126	135	91,3		
Sulfachinoksalina	mięśnie	50	45,9	48,4	50,6	45,2	47,7	44,5	94,1		
		100	90,5	91,0	87,0	92,4	91,0	92,1	90,7	93,8	
		150	151	150	141	135	148	145	96,5		
Sulfadimetoksyna	mięśnie	50	49,2	49,2	48,3	50,2	47,2	48,8	97,6		
		100	96,9	102	108	90,9	101	95,8	99,1	96,9	
		150	144	142	137	150	138	136	93,9		
Sulfametoksazol	mięśnie	50	48,1	51,0	49,6	48,0	50,2	49,2	98,7		
		100	95,3	95,2	90,9	92,9	99,5	96,1	95,0	95,8	
		150	152	141	132	146	128	146	93,9		
Sulfamerazyna	mięśnie	50	56,8	49,6	54,3	47,3	56,7	50,3	105		
		100	98,2	100	101	89,4	89,3	90,1	94,7	98,7	
		150	146	143	140	138	152	148	96,4		
β-laktamy											
Amoksycylina	mięśnie	25	21,6	21,8	25,3	21,0	22,3	21,4	89,0		
		50	45,9	45,3	45,2	43,2	47,1	41,3	89,4	90,6	
		75	57,0	69,0	78,4	72,4	78,5	65,3	93,5		
Ampicylina	mięśnie	25	19,6	23,7	17,5	23,7	23,8	25,4	89,1		
		50	42,7	43,8	53,2	44,5	43,6	44,9	90,9	90,8	
		75	65,6	69,8	68,4	66,8	69,7	75,1	92,3		
Penicylina G	mięśnie	25	21,6	25,0	23,8	23,6	23,2	23,0	93,4		
		50	49,0	44,0	45,6	46,4	40,3	43,9	89,7	92,1	
		75	72,8	63,7	68,0	75,0	65,8	74,0	93,2		
Penicylina V	mięśnie	12,5	11,4	12,0	13,1	10,3	12,5	11,7	94,6		
		25	20,2	20,6	23,4	23,5	23,1	25,4	90,8	92,3	
		37,5	38,7	34,7	36,0	31,6	33,3	31,4	91,5		
Oksacylina	mięśnie	150	148	156	114	153	133	127	92,3		
		300	265	238	223	268	257	246	83,1	88,9	
		450	377	426	436	433	416	373	91,1		
Kloksacylina	mięśnie	150	148	158	121	129	140	130	91,7		
		300	275	275	266	233	263	269	87,9	89,4	
		450	355	453	389	390	380	421	88,5		

90,3

Nafcylina	mięśnie	150	151	115	145	125	139	112	87,3	88,2
		300	221	255	332	290	289	303	93,9	
		450	357	322	365	372	455	380	83,4	
Dikloksacylina	mięśnie	150	158	134	126	128	153	173	96,9	96,1
		300	271	310	303	290	322	244	96,7	
		450	459	428	380	442	437	414	94,8	
Cefapiryna	mięśnie	25	19,3	21,9	23,9	24,9	20,2	23,6	89,2	90,7
		50	46,2	52,4	41,2	42,8	39,7	40,7	87,7	
		75	73,1	69,6	68,9	70,9	80,7	64,9	95,1	
Ceftiofur	mięśnie	500	432	464	460	467	465	521	93,7	91,3
		1000	985	952	902	833	826	851	89,1	
		1500	1404	1510	1420	1520	1200	1140	91,1	
Cefkwinom	mięśnie	25	23,3	20,0	20,5	20,3	23,7	23,5	87,5	88,2
		50	52,5	42,6	42,3	42,4	50,1	50,3	93,4	
		75	60,2	58,3	74,2	58,6	70,1	56,3	83,9	
Cefalonium	mięśnie	10	7,47	8,50	10,0	8,67	8,65	8,14	85,7	88,2
		20	14,5	16,9	19,0	16,2	19,2	18,3	86,8	
		30	26,6	28,9	24,6	25,9	29,8	29,8	92,0	
Cefazolina	mięśnie	25	21,7	19,8	20,6	25,2	21,7	21,6	87,0	89,4
		50	49,8	44,8	44,3	48,9	52,4	38,6	92,9	
		75	59,8	64,1	67,4	65,8	67,8	72,9	88,4	
Cefaleksyna	mięśnie	100	76,8	90,3	82,3	98,3	88,6	84,7	86,9	88,3
		200	187	152	200	187	188	168	90,2	
		300	306	251	257	258	260	251	88,0	
Cefoperazon	mięśnie	25	21,2	21,4	23,5	22,5	22,5	29,0	93,4	90,4
		50	51,7	48,4	39,2	41,9	45,5	46,4	91,0	
		75	68,3	54,9	65,1	70,8	64,2	66,8	86,7	
Makrolidy										
Tylozyna	mięśnie	50	55,0	44,2	43,8	43,7	44,2	49,1	93,3	96,9
		100	89,3	103	93,7	104	112	95,2	99,5	
		150	158	140	145	144	143	151	97,7	
Erytromycyna	mięśnie	100	87,8	85,8	92,6	89,7	93,4	94,1	90,6	94,5
		200	198	191	193	184	199	213	98,1	
		300	270	317	251	291	276	300	94,8	
Spiramycyna	mięśnie	100	112	97,0	88,6	102	91,5	109	100	97,9
		200	188	188	190	214	199	187	97,1	
		300	282	294	293	283	276	309	96,5	
Tylmikozyzna	mięśnie	25	23,6	28,0	26,4	24,1	24,2	25,6	101	99,0
		50	50,8	48,9	44,6	52,3	49,8	53,5	100	
		75	69,9	81,0	75,3	64,3	76,9	63,4	96	
Jozamycyna	mięśnie	100	104	100	96	100	98	102	100	96,6
		200	190	180	194	191	178	188	93,4	
		300	290	253	302	297	297	289	96,1	
Tulatromycyna	mięśnie	25	20,8	20,5	20,6	26,3	24,0	23,0	90,0	90,2
		50	47,9	39,8	46,9	45,5	44,3	39,6	88,0	

		75	80,3	69,0	65,6	70,1	67,6	64,4	92,7		
Diaminopirymidyny											
Trimetoprim	mięśnie	25	21,8	20,5	19,0	24,1	25,6	25,8	91,2	94,5	94,5
		50	50,3	47,2	50,5	45,7	44,5	43,1	93,8		
		75	75,5	72,9	74,2	73,6	73,3	74,2	98,6		
Pleuromutyliny											
Tiamulina	mięśnie	25	22,7	19,9	23,0	25,2	26,0	26,0	95,1	93,7	93,7
		50	46,5	48,9	45,6	50,0	43,2	43,0	92,4		
		75	72,7	74,6	75,7	66,8	65,9	65,0	93,5		
Tetracykliny											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Linkomycyna											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Aminoglikozydy											
Związki nie zostały wyekstrahowane – metoda nie pozwala na oznaczenie tej grupy związków											

Tabela A 2. Wyniki z Doświadczenia 2

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Fluorochinolony											
Marbofloksacyna	mięśnie	75	80,0	70,9	77,5	81,5	78,8	82,4	105	101	100
		150	149	147	147	145	153	147	98,6		
		225	227	226	222	221	231	224	100		
Norfloksacyna	mięśnie	50	50,5	50,9	48,3	49,0	48,3	45,2	97,4	97,9	
		100	102	94,0	95,7	98,1	98,1	98,8	97,9		
		150	145	146	148	147	151	148	98,4		
Ciprofloksacyna	mięśnie	50	50,9	50,8	53,1	47,8	52,5	54,2	103	101	
		100	101	100	102	102	104	99,5	101		
		150	151	147	151	149	147	151	99,6		
Danofloksacyna	mięśnie	50	53,1	48,2	53,5	54,4	51,7	53,6	105	101	
		100	101	101	99,0	95,4	96,9	95,5	98,2		
		150	153	148	147	151	150	150	99,9		
Enrofloksacyna	mięśnie	50	50,6	48,7	52,6	51,7	54,1	53,0	104	101	
		100	104	97,7	103	92,3	96,7	98,5	98,7		
		150	146	147	153	150	150	151	99,8		
Sarafloksacyna	mięśnie	15	16,0	15,7	15,7	14,2	14,5	13,9	100	98,6	
		30	29,1	29,5	29,9	30,8	29,8	29,0	98,9		
		45	44,8	43,2	43,4	43,1	43,2	43,7	96,8		
Difloksacyna	mięśnie	150	159	158	158	158	145	148	103	101	
		300	291	315	290	315	303	314	102		
		450	439	442	458	449	447	458	99,8		
Kwas oksolinowy	mięśnie	50	48,6	50,2	46,2	52,2	53,6	49,1	99,9	99,6	
		100	97,7	103	102	103	96,2	96,3	99,8		
		150	149	147	151	148	146	149	99,0		
Kwas nalidyksowy	mięśnie	50	53,7	52,1	52,0	51,3	50,3	47,9	102	100	

		100 150	102 148	96,2 146	97,9 144	103 153	102 145	100 150	100 98,5		
Flumechina	mięśnie	100 200 300	99,4 205 299	99,5 195 300	106 201 294	112 205 304	107 198 296	104 204 302	105 101 99,7	102	
Sulfonamidy											
Sulfaguanidyna	mięśnie	50 100 150	50,7 95,6 149	52,1 100,6 152	52,3 95,6 150	49,9 97,2 152	53,5 95,5 153	46,6 98,6 150	102 97,2 101	99,8	
Sulfadiazyna	mięśnie	50 100 150	49,5 98,8 151	54,1 97,5 145	51,7 103 145	52,0 99,1 147	52,3 99,7 146	48,7 95,9 149	103 99,0 98,2	100	
Sulfametoksypyridazyna	mięśnie	50 100 150	52,7 102 150	52,6 103 150	56,8 103 146	54,9 104 148	53,0 101 145	48,9 96,3 147	106 102 98,4	102	
Sulfametazyna	mięśnie	50 100 150	53,4 101 151	52,3 97,0 146	53,1 99,3 144	52,8 101 150	53,6 101 148	50,8 103 147	105 100 98,6	101	
Sulfatiazol	mięśnie	50 100 150	53,4 99,6 151	52,6 102 148	50,9 101 150	53,3 103 150	47,5 100 148	53,2 98,7 148	104 101 99,3	101	
Sulfamonometoksyna	mięśnie	50 100 150	54,8 95,6 152	50,2 103 149	54,3 99,3 145	52,7 102 146	50,4 103 149	48,9 101 153	104 101 99,3	101	101
Sulfadoksyna	mięśnie	50 100 150	52,7 99,9 151	51,9 104 147	53,2 103 146	56,2 100 151	55,4 103 145	48,9 98,5 148	106 102 98,7	102	
Sulfachinoksalina	mięśnie	50 100 150	52,5 96,3 152	50,5 98,9 152	49,6 95,0 155	48,5 102 151	47,5 101 154	48,1 94,7 146	98,9 97,9 101	99,3	
Sulfadimetoksyna	mięśnie	50 100 150	54,2 102 150	50,7 104 145	53,4 103 145	50,7 99,9 151	50,2 105 149	51,1 98,9 149	103 102 98,7	101	
Sulfametoksazol	mięśnie	50 100 150	52,7 102 150	51,8 104 148	53,8 101 147	48,8 103 145	53,2 102 150	48,0 98,0 148	103 102 98,6	101	
Sulfamerazyna	mięśnie	50 100 150	54,1 101 151	51,1 99,2 147	54,5 101 148	54,9 98,4 147	54,7 104 147	51,3 98,4 152	107 100 99,1	102	
β-laktamy											
Amoksycylina	mięśnie	25 50 75	25,5 49,0 75,6	24,5 50,3 72,1	23,1 49,4 72,9	22,6 50,4 76,4	24,7 48,4 72,7	23,3 46,0 77,3	95,7 97,8 99,3	97,6	99,7
Ampicylina	mięśnie	25 50	24,9 46,6	22,3 48,6	23,5 48,5	25,6 48,7	23,5 48,0	25,7 49,4	96,9 96,6	98,1	

		75	73,7	76,1	77,9	76,8	76,0	73,1	101		
Penicylina G	mięśnie	25	28,1	24,4	27,8	25,1	25,5	23,5	103	101	
		50	52,5	47,7	51,9	52,7	52,6	47,2	102		
		75	76,4	74,4	71,9	73,3	77,0	72,5	99,0		
Penicylina V	mięśnie	12,5	14,2	13,7	13,5	12,9	13,2	11,2	105	102	
		25	25,5	25,8	24,1	24,8	26,4	23,6	100		
		37,5	37,8	35,7	37,3	37,8	37,7	37,4	99,4		
Oksacylina	mięśnie	150	173	158	168	153	158	145	106	102	
		300	287	299	300	308	306	281	98,9		
		450	445	444	445	445	451	465	99,8		
Kloksacylina	mięśnie	150	141	151	141	153	150	153	98,8	99,1	
		300	286	290	287	307	301	306	98,7		
		450	454	436	449	459	446	459	100		
Nafcylina	mięśnie	150	162	153	147	142	150	140	99,4	99,2	
		300	293	296	294	310	303	290	99,3		
		450	438	441	439	449	447	452	98,8		
Dikloksacylina	mięśnie	150	149	154	158	159	149	154	103	100	
		300	301	293	290	293	291	309	98,8		
		450	447	438	441	456	446	458	99,5		
Cefapiryna	mięśnie	25	23,0	25,9	24,7	26,0	25,1	22,7	98,3	98,2	
		50	47,6	48,5	50,8	51,1	49,2	47,1	98,1		
		75	72,1	75,0	73,1	73,5	71,8	76,2	98,2		
Ceftiofur	mięśnie	500	540	500	532	497	526	484	103	102	
		1000	1010	1000	990	1060	1050	1040	102		
		1500	1490	1520	1520	1510	1500	1510	100		
Cefkwinom	mięśnie	25	23,5	22,1	22,8	25,5	27,1	26,4	98,2	99,5	
		50	51,3	52,5	50,0	49,7	47,7	49,9	100		
		75	76,5	76,3	74,2	73,2	73,8	76,1	100		
Cefalonium	mięśnie	10	9,56	9,20	10,6	10,6	10,1	9,69	99,6	99,4	
		20	20,0	19,4	19,2	20,1	19,6	19,5	98,2		
		30	29,6	30,4	29,9	30,6	30,1	29,9	100		
Cefazolina	mięśnie	25	26,1	25,7	25,2	24,7	25,6	24,4	101	99,9	
		50	50,6	48,3	50,3	49,9	50,3	49,0	99,4		
		75	74,2	74,1	74,3	74,3	74,3	74,6	99,0		
Cefaleksyna	mięśnie	100	95,6	101	91,4	93,0	92,5	95,1	94,7	97,9	
		200	194	200	197	201	203	194	99,1		
		300	298	296	304	304	298	299	99,9		
Cefoperazon	mięśnie	25	25,7	26,1	23,6	27,0	25,4	24,7	102	99,8	
		50	49,3	50,0	51,1	48,7	48,6	49,7	99,1		
		75	73,8	73,0	74,1	74,7	72,6	75,3	98,6		
Makrolidy											
Tylozyna	mięśnie	50	54,3	52,5	51,5	49,4	51,7	47,9	102	101	99,4
		100	100	102	101	101	105	95,9	101		
		150	151	148	150	151	145	150	99		
Erytromycyna	mięśnie	100	89,4	101	94,8	88,7	91,2	92,4	92,9	96,5	

