

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**NOWOCZESNE SPOSOBY PRZYGOTOWANIA  
PRÓBEK BIOLOGICZNYCH I ŚRODOWISKOWYCH  
W OZNACZANIU LEKÓW**

**Izabella Kośka**

Praca przygotowana w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii  
Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem  
dr. hab. Pawła Kubalczyka, prof. UŁ

Łódź, 2023

## Spis treści

Wykaz skrótów i symboli .....	3
Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej .....	4
Wstęp .....	5
1. Fluorochinolony - cyprofloksacyna i ofloksacyna .....	7
1.1. Wiadomości ogólne .....	7
1.2. Właściwości fizykochemiczne .....	8
1.2.1. Cyprofloksacyna .....	8
1.2.2. Ofloksacyna .....	9
1.3. Aktywność fluorochinolonów .....	9
1.4. Farmakokinetyka, farmakodynamika .....	10
1.5. Wskazania kliniczne stosowania fluorochinolonów i ich toksykologia .....	12
2. Azaperon i jego metabolit azaperol .....	13
2.1. Zapotrzebowanie na stosowanie leków uspokajających .....	13
2.2. Właściwości fizykochemiczne azaperonu .....	13
2.3. Aktywność azaperonu .....	14
2.4. Azaperol - metabolit azaperonu .....	14
3. Przegląd wybranych metod oznaczania fluorochinolonów .....	16
3.1. Procedury wykorzystujące wysokosprawną chromatografię cieczową .....	16
3.2. Metody oparte na elektroforezie kapilarnej .....	20
4. Przegląd wybranych metod oznaczania azaperonu .....	23
5. Uzasadnienie wyboru tematyki badań .....	33
6. Wyniki .....	35
Zalety i wady opracowanych metod .....	94
Podsumowanie i wnioski końcowe .....	97
Abstract .....	100
Wykaz literatury .....	102
Życiorys/dorobek naukowy .....	113

## Wykaz skrótów i symboli

<b>ACN</b>	acetonitryl
<b>AZN</b>	azaperon
<b>AZL</b>	azaperol
<b>BGE</b>	elektrolit podstawowy
<b>CE</b>	elektroforeza kapilarna
<b>CE-C<sup>4</sup>D</b>	elektroforeza kapilarna z bezdotykową detekcją przewodnictwa ze sprzężeniem pojemnościowym
<b>Cpx</b>	cyprofloksacyna
<b>DCM</b>	dichlorometan
<b>FQLs</b>	fluorochinolony
<b>HPLC</b>	wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>ICA</b>	test immunochromatograficzny
<b>IgG</b>	immunoglobuliny G
<b>LC-MS/MS</b>	chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
<b>mAB</b>	przeciwciało monoklonalne
<b>MES</b>	bufor kwasu 2-(N-morfolino)etanosulfonowego
<b>MPs</b>	nanocząstki magnetyczne
<b>MRL</b>	maksymalny dopuszczalny limit pozostałości
<b>Ofx</b>	ofloksacyna
<b>SPE</b>	ekstrakcja do fazy stałej
<b>SEF</b>	współczynnik wspomnienia czułości
<b>tpITP</b>	przejściowa pseudo izotachoforeza

## Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

[D1] **I. Kośka**, K. Purgat, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachophoresis*, *Molecules*, 26 (2021) 6931.

[D2] **I. Kośka**, K. Purgat, P. Kubalczyk, *Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine*, *Scientific Reports*, 12 (2022) 7729.

[D3] **I. Kośka**, P. Kubalczyk, *Development of the chromatographic method for simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal kidneys and livers*, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023) 100.

[D4] **I. Kośka**, P. Kubalczyk, M. Cichomski, A. Kisielewska, *The use of extraction on C18-silica-modified magnetic nanoparticles for the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues*, *Molecules*, 28 (2023) 6123.

## Wstęp

Fluorochinolony (FQLs) są to związki będące pochodnymi diaminopirymidyny, które stanowią grupę syntetycznych antybiotyków, często stosowanych w leczeniu zwierząt. Są one bardzo chętnie podawane zwierzętom przez hodowców ze względu na ich uniwersalność, charakteryzują się bowiem szerokim spektrum działania zarówno przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym. Swoje silne właściwości bakteriobójcze zawdzięczają zdolności hamowania transkrypcji i replikacji bakteryjnego DNA. Związki te są powszechnie stosowane w leczeniu chorób układu oddechowego, infekcji dróg moczowych i zaburzeń żołądkowych. Ponadto wykazują doskonałą biodostępność dzięki szybkiemu wchłanianiu po podaniu doustnym oraz szerokie spektrum działania. Główny problem związany ze stosowaniem tych związków stanowi fakt, że antybiotyki z tej grupy podawane są chorym zwierzętom nie tylko w celach terapeutycznych, ale także profilaktycznie, aby uniknąć zachorowań wśród całych stad. Te związki chemiczne, oprócz zamierzonego działania farmakologicznego, często charakteryzują się niepożądanymi lub nawet toksycznymi działaniami, które są niebezpieczne dla ludzi, a wydalanie wraz z moczem i kałem pozostałości tych związków, prowadzi do zanieczyszczenia środowiska. Podawanie zwierzętom antybiotyków bez wyraźnej przyczyny oraz nieprzestrzeganie okresu karencji prowadzi do powstawania bakterii opornych na antybiotyki. Występowanie bakterii opornych na antybiotyki nosi nazwę antybiotykooporności. Infekcje spowodowane bakteriami opornymi na antybiotyki są bardzo trudno bądź nawet niemożliwe do wyleczenia. Niestety, Polska zajmuje 2. miejsce w Europie pod względem stosowania niezwykle ważnych antybiotyków, czyli najsilniejszych leków w leczeniu chorób u ludzi. Ich stosowanie niesie ogromne ryzyko dla ludzi, mogą wywołać reakcje alergiczne lub toksyczne u osób z nadwrażliwością. Pozostałości antybiotyków zwiększają również ryzyko występowania chorób grzybiczych oraz pojawienia się i wzrostu oporności drobnoustrojów na te antybiotyki. Z drugiej strony pozostałości substancji hormonalnych prowadzą do zaburzeń endokrynologicznych u ludzi.

Wśród leków podawanych zwierzętom można wyróżnić również leki uspokajające, które są im podawane podczas transportu do rzeźni. Najczęściej stosowanym u zwierząt środkiem uspokajającym jest azaperon (AZN). Świnie są niezwykle podatne na stres, a transport zwierząt na rzeź niezaprzeczalnie należy do okoliczności stresogennych. Hodowcy więc, stosują leki uspokajające w celu zminimalizowania ryzyka śmierci zwierząt i utrzymania wysokiej jakości mięsa. Głównie dlatego, że mięso pochodzące od zestresowanych zwierząt jest twarde i pozbawione dobrego smaku. Ze względu na powszechne stosowanie tych

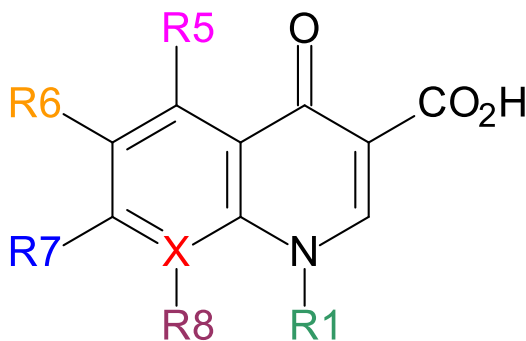
związków oraz często nieprzestrzeganie okresu karencji, możliwe jest, że pozostałości leków są obecne w żywności. Podawanie leków weterynaryjnych powinno być wstrzymane na odpowiedni czas przed ubojem zwierząt, ponieważ spożywanie mięsa z pozostałościami takich leków również jest niebezpieczne dla zdrowia konsumentów.

Mając na uwadze powyższe rozważania można stwierdzić, że bardzo ważne jest badanie zawartości pozostałości leków weterynaryjnych w pożywieniu, a ze względu na to, że okazuje się, ciągła ich kontrola jest niezbędna, laboratoria zmuszone są do opracowania czułych i wiarygodnych metod oznaczania tych związków. W związku z tym, przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie prostych, czułych, szybkich i tanich metod oznaczania wybranych antybiotyków (cyprofloksacyny oraz ofloksacyny) w moczu człowieka oraz tkankach zwierząt, a także AZN oraz azaperolu w tkankach zwierząt. Zaproponowane metodologie oparte są na zastosowaniu najczęściej wykorzystywanych technik, wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV-Vis, a także elektroforezy kapilarnej (CE) również z detekcją UV-Vis z zateżaniem w kapilarze na drodze przejściowej pseudo-izotachoforezy. Takie podejście ma na celu umożliwienie wszystkim laboratoriom, nawet nie posiadającym wyrafinowanego sprzętu, skorzystać z takich metod, aby badać zawartość szkodliwych pozostałości leków w pożywieniu.

## 1. Fluorochinolony - cyprofloksacyna i ofloksacyna

### 1.1. Wiadomości ogólne

Chinolony stanowią rodzinę antybiotyków zawierających bicykliczny rdzeń związany ze związkiem 4-chinolonowym (Rysunek 1) [1,2].



Rysunek 1. Struktura rdzenia chinolonu

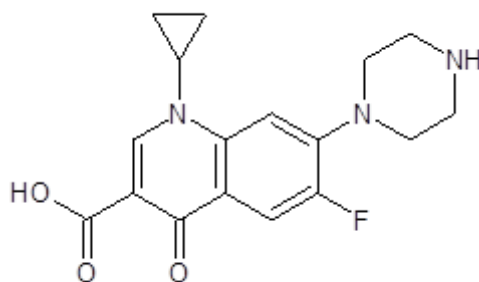
Od czasu ich odkrycia na początku lat 60. zyskały one na znaczeniu jako związki kluczowe w leczeniu zarówno pozaszpitalnych, jak i ciężkich zakażeń szpitalnych [3]. Za pierwszy antybiotyk chinolonowy uważa się powszechnie kwas nalidyksowy, który jest lekiem o wąskim spektrum działania przeciwko bakteriom jelitowym, stosowanym w leczeniu niepowikłanych infekcji dróg moczowych [2,4].

W latach 70. nastąpił przełom w znaczeniu tej klasy związków dzięki opracowaniu FQLs, które wykazują znacznie szersze spektrum działania, ale także dużo lepszą farmakokinetykę w porównaniu z chinolonami pierwszej generacji, mniejsze wiązanie z białkami, wyższą tolerancję na lek oraz mniejszą toksyczność i dłuższy okres półtrwania [5,6]. Jako reprezentantów tej grupy antybiotyków można wyróżnić cyprofloksacynę (Cpx) i ofloksacynę (Ofx). Działają one zarówno na patogeny Gram-ujemne, jak i Gram-dodatnie, a co ważne, są również aktywne przeciwko czynnikowi wywołującemu gruźlicę, *Mycobacterium tuberculosis* [2].

## 1.2. Właściwości fizykochemiczne

### 1.2.1. Cyprofloksacyna

Cpx (kwas 1-cyklopropylo-6-fluoro-4-okso-7-piperazyn-1-ylochinolino-3-karboksylowy) jest związkiem chinolonowym, należącym do II generacji FQLs, posiadającym w swojej strukturze cyklopropyl, kwas karboksylowy, atom fluoru i piperazyn-1-yl w pozycjach odpowiednio 1, 3, 6 i 7. Wzór strukturalny Cpx przedstawiono na Rysunku 2. Komercyjnie, Cpx dostępna jest pod postacią krystalicznego proszku o barwie od białej do jasnożółtej, słabo rozpuszczalnego w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalnego w 0,1 mol/l HCl [8]. Wartość pH wodnych roztworów chlorowodoru Cpx wynosi 1,5-7,5 i, roztwory te są stabilne przez co najmniej 14 dni w temperaturze pokojowej [9].



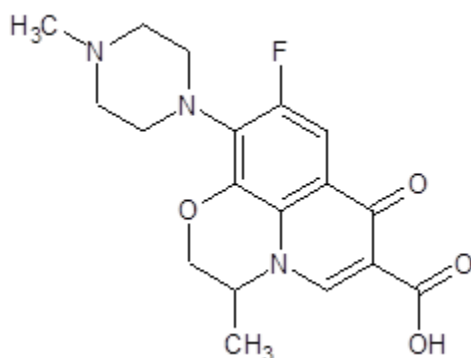
**Rysunek 2. Wzór strukturalny cyprofloksacyny**

Wartość pKa grupy karboksylowej cząsteczki Cpx wynosi 6,09, natomiast wartość pKa atomu azotu w pierścieniu piperazyńlowym wynosi 8,74 [10]. Natomiast maksimum absorpcji następuje przy długości fali  $\lambda=276$  nm [11].



### 1.2.2. Ofloksacyna

Ofx (kwas ( $\pm$ )-9-fluoro-2,3-dihydro-3-metylo-10-(4-metylo-1-piperazynylo)-7-okso-7H-pirydol[1,2,3-de]-1,4-benzoksazyno-6-karboksylowy) jest oksazinochinolonem zawierającym podstawniki karboksylowe, fluorowe, metylowe i 4-metylopiperazynowe. Wzór strukturalny Ofx przedstawiono na Rysunku 3. Ten organiczny związek heterocykliczny ma postać od białego do jasnożółtego krystalicznego proszku. Ofx rozpuszczalna jest w roztworach wodnych o pH pomiędzy 2 a 5 oraz powyżej 9. Natomiast jest słabo rozpuszczalna w roztworach wodnych o pH 7 (rozpuszczalność w takich roztworach spada do 4 mg/ml) [12]. Wartość pKa grupy karboksylowej cząsteczki Ofx wynosi 5,97, natomiast wartość pKa uwarunkowana obecnością pierścienia piperazynowego wynosi 9,28 [13].



Rysunek 3. Wzór strukturalny ofloksacyny

### 1.3. Aktywność fluorochinolonów

Aktywność chinolonów pierwszej generacji była ograniczona tylko do działania wobec organizmów Gram-ujemnych, z wyłączeniem gatunków *Pseudomonas* [14]. Pierwszy chinolon drugiej generacji, flumechina, jest przykładem, że dodanie atomu fluoru w pozycji R6, może znacznie poprawić spektrum aktywności [15]. Taka zmiana w strukturze cząsteczki pozwala radykalnie zwiększyć aktywność chinolonów. Prawie wszystkie antybiotyki określone jako FQLs drugiej generacji np. enoksacyna, norfloksacyna i cyprofloksacyna są zdolne do hamowania wszystkich organizmów Gram-ujemnych, w tym także gatunków *Pseudomonas* [16]. Po dodaniu podstawnika fluorowego, leki te były dalej modyfikowane przez dołączenie pierścienia piperazyny do pozycji R7 i dodanie grupy cyklopropylowej do pozycji R1. Pierścień piperazyny R7 poprawił siłę działania wobec bakterii Gram-ujemnych, podczas gdy grupa cyklopropylowa poprawiała ogólną aktywność związków, zwiększając siłę ich działania [17, 18]

Taka kombinacja w strukturze cząsteczki Cpx sprawiła, że stała się ona najbardziej aktywnym związkiem spośród wczesnych związków drugiej generacji i uczyniła ją pierwszym wyborem stosowane obecnie przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* [19]. Kolejne modyfikacje struktury cząsteczek drugiej generacji FQLs, prowadzące do uzyskania Ofx umożliwiły hamowanie aktywności organizmów Gram-dodatnich [20]. Ze wszystkich związków należących do tej grupy, Ofx uważana jest za najpotężniejszą, ponieważ zawiera w sobie wszystkie nowe podstawniki i dzięki temu jest obecnie nadal stosowana w leczeniu klinicznym.

#### 1.4. Farmakokinetyka, farmakodynamika

Rozwój chinolonów pod względem farmakokinetyki i farmakodynamiki wiąże się z ulepszaniem strategii dawkowania antybiotyków w celu zwiększenia ich skuteczności i zapobiegania mutacjom bakterii w celu zwiększania oporności. Stosowanie pierwszego związku chinolonowego, kwasu nalidyksowego, było ograniczone ze względu na niski poziom w surowicy. Jednak modyfikacje struktury tego związków poprzez wprowadzanie podstawników w późniejszych generacjach chinolonów doprowadziły do poprawy wchłaniania doustnego [1]. Modyfikacje te spowodowały również wydłużenie okresu półtrwania, co umożliwiło dawkowanie raz dziennie niektórych środków drugiej generacji i wszystkich środków późniejszych generacji, co przedstawiono w Tabeli 1.

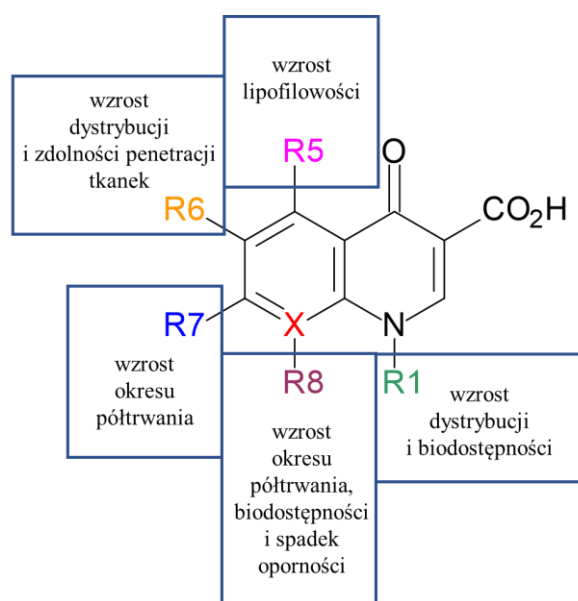
**Tabela 1. Dawkowanie oraz okres półtrwania wybranych środków chinolonowych**

Rodzaj chinolonu	Dawka [g]	Częstotliwość dawkowania [razy dziennie]	Okres półtrwania [godziny]
<b>Kwas nalidyksowy</b>	1	4	1,5
<b>Cyprofloksacyna</b>	0,75	2	4
<b>Ofloksacyna</b>	0,4	2	6

Ponieważ większość pierwszych chinolonów miała niski poziom w surowicy i umiarkowaną siłę działania, wymagały one częstych dawek, przy czym zmniejszenie częstotliwości dawkowania najnowszych środków wynikało nie tylko z ich lepszej ekspozycji, ale także ze znacznie zwiększonej siły działania, miały również lepszą penetrację tkanek [1]. Z biegiem czasu zaobserwowano zmiany w metabolizmie chinolonów, wcześniejsze generacje tych związków były głównie eliminowane z organizmu przez metabolizm i klirens nerkowy, natomiast późniejsze chinolony zostały zmodyfikowane tak, aby stały się środkami

usuwanymi klirens pozanerkowy. Podsumowując, chinolony wykazują aktywność bakteriobójczą zależną od stężenia z trwałym efektem poantybiotycznym.

Kluczowe modyfikacje strukturalne mające na celu poprawę farmakokinetyki chinolonów opierały się na modyfikacjach w pozycjach R5, R6, R7 i R8 (Rysunek 4), co skutkuje dłuższym okresem półtrwania, lepszą penetracją tkanek i lepszą biodostępnością. Dodanie grupy aminowej w pozycji R5 zwiększyło lipofilowość chinolonów, natomiast podstawnik fluorowy w pozycji R6 okazał się ułatwiać penetrację do komórki bakteryjnej [68]. Poprawę tę zaobserwowano podczas opracowywania drugiej generacji chinolonów i utrzymała się ona aż do ostatniego środka czwartej generacji. Dodatek podstawników w pozycji R7 pośredniczył w poprawie okresu półtrwania i penetracji tkanek bakteryjnych. Grupa azabicykliczna i grupa piperazynowa w pozycji R7 wydłużyły okres półtrwania środków do powyżej 10 godzin poprzez kolejne zwiększenie lipofilowości [21,22] Innym podstawnikiem w tej pozycji są pierścienie piperolidynowe, jednak ta modyfikacja ma kluczowe znaczenie dla wzmocnienia siły działania chinolonów. Donoszono, że wiąże się to z niekorzystną rozpuszczalnością w wodzie i biodostępnością po podaniu doustnym. Aby poprawić te właściwości fizyczne, kolejne generacje chinolonów wprowadziły do pierścieni grupę metylową. Ponadto alkilowanie pierścieni w pozycji R7 zwiększyło okres półtrwania i biodostępność środków. Dodanie tej grupy do pierścieni piperazyny istotnie wydłużyło okres półtrwania Ofx w porównaniu z Cpx, która ma w strukturze tylko grupę piperazynową [23,24]. Najnowsze badania nad kluczowymi modyfikacjami struktur chinolonów prowadzą do zahamowania rozwoju oporności bakterii na chinolony.



Rysunek 4. Wpływ modyfikacji struktury chinolonu na ich właściwości farmakokinetyczne

## 1.5. Wskazania kliniczne stosowania fluorochinolonów i ich toksykologia

Chinolony to antybiotyki o szerokim spektrum działania i wielu wskazaniach klinicznych. W ostatnich latach FQLs były głównymi lekami stosowanymi w leczeniu infekcji dróg moczowych oraz infekcji przewodu pokarmowego i układu oddechowego [1]. Niestety, nadmierne przepisywanie przez lekarzy chinolonów doprowadziło do szybkiego rozwoju oporności bakterii na te antybiotyki, co z kolei prowadzi do utraty skuteczności leków. FQLs są jednak nadal podstawą leczenia duru brzuszego wywołanego przez *Salmonellę* ze względu na oporność na wcześniej stosowane leki. Jednak oporność *Salmonelli* na chinolony jest coraz częściej zgłaszana w obu Amerykach, Azji Południowej, Azji Południowo-Wschodniej, a zwłaszcza w Afryce Subsaharyjskiej, a *Salmonella* jest obecnie uznawana za patogen o wysokim priorytecie w badaniach i opracowywaniu nowych antybiotyków [25]. Chinolony nie są zalecane jako pierwsze próby leczenia (zwłaszcza pozaszpitalnego) zapalenia płuc, natomiast są jednak zarezerwowane dla poważnych przypadków [1]. W celu ograniczenia rozwoju oporności na FQLs zaleca się ograniczenie stosowania tej klasy leków w leczeniu pacjentów z mniej nasilonymi zakażeniami, pacjentów z przedłużonym pobytem w szpitalu oraz pacjentów z przewlekłą chorobą nawrotową.

Najczęstszymi zgłaszanymi działaniami niepożądanymi po podaniu chinolonów są zaburzenia żołądkowo-jelitowe i/lub bóle stawów. Ze względu na obawy z tym związane, ta klasa związków jest ograniczona do przepisywania pacjentom pediatrycznym [26]. Kolejnym działaniem niepożądanym jest fototoksyczność, spowodowana gromadzeniem się wrażliwych leków w skórze, gdzie mogą być aktywowane przez ekspozycję na światło słoneczne, powodując uszkodzenie skóry [27]. Zaobserwowano to w przypadku środków z grupą  $-NH_2$  w pozycji R5 i fluoru lub chloru w pozycji R8. Niektóre chinolony wywoływały też reakcje ośrodkowego układu nerwowego, w tym zawroty głowy, bezsenność i ból głowy. Wykazano, że to działanie niepożądane jest związane z hamowaniem receptorów GABA, głównego neuroprzekaźnika hamującego, i obserwowano je po podaniu środków o dodatkowym działaniu grupy w pozycji R7 [28].

## 2. Azaperon i jego metabolit azaperol

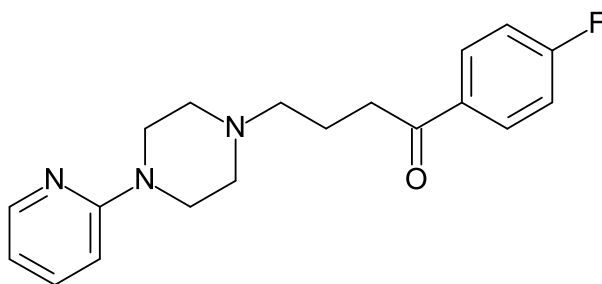
### 2.1. Zapotrzebowanie na stosowanie leków uspokajających

Intensywna produkcja mięsa zwiększa zapotrzebowanie na szybki wzrost masy ciała zwierząt, przy maksymalnym obniżeniu kosztów. Świnia stanowi prawie 50% mięsa spożywanego w wielu krajach europejskich, jednak zwierzęta te są szczególnie wrażliwe na stres podczas przeładunku i transportu do rzeźni. Niestety, takie zjawisko prowadzi do wysokiej śmiertelności tego gatunku i złej jakości mięsa, które określane jest jako twarde i niesmaczne [29]. Z tego powodu stosowanie środków uspokajających przed transportem świń do rzeźni stało się niezwykle popularne i powszechne już od lat 70. XX wieku. Jako pierwsze preparaty na rynku pojawiły się pochodne fenotiazyny (acepromazyna, chlorpromazyna i propionylopromazyna). Obecnie jednak, stosowanie takich środków jako weterynaryjnych produktów leczniczych jest zakazane u zwierząt przeznaczonych na produkcję żywności [30].

