

## ВАЛИДИРАНЕ НА МЕТОД ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО И КАЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИТРОКСИНИЛ В МЛЯКО С ПОМОЩТА НА LC-MS

Тодорка Янковска-Стефанова, Милена Фунева-Пейчева и Петко Серафимов  
Централна Лаборатория по Ветеринарно Санитарна Експертиза и Екология ЦЛВСЕЕ, София,  
България

## METHOD VALIDATION FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF NITROXINIL IN MILK BY LC-MS

Todorka Yankovska-Stefanova, Milena Funeva-Peycheva and Petko Serafimov  
Central Laboratory of Veterinary Control and Ecology – CLVCE, Sofia, Bulgaria

Нитроксинилът е антихелминтно ветеринарно лекарство средство, което се използва във ветеринарната медицина срещу паразитни червеи по овце и говеда. Нитроксинилът е активен срещу чернодробния метил *Fasciola hepatica* и в по-малка степен срещу глисти в стомашно-чревния тракт. Съгласно Регламент (ЕС) 37/2010 на Комисията, максимално допустимата стойност на остатъчно количество нитроксинил в мляко е 20 µg/kg. Във връзка с максимално допустимата граница на остатъчни вещества е разработен и валидиран метод за качествено и количествено определяне на нитроксинил. Този метод включва подготовка на проба матрица мляко, състояща се от екстракция с 0,5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и ацетонитрил, твърдофазна екстракция с картридж Strata X, концентриране на пробата чрез изпарение под азот, последвано от инструментален анализ с помощта на LC/MS Thermo Science QExactive UHMR. Използвана е хроматографска колона Synergi Polar-RP на фирма Phenomenex с размери 150 x 2,0 мм и пълнеж 4 микрона. Оптимизирани са параметрите на хроматографското разделяне чрез разработване на градиентна програма за мобилните фази: състояща се от 0,01% мравчена киселина във вода (А) и 0,01% мравчена киселина в ацетонитрил (В). В изследваният обект съдържанието на нитроксинил се представя в µg/kg. Методът е валидиран съгласно Регламент за изпълнение (ЕС) 2021/808 на Комисията, покривайки критериите: истинност, повторемост и вътрешнолабораторна възпроизводимост, селективност, абсолютен аналитичен добив, работен обхват, граница за решение за потвърждение (CC<sub>α</sub>) и неопределеност.

### Подготовка на пробите

2,0 грама проба мляко  
+ 10 µl от р-р на Нитроксинил 13С6 (вътрешен стандарт) с конц. 1µg/ml.  
Екстракция с 10 ml 0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 20ml ацетонитрил, хомогенизиране на вортекс и центрофугиране при 8500 грм, 10 min.  
Органичният слой се отделя в втора (чиста) центрофужна епруветка и се изпраща до сухо под азот. Сухият остатък се възстановява с 1 ml 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 5 ml 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>. Следва етап на твърдофазна екстракция.

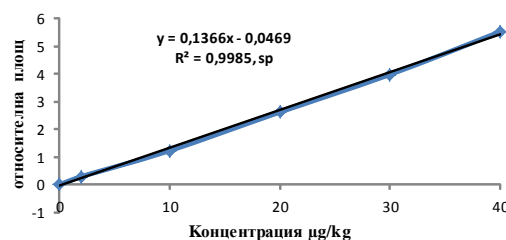


### Твърдо-фазно пречистване на екстракта (SPE) Strata X

Активиране:- 3 ml CH<sub>3</sub>OH  
- 3 ml H<sub>2</sub>O  
Нанасяне на проба  
Промиване: - 3 ml H<sub>2</sub>O  
Елуиране: - 5 ml р-р 50:50 (v:v) ацетонитрил:метанол  
Елуатът се изпраща до сухо под N<sub>2</sub>  
Възстановяване с 0.5 ml 10% разтвор на метанол във вода.

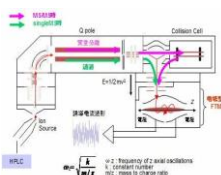


### Калибрационна графика на проби мляко с добавка на Нитроксинил и вътрешен стандарт на Нитроксинил 13С6



### Инструментален анализ LC-MS/MS УСЛОВИЯ

Подвижна фаза А) Дейонизирана с 0,01 ml Мравчена киселина;  
Подвижна фаза Б) ацетонитрил с 0,01 ml Мравчена киселина.



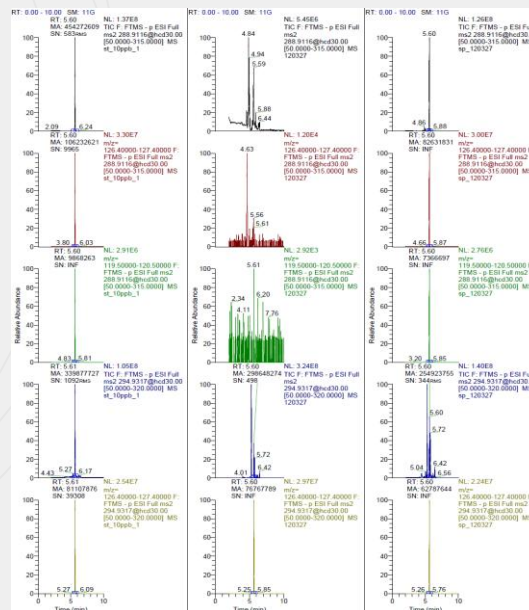
Първоначалните условия на подвижната фаза са 80:20 (v:v), След което ацетонитрилът се увеличава до 90% от 2 мин. до 8 мин. От 8.2 до 10 мин. системата се уравнивява с първоначалните условия на подвижната фаза. Скоростта на потока на подвижната фаза е 0.300 ml/min. Хроматографска колона - Synergi Polar RP на фирмата Phenomenex, с размер 150 x 2.0 mm



### Резултати и заключение



Разработен е метод за качествен и количествен анализ на Нитроксинил в матрица мляко с предварителна пробоподготовка на пробите. Методът е валидиран съгласно Регламент за изпълнение (ЕС) 2021/808 на Комисията, покривайки критериите: истинност, повторемост (10µg/kg – 0.728µg/kg) и вътрешнолабораторна възпроизводимост (10 µg/kg – 7.7 %), селективност, абсолютен аналитичен добив (10 µg/kg - 100 %), работен обхват (2 µg/kg - 40 µg/kg), граница за решение за потвърждение CC<sub>α</sub> (Нитроксинил CC<sub>α</sub> 21.06 ) и неопределеност. Създаденият метод отговаря на изискванията на законодателството на Европейския съюз. Всички изследвания бяха извършени при стандартизирани лабораторни условия и спазване принципите на добрата лабораторна практика (GLP).



Хроматограми на стандартен разтвор, “чиста” проба мляко и проба с внесена добавка на Нитроксинил при концентрационно ниво 10µg/kg, както и Вътрешен стандарт Нитроксинил 13С6.