		200	198	189	188	193	194	191	96,0		
		300	305	298	306	309	292	300	101		
Spiramycyna	mięśnie	100	101	103	111	104	109	96	104	101	
		200	207	198	208	200	203	193	101		
		300	294	297	297	292	303	303	99,2		
Tylmikozyzna	mięśnie	25	26,0	25,7	26,4	25,1	24,2	26,8	103	101	
		50	49,3	49,5	51,8	52,4	50,8	51,3	102		
		75	72,8	75,2	74,2	74,7	75,4	73,0	98,9		
Jozamycyna	mięśnie	100	101	102	96,6	102	105	106	102	101	
		200	203	195	203	195	201	207	100		
		300	297	306	298	296	297	299	100		
Tulatromycyna	mięśnie	25	25,3	25,5	23,5	25,1	24,5	23,3	98,2	96,1	
		50	47,0	44,1	43,5	50,2	48,5	44,0	92,4		
		75	76,7	72,1	74,4	72,4	73,2	71,1	97,8		
Diaminopirymidyny											
Trimetoprim	mięśnie	25	23,8	23,7	24,7	23,0	24,6	23,8	95,7	97,2	97,2
		50	49,2	49,2	47,5	47,8	51,3	47,1	97,4		
		75	75,5	72,9	74,2	73,6	73,3	74,2	98,6		
Pleuromutyliny											
Tiamulina	mięśnie	25	24,8	23,2	26,8	24,8	25,7	26,3	101	99,8	99,8
		50	45,1	49,9	46,4	50,5	53,5	48,3	97,9		
		75	74,7	76,3	75,2	75,8	72,4	78,5	101		
Tetracykliny											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Linkomycyna											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Aminoglikozydy											
Związki nie zostały wyekstrahowane – metoda nie pozwala na oznaczenie tej grupy związków											

Tabela A 3. Wyniki z Doświadczenia 3

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Tetracykliny											
Oksytetracyklina	mięśnie	50	47,5	52,8	49,8	51,8	47,5	48,9	99,5	98,7	99,0
		100	96,4	93,2	100	94,8	99,7	101	97,5		
		150	151	147	148	151	146	149	99,1		
4-epioksy-tetracyklina	mięśnie	50	54,6	47,5	49,5	47,5	47,5	46,7	97,8	99,3	
		100	99,1	103	104	98,0	104	96,6	101		
		150	153	153	146	152	146	146	99,4		
Tetracyklina	mięśnie	50	52,7	47,9	50,6	51,6	50,6	47,3	100	100,3	
		100	101	99,2	96,4	96,9	98,6	104	99,4		
		150	154	152	154	152	154	145	101		
4-epitetracyklina	mięśnie	50	46,0	48,4	46,9	48,2	47,9	52,9	96,8	97,9	
		100	103	97,1	95,2	95,2	101	102	98,9		
		150	146	144	149	142	148	153	98,0		

Chlorotetracyklina	mięśnie	50	53,5	50,5	48,0	51,0	52,4	47,9	101	99,5	
		100	101	98,3	95,7	101	96,1	95,3	98,0		
		150	145	144	152	156	147	151	99,4		
4-epichlorotetracyklina	mięśnie	50	50,5	49,0	51,1	48,2	53,1	50,7	101	99,8	
		100	103	102	98,2	97,7	98,3	94,0	98,8		
		150	154	149	149	148	147	150	99,7		
Doksycyklina	mięśnie	50	45,6	49,7	46,5	52,5	47,9	45,5	95,9	97,6	
		100	92,3	98,5	98,2	92,6	103	101	97,6		
		150	145	147	152	145	153	153	99,4		
Linkozamidy											
Linkomycyna	mięśnie	50	45,3	51,7	49,9	53,7	50,6	50,6	101	98,6	98,6
		100	99,0	92,1	98,1	95,7	95,4	101	96,9		
		150	146	146	150	148	151	142	98,2		
Aminoglikozydy											
Spektynomycyna	mięśnie	150	128	144	162	150	150	152	98,5	100	
		300	316	293	300	298	311	301	101		
		450	473	459	444	438	460	446	101		
Streptomycyna	mięśnie	250	263	271	224	268	244	269	103	102	
		500	479	505	514	506	518	505	101		
		750	768	749	785	766	788	733	102		
Dihydrostreptomycyna	mięśnie	250	220	240	257	242	230	244	95,6	97,5	
		500	468	473	508	498	494	488	97,6		
		750	726	749	750	757	750	734	99,3		
Kanamycyna A	mięśnie	50	45,2	48,3	47,1	51,5	43,8	53,6	96,5	96,8	99,0
		100	89,3	94,8	102	91,5	93,8	101	95,5		
		150	145	149	142	150	152	147	98,4		
Paromomycyna	mięśnie	250	207	242	245	265	250	269	98,6	98,4	
		500	477	466	522	486	480	497	97,6		
		750	777	746	726	742	748	713	98,9		
Neomycyna	mięśnie	250	233	245	254	263	245	245	99,0	98,5	
		500	464	463	474	497	509	510	97,2		
		750	730	749	715	747	771	760	99,4		
Gentamycyna	mięśnie	25	24,2	27,9	24,7	23,6	24,9	28,7	103	99,9	
		50	51,8	49,7	45,8	49,3	49,2	48,7	98,2		
		75	73,6	74,7	74,7	73,1	72,6	76,8	99,0		
Fluorochinolony											
Niższy odzysk niż w Doświadczeniu I i 2 – średni odzysk około 60 %											
Sulfonamidy											
Niższy odzysk niż w Doświadczeniu I i 2 – średni odzysk około 70 %											
β-laktamy											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Makrolidy											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Diaminopirymidyny											
Niższy odzysk niż w Doświadczeniu I i 2 – średni odzysk około 70 %											

Pleuromutyliny											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											

Tabela A 4. Wyniki z Doświadczenia 4

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Tetracykliny											
Oksytetracyklina	mięśnie	50	42,5	43,9	44,8	42,5	45,2	48,1	89,0	89,5	87,3
		100	85,8	89,1	87,5	90,2	90,8	89,4	88,8		
		150	130	137	134	141	135	140	90,7		
4-epioksy-tetracyklina	mięśnie	50	44,3	45,5	39,9	40,2	44,8	48,3	87,7	89,4	
		100	87,4	90,7	91,2	87,9	85,8	88,1	88,5		
		150	135	139	142	136	142	135	92,1		
Tetracyklina	mięśnie	50	42,9	39,7	44,3	43,2	41,5	45,4	85,7	83,7	
		100	79,8	77,1	83,2	81,4	80,3	82,0	80,6		
		150	124	126	129	126	127	130	84,6		
4-epitetracyklina	mięśnie	50	40,1	39,5	42,7	41,6	40,9	43,8	82,9	82,3	
		100	78,2	76,8	82,1	79,3	85,9	82,5	80,8		
		150	117	123	127	123	126	133	83,3		
Chlorotetracyklina	mięśnie	50	44,5	42,3	45,7	43,9	44,3	46,6	89,1	90,3	
		100	95,7	87,0	93,9	88,4	89,7	85,9	90,1		
		150	132	134	135	139	144	140	91,6		
4-epichlorotetracyklina	mięśnie	50	44,9	44,2	43,7	46,8	45,5	44,9	90,0	89,9	
		100	89,5	87,7	91,9	92,8	96,4	93,2	91,9		
		150	126	129	133	129	133	141	87,8		
Doksycyklina	mięśnie	50	39,8	43,1	41,6	44,2	42,5	45,2	85,5	85,9	
		100	77,6	81,1	79,2	80,5	98,9	82,1	83,2		
		150	119	135	137	132	137	142	89,1		
Linkozamidy											
Linkomycyna	mięśnie	50	40,3	42,7	39,9	45,8	42,3	43,5	84,8	86,7	86,7
		100	87,5	85,0	80,8	80,9	94,7	93,2	87,0		
		150	135	136	132	139	130	122	88,2		
Aminoglikozydy											
Spektynomycyna	mięśnie	150	122	130	128	123	127	129	84,2	83,5	87,2
		300	244	249	257	253	258	248	83,8		
		450	365	374	381	369	375	360	82,4		
Streptomycyna	mięśnie	250	201	212	218	212	208	202	83,5	82,6	
		500	400	416	426	415	409	403	82,3		
		750	601	621	635	622	611	603	82,1		
Dihydrostreptomycyna	mięśnie	250	198	207	215	210	202	200	82,1	84,6	
		500	497	410	418	456	403	399	86,1		
		750	695	618	626	610	604	697	85,6		
Kanamycyna A	mięśnie	50	45,5	47,8	44,2	41,9	49,8	38,9	89,4	91,2	
		100	85,9	94,4	85,6	92,3	89,2	95,9	90,6		

		150	143	147	138	145	122	149	93,7		
Paromomycyna	mięśnie	250	242	214	220	234	226	232	91,2		
		500	460	458	475	462	466	401	90,8	92,2	
		750	700	725	736	715	698	689	94,7		
Neomycyna	mięśnie	250	235	222	240	233	228	224	92,1		
		500	493	432	482	429	433	459	90,9	91,6	
		750	681	666	682	696	704	704	91,8		
Gentamycyna	mięśnie	25	20,9	21,8	22,6	21,5	20,3	19,9	84,7		
		50	41,8	43,4	45,9	42,2	41,1	40,8	85,1	84,7	
		75	62,3	64,9	66,5	63,1	61,9	60,8	84,3		
Fluorochinolony											
Niższy odzysk niż w Doświadczeniu 1 i 2 – średni odzysk około 70 %											
Sulfonamidy											
Niższy odzysk niż w Doświadczeniu 1 i 2 – średni odzysk około 70 %											
β-laktamy											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Makrolidy											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											
Diaminopirymidyny											
Niższy odzysk niż w Doświadczeniu 1 i 2 – średni odzysk około 70 %											
Pleuromutyliny											
Niski odzysk (<50%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											

Tabela A 5. Wyniki analizy mleka krowiego (ekstrakcja MeCN oraz TCA)

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Fluorochinolony											
Marbofloksacyna	mleko	37,5	36,9	35,0	38,0	38,9	37,8	36,8	99,3	98,5	
		75	74,1	73,1	74,6	75,3	73,7	73,8	98,8		
		112,5	111	107	110	112	113	106	97,5		
Norfloksacyna	mleko	50	46,8	48,6	49,6	52,1	47,3	47,2	97,2	97,7	
		100	96,2	96,5	102	92,6	98,1	101	97,7		
		150	143	151	144	154	145	148	98,3		
Ciprofloksacyna	mleko	50	51,4	53,5	49,1	52,1	48,2	46,4	100	99,7	99,1
		100	103	104	97,2	93,1	95,0	101	98,8		
		150	142	154	147	150	156	152	100		
Danofloksacyna	mleko	15	14,3	14,8	14,2	14,6	14,8	15,3	97,7	97,9	
		30	29,0	30,1	28,9	29,7	30,3	28,8	98,2		
		45	46,9	40,0	44,0	45,4	45,4	42,5	97,9		
Enrofloksacyna	mleko	50	48,7	46,4	47,6	47,1	52,1	47,7	96,5	99,7	
		100	108	98,3	105	99,6	95,9	106	102		
		150	144	155	150	153	147	153	100		
Sarafloksacyna	mleko	50	49,0	50,8	51,0	49,9	49,9	51,2	101	99,8	
		100	99,5	100	98,4	95,6	101	98,3	98,9		

		150	148	153	150	147	151	152	100		
Difloksacyna	mleko	25	23,9	24,2	25,9	24,9	24,4	26,1	99,5	100,5	
		50	49,3	52,3	52,7	52,0	51,7	48,8	102		
		75	77,5	73,1	71,8	75,3	75,0	76,0	99,7		
Kwas oksolinowy	mleko	25	24,4	24,8	25,9	25,1	24,7	24,4	99,6	98,8	
		50	49,3	51,4	45,8	49,3	49,1	50,9	98,6		
		75	73,2	76,2	72,1	75,4	72,9	71,8	98,1		
Kwas nalidyksowy	mleko	25	23,5	24,9	24,7	25,6	23,5	26,5	99,0	98,8	
		50	48,9	50,7	47,4	48,6	50,7	51,2	99,2		
		75	73,5	73,0	75,0	74,0	74,2	72,0	98,2		
Flumechina	mleko	25	24,7	23,0	25,9	25,9	24,6	25,4	98,9	99,2	
		50	49,0	50,6	48,6	49,6	52,0	47,5	99,1		
		75	77,0	75,4	74,9	73,7	73,9	73,4	99,6		
Sulfonamidy											
Sulfaguanidyna	mleko	50	47,9	49,2	49,0	50,0	50,0	48,5	98,2	97,4	
		100	97,3	97,0	94,3	94,3	94,5	104	96,8		
		150	146	143	143	151	149	143	97,2		
Sulfadiazyna	mleko	50	46,2	49,0	52,5	53,7	50,4	47,2	99,6	98,4	
		100	94,5	96,8	102	101	93,9	95,7	97,3		
		150	147	148	145	147	147	150	98,2		
Sulfametoksypyridazyna	mleko	50	51,1	50,0	48,4	49,7	47,3	47,7	98,1	98,0	
		100	99,2	97,0	97,8	100	94,7	96,5	97,6		
		150	149	145	147	146	148	152	98,4		
Sulfametazyna	mleko	50	51,9	51,0	51,8	50,8	52,2	46,1	101	100	
		100	102	105	94,1	98,9	101	105	101		
		150	148	151	149	148	147	144	98,7		
Sulfatiazol	mleko	50	49,1	48,9	48,0	48,4	49,7	49,9	98,0	99,0	
		100	102	100	103	101	98,5	99,7	101		
		150	145	145	149	147	152	146	98,2		
Sulfamonometoksyna	mleko	50	46,0	50,3	48,3	48,9	50,5	47,0	97,0	98,1	98,6
		100	95,8	100	98,5	102	103	95,7	99,3		
		150	151	150	150	145	140	146	98,0		
Sulfadoksyna	mleko	50	49,2	50,8	50,2	51,1	49,7	49,9	100	98,9	
		100	98,4	99,3	96,6	98,8	97,8	100	98,6		
		150	146	146	149	146	148	146	97,8		
Sulfachinoksalina	mleko	50	49,2	48,3	49,8	48,4	49,6	48,3	97,9	98,4	
		100	97,0	96,0	98,1	100	103	102	99,3		
		150	146	146	150	147	145	148	98,0		
Sulfadimetoksyna	mleko	50	50,9	51,7	50,0	52,4	45,7	45,1	98,6	98,5	
		100	102	96,8	97,1	97,2	101	95,1	98,2		
		150	150	147	147	144	150	150	98,7		
Sulfametoksazol	mleko	50	50,7	51,3	51,2	51,2	48,0	51,7	101	100	
		100	96,1	93,4	98,4	102	103	98,4	98,5		
		150	152	148	152	150	150	150	100		
Sulfamerazyna	mleko	50	46,1	47,4	50,0	49,1	51,3	49,8	97,9	97,9	