AZN, składnik aktywny preparatu Stresnil® należy do grupy neuroleptyków butyrofenonowych. Lek ten jest opracowany dla świń i szeroko stosowany w produkcji trzody chlewnej [30]. W medycynie weterynaryjnej AZN jest przepisywany dla świń w celu zwalczania antyagresywności, stresu, sedacji i jako znieczulenie. AZN jest częściowo metabolizowany do azaperolu (AZL) [31].

### 2.2. Właściwości fizykochemiczne azaperonu

AZN to 4-fluoro-4-(4-(2-pirydylo)piperazyn-1-ylo)butyrofenon, który jest trzeciorzędowym związkiem aminowym. Wzór strukturalny tego związku przedstawiono na Rysunku 5.



Rysunek 5. Wzór strukturalny azaperonu

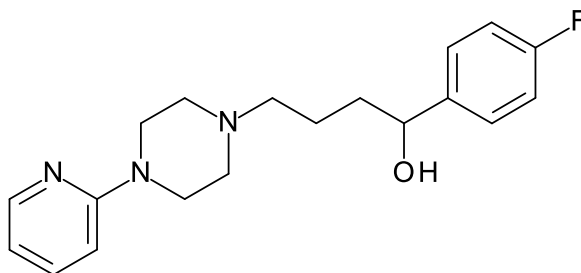
Występuje pod postacią białego proszku, który jest praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, rozpuszczalny w etanolu, natomiast dobrze rozpuszczalny w acetonie i chlorku metylenu [32]. Przewidywana wartość pKa tego związku chemicznego wynosi 8,43 [33].

### 2.3. Aktywność azaperonu

AZN jest środkiem działającym poprzez blokowanie receptorów dopaminy w mózgu przeciwpsychotycznych, natomiast w przeciwieństwie do większości neuroleptyków, które mają zdolność blokowania receptorów dopaminy w dużych dawkach, AZN jest silnym blokerem receptorów  $\alpha$  już w małych dawkach. Uważa się, że AZN obniża aktywność układu aktywującego siatkówkę, co zmniejsza zdolność zwierzęcia do reagowania na sygnały zewnętrzne, czyniąc zwierzę względnie obojętnym na otoczenie po podaniu tego leku. Opisane efekty kliniczne utrzymują się od 4 do 8 godzin [34]. Uważa się również, że AZN działa na ośrodkowy układ nerwowy, przez co zwierzęta stają się obojętne na otaczające je środowisko [34,35]. Badania wykazały, że lek ten powoduje widoczne zmiany w zachowaniu świń, wskazujące na jego działanie przeciwlękowe [36]. Poza udowodnionym działaniem AZN u świń, związek ten został również opisany jako skuteczny środek uspokajający u małych i średnich gatunków antylop i jeleniowatych w zakresie dawek 0,05–2,83 mg/kg masy ciała [37].

### 2.4. Azaperol - metabolit azaperonu

Biotransformacja AZN prowadzi przede wszystkim do wytworzenia zredukowanego metabolitu- AZL (Rysunek 6).



Rysunek 6. Wzór strukturalny azaperolu

AZL jest jedynym metabolitem AZNu o działaniu farmakologicznym, jednak uważa się, że AZN ma 4–30 razy większą siłę biologiczną niż AZL [31]. Chociaż istnieją dowody na to, że AZL jest farmakologicznie mniej skuteczny niż AZN, dla odpowiedniej oceny bezpieczeństwa dla konsumenta, pozostałości AZL są uważane za równie szkodliwe jak AZN, a więc pozostałości AZN ocenia się jako sumę AZN i AZL [38]. W związku z tym, Komitet ds. Weterynaryjnych Produktów Leczniczych Europejskiej Agencji ds. Oceny Produktów Leczniczych zaleca wyznaczenie pozostałości znacznikowej jako suma AZN i AZL w celu

ustalenia maksymalnego limitu pozostałości (MRL). Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1958/98 klasyfikuje AZN jako substancję, której MRL u zwierząt z gatunku świnia wynosi 100 µg/kg w tkankach [39,40]. Ślady pozostałości zarówno AZNu, jak i AZLu zmniejszają się do niemalże niewykrywalnych poziomów już w ciągu kilku dni po podaniu domięśniowym we wszystkich tkankach jadalnych z wyjątkiem miejsca wstrzyknięcia. Biorąc pod uwagę większą trwałość tych związków w miejscu wstrzyknięcia, podanie doustne AZNu może być w przyszłości rozwiązaniem usuwającym problem pozostałości w miejscu wstrzyknięcia transportowanych zwierząt [41].

### 3. Przegląd wybranych metod oznaczania fluorochinolonów

Powszechnie wiadomo, że antybiotyki są coraz częściej stosowane w hodowli zwierząt ze względu na konieczność szybkiego ich wzrostu, czy unikanie zachorowań wśród całych stad. Wydalanie pozostałości tych związków z moczem i kałem zwierząt prowadzi do zanieczyszczenia środowiska. Ich stosowanie niesie ze sobą ryzyko dla ludzi, ponieważ mają one negatywny wpływ na zdrowie człowieka. Długotrwałe narażenie ludzi i środowiska na pozostałości antybiotyków powoduje powstawanie zjawiska antybiotykooporności. Jest to bardzo niekorzystne, ponieważ infekcje wywołane bakteriami opornymi na antybiotyki są bardzo trudne do wyleczenia, a czasem wręcz niemożliwe. W związku ustanowieniem MRL antybiotyków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego [42] laboratoria zmuszone są opracowywać coraz prostsze, szybsze, bardziej precyzyjne metody oznaczania pozostałości antybiotyków w mięsie i środowisku. W literaturze naukowej można znaleźć wiele metod oznaczania FQLs, które oparte są głównie na HPLC, ale również CE [43-49]. Możliwość wykorzystania tych technik w oznaczaniu FQLs zostały również opisane w artykułach przeglądowych [50-52]. Jednak w pracach przeglądowych, w których przedstawiono metody oznaczania FQLs można znaleźć doniesienia wykorzystujące również inne techniki analityczne takie jak: UV-Vis, TLC, GC-MS, chromatografia z przepływem turbulentnym, woltamperometria, a nawet jądrowy rezonans magnetyczny [50-52]. Poniżej opisano wybrane metodologie oznaczania Cpx oraz Ofx wykorzystujące najbardziej popularne techniki separacyjne [43-49].

#### 3.1. Procedury wykorzystujące wysokosprawną chromatografię cieczową

Współcześnie, w literaturze można znaleźć metody oznaczania FQLs wykorzystujące głównie HPLC w odwróconym układzie faz, zazwyczaj z zastosowaniem kolumn chromatograficznych z wypełnieniem C18. Ze względu na naturę chemiczną tych związków, na etapie przygotowania próbki nie jest wymagana derywatywacja. Zarówno Cpx jak i Ofx wykazują absorpcję w zakresie UV-Vis, w związku z tym stosuje się detektor DAD, jak również MS/MS czy FLD [43-49].

Zespół Sary Cairoli [43] opracował metodę opartą na HPLC z detekcją DAD, która umożliwia jednoczesny pomiar stężenia w osoczu 10 antybiotyków przepisywanych na oddziale intensywnej terapii tamtejszego szpitala: Cpx, ceftazydym, ceftriakson, meropenem, ertapenem, tygecyklinę, ampicylinę, lewofloksacynę, piperacylina oraz tazobaktam. Osocze



otrzymano z krwi obwodowej pobranej do probówek próżniowych zawierających EDTA przez wirowanie przy 3500 g przez 5 min. Jednakże, w celu oznaczenia meropenemu, przed przystąpieniem do przygotowania próbki, stabilizowano osocze 1 mol/l buforem kwasu 2-(N-morfolino)etanosulfonowego (MES) (stosunek v/v, 1:1) doprowadzonym do pH 6 za pomocą NaOH i przechowywano w 4 °C. Przygotowanie próbek pacjentów wyglądało następująco: do 100 µl osocza dodano 50 µl roztworu wzorca wewnętrznego w stosunku 1:40 i worteksowano przez 5 s, następnie mieszaninę ekstrahowano 250 µl ACN, mieszano przez 30 s, a następnie wirowano przy 13000 obr./min przez 9 min. Otrzymany w ten sposób roztwór z nad osadu zebrano i odparowano, a pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w 100 µl buforu 1 mol/l MES. Do rozdzielania chromatograficznego wykorzystano kolumnę Kinetex® 2.6 µm EVO C18 100 × 2.1 mm. Prędkość przepływu wynosiła 0,5 ml/min, natomiast temperatura podczas rozdzielania była utrzymywana na poziomie 50 °C. Faza ruchoma składała się z A: 0,35% wodnego roztworu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O o pH 7, a składnikiem B był ACN. Zastosowano gradient ilości ACN w składzie fazy ruchomej, który przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2. Gradient.**

Czas [min]	%A	% B
0	98	2
0,5	98	2
2,5	85	15
4	70	30
4,5	70	30
5	20	80
5,5	20	80
6	98	2
8	98	2

Dolna granica oznaczalności (LLOQ) dla Cpx wyniosła 0,5 µg/ml dla tej metody. CV zawiera się w przedziale od 2,93 do 8,40% [43].

Do analizy ścieków na zawartość Cpx oraz Ofx, a także innych antybiotyków Alexandra Maia z zespołem [44] wykorzystali chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). W pracy przedstawiono procedurę przygotowania próbki opartą na ekstrakcji do fazy stałej (SPE) przy użyciu kartridży zbalansowanych hydrofilowo-lipofilowo.

Kondycjonowanie przeprowadzono za pomocą 5 ml metanolu i 5 ml ultraczystej wody o pH 3 miareczkowanej kwasem siarkowym. 100 ml próbki naniesiono na kolumnienki stosując próżnię, aby uzyskać prędkość przepływu 10 ml/min, następnie przepłukano 5 ml 5% roztworu metanolu w i suszono w próżni przez 40 minut. Następnie do elucji zastosowano 8 ml metanolu. Ekstrakty odparowano przy użyciu koncentratora i rozpuszczono w 500 ml 0,1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego. Odtworzone ekstrakty przesączono przez filtry strzykawkowe z membraną z politetrafluoroetyleny. W zastosowanej metodzie LC-MS/MS wykorzystano kolumnę Cortecs™ UPLC® C18  $\mu$  firmy Waters oraz fazę ruchomą składającą się z 0,1% kwasu mrówkowego (A) i ACN (B) pompowaną z prędkością przepływu 0,3 ml/min. Elucję gradientową rozpoczęto od 5% zawartości składnika B, zwiększając ją następnie do 100% B w ciągu 3 minut i utrzymując 100% B przez kolejne 0,5 minuty. Temperaturę automatycznego dozownika próbek utrzymywano na poziomie 4 °C, a temperaturę kolumny ustawiono na 30°C. Objętość wprowadzonej do kolumny próbki wynosiła 5  $\mu$ l. LOQ dla Cpx wynosi w tej metodzie 23,4 ng/l, natomiast dla Ofx 22,3 ng/l. Wartości RSD dla Cpx mieściły się w przedziale od 10,4 do 16,5 % a dla Ofx od 8,1 do 14,3 % [44].

Weijia Zheng z zespołem [45] opracowali metodę oznaczania Cpx obok 15 innych antybiotyków w mięsie kaczki. Wykorzystano również technikę LC-MS/MS oraz SPE podczas etapu przygotowania próbek. W celu przygotowania próbki do analizy, 2 g mięsa kaczki odważono do probówek polipropylenowych o pojemności 50 ml i dodano 6 ml 0,1 mol/L roztworu Na<sub>2</sub>EDTA, a następnie 4 ml 2% roztworu TFA. Następnie mieszaninę worteksowano przez 5 minut i odwirowano przy 2600  $\times$  g w 4 °C przez 10 min. Otrzymany supernatant przeniesiono do nowej probówki, do której dodano 10 ml n-heksanu, a następnie worteksowano przez 5 minut i wirowano przy 2600  $\times$  g przez kolejne 10 minut. 10 ml nadsącza nałożono na kolumnienki SPE skondycjonowane 3 ml ACN, 3 ml metanolu i 2 ml wody destylowanej. Próbki przepuszczano przez kartridże przy niskim natężeniu przepływu, a następnie przemywano dwukrotnie 5 ml wody destylowanej i suszono w strumieniu powietrza przez 10 minut. Następnie na kolumnienki naniesiono kolejno 3 ml metanolu, 3 ml ACN i 3 ml 0,02% roztworu amoniaku w metanolu. Zebrany eluat odparowano pod łagodnym przepływem gazowego azotu w temperaturze 45 °C. Po około 30 minutach pozostałości (<0,3 ml) rozpuszczono do 2 ml w metanolu, wytrząsano i wirowano przy 10840  $\times$  g przez 5 minut. Na koniec otrzymane mieszaniny przefiltrowano przy użyciu filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,2  $\mu$ m, aby przygotować je do analizy techniką LC-MS/MS. Do rozdzielania zastosowano kolumnę LC (Phenomenex Kinetex EVO C18, 2,1  $\times$  150 mm, 2,6  $\mu$ m). Składnik A fazy ruchomej zawierał

0,1% TFA w wodzie destylowanej, natomiast składnik B zawierał 0,1% TFA w metanolu. Analiza trwała 10 minut z elucją izokratyczną przy stosunku składników fazy ruchomej 10:90 (faza ruchoma A:B) i prędkości przepływu 0,15 ml/min, natomiast objętość wprowadzonej do kolumny próbki wynosiła 10 µl. LOQ dla Cpx wynosiła w tej metodzie 17,04 µg/kg tkanki, a RSD mieściło się w przedziale od 2,1 do 7,7% [45].

Irina Timofeeva z zespołem [46] opracowali metodę oznaczania FQLs w mięsie z wykorzystaniem detekcji FLD oraz opartą na tworzeniu rozpuszczalnika głęboko eutektycznego (DES). Procedura zakładała rozpuszczenie akceptora wiązań wodorowych DES, który stanowiła czwartorzędowa sól amoniowa, w homogenizowanej próbce mięsa, a następnie ogrzewanie z donorem wiązań wodorowych DES, którym był alkohol średniołańcuchowy. Trzy różne próbki mięsa (jedna próbka mięsa drobiowego i dwie próbki mięsa wołowego) zakupiono w lokalnych supermarketach w Sankt Petersburgu w Rosji i poddano homogenizacji za pomocą miksera. W celu przygotowania wzbogaconych próbek w pierwszej kolejności przeprowadzono ich liofilizację. Następnie, przed analizą, do 10 g każdej liofilizowanej próbki mięsa dodawano odpowiednią objętość roztworów FQLs i mieszano mieszadłem magnetycznym przez 20 min. Próbki mięsa, które nie zostały wzbogacone badanymi analitami, nie poddano liofilizacji. Zawartość wody w próbce mięsa po liofilizacji wynosiła ponad 0,5% (m/m) i była wystarczająca do rozpuszczenia bromku tetrabutylamoniowego w próbce. Do dwóch różnych szklanych fiolek o pojemności 10 ml dodano po 200 mg niewzbogaconej oraz wzbogaconej próbki mięsa (zawierającej wodę i 170 mg bromku tetrabutylamoniowego), po czym próbki mieszano mieszadłem magnetycznym przez 1 min w celu rozpuszczenia bromku tetrabutylamoniowego. Następnie dodano 150 µl heptanolu i mieszaninę mieszano przez 20 minut w temperaturze 80 °C za pomocą mieszadła magnetycznego z funkcją grzania. Spowodowało to jednoczesne utworzenie fazy DES (bromek tetrabutylamoniowy-heptanol, 1:2, mol/mol) i ekstrakcję docelowych analitów do fazy DES. Po odwirowaniu (5000 × g przez 10 min) otrzymano próbkę mięsa zwilżoną DES (faza dolna) i klarowną fazę DES (faza górna) zawierającą anality. Aby uniknąć pobierania próbek mięsa, pobrano tylko 200 µl górnej fazy DES i przeniesiono do 1,5 ml fiołki z 30 µl 0,005 mol/l NaOH. Mieszaninę delikatnie wytrząsano w fiołce i przeprowadzono ponowną ekstrakcję FQLs do fazy wodnej w celu obniżenia wartości LOD. Fazę wodną (30 µl) zawierającą anality analizowano następnie metodą HPLC-FLD. Do rozdzielania zastosowano kolumnę chromatograficzną Luna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), fazę ruchomą składającą się z metanolu (A) i 0,05 mol/l buforu fosforanowego o pH 6,4 (B) (45:55, v/v) o prędkości przepływu 0,7 ml/min. Układ pracował

w temperaturze 30 °C. Długości fali wzbudzenia i fali emisji fluorescencji wynosiły odpowiednio 278 i 466 nm. Wartość LOQ dla Ofx wynosiła 30 µg/kg, natomiast powtarzalność metody, wyrażona jako RSD wynosiła 8–10 % [46].

### 3.2. Metody oparte na elektroforezie kapilarnej

Okazuje się, że ze względu na strukturę i charakter chemiczny FQLs, także techniki elektromigracyjne wykazują ogromny potencjał w ich oznaczaniu. Elektroforeza kapilarna (CE) stała się doskonałym narzędziem do oznaczania tej grupy antybiotyków ze względu na możliwość kontroli ładunku cząsteczek FQLs poprzez odpowiedni dobór pH środowiska. Spośród 45 elektroforetycznych metod oznaczania FQLs [6,7,47-49,53-92] wybrano kilka i opisano je poniżej.

W 2011 roku Wenhua Gaoa wraz ze współpracownikami zaproponowali metodę oznaczania Cpx, Ofx oraz innych FQLs w moczu z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli [47]. Próbkę moczu dostarczył zdrowy ochotnik płci męskiej (27 lat, 70 kg). Po moczu pobranym na czczo uczestnik wypił 200 ml wody, a następnie ponownie zebrał mocz. Próbkę moczu odpowiednio zebrano i przechowywano w kolbach PTFE w temperaturze 4 °C przed użyciem. Wszystkie próbki moczu wirowano przez 10 minut przy 4000 obr./min i przesączono przez filtry polieterosulfonowe 0,45 µm. Fiolkę o pojemności 4,0 ml umieszczono na mieszadle magnetycznym z grzaniem. Następnie 3,5 ml wodnego roztworu próbki zawierającej wzorce analitów przeniesiono do fiolki jako fazę donorową (0,02 mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o pH 7,0). Roztwór fazy donorowej przygotowano rozpuszczając odpowiednią ilość NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> w wodzie i doprowadzając do oczekiwanej wartości pH poprzez wkroplenie 0,1 mol/l NaOH. Ostrożnie dodano 350 µl fazy organicznej (DCM:toluen, 1:1, v/v) na wierzch fazy donorowej, aby utworzyć warstwę rozpuszczalnika. Następnie na końcu igły mikrostrzykawki zanurzonej w fazie organicznej wygenerowano kroplę fazy akceptorowej (0,1 mol/l NaOH) o objętości 1 µl. Podczas ekstrakcji roztwór mieszano z prędkością 450 obr./min. Po 40 minutach ekstrakcji fazę akceptorową pobrano z powrotem do mikrostrzykawki i przeniesiono do fiolki. Następnie próbkę wprowadzono do układu CE. Na początku każdego dnia roboczego kapilarę płukano kolejno 0,2 mol/l NaOH przez 15 min, wodą dejonizowaną przez 15 min i elektrolitem podstawowym (BGE) przez 15 min. Ponadto kapilara była przepłukiwana BGE przez 3 minuty pomiędzy analizami. BGE stanowił 12 mmol/l Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> miareczkowany 38 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> do pH 8,5. Napięcie podczas rozdzielania wynosiło 10 kV i zastosowano detekcję UV przy długości fali 280 nm. Próbkę wprowadzano do kapilary sposobem hydrodynamicznym. LOD

tej metody dla FQLs mieściła się w zakresie 7,4 do 31,5  $\mu\text{g/l}$ , natomiast RSD zawierał się w przedziale od 4,3 do 8,3% [47].

Inną metodę elektroforetycznego oznaczania FQLs w świńskiej krwi z wykorzystaniem dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz zaproponowali Luciana Vera–Candiotti z zespołem [48]. Krew świń została w sposób higieniczny pobrana w sześciu różnych rzeźniach zlokalizowanych w Santa Fe w Argentynie. Krew podzielono na porcje i przechowywano w plastikowych butelkach w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy. W celu ekstrakcji dziewięciu FQLs 500  $\mu\text{l}$  krwi doprowadzono do pH 6,80 przez dodanie 40  $\mu\text{l}$  HCl 0,2 mol/l. Następnie za pomocą mikropipety szybko wprowadzono do próbki 1250  $\mu\text{l}$  acetonitrylu (ACN) i 250  $\mu\text{l}$  dichlorometanu (DCM). W celu zapewnienia całkowitej dyspersji i ułatwienia ekstrakcji mieszaninę wortexowano przez 1 min. Fazę ekstrakcyjną oddzielono przez wirowanie przy 10000 obr./min przez 5 minut i zebrano w szklanej probówce. Na koniec rozpuszczalnik odparowano do sucha w strumieniu azotu, a pozostałość ponownie rozpuszczono w 50  $\mu\text{l}$  mieszaniny woda-ACN (70:30, v/v) i wprowadzono do układu CE. Autorzy podkreślili, że w związku z tym, przy wstępnej obróbce próbki można potencjalnie osiągnąć 10-krotny współczynnik wzbogacenia, biorąc pod uwagę związek między początkową objętością próbki a końcową objętością ekstraktu. Optymalne warunki rozdzielania były następujące: roztwór BGE zawierający równe ilości boranu sodu ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) i wodorofosforanu disodu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) o stężeniu końcowym 23 mmol/l zawierający 0,2% chlorku poli(diallilodimetyloamoniowego) dostosowany do pH 7,80. Rozdzielanie prowadzono stosując ujemny potencjał 25 kV, temperatura utrzymywana była na poziomie  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a elektroforegramy rejestrowano przy długości fali 275 nm przez 4 min. Próbkę wprowadzana była sposobem hydrodynamicznym stosując ciśnienie 50 mbar przez 10 s. Niestety autorzy podkreślili, że nie przeprowadzono jeszcze walidacji metody zaprezentowanej w opublikowanej pracy [48].

Kolejne badania opublikowane w 2016 roku przeprowadzili Prasanta Paul z zespołem [49]. Przeprowadzali oni analizę leku na zawartość Cpx z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej z detekcją konduktometryczną sprzężoną pojemnościowo (CE- $\text{C}^4\text{D}$ ). Roztwór standardowy analitu przygotowano przez rozpuszczenie dokładnie odważonej ilości Cpx bezpośrednio w rozcieńczonym dziesięciokrotnie BGE. Ponadto dodano 0,5 mol/l roztworu HCl w celu całkowitego rozpuszczenia analitu. Roztwór próbki przygotowano ze sproszkowanych tabletek (Neofloksin® 500, Beximco Pharmaceuticals Ltd., Bangladesz) w taki sam sposób jak roztwór wzorcowy. Ustawienia detektora  $\text{C}^4\text{D}$  zależą od konkretnego używanego BGE. Dla każdego

użytego BGE wykonano profilowanie  $C^4D$  w celu znalezienia niezbędnych parametrów. W przypadku buforu octanu amonu zastosowano detektor eDAQ  $C^4D$  przy amplitudzie międzyszczytowej 60 V i częstotliwości wejściowej 1050 kHz. Dla buforu cytrynianowego zastosowano detektor eDAQ  $C^4D$  przy amplitudzie międzyszczytowej 40 V i częstotliwości wejściowej 800 kHz. Napięcie separacji oraz warunki płukania kapilar zostały zoptymalizowane metodą prób i błędów, a także określone na podstawie wcześniejszych badań. Nowe kapilary kondycjonowano w temperaturze 25 °C przez płukanie 1 mol/l NaOH przez 10 min, wodą dejonizowaną przez 10 min, 0,1 mol/l NaOH przez 10 min i ponownie wodą dejonizowaną przez 10 min. Codziennie na początku analizy kapilarę płukano 0,1 mol/l NaOH, wodą dejonizowaną oraz BGE przez 10 minut. Pomiędzy analizami kapilarę płukano BGE przez 3 minuty. Rozdzielanie było prowadzone przy 20 kV. Każdego wieczoru kapilara była płukana wodą przez 10 minut w celu jej oczyszczenia. Co tydzień dwie platynowe elektrody dokładnie czyszczono mieszaniną wody i metanolu (50:50, v/v) za pomocą bawełnianego wacika. Wartość LOQ dla opracowanej metody wyniosła 1 mg/ml przy zastosowaniu jako BGE 20 mmol/l octanu amonu, natomiast przy zastosowaniu 10 mmol/l buforu cytrynianowego wynosiła 0,0125 mg/ml. RSD dla tej metody mieści się w przedziale od 2 do 3% [49].