		100	96,7	97,5	103	102	95,8	94,3	98,2		
		150	148	146	146	148	146	147	97,8		
β-laktamy											
Amoksyacylina	mleko	2	1,84	1,93	1,88	1,86	1,96	1,96	95,1	95,8	
		4	3,49	3,42	3,90	3,80	3,93	3,96	93,7		
		6	5,82	6,02	5,91	5,90	5,98	5,89	98,7		
Ampicylina	mleko	2	1,86	1,99	1,88	1,96	2,00	2,04	97,7	98,4	
		4	4,02	4,11	3,88	3,96	3,92	3,87	99,0		
		6	5,92	5,97	5,87	5,92	5,73	6,04	98,5		
Penicylina G	mleko	2	1,86	1,80	1,84	1,83	1,80	1,88	91,8	93,8	
		4	3,69	3,84	3,53	3,61	3,82	3,66	92,3		
		6	5,93	5,78	5,77	5,91	5,86	5,75	97,2		
Penicylina V	mleko	2	1,93	1,95	1,89	1,97	2,03	2,01	98,2	98,2	
		4	4,02	3,54	3,93	4,00	4,03	3,98	97,9		
		6	5,96	5,74	6,02	6,01	5,86	5,91	98,6		
Oksacylina	mleko	15	15,0	14,0	14,1	14,9	15,2	14,0	96,7	97,1	
		30	29,7	28,3	29,5	30,8	29,3	29,1	98,1		
		45	42,8	44,0	42,9	43,4	44,2	42,7	96,3		
Kloksacylina	mleko	15	14,9	14,7	15,3	15,4	14,7	15,7	101	98,5	
		30	29,9	27,7	27,4	27,4	31,4	28,9	96,0		
		45	45,1	44,4	43,6	45,8	44,1	44,0	98,9		
Nafcyliina	mleko	15	14,5	14,9	15,0	15,1	14,8	15,0	99,2	98,4	
		30	30,3	29,0	29,1	29,0	29,3	30,3	98,3		
		45	44,3	42,5	44,5	43,0	44,2	45,0	97,6		
Dikloksacylina	mleko	15	14,1	14,5	14,5	14,1	14,1	14,6	95,4	95,2	
		30	27,9	27,9	27,1	27,8	28,4	28,0	92,9		
		45	42,2	44,3	43,9	44,8	43,7	44,3	97,4		
Cefapiryna	mleko	30	27,9	29,2	29,5	31,1	33,0	32,6	102	99,1	
		60	56,6	56,4	60,2	57,0	58,7	58,0	96,4		
		90	89,4	88,5	89,3	87,8	90,7	89,5	99,1		
Ceftiofur	mleko	50	44,8	46,6	51,7	46,2	48,5	53,5	97,1	97,7	
		100	101	94,6	90,8	96,5	101	96,3	96,8		
		150	149	150	148	151	148	145	99,1		
Cefkwinom	mleko	10	9,42	9,59	9,76	9,36	9,75	9,49	95,6	94,9	
		20	18,9	18,9	19,2	19,0	19,4	19,8	95,9		
		30	27,6	28,4	28,3	27,3	28,8	27,6	93,3		
Cefalonium	mleko	10	8,90	9,11	9,67	9,93	9,91	9,80	95,6	95,9	
		20	18,7	20,3	19,0	18,9	20,7	19,9	97,8		
		30	28,1	28,1	28,5	28,8	27,5	28,8	94,3		
Cefazolina	mleko	25	23,1	23,8	24,5	23,2	25,2	25,2	96,6	97,8	
		50	50,0	48,7	48,9	48,7	52,1	51,0	99,8		
		75	73,0	74,3	72,7	72,5	71,4	72,9	97,1		
Cefaleksyna	mleko	50	44,7	44,5	52,0	46,7	49,0	47,8	94,9	95,8	
		100	90,8	90,5	97,9	94,0	97,9	97,6	94,8		
		150	145	149	143	147	149	147	97,7		

97,0

Cefoperazon	mleko	25	24,9	24,8	24,6	25,4	23,6	24,5	98,5	97,6	
		50	49,8	48,4	48,1	48,6	49,5	50,0	98,1		
		75	70,6	72,5	72,9	71,5	73,9	71,4	96,2		
Makrolidy											
Tylozyna	mleko	25	25,9	23,8	23,1	24,1	22,5	23,1	95,0	96,1	
		50	48,8	48,2	47,3	48,0	50,2	47,8	96,8		
		75	70,8	75,3	72,4	73,1	70,8	72,3	96,6		
Erytromycyna	mleko	20	18,0	19,2	18,9	18,8	18,7	20,3	94,9	96,5	
		40	38,7	40,0	39,2	37,3	39,8	39,2	97,6		
		60	57,1	60,1	59,1	57,6	57,6	58,0	97,1		
Spiramycyna	mleko	100	97,5	95,6	96,7	101	99,3	98,2	98,1	97,7	96,7
		200	196	184	202	196	202	189	97,3		
		300	276	297	284	299	305	295	97,6		
Tylmikozyzna	mleko	25	22,8	24,0	24,1	24,2	23,7	24,0	95,2	96,2	
		50	48,6	47,8	47,1	47,9	50,7	52,3	98,1		
		75	65,5	74,9	74,4	71,1	71,6	71,5	95,4		
Jozamycyna	mleko	25	24,8	25,2	24,6	23,9	24,2	21,5	96,1	96,9	
		50	48,6	47,7	49,1	50,2	46,6	49,6	97,2		
		75	73,1	73,1	75,0	70,2	72,7	74,1	97,4		
Tetracykliny											
Oksytetracyklina	mleko	50	48,9	48,5	51,7	51,0	51,0	44,0	98,3	98,2	
		100	94,8	102	95,4	98,4	98,8	103	98,8		
		150	140	148	152	150	143	145	97,5		
4-epioksy-tetracyklina	mleko	50	49,8	45,2	46,3	50,4	45,6	51,1	96,1	97,3	
		100	101	103	99,4	97,0	96,8	99,7	99,5		
		150	145	145	140	139	145	153	96,3		
Tetracyklina	mleko	50	49,9	51,2	49,8	50,1	48,3	47,2	98,9	97,8	
		100	103	98,2	101	96,4	97,0	92,2	98,1		
		150	144	148	147	152	141	135	96,5		
4-epitetracyklina	mleko	50	47,8	46,0	49,2	51,1	49,0	47,6	96,9	97,9	97,7
		100	100	95,7	96,7	106	99,8	93,5	98,6		
		150	151	147	140	150	151	146	98,3		
Chlorotetracyklina	mleko	50	50,9	51,7	48,5	47,3	49,5	48,1	98,7	98,1	
		100	97,8	99,1	99,8	96,7	96,4	104	98,9		
		150	147	148	145	141	143	149	96,8		
4-epichlorotetracyklina	mleko	50	52,0	44,8	47,5	53,9	46,8	47,5	97,5	97,3	
		100	95,9	95,1	95,7	97,2	106	99,9	98,3		
		150	142	141	144	156	140	144	96,3		
Doksycyklina	mleko	50	50,8	47,7	49,7	47,1	48,0	49,9	97,7	97,4	
		100	90,8	98,3	99,2	95,7	95,4	101	96,8		
		150	142	147	150	144	144	152	97,7		
Linkozamidy											
Linkomycyna	mleko	75	77,2	75,0	74,0	73,0	74,0	75,0	99,6	98,9	98,9
		150	143	154	146	148	153	150	99,3		
		225	210	222	219	230	221	218	97,8		

Aminoglikozydy											
Spektynomycyna	mleko	100	105	94,2	95,1	99,6	92,5	92,1	96,4	98,2	97,4
		200	193	188	197	206	196	205	98,7		
		300	300	297	297	300	303	294	99,4		
Streptomycyna	mleko	100	97,3	100,5	104,5	94,9	99,2	90,1	97,8	97,8	
		200	186	189	187	197	200	201	96,7		
		300	292	307	291	306	300	283	98,8		
Dihydrostreptomycyna	mleko	100	96,0	98,5	93,7	101,5	82,0	89,5	93,5	96,3	
		200	187	199	194	188	201	201	97,4		
		300	286	304	287	292	290	301	97,8		
Kanamycyna A	mleko	75	72,4	70,2	72,9	76,0	72,7	71,2	96,8	97,5	
		150	140	145	151	148	149	148	97,8		
		225	215	219	221	224	224	217	97,8		
Paromomycyna	mleko	50	45,7	50,2	49,4	46,9	45,7	52,0	96,6	97,2	
		100	93,5	101	96,5	91,2	95,6	103	96,8		
		150	146	144	148	152	144	149	98,1		
Neomycyna	mleko	750	717	742	736	702	810	734	98,7	98,3	
		1500	1380	1510	1400	1480	1480	1590	98,2		
		2250	2040	2150	2240	2340	2240	2240	98,2		
Gentamycyna	mleko	50	47,0	43,6	45,9	51,9	45,8	46,5	93,6	96,7	
		100	95,8	103	97,2	92,2	100	99,6	98,0		
		150	147	139	152	149	148	153	98,7		

Tabela A 6. Wyniki analizy nerek (ekstrakcja MeCN oraz TCA)

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Fluorochinolony											
Marbofloksacyna	nerka	75	63,1	65,3	70,9	68,8	73,2	67,9	91,0	89,6	87,9
		150	126	125	144	145	125	132	88,6		
		225	187	224	200	207	186	200	89,2		
Norfloksacyna	nerka	100	88,5	89,0	92,4	98,3	91,0	96,2	92,6	91,3	
		200	177	165	187	180	182	187	89,9		
		300	278	283	270	289	269	258	91,5		
Ciprofloksacyna	nerka	100	91,4	94,5	88,8	80,1	80,7	89,1	87,4	86,6	
		200	169	172	170	163	160	166	83,5		
		300	283	259	257	266	284	253	89,0		
Danofloksacyna	nerka	100	82,0	89,2	85,9	85,9	85,2	86,2	85,7	85,6	
		200	165	171	171	167	181	163	84,8		
		300	291	250	245	263	255	248	86,2		
Enrofloksacyna	nerka	100	88,6	84,7	84,0	82,8	92,1	83,3	85,9	85,8	
		200	163	177	167	165	160	183	84,6		
		300	269	253	267	249	276	251	87,0		
Sarafloksacyna	nerka	50	41,0	44,3	41,8	42,3	43,9	47,9	87,1	88,5	
		100	88,5	91,5	90,8	85,2	87,3	93,0	89,4		

		150	123	126	130	141	130	151	88,9		
Difloksacyna	nerka	300	257	242	256	265	246	242	83,8	87,5	
		600	528	523	482	537	591	510	88,1		
		900	878	774	846	777	846	781	90,8		
Kwas oksolinowy	nerka	75	72,0	65,9	60,9	66,5	60,7	64,0	86,7	87,9	
		150	123	135	138	124	125	124	85,5		
		225	202	223	214	195	211	190	91,5		
Kwas nalidyksowy	nerka	75	62,3	70,3	72,0	66,9	62,5	67,9	89,3	87,8	
		150	130	125	129	124	123	135	85,1		
		225	217	203	204	192	193	191	89,0		
Flumechina	nerka	500	433	418	442	441	418	440	86,4	88,8	
		1000	987	808	991	832	893	997	91,8		
		1500	1200	1390	1270	1450	1320	1290	88,0		
Sulfonamidy											
Sulfaguanidyna	nerka	50	47,5	41,1	47,1	56,2	45,9	45,3	94,4	92,1	
		100	89,9	90,5	96,5	83,5	86,4	103	91,7		
		150	146	129	142	130	133	134	90,4		
Sulfadiazyna	nerka	50	47,3	47,2	42,3	50,1	44,6	45,7	92,4	92,8	
		100	95,1	88,9	87,0	99,8	90,9	87,9	91,6		
		150	143	151	144	141	130	141	94,4		
Sulfametoksypyridazyna	nerka	50	44,5	44,1	44,4	46,3	47,0	51,9	92,7	92,5	
		100	90,1	95,0	95,7	98,4	88,4	87,4	92,5		
		150	136	133	140	139	155	130	92,3		
Sulfametazyna	nerka	50	42,3	44,1	46,3	45,5	50,4	44,3	90,9	89,7	
		100	90,1	89,6	95,6	85,1	92,2	82,8	89,2		
		150	131	133	135	129	136	136	88,9		
Sulfatiazol	nerka	50	43,5	41,7	43,9	42,4	49,7	43,5	88,2	90,6	
		100	87,8	95,3	93,9	93,9	88,7	85,5	90,9		
		150	135	139	140	140	139	141	92,6		
Sulfamonometoksyna	nerka	50	42,0	44,7	46,4	50,3	46,6	45,2	91,7	91,3	91,1
		100	97,8	96,4	83,1	92,8	88,5	87,5	91,0		
		150	135	145	136	121	134	148	91,2		
Sulfadoksyna	nerka	50	41,8	43,4	46,5	41,6	48,7	52,4	91,4	91,9	
		100	96,3	91,9	88,2	99,3	92,8	84,7	92,2		
		150	136	145	137	132	133	144	91,9		
Sulfachinoksalina	nerka	50	43,4	45,6	46,6	45,6	44,0	46,2	90,5	90,4	
		100	90,7	80,9	95,5	89,6	92,3	94,7	90,6		
		150	127	128	131	143	139	143	90,1		
Sulfadimetoksyna	nerka	50	46,5	42,0	41,0	43,7	50,2	43,4	88,9	89,6	
		100	90,7	87,2	93,3	92,8	89,7	91,8	90,9		
		150	138	129	124	137	122	149	88,9		
Sulfametoksazol	nerka	50	45,2	43,9	45,0	47,5	42,9	46,6	90,3	90,0	
		100	83,2	93,8	88,9	87,0	96,2	92,7	90,3		
		150	133	135	128	133	146	128	89,4		
Sulfamerazyna	nerka	50	45,7	45,2	44,5	44,4	51,5	47,6	93,0	91,2	

		100	84,4	88,9	97,5	84,2	97,1	90,6	90,4		
		150	134	131	138	129	131	148	90,1		
β-laktamy											
Amoksyacylina	nerka	25	21,3	22,1	21,1	23,0	20,2	22,4	86,7	86,1	
		50	44,8	40,1	42,9	44,2	40,3	41,3	84,5		
		75	63,0	64,1	66,6	65,0	65,7	66,8	86,9		
Ampicylina	nerka	25	21,1	20,4	20,5	23,5	20,7	22,5	85,8	86,8	
		50	44,9	42,3	45,4	44,7	45,3	43,7	88,8		
		75	61,8	64,1	66,4	61,2	70,7	62,4	85,9		
Penicylina G	nerka	25	20,3	21,0	23,1	22,3	21,1	21,2	86,0	85,0	
		50	44,1	42,2	40,7	42,3	43,0	40,3	84,1		
		75	61,5	62,1	66,8	61,5	61,6	68,0	84,8		
Penicylina V	nerka	12,5	11,1	10,4	10,2	11,1	10,6	10,6	85,2	87,4	
		25	21,4	22,2	21,3	20,7	23,7	23,0	88,1		
		37,5	33,4	35,0	30,7	30,9	34,9	35,3	89,0		
Oksacylina	nerka	150	135	132	134	142	122	127	88,1	88,6	
		300	261	247	287	287	241	280	89,1		
		450	404	361	418	403	389	418	88,7		
Kloksacylina	nerka	150	130	133	128	125	126	130	85,8	87,2	
		300	241	287	292	254	256	288	89,9		
		450	378	367	372	435	390	381	86,0		
Nafcylina	nerka	150	123	130	122	136	132	128	85,7	87,7	
		300	254	271	278	282	264	244	88,5		
		450	404	400	443	378	395	383	89,0		
Dikloksacylina	nerka	150	128	125	128	146	130	128	87,1	87,5	
		300	258	264	258	243	267	250	85,6		
		450	379	411	429	424	407	374	89,8		
Cefapiryna	nerka	50	40,8	49,0	42,9	44,4	42,3	43,1	87,5	87,6	
		100	84,3	81,3	84,0	87,9	93,0	85,3	85,9		
		150	144	133	142	126	132	127	89,3		
Ceftiofur	nerka	3000	2660	2580	2940	2460	2560	2870	89,3	91,3	
		6000	5860	5570	5490	5770	5600	4990	92,4		
		9000	8830	8590	8940	7760	8130	7580	92,3		
Cefkwinom	nerka	100	91,5	91,6	82,8	88,8	84,8	92,6	88,7	87,9	
		200	162	177	182	178	162	175	86,4		
		300	248	271	256	273	255	288	88,5		
Cefalonium	nerka	50	40,7	41,0	40,4	41,8	41,2	45,0	83,4	84,6	
		100	82,5	83,8	85,6	81,3	85,6	90,8	84,9		
		150	131	128	124	131	128	127	85,4		
Cefazolina	nerka	50	47,7	45,4	41,2	44,4	46,2	42,5	89,1	89,6	
		100	85,9	88,9	90,5	92,5	86,0	91,2	89,2		
		150	136	138	136	139	140	125	90,5		
Cefaleksyna	nerka	500	431	452	458	412	401	412	85,5	86,7	
		1000	989	817	877	866	935	825	88,5		
		1500	1340	1270	1320	1200	1360	1250	86,1		

87,4

Cefoperazon	nerka	50	40,2	46,7	46,5	43,0	45,7	42,8	88,3	86,8	
		100	83,8	89,2	86,6	85,8	82,0	90,4	86,3		
		150	136	125	133	127	124	127	85,6		
Makrolidy											
Tylozyna	nerka	50	46,7	45,7	44,9	45,4	47,7	40,3	90,2	88,7	
		100	88,7	89,3	82,5	90,0	88,2	87,2	87,7		
		150	127	123	122	146	145	132	88,4		
Erytromycyna	nerka	100	92,5	85,0	94,1	89,0	95,0	86,5	90,3	91,1	
		200	185	185	188	180	180	187	92,1		
		300	269	283	280	261	278	265	90,9		
Spiramycyna	nerka	150	141	133	129	134	147	143	91,8	90,1	
		300	265	248	256	251	249	269	85,5		
		450	411	422	416	429	427	407	93,0		
Tylmikozyzna	nerka	125	113	122	110	142	124	116	97,1	94,1	
		250	223	228	243	234	228	239	93,0		
		375	357	347	333	330	350	357	92,2		
Jozamycyna	nerka	50	41,9	43,5	40,1	42,9	45,7	46,6	86,9	89,5	
		100	89,1	92,7	93,9	88,4	93,4	87,2	90,8		
		150	129	134	144	135	138	137	90,8		
Tulatomycyna	nerka	1500	1380	1260	1230	1430	1430	1380	90,1	90,4	
		3000	2840	2770	2600	2720	2750	2620	90,5		
		4500	3970	4210	3820	4150	4080	4190	90,5		
Diaminopirymidyny											
Trimetoprim	nerka	25	21,1	20,5	23,9	23,2	21,1	20,5	86,9	85,9	85,9
		50	43,3	45,9	41,2	42,6	42,7	43,7	86,5		
		75	64,0	63,9	60,3	67,5	61,2	63,0	84,4		
Tetracykliny											
Oksytetracyklina	nerka	300	256	281	263	264	274	287	90,3	90,8	
		600	542	516	527	569	551	564	90,8		
		900	830	799	794	818	818	867	91,2		
4-epioksyetetracyklina	nerka	300	266	279	267	272	269	276	90,5	91,7	
		600	555	525	537	572	563	572	92,3		
		900	833	811	799	825	826	880	92,1		
Tetracyklina	nerka	300	269	289	295	276	273	302	94,7	95,4	
		600	599	588	577	602	529	562	96,0		
		900	788	879	907	835	829	918	95,5		
4-epitetrazyklina	nerka	300	262	272	285	287	272	299	93,2	94,3	
		600	595	576	563	606	526	553	95,0		
		900	791	864	910	827	822	903	94,8		
Chlorotetracyklina	nerka	300	303	281	268	279	288	299	95,4	95,2	
		600	564	581	514	596	593	584	95,3		
		900	834	914	887	841	878	774	95,0		
4-epichlorotetracyklina	nerka	300	299	282	262	270	287	292	94,0	94,2	
		600	559	577	518	581	593	578	94,6		
		900	829	899	874	838	858	775	93,9		

Doksycyklina	nerka	300	268	296	260	280	256	298	92,1	91,3	
		600	521	536	541	539	590	492	89,4		
		900	844	868	824	851	759	837	92,3		
Linkozamidy											
Linkomycyna	nerka	750	630	651	642	719	647	680	630	87,7	87,7
		1500	1360	1300	1300	1300	1230	1300	1360		
		2250	2030	2000	1870	1990	2030	2000	2030		
Aminoglikozydy											
Spektynomycyna	nerka	2500	2120	2140	2080	2200	2200	2140	85,8	85,8	
		5000	4210	4460	4060	4360	4290	4330	85,7		
		7500	6230	6420	6550	6180	6960	6310	85,9		
Streptomycyna	nerka	500	394	476	438	409	449	437	86,8	87,2	
		1000	862	843	967	819	877	877	87,4		
		1500	1230	1250	1360	1400	1320	1290	87,3		
Dihydrostreptomycyna	nerka	500	397	437	448	426	430	404	84,7	86,1	
		1000	888	890	860	818	880	890	87,1		
		1500	1258	1260	1300	1409	1250	1300	86,4		
Kanamycyna A	nerka	1250	1190	1130	1010	1140	1100	1090	88,7	87,8	86,3
		2500	2010	2220	2250	2150	2140	2340	87,4		
		3750	3430	3100	3340	3160	3190	3420	87,3		
Paromomycyna	nerka	750	638	634	641	623	643	642	84,9	86,2	
		1500	1300	1400	1300	1230	1220	1350	86,7		
		2250	1950	1930	2030	1910	1870	2060	87,0		
Neomycyna	nerka	2500	2030	2130	2360	2090	2180	2240	86,8	86,8	
		5000	4230	4070	4280	4120	4520	4500	85,7		
		7500	6140	6120	7080	6850	6510	6800	87,8		
Gentamycyna	nerka	375	314	307	303	329	312	315	83,6	84,0	
		750	606	623	658	663	613	612	83,9		
		1125	964	956	905	987	995	892	84,4		

Tabela A 7. Wyniki z Doświadczenia 2 (matryca jaja)

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Fluorochinolony											
Marbofloksacyna	jaja	25	22,9	22,9	23,3	21,9	25,4	25,7	94,8	95,1	93,4
		50	47,9	46,2	46,1	47,0	49,0	48,9	95,0		
		75	70,9	71,4	70,7	72,6	67,4	76,2	95,4		
Norfloksacyna	jaja	25	20,5	22,5	23,6	26,5	20,6	22,7	90,9	89,8	
		50	41,1	43,4	49,4	44,1	46,3	44,6	89,6		
		75	64,0	69,5	66,0	65,7	70,1	65,4	89,0		
Ciprofloksacyna	jaja	25	23,5	25,1	22,8	23,6	22,1	23,8	93,9	95,5	
		50	49,2	45,6	49,6	47,8	48,3	46,3	95,5		
		75	77,4	68,3	74,5	75,0	70,1	72,0	97,2		
Danofloksacyna	jaja	25	23,0	20,5	22,6	23,5	21,4	20,6	87,8	87,4	

		50	40,3	42,8	43,3	41,6	45,9	43,1	85,7		
		75	65,2	67,3	67,6	71,0	66,6	61,9	88,8		
Enrofloksacyna	jaja	25	20,2	26,0	20,4	22,8	22,5	25,7	91,7		
		50	46,4	47,0	42,3	41,6	50,3	46,1	91,2	92,2	
		75	70,8	68,2	67,2	66,8	73,5	74,9	93,7		
Sarafloksacyna	jaja	25	21,4	24,7	22,9	24,2	25,0	25,0	95,4		
		50	42,4	43,2	45,0	46,8	51,7	45,2	91,4	93,9	
		75	67,4	74,8	70,2	72,5	72,6	69,0	94,8		
Difloksacyna	jaja	25	25,0	23,9	24,1	26,9	22,7	22,0	96,4		
		50	46,0	49,5	47,7	46,1	43,3	50,7	94,4	95,3	
		75	73,9	67,7	72,0	67,8	72,3	74,7	95,2		
Kwas oksolinowy	jaja	25	21,4	24,0	23,5	25,6	23,2	24,7	94,9		
		50	45,8	44,0	49,9	49,1	48,5	43,6	93,6	94,1	
		75	70,7	74,7	68,1	62,3	75,7	70,5	93,8		
Kwas nalidyksowy	jaja	25	24,4	24,5	23,4	24,0	22,5	23,6	95,0		
		50	44,1	47,0	51,8	46,1	46,2	53,9	96,4	96,1	
		75	78,6	73,0	69,2	69,5	72,0	74,4	97,0		
Flumechina	jaja	25	25,2	21,7	24,5	25,0	22,3	23,1	94,6		
		50	48,4	46,4	47,1	49,7	51,0	48,8	97,2	94,9	
		75	72,1	69,8	71,7	70,6	64,0	70,0	93,0		
Sulfonamidy											
Sulfaguanidyna	jaja	25	22,8	25,4	23,3	25,7	23,5	23,2	95,9		
		50	48,5	44,1	43,4	43,8	46,6	46,9	91,1	93,3	
		75	67,5	70,2	69,5	68,0	70,6	71,8	92,8		
Sulfadiazyna	jaja	25	24,5	27,2	22,5	23,9	23,3	26,4	98,6		
		50	51,9	47,2	49,3	46,4	52,8	50,7	99,4	98,7	
		75	69,3	71,5	71,7	75,9	75,5	76,8	97,9		
Sulfametoksypyridazyna	jaja	25	21,8	22,1	26,8	21,1	20,2	22,2	89,5		
		50	46,3	42,3	47,3	42,8	47,6	48,5	91,6	90,4	
		75	71,7	61,8	67,6	66,1	71,9	66,5	90,1		
Sulfametazyna	jaja	25	24,5	21,7	24,3	24,0	24,3	24,5	95,5		
		50	50,3	49,9	51,8	43,8	49,3	45,7	96,9	95,2	
		75	70,4	63,9	71,0	70,4	70,9	73,0	93,3		
Sulfatiazol	jaja	25	23,3	22,2	22,0	22,7	21,8	23,9	90,6		93,5
		50	43,1	43,1	44,0	52,4	45,4	48,4	92,1	91,9	
		75	79,0	63,1	67,5	73,3	67,8	68,0	93,0		
Sulfamonometoksyna	jaja	25	24,2	23,8	22,2	23,9	22,5	25,0	94,3		
		50	51,3	46,8	47,8	46,8	51,2	47,0	97,0	94,9	
		75	69,5	70,8	70,4	69,2	68,2	72,5	93,5		
Sulfadoksyna	jaja	25	22,9	24,3	23,4	24,6	21,9	23,5	93,8		
		50	47,0	41,7	44,1	46,1	45,9	50,0	91,6	93,4	
		75	65,6	71,3	70,3	72,9	71,7	75,6	95,0		
Sulfachinoksalina	jaja	25	23,2	21,2	20,3	21,9	25,7	20,9	88,7		
		50	41,5	42,7	42,4	43,3	44,8	43,7	86,1	88,5	
		75	71,4	62,4	70,5	64,6	71,7	67,7	90,7		

Sulfadimetoksyna	jaja	25	26,6	26,0	21,0	21,2	20,8	20,6	90,8	93,0	92,9	
		50	47,6	55,3	43,2	47,5	40,7	46,8	93,8			
		75	69,6	75,5	76,4	70,4	67,3	65,4	94,4			
Sulfametoksazol	jaja	25	27,6	26,6	20,2	21,5	21,3	23,7	93,9	92,8		
		50	50,1	43,7	45,5	43,6	46,3	45,8	91,7			
		75	70,3	74,9	73,9	63,5	64,2	71,3	92,9			
Sulfamerazyna	jaja	25	23,9	24,7	23,0	25,4	22,2	26,3	96,9	96,7		
		50	51,7	46,1	52,6	47,8	51,0	43,0	97,4			
		75	71,6	68,4	70,0	71,4	70,7	79,7	95,9			
β-laktamy												
Amoksyacylina	jaja	25	22,3	26,0	22,4	25,1	23,0	21,4	93,4	92,2		
		50	46,7	41,5	44,8	40,8	46,2	50,8	90,3			
		75	73,3	68,6	65,2	66,9	74,6	70,1	93,0			
Ampicylina	jaja	25	23,2	25,0	24,3	24,4	23,7	23,9	96,3	93,6		
		50	45,2	45,0	46,7	44,1	47,3	48,8	92,4			
		75	71,0	70,7	63,9	71,0	68,8	69,0	92,1			
Penicylina G	jaja	25	20,1	20,8	25,9	21,3	21,1	22,1	87,6	88,6		
		50	40,6	48,2	41,3	40,5	47,7	47,9	88,7			
		75	61,7	62,2	72,5	61,2	72,0	72,7	89,4			
Penicylina V	jaja	12,5	11,7	12,2	11,8	11,6	12,1	12,7	96,0	95,3		
		25	24,9	24,3	24,2	23,4	23,7	22,6	95,3			
		37,5	37,0	37,1	27,2	37,1	37,0	37,2	94,6			
Oksacylina	jaja	25	22,2	23,6	22,1	29,0	23,1	25,0	96,7	96,0		
		50	47,6	48,8	48,5	50,2	47,1	44,5	95,6			
		75	70,4	73,2	69,3	68,5	75,3	73,6	95,6			
Kloksacylina	jaja	25	25,0	27,7	24,7	21,4	24,6	23,9	98,3	96,7		
		50	52,6	47,2	47,9	49,5	46,2	47,6	97,0			
		75	71,6	77,6	68,8	72,5	64,3	71,6	94,8			
Nafcylina	jaja	25	23,7	25,5	24,9	23,9	24,0	23,0	96,6	96,3		
		50	49,8	48,3	47,7	45,7	48,1	46,8	95,4			
		75	68,9	72,8	72,0	72,9	74,6	75,1	97,0			
Dikloksacylina	jaja	25	23,7	25,5	24,5	23,0	23,0	24,1	95,9	96,5		
		50	48,0	47,7	51,9	48,8	47,7	49,7	97,9			
		75	69,9	69,0	73,3	77,2	70,1	71,9	95,9			
Cefapiryna	jaja	25	22,4	21,6	22,8	20,6	24,2	21,6	88,9	90,5		
		50	49,4	42,5	49,2	40,8	49,4	40,9	90,8			
		75	65,9	72,9	67,8	70,0	66,5	70,2	91,9			
Ceftiofur	jaja	25	22,6	24,8	24,1	22,0	26,1	23,6	95,5	93,4		
		50	45,0	44,9	44,4	46,8	46,3	45,8	91,1			
		75	74,7	72,3	73,5	64,1	66,8	70,0	93,7			
Cefkwinom	jaja	25	22,5	23,9	21,9	24,9	22,2	23,9	93,0	91,0		
		50	49,2	41,4	46,4	42,4	46,5	42,6	89,5			
		75	66,9	69,8	68,1	65,8	70,9	65,7	90,5			
Cefalonium	jaja	25	21,4	23,9	20,8	21,9	22,8	20,7	87,7	88,9		
		50	43,9	41,1	44,6	43,8	48,9	45,8	89,4			