Metodologie oparte na HPLC przeważają nad metodami elektroforetycznymi przede wszystkim swoją uniwersalnością. W przypadku rutynowych analiz żywności pod kątem zawartości substancji niebezpiecznych dla zdrowia konsumentów bardzo ważne jest, aby brać pod uwagę jakim sprzętem dysponują laboratoria wykonujące takie analizy. Większość laboratoriów posiada w swoim wyposażeniu aparat do HPLC, w związku z tym wysoce wskazane jest opracowywanie metod opartych na tej technice separacyjnej. Metodologie oparte na CE charakteryzują się natomiast prostszą i krótszą procedurą przygotowania próbki do analizy, co również jest niezwykle ważne w przypadku rutynowych badań mięsa. Są one również dużo bardziej przyjazne środowisku ze względu na niewielkie zużycie próbek i szkodliwych rozpuszczalników organicznych, co także należy wziąć pod uwagę przy wyborze metody oznaczania FQLs w żywności oraz w próbkach środowiskowych. Współcześnie duży nacisk kładzie się na ekologię, a metody elektroforetyczne zdecydowanie przewyższają pod tym względem procedury chromatograficzne, gdzie zużywa się dużo większe objętości szkodliwych rozpuszczalników organicznych. Szczegółowe porównanie parametrów opisanych powyżej metod oznaczania FQLs przedstawiono w Tabeli 3.

**Tabela 3. Porównanie wybranych metod oznaczania fluorochinolonów**

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbki do analizy	Całkowity czas analizy	LOQ	Matryca próbki	Rodzaj detekcji
HPLC [43]	Ekstrakcja ciecz-ciecz	22,5 min	0,5 µg/ml (Cpx)	osocze	UV-Vis
HPLC [44]	SPE	43,5 min	23,4 ng/l (Cpx) 22,3 ng/l (Ofx)	ścieki komunalne	MS
HPLC [45]	Homogenizacja, SPE	80 min	17,04 µg/kg tkanki (Cpx)	tkanka zwierzęca	MS
HPLC [46]	Homogenizacja, liofilizacja, ekstrakcja ciecz-ciecz	65 min	30 µg/kg tkanki (Ofx)	tkanka zwierzęca	FLD
CZE [47]	SDME	64 min	Nie podano	mocz	UV-Vis
CZE [48]	DLLME	10 min	Nie podano	krew	UV-Vis
CZE [49]	10-krotne rozcieńczenie roztworu wodnego próbki leku	13 min	0,0125 mg/ml (Cpx)	preparat farmaceutyczny	konduktometria

#### 4. Przegląd wybranych metod oznaczania azaperonu

Ze względu na powszechne stosowanie leków uspokajających wśród zwierząt w sytuacjach stresowych, między innymi podczas transportu na rzeź, pozostałości tych związków są czasami obecne w żywności. Powodem tego jest często nieprzestrzeganie okresu karencji, gdy podawanie leków weterynaryjnych nie zostało przerwane na odpowiedni czas przed ubojem zwierzęcia. Spożywanie mięsa z pozostałościami farmaceutyków jest niebezpieczne dla zdrowia konsumentów, w związku z tym naukowcy poszukują nowych metod oznaczania, które mogłyby być jak najbardziej przydatne podczas rutynowych analiz mięsa pod kątem zawartości pozostałości leków groźnych dla zdrowia ludzi [93]. Poniżej zebrano i krótko opisano wybrane metody oznaczania AZN, głównego leku uspokajającego dla zwierząt.

W literaturze można znaleźć metody oznaczania AZN bazujące głównie na technice HPLC [93-109]. Ze względu na strukturę i naturę chemiczną tego związku naukowcy wykorzystują chromatografię w odwróconym układzie faz. W literaturze jest opisanych kilka metod HPLC oznaczania tego leku uspokajającego z wykorzystaniem detekcji UV-Vis [94, 96] lub FLD [95, 96], natomiast większość metod oparta jest na tandemowej spektrometrii mas [93,97-99, 101-109], a najnowsze doniesienia literaturowe świadczą o próbach rozwijania metod immunochromatograficznych [100]. Spośród wspomnianych metod oznaczania AZN wybrano kilka [93-100] i opisano je poniżej.

Keukens z zespołem w roku 1991 zaproponowali metody [94] oznaczania pozostałości  $\beta$ -blokerów i związków uspokajających, w tym AZN w nerkach świń, wykorzystując SPE oraz HPLC z detekcją UV oraz FLD. Początkowo na etapie przygotowania próbki, z nerki usunięto nadmiar tłuszczu, tkankę następnie pocięto na małe kawałki i homogenizowano za pomocą młynka kuchennego. 5 g homogenizowanej próbki dokładnie odważono w polipropylenowej probówce i ciągle mieszając dodano 20 ml ACN. Po zamknięciu próbki próbkę energicznie worteksowano przez 30 s (1500 obr./min). Probówkę umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 2 minuty, a następnie wirowano przy  $4000 \times g$  przez 5 minut. Kolumnkę C18 aktywowano kolejno 5 ml metanolu i 5 ml wody. Do 7,5 ml objętości ekstraktu próbki dodano 40 ml 10% roztworu NaCl i wymieszano. Roztwór ten delikatnie przefiltrowano przez kolumnkę za pomocą jednorazowej strzykawki. Przepłukano ją następnie 1 ml 0,01 mol/l  $H_2SO_4$ , a następnie 2 ml powietrza. Związki eluowano 2 ml zakwaszonego ACN i eluat zbierano do próbki, którą przed użyciem przepłukano stężonym amoniakiem, wodą i acetonem, a następnie wysuszono w strumieniu azotu. Eluat odparowano do objętości 300  $\mu$ l delikatnym strumieniem azotu w temperaturze 70 °C. Po delikatnym wymieszaniu od razu dodano 1 ml n-heksanu i mieszano przez 30 s na worteksie. Fazy rozdzielono przez odwirowanie ( $2000 \times g$ ) i wyodrębniono dolną fazę wodną. 50  $\mu$ l tak przygotowanej próbki wstrzyknięto do układu HPLC. Kolumna analityczna wypełniona fazą C18 miała długość i średnicę wewnętrzną 300 mm x 3,9 mm. Prędkość przepływu eluentu wynosiła 1,2 ml/min. Eluent przygotowano mieszając 2,46 g bezwodnego octanu sodu, 450 ml wody i 550 ml ACN. pH doprowadzono do wartości 6,5 za pomocą kwasu octowego, a eluent przed użyciem dodatkowo przesączono. Detekcję UV przeprowadzono przy długości fali 240 nm, natomiast detekcję FLD przeprowadzono przy długości fali wzbudzenia 246 nm i długości fali emisji 351 nm. Wartość ustawionego wzmocnienia w detektorze wynosiła 12. Precyzja metody dla stężenia AZN równego 20  $\mu$ g/kg wynosiła 8,8%, natomiast LOQ była równa 1  $\mu$ g/kg [94].



Vesna Cerkvenik-Flajs [95] zaproponowała metodę oznaczania AZN w nerkach z wykorzystaniem HPLC z detekcją FLD. Porcję  $5,0 \pm 0,1$  g rozmrożonej, zhomogenizowanej próbki nerki umieszczono w 50 ml plastikowej probówce wirówkowej i ekstrahowano 20 ml ACN przez krótkie, 5 min użycie wibromiksu i ultradźwięków. Po wielokrotnym krótkim, wibracyjnym mieszaniu próbki, wirowano ją przez 10 minut przy  $3290 \times g$  w temperaturze pokojowej. Supernatant przeniesiono do 50 ml plastikowej probówki do wirowania i wymieszano. 10 ml ekstraktu odpipetowano do zlewki owiniętej folią aluminiową, następnie dodano 20 ml redestylowanej wody i roztwór wymieszano. Wartość pH rozcieńczonego ekstraktu doprowadzono do 4,0 za pomocą 0,1 mol/l HCL. Tak przygotowaną próbkę powoli nanoszono na kolumnę SPE z prędkością przepływu około 1 kropla/sekundę bez wstępnego kondycjonowania. Kolumnę przemyto 6 ml 0,1 mol/l HCl i 6 ml metanolu z prędkością przepływu około 1 kropla/sek. Na koniec kolumnę odessano do sucha. Elucję przeprowadzono powoli 5 ml 5% trietyloaminy w metanolu. Eluat SPE odparowano w strumieniu azotu w temperaturze  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  prawie do sucha. Suche pozostałości ponownie rozpuszczono w 1 ml składnika A fazy ruchomej i wirowano przez 10 minut przy  $3290 \times g$  w temperaturze pokojowej. Końcowe ekstrakty przeniesiono do silanizowanych fiolek i analizowano metodą LC. Kolumnę analityczną wypełniono fazą stacjonarną LiChrospher 60 RP-select B (wielkość cząstek  $5\text{ }\mu\text{m}$ ). Składnik A fazy ruchomej stanowiła mieszanina 0,05 mol/l buforu fosforanowego o pH 4,5, tetrahydrofuranu i ACN (60:5:35, v/v/v), natomiast składnikiem B był 0,05 mol/l bufor fosforanowy o pH 4,5, który przygotowano rozpuszczając 5,8 g kwasu ortofosforowego w 900 ml świeżej redestylowanej wody, a pH doprowadzono do wartości 4,5 za pomocą trietanolaminy. Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono stosując następujący gradient składu fazy ruchomej: czas 0 (100% A), 0–3 min, 0–22% B; 3–9 min, 22% B; 9–12 min, 78–100% A. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,7 ml/min, objętość wprowadzonej do kolumny próbki wynosiła 50  $\mu\text{l}$ , natomiast temperaturę przedkolumny i kolumny analitycznej ustalono na  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Długości fali wzbudzenia i fali emisji dla AZN wynosiły odpowiednio 245 i 345 nm. Zakres liniowości metody dla AZN wyznaczono w dwóch zakresach stężeń, pierwszym od 0,0025–0,5 g/ml i drugim od 0,0025–0,05 g/ml. Zakres liniowości metody dla AZL zawierał się natomiast w zakresie stężeń 5–150 g/kg. Wartości RSD w tej metodzie dla AZN zawarte były w przedziale od 6,1 do 13,3%, natomiast wartość LOQ wynosiła 10  $\mu\text{g/kg}$  [95].

W 2011 roku grupa badaczy z Polski podjęła próbę oznaczania leków uspokajających, w tym AZN oraz  $\beta$ -blokerów w moczu zwierzęcym z wykorzystaniem HPLC z detekcją UV

oraz FLD [96]. Aby zoptymalizować przygotowanie próbki i zwalidować całą procedurę, pobrano mocz od dorosłego bydła. Próbki odwirowano, a następnie zamrożono w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy. Objętość  $5,0 \pm 0,1$  ml próbki przeniesiono do 50 ml plastikowej probówki wirówkowej, a następnie dodano do niej 15 ml ACN. Zawartość probówki wortexowano przez 1 min, otrzymany roztwór wirowano przy 3500 obr./min w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 20 min, po czym supernatant oddzielono i przeniesiono do 50 ml probówki z zakrętką. Do probówki z supernatantem dodano 35 ml 0,05 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,0, mieszano i poddawano działaniu ultradźwięków przez 5 min. Kolumnienki SPE kondycjonowano 10 ml metanolu, a następnie 10 ml 0,05 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,0. Próbki następnie naniesiono na kolumnienki SPE. Złoże przepłukano 10 ml świeżej redestylowanej wody, 10 ml metanolu i następnie suszono przez 5 minut pod zmniejszonym ciśnieniem. Anality eluowano dwukrotnie 4 ml alkalicznego ACN. Połączone eluaty odparowano do sucha w temperaturze  $\leq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  w atmosferze azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 0,5 ml fazy ruchomej LC i przeniesiono do fiolki do analizy. Długość fali wzbudzenia ustawiono na 245 nm, natomiast długość fali emisji na 345 nm. Do rozdzielania wykorzystywano kolumnę C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm), faza ruchoma składała się z ACN i buforu octanowego (0,03 mol/l octan sodu o pH 6,0). Tabela 4 przedstawia profil elucji gradientowej wykorzystany w opisywanej metodzie.

**Tabela 4. Profil gradientu**

Czas [min]	Acetonitryl [%]	Bufor octanowy [%]
0	50	50
11	50	50
13	85	15
16	85	15
18	50	50
25	50	50

Wprowadzana na kolumnę objętość próbki wynosiła 50  $\mu\text{l}$ , a rozdzielanie analitów prowadzono przy prędkości przepływu 1 ml/min w temperaturze  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Wartość LOD dla AZN w tej metodzie wynosiła 5  $\mu\text{g/l}$ , natomiast powtarzalność tej metody zawierała się w przedziale od 6,3 do 8,0% [96].

Kamila Mitrowska z zespołem [97] opracowali metodę oznaczania leków uspokajających, w tym AZN wraz z jego metabolitem AZL, w nerkach świńskich i bydłeczych

z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS. 2,5 g homogenizowanej próbki wzbogacono roztworem wzorców wewnętrznych do zawartości odpowiadającej 20 g/kg poprzez dodanie 50 µl roztworu chlorpromazyny-d<sub>6</sub> i karazololu-d<sub>6</sub> o stężeniu 1 g/ml. Następnie dodano 20 ml ACN i mieszaninę mieszano przez 15 min. Po odwirowaniu przez 10 min przy 4000 obr./min w temperaturze -10 °C, 2 ml ekstraktu odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 50 °C, a pozostałość rozpuszczono w 1 ml fazy ruchomej. Przed analizą LC-MS/MS ekstrakt nerki odwirowano w celu otrzymania klarownego roztworu. Jonizację próbki prowadzono poprzez elektrorozpylanie z wykorzystaniem jonizacji w trybie jonów dodatnich, której źródło (TurboIonSpray) pracowało w temperaturze 300 °C, przy napięciu ustawionym na 5500 V. Azot był używany jako gaz nebulizatora, gaz kurtynowy, a także gaz kolizyjny. Anality wykrywano w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM) z czasem obserwowania przejścia wynoszącym 200 ms. Analizatory kwadrupolowe Q1 i Q3 zostały utrzymane w rozdzielczości jednostkowej. Rozdzielanie chromatograficzne przeprowadzono w kolumnie analitycznej Luna C-18 (150 mm x 2,0 mm, 5 µm) z oktadecylową przedkolumną (4 mm x 2 mm). Faza ruchoma składała się z rozpuszczalnika A (ACN) i rozpuszczalnika B (bufor mrówczanowy amonu (stężenie 0,05 mol/l, pH 4,5)). Gradient liniowy składu fazy ruchomej wynosił: 20% A w 0 min, 80% A od 1 do 5 min, a następnie 20% A od 7 do 15 min. Prędkość przepływu wynosiła 200 µl/min w temperaturze otoczenia, a objętość wprowadzonej do kolumny próbki wynosiła 30 µl. RSD opracowanej metody dla AZN zawierało się w przedziale od 4,1 do 9,1%, natomiast wartość LOQ dla AZN wyniosła 105,5 µg/kg [97].

Limin He wraz ze współpracownikami [93] również podjęli próbę oznaczenia wybranych leków uspokajających, w tym AZN oraz β-blokerów w tkankach świń. Próbki mięśni, wątroby i nerek świń pobrano z lokalnej fermy, gdzie zwierzęta te nie były leczone środkami uspokajającymi takimi jak β-blokerami, czy karazololem. Wszystkie próbki homogenizowano w szybkoobrotowym blenderze do żywności, a następnie zamrażano w temperaturze -20 °C do czasu analizy. 2,0 g próbki mięśnia, wątroby lub nerki świni odważono do 50 ml polipropylenowej probówki wirówkowej. Dodano do niej 2 g bezwodnego siarczanu sodu i 10 ml ACN. Po worteksowaniu przez 30 s, probówkę energicznie wytrząsano na wytrząsarce przez 10 min, a następnie wirowano w 4 °C z prędkością 6500 obr./min przez 5 min. Górną warstwę organiczną zdekantowano do innej 50 ml probówki wirówkowej. Pozostałość ponownie ekstrahowano 10 ml ACN. Po połączeniu wszystkich supernatantów, 5 ml próbki przeniesiono do 10 ml szklanej probówki i odparowano prawie do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 50 °C. Pozostałość ponownie rozpuszczono w 1 ml 2%

amoniaku w ACN, mieszano na wortexie przez 1 min, następnie do próbki dodano 7 ml dejonizowanej wody i mieszano na wortexie w celu oczyszczenia. Kartridż Oasis HLB kondycjonowano kolejno 5 ml metanolu i 5 ml wody dejonizowanej. Ekstrakty próbek przenoszono do kartridża. Następnie przemyto go 5 ml wody dejonizowanej. Po osuszeniu przez zastosowanie niskiego ciśnienia przez 2 minuty, analyty eluowano do 5 ml próbki z 3 ml 2% amoniaku w ACN. Eluaty odparowano do ok. 1 ml pod delikatnym strumieniem azotu w temperaturze 50 °C. Roztwór wortexowano i przesączono przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm do dalszej analizy techniką LC-MS/MS. Rozdzielanie chromatograficzne przeprowadzono stosując kolumnę Shim-Pack XR-ODS (75 mm x 3,0 mm, 2,7 µm) w temperaturze 30 °C. Faza ruchoma składała się z 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie jako składnik A i 0,1% kwasu mrówkowego w ACN jako składnik B. Profil elucji gradientowej był następujący: 0–5 min 5% B, 5–13 min 5% B–75% B, 13–13,1 min 75% B–5% B, 13,1–18 min 5% B. Do analizy LC-MS/MS zastosowano objętość wprowadzanej do kolumny próbki równą 10 µl i prędkość przepływu fazy ruchomej 0,3 ml/min. Analizy MS przeprowadzono stosując elektrorozpylanie z wykorzystaniem jonizacji w trybie jonów dodatnich przy następujących warunkach: napięcie 5,5 kV, temperatura źródła jonów 550 °C; ciśnienie gazu osłonowego 25 psi. Wartość LOQ dla AZN wynosiła 0,2 µg/kg mięśni oraz 0,4 µg/kg wątroby i nerek, a precyzja metody dla tego analitu mieściła się w zakresie od 1,9 do 3,9% [93].

W 2016 roku M.L. Oca z zespołem [98] opracowali kolejną metodę oznaczania AZN oraz innych leków podawanych zwierzętom w mięśniach z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS. W celu przygotowania próbki, 5 g homogenizowanego mięśnia zwierzęcego odważono w 50 ml próbce polipropylenowej, a następnie wzbogacono 50 µl roztworu zawierającego trzy standardy wewnętrzne. Kolejno do próbki dodano 10 ml 0,1 mol/l roztworu buforu fosforanowego o pH 6,1 i całość mieszano przez 30 s. Następnie próbkę umieszczono na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej, po czym dodano 3 ml 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i każdą próbkę ponownie wymieszano na wortexie przez 30 s, po czym mieszaninę wirowano przez 10 minut przy 6800 obr./min w temperaturze pokojowej. Supernatant każdego homogenatu klarowano stosując filtr wstępny Millex-AP połączony z 20 ml strzykawką. Etap oczyszczania przez ekstrakcję do fazy stałej (SPE) przeprowadzono ręcznie lub automatycznie. Kolumnienki SPE najpierw kondycjonowano 3 ml metanolu, a następnie 3 ml wody dejonizowanej. Po naniesieniu każdego przesączu próbki złoża SPE płukano 3 ml 1 mol/l kwasu mrówkowego, a następnie 3 ml lub 3,5 ml mieszaniny metanolu z 1 mol/l kwasem mrówkowym (55/45, v/v).

Kolumnienki suszono przez 10 min poprzez przepuszczenie przez nie strumienia powietrza za pomocą pompy próżniowej, w dalszej kolejności przeprowadzono elucję analitów i wzorców wewnętrznych za pomocą 4 lub 4,5 ml nowo przygotowanego lub 1-tygodniowego roztworu eluującego, który składał się z mieszaniny wodorotlenku amonu i etanolu (2/98, v/v). Każdy eluat zebrano w 15 ml bursztynowej probówce, odparowano do sucha w atmosferze azotu w temperaturze 38 °C, rozpuszczono w 250 µl 30% ACN i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 5 minut. Każdy końcowy ekstrakt klarowano przez filtr nylonowy o średnicy porów 0,22 µm połączony z 1 ml strzykawką, a przesącz przenoszono fiołki do analizy LC-MS/MS. Separację chromatograficzną przeprowadzono na kolumnie Gemini NX C18 (50 mm x 2 mm, 3 µm), którą umieszczono w temperaturze 30 °C. Zastosowano elucję gradientową, składnik A fazy ruchomej zawierał ACN z 0,5% wodorotlenkiem amonu, a składnik B fazy ruchomej zawierał wodę z 0,5% wodorotlenkiem amonu. Początkowy skład fazy ruchomej wynosił 30% A i 70% B, ilość składnika A zwiększono liniowo do 85% w ciągu pierwszych 7 minut, utrzymywano w tych warunkach przez 2 minuty i przywrócono do początkowego składu od minuty 9 do 11 minuty. Prędkość przepływu wynosiła 0,3 ml/min, a objętość wprowadzanej do kolumny próbki wynosiła 10 µl. Detekcję MS/MS przeprowadzono przy użyciu potrójnego kwadrupolowego analizatora mas firmy Agilent 6410B z wielomodowym źródłem jonizacji, które zaprogramowano do pracy w mieszanych warunkach chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym i elektrorozpylania w trybie jonów dodatnich. Temperaturę źródła utrzymywano na poziomie 250 °C, a napięcie kapilarne ustawiono na 4300 V. W opisywanej metodzie azot był używany zarówno jako gaz do nebulizatora, jak i gaz kolizyjny. Wartość LOQ dla AZN w zaproponowanej przez M.L. Oca metodologii wyniosła 106,5 µg/kg [98].

Lenise Guimarães de Oliveira i współpracownicy [99] również zaproponowali w roku 2017 metodę oznaczania leków weterynaryjnych w tym AZN, w mięsie świń oraz nerkach bydłęcych, a także końskich. Opracowali oni metodologię opartą na technice LC-MS/MS oraz dyspersyjnej SPE na etapie przygotowania próbki. Próbki mięsa pozyskano z rzeźni Portal e Filhos oraz z innych rzeźni pod nadzorem Ministerstwa Rolnictwa, Hodowli i Zaopatrzenia w Żywność. Zewnętrzne plastry nerki, pozbawione włókien zmielono i homogenizowano za pomocą blendera spożywczego. Otrzymane homogenaty przechowywano w -20 °C w plastikowych pojemnikach. W celu dalszego przygotowania próbki, porcję 2 g homogenizowanej nerki odważono do 50 ml propylenowej probówki wirówkowej. Do każdej probówki dodano 10 ml ACN i próbkę homogenizowano przy użyciu urządzenia do rozrywania

tkanek Ultra-Turrax, następnie mieszano 20 min przy 180 obrotach na minutę w wytrząsarce. Kolejno, mieszaninę wirowano przy około 5600 g przez 5 minut w temperaturze 5 °C. Powstały supernatant przeniesiono do 15 ml polipropylenowej probówki i trzymano w -20 °C przez 1 godzinę w zamrażarce. Następnie próbkę wirowano przy 5600 × g przez 20 min w temperaturze 0 °C. Supernatant przeniesiono do innych, czystych 15 ml polipropylenowych probówek do wirowania zawierających 500 mg materiału filtracyjnego zawierającego ziemię okrzemkową (Celite 545). Roztwór w probówkach mieszano przez 20 s i ponownie odwirowano w tych samych warunkach. 1 ml supernatantu przeniesiono do czystej probówki polipropylenowej o pojemności 50 ml i odparowano do sucha pod delikatnym strumieniem azotu. Następnie suchą pozostałość rozpuszczono w 300 µl metanolu i ekstrakt przeniesiono do fiolki do HPLC w celu poddania go analizie techniką LC-MS/MS. Rozdzielanie chromatograficzne przeprowadzono przy użyciu kolumny analitycznej Poroshell 120 EC-C18 3,0 x 50 mm x 2,7 µm. Faza ruchoma składała się z wody z 0,1% kwasem mrówkowym (v/v) - składnik A oraz metanolu zakwaszonego 0,1% kwasem mrówkowym (v/v) - składnik B. Zaproponowany gradient składu fazy ruchomej wyglądał następująco: początkowa ilość składnika A wynosiła 95%, od 2 do 4 minuty zawartość składnika A malała do 50%, w ciągu kolejnej minuty spadała do 5% A, następnie skład fazy ruchomej nie zmieniał się przez 3 minuty, a od 8 do 9 minuty zawartość składnika A powróciła do 95% A i utrzymywała się przez minutę do końca analizy. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,5 ml/min. Detekcję za pomocą spektrometru mas przeprowadzono przy użyciu jonizacji poprzez elektrorozpylanie w trybie jonów dodatnich i przy użyciu MRM. Zoptymalizowane parametry detekcji MS były następujące: temperatura źródła 700 °C, ciśnienie gazu osłonowego 30 psi, napięcie jonizacji 5500 V, włączone termostatowanie interfejsu, ciśnienie gazu kolizyjnego 8 psi, potencjał wejściowy 10 eV i potencjał deklasterowania 60 eV. Wartość LOQ uzyskana w tej metodzie dla AZN wynosiła 2,5 µg/kg tkanki, natomiast RSD mieściło się w przedziale od 6,0 do 20,3% [99].

Linlin Chen z zespołem zaproponowali w bieżącym roku zupełnie inną, immunochromatograficzną metodę (ICA) oznaczania AZN w mięsie wieprzowym [100]. W tym badaniu opracowano czuły test immunochromatograficzny (ICA) do jednoczesnego wykrywania AZN i jego metabolitu AZL, w oparciu o przeciwciało monoklonalne (mAb) o wysokim powinowactwie. Tutaj antygen resztkowy AZL-SA zsyntetyzowano poprzez reakcję AZL z bezwodnikiem bursztynowym (SA), a następnie przygotowano koniugaty AZL-SA z owalbuminą i hemocyjaniną KL. Kolejno wytworzono mAb do monitorowania

analitów za pomocą dwóch trybów detekcji. Próbki wieprzowiny w tym badaniu pochodziły z Henan Academy of Agricultural Sciences. Próbki te zostały wcześniej zakupione na lokalnym rynku i nie znaleziono w nich śladów analitów za pomocą techniki LC-MS. Początkowo 5 g mięsa wieprzowego zhomogenizowano i przeniesiono do próbki wirówkowej o pojemności 50 ml. Następnie dodano 20 ml ACN i wytrząsano przez 2 minuty, po czym poddano działaniu ultradźwięków w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Supernatant i osad oddzielono poprzez wirowanie przy  $5000 \times g$  przez 5 min. Po zebraniu supernatantu do osadu ponownie dodano 10 ml ACN w celu powtórnej ekstrakcji. Następnie oba ekstrakty zmieszano ze sobą i wysuszono w atmosferze azotu w temperaturze 40 °C. Na koniec pozostałość ponownie rozpuszczono w 5 ml 0,1 mol/l soli fizjologicznej buforowanej fosforanami o pH 7,4 zawierającej 5% ACN. W bezpośredniej ICA (przy użyciu swoistych przeciwciał znakowanych nanocząstkami złota) wizualna LOD dla AZN wynosiła 80 ng/g. W przypadku pośredniej ICA (przy użyciu przeciwciał antygatunkowych znakowanych nanocząstkami złota) wizualne i instrumentalne LOD dla AZN wynosiły odpowiednio 8 i 0,14 ng/g, a dla AZL odpowiednio 8 i 0,12 ng/g. Wyniki wykazały, że granica wykrywalności wizualnej formatu pośredniego była dziesięciokrotnie niższa niż w przypadku formatu bezpośredniego. Według autorów opisana metoda analityczna pozwala uzyskać wyniki w ciągu 15 minut i zapewnia czułe i proste narzędzie do wykrywania AZN i AZL w miejscu pobierania próbki, co jest niezwykłą jej zaletą [100].

Opisane powyżej czułe metody oparte na LC-MS/MS, niestety nie są tak użyteczne dla laboratoriów wykonujących rutynowe analizy mięsa na zawartość AZN i AZL, głównie ze względu na konieczność stosowania wyrafinowanego, drogiego sprzętu, którym takie laboratoria często nie dysponują. Kolejną wadą tych metod jest skomplikowana i dość czasochłonna procedura przygotowania próbki. Jednak do niewątpliwych zalet tych metod można zaliczyć bardzo dobrą selektywność, wysoką czułość oraz niskie LOD i LOQ. Metody oznaczania leków uspokajających z wykorzystaniem HPLC z detekcją UV [94, 96] są zdecydowanie bardziej użyteczne, ponieważ taka aparatura jest dużo łatwiej dostępna, jednak jej zastosowanie wiąże się z gorszą czułością, którą można poprawić dodając do procedury przygotowania próbki etap zateżnienia analitów. Ostatnia, najnowsza z opisanych procedur jest najbardziej użyteczna pod względem wykonywania rutynowych analiz, ponieważ pozwala uzyskać wyniki w miejscu pobrania próbki w bardzo krótkim czasie, jednocześnie przy niewielkim stopniu skomplikowania procedury przygotowania próbki. Szczegółowe porównanie opisanych metod przedstawiono w Tabeli 5 poniżej.

**Tabela 5. Porównanie wybranych metod oznaczania azaperonu**

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbki do analizy	Całkowity czas analizy	LOQ	Matryca próbki	Rodzaj detekcji
HPLC [93]	homogenizacja, SPE	~52 min	0,2 - 0,4 µg/kg	tkanka zwierzęca	MS
HPLC [94]	homogenizacja, SPE	38 min	1 µg/kg	tkanka zwierzęca	UV/FLD
HPLC [95]	homogenizacja, SPE	37 min	10 µg/kg	tkanka zwierzęca	FLD
HPLC [96]	SPE	56 min	nie podano	mocz	UV/FLD
HPLC [97]	homogenizacja, ekstrakcja ciecz-ciecz	40 min	105 µg/kg	tkanka zwierzęca	MS
HPLC [98]	homogenizacja, SPE	36,5 min	106,5 µg/kg	tkanka zwierzęca	MS
HPLC [99]	homogenizacja, SPE	115 min	2,5 µg/kg	tkanka zwierzęca	MS
ICA [100]	homogenizacja, ekstrakcja ciecz-ciecz	12 min	nie podano	tkanka zwierzęca	-



## 5. Uzasadnienie wyboru tematyki badań

Współcześnie wzrasta świadomość ludzi, że dieta ma ogromny wpływ na zdrowie człowieka, a nawet leczenie niektórych chorób. W związku z tym znacząco wrosło zainteresowanie ludzi tematyką zdrowego odżywiania. Konsumenci bardzo świadomie podchodzą do kwestii odżywiania i wybierają produkty zawierające jak najmniej szkodliwych substancji chemicznych. Ludzie kupując żywność, częściej zwracają uwagę na skład produktu znajdujący się na etykiecie opakowania. Niestety, w pożywieniu mogą znaleźć się związki, które nie są wymienione w składzie na etykiecie produktu. Są to na przykład związki dodawane do pasz lub leki podawane zwierzętom. Ze względu na potrzebę szybkiego wzrostu zwierząt, takie związki są coraz częściej stosowane w ich hodowli. Hodowcy zwierząt bardzo często stosują antybiotyki jako stymulatory wzrostu. Obecnie w krajach rozwijających się produkty mięsne w zdecydowanej większości pochodzą z tak zwanej intensywnej hodowli przemysłowej, która wymaga szybkiej produkcji mięsa, mleka i jaj. Podczas hodowli zwierząt stosuje się ogromne ilości leków, w tym antybiotyki jako „lekarstwa na wszystko”. Hodowcy aby uniknąć zachorowań, często stosują antybiotyki profilaktycznie wśród całych stad zwierząt, a nie tylko u chorych osobników. Aby zagwarantować bezpieczeństwo konsumenta, podawanie leków weterynaryjnych musi zostać zatrzymane na odpowiedni czas przed ubojem zwierząt lub zebraniem produktów (jaja, mleko). Ten okres karencji różni się w zależności od gatunku zwierzęcia, drogi podania oraz samego preparatu. W przypadku nieprzestrzegania takiego czasu oraz podawania leków tuż przed ubojem zwierząt lub zebraniem produktów, pozostałości tych związków są obecne w organizmie zwierzęcia, więc konsumenci spożywają te związki, a następnie wydalają do środowiska. Takie postępowanie stanowi potencjalne ryzyko dla zdrowia konsumentów. Związki chemiczne, które są podawane zwierzętom oprócz zamierzonego działania farmakologicznego, często charakteryzują się niepożądanymi lub nawet toksycznymi działaniami, które są niebezpieczne dla ludzi. Wydalanie pozostałości antybiotyków wraz z moczem i kałem, prowadzi do zanieczyszczenia środowiska i powstawania zjawiska antybiotykoodporności. Powstawanie bakterii opornych na działanie antybiotyków sprawia, że infekcje bakteryjne są bardzo trudne, lub nawet niemożliwe do wyleczenia [110, 111].

W literaturze można znaleźć wiele metod oznaczania FQLs w próbkach środowiskowych oraz tkankach zwierząt z wykorzystaniem HPLC [51]. Opisanych metodologii opartych na technikach elektromigracyjnych jest zdecydowanie mniej [51]. Z uwagi na powyższe, pierwszym celem badań do rozprawy doktorskiej było opracowanie

elektroforetycznych metod oznaczania Cpx i Ofx w moczu człowieka oraz tkankach mięsnych pochodzenia zwierzęcego z wykorzystaniem zatężania analitów wewnątrz kapilary na drodze przejściowej pseudo-izotachoforezy (tpITP). W piśmiennictwie nie znalazłam żadnych metod oznaczania FQLs za pomocą CE-UV oraz tpITP, jak również metod oznaczania wybranych przeze mnie analitów z wykorzystaniem ekstrakcji na nanocząstkach magnetycznych, których powierzchnia została zmodyfikowana krzemionką z przyłączonymi łańcuchami C18. W związku z tym postanowiłam również skupić się na eksperymencie, który wykorzystywałby wymieniony typ ekstrakcji.

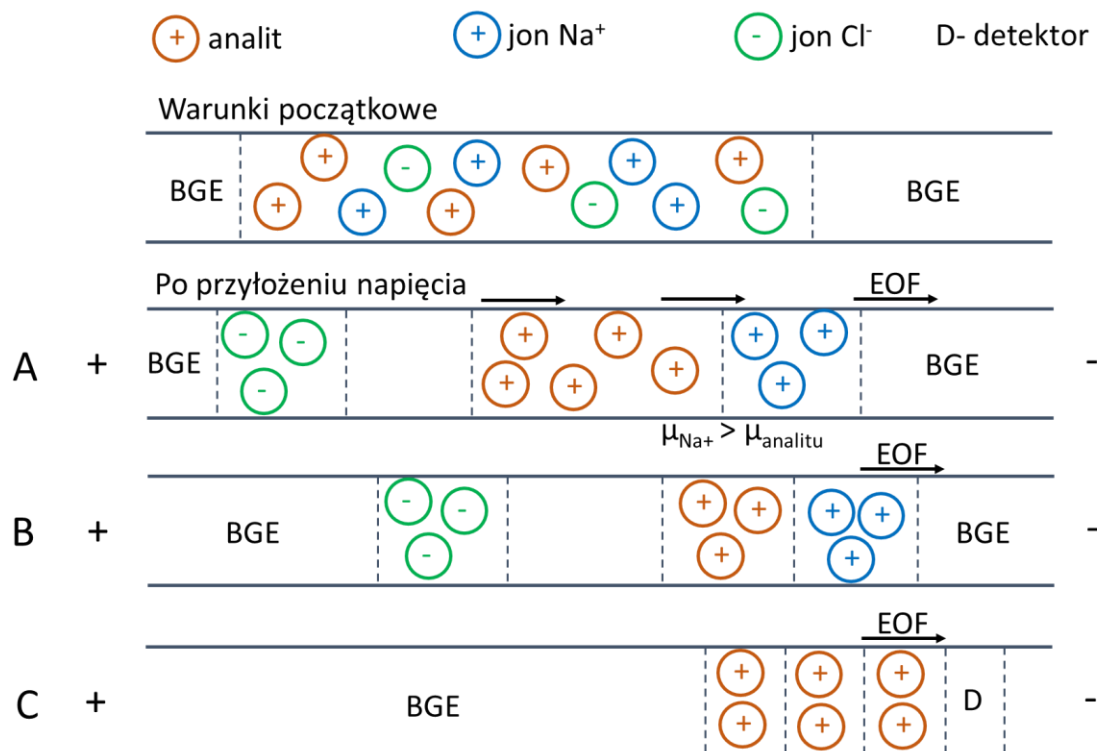
Wśród leków podawanych zwierzętom wyróżniamy również leki uspokajające, które podawane są głównie świniom podczas transportu do rzeźni, ze względu na to, że ten gatunek zwierząt jest niezwykle podatny na stres. Hodowcy stosują leki uspokajające w celu zminimalizowania ryzyka śmierci zwierząt i utrzymania wysokiej jakości mięsa, ponieważ mięso pochodzące od zestresowanych zwierząt jest bardzo twarde i pozbawione smaku. Najczęściej stosowanym jako lek uspokajający związkami jest AZN. Ze względu na powszechne stosowanie tych związków oraz często nieprzestrzeżenie okresu karencji, pozostałości tych leków mogą być obecne w żywności. Jak opisano powyżej, podawanie leków zwierzętom powinno się przerwać w odpowiednim czasie przed ubojem zwierząt, ponieważ spożywanie mięsa z pozostałościami leków podawanych zwierzętom jest niebezpieczne dla zdrowia konsumentów [93, 96, 99]. Dlatego bardzo ważne jest badanie zawartości pozostałości leków weterynaryjnych w pożywieniu, a ze względu na to, że ciągła ich kontrola jest niezbędna, laboratoria zmuszone są do opracowania czułych i wiarygodnych metod oznaczania tych związków.

Z uwagi na powyższe, drugi cel moich badań obejmował opracowanie nowej, precyzyjnej i dokładnej chromatograficznej metody oznaczania AZN oraz jego metabolitu AZL w próbkach tkanek mięsnych. W badaniach skupiono się na tym, aby nowa metodologia była możliwa do odtworzenia w każdym laboratorium wykonującym rutynowe analizy mięsa pod kątem zawartości pozostałości leków potencjalnie groźnych dla zdrowia konsumentów. Rozwijana metoda chromatograficzna miała być możliwa do odtworzenia w każdym laboratorium dysponującym podstawowym sprzętem analitycznym, wobec tego nie korzystano z wyrafinowanej aparatury oraz zadbano, aby przygotowanie próbki było jak najmniej czasochłonne oraz zawierało jak najmniej etapów.

## 6. Wyniki

Publikacja D1: **I. Kośka**, K. Purgat, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachophoresis*, *Molecules*, 26 (2021) 6931.

W literaturze dotąd nie została opisana metoda oznaczania Cpx oraz Ofx z wykorzystaniem CE z zateżaniem w kapilarze na drodze tpITP. Zateżanie próbek metodą tpITP, wykorzystywane jest do analizy próbek, które zawierają wysokie stężenie soli. Dzięki tej technice możliwe jest wprowadzenie do kapilary większej objętości próbki (nawet do 30% całkowitej pojemności kapilary) niż w trybie klasycznej kapilarnej elektroforezy strefowej (1–3% całkowitej pojemności kapilary). Izotachoforeza jest techniką, której charakterystyczną cechą jest to, że po osiągnięciu lokalnego układu równowagowego wszystkie jony analitów poruszają się z taką samą prędkością. Jednak ze względu na specyficzny układ elektrolitów przed i za strefą próbki, prędkość analitu zależy od ruchliwości jonu wiodącego i jego stężenia. Jon kończący natomiast, zapewnia wysokie natężenie pola i jest niezbędny do utrzymania analitu w paśmie, a zatem zapobiega jego dyfuzji. W opracowanej przeze mnie metodzie, dodawany do próbki w końcowym etapie jej przygotowania ACN działa jako kończący pseudojon, zapewniając pole o dużym natężeniu wymaganym do wzbudzenia ruchu lub przyspieszenia migracji analitów. Mechanizm tego typu zateżania przedstawiłam na schemacie na Rysunku 7. Technika tpITP sprawdza się z powodzeniem w zateżeniu analitów w próbkach rzeczywistych o wysokim zasoleniu [112].



**Rysunek 7. Zateżnienie na drodze tpITP.** Początkowo, próbka o wysokim stężeniu soli zawierająca modyfikator organiczny (ACN) wprowadzana jest hydrodynamicznie do kapilary wypełnionej BGE (EOF – przepływ elektroosmotyczny,  $\mu$  – ruchliwość elektroforetyczna). A). Po przyłożeniu napięcia jony soli poruszają się szybko w środowisku ACN, a następnie zwalniają na granicy strefa próbki/BGE. W obrębie próbki tworzone są dwie strefy o różnych wartościach natężenia pola elektrycznego, niskiej w soli i wysokiej w ACN. B) Anality, znajdujące się w acetonitrylowej strefie wysokiego natężenia pola elektrycznego są znacznie przyspieszane, a następnie ulegają układaniu w stos (spiętrzaniu), gdy osiągną strefę niskiego natężenia pola elektrycznego. C). Po spiętrzeniu anality przenikają do BGE, a następnie ulegają separacji zgodnie z zasadami CZE. Opracowano na podstawie [112].

CE jest doskonałym narzędziem analitycznym do oznaczania związków, które ze względu na swoją strukturę chemiczną mogą posiadać ładunek zależny od pH środowiska. Zdecydowałam się wykorzystać technikę CE ze względu na fakt, że jest bardzo przyjazna środowisku, ponieważ zużywa bardzo małe ilości rozpuszczalników i tym samym nie generuje toksycznych odpadów. Jednak ze względu na niską czułość stężeniową jaką charakteryzuje się CE (głównie z uwagi na niewielką objętość próbki wprowadzaną do kapilary oraz krótką drogę optyczną przy zastosowaniu detekcji UV-Vis) niezbędne było wprowadzenie etapu ekstrakcji do procedury przygotowania próbki. W badaniach do pracy D1 zdecydowałam się na wykorzystanie popularnej ekstrakcji ciecz-ciecz, ponieważ w badaniach żywności ważna jest

łatwość przygotowania próbki, aby możliwe było odtworzenie takiej metody w wielu laboratoriach. Proces ekstrakcji poprzedzało rozdrobnienie próbki na drodze homogenizacji, aby umożliwić wykonanie ekstrakcji z próbki mięsa. Podczas optymalizacji warunków ekstrakcji ciecz- ciecz skupiłam się na parametrach takich jak: pH środowiska, aby zapewnić brak ładunku na cząsteczkach FQLs, stosunek masy tkanki pobranej do homogenizacji do objętości buforu, rodzaj fazy donorowej, którą stanowił rozpuszczalnik organiczny, jego objętość, czas ekstrakcji oraz jej krotność. Dobór pH zarówno buforu do przygotowania próbki, jak i BGE jest związany z wartościami  $pK_a$  analitów.  $pK_{a1}$  Cpx wynosi 6,09, a  $pK_{a2}$  8,74 [10], dla Ofx natomiast wartości te wynoszą odpowiednio 5,97 oraz 9,28 [13]. Początkowo, umieściłam 0,2 g tkanki wątroby kurzej w 3 ml próbówce polipropylenowej z 2 ml 0,2 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,00 i tkankę homogenizowałam. Następnie mieszaninę wirowałam przy  $13680 \times g$  (12000 obr./min) przez 10 minut, aby oddzielić cząstki stałe i uzyskać klarowny roztwór próbki, po czym 400  $\mu$ l homogenatu przenosiłam do 2 ml próbówki typu Eppendorf. Do fazy donorowej dodałam 600  $\mu$ l fazy organicznej (mieszanina 2:1 dichlorometanu i ACN, v/v) i wytrząsałam przez 15 min przy 3000 obr./min w celu ekstrakcji analitów. W celu oddzielenia faz próbkę wirowałam przy  $13680 \times g$  (12000 obr./min) przez 5 minut. Następnie przeniosłam 600  $\mu$ l dolnej fazy, stanowiącej fazę akceptorową do innej próbówki Eppendorf i odparowałam do sucha. Proces ekstrakcji powtarzałam dwukrotnie dla każdej próbki w celu całkowitej ekstrakcji analitów. Zebrane fazy organiczne następnie połączyłam i odparowałam do sucha. Po odparowaniu pozostałość rozpuściłam w 50  $\mu$ l mieszaniny ACN i 0,01 mol/l NaOH (3:1, v/v) i poddałam analizie techniką CE.

Podczas optymalizacji parametrów elektroforetycznych dobrałam: rodzaj, stężenie oraz pH roztworu BGE, w taki sposób aby zapewnić analitom odpowiednie środowisko, w którym zyskują ładunek w cząsteczce w celu umożliwienia ich rozdzielania, objętość próbki wprowadzanej do kapilary, aby zapewnić jak najlepszą wydajność zatężania na drodze przejściowej pseudo-izotachorofezy, a końcowo, temperaturę oraz napięcie separacji. Funkcję BGE pełnił bufor fosforanowo-boranowy o stężeniu 0,1 mol/l oraz pH 8,40, składający się z 0,1 mol/l  $NaH_2PO_4$  oraz 0,1 mol/l  $Na_2B_4O_7$ . Zastosowałam hydrodynamiczne wprowadzenie próbki pod ciśnieniem 60 mbar przez 30 s. Próbki analizowałam w temperaturze 25 °C, a do rozdzielania zastosowałam napięcie 16 kV. Detekcja UV-Vis analitów następowała przy długości fali 288 nm dla obu FQLs.

Po zakończonej optymalizacji parametrów metody tj. przygotowania próbki oraz rozdzielania, procedurę poddałam walidacji na podstawie wytycznych przewodnika wydanego

przez Agencję Żywności i Leków (FDA) [113]. Wyzaczyłam w tym celu LOD i LOQ, wykonałam krzywe kalibracyjne, a także wyznaczyłam wewnątrzdniołą i międzydniołą precyzję oraz dokładność metody. Krzywe kalibracyjne, które wykonałam w zakresie stężeń od 2 do 10 nmol/g tkanki, wykazywały w takim przedziale stężeń liniowość. Równanie krzywej kalibracyjnej dla Cpx wyglądało następująco:  $y=(1,0816\pm 0,0223)x - (0,7933\pm 0,1484)$ , natomiast w przypadku Ofx:  $y=(5,1558\pm 0,1041)x - (1,6816\pm 0,6905)$ . LOD oraz LOQ wyznaczyłam metodą stosunku sygnału do szumu. LOD dla Cpx wynosiło 0,3 nmol/g, a dla Ofx 0,1 nmol/g, natomiast wartości LOQ wynosiły 0,8 nmol/g dla Cpx oraz 0,3 nmol/g dla Ofx. Opracowana metoda wykazuje bardzo zadowalające wartości zarówno wewnątrz jak i międzydniowej precyzji ( $\leq 11,8\%$ ) oraz dokładności (90%-105%), co jest bardzo ważne w kontekście potwierdzenia wiarygodności metody.

Kolejnym etapem badań, po optymalizacji parametrów oraz walidacji metody, na którym się skupiłam było zaimplementowanie jej do analizy próbek tkanek mięsnych takich jak wątróbka drobiowa, nerki oraz wątroba kaczki i indyka na zawartość Cpx i Ofx. W żadnej z próbek tkanek nie wykryłam śladów analitów za pomocą zaproponowanej metodologii. Może to świadczyć o tym, że stężenie tych związków jest poniżej LOD metody lub anality nie są obecne w badanym mięsie. W drugim przypadku byłaby to niezwykle pozytywna wiadomość, ponieważ próbki mięsa pochodziły od polskich hodowców, a w Polsce stosowanie FQLs jako dodatków paszowych jest zabronione. Jest to budujące stwierdzenie, ponieważ wskazuje, że lokalni producenci mięsa przestrzegają tego zakazu i nie dodają do pasz antybiotyków z tej grupy.

## Article

# Simultaneous Determination of Ciprofloxacin and Ofloxacin in Animal Tissues with the Use of Capillary Electrophoresis with Transient Pseudo-Isotachophoresis

Izabella Końska<sup>1,2,\*</sup>, Krystian Purgat<sup>1</sup>, Rafał Głowacki<sup>1</sup>  and Paweł Kubalczyk<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163, 90-236 Lodz, Poland; krystian.purgat@edu.uni.lodz.pl (K.P.); rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl (R.G.)  
<sup>2</sup> Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland  
\* Correspondence: izabella.koska@edu.uni.lodz.pl (I.K.); pawel.kubalczyk@chemia.uni.lodz.pl (P.K.); Tel.: +48-4263-558-44 (P.K.)

**Abstract:** We have developed a precise and accurate method for the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues. Our method utilizes capillary electrophoresis with a transient pseudo-isotachophoresis mechanism and liquid–liquid extraction during sample preparation. For our experiment, a meat tissue sample was homogenized in pH 7.00 phosphate buffer at a ratio of 1:10 (tissue mass: buffer volume; g/mL). The extraction of each sample was carried out twice for 15 min with 600 µL of a mixture of dichloromethane and acetonitrile at a 2:1 volume ratio. We then conducted the electrophoretic separation at a voltage of 16 kV and a temperature of 25 °C using a background electrolyte of 0.1 mol/L phosphate–borate (pH 8.40). We used the UV detection at 288 nm. The experimentally determined LOQs for ciprofloxacin and ofloxacin were 0.27 ppm (0.8 nmol/g tissue) and 0.11 ppm (0.3 nmol/g tissue), respectively. The calibration curves exhibited linearity over the tested concentration range of 2 to 10 nmol/g tissue for both analytes. The relative standard deviation of the determination did not exceed 15%, and the recovery was in the range of 85–115%. We used the method to analyze various meat tissues for their ciprofloxacin and ofloxacin contents.