		75	69,9	67,2	70,9	64,5	67,9	62,7	89,6		
Cefazolina	jaja	25	22,0	26,0	21,6	24,0	21,7	24,6	93,2	93,4	
		50	43,3	43,6	45,1	44,3	48,5	49,4	91,4		
		75	72,1	68,6	70,3	68,8	74,4	75,9	95,6		
Cefaleksyna	jaja	25	21,7	21,7	23,0	20,4	23,3	24,9	90,0	90,1	
		50	48,5	42,0	42,5	43,1	45,8	41,9	87,9		
		75	70,8	68,9	61,4	71,6	73,0	70,1	92,4		
Cefoperazon	jaja	25	24,7	21,4	21,5	22,5	23,5	25,0	92,5	90,4	
		50	50,6	45,7	40,0	44,2	41,6	46,2	89,4		
		75	67,9	70,2	65,5	61,7	60,9	75,5	89,3		
Makrolidy											
Tylozyna	jaja	100	107	82,3	107	98,0	89,8	108	98,7	98,3	
		200	193	201	182	198	196	192	96,9		
		300	288	301	284	297	309	307	99,2		
Erytromycyna	jaja	75	69,2	72,1	74,6	65,1	62,9	70,5	92,1	95,0	
		150	144	142	151	141	146	141	96,1		
		225	225	220	213	219	216	214	96,8		
Spiramycyna	jaja	25	20,4	25,3	26,0	22,1	28,0	25,3	98,2	96,8	97,4
		50	47,7	49,5	46,8	46,5	48,1	48,7	95,8		
		75	75,8	69,0	69,2	72,9	71,4	75,8	96,5		
Tylmikozyzna	jaja	25	27,8	23,8	27,8	25,9	24,9	23,7	103	101	
		50	47,3	46,1	49,7	53,1	49,5	51,6	99,1		
		75	69,2	74,7	75,4	79,9	74,5	77,6	100		
Jozamycyna	jaja	25	23,5	23,5	25,1	25,9	24,8	23,4	97,4	96,2	
		50	48,5	47,3	50,8	46,1	49,8	45,9	96,1		
		75	69,0	70,1	75,7	69,6	72,7	70,4	95,0		
Pleuromutyliny											
Tiamulina	jaja	500	510	514	481	488	448	448	96,3	97,0	97,0
		1000	1010	978	883	1020	988	1000	97,9		
		1500	1460	1490	1530	1420	1410	1430	97,0		
Tetracykliny											
Oksytetracyklina	jaja	100	91,1	108	93,9	104	96,3	92,0	97,5	98,4	
		200	194	183	187	202	211	204	98,5		
		300	304	272	314	280	306	311	99,2		
4-epioksy-tetracyklina	jaja	100	103	95,8	95,8	87,4	88,3	94,5	94,1	96,8	
		200	194	202	197	181	205	201	98,2		
		300	292	292	291	299	309	283	98,1		
Tetracyklina	jaja	100	97,1	95,5	95,1	93,5	93,1	96,9	95,2	94,3	96,8
		200	192	180	190	181	188	188	93,2		
		300	271	285	279	293	285	289	94,5		
4-epitetracyklina	jaja	100	98,3	95,2	101,0	93,7	72,5	98,7	93,2	95,3	
		200	187	181	181	191	196	193	94,0		
		300	309	288	295	293	291	299	98,6		
Chlorotetracyklina	jaja	100	99,4	82,9	95,5	102,2	98,0	94,1	95,3	95,3	
		200	197	181	211	182	182	205	96,4		

		300	295	272	269	272	300	285	94,0		
4-epichlorotetracyklina	jaja	100	98,9	96,4	102	94,9	101	96,1	98,3	98,0	
		200	198	204	192	190	190	203	98,0		
		300	302	282	290	284	307	295	97,7		
Doksycyklina	jaja	25	26,3	25,9	24,1	24,3	25,9	25,4	101	99,7	
		50	50,3	48,5	45,0	49,2	52,9	51,6	99,2		
		75	71,2	78,7	74,7	68,2	72,8	79,1	98,8		
Linkozamidy											
Linkomycyna	jaja	25	22,3	21,1	22,3	23,1	22,6	21,3	88,4	88,5	88,5
		50	46,5	44,6	45,0	42,6	40,9	48,6	89,4		
		75	70,3	64,9	62,4	67,6	66,1	62,5	87,5		

Tabela A 8. Wyniki z Doświadczenia 3 (matryca jaja)

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Fluorochinolony											
Marbofloksacyna	jaja	25	10,2	10,4	12,4	9,34	11,4	7,28	40,7	42,1	
		50	24,5	22,9	20,3	21,1	19,4	20,3	42,8		
		75	32,4	29,6	32,9	32,0	38,4	27,2	42,8		
Norfloksacyna	jaja	25	9,55	8,67	9,94	9,04	8,78	9,02	36,7	37,2	
		50	17,9	17,6	18,3	18,6	19,9	19,0	37,1		
		75	29,1	28,0	28,5	27,2	29,7	28,0	37,9		
Ciprofloksacyna	jaja	25	1,43	1,38	0,91	1,43	1,52	2,26	5,95	6,69	
		50	4,54	4,36	3,64	4,35	3,54	2,94	7,79		
		75	7,25	4,04	3,98	3,49	4,74	4,97	6,33		
Danofloksacyna	jaja	25	5,91	6,95	5,09	5,26	7,16	5,06	23,6	21,9	
		50	6,85	11,2	15,7	6,65	10,6	14,7	21,9		
		75	14,8	18,3	16,5	12,5	9,05	20,3	20,3		
Enrofloksacyna	jaja	25	0,88	1,74	1,71	0,89	1,59	1,09	5,27	7,08	41,1
		50	5,77	4,89	3,97	5,64	4,41	2,79	9,16		
		75	4,10	3,71	4,82	7,39	3,79	6,87	6,82		
Sarafloksacyna	jaja	25	3,68	7,94	9,35	5,46	6,73	8,09	27,5	27,8	
		50	10,7	12,1	11,0	12,6	16,5	9,78	24,2		
		75	30,7	20,8	27,6	21,2	21,0	21,5	31,7		
Difloksacyna	jaja	25	12,2	13,6	11,3	10,9	14,1	19,3	54,2	56,6	
		50	37,5	20,8	16,7	18,7	35,1	38,4	55,8		
		75	44,1	51,1	42,1	42,4	43,6	45,7	59,8		
Kwas oksolinowy	jaja	25	15,5	16,7	16,4	17,3	16,2	15,9	65,3	64,7	
		50	33,3	29,7	31,9	29,8	34,2	28,3	62,4		
		75	50,7	48,2	52,1	45,6	47,8	53,8	66,3		
Kwas nalidyksowy	jaja	25	13,1	12,0	7,1	8,0	33,3	10,0	55,7	54,4	
		50	26,6	19,3	33,3	38,7	24,8	21,9	54,9		
		75	51,8	34,6	13,7	34,8	47,5	54,7	52,7		
Flumechina	jaja	25	23,5	21,0	24,3	22,8	22,0	23,0	91,1	92,9	

		50	46,5	42,0	46,0	47,0	48,0	44,5	91,3		
		75	71,1	73,9	72,3	75,4	69,7	70,5	96,2		
Sulfonamidy											
Sulfaguanidyna	jaja	25	17,8	18,8	13,0	12,4	18,9	18,8	66,5	68,7	
		50	44,3	24,1	46,9	25,4	28,1	36,4	68,4		
		75	60,3	40,1	63,3	56,7	37,9	62,2	71,2		
Sulfadiazyna	jaja	25	17,5	19,1	18,1	19,9	19,4	19,2	75,5	74,1	
		50	35,4	38,1	34,9	37,0	39,1	36,5	73,7		
		75	55,7	53,2	52,1	57,8	55,1	54,8	73,0		
Sulfametoksypyridazyna	jaja	25	18,7	15,7	23,5	19,3	21,7	20,0	79,3	76,7	
		50	37,5	42,4	46,5	42,3	32,3	33,9	78,3		
		75	62,6	64,8	57,5	41,6	55,4	44,0	72,4		
Sulfametazyna	jaja	25	23,9	23,5	19,9	12,6	18,1	15,7	75,8	75,8	
		50	31,8	40,4	46,6	43,3	39,6	36,3	79,3		
		75	60,6	44,0	55,8	58,6	53,8	52,3	72,2		
Sulfatiazol	jaja	25	14,9	13,9	14,8	18,2	16,7	12,7	60,8	61,5	
		50	38,0	27,5	32,4	22,5	40,1	24,1	61,5		
		75	46,0	56,5	43,9	53,9	37,1	42,9	62,3		
Sulfamonometoksyna	jaja	25	16,1	18,5	13,5	13,6	11,7	15,0	58,9	59,3	67,4
		50	35,3	29,8	30,8	33,5	25,8	27,8	61,0		
		75	31,5	35,7	50,2	53,1	50,2	40,4	58,0		
Sulfadoksyna	jaja	25	16,6	17,1	17,9	15,4	21,5	16,7	70,1	71,6	
		50	41,1	46,1	41,8	37,5	24,6	35,4	75,5		
		75	32,4	64,0	70,0	47,5	47,0	50,6	69,2		
Sulfachinoksalina	jaja	25	15,3	19,6	13,3	18,9	17,6	18,1	68,5	67,9	
		50	43,1	23,0	35,4	41,3	33,6	21,3	65,9		
		75	70,0	49,3	42,2	41,6	44,9	63,3	69,2		
Sulfadimetoksyna	jaja	25	8,77	13,8	11,9	19,9	10,9	13,2	52,3	48,1	
		50	24,5	28,8	28,8	17,0	17,2	22,1	46,1		
		75	30,8	36,6	50,3	28,5	37,1	23,5	46,0		
Sulfametoksazol	jaja	25	17,3	11,2	24,3	13,7	13,0	13,0	61,7	62,0	
		50	29,0	30,8	28,4	31,0	32,9	33,8	62,0		
		75	56,0	55,7	54,1	24,5	39,3	50,4	62,2		
Sulfamerazyna	jaja	25	19,9	20,9	19,1	17,3	15,9	20,1	75,5	75,3	
		50	38,5	37,6	37,4	44,8	30,3	33,2	73,9		
		75	50,4	62,0	56,6	53,2	47,6	74,4	76,5		
β-laktamy											
Amoksycylina	jaja	25	5,60	5,52	7,01	7,84	9,20	7,61	28,4	25,9	
		50	11,9	9,92	11,3	12,8	13,9	9,00	22,9		
		75	14,6	25,4	15,3	18,7	16,0	28,3	26,3		
Ampicylina	jaja	25	9,40	10,3	6,73	11,1	5,83	12,6	37,3	38,0	35,2
		50	22,6	21,0	21,2	17,6	15,5	22,1	40,0		
		75	29,1	41,0	26,5	25,9	22,7	20,6	36,8		
Penicylina G	jaja	25	10,5	9,20	16,3	8,90	11,9	11,8	45,7	42,5	
		50	19,2	18,0	19,7	23,8	18,4	22,5	40,5		

		75	23,5	43,3	27,6	32,6	28,2	30,1	41,2		
Penicylina V	jaja	12,5	5,71	6,50	5,50	6,24	7,00	5,61	48,6	46,6	
		25	13,8	9,12	11,0	9,32	11,7	17,6	48,3		
		37,5	25,2	18,1	12,5	15,1	10,5	15,4	43,0		
Oksacylina	jaja	25	12,2	13,1	11,6	15,1	11,6	14,9	52,3	54,1	
		50	27,9	35,4	26,1	26,5	26,0	31,4	57,8		
		75	47,0	34,0	36,4	43,9	36,0	38,1	52,3		
Kloksacylina	jaja	25	11,5	14,9	12,2	9,44	9,17	10,1	44,9	42,8	
		50	22,5	19,5	20,0	23,5	19,3	23,1	42,6		
		75	36,8	34,8	24,4	23,2	37,8	27,1	40,9		
Nafcylina	jaja	25	10,9	10,0	12,2	11,4	11,8	9,82	44,0	42,7	
		50	18,6	24,5	24,4	24,4	18,7	20,8	43,8		
		75	24,8	34,7	38,2	21,3	28,7	33,4	40,2		
Dikloksacylina	jaja	25	17,1	10,3	17,0	14,5	13,7	10,6	55,5	53,6	
		50	23,2	34,0	28,2	29,1	22,3	21,1	52,6		
		75	43,8	37,4	60,9	26,4	29,6	39,2	52,7		
Cefapiryna	jaja	25	5,52	5,30	5,52	5,02	4,83	6,33	21,7	19,2	
		50	6,53	8,36	9,84	7,43	9,60	9,75	17,2		
		75	12,5	14,4	15,5	15,3	13,5	13,6	18,8		
Ceftiofur	jaja	25	10,6	10,8	13,3	12,3	14,8	9,93	47,8	43,8	
		50	24,3	14,4	20,2	24,2	22,4	21,7	42,4		
		75	29,4	36,8	33,3	32,4	23,8	30,2	41,3		
Cefkwinom	jaja	25	3,33	4,17	5,03	3,89	5,37	4,59	17,6	17,3	
		50	9,55	10,60	6,92	11,0	7,80	7,69	17,9		
		75	13,3	14,3	10,0	13,7	10,9	11,5	16,4		
Cefalonium	jaja	25	7,85	5,92	6,09	3,84	5,17	6,68	23,7	22,3	
		50	10,5	11,8	8,09	15,3	9,17	11,9	22,3		
		75	10,9	16,2	14,7	15,1	20,5	16,8	20,9		
Cefazolina	jaja	25	4,02	4,17	3,70	6,22	5,33	5,69	19,4	18,5	
		50	9,66	5,59	11,7	8,61	10,4	6,84	17,6		
		75	17,9	10,9	11,5	15,5	14,8	12,2	18,4		
Cefaleksyna	jaja	25	3,94	6,30	6,05	4,42	6,49	4,76	21,3	24,6	
		50	13,7	16,2	10,0	16,7	13,5	14,1	28,1		
		75	19,7	15,5	11,9	15,6	24,6	22,6	24,4		
Cefoperazon	jaja	25	11,0	11,5	7,38	8,03	9,31	11,3	39,0	36,3	
		50	19,4	2,6	15,0	22,0	21,2	20,1	33,4		
		75	24,4	25,7	32,2	26,6	28,8	27,0	36,6		
Makrolidy											
Tylozyna	jaja	100	51,2	43,9	61,1	50,7	69,9	61,4	56,4	57,0	
		200	130	114	88	130	109	134	58,8		
		300	177	144	163	167	155	202	56,0		
Erytromycyna	jaja	75	36,6	26,9	29,1	39,7	41,9	42,4	48,1	47,9	59,3
		150	103	68,8	68,9	56,5	56,9	82,9	48,6		
		225	91,1	161	90,5	107,0	93,9	89,8	46,9		
Spiramycyna	jaja	25	10,2	13,2	10,8	13,0	12,4	15,7	50,2	48,9	