**Keywords:** capillary electrophoresis; transient pseudo-isotachophoresis; extraction; antibiotics; ciprofloxacin; ofloxacin



**Citation:** Końska, I.; Purgat, K.; Głowacki, R.; Kubalczyk, P. Simultaneous Determination of Ciprofloxacin and Ofloxacin in Animal Tissues with the Use of Capillary Electrophoresis with Transient Pseudo-Isotachophoresis. *Molecules* **2021**, *26*, 6931. <https://doi.org/10.3390/molecules26226931>

Academic Editors: Man He and Nuno Neng

Received: 19 October 2021  
Accepted: 15 November 2021  
Published: 17 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Fluoroquinolones (FQLs) are derivatives of nalidixic acid and belong to a class of synthetic antibiotics. These compounds are commonly used in treating respiratory diseases, urinary tract infections, and gastric disorders. FQLs possess powerful bactericidal properties. They inhibit the transcription and replication of bacterial DNA by cutting bacterial DNA in the gyrase DNA and type IV topoisomerase enzymatic complexes [1,2]. This bactericidal activity is observed against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. In addition, they show excellent bioavailability due to rapid absorption following oral administration and a broad spectrum of activity [1,3]. FQLs are used not only for treatment, but also for the prevention of infectious diseases in humans and animals. Our approach addresses the risk of overprescribing this group of antibiotics and releasing excessive amounts of these compounds into the environment through urine and feces. Excessive consumption of FQLs can cause many problems and lead to allergic reactions, diseases, and even cancer. Another problem related to the use of antibiotics is the effect of antibiotic resistance due to the formation of antibiotic-resistant bacteria. This is one of the most serious problems today [3,4].

Therefore, the development of new, sensitive and selective analytical methods for the determination of FQL residues in food and the environment is of the utmost importance [5,6]. These actions should enable the optimal dose of the relevant drugs to be judged, thus minimizing treatment time in order to prevent the negative effects of antibiotic use [2].

This paper describes how we developed our method for detecting ciprofloxacin (Cpx) and ofloxacin (Ofx) in animal tissues. Several HPLC-UV methods enable the determination of these compounds in various matrices, e.g., in human plasma and urine [2,7]. Methods based on HPLC-MS for FQLs' determination in wastewater [8,9] or animal products [10,11] are also described in the literature. We also detail CE methods that allow the identification of some FQLs in human urine [12] and animal products [13]. In this work, we decided to use CE due to its advantages over HPLC, such as high efficiency for separation, a short analysis time, and, importantly, lower consumption of reagents and samples. Such a development is desirable from both an environmental standpoint and in the interests of green chemistry. Due to the limitations of this technique, i.e., a relatively high detection limit compared to other, more sophisticated techniques, some methods of sample purification and concentration were applied [6,13–17].

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Optimization of Electrophoretic Conditions

#### 2.1.1. Optimization of BGE Concentration and pH of BGE

The first optimized parameter was the BGE concentration. We investigated the influence of the BGE concentration on the height of the analytical signals, peak size repeatability, and resolution. To test these correlations, we selected the following concentrations of phosphate–borate buffer (pH 8.40): 0.01 mol/L, 0.02 mol/L, 0.05 mol/L, 0.1 mol/L, 0.15 mol/L, 0.175 mol/L, and 0.2 mol/L. In the case of BGE concentrations in the range of 0.01–0.05 mol/L, no signals from the analytes appeared. Since 0.1 mol/L phosphate–borate buffer demonstrated the highest signals, we selected this concentration of BGE for further studies. Subsequently, we checked the effect of pH of BGE on the peak height, size repeatability, and resolution. We studied the following pHs of the 0.1 mol/L phosphate–borate buffer: 8.00, 8.20, 8.40, 8.60, and 8.80. The peaks from Cpx and Ofx did not separate satisfactorily when the buffers were at pH 8.00 and 8.20, while from pH 8.40 upwards, these peaks were isolated to the baseline. In Figure S1, one can observe that the highest analytical signals were obtained for pH 8.40. Therefore, we selected as BGE for further experiments the phosphate–borate buffer with a concentration of 0.1 mol/L consisting of 0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  adjusted to pH 8.40.

#### 2.1.2. Selection of the Sample Volume Introduced to the Capillary

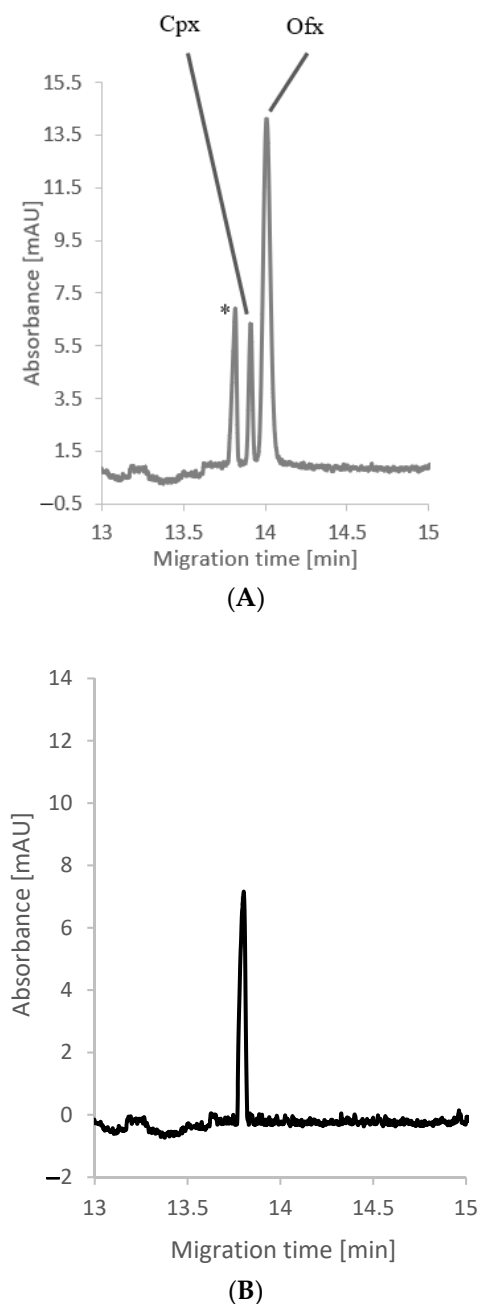
We investigated the influence of the sample volume introduced into the capillary on the height of the analytical signal. For this, we introduced the sample into the capillary hydrodynamically by alternating the amount of pressure and the length of time applied. We introduced the sample for 10 s at a pressure of 5 mbar, then at 10 mbar, 20 mbar, and 30 mbar, and a pressure of 10 mbar, 20 mbar, 30 mbar for 20 s, and 60 mbar for 30 s. The introduction of a larger sample volume probably overloaded the capillary because it resulted in an unstable current. The highest analytical signals were observed in the case of sample introduction by applying a pressure of 60 mbar for 30 s (217 nL, 7.6% total volume of capillary). We introduced the sample into the capillary using this method during further experiments.

#### 2.1.3. Optimization of Capillary Temperature and Separation Voltage

Having identified that, among the temperatures between 20 and 27 °C, the highest signals occur at 25 °C, we chose a voltage of 16 kV since the sample stacking method relates to the mechanism of transient pseudo-isotachopheresis. This value did not cause excessive Joule heating. It ensured the signals were satisfactory, but above all, the Cpx and Ofx peaks separated to the baseline within 15 min, as shown in Figure 1A. It is commonly known that meat tissue has a complex matrix containing cells, minerals, salts, etc. Since SDME is not entirely a specific method, other substances besides analytes were extracted and visible on the electropherogram. An unknown peak that migrates at 13.8 min appears in Figure 1B. It



is related to the substance(s) present in the sample and, thankfully, does not interfere with the analytes.



**Figure 1.** (A) Representative electropherogram obtained for meat tissue spiked with Cpx and Ofx (final concentration 1.4 ppm (4 nmol/g tissue)). \* The peak corresponds to the non-identified component of the sample. (B) Representative electropherogram obtained for blank meat tissue.

#### 2.1.4. Sample Stacking by Transient Pseudo-Isotachophoresis

A notable limitation of the CE separation methods compared to the HPLC is that the concentration sensitivity is inferior when used with current commercial instrumentation equipped with UV-Vis absorption detectors. In our experiment, we applied transient pseudo-isotachophoresis to achieve sample concentration directly on the capillary before the separation step took place. The meat tissue sample evaporated to dryness after homogenization and extraction. We dissolved it in a mixture of acetonitrile and 0.01 mol/L NaOH (1:3 *v/v*) and then hydrodynamically injected it into the capillary as a long plug. Once we turned on the voltage, small cations (sodium or others) made rapid movement

due to high mobility and the presence of low conductivity acetonitrile, slowing down at the interface of the BGE. Because of the increased field in that area vacated by the small cations, analytes (Ofx, Cpx) in the region move fast, while those in front or close to the inorganic cations slow down and remain behind, giving rise to stacking. The rationale for labelling this method of stacking transient pseudo-isotachopheresis is that small inorganic cations act as leading ions while acetonitrile operates as a pseudo-terminator.

## 2.2. Optimization of Extraction Procedure

### 2.2.1. Selection of Buffer pH for Sample Preparation

The choice of pH for the homogenization buffer was an invaluable parameter in the development of this sample preparation procedure, as the pH of the sample at this stage determines the equilibrium state of the extraction and therefore the extraction's efficiency. During the selection of the sample pH for extraction, knowing the pKa of the analytes is valuable. The pKa values of Cpx are 6.00 for the carboxylic acid group and 8.80 due to the nitrogen on the piperazinyl ring, while the pKa values of Ofx are 6.10 and 8.28, respectively [13]. Considering the pKa values mentioned above, the correlation between the height of the analytical signals and the pH of 0.2 mol/L phosphate buffer was tested in the range from 5.00 to 9.00. As evident in Figure S2, the level of the signals increases until the sample pH of 7.00, when the peak heights reach their maximum values and then decrease. Therefore, we chose a 0.2 mol/L phosphate buffer that we adjusted to pH 7.00 by mixing 0.2 mol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  with 0.2 mol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  for the sample preparation.

### 2.2.2. Tissue to Buffer Ratio

The following ratios of animal tissue mass to buffer volume were checked for homogenization: 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, and 1:15 (g/mL). In Figure S3, the peak heights increased with rising sample dilution until a 1:10 (g/mL) dilution. Further dilution of the sample did not increase the extraction efficiency. Thus, we selected the 1:10 (g/mL) ratio of tissue mass to buffer volume.

### 2.2.3. Selection of Organic Solvent

After optimizing the homogenization parameters, we checked the influence of the type of organic phase on the extraction efficiency. While selecting organic solvents, we carefully chose those immiscible with the donor phase to ensure the phases were separated satisfactorily following the extraction process. Therefore, following solvents were investigated: dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, hexane, and dichloromethane mixtures with chloroform, ethyl acetate, and acetonitrile in the following ratios: 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, and 1:4 (*v/v*). The dichloromethane and acetonitrile mixture gave the highest peaks at a volumetric ratio of 2:1. Therefore, this organic mixture was used as acceptor phase to perform the Cpx and Ofx extraction in this experiment.

### 2.2.4. Selection of Organic Solvent Volume

Subsequently, we checked the influence of organic phase volume on the extraction efficiency. For this purpose, the extraction took place with various portions of the organic solvent, i.e., 200  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{L}$ , 800  $\mu\text{L}$ , and 1000  $\mu\text{L}$ . We observed no increase in the extraction efficiency for volumes greater than 600  $\mu\text{L}$ , as per Figure S4. Hence, we extracted samples with a 600  $\mu\text{L}$  portion of the organic phase in further studies.

### 2.2.5. Optimization of Extraction Time

Another optimized parameter was extraction time, which we tested in the range from 5 to 60 min. Figure S5 shows that there is no increase in peak height and no improvement in repeatability for extraction times longer than 15 min. This lull indicates that the equilibrium between the sample and organic phase takes place within 15 min, so we chose this as the extraction time.

### 2.2.6. The Number of Extractions

We checked whether multiple extractions of the same sample would affect the extraction efficiency. To test this, we performed extractions once, twice, and thrice. However, we achieved reliable repeatability when we extracted the same tissue sample twice (Figure S6). Therefore, we performed the sample extraction twice.

### 2.3. Calibration and Other Validation Data

The developed method for simultaneous Ofx and Cpx determination in meat tissues was validated in accordance with the criteria set for the analysis of biological samples [18]. We determined the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) experimentally and then chose an analyte concentration for which the signal is three times higher than the baseline noise as the LOD. Likewise, we identified the LOQ as an analyte concentration for which the signal is nine times higher than the baseline noise. The LOD value (0.15 mAU) evaluated for Cpx was 99.4 ppb (0.3 nmol/g) and 36.1 ppb (0.1 nmol/g) for Ofx. The LOQ values (0.45 mAU) were 0.27 ppm (0.8 nmol/g) for Cpx and 0.11 ppm (0.3 nmol/g) for Ofx, respectively. The LOQs of the developed method are lower than for CE-DAD procedure [19] (for Cpx 0.098 mg/kg (0.3  $\mu$ mol/g) and for Ofx 0.090 mg/kg (0.25  $\mu$ mol/g)), similar to HPLC-FLD procedure [20] (for Ofx LOQ is: 40  $\mu$ g/kg (0.1 nmol/g)) and for LC-MS/MS procedure [21] (for Cpx LOQ is 125  $\mu$ g/kg (0.38 nmol/g)), but higher than for LC-MS/MS methods [22] (Cpx 22 ng/g, and Ofx 24 ng/g (0.07 nmol/g)) and [23] (Cpx and Ofx 5  $\mu$ g/kg (0.015 nmol/g)). We constructed five-point calibration curves for Cpx and Ofx in meat tissues in the concentration range from 2 to 10 nmol/g tissue. Each series was performed in triplicate. The obtained calibration curves (Figure S7) showed linearity in the tested concentration range. The linear correlation coefficient square ( $R^2$ ) for Cpx and Ofx was 0.9988 and 0.9987, respectively. The equation of the calibration curve for Cpx was  $y = (1.0816 \pm 0.0223)x - (0.7933 \pm 0.1484)$ , and for Ofx  $y = (5.1558 \pm 0.1041)x - (1.6816 \pm 0.6905)$ . The RSD of the Cpx calibration curve points ranged from 10.9 to 5.2%, and for Ofx, the recovery ranged from 96.4% to 101.9%. These values are consistent with the analysis criteria for biological samples [19]. In the next stage, we examined intraday and interday precision. For this purpose, we selected three concentrations from the range of the calibration curve. The meat tissue samples were prepared for the calibration curve and analyzed. We selected the first concentration (3 nmol/g) from the beginning of the calibration curve range, the next concentration (5 nmol/g) represented the center of the calibration curve, and the final concentration was at the end of the calibration curve (9 nmol/g). Both the precision (RSDs  $\leq$  11.8%) and the accuracy (in the range of 85–115%) are at a satisfactory level. Therefore, in our opinion, our method for the determination of Cpx and Ofx can be used in the routine analysis of meat tissues. All the validation data are available in Table 1.

Table 1. Validation data.

Added * [nmol/g Tissue]	Intra-Day			Inter-Day		
	Found $\pm$ SD [nmol/g Tissue]	RSD [%]	Accuracy [%]	Found $\pm$ SD [nmol/g Tissue]	RSD [%]	Accuracy [%]
<b>Ciprofloxacin</b>						
3.00	3.14 $\pm$ 0.37	11.79	104.57	3.14 $\pm$ 0.33	10.63	104.57
5.00	4.92 $\pm$ 0.56	11.32	98.49	5.17 $\pm$ 0.40	7.79	103.42
9.00	8.87 $\pm$ 0.09	1.04	98.54	8.62 $\pm$ 0.53	6.10	95.81
<b>Ofloxacin</b>						
3.00	2.71 $\pm$ 0.18	6.56	90.39	2.72 $\pm$ 0.31	11.33	90.61
5.00	4.74 $\pm$ 0.53	11.15	94.71	4.80 $\pm$ 0.46	9.57	96.00
9.00	8.66 $\pm$ 0.97	11.15	96.22	8.21 $\pm$ 0.79	9.60	91.19

\* n = 3.

The procedure for tissue sample preparation described in this paper is simple and not time consuming. The overall time needed to prepare and analyze the meat sample for Cpx and Ofx content equals 55 min (during this time, seven samples can be prepared simultaneously due to the seven places in the vortex). This analysis time is shorter in the magnetic solid-phase extraction HPLC-MS [24] (72 min), single drop microextraction CE [12] (61 min), and excitation–emission matrix with an alternating normalization-weighted error (EEM-ANWE) [25] (155 min) procedure.

It is commonly known that the use of an internal standard can improve the method repeatability. The best choice for internal standard is a substance similar to an analyte in terms of its physicochemical, electrophoretic, and spectroscopic properties (e.g., isotopically labelled analytes). It must be absent from a sample at the same time. Unfortunately, we do not have access to these compounds. On the other hand, our results show that the method has acceptable repeatability with RSDs < 12%. Therefore, all the experiments were successful without the use of the internal standard.

#### 2.4. Determination of Cpx and Ofx in Meat Tissue

Once we developed and validated our method, we used it to identify Cpx and Ofx in meat tissues such as chicken liver, kidneys, and duck and turkey liver. No traces of analytes were detected in any of tissue samples. This may indicate that the concentration of these compounds is below the LOD of the method, or these compounds are not present in the tested meat. This would be extremely positive news because, in Poland, the use of fluoroquinolones as feed additives is prohibited, so this is an encouraging finding, as it would indicate that local meat producers are complying with this regulation.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Apparatus

We performed all our experiments with an apparatus for the CE Agilent 7100 CE System (Waldbronn, Germany) coupled with an absorbance diode-array detector. This apparatus is equipped with an automatic injector. The fused-silica capillary we used (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) is characterized by effective length of 56 cm, total length of 64.5 cm and inner diameter of 75  $\mu\text{m}$ . We attributed the peaks to the analytes by comparing the spectra and the migration times on the electropherograms of the standard and biological samples. We used Agilent ChemStation software for quantitative analysis and to measure the height and area of the peaks. We used a pH-meter (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) to adjust the pH of the solutions and thermostat (Grant, UK) to evaporate the organic solvent. Finally, we utilized a Millipore Milli-Q-RG System (Waterford, Ireland) to deionize the water.

#### 3.2. Chemicals

The standards of analytes, i.e., Cpx ( $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$ ) and Ofx ( $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ ) were sourced from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). We purchased sodium tetraborate decahydrate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) from Sigma (Steinheim, Germany) and boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), and dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ) and sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) were from POCH (Gliwice, Poland). Hexane was obtained from Lab-Scan (Dublin, Ireland). Last, we acquired chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), ethyl acetate ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), and toluene ( $\text{C}_7\text{H}_8$ ) from Chempur (Piekary Śląskie, Poland).

#### 3.3. Capillary Preconditioning

The new capillary was conditioned with 1 mol/L NaOH solution for 20 min, followed by 20 min with 0.1 mol/L NaOH solution, 2 min with water, and 30 min with background electrolyte (BGE). Every morning, the capillary was rinsed for 5 min with 1 mol/L NaOH solution, 20 min with 0.1 mol/L NaOH solution, 2 min with water, and 30 min with BGE

solution. After finishing work, we rinsed the capillary with water for 20 min and then left the capillary ends overnight in vials with water.

### 3.4. Electrophoretic Conditions

Sample concentration by transient pseudo-isotachopheresis, also called acetonitrile-salts stacking, was invented and introduced by Shihabi [26–28] for the analysis of samples that themselves contain a high concentration of salts. A larger injection volume of a sample (up to 30% of capillary capacity) than in the classical capillary zone electrophoresis mode (1–3% of capillary capacity) is possible with this technique. In isotachopheresis, the crucial feature is that all analytes move at the same velocity when reaching a steady state. However, the analyte speed depends on the mobility of the leading ion and its concentration. A terminating ion, which determines the high field strength, is essential to keep the analyte in the band and prevent its diffusion. Thus, acetonitrile functions as a terminating pseudo-ion by supplying the high field strength required to push or speed up the analytes' migration without being an ion itself [15]. Transient pseudo-isotachopheresis works successfully as an analytes concentration technique for determining several compounds [29–33] in genuine samples of high salinity.

We used 0.1 mol/L, pH 8.40 phosphate–borate buffer as the BGE (0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ). We used hydrodynamic injection of the sample at 60 mbar for 30 s. The samples were analyzed at a temperature of 25 °C, while the applied voltage for separation was 16 kV. We performed UV-Vis detection at a wavelength of 288 nm for both FQLs.

### 3.5. Sample Collection and Preparation

We purchased animal tissues (liver, kidneys) in local stores, then portioned and stored them at a reduced temperature (−20 °C). We placed 0.2 g of tissue in a 3 mL polypropylene tube with 2 mL of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.00) and homogenized. This mixture was centrifuged at  $13,680 \times g$  (12,000 rpm) for 10 min and 400  $\mu\text{L}$  of the homogenate was transferred to a 2 mL Eppendorf tube. We added 600  $\mu\text{L}$  of the organic phase (2:1 mixture of dichloromethane and acetonitrile) to the homogenate and shook it for 15 min at 3000 rpm. After extraction, we centrifuged the sample at  $13,680 \times g$  (12,000 rpm) for 5 min. Next, we transferred 600  $\mu\text{L}$  of the organic solvent (lower phase) to another Eppendorf tube and evaporated to dryness. We repeated the extraction process twice for each sample. After evaporation, we dissolved the residue in 50  $\mu\text{L}$  of the mixture of acetonitrile and 0.01 mol/L NaOH (3:1, *v/v*) and analyzed by CE.

### 3.6. Calibration of the Method

Stock solutions of each analyte, which were then used to prepare the calibration solutions, were prepared at a concentration of 3  $\mu\text{mol/mL}$  in 0.1 mol/L HCl. We fixed three series of Cpx and Ofx solutions with concentrations in the range of 2–10 nmol/g tissue for calibration. These solutions were prepared according to the following procedure: hen's liver was homogenized with 0.2 mol/L, pH 7.00 phosphate buffer, at a ratio of 1:10 (g/mL) in a 3 mL polypropylene tube. The homogenate was centrifuged at  $13,680 \times g$  (12,000 rpm) for 10 min, while 400  $\mu\text{L}$  was transferred to the Eppendorf tube. Then, increasing amounts of the standard working solutions were added to the homogenate to obtain concentrations: 2 nmol/g tissue, 4 nmol/g tissue, 6 nmol/g tissue, 8 nmol/g tissue, and 10 nmol/g tissue. Next, 600  $\mu\text{L}$  of a mixture of dichloromethane and acetonitrile in the volume ratio 2:1 was added, the tube was vigorously shaken at 3000 rpm for 15 min, and centrifuged at  $13,680 \times g$  (12,000 rpm) for 5 min. After the phases' separation, 600  $\mu\text{L}$  of the organic phase was transferred to the Eppendorf tube and evaporated to dryness. This extraction procedure was repeated twice for each sample. After evaporation, the residue was dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of acetonitrile and 0.01 mol/L NaOH (3:1, *v/v*) and analyzed. After the experiments, we plotted the peak areas of Cpx and Ofx versus corresponding concentrations and fitted the curves using least-squares linear regression analysis.

#### 4. Conclusions

We have developed a quick, easy, and cost-effective analytical procedure for identifying Cpx and Ofx in animal meat tissues. We developed our method based on sample clean up and analytes concentration by duplicate liquid–liquid sample extraction, online sample stacking by transient pseudo-isotachopheresis, capillary electrophoretic separation, and UV-Vis detection. The sample preparation procedure compares favorably against other methods of determining these compounds in animal tissues both in time saved and the efficiency of analysis. Our procedure is quick and easy to perform. In addition, our model produces high sensitivity and precision as well as good linearity. Considering all the advantages of our method, we believe it can usefully serve in the routine analysis of meat for Cpx and Ofx content. This effort is essential to avoid consuming these compounds with food.

**Supplementary Materials:** The following are available online, Figure S1: The relationship between the peak height and the pH of the background electrolyte, Figure S2: The relationship between the peak height and the pH of the buffer for sample preparation, Figure S3: The relationship between the peak height and the ratio of tissue to 0.2 mol/L phosphate buffer, Figure S4: The relationship between the peak height and the volume of organic phase, Figure S5: The relationship between the peak height and the time of extraction, Figure S6: The relationship between the peak height and the times of extraction, Figure S7: Calibration curves.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.K., P.K.; Methodology, I.K., P.K.; Validation, Formal Analysis, Data Curation, I.K.; Writing—Original Draft Preparation, I.K., P.K.; Writing—Review and Editing, I.K., K.P., R.G., P.K.; Visualization, I.K., K.P.; Supervision, P.K., R.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Lodz (protocol code 8/KBBN-UL/I/2020–2021).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** CE data are available from the authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sample Availability:** Meat tissue samples are not available from the authors.