		50	22,0	28,8	18,8	21,2	27,3	27,1	48,4		
		75	31,3	38,6	32,7	40,7	45,1	28,1	48,1		
Tylmikozyzna	jaja	25	20,1	12,4	15,9	15,3	22,5	17,5	69,1	69,2	
		50	34,5	46,2	28,8	35,4	29,2	26,7	66,9		
		75	57,9	43,8	49,3	41,7	69,8	59,7	71,6		
Jozamycyna	jaja	25	16,8	18,4	21,1	14,9	23,9	17,1	74,8	73,6	
		50	41,3	32,5	36,6	34,7	26,9	49,9	74,0		
		75	60,1	69,8	32,6	62,3	40,7	59,1	72,1		
Pleuromutyliny											
Tiamulina	jaja	500	438	429	396	366	375	395	80,0	81,6	81,6
		1000	895	770	898	1040	707	699	83,5		
		1500	1390	1330	1150	1180	1280	1000	81,4		
Linkozamidy											
Linkomycyna	jaja	25	17,3	15,7	18,4	14,2	14,1	15,2	63,3	62,0	62,0
		50	28,6	33,0	31,8	27,9	30,8	29,4	60,5		
		75	45,8	53,4	49,6	43,0	45,5	42,3	62,1		
Tetracykliny											
Niski odzysk (<10%) – metoda nieodpowiednia dla tej grupy związków											

Tabela A 9. Wyniki z Doświadczenia 1 (matryca miody)

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Fluorochinolony											
Marbofloksacyna	miody	5	4,95	4,73	4,62	4,63	5,00	4,39	94,4	95,9	
		10	9,72	9,69	9,07	9,70	9,63	9,61	95,7		
		15	14,7	14,8	14,8	14,3	14,9	14,5	97,7		
Norfloksacyna	miody	5	4,57	4,51	4,72	4,51	4,69	4,68	92,3	92,6	
		10	9,13	9,49	9,14	9,36	9,46	9,37	93,3		
		15	14,1	13,8	14,0	13,7	13,3	14,2	92,4		
Ciprofloksacyna	miody	5	4,69	4,66	4,44	4,69	4,72	4,88	93,6	94,5	
		10	9,31	9,98	9,50	9,55	9,56	9,34	95,4		
		15	13,9	14,3	14,0	14,5	14,3	14,1	94,5		
Danofloksacyna	miody	5	4,72	4,58	4,51	4,73	4,82	4,74	93,7	93,3	93,1
		10	8,99	9,26	8,81	9,09	9,14	9,87	91,9		
		15	14,0	14,1	14,3	14,4	13,9	14,2	94,4		
Enrofloksacyna	miody	5	4,84	4,69	4,79	5,00	4,75	4,71	95,9	96,7	
		10	9,61	9,71	9,53	9,81	9,70	10,1	97,1		
		15	14,8	14,2	14,4	14,8	14,5	14,7	97,0		
Sarafloksacyna	miody	5	4,48	4,51	4,64	4,68	4,28	4,53	90,4	91,8	
		10	8,81	8,82	9,56	8,90	9,84	9,26	92,0		
		15	14,3	13,5	13,9	14,1	13,9	14,0	92,9		
Difloksacyna	miody	5	4,78	4,69	4,87	4,68	4,71	4,70	94,7	94,1	
		10	8,58	9,31	9,24	9,71	9,81	9,66	93,8		
		15	14,1	14,2	14,0	13,7	13,6	14,7	93,6		
Kwas oksolinowy	miody	5	4,42	4,49	4,29	4,42	4,43	4,69	89,1	89,9	

		10	8,80	8,93	9,12	9,08	9,32	8,83	90,1		
		15	13,0	13,8	14,2	13,3	13,1	14,0	90,5		
Kwas nalidyksowy	miody	5	4,23	4,45	4,28	4,59	4,15	4,17	86,2		
		10	8,41	8,88	9,20	8,73	9,54	9,15	89,8	89,3	
		15	13,3	14,0	14,0	13,5	13,3	14,5	91,8		
Flumechina	miody	5	4,70	4,70	4,59	4,92	4,56	4,65	93,7		
		10	9,44	9,36	9,52	9,03	9,29	9,03	92,8	93,3	
		15	14,2	14,2	14,0	13,9	13,7	14,1	93,5		
Makrolidy											
Tylozyna	miody	5	4,74	4,16	4,42	4,67	4,48	4,13	88,6		
		10	8,89	8,52	8,72	9,16	9,05	9,25	89,3	89,5	
		15	13,6	13,9	13,4	13,4	13,5	13,6	90,4		90,1
Erytromycyna	miody	5	4,37	4,53	4,47	4,45	4,48	4,54	89,4		
		10	8,79	8,75	9,63	9,35	8,99	9,20	91,2	90,8	
		15	13,3	13,6	14,2	13,6	13,9	14,1	91,8		
Tetracykliny											
Oksytetracyklina	miody	5	4,82	4,59	4,45	4,86	4,59	4,74	93,5		
		10	9,23	9,32	9,32	10,01	9,55	9,51	94,9	94,6	
		15	14,4	13,7	14,5	14,4	14,4	14,6	95,4		
4-epioksyntetracyklina	miody	5	4,71	4,73	4,58	4,90	4,64	4,44	93,3		
		10	9,21	9,73	9,48	9,08	9,77	9,72	95,0	94,5	
		15	14,5	14,3	14,0	14,5	14,2	14,1	95,2		
Tetracyklina	miody	5	4,60	4,36	4,39	4,65	4,89	4,40	91,0		
		10	9,49	9,23	9,63	9,25	9,65	9,66	94,8	93,5	
		15	14,0	14,4	14,4	14,5	14,5	13,4	94,7		
4-epitetracyklina	miody	5	4,71	4,71	4,67	4,61	4,75	4,76	94,0		
		10	9,34	8,78	8,58	8,68	9,57	9,91	91,4	93,4	93,8
		15	14,0	14,2	14,3	14,7	14,1	14,1	94,9		
Chlorotetracyklina	miody	5	4,57	4,86	4,46	4,92	4,78	4,42	93,3		
		10	8,74	9,39	8,87	9,31	9,19	9,82	92,2	93,0	
		15	13,9	13,8	14,3	14,7	13,4	14,1	93,4		
4-epichlorotetracyklina	miody	5	4,68	4,79	4,66	4,71	4,57	4,51	93,1		
		10	9,62	9,61	9,58	8,98	9,52	9,26	94,3	94,1	
		15	14,1	14,3	14,2	14,2	14,2	14,4	94,8		
Doksycyklina	miody	5	4,43	4,54	4,54	4,60	4,49	4,78	91,2		
		10	9,12	9,27	9,79	9,40	9,54	9,64	94,6	93,3	
		15	14,5	14,7	14,4	13,6	13,4	14,0	94,1		
Linkozamidy											
Linkomycyna	miody	5	4,94	4,80	4,65	5,00	4,93	4,56	96,3		
		10	9,81	9,78	9,69	9,54	9,16	9,31	95,5	96,2	96,2
		15	14,7	14,8	14,7	14,6	13,9	14,3	96,7		
Aminoglikozydy											
Streptomycyna	miody	5	4,31	4,49	4,38	4,38	4,21	4,46	87,4		
		10	8,74	8,80	9,24	8,69	8,83	8,59	88,1	88,8	88,8
		15	13,4	13,9	14,3	14,2	13,3	12,7	90,8		

Tabela A 10. Wyniki z Doświadczenia 2 (matryca miody)

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6			
Sulfonamidy											
Sulfatiazol	miody	5	0,797	0,781	0,753	0,743	0,756	0,760	15,3	15,3	49,0
		10	1,54	1,48	1,48	1,52	1,52	1,56	15,2		
		15	2,15	2,34	2,35	2,38	2,44	2,32	15,5		
Sulfamerazyna	miody	5	1,68	1,92	1,44	1,54	1,86	1,85	34,3	33,9	
		10	3,19	3,22	3,02	3,14	3,68	3,30	32,6		
		15	5,06	5,08	5,27	5,34	5,30	5,31	34,9		
Sulfametazyna	miody	5	0,961	0,940	0,972	0,953	0,761	0,660	17,5	17,7	
		10	1,55	1,59	1,86	1,24	2,06	1,77	16,8		
		15	2,94	2,64	3,14	2,90	2,40	2,80	18,7		
Sulfametoksazol	miody	5	3,80	3,60	3,57	3,61	3,56	3,61	72,5	73,0	
		10	7,13	7,19	7,18	7,10	7,09	7,20	71,4		
		15	11,3	11,2	11,3	11,2	11,3	11,3	75,1		
Sulfamonometoksyna	miody	5	3,68	3,90	3,81	3,77	3,79	3,78	75,7	73,4	
		10	7,54	7,33	7,56	7,20	6,88	6,89	72,3		
		15	10,2	11,4	10,9	10,9	10,9	10,5	72,0		
Sulfadimetoksyna	miody	5	1,96	2,19	2,32	1,99	1,96	1,79	40,7	41,4	
		10	4,34	4,05	4,06	4,12	4,03	3,91	40,8		
		15	6,67	6,02	6,84	6,70	6,63	5,56	42,7		
Sulfaguanidyna	miody	5	0,461	0,471	0,438	0,419	0,426	0,428	8,81	9,03	
		10	0,922	0,922	0,926	0,916	0,896	0,894	9,13		
		15	1,37	1,35	1,36	1,37	1,35	1,46	9,17		
Sulfadiazyna	miody	5	2,59	3,46	3,43	2,37	3,38	3,38	62,0	61,2	
		10	6,08	6,13	6,10	6,12	6,07	6,11	61,0		
		15	8,97	9,06	9,13	8,73	9,20	9,38	60,5		
Sulfametoksypyridazyna	miody	5	2,36	2,34	2,40	2,23	2,41	2,65	48,0	47,3	
		10	4,19	4,60	5,12	4,42	4,73	4,60	46,1		
		15	7,34	7,24	7,93	6,68	7,30	6,65	47,9		
Sulfadoksyna	miody	5	3,77	3,91	3,67	3,71	3,98	4,05	77,0	74,9	
		10	7,85	7,69	7,72	6,96	7,39	7,72	75,5		
		15	10,7	11,2	11,1	11,0	10,2	10,7	72,1		
Sulfachinoksalina	miody	5	1,31	1,00	1,03	1,02	1,00	1,20	21,9	22,7	
		10	2,16	2,05	2,65	2,26	2,17	2,09	22,3		
		15	3,07	3,71	3,69	3,80	3,72	3,67	24,1		
Sulfacetamid	miody	5	3,19	3,18	3,17	3,17	3,29	3,56	65,2	64,7	
		10	6,54	6,28	6,65	6,48	6,51	6,28	64,6		
		15	9,78	9,61	9,62	9,70	9,75	9,48	64,4		
Sulfachloropirydazyna	miody	5	3,59	3,59	3,57	3,58	3,56	3,58	71,5	74,6	
		10	7,33	7,92	7,92	7,04	7,90	7,24	75,6		
		15	11,7	11,6	11,7	11,0	11,5	11,7	76,8		
Sulfapirydyna	miody	5	1,90	1,88	1,88	1,85	1,87	1,86	37,5	37,5	

		10	3,77	3,80	3,72	3,97	3,69	3,99	38,2		
		15	5,56	5,67	5,62	5,15	5,51	5,58	36,8		
Sulfisoksazol	miody	5	3,66	3,65	3,54	3,52	3,50	3,83	72,3		
		10	7,56	7,50	7,58	7,56	7,43	7,35	74,9	74,8	
		15	11,4	11,8	11,2	11,7	11,6	11,6	77,0		
Sulfachloropirazyne	miody	5	2,63	2,23	3,23	3,24	3,23	2,83	57,9		
		10	4,41	5,41	5,42	5,40	5,63	6,12	54,0	54,1	
		15	6,92	7,55	7,55	7,97	7,56	7,75	50,3		
Sulfametizol	miody	5	3,68	2,87	2,20	3,19	2,21	3,26	58,0		
		10	5,90	6,16	5,82	5,66	5,62	5,81	58,3	57,8	
		15	8,29	8,31	8,20	8,15	9,29	9,23	57,2		
Diaminopirymidyny											
Trimetoprim	miody	5	0,158	0,184	0,521	0,429	0,509	0,613	8,05		
		10	1,43	0,865	1,58	1,04	1,68	1,66	13,7	12,2	12,2
		15	2,20	2,78	2,21	1,92	1,81	2,46	14,9		

Tabela A 11. Wyniki z Doświadczenia 3 (matryca miody)

Związek	Matryca	Poziom stężenia (µg/kg)	Stężenie (µg/kg)						Średni odzysk (%)	Średni odzysk dla związku (%)	Średnia odzysku dla grupy (%)			
			Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6						
Sulfonamidy														
Sulfatiazol	miody	5	5,03	4,81	4,70	4,71	5,08	4,47	95,9	97,3	96,4			
		10	9,89	9,86	9,24	9,88	9,81	9,79	97,4					
		15	15,0	14,1	15,0	14,6	15,2	14,7	98,5					
Sulfamerazyne	miody	5	4,64	4,59	4,79	4,58	4,77	4,76	93,8	94,3		96,4		
		10	9,31	9,67	9,32	9,53	9,63	9,55	95,0					
		15	14,3	14,1	14,3	13,9	13,6	14,5	94,2					
Sulfametazyne	miody	5	4,78	4,76	4,34	4,79	4,82	4,97	94,8	96,5			96,4	
		10	9,55	10,21	9,74	9,79	9,80	9,58	97,8					
		15	14,2	14,6	14,4	14,9	14,7	14,5	97,0					
Sulfametoksazol	miody	5	4,83	4,69	4,61	4,84	4,93	4,84	95,8	96,7				96,4
		10	9,32	9,59	9,64	9,72	9,47	10,2	96,6					
		15	14,4	14,4	15,1	14,8	14,7	14,6	97,8					
Sulfamonometoksyna	miody	5	4,84	4,69	4,79	5,00	4,75	4,72	96,0	97,5	96,4			
		10	9,72	9,78	9,63	9,90	9,85	10,2	98,4					
		15	15,0	14,4	14,5	15,0	14,6	14,8	98,2					
Sulfadimetoksyna	miody	5	4,49	4,52	4,65	4,68	4,89	4,94	93,8	93,8		96,4		
		10	9,04	8,95	9,69	9,03	9,97	9,39	93,4					
		15	14,4	13,7	14,1	14,2	14,1	14,2	94,1					
Sulfaguanidyna	miody	5	4,90	4,82	5,00	4,80	4,83	4,82	97,2	96,6			96,4	
		10	8,87	9,60	9,53	10,0	10,1	10,0	96,7					
		15	14,4	14,6	14,3	14,0	13,9	15,0	95,8					
Sulfadiazyna	miody	5	4,89	4,472	4,981	5,065	4,717	4,97	97,0	96,9				96,4
		10	9,59	9,49	9,84	9,54	9,48	9,61	95,9					
		15	14,8	14,6	14,7	14,6	14,7	14,4	97,7					

Sulfametoksypyrydazyna	miody	5	4,80	4,85	4,71	4,63	4,83	4,50	94,4	95,9	
		10	9,35	9,51	9,50	9,93	9,63	9,78	96,2		
		15	14,7	14,2	14,6	15,1	14,4	14,5	97,1		
Sulfadoksyna	miody	5	4,89	4,91	4,85	4,88	4,92	4,90	97,8	97,0	
		10	9,68	9,61	9,64	9,60	9,37	9,87	96,3		
		15	14,7	14,6	15,0	14,4	14,3	14,2	96,8		
Sulfachinoksalina	miody	5	5,04	4,90	4,67	4,98	4,90	4,76	97,5	97,4	
		10	9,50	9,65	9,65	9,86	10,1	9,43	97,0		
		15	14,9	14,7	15,0	14,9	14,2	14,3	97,7		
Sulfacetamid	miody	5	4,93	4,80	4,75	4,64	4,71	4,86	95,6	96,8	
		10	10,1	9,61	9,61	9,43	9,62	9,88	97,1		
		15	14,6	14,5	14,8	14,7	14,8	14,4	97,6		
Sulfachloropyrydazyna	miody	5	4,93	4,73	4,94	4,68	4,73	4,72	95,8	95,9	
		10	9,48	9,32	9,30	9,52	9,42	9,57	94,3		
		15	15,0	14,8	14,8	14,1	14,9	14,3	97,6		
Sulfapirydyna	miody	5	4,96	4,83	4,85	4,67	4,76	4,64	95,7	96,0	
		10	9,62	9,90	9,56	9,27	9,30	9,70	95,6		
		15	15,0	14,9	14,5	14,7	14,2	13,7	96,7		
Sulfisoksazol	miody	5	4,77	4,75	4,88	4,53	4,59	4,96	95,0	96,8	
		10	9,85	10,2	9,73	9,60	9,81	9,24	97,4		
		15	15,0	15,0	14,9	14,6	14,6	14,2	97,9		
Sulfachloropirazyna	miody	5	4,84	4,97	4,73	4,79	4,80	4,99	97,1	96,2	
		10	9,45	9,52	9,60	9,12	9,55	9,11	93,9		
		15	14,7	14,7	14,2	14,7	14,8	14,8	97,6		
Sulfametizol	miody	5	4,86	4,84	4,79	5,02	4,86	5,07	98,1	97,6	
		10	9,39	9,42	10,0	10,2	9,98	9,73	97,9		
		15	14,4	14,6	14,3	15,0	14,8	14,0	96,8		
Diaminopirimidyny											
Trimetoprim	miody	5	5,03	5,04	4,96	4,65	4,59	4,77	96,8	96,1	96,1
		10	9,43	9,05	9,72	9,68	9,50	9,74	95,2		
		15	14,3	14,8	15,1	13,9	14,1	14,4	96,2		

POLSKIE CENTRUM AKREDYTACJI
POLISH CENTRE FOR ACCREDITATION



Sygnatariusz EA MLA
EA MLA Signatory

CERTYFIKAT AKREDYTACJI
LABORATORIUM BADAWCZEGO
ACCREDITATION CERTIFICATE OF TESTING LABORATORY
Nr AB 465

Potwierdza się, że: / This is to confirm that:

**WOJEWÓDZKI INSPEKTORAT WETERYNARII
W POZNANIU**
ZAKŁAD HIGIENY WETERYNARYJNEJ W POZNANIU
IM. TADEUSZA ŁOSIŃSKIEGO
ul. Grunwaldzka 250, 60-166 Poznań

spełnia wymagania normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02
meets requirements of the PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 standard

Akredytowana działalność jest określona w Zakresie Akredytacji Nr AB 465
Accredited activity is defined in the Scope of Accreditation No AB 465

Akredytacja pozostaje w mocy pod warunkiem przestrzegania
wymagań jednostki akredytującej określonych w kontrakcie Nr AB 465
This accreditation remains in force provided the Laboratory observes
the requirements of Accreditation Body defined in the Contract No AB 465

Akredytacji udzielono dnia 31.03.2004 r.
Accreditation was granted on 31.03.2004



DYREKTOR
POLSKIEGO CENTRUM AKREDYTACJI

LUCYNA OLBORSKA

Warszawa, dnia 3 lutego 2020 roku

PCA

Zakres akredytacji Nr AB 465
Scope of accreditation No. AB 465

**ZAKRES AKREDYTACJI
LABORATORIUM BADAWCZEGO**
SCOPE OF ACCREDITATION FOR TESTING LABORATORY
Nr / No. AB 465

wydany przez / issued by
POLSKIE CENTRUM AKREDYTACJI
01-382 Warszawa, ul. Szczotkarska 42

Wydanie / Issue 30 z / of 10.01.2025

Za zgodność z oryginałem

podpis *[signature]* data 03.03.2025

Kierownik Pracowni

[signature]

mer Agnieszka Konydłowska

 AB 465	Nazwa i adres / Name and address WOJEWÓDZKI INSPEKTORAT WETERYNARII W POZNANIU ZAKŁAD HIGIENY WETERYNARYJNEJ W POZNANIU im. Tadeusza Łosińskiego ul. Grunwaldzka 250 60-166 Poznań
Kod identyfikacyjny / Identification code¹⁾ - B/3, B/22, B/55, B/57 - C/3, C/22, C/28, C/55 - D/3 - K/3, K/22, K/28, K/55, K/57 - M/55 - O/22, O/55	Dziedzina i przedmiot badań / Field of testing and item: - Badania biologiczne i biochemiczne obiektów i materiałów biologicznych przeznaczonych do badań, żywności, pasz dla zwierząt, obiektów z obszaru produkcji żywności / Biological and biochemical tests of biological items and materials for testing, food, animal feedstuffs, objects from food production area - Badania chemiczne obiektów i materiałów biologicznych przeznaczonych do badań, żywności, wody, pasz dla zwierząt / Chemical tests of biological items and materials for testing, food, water, animal feedstuffs - Badania kliniczne, medyczne i weterynaryjne obiektów i materiałów biologicznych / Clinical, medical and veterinary tests of biological items and materials for testing - Badania mikrobiologiczne obiektów i materiałów biologicznych przeznaczonych do badań, żywności, wody, pasz dla zwierząt, obiektów z obszaru produkcji żywności / Microbiological tests of biological items and materials for testing, food, water, animal feedstuffs, objects from food production area - Badania inne pasz dla zwierząt / Other tests of animal feedstuffs - Badania radiochemiczne i promieniowania – w tym nuklearne żywności, pasz dla zwierząt / Radiochemical tests and tests of radiation – including nuclear radiation of food, animal feedstuffs

Wersja strony / Page version: A

¹⁾ Kod identyfikacyjny zgodnie z załącznikiem do dokumentu DAB-07 dostępnym na stronie internetowej www.pca.gov.pl / The identification code according to the Annex to document DAB-07, available at PCA website www.pca.gov.pl

KIEROWNIK DZIAŁU AKREDYTACJI
BADAŃ I CERTYFIKACJI ŻYWNOSCI

HANNA TUGI

Niniejszy dokument jest załącznikiem do Certyfikatu Akredytacji Nr AB 465 z dnia 03.02.2020 r.
Cykl akredytacji od 05.02.2024 r. do 30.03.2028 r.
Status akredytacji oraz aktualność zakresu akredytacji można potwierdzić na stronie internetowej PCA www.pca.gov.pl

This document is an annex to accreditation certificate No. AB 465 of 03.02.2020
Accreditation cycle from 05.02.2024 to 30.03.2028
The status of accreditation and validity of the scope of accreditation can be confirmed at PCA website www.pca.gov.pl

Wydanie nr / Issue No. 30, 10.01.2025 1/55

Pracownia Badań Chemicznych w Poznaniu ul. Grunwaldzka 250, 60-166 Poznań		
Przedmiot badań/wyrób	Rodzaj działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
Elastyczny zakres akredytacji ^{1) 2) 3) 4) 5)}		
Żywność ¹⁾	Zawartość pestycydów ^{2), 3)} Metoda chromatografii gazowej z detekcją wychwytu elektronów (GC-ECD) i/lub termojonową (GC-NPD)	PBC-20.00.00 ⁴⁾ PBC-19.00.00 ⁴⁾ PBC-78.00.00 ⁴⁾ PN-EN 1528 ⁴⁾
	Zawartość kongenerów PCB ^{2), 3)} Metoda chromatografii gazowej z detekcją wychwytu elektronów (GC-ECD)	PBC-08.00.00 ⁴⁾
	Zawartość metali ^{2), 3)} Metoda absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS)	PBC-02.00.00 ⁴⁾
	Zawartość metali ^{2), 3)} Metoda płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS)	PBC-14.00.00 ⁴⁾
	Zawartość arsenu ³⁾ Metoda absorpcyjnej spektrometrii atomowej z generowaniem wodoroków (HGAAS)	PBC-63.00.00 ⁴⁾
	Zawartość rtęci ³⁾ Metoda atomowej spektrometrii absorpcyjnej z techniką amalgamacji	PBC-06.00.00 ⁴⁾
Żywność ¹⁾	Zawartość leków weterynaryjnych ^{2), 3)} Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD)	Procedury badawcze ⁵⁾
Żywność ¹⁾ Materiały biologiczne ¹⁾	Zawartość leków weterynaryjnych ^{2), 3)} Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	Procedury badawcze ⁵⁾
Żywność ¹⁾	Zawartość mykotoksyn ^{2), 3)} Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD)	Procedury badawcze ⁵⁾ PN-EN ISO 14501 ⁴⁾
Żywność ¹⁾ Materiały biologiczne ¹⁾	Zawartość hormonów i tyreostatyków ^{2), 3)} Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	Procedury badawcze ⁵⁾
Ryby, produkty rybne	Zawartość histaminy ³⁾ Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV-VIS)	PN-EN ISO 19343 ⁴⁾
Ryby	Zawartość barwników ^{2), 3)} Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	PBC-79.00.00 ⁴⁾

Wersja strony: A

Pracownia Badań Chemicznych w Poznaniu ul. Grunwaldzka 250, 60-166 Poznań		
Przedmiot badań/wyrób	Rodzaj działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
Elastyczny zakres akredytacji ^{1) 2) 3) 4) 5)}		
Pasze	Zawartość pestycydów ^{2), 3)} Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	PBC-03.00.00 ⁴⁾
	Zawartość rtęci ³⁾ Metoda atomowej spektrometrii absorpcyjnej z techniką amalgamacji	PBC-06.00.00 ⁴⁾
	Zawartość metali ³⁾ Metoda absorpcyjnej spektrometrii atomowej z generowaniem wodorków (HGAAS)	PBC-53.00.00 ⁴⁾ PBC-71.00.00 ⁴⁾ PN-EN 16159 ⁴⁾
	Zawartość metali ^{2), 3)} Metoda płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS)	PN-EN ISO 6869 ⁴⁾ PBC-52.00.00 ⁴⁾ Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2024/771 ⁴⁾
	Zawartość metali ^{2), 3)} Metoda absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS)	PBC-02.00.00 ⁴⁾
Woda	Zawartość leków weterynaryjnych ^{2), 3)} Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	Procedury badawcze ⁵⁾
	Zawartość hormonów i tyreostatyków ^{2), 3)} Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	PBC-103.00.00 ⁴⁾ PBC-104.00.00 ⁴⁾

1) Dodanie przedmiotu badań w ramach grupy przedmiotów badań.

2) Dodanie badanej cechy w ramach przedmiotu / grupy przedmiotów badań i metody (techniki badawczej).

3) Zmiana zakresu pomiarowego metody badawczej.

4) Stosowanie zaktualizowanych metod opisanych w: normach / procedurach opracowanych przez laboratorium/ przepisach prawa.

5) Stosowanie zaktualizowanych i wdrażanie nowych metod opisanych w: procedurach opracowanych przez laboratorium.

Lista akredytowanych działań jest publicznie udostępniana przez akredytowany podmiot

Wersja strony: A

Wykaz zmian Zakresu Akredytacji Nr AB 465

Status zmian: wersja pierwotna - A



Zatwierdzam status zmian
**KIEROWNIK
DZIAŁU AKREDYTACJI
BADAŃ I CERTYFIKACJI ŻYWNOSCI**

HANNA TUGI
dnia: 10.01.2025 r.

Dokument 6. Lista akredytowanych działań prowadzonych w ramach zakresu elastycznego

ZHW	LISTA AKREDYTOWANYCH DZIAŁAŃ PROWADZONYCH W RAMACH ZAKRESU ELASTYCZNEGO	
	ZAŁĄCZNIK DO ZAKRESU AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ -	NR LISTY: 1/PBCH
		WYDANIE NR: 51
		STRONA: 9 STRON:19
Przedmiot badań/wyrób	Rodział działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
	mapenterol (0,13-0,4) µg/kg brombuterol (0,14-0,4) µg/kg Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	
Mięso (tkanka mięśniowa), ryba, mleko	Zawartość substancji przeciwbakteryjnych Zawartość β-laktamów Zakres: Dla tkanki amoksyacylina (25-75) µg/kg ampicylina (25-75) µg/kg penicylina G (25-75) µg/kg penicylina V (12,5-37,5) µg/kg oksacylina (150-450) µg/kg kloksacylina (150-450) µg/kg nafcylicyna (150-450) µg/kg dikloksacylina (150-450) µg/kg cefapiryna (25-75) µg/kg ceftiofur (500-1500) µg/kg cefkwinom (25-75) µg/kg cefalonium (10-30) µg/kg cefazolina (25-75) µg/kg cefaleksyna (100-300) µg/kg cefoperazon (25-75) µg/kg Zakres: Dla mleka amoksyacylina (2,0-6,0) µg/kg ampicylina (2,0-6,0) µg/kg penicylina G (2,4-6,0) µg/kg penicylina V (2,1-6,0) µg/kg oksacylina (15-45) µg/kg kloksacylina (15-45) µg/kg nafcylicyna (15-45) µg/kg dikloksacylina (15-45) µg/kg cefapiryna (30-90) µg/kg ceftiofur (50-150) µg/kg cefkwinom (10-30) µg/kg cefalonium (10-30) µg/kg cefazolina (25-75) µg/kg cefaleksyna (50-150) µg/kg cefoperazon (25-75) µg/kg Zawartość sulfonamidów Zakres: Dla tkanki sulfaguanidyna (50-150) µg/kg sulfadiazyna (50-150) µg/kg sulfametoksypirydazyna (50-150) µg/kg sulfametazyna (50-150) µg/kg sulfatiazol (50-150) µg/kg sulfamonometoksyna (50-150) µg/kg sulfadoksyna (50-150) µg/kg sulfachinoksalina (50-150) µg/kg sulfadimetoksyna (50-150) µg/kg sulfametoksazol (50-150) µg/kg sulfamerazyna (50-150) µg/kg	PBC-101.00.00 wydanie 3 z dnia 10.06.2024 Za zgodność z oryginałem podpis <i>[podpis]</i> data 09.03.25 Kierownik Pracowni <i>[podpis]</i> mgr Agnieszka Kopudłowska