#### References

1. Mohamed Derayea, S.; Ahmed Omar, M.; Abdelkhalik Hammad, M.; Farag Hassan, Y.; Badr El-Din, K.M. Augmented spectrofluorimetric determination of certain fluoroquinolones via micellar—Metal complex connection: Application to pharmaceuticals and biological fluids. *Microchem. J.* **2021**, *160*, 105717. [[CrossRef](#)]
2. Yıldırım, S.; Karakoç, H.N.; Yaşar, A.; Köksal, İ. Determination of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin and gemifloxacin in urine and plasma by HPLC–FLD–DAD using pentafluorophenyl core–shell column: Application to drug monitoring. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34*, e4925. [[CrossRef](#)]
3. Guan, S.; Wu, H.; Yang, L.; Wang, Z.; Wu, J. Use of a magnetic covalent organic framework material with a large specific surface area as an effective adsorbent for the extraction and determination of six fluoroquinolone antibiotics by HPLC in milk sample. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43*, 3775–3784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wang, Z.; Wang, X.Y.; Tian, H.; Wei, Q.H.; Liu, B.S.; Bao, G.M.; Liao, M.L.; Peng, J.L.; Huang, X.Q.; Wang, L.Q. High through-put determination of 28 veterinary antibiotic residues in swine wastewater by one-step dispersive solid phase extraction sample cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **2019**, *230*, 337–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tian, H.; Liu, T.; Mu, G.; Chen, F.; He, M.; You, S.; Yang, M.; Li, Y.; Zhang, F. Rapid and sensitive determination of trace fluoroquinolone antibiotics in milk by molecularly imprinted polymer-coated stainless steel sheet electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* **2020**, *219*, 121282. [[CrossRef](#)]
6. Yu, L.; Yue, M.E.; Xu, J.; Jiang, T.F. Determination of fluoroquinolones in milk, honey and water samples by salting out-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent combined with MECC. *Food Chem.* **2020**, *332*, 127371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Cairoli, S.; Simeoli, R.; Tarchi, M.; Dionisi, M.; Vitale, A.; Perioli, L.; Dionisi-Vici, C.; Goffredo, B.M. A new HPLC–DAD method for contemporary quantification of 10 antibiotics for therapeutic drug monitoring of critically ill pediatric patients. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34*, e4880. [CrossRef]
8. Maia, A.S.; Paíga, P.; Delerue-Matos, C.; Castro, P.M.L.; Tiritan, M.E. Quantification of fluoroquinolones in wastewaters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* **2020**, *259*, 113927. [CrossRef]
9. Ziarrusta, H.; Val, N.; Dominguez, H.; Mijangos, L.; Prieto, A.; Usobiaga, A.; Etxebarria, N.; Zuloaga, O.; Olivares, M. Determination of fluoroquinolones in fish tissues, biological fluids, and environmental waters by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 6359–6370. [CrossRef]
10. Magalhães, D.; Freitas, A.; Sofia Vila Pouca, A.; Barbosa, J.; Ramos, F. The use of ultra-high-pressure-liquid-chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry as a confirmatory method in drug residue analysis: Application to the determination of antibiotics in piglet liver. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2020**, *1153*, 122264. [CrossRef]
11. Li, J.; Ren, X.; Diao, Y.; Chen, Y.; Wang, Q.; Jin, W.; Zhou, P.; Fan, Q.; Zhang, Y.; Liu, H. Multiclass analysis of 25 veterinary drugs in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *257*, 259–264. [CrossRef] [PubMed]
12. Gao, W.; Chen, G.; Chen, Y.; Zhang, X.; Yin, Y.; Hu, Z. Application of single drop liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 291–295. [CrossRef] [PubMed]
13. Vera-Candiotti, L.; Teglia, C.M.; Cámara, M.S. Dispersive liquid–liquid microextraction of quinolones in porcine blood: Optimization of extraction procedure and CE separation using experimental design. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 2670–2677. [CrossRef] [PubMed]
14. Baciú, T.; Borrull, F.; Neusüß, C.; Aguilar, C.; Calull, M. Capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction using magnetic particles as new adsorbents for the determination of drugs of abuse in human urine. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1232–1244. [CrossRef]
15. Kubalczyk, P.; Bald, E. Methods of analyte concentration in a capillary. *Springer Ser. Chem. Phys.* **2013**, *105*, 215–235.
16. Zhang, H.; Deng, Y.; Zhao, M.Z.; Zhou, Y.L.; Zhang, X.X. Highly-sensitive detection of eight typical fluoroquinolone antibiotics by capillary electrophoresis-mass spectroscopy coupled with immunoaffinity extraction. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 4063–4071. [CrossRef]
17. Martínez-Perez-Cejuela, H.; Benavente, F.; Simo-Alfonso, E.F.; Herrero-Martínez, J.M. A hybrid nano-MOF/polymer material for trace analysis of fluoroquinolones in complex matrices at microscale by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis. *Talanta* **2021**, *233*, 122529. [CrossRef]
18. FDA, Cder, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceuticals Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceuticals Contains Nonbinding Recommendations. 2018. Available online: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm#orhttp://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm> (accessed on 8 April 2020).
19. Sun, H.-W.; He, P.; Lv, Y.-K.; Liang, S.-X. Effective separation and simultaneous determination of seven fluoroquinolones by capillary electrophoresis with diode-array detector. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *852*, 145–151. [CrossRef] [PubMed]
20. Timofeeva, I.; Stepanova, K.; Shishov, A.; Nugbienyo, L.; Moskvina, L.; Bulatov, A. Fluoroquinolones extraction from meat samples based on deep eutectic solvent formation. *J. Food Compos. Anal.* **2020**, *93*, 103589. [CrossRef]
21. Van Hoof, N.; De Wasch, K.; Okerman, L.; Reybroeck, W.; Poelmans, S.; Noppe, H.; De Brabander, H. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *529*, 265–272. [CrossRef]
22. Biselli, S.; Schwalb, U.; Meyer, A.; Hartig, L. A multi-class, multi-analyte method for routine analysis of 84 veterinary drugs in chicken muscle using simple extraction and LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A* **2013**, *30*, 921–939. [CrossRef] [PubMed]
23. Ji, X.; Xu, Y.; Wang, J.; Lyu, W.; Li, R.; Tan, S.; Xiao, Y.; Tang, B.; Yang, H.; Qian, M. Multiresidue determination of antibiotics in ready-to-eat duck eggs marketed through e-commerce stores in China and subsequent assessment of dietary risks to consumers. *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 2145–2162. [CrossRef]
24. Wei, D.; Guo, M. Facile preparation of magnetic graphene oxide/nanoscale zerovalent iron adsorbent for magnetic solid-phase extraction of ultra-trace quinolones in milk samples. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43*, 3093–3102. [CrossRef]
25. Ouyang, Y.-Z.; Wu, H.-L.; Fang, H.; Wang, T.; Sun, X.-D.; Chang, Y.-Y.; Ding, Y.-J.; Yu, R.-Q. Rapid and simultaneous determination of three fluoroquinolones in animal-derived foods using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *224*, 117458. [CrossRef]
26. Shihabi, Z.K. Stacking and discontinuous buffers in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2872–2878. [CrossRef]
27. Shihabi, Z.K.; Hinsdale, M.E.; Cheng, C.P. Analysis of glutathione by capillary electrophoresis based on sample stacking. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2351–2354. [CrossRef]
28. Shihabi, Z.K. Transient pseudo-isotachopheresis for sample concentration in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1612–1617. [CrossRef]
29. Chen, Y.; Xu, L.; Zhang, L.; Chen, G. Separation and determination of peptide hormones by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence coupled with transient pseudo-isotachopheresis preconcentration. *Anal. Biochem.* **2008**, *380*, 297–302. [CrossRef] [PubMed]

30. Kubalczyk, P.; Bald, E. Analysis of orange juice for total cysteine and glutathione content by CZE with UV-absorption detection. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2280–2283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kubalczyk, P.; Bald, E. Method for determination of total cysteamine in human plasma by high performance capillary electrophoresis with acetonitrile stacking. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 3636–3640. [[CrossRef](#)]
32. Botello, I.; Borrull, F.; Calull, M.; Aguilar, C. Simultaneous determination of weakly ionizable analytes in urine and plasma samples by transient pseudo-isotachopheresis in capillary zone electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 527–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yu Kong Feng, H.; Yang, G.; Kong, L.; Hou, L.; Li, H.; Gao, M. Stacking and Detecting Blood Glutathione as a Cation under Strong Acidic Conditions by Capillary Electrophoresis using Acetonitrile-salt Stacking Method. *J. Anal. Chem.* **2020**, *75*, 225–230. [[CrossRef](#)]



Publikacja D2: **I. Kośka**, K. Purgat, P. Kubalczyk, *Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine*, Scientific Reports, 12 (2022) 7729.

Badania do drugiej publikacji będącej podstawą niniejszej rozprawy, opierały się na opracowaniu elektroforetycznej metody oznaczania Cpx oraz Ofx z wykorzystaniem przejściowej pseudo-izotachoforezy w próbkach moczu. Postanowiłam zmienić matrycę próbki na mocz człowieka, ponieważ ludzie jedzący mięso narażeni są na przyjmowanie antybiotyków wraz z pokarmem, a następnie mogą wydalać pozostałości tych związków do środowiska wraz z moczem i/lub kałem. W zależności od stanu i pracy narządów około 40 – 50% dawki Cpx podanej doustnie wydalane jest z moczem w postaci niezmienionej, a całkowite jej usunięcie z organizmu następuje w ciągu 24 godzin po podaniu [114]. W związku z tym postanowiłam opracować metodę, która byłaby użyteczna do badań, które by to wykazały lub odrzuciły. Choć metoda z pozoru wydaje się podobna do opisanej w pracy D1, to ze względu na zmianę matrycy próbki, wymagała ponownego opracowania procedury przygotowania próbki. Mocz jest bardzo skomplikowaną matrycą wodną, zawierającą bardzo zróżnicowane stężenia związków organicznych, soli nieorganicznych oraz śladowe ilości biomakromolekuł. Częsteczki białkowe wykazują zdolność adsorbowania się do ściany kapilary, co prowadzi do częściowej modyfikacji ściany wewnętrznej kapilary, a w konsekwencji może powodować zmiany w zdolnościach separacyjnych [115]. Zawartość soli nieorganicznych znacząco zmienia przewodnictwo próbki i może zmieniać zdolności rozdzielcze w CE, w związku z tym niezbędna była również nieznaczna modyfikacja warunków separacji.

Sprawdziłam, które parametry przygotowania próbki mogą pozostać takie jak w poprzednio opracowanej metodzie, a które wymagają modyfikacji. W związku z tym wykonałam optymalizację: pH buforu zapewniającego odpowiednie środowisko do ekstrakcji, stosunek objętości buforu do objętości moczu, rodzaju oraz objętości fazy akceptorowej użytej do ekstrakcji, czasu oraz krotności ekstrakcji, a także temperatury odparowania próbki oraz rodzaju substancji, w której najlepiej rozpuścić pozostałość po odparowaniu. Ze względu na to, że w badaniach wykorzystywałam próbki pochodzące od ludzi, niezbędne było uzyskanie pozwolenia od Komisji ds. Bioetyki na Uniwersytecie Łódzkim. Wszystkie eksperymenty przeprowadziłam zatem zgodnie z Uchwałą Komisji nr 8/KBBN UŁ/I/2020–2021. próbki ludzkiego moczu uzyskałam od pozornie zdrowych ochotników w wieku 20-50 lat. próbki te wirowałam przez 5 minut przy 12000 obr./min, następnie roztwór supernatantu zebrałam do

próbki polipropylenowej i przechowywałam w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ostatecznie, przygotowanie próbki wyglądało następująco:  $268\text{ }\mu\text{l}$  ludzkiego moczu z  $0,06\text{ g}$  NaCl przenosiłam do fiolki polipropylenowej i dodawałam  $132\text{ }\mu\text{l}$   $0,2\text{ mol/L}$  buforu fosforanowego o pH 7, tak by stosunek moczu do buforu wynosił 2:1 (v/v), otrzymaną mieszaninę mieszałam. Następnie dodawałam  $1\text{ ml}$  mieszaniny dichlorometanu i chloroformu (3:1, v/v) i wytrząsałam na wytrząsarce przez 15 minut przy  $3500\text{ obr./min}$ . Następnie próbkę wirowałam przez 5 minut przy  $12000\text{ obr./min}$ , a po oddzieleniu się faz zebrałam  $1\text{ ml}$  rozpuszczalnika organicznego stanowiącego fazę dolną i odparowałam do sucha w temperaturze  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ekstrakcję jednej próbki prowadziłam trzykrotnie. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczałam w  $50\text{ }\mu\text{l}$  mieszaniny ACN i  $0,01\text{ mol/l}$  NaOH (3:1, v/v), wprowadzałam do układu CE i poddawałam analizie. Podczas separacji elektroforetycznej jako BGE zastosowałam  $0,1\text{ mol/l}$  bufor fosforanowo-boranowy o pH 8,4. Rozdzielanie prowadziłam przy napięciu  $16\text{ kV}$  w temperaturze  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Próbka wprowadzana była do kapilary pod ciśnieniem  $60\text{ mbar}$  przez  $30\text{ s}$ . Podobnie jak w pracy D1, detekcję UV-Vis również przeprowadziłam przy analitycznej długości fali wynoszącej  $288\text{ nm}$  dla obu FQLs.

Kolejnym etapem prowadzonych przeze mnie badań było sprawdzenie trwałości Cpx i Ofx w zakresie temperatur od  $60$  do  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Eksperymenty te były istotne nie tylko ze względu na dobór maksymalnej temperatury w jakiej mogłam odparowywać próbki, jednak również z punktu widzenia konsumentów jako kontynuację badań opisanych w publikacji D1. Chciałam sprawdzić czy w hipotetycznej sytuacji, jeżeli w mięsie byłyby obecne pozostałości antybiotyków, proces gotowania powodowałby rozkład FQLs, czy ze względu na ich trwałość w wysokich temperaturach byłyby nadal obecne w pożywieniu. Wyniki badań wskazywały na to, że w wybranym zakresie temperatur związki te są trwałe. Kolejne eksperymenty obejmowały badanie długoterminowej trwałości Cpx i Ofx. Wyniki wykazały, że związki te nie ulegają degradacji w czasie 36 dni i są trwałe w temperaturze pokojowej, zarówno w świetle dziennym, jak i bez dostępu do światła, oraz w niskich temperaturach  $4$  i  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a kilkukrotne rozmrażanie również nie ma wpływu na ich stężenie.

Zoptymalizowaną procedurę analityczną poddałam następnie walidacji. Sześciopunktowe krzywe kalibracyjne w zakresie stężeń od  $1\text{ nmol/ml}$  do  $6\text{ nmol/ml}$  wykazały charakter liniowy. Równanie krzywej kalibracyjnej dla Cpx przybrało postać  $y=(7,093\pm 0,285)x-(4,187\pm 0,453)$  natomiast dla Ofx:  $y=(45,110\pm 0,828)x-(0,511\pm 0,298)$ . Wartość LOD metody wynosiła  $0,05\text{ nmol/ml}$  dla Cpx, natomiast dla Ofx  $0,01\text{ nmol/ml}$ , a LOQ

metody wynosiła 0,2 nmol/ml oraz 0,05 nmol/ml odpowiednio dla Cpx oraz Ofx. Precyzja metody (1,4%-7,8%), a także jej dokładność (86,4%-102,6%) zarówno wewnątrz jak i międzydniowe były na zadowalającym poziomie oraz zgodne z wytycznymi przewodnika FDA [113], co upewniło mnie o wiarygodności opracowanej metody. W związku z tym, kolejno przesłałam do oznaczania Cpx oraz Ofx w ludzkim moczu. Próbki moczu uzyskałam od 6 pozornie zdrowych ochotników (kobiety i mężczyźni w wieku od 20 do 50 lat), dodałam do nich znaną ilość Cpx i Ofx, w taki sposób, aby uzyskać stężenie obu analitów w moczu wynoszące 6 nmol/ml. Średnia zawartość leków jaką uzyskałam podczas eksperymentu to 6,33 mmol/ml dla Cpx oraz 6,36 dla Ofx. Wartości RSD tych oznaczeń mieściły się w zakresie od 4,7 do 17,3% dla Cpx oraz dla Ofx 1,1 do 11,5%. Można więc stwierdzić, że wyniki, które uzyskałam były zgodne z dodaną ilością analitów, tym samym wykazałam użyteczność metody w przypadku analizy próbek rzeczywistych.



OPEN

## Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine

Izabella Końska<sup>1,2</sup>, Krystian Purgat<sup>1</sup> & Paweł Kubalczyk<sup>1</sup>

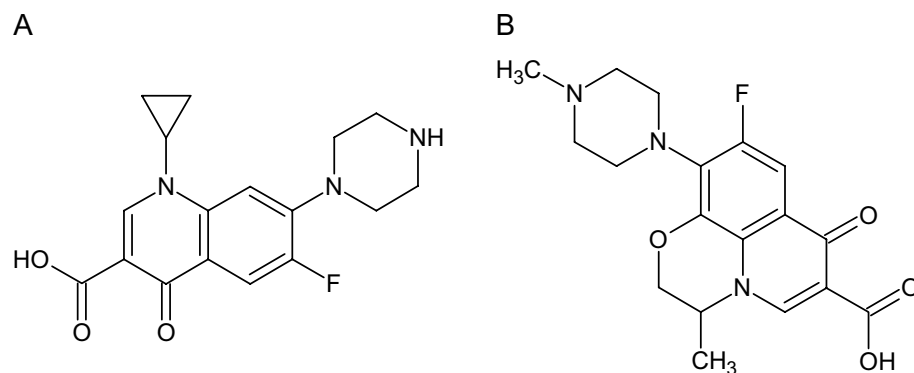
A simple, fast, and accurate capillary zone electrophoresis method has been developed for the determination of ciprofloxacin and ofloxacin. This method uses liquid–liquid extraction. Therefore, it is characterized by a very simple procedure of sample preparation but at the same time satisfactory precision and accuracy. The extraction process of the same urine sample was repeated three times. The extraction protocol was performed each time for 15 min with 1 mL of dichloromethane and chloroform mixture in a 3:1 volume ratio. A 0.1 mol/L phosphate-borate buffer (pH 8.40) was selected as the background electrolyte. UV detection was performed at 288 nm. The separation was carried out at a voltage of 16 kV, at a temperature of 25 °C. Experimentally evaluated LOQ values for ciprofloxacin and ofloxacin were 0.2 nmol/mL urine and 0.05 nmol/mL urine, respectively. For both analytes the calibration curves exhibited linearity over the entire tested concentration range of 1–6 nmol/mL urine. The precision of the method did not exceed 15%, and the recovery was in the range of 85–115%. The developed and validated procedure was applied to analyze human urine for the content of ciprofloxacin and ofloxacin.

Nowadays, we observe an increase in consumer interest in the topic of healthy eating. More and more people are aware that diet has an impact on human health. Consumers pay more attention to what they eat and more often read the ingredients listed on the product labels. Unfortunately, food could also contain compounds that are not labeled on a package. These are, for example, animal food additives or medicines given to animals. It is commonly known that antibiotics are increasingly being used in animal husbandry due to the need for rapid growth of animals<sup>1,2</sup>. Excretion of the residues of these compounds with animal urine and feces leads to environmental pollution<sup>1,3,4</sup>. Their use carries a risk to people because they negatively affect human<sup>1–3,5,6</sup>. Long-standing exposure of humans and the environment to antibiotic residues causes the so-called antibiotic resistance, which is one of the most serious global public health problems<sup>1–7</sup>. Soon after the entry of antibiotics to widespread use, resistant and multiresistant strains of the bacteria began to spread rapidly. This is a very unfavorable phenomenon because infections caused by antibiotic-resistant bacteria are very difficult to cure, sometimes even impossible<sup>5</sup>. Therefore, maximum residue limits have been established for veterinary antibiotics in food of animal origin<sup>1,2,6</sup>.

Fluoroquinolones (FQLs) are a group of compounds that are often used in the treatment of animals. FQLs are synthetic antibiotics derived from diaminopyrimidine<sup>2,3</sup>. They are considered broad-spectrum antibiotics due to their activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as some anaerobes<sup>2,5,6,8,9</sup>. Representatives of FQLs are ciprofloxacin (Cpx) and ofloxacin (Ofx). The Cpx and Ofx structures are shown in Fig. 1

They belong to fluoroquinolone compounds and commonly occur in food of animal origin<sup>3</sup>. Cpx and Ofx are derivatives obtained by the introduction of a fluorine atom at the 6th position of the quinoline ring and at the 7th position of the piperazine ring. These compounds are highly effective in the treatment of several diseases, such as bacterial infections of the gastrointestinal tract and urinary tract<sup>10</sup>. Cpx has 12 approved applications by the US Food and Drug Administration (FDA) in the treatment of humans and animals, but is often used for unapproved applications. Cpx was patented in 1983 by Bayer A.G. for the first time, and then in 1987 Cpx was approved by the FDA<sup>3</sup>. On the other hand, ofloxacin was approved by the FDA in 1992 after being reported by the Johnson Pharmaceutical Research Institute<sup>11</sup>.

<sup>1</sup>Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163, 90-236 Lodz, Poland. <sup>2</sup>Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland. ✉email: izabella.koska@edu.uni.lodz.pl; pawel.kubalczyk@chemia.uni.lodz.pl



**Figure 1.** Structures of (A) ciprofloxacin, (B) ofloxacin.

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful analytical tool characterized by a short analysis time, high separation efficiency, and very low reagents, harmful organic solvents and sample consumption<sup>12</sup>. Despite many advantages, it has limitations, just like other techniques. A commonly known disadvantage of CE is the relatively high limit of quantification (LOQ). It is the result of a very small volume of sample introduced into the capillary and the short optical pathway equal to the inner diameter of the capillary<sup>13,14</sup>.

Nowadays, several analytical methods have been developed for the determination of Cpx and Ofx in various matrices, for example, HPLC methods with UV detection for the determination of FQLs in human plasma<sup>15</sup>, in urine and plasma<sup>16</sup>, and in wastewater<sup>17</sup>. More HPLC methods with mass spectrometry (MS) allow to determine FQLs in animal products<sup>18,19</sup> or wastewater<sup>20,21</sup>. Several CE methods have also been developed to determine these compounds in animal products<sup>22</sup> or human urine<sup>5</sup>.

In this protocol for simultaneous CE determination of Cpx and Ofx, liquid–liquid extraction was used as a concentration and purification step during sample preparation.

This method is based in part on our previously developed method for the determination of fluoroquinolones in animal tissues<sup>23</sup>. However, it should be noted that urine is a very complex aqueous matrix that contains significantly varying concentrations of organic compounds, inorganic salts, and trace amounts of biomacromolecules. The presence of these compounds makes it necessary to properly prepare the sample before its analysis. The content of inorganic salts significantly changes the conductivity of the sample and may alter the separation in capillary electrophoresis. Thus, in this work, due to the change in the sample matrix, the entire methodology, i.e., the sample preparation procedure and the CE analysis conditions, was significantly modified. To the best of our knowledge, the literature does not describe the CE method for the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine with the use of in capillary preconcentration based on the mechanism of transient pseudo-isotachopheresis.

## Results and discussion

**Optimization of electrophoretic conditions.** *Buffer selection.* Four electrolyte solutions, i.e., 0.1 mol/L borate buffer (pH 8.5), 0.1 mol/L sodium tetraborate, 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 8.5) and 0.1 mol/L phosphate-borate buffer (pH 8.5) were tested as BGE. The best peaks parameters (height and area, repeatability, and resolution) were obtained using phosphate-borate buffer. Then, the concentration and pH of this buffer were optimized.

*Optimization of the concentration and pH of BGE.* The influence of BGE concentration on the height, area and shape of the peaks, resolution, and repeatability of the sizes of the analytical signals were checked. The concentration of phosphate-borate buffer was checked in the range of 0.05 to 0.2 mol/L. The highest peaks were obtained for 0.1 mol/L phosphate-borate buffer, so this concentration was used for the next experiments. Subsequently, 0.1 mol/L phosphate-borate buffer was tested in the 8.00 to 9.00 pH range with 0.25 increments. As one can see in Fig. S1, the highest signals were obtained for pH 8.25, but unfortunately at this pH the baseline separation of Cpx and Ofx peaks was not achieved. Therefore, to improve the resolution between the peaks, we decided to use a 0.1 mol/L phosphate-borate buffer at pH 8.40.

*Optimization of capillary temperature.* The influence of capillary temperature on peak size was checked at 8 temperature values in the range of 20–27 °C. As expected, migration times increased with increasing temperature, while 25 °C was chosen as the optimal value. At this capillary temperature, the resolution and size of the peaks were also satisfactory.

*Optimization of separation voltage.* The relationship between current and applied voltage was tested to determine maximum voltage to avoid excessive Joule heating, which is undesirable effect during electrophoretic analyzes. However, application of higher voltage shortens the migration time of analytes and improves resolution. The maximum value of the separation voltage was set at 23 kV. Thanks to this baseline separation of Cpx and Ofx was achieved. However, in the next stage of the experiment, we decided to add an in-capillary preconcentration

step based on the mechanism of transient pseudo-isotachophoresis. The addition of acetonitrile to the sample significantly reduces its conductivity and the voltage of 16 kV appears to be more favorable.

**Optimization of extraction procedure.** *Selection of buffer pH for sample preparation.* Proper choice of the pH of the sample is a very important parameter during optimization of the extraction process. The pH value should be carefully selected because the analytes should not have charge when nonpolar organic solvent is used for extraction. In this case, lack of charge facilitates diffusion of molecules into the nonpolar organic solvent and enhances efficiency of extraction. For the selection of an optimal extraction pH, knowledge of the pKa value of the analyte is very helpful. Cpx pKa values are 8.80 for nitrogen in the piperaziny ring and 6.00 for the carboxylic acid group, and the Ofx pKa values for the ammonium form and for the carboxylic function are 8.28 and 6.10, respectively<sup>22</sup>. Therefore, in this study, the optimization of the pH of the sample was studied by adding 0.2 mol/L phosphate buffer to urine at various pH ranges of 6.50 to 8.00. In Fig. S2 the highest efficiency of the extraction process and satisfactory reproducibility were observed when phosphate buffer was used at pH 7.00.

*Buffer:urine ratio.* The influence of the volume ratio of buffer to urine on extraction efficiency was also checked. The following buffer:urine ratios were checked: 1:2, 1:1 and 2:1. It can be clearly seen in Fig. S3 that the highest signal parameters were obtained when the volume of urine sample was 2 times more than the volume of buffer.

*Selection of organic solvent.* During the choice of organic solvent as the acceptor phase, it is very important that the organic solvent must be immiscible with the aqueous solution and also exhibit good selectivity towards the analyte to obtain the highest efficiency and repeatability of extraction<sup>13</sup>. In this study, the following organic solvents and their mixtures were tested: chloroform, dichloromethane, toluene, hexane, ethyl acetate, chloroform:toluene (1:1, v/v), dichloromethane:toluene (1:1, v/v) and dichloromethane:chloroform (1:1, v/v). In Fig. S4 the best results have been obtained for the mixture of dichloromethane and chloroform. Therefore, in the next step, the effect of various ratios of the mixture on the extraction efficiency was investigated. The following mixtures were checked: dichloromethane, dichloromethane:chloroform (3:1), dichloromethane:chloroform (2:1), dichloromethane:chloroform (1:1), dichloromethane:toluene (2:1), dichloromethane:toluene (1:1). The results showed that the highest extraction efficiency was obtained for the dichloromethane and chloroform mixture in the ratio 3:1 (v/v) (S5). Therefore, this solvent mixture was used as the acceptor phase. Then the volume of the organic phase was selected.

*Selection of organic solvent volume.* The influence of solvent volume on extraction efficiency was tested. For this purpose, the following volumes of dichloromethane and chloroform (3:1) mixture were used for the research: 600, 800, 1000, 1200 and 1400  $\mu$ L. The highest extraction efficiency was observed when 1000  $\mu$ L of organic solvent was added (S6). An increase in efficiency of the extraction process was not observed with the addition of larger volumes of the acceptor phase. So finally, it was decided that a volume of 1000  $\mu$ L would be used as the acceptor phase.

*Optimization of extraction time.* The extraction time needed to achieve the highest efficiency was optimized in the range of 5–30 min. The efficiency of this process did not change significantly and after 15 min it remained at a similar level. With the extraction time of 15 min, the best reproducibility was also obtained. Therefore, 15 min of extraction was chosen.

*Salt addition.* It was checked whether the addition of NaCl can influence the extraction efficiency. NaCl dissolved in water increases the dielectric constant of water, which expands the differences between the hydrophilic and hydrophobic phases, and consequently significantly simplifies phases separation. In the beginning, it was checked whether the addition of 5% NaCl to the sample would increase the extraction efficiency. In this case, changes in the heights of the analytical signal were not observed. So, the higher addition of NaCl, i.e., 15%, was tested in the urine sample. It was observed that the analytical signals were higher; therefore, it was considered that a 15% addition of NaCl was further utilized in the sample preparation procedure. A higher addition of NaCl did not give a positive effect, because during the extraction there were difficulties with phase separation.

*The number of extractions.* The effect of the number of repeated extractions on its efficiency was also checked. For this purpose, 1-, 2-, 3-, and fourfold extraction was performed. It was found that the more times the extraction process is carried out, the higher efficiency of extraction is obtained. However, when the extraction was carried out four times, the efficiency does not change significantly, and the time of sample preparation elongates excessively. Therefore, the three-fold extraction was selected as the optimal.

*Selection of solvent to dissolve the evaporation residue.* To verify the dissolution of the analytes and select which mixture will provide the highest analytical signals after evaporation of the organic extract to dryness, the residue was dissolved in 50  $\mu$ L of a mixture of methanol and 0.1 mol/L HCl in the following volumetric ratios of methanol and HCl: 1:1, 1:3, 3:1, 1:0, 0:1. Before the selection of the appropriate volumetric ratio of methanol to HCl, the dissolution of Cpx and Ofx in various concentrations of HCl was studied. It was observed that both analytes dissolve very well in 0.1 mol/L HCl. The reason of the addition of methanol is that methanol is characterized by the high viscosity, which simplifies mixing a small volume of the solution in a polypropylene tube. The highest signals were obtained with methanol in a 0.1 mol/L HCl ratio of 1:1 (v/v), and this mixture was used to dissolve the residue after evaporation. Then it was decided to additionally concentrate analytes inside the separation cap-

Concentration* (nmol/mL urine)	RSD (%)
<b>Ciprofloxacin</b>	
8	4.6
18	3.0
30	5.5
<b>Ofloxacin</b>	
8	5.7
18	6.1
30	2.9

**Table 1.** Repeatability of ciprofloxacin and ofloxacin extraction. \*n = 3.

illary in the CE system. For this purpose, methanol was changed to acetonitrile and 0.1 mol/L HCl was changed to 0.01 mol/L NaOH. The influence of the volume ratio of these compounds on the size of analytical signals was investigated. The following ratios of acetonitrile to NaOH (v/v) were tested: 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1. The best results (the best reproducibility and the highest concentration of analytes) were obtained when the mixture was used in a 3:1 volumetric ratio; further increasing the volume of acetonitrile did not improve the results.

**Influence of the matrix on the slope of the calibration curve.** To study the effect of the matrix on the slope of the calibration curves, two urine samples taken from different apparently healthy volunteers were prepared in the following dilutions: 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 and 1:7 (urine: 0.2 mol/L phosphate buffer, pH 7.00). The three-point curves were constructed in triplicate (shown in Fig. S7). For each urine dilution, the three-point relationships of the analytical signal and the concentration of the analytes showed similar slope factors. Therefore, it was concluded that the matrix effect has a small impact on the analytical signal and therefore the sample was diluted in the 2:1 ratio in further studies. The repeatability of the slope coefficients of the calibration curves was subsequently tested in urine from a larger number of people. For this purpose, 5-point calibration curves were prepared in 3 series on urine from different people. The slopes of the calibration curves for ciprofloxacin were as follows: 2.8833, 3.5083, 3.1333, 2.5917, 3.025 (CV = 9.94%) and for ofloxacin they were as follows: 24.325, 24.892, 21.275, 28.058 and 25.925 (CV = 9.94%). According to the EMA guide<sup>24</sup>, we find that there is no matrix influence as these ratios do not differ more than 15%.

**Extraction repeatability.** Repeatability of extraction was studied by preparing 3 urine samples with different concentrations of Cpx and Ofx. Stock standard solutions of Cpx and Ofx were prepared at concentrations of 3000 nmol/mL in 0.1 mol/L HCl and used for sample spiking with Cpx and Ofx to obtain analytes concentration of 8, 18, 30 nmol/mL urine. Each sample of working solution was prepared in triplicate. After the analysis of the urine extract, the relative standard deviation (RSD) was utilized to estimate the repeatability of the extraction procedure. For both analytes, RSD did not exceed 15%. The detailed data are presented in Table 1.

**Sensitivity enhancement factor.** The sensitivity enhancement factor (SEF) can be used to determine the degree of concentration of the analyte with the developed method. It determines the efficiency of extraction by comparing the size of the analytical signal obtained with the method using the concentration of the analyte and the signal without the extraction step. In this work, the following formula was used to calculate the SEF coefficient:

$$SEF = \frac{h_{\text{after extraction}}}{h_{\text{without extraction}}} \cdot \frac{C_{\text{without extraction}}}{C_{\text{after extraction}}}$$

where  $h_{\text{after extraction}}$ —peak height of analyte for urine analysis after extraction,  $h_{\text{without extraction}}$ —peak height of analyte for urine analysis without extraction,  $C_{\text{after extraction}}$ —concentration of analyte in urine sample, which was analyzed with extraction step,  $C_{\text{without extraction}}$ —concentration of analyte in urine sample, which was analyzed without extraction step.

Urine samples were prepared according to the procedure described in section “[Calibration of the method](#)”, each sample was prepared in triplicate, and the SEF’s for Cpx and Ofx calculated from the above equation were 142.4 and 216, respectively.

**Calibration and other validation data.** The method developed for the simultaneous determination of Ofx and Cpx in human urine was validated under optimized conditions according to the criteria for biological sample analysis<sup>11</sup>. The limit of detection (LOD) was experimentally determined as the concentration that corresponds to the analytical signal 3 times higher than the baseline noise, while the limit of quantification (LOQ) was the concentration that corresponds to the signal 9 times higher than the baseline noise<sup>25</sup>. The LOD and LOQ values evaluated for Cpx were: 0.05 and 0.2 nmol/mL urine and for Ofx were 0.01 nmol/mL urine and 0.05 nmol/mL urine, respectively. The LOD and LOQ of the developed method are lower than for CE procedure<sup>26</sup> and CIEF method<sup>27</sup> but higher than for UPLC-MS/MS method<sup>1</sup> and MSPE-HPLC-MS procedure<sup>28</sup> (Table 2).

Method	LOD		LOQ	
	Cpx	Ofx	Cpx	Ofx
CE <sup>26</sup>	12.83 nmol/mL* (0.00425 mg/mL)	No data	37.73 nmol/mL* (0.0125 mg/mL)	No data
CIEF <sup>27</sup>	1.03 nmol/mL* (0.34 µg/ mL)	3.32 nmol/mL* (1.20 µg/ mL)	No data	No data
UPLC-MS/MS <sup>1</sup>	$1.38 \times 10^{-5}$ nmol/mL* (0.005 ng/mL)	$1.38 \times 10^{-5}$ nmol/mL* (0.005 ng/mL)	$4.14 \times 10^{-5}$ nmol/mL* (0.015 ng/mL)	$4.14 \times 10^{-5}$ nmol/mL* (0.015 ng/mL)
MSPE-HPLC-MS <sup>28</sup>	$3.05 \times 10^{-5}$ nmol/mL* (10.1 ng/L)	$8.58 \times 10^{-6}$ nmol/mL* (3.1 ng/L)	$1.02 \times 10^{-4}$ nmol/mL* (33.8 ng/L)	$2.88 \times 10^{-5}$ nmol/mL* (10.4 ng/L)
Presented method	0.05 nmol/mL	0.01 nmol/mL	0.2 nmol/mL	0.05 nmol/mL

**Table 2.** Comparison the LOD and LOQ values of the described method with published methods. \*LOD and LOQ values converted and reported in nmol/mL urine.

Added* (nmol/mL urine)	Intra-day			Inter-day		
	Found ± SD (nmol/mL urine)	RSD (%)	Accuracy (%)	Found ± SD (nmol/mL urine)	RSD (%)	Accuracy (%)
<b>Ciprofloxacin</b>						
1.50	1.42 ± 0.02	1.4	94.8	1.46 ± 0.11	7.8	97.0
2.50	2.25 ± 0.05	2.2	89.9	2.32 ± 0.12	5.3	92.6
4.50	3.89 ± 0.18	4.7	86.4	4.11 ± 0.11	2.6	91.4
<b>Ofloxacin</b>						
1.50	1.51 ± 0.12	7.8	100.7	1.53 ± 0.09	6.0	102.1
2.50	2.56 ± 0.18	7.0	102.6	2.49 ± 0.06	2.4	99.6
4.50	4.44 ± 0.12	2.6	98.7	4.47 ± 0.07	1.9	99.4

**Table 3.** Validation data—results. \*n = 3.

Six-point calibration curves were constructed for both Cpx and Ofx in human urine in the range of 1–6 nmol/mL, in triplicate. The calibration curves obtained (Fig. S8) exhibit a linear character in the tested concentration range. The square of the linear correlation coefficient ( $R^2$ ) for Cpx was 0.9936 and for Ofx was 0.9987. The equation of the calibration curve for Cpx was  $y = (7.093 \pm 0.285)x - (4.187 \pm 0.453)$  and for Ofx was  $y = (45.110 \pm 0.828)x - (0.511 \pm 0.298)$ . The RSD of the points of the calibration curves in urine for Cpx and Ofx ranged from 3.7 to 9.3%, while recovery ranged from 97.5 to 104.5%. These values are in good agreement with the criteria approved for the analysis of biological samples<sup>11</sup>. Then, intra-day and inter-day validation was performed. For this purpose, three concentrations of the quantified compounds within the range of the calibration curve were studied. The first concentration represents the beginning of the calibration curve range, the next concentration was in the middle of the calibration curve range, and the third concentration was near the upper boundary of the calibration curve. Due to satisfactory precision (less than 15%) and recovery (in the range 85–115%), we strongly believe that the developed method can be used to determine Cpx and Ofx in human urine. All validation data are presented in Table 3.

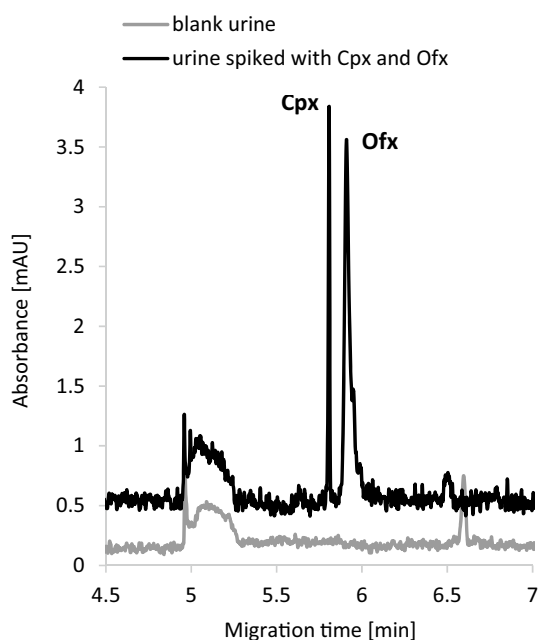
The procedure for preparing the urine sample is simple, but quite time consuming, the overall time needed to analyze the urine sample for the Cpx and Ofx content with the use of the above-mentioned procedure equals 68 min. However, during this time, at least 10 samples can be prepared simultaneously (this number corresponds to the number of places on the shaker). The overall analysis time of our methodology is similar to that of the MSPE-HPLC-MS method<sup>28</sup> (72 min) or SDME-CE procedure<sup>5</sup> (61 min), but much shorter than in EEM-ANWE approach<sup>10</sup> (155 min).

**Determination of Cpx and Ofx in human urine.** After conducting the whole optimization, calibration, and validation protocol, the analytical procedure was applied to analyze human urine samples for the Cpx and Ofx content. Urine samples were taken from 6 apparently healthy volunteers, spiked with a known amount of Cpx and Ofx to obtain a concentration of 6 nmol/mL urine for both analytes, and prepared according to the procedure described in section “Urine sample preparation”. The samples were then subjected to analysis with the use of capillary zone electrophoresis with concentration in the capillary. All the data are shown in Table 4. Representative electropherograms obtained for urine and spiked urine are shown in Fig. 2. The RSD value exceeds 15% for one urine sample, it may be due to its own properties. The high value of RSD in the case of analysis of one urine sample may result from mistakes made during the sample preparation, mainly incomplete collection of the organic phase during the extraction. In addition, the sample to be analyzed contains acetonitrile, so it could evaporate while it was in the CE apparatus.



Sample number	Added* (nmol/mL urine)	Found $\pm$ SD (nmol/mL urine)	RSD (%)
<b>Ciprofloxacin</b>			
1	6.00	6.68 $\pm$ 0.57	8.50
2	6.00	5.88 $\pm$ 0.57	9.7
3	6.00	6.28 $\pm$ 0.57	9.1
4	6.00	6.08 $\pm$ 0.29	4.7
5	6.00	5.96 $\pm$ 1.03	17.3
6	6.00	7.09 $\pm$ 0.57	8.1
<b>Ofloxacin</b>			
1	6.00	6.16 $\pm$ 0.07	1.10
2	6.00	6.26 $\pm$ 0.48	7.6
3	6.00	6.69 $\pm$ 0.55	8.0
4	6.00	6.16 $\pm$ 0.48	7.8
5	6.00	6.55 $\pm$ 0.75	11.5
6	6.00	6.31 $\pm$ 0.55	8.7

**Table 4.** Determination of Cpx and Ofx in human urine—results. \*n = 3.



**Figure 2.** Representative electropherograms obtained for urine and urine spiked with Cpx and Ofx (final concentration 6 nmol/mL urine).

**Stability tests.** *Thermal stability.* Both Cpx and Ofx concentrations are constant over the whole range of evaporation temperature from 60 to 100 °C (Fig. S8). The Cpx concentration ranges from 11.09  $\pm$  0.35 nmol/mL urine to 12.66  $\pm$  0.27 nmol/mL urine and the Ofx concentration is within the range from 10.09  $\pm$  0.40 nmol/mL urine to 11.03  $\pm$  1.00 nmol/mL urine. Therefore, it can be assumed that if the meat containing FQLs is cooked at a temperature below 100 °C, the tested FQLs are still present in the food. Since Cpx and Ofx are stable at high temperatures and considering that the evaporation time is equal to 15 min, the optimal evaporation temperature was found to be 90 °C.

*Long-term stability.* Experiments on the long-term stability of Cpx and Ofx have shown that these compounds do not degrade over time. As can be seen in Fig. S10, the tested FQLs are stable at room temperature at both light and dark and low temperatures, and their concentration is not affected by thaw. The average Cpx and Ofx content found in urine was 10.44  $\pm$  1.81 nmol/mL urine and 10.12  $\pm$  0.75 nmol/mL urine for samples stored in light, 10.58  $\pm$  1.66 nmol/mL urine and 10.08  $\pm$  1.25 nmol/mL urine for samples stored in the dark, 10.28  $\pm$  1.77 nmol/mL urine and 10.03  $\pm$  0.89 nmol/mL urine during the storage of samples at 4 °C. When samples were stored at -24 °C and after several freeze-thaw cycles, mean Cpx and Ofx concentrations were 9.35  $\pm$  2.38 nmol/mL urine and 8.85  $\pm$  1.72 nmol/mL urine, respectively.

## Materials and methods

**Instruments.** For all experiments, Agilent 7100 CE System (Waldbronn, Germany) coupled with UV–Vis absorbance diode array detector and equipped with automatic injector was used. For separation, bare fused silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) of total length of 64.5 cm (effective length of 56 cm) and inner diameter of 75  $\mu\text{m}$  was utilized. To measure peak areas, migration times, and other data, Agilent ChemStation software was used. Peaks of these compounds were identified by comparing their spectra in the standard sample with those in the biological sample, as well as by comparing the migration times of analytes on electropherograms of the standard and the real sample. To shake the samples, a vortex was used, in turn, a thermostat was used to evaporate the organic solvent, and the pH of the solutions was adjusted using a pH-meter from Mettler Toledo (Switzerland). The deionized water used for all experiments was purified using a Millipore Milli-Q-RG System (Waterford, Ireland).

**Chemicals.** Sodium hydroxide (NaOH) and sodium chloride (NaCl) were purchased from POCH (Gliwice, Poland), sodium tetraborate decahydrate ( $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) was obtained from Sigma (Steinheim, Germany), boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) and methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) were from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), toluene ( $\text{C}_7\text{H}_8$ ), and ethyl acetate ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) were purchased from Chempur (Piekary Slaskie, Poland). The hexane was obtained from Lab-Scan (Dublin, Ireland). Standards of analytes, i.e., Cpx ( $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$ ) and Ofx ( $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ ) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, United States of America). The buffer pH was adjusted by potentiometric titration and degassed using an ultrasonic bath.

**Capillary preconditioning.** In case of new capillary, the preconditioning procedure was performed by flushing with 1 mol/L NaOH solution for 20 min, next with 0.1 mol/L solution of NaOH for 20 min, then 2 min with deionized water, and finally with BGE for 30 min. Every next day of work, the capillary was flushed with 1 mol/L NaOH solution for 5 min and 0.1 mol/L NaOH solution for 20 min, then with water for 2 min, and 30 min with BGE. At the end of each day, the capillary was flushed with water for 20 min and the capillary ends were left in the water overnight.

**Electrophoretic conditions.** During electrophoretic analysis, 0.1 mol/L (pH 8.40) phosphate-borate buffer was used as BGE. Separation was achieved with a voltage of 16 kV at 25 °C. Hydrodynamic injection of the sample solution was performed at 60 mbar for 30 s. UV–Vis detection was performed at an analytical wavelength of 288 nm for both FQLs.

**Human urine collection.** All experiments were carried out according to the Institutional Ethics Approval of the relevant University Committee (Resolution no. 8/KBBN-UŁ/I/2020–2021). To develop the method, human urine samples were collected from apparently healthy volunteers. These samples were centrifuged for 5 min at 12,000 rpm, then the supernatant solution was collected in a polypropylene tube and stored at reduced temperature (–20 °C).

**Urine sample preparation.** To prepare the sample for the extraction procedure, 268  $\mu\text{L}$  of human urine with 0.06 g NaCl was transferred into polypropylene vial and 132  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L (pH 7.00) phosphate buffer was added (the urine–buffer ratio was 2:1) and the mixture obtained was mixed. Then 1 mL of the dichloromethane and chloroform mixture (3:1) was added and vigorously shaken for 15 min at 3500 rpm. The sample was then centrifuged for 5 min at 12,000 rpm. 1 mL of the organic solvent (lower phase) was collected and evaporated to dryness. The same sample was extracted three times. The residue was dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of the mixture of acetonitrile and 0.01 mol/L NaOH (3:1, v/v), introduced to the CE system and analyzed.

**Calibration of the method.** Calibration standards for the determination of Cpx and Ofx in urine were prepared by diluting 3000 nmol/mL of Cpx and Ofx with 0.1 mol/L HCl as needed. To calibrate the method, 3 series of solutions with increasing concentrations were prepared. All working solutions were prepared according to the following procedure: 268  $\mu\text{L}$  of human urine with 0.06 g NaCl was added to a polypropylene tube and 132  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.00) was added and mixed. Then, the solutions obtained were spiked with the growing amounts of working standard solutions of both Cpx and Ofx to obtain the following concentrations: 1 nmol/mL urine, 2 nmol/mL urine, 3 nmol/mL urine, 4 nmol/mL urine, and 5 nmol/mL urine, 6 nmol/mL urine. The volume of spiking solutions added to all calibration samples was the same. Subsequently, 1 mL of the dichloromethane and chloroform mixture (3:1) was added, the mixture was vigorously shaken for 15 min at 3500 rpm and centrifuged for 5 min at 12,000 rpm. The organic phase was collected (extraction of the same sample was carried out three times), evaporated to dryness, and the residue was dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of acetonitrile and 0.01 mol/L NaOH (3:1, v/v), then the sample was introduced to the CE system and analyzed. The peak areas of Cpx and Ofx were plotted versus their corresponding concentrations, and the curves were fitted using a least-squares linear regression analysis.

**Stability tests.** For thermal stability experiments, 5 series of urine samples without FQLs content were prepared (according to the procedure described in section “Urine sample preparation”) and spiked with known amounts of working standard solutions of Cpx and Ofx, to provide final concentrations of these compounds equal 10 nmol/mL urine. Each such urine sample was prepared in triplicate. The first series was tested for thermal stability, the second series was subjected to long-term stability tests at room temperature in daylight, another

series at room temperature in the dark, and the last two series at reduced temperatures of 4 °C and –24 °C, respectively. For studies of the thermal stability of Cpx and Ofx samples were evaporated at different temperatures: 60, 70, 80, 90, and 100 °C. However, to test long-term stability, the enriched samples were stored at the above mentioned temperatures and analyzed after 1, 2, 3, 7, and 36 days.

**Ethics declarations.** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Lodz (protocol code 8/KBBN-UŁ/I/2020–2021).

**Informed consent.** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

## Conclusions

A new, fast and simple analytical procedure for the determination of Cpx and Ofx in human urine with the use of CZE with UV–Vis detection and analytes concentration by in-capillary pseudo-transient isotachopheresis and liquid–liquid sample extraction was developed. This method is characterized by a very simple and a relatively fast preparation of the urine sample. In this study, the mixture of dichloromethane and chloroform (3:1, v/v) was chosen for sample extraction as the organic phase. The extraction process of the same urine sample was carried out three times, each time for 15 min, with 1 mL of the organic solvent. The described procedure is very simple and does not require sophisticated equipment while maintaining relatively high sensitivity. Besides, the developed method is sensitive and precise, and it is characterized by good linearity and accuracy. Considering all these advantages of our method, we strongly believe that it can be implemented in the routine analysis of urine for Cpx and Ofx content.

## Data availability

CE data are available from the authors.

Received: 30 January 2022; Accepted: 27 April 2022

Published online: 11 May 2022

## References

- Wang, Z. *et al.* High Through-put determination of 28 veterinary antibiotic residues in swine wastewater by one-step dispersive solid phase extraction sample cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **230**, 337–346 (2019).
- 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. *Biomed. Chromatogr.* **33**(5), e4501 (2019).
- Aresta, A., Cotugno, P. & Zambonin, C. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin, and marbofloxacin in bovine urine, serum, and milk by microextraction by a packed sorbent coupled to ultra-high performance liquid chromatography. *Food Anal.* **52**, 790–802 (2019).
- Wang, D., Ning, Q., Dong, J., Brooks, B. W. & You, J. Predicting mixture toxicity and antibiotic resistance of fluoroquinolones and their photodegradation products in *Escherichia coli*. *Environ. Pollut.* **262**, 114275 (2020).
- Gao, W. *et al.* Application of single drop liquid–liquid–liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **879**, 291–295 (2011).
- Wang, H. *et al.* Selective extraction and determination of fluoroquinolones in bovine milk samples with montmorillonite magnetic molecularly imprinted polymers and capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 589–598 (2016).
- Wang, M. *et al.* Magnetic covalent organic frameworks with core-shell structure as sorbents for solid phase extraction of fluoroquinolones, and their quantitation by HPLC. *Microchim. Acta* **186**, 827 (2019).
- Egunova, O. R., Reshetnikova, I. S., Kazimirova, K. O. & Shtykov, S. N. Magnetic solid-phase extraction and fluorimetric determination of some fluoroquinolones. *J. Anal. Chem.* **75**, 24–33 (2020).
- Saad, M. N., Essam, H. M., Elzanfaly, E. S. & Amer, S. M. Economic chromatographic methods for simultaneous quantitation of some fluoroquinolones and corticosteroids present in different binary ophthalmic formulations. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **43**, 271–281 (2020).
- Ouyang, Y.-Z. *et al.* Rapid and simultaneous determination of three fluoroquinolones in animal-derived foods using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **224**, 117458 (2020).
- FDA; Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceuticals Contains Nonbinding Recommendations (2018).
- Baciu, T., Borruil, F., Neusüß, C., Aguilar, C. & Calull, M. Capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction using magnetic particles as new adsorbents for the determination of drugs of abuse in human urine. *Electrophoresis* **37**, 1232–1244 (2016).
- Purgat, K., Olejarz, P., Koška, I., Głowacki, R. & Kubalczyk, P. Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction. *Anal. Biochem.* **596**, 113640 (2020).
- Kubalczyk, P. & Bald, E. Methods of analyte concentration in a capillary. *Springer Ser. Chem. Phys.* **105**, 215–235 (2013).
- Cairolì, S. *et al.* A new HPLC–DAD method for contemporary quantification of 10 antibiotics for therapeutic drug monitoring of critically ill pediatric patients. *Biomed. Chromatogr.* **34**, e4880 (2020).
- Yıldırım, S., Karakoç, H. N., Yaşar, A. & Köksal, İ. Determination of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin and gemifloxacin in urine and plasma by HPLC–FLD–DAD using pentafluorophenyl core-shell column: Application to drug monitoring. *Biomed. Chromatogr.* **34**, 34925 (2020).
- Selahle, S. K. & Nomngongo, P. N. Determination of fluoroquinolones in the environmental samples using vortex assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **100**, 282–294 (2020).
- Magalhães, D., Freitas, A., Sofia Vila Pouca, A., Barbosa, J. & Ramos, F. The use of ultra-high-pressure-liquid-chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry as a confirmatory method in drug residue analysis: Application to the determination of antibiotics in piglet liver. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1153**, 122264 (2020).
- Li, J. *et al.* Multiclass analysis of 25 veterinary drugs in milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **257**, 259–264 (2018).
- Maia, A. S., Paiga, P., Delerue-Matos, C., Castro, P. M. L. & Tiritan, M. E. Quantification of fluoroquinolones in wastewaters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* **259**, 113927 (2020).

21. Ziarrusta, H. *et al.* Determination of fluoroquinolones in fish tissues, biological fluids, and environmental waters by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 6359–6370 (2017).
22. Vera-Candioti, L., Teglia, C. M. & Cámara, M. S. Dispersive liquid–liquid microextraction of quinolones in porcine blood: Optimization of extraction procedure and CE separation using experimental design. *Electrophoresis* **37**, 2670–2677 (2016).
23. Koška, I., Purgat, K., Głowacki, R. & Kubalczyk, P. Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachopheresis. *Molecules* **26**, 6931 (2021).
24. Medicines Agency, E. 2\*\* Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on Bioanalytical Method Validation (1995).
25. Borowczyk, K. *et al.* Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthalaldehyde. *Talanta* **161**, 917–924 (2016).
26. Paul, P., Van Laeken, C., Sängler-van de Griend, C., Adams, E. & Van Schepdael, A. CE-C4D method development and validation for the assay of ciprofloxacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **129**, 1–8 (2016).
27. Horká, M. *et al.* CIEF separation, UV detection, and quantification of ampholytic antibiotics and bacteria from different matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 6285–6296 (2014).
28. Wei, D. & Guo, M. Facile preparation of magnetic graphene oxide/nanoscale zerovalent iron adsorbent for magnetic solid-phase extraction of ultra-trace quinolones in milk samples. *J. Sep. Sci.* **43**, 3093–3102 (2020).

### Author contributions

Conceptualization—I.K., P.K.; methodology—I.K., P.K.; validation, formal analysis, data curation—I.K.; writing—original draft preparation—I.K., P.K.; writing—review and editing—I.K., K.P., P.K.; visualization—I.K., K.P.; supervision—P.K. All authors reviewed the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11747-y>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to I.K. or P.K.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Publikacja D3: **I. Kośka**, P. Kubalczyk, *Development of the chromatographic method for simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal kidneys and livers*, International Journal of Molecular Sciences, 24 (2023) 100.

Kolejnymi bardzo często stosowanymi lekami w weterynarii są leki uspokajające, których reprezentantem jest podawany zwierzętom azaperon (AZN). W związku z tym, kolejna opisana praca opiera się na chromatograficznym oznaczaniu AZN i jego metabolitu azaperolu (AZL) w tkankach zwierzęcych. Zdecydowałam się na zmianę techniki separacyjnej ze względu na to, aby metoda ta była jak najłatwiejsza do odtworzenia w laboratoriach wykonujących rutynowe analizy, gdyż zazwyczaj posiadają one w swym wyposażeniu aparat do HPLC. Procedurę przygotowania próbki opracowałam w taki sposób, aby zawierała jedynie niezbędne elementy, tj. homogenizację nerki oraz odbiałczanie. Ze względu na to, że najbardziej popularnym sposobem detekcji jest detekcja spektrofotometryczna, na taką się też zdecydowałam. Natomiast w celu poprawy czułości metody przy zastosowaniu wspomnianego detektora zdecydowałam się na wprowadzenie do procedury przygotowania próbki także etapu zatężania jej. Optymalizowałam zatem parametry takie jak: stosunek masy tkanki do objętości ACN, który pełnił rolę rozpuszczalnika do homogenizacji, temperaturę liofilizacji w celu odparowania go, objętość etanolu do rozpuszczenia pozostałości po odparowaniu, a także objętość PCA do odbiałczania. Aby przygotować próbkę nerki do analizy, 0,5 g tkanki umieszczałam w 3 ml próbówce polipropylenowej z 2 ml ACN i homogenizowałam. Homogenat wirowałam następnie przy  $13680 \times g$  (12000 obrotów na minutę) przez 15 minut w celu oddzielenia cząstek stałych, a następnie supernatant przenosiłam do 2 ml próbówki polipropylenowej. Próbkę liofilizowałam w temperaturze 50 °C, a następnie po odparowaniu ACN pozostałość rozpuszczałam w 20 µl etanolu, który jest doskonałym rozpuszczalnikiem dla AZN. W celu odbiałczenia próbki, na tym etapie dodawałam 15 µl PCA, gdyż taka objętość pozwalała na całkowite wytrącenie białka. Próbkę kolejno wirowałam w w/w warunkach przez 10 min, następnie 25 µl roztworu supernatantu przenosiłam do stożkowej fiolki chromatograficznej i 5 µl tak przygotowanej próbki poddawałam analizie HPLC. Rozdzielanie prowadziłam w odwróconym układzie faz, w związku z tym zastosowałam kolumnę Zorbax SB C-18. Faza ruchoma składała się z 0,05 mola/l buforu fosforanowego o pH 3 (składnik A) i ACN (składnik B). Chromatograficzne rozdzielanie AZN i AZL od pozostałych składników próbki osiągnęłam stosując elucję gradientową o następującym profilu: 0–7 min 10–50% B; 7–9 min 50–10% B. Wszystkie analizy prowadziłam w temperaturze pokojowej przy stałej

prędkości przepływu fazy ruchomej wynoszącej 1 ml/min. Zastosowałam detekcję UV-Vis przy analitycznej długości fali równej 245 nm dla obu analitów.

Kolejno proces walidacji rozpoczęłam od wykonania kalibracji metody w taki sposób, aby w środku krzywej kalibracyjnej znalazło się stężenie AZN i AZL, które odpowiada maksymalnemu dopuszczalnemu poziomowi MRL, aby pozwolić sobie na identyfikację takich próbek, które to stężenie mogłyby przekraczać. Wykazałam, że krzywa kalibracyjna charakteryzowała się liniowością w zakresie stężeń od 50 do 300 µg/kg tkanki. Równanie krzywej kalibracyjnej dla AZN wyglądało następująco  $y=(0,0222\pm 0,0005)x+(0,2904\pm 0,0843)$ , natomiast dla AZL:  $y=(0,0510\pm 0,0009)x+(1,1217\pm 0,1484)$ . Poza tym, co było niezwykle zadowalające, mimo prostoty przygotowania próbki osiągnęłam bardzo dobre wartości LOD i LOQ, które wynosiły dla AZN odpowiednio 1 µg/kg oraz 2,5 µg/kg, a dla AZL odpowiednio 0,4 µg/kg oraz 1,2 µg/kg. Zarówno wewnątrzdniowa jak i międzydniowa precyzja opracowanej metody nie przekraczała 9,9%, natomiast dokładność metody mieściła się z zakresie od 93,4% do 109,5%.

Zwalidowaną procedurę opisaną w niniejszej pracy zastosowałam do oznaczenia AZN i AZL w tkankach mięsnych, tj. nerkach i wątróbkach wieprzowych, które zostały zakupione od lokalnych hodowców mięsa. Do próbek tkanek dodałam znaną ilość AZN i AZL w celu uzyskania stężenia 230 µg/kg tkanki dla obu analitów, a następnie analizowałam za pomocą HPLC. Wartości stężeń AZN otrzymane podczas eksperymentu mieściły się w zakresie od 212,14±7,80 µg/kg do 236,17±5,20 µg/kg, natomiast dla AZL od 213,30±3,92 µg/kg do 234,21±6,30 µg/kg. Wartości RSD oznaczeń dla AZN mieściły się w zakresie od 1,1 do 5,8%, natomiast dla AZL od 1,8 do 4,7%.

W końcowym etapie badań postanowiłam również sprawdzić, w jakim stopniu zaproponowana przeze mnie procedura spełnia kryteria tzw. ekologiczności metody. Zdecydowałam się na ten krok ze względu na to, że współcześnie duży nacisk kładzie się na ochronę środowiska, więc skoro opisana metoda ma być użyteczna pod względem rutynowych analiz mięsa to dobrze, aby w jak najmniejszym stopniu wpływała negatywnie na środowisko. W celu określenia ekologiczności metody wykorzystałam do tego oprogramowanie Kalkulator Analytical GREENness stworzone w oparciu o opisane przez Pena-Pereira i wsp. w artykule naukowym [116] zasady SIGNIFICANCE. Obliczona w kalkulatorze ekologiczność prezentowanej metody wynosi 0,58. Wskazuje to, że zieloność opracowanej przeze mnie

metody jest podobna jak w metodzie HPLC-FL [95], a lepsza od HPLC-MS/MS [109], ze względu na to, że wielkość ta jest bliższa 1. Wynik ten jest zadowalający, ze względu na to, że na uzyskany wynik składały się następujące parametry: procedura przygotowania próbki wymaga tylko niewielkiej ilości etapów (zasada 1), wykorzystano próbkę tkanki o niewielkiej masie 0,5 g (zasada 2), pomiar odbywa się w miejscu innym niż to, w którym pobrano próbkę, a więc trybie off-line (zasada 3), metoda składa się z czterech odrębnych etapów, takich jak homogenizacja, liofilizacja, wirowanie i separacja (zasada 4). Procedura jest półautomatyczna i zminiaturyzowana (zasada 5), podczas analizy nie był wymagany etap derywatywacji (zasada 6), odpady chemiczne obejmują 2 ml ACN wykorzystanego do homogenizacji, 20 µl etanolu do rozcieńczenia, 15 µl PCA do odbiałczenia i 10,1 ml (w tym 2,9 ml ACN) fazy ruchomej HPLC (zasada 7). Podczas jednej analizy oznaczane są dwa anality, a ilość próbek, które można poddać analizie ciągu godziny wynosi ~4, jeśli założymy, że jednocześnie można przygotować około 48 próbek (zasada 8). Według zasady 9 etap liofilizacji jest w opisanym eksperymencie najbardziej wymagający pod względem zużycia energii, a zgodnie z zasadą 10 niektóre odczynniki można uzyskać ze źródeł biologicznych. Do obliczenia ekologiczności metody brałam pod uwagę również fakt, że procedura wymaga 4,9 ml toksycznych rozpuszczalników (zasada 11), a opary ACN uważane są za materiał wybuchowy i wysoce łatwopalny (zasada 12).

Uzyskane w tym eksperymencie wyniki wskazują na to, że opisana metodologia może być z powodzeniem stosowana do rutynowej analizy mięsa pod kątem zawartości AZP i AZL, ponieważ ze względu na niskie wartości RSD oznaczeń można stwierdzić, że powtarzalność wyników oznaczeń jest na zadowalającym poziomie według wytycznych w przewodniku FDA [113].



Article

# Development of the Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Azaperone and Azaperol in Animal Kidneys and Livers

Izabella Końska<sup>1,2,\*</sup> and Paweł Kubalczyk<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163, 90-236 Lodz, Poland

<sup>2</sup> Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

\* Correspondence: izabella.koska@edu.uni.lodz.pl (I.K.); pawel.kubalczyk@chemia.uni.lodz.pl (P.K.); Tel.: +48-4263-558-44 (P.K.)

**Abstract:** A precise and accurate method for the simultaneous determination of azaperone and azaperol in meat tissues has been developed. This paper describes the first method to be so fast, simple, and useful, especially for many laboratories that do not have sophisticated equipment. This method is based on LC separation and UV-Vis detection. During the sample preparation, the meat tissue was homogenized in acetonitrile at a ratio of 1:4 (tissue weight:acetonitrile volume). The homogenate was centrifuged, the supernatant was evaporated in a lyophilizator, and then the evaporation residue was dissolved in 20 µL of ethanol. For deproteinization, 15 µL of perchloric acid was added, and the sample prepared in this way was injected into a chromatographic column and analyzed using reversed-phased HPLC. The mobile phase consisted of 0.05 mol/L phosphate buffer pH 3.00 (component A) and acetonitrile (component B). UV detection was conducted at 245 nm. The experimentally determined LOQs were 0.25 µg/kg for azaperone and 0.12 µg/kg for azaperol. For both analytes, the calibration curves showed linearity in the tested concentration range from 50 to 300 µg/kg of tissue. The accuracy of the presented method did not exceed 15%, and the recovery was in the range of 85–115%. A validated analytical procedure was implemented for the analysis of various animal tissues for their content of azaperone and azaperol.

**Keywords:** azaperone; azaperol; sedatives; high-performance liquid chromatography; animal kidneys; animal livers



**Citation:** Końska, I.; Kubalczyk, P. Development of the Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Azaperone and Azaperol in Animal Kidneys and Livers. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 100. <https://doi.org/10.3390/ijms24010100>

Academic Editors: Miguel Hueso and Alfredo Vellido

Received: 30 November 2022

Revised: 17 December 2022

Accepted: 19 December 2022

Published: 21 December 2022



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

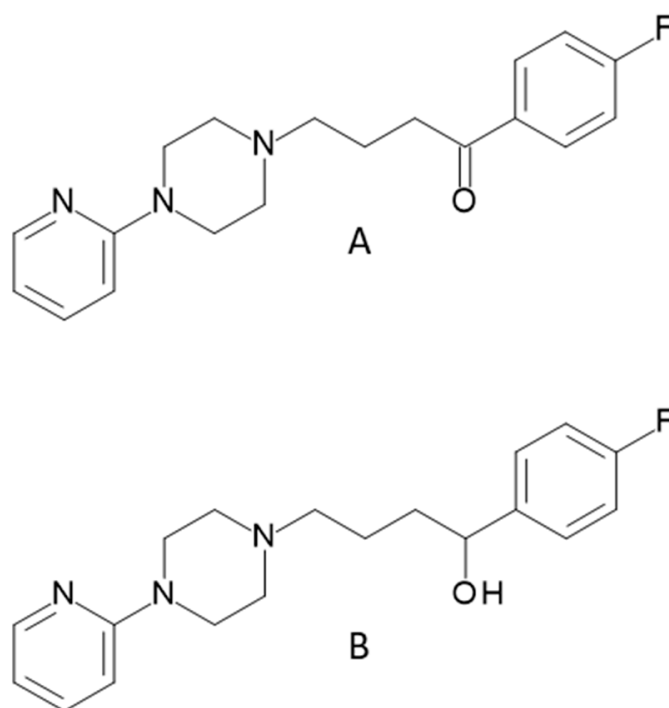
Among the drugs administered to animals, sedative drugs can be distinguished. They are administered to animals, mainly pigs, during transport to the slaughterhouse [1–4]. Pigs are extremely susceptible to stress, and breeders use these drugs to minimize the risk of animal death and to maintain a high quality of meat, because meat from stressed animals is very hard and tasteless [5]. Due to the widespread use of these compounds, drug residues are sometimes present in food. The reason for this is often nonadherence to the withdrawal period, when the administration of veterinary drugs has not been stopped for an appropriate amount time before the slaughter of the animal or the collection of, for example, eggs. Eating meat with residues of chemicals is dangerous to the health of the consumers [1,6,7]. The most commonly used sedative drug is azaperone (AZN) (Figure 1A), or 1-(4-fluorophenyl)-4-[4-(2-pyridin-yl)-1-piperazinyl]-1-butanone, belonging to the butyrophenones group [3].

In animals, AZN is reduced and metabolized to azaperol (AZL) [8] (Figure 1B).

As many as 10% of these compounds are believed to have neuroleptic strength, and the remaining 90% are subject to a maximum residue limit (MRL).



The MRL for AZN and AZL residues is 100 µg/kg for pig liver and kidneys according to the European Union Commission Regulation (EC) No. 1958/98 as an amendment to the Council Regulation (EEC) No. 2377/90 [8–10]. To identify meat from dishonest producers, it is very important to control the level of the residues of these drugs in the meat bought and eaten by consumers, and to check that the content of these compounds does not exceed the MRL level. For this reason, it is necessary to develop fast, cheap, sensitive, precise, and, above all, simple analytical methods that will enable the determination of AZN and AZL at low concentrations, using simple analytical tools that most laboratories are equipped with. This paper describes a method for the simultaneous determination of AZN and AZL in animal tissues. In the literature, methods are described that allow the determination of AZN in tissues by LC-MS-MS [1,5,6,11–13] and immunochromatographic assay (ICA) [14], in animal urine [6] and in tissues [8,15] with the use of LC-FLD, in biological fertilizer blood meal with the use of LLE-LC-MS [16], and in blood meal with the use of ASE and LC-Orbitrap MS [17]. In the method presented here, we decided to use the HPLC technique with UV-Vis detection because we want to develop a useful and universal method. We focused on simplifying the sample preparation procedure as much as possible, to allow this procedure to be reproduced by other scientists or units which would like to test meat quality, even in less sophisticated laboratories. Taking the above into account, the method presented stands out among other protocols described in the literature primarily because of its great usability, but also because of its simplicity while maintaining satisfactory validation parameters. This methodology is also not time consuming, which is an additional advantage of method here described.



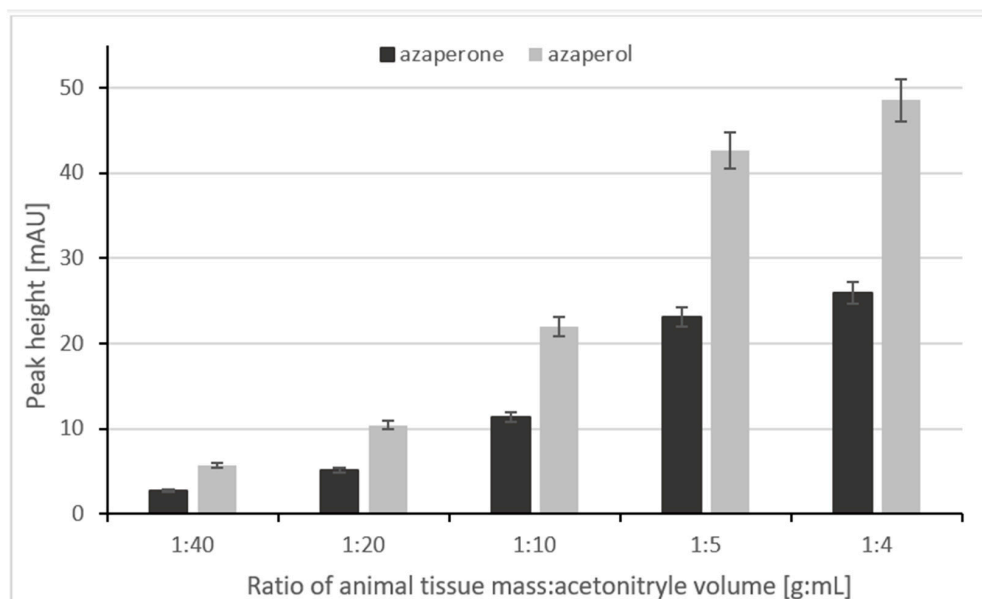
**Figure 1.** Structure of azaperone (A) and azaperol (B).

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Sample Preparation

#### 2.1.1. Optimization of the Ratio of Animal Tissue Mass to Acetonitrile Volume

During the optimization of homogenization step, different tissue mass to acetonitrile volume ratios were checked. The following ratios were selected for optimization: 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, and 1:40. It can be seen in the Figure 2 that the highest and the most reproducible signals were obtained when the kidney tissue sample was homogenized with acetonitrile in a ratio of 1:4.

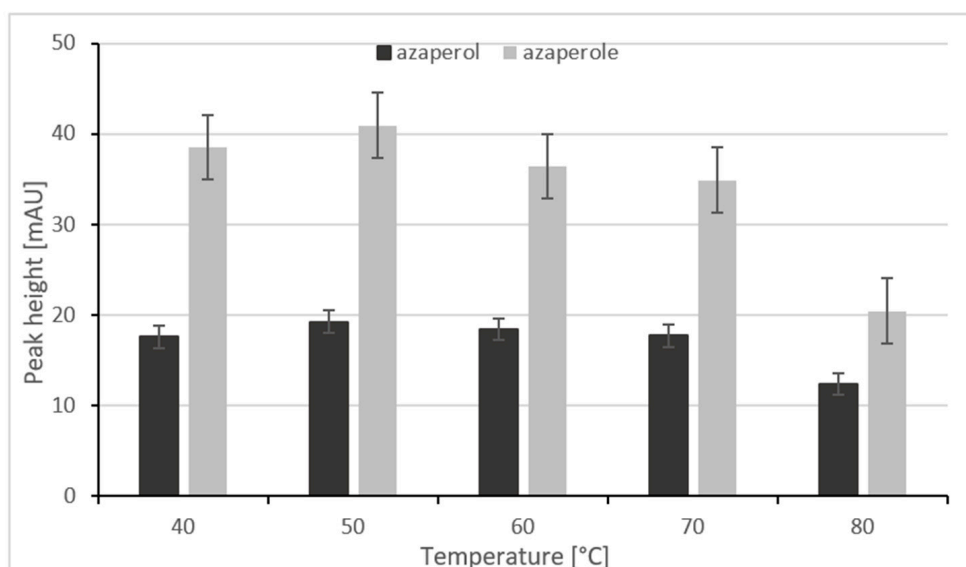


**Figure 2.** The relationship between peak height and the ratio of animal tissue mass to acetonitrile volume.

It can be assumed that a further increase in kidney mass in relation to the volume of acetonitrile would increase the signals even more; however, increasing the amount of meat prevented homogenization, because the sample was too dense. Therefore, a 1:4 ratio of tissue mass to acetonitrile volume was selected.

#### 2.1.2. Selection of the Lyophilization Temperature