Załącznik ZHW PO-16.00.01 wydanie 10 z dnia 28.10.2022

ZHW	LISTA AKREDYTOWANYCH DZIAŁAŃ PROWADZONYCH W RAMACH ZAKRESU ELASTYCZNEGO	
	ZAŁĄCZNIK DO ZAKRESU AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO	
	PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ -	
Przedmiot badań/wyrób	Rodział działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
	Zakres: Dla mleka sulfaguanidyna (50-150) µg/kg sulfadiazyna (50-150) µg/kg sulfametoksypiridazyna (50-150) µg/kg sulfametazyna (50-150) µg/kg sulfatiazol (50-150) µg/kg sulfamonometoksyna (50-150) µg/kg sulfadoksyna (50-150) µg/kg sulfachinoksalina (50-150) µg/kg sulfadimetoksyna (50-150) µg/kg sulfametoksazol (50-150) µg/kg sulfamerazyna (50-150) µg/kg Zawartość aminoglikozydów Zakres: Dla tkanki spektynomycyna (120-450) µg/kg streptomycyna (230-750) µg/kg dihydrostreptomycyna (250-750) µg/kg kanamycyna A (55-150) µg/kg paromomycyna (250-750) µg/kg neomycyna (200-750) µg/kg gentamycyna (35-75) µg/kg Zakres: Dla mleka spektynomycyna (100-300) µg/kg streptomycyna (100-300) µg/kg dihydrostreptomycyna (100-300) µg/kg kanamycyna A (75-225) µg/kg paromomycyna (62-150) µg/kg neomycyna (750-2250) µg/kg gentamycyna (50-150) µg/kg Zawartość makrolidów Zakres: Dla tkanki tylozyna (50-150) µg/kg erytromycyna (100-300) µg/kg spiramycyna (100-300) µg/kg tylmikozyna (25-75) µg/kg jozamycyna (100-300) µg/kg tulatromycyna (14-75) µg/kg Zakres: Dla mleka tylozyna (25-75) µg/kg erytromycyna (20-60) µg/kg spiramycyna (100-300) µg/kg tylmikozyna (25-75) µg/kg jozamycyna (27-75) µg/kg Zawartość tetracyklin Zakres: Dla tkanki oksyetetracyklina (40-150) µg/kg tetracyklina (40-150) µg/kg chlorotetracyklina (50-150) µg/kg doksycyklina (40-150) µg/kg 4-epitetracyklina (50-150) µg/kg 4-epioksyetetracyklina (50-150) µg/kg	

Załącznik ZHW PO-16.00.01 wydanie 10 z dnia 28.10.2022

ZHW	LISTA AKREDYTOWANYCH DZIAŁAŃ PROWADZONYCH W RAMACH ZAKRESU ELASTYCZNEGO		NR LISTY: 1/PBCH
	ZAŁĄCZNIK DO ZAKRESU AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO		WYDANIE NR: 51
	PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ -		STRONA: 11 STRON: 19
	Przedmiot badań/wyrób	Rodział działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
		4-epichlorotetracyklina (50-150) µg/kg Zakres: Dla mleka oksytetracyklina (6,0-150) µg/kg tetracyklina (6,0-150) µg/kg chlortetracyklina (7,0-150) µg/kg doksytyklina (6,0-150) µg/kg 4-epitetacyklina (7,0-150) µg/kg 4-epichlorotetracyklina (7,0-150) µg/kg 4-epioksytetacyklina (6,0-150) µg/kg Zawartość linkozamidów Zakres: Dla tkanki linkomycyna (40-150) µg/kg Zakres: Dla mleka linkomycyna (75-225) µg/kg Zawartość fluorochinolonów Zakres: Dla tkanki marbofloksacyna (75-225) µg/kg norfloksacyna (50-150) µg/kg ciprofloksacyna (50-150) µg/kg danofloksacyna (50-150) µg/kg enrofloksacyna (50-150) µg/kg sarafloksacyna (15-45) µg/kg difloksacyna (150-450) µg/kg kwas oksolinowy (50-150) µg/kg kwas nalidyksowy (50-150) µg/kg flumechina (100-300) µg/kg Zakres: Dla mleka marbofloksacyna (37,5-112,5) µg/kg norfloksacyna (55-150) µg/kg ciprofloksacyna (50-150) µg/kg danofloksacyna (15-45) µg/kg enrofloksacyna (50-150) µg/kg sarafloksacyna (56-150) µg/kg difloksacyna (29-75) µg/kg kwas oksolinowy (26-75) µg/kg kwas nalidyksowy (27-75) µg/kg flumechina (25-75) µg/kg Zawartość pleuromutyliny Zakres: Dla tkanki tiamulina (14-75) µg/kg Zawartość diaminopirymidyn Zakres: Dla tkanki trimetoprim (15-75) µg/kg Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	

Załącznik ZHW PO-16.00.01 wydanie 10 z dnia 28.10.2022

ZHW	LISTA AKREDYTOWANYCH DZIAŁAŃ PROWADZONYCH W RAMACH ZAKRESU ELASTYCZNEGO	
	ZAŁĄCZNIK DO ZAKRESU AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO	
	PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ -	
Przedmiot badań/wyrób	Rodział działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
Jaja	Zawartość substancji przeciwbakteryjnych Zawartość β-laktamów Zakres: amoksycylina (28-75) $\mu\text{g/kg}$ ampicylina (28-75) $\mu\text{g/kg}$ penicylina G (26-75) $\mu\text{g/kg}$ penicylina V (15-37,5) $\mu\text{g/kg}$ oksacylina (26-75) $\mu\text{g/kg}$ kloksacylina (27-75) $\mu\text{g/kg}$ natcylina (27-75) $\mu\text{g/kg}$ dikloksacylina (28-75) $\mu\text{g/kg}$ cefapiryna (28-75) $\mu\text{g/kg}$ ceftiofur (28-75) $\mu\text{g/kg}$ cefkwinom (28-75) $\mu\text{g/kg}$ cefalonium (27-75) $\mu\text{g/kg}$ cefazolina (27-75) $\mu\text{g/kg}$ cefaleksyna (28-75) $\mu\text{g/kg}$ cefoperazon (28-75) $\mu\text{g/kg}$ Zawartość sulfonamidów Zakres: sulfaguanidyna (28-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfadiazyna (27-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfametoksypyridazylna (27-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfametazylna (27-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfatiazol (28-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfamonometoksyna (28-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfadoksyna (26-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfachinoksalina (28-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfadimetoksyna (30-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfametoksazol (28-75) $\mu\text{g/kg}$ sulfamerazylna (28-75) $\mu\text{g/kg}$ Zawartość makrolidów Zakres: tylozyna (56-300) $\mu\text{g/kg}$ erytromycyna (47-225) $\mu\text{g/kg}$ spiramycyna (28-75) $\mu\text{g/kg}$ tylmikozyna (29-75) $\mu\text{g/kg}$ jozamycyna (27-75) $\mu\text{g/kg}$ Zawartość tetracyklin Zakres: oksytetracyklina (52-300) $\mu\text{g/kg}$ tetracyklina (50-300) $\mu\text{g/kg}$ chlorotetracyklina (50-300) $\mu\text{g/kg}$ doksycyklina (27-75) $\mu\text{g/kg}$ 4-epichlorotetracyklina (55-300) $\mu\text{g/kg}$ 4-epioksytetracyklina (55-300) $\mu\text{g/kg}$ 4-epitetacyklina (59-300) $\mu\text{g/kg}$ Zawartość linkozamidów Zakres: linkomycyna (15-75) $\mu\text{g/kg}$ Zawartość fluorochinolonów Zakres: marbofloksacyna (28-75) $\mu\text{g/kg}$	PBC-106.00.00 wydanie 3 z dnia 09.09.2024 Za zgodność z oryginałem podepisz data Kierownik Pracowni mgr Agnieszka Kopudłowska

Załącznik ZHW PO-16.00.01 wydanie 10 z dnia 28.10.2022

ZHW	LISTA AKREDYTOWANYCH DZIAŁAŃ PROWADZONYCH W RAMACH ZAKRESU ELASTYCZNEGO		NR LISTY: 1/PBCH
	ZAŁĄCZNIK DO ZAKRESU AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO		WYDANIE NR: 51
	PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ -		STRONA: 13 STRON: 19
	Przedmiot badań/wyrób	Rodział działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
		norfloksacyna (28-75) µg/kg ciprofloksacyna (27-75) µg/kg danofloksacyna (27-75) µg/kg enrofloksacyna (27-75) µg/kg sarafloksacyna (27-75) µg/kg difloksacyna (27-75) µg/kg kwas oksolinowy (28-75) µg/kg kwas nalidyksowy (27-75) µg/kg flumechina (28-75) µg/kg Zawartość pleuromutyliny Zakres: tiamulina (32,5-1500) µg/kg Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	
Miód		Zawartość substancji przeciwbakteryjnych Zawartość fluorochinolonów Zakres: marbofloksacyna (3,0-20) µg/kg norfloksacyna (3,5-20) µg/kg ciprofloksacyna (3,5-20) µg/kg danofloksacyna (3,5-20) µg/kg enrofloksacyna (3,5-20) µg/kg sarafloksacyna (3,5-20) µg/kg difloksacyna (3,5-20) µg/kg kwas oksolinowy (3,5-20) µg/kg kwas nalidyksowy (3,5-20) µg/kg flumechina (3,5-20) µg/kg Zawartość tetracyklin Zakres: oksytetracyklina (3,5-20) µg/kg tetracyklina (3,5-20) µg/kg chlorotetracyklina (3,5-20) µg/kg doksyacyklina (3,5-20) µg/kg 4-epichlorotetracyklina (3,5-20) µg/kg 4-epioksytetracyklina (3,5-20) µg/kg 4-epitetracyklina (3,5-20) µg/kg Zawartość linkozamidów Zakres: linkomycyna (3,0-20) µg/kg Zawartość makrolidów Zakres: tylozyna (3,0-20) µg/kg erytromycyna (3,5-20) µg/kg Zawartość sulfonamidów Zakres: sulfaguanydyna (3,5-20) µg/kg sulfadiazyna (3,5-20) µg/kg sulfametoksypirydazyna (4,0-20) µg/kg sulfametazyna (4,5-20) µg/kg sulfatiazol (3,5-20) µg/kg sulfamonometoksyna (3,0-20) µg/kg sulfadoksyna (3,0-20) µg/kg	PBC-25.00.00 wydanie 1 z dnia 11.07.2022 Za zgodność z oryginałem podpis <i>[podpis]</i> data 03.03.25... Kierownik Pracowni <i>[podpis]</i> mgr Agnieszka Kopudłowska

Załącznik ZHW PO-16.00.01 wydanie 10 z dnia 28.10.2022

ZHW	LISTA AKREDYTOWANYCH DZIAŁAŃ PROWADZONYCH W RAMACH ZAKRESU ELASTYCZNEGO	
	ZAŁĄCZNIK DO ZAKRESU AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO	
	PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ -	
Przedmiot badań/wyrób	Rodział działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
	sulfachinoksalina (4,0-20) µg/kg sulfadimetoksyna (3,5-20) µg/kg sulfametoksazol (3,0-20) µg/kg sulfamerazyna (3,0-20) µg/kg sulfacetamid (4,0-20) µg/kg sulfachloropirydazyna (3,5-20) µg/kg sulfapirydyna (3,5-20) µg/kg sulfisoksazol (3,5-20) µg/kg sulfachloropirazylna (4,0-20) µg/kg sulfamethizol (4,0-20) µg/kg Zawartość aminoglikozydów Zakres: streptomycyna (5,0-20) µg/kg Zawartość diaminopirymidyn Zakres: trimetoprim (3,5-20) µg/kg Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	
Mięso (tkanka mięśniowa), ryby, mleko, jaja, materiał biologiczny (mocz), woda	Zawartość chloramfenikolu Zakres : Dla tkanki (0,087-0,300) µg/kg Dla mleka (0,090-0,300) µg/kg Dla jaj (0,091-0,300) µg/kg Dla moczu (0,084-0,300) µg/kg Dla wody (0,077-0,300) µg/kg Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	PBC-108.00.00 wydanie 5 z dnia 21.07.2023
Mięso (wątroba), ryby	Zawartość leków przeciwwrobaczych Zakres od: albendazolu sulfon (ABZ-SO ₂): 50 µg/kg albendazolu sulfotlenek (ABZ-SO): 50 µg/kg 2-amino-sulfon albendazolu (ABZ-NH ₂ -SO ₂): 50 µg/kg derkwantel (DER): 10 µg/kg fenbendazol (FBZ): 50 µg/kg fenbendazolu sulfon (FBZ-SO ₂): 50 µg/kg fenbendazolu sulfotlenek (FBZ-SO): 50 µg/kg flubendazol (FIBZ): 50 µg/kg 2-amino-flubendazol (FIBZ-NH ₂): 50 µg/kg iksonil (IOX): 5 µg/kg kambendazol (KBZ): 5 µg/kg klorsulon (KLR): 50 µg/kg klozantel (KLZ): 50 µg/kg lewamizol (LEW): 50 µg/kg mebendazol (MBZ): 50 µg/kg 5-hidroksymebendazol (MBZ-OH): 50 µg/kg 2-aminomebendazol (MBZ-NH ₂): 50 µg/kg monepantolu sulfon (MON-SO ₂): 50 µg/kg morantrel (MOR): 25 µg/kg niklozamid (NKD): 5 µg/kg nitroksynil (NTR): 10 µg/kg oksybendazol (OxBZ): 50 µg/kg oksyklozanid (OXD): 50 µg/kg prazikwantel (PRZ): 50 µg/kg pyrantel (PYR): 50 µg/kg rafoksanid (RFX): 10 µg/kg	PBC-04.00.00 wydanie 1 z dnia 17.02.2020

Załącznik ZHW PO-16.00.01 wydanie 10 z dnia 28.10.2022

ZHW	LISTA AKREDYTOWANYCH DZIAŁAŃ PROWADZONYCH W RAMACH ZAKRESU ELASTYCZNEGO	
	ZAŁĄCZNIK DO ZAKRESU AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO AB 465	
	PRACOWNIA BADAŃ CHEMICZNYCH DZIAŁ -	
Przedmiot badań/wyrob	Rodzaj działalności/badane cechy/metoda	Dokumenty odniesienia
	octan melengestrolu MLGA Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	
Tłuszcz (tkanka tłuszczowa)	Zawartość hormonów: Tkanka tłuszczowa: gestageny Zakres: (0,6-2,0) µg/kg : Octan medroksyprogesteronu Zakres: octan chlormadinonu: (1,1- 4,0) µg/kg octan megestrolu : (1,1- 4,0) µg/kg octan melengestrolu : (1,2- 4,0) µg/kg Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	PBC-104.00.00 wydanie 5 z dnia 09.01.2023 PBC-104.05.00 wydanie 4 z dnia 09.01.2023
Mięso (tkanka mięśniowa)	Zawartość tyreostatyków Zakres: tapazol-TAP (3-20) µg/kg tiouracyl -TU(7-20) µg/kg metylotiouracyl-MTU (3-20) µg/kg propylotiouracyl-PTU (3-20) µg/kg fenylotiouracyl-FTU (3-20) µg/kg Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	PBC-103.00.00 wydanie 3 z dnia 03.01.2020
Materiał biologiczny (mocz),woda	Zawartość tyreostatyków Zakres: tapazol-TAP (6,0-20) µg/l tiouracyl -TU (6,0-20) µg/l metylotiouracyl-MTU (6,0-20)µg/l propylotiouracyl-PTU (6,0-20)µg/l fenylotiouracyl-FTU (6,0-20)µg/l Metoda chromatografii cieczowej z detekcją tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS)	PBC-103.00.00 wydanie 3 z dnia 03.01.2020

ST. ASYSTENT

mgr Joanna Pacynska
Sporządził: 29.11.2024.....
(data, pieczęćka i podpis Asystenta Wiodącego)

Kierownik Pracowni

mgr Agnieszka Kacydlowska
Zatwierdził: 29.11.2024.....
(data, pieczęćka i podpis Kierownika Pracowni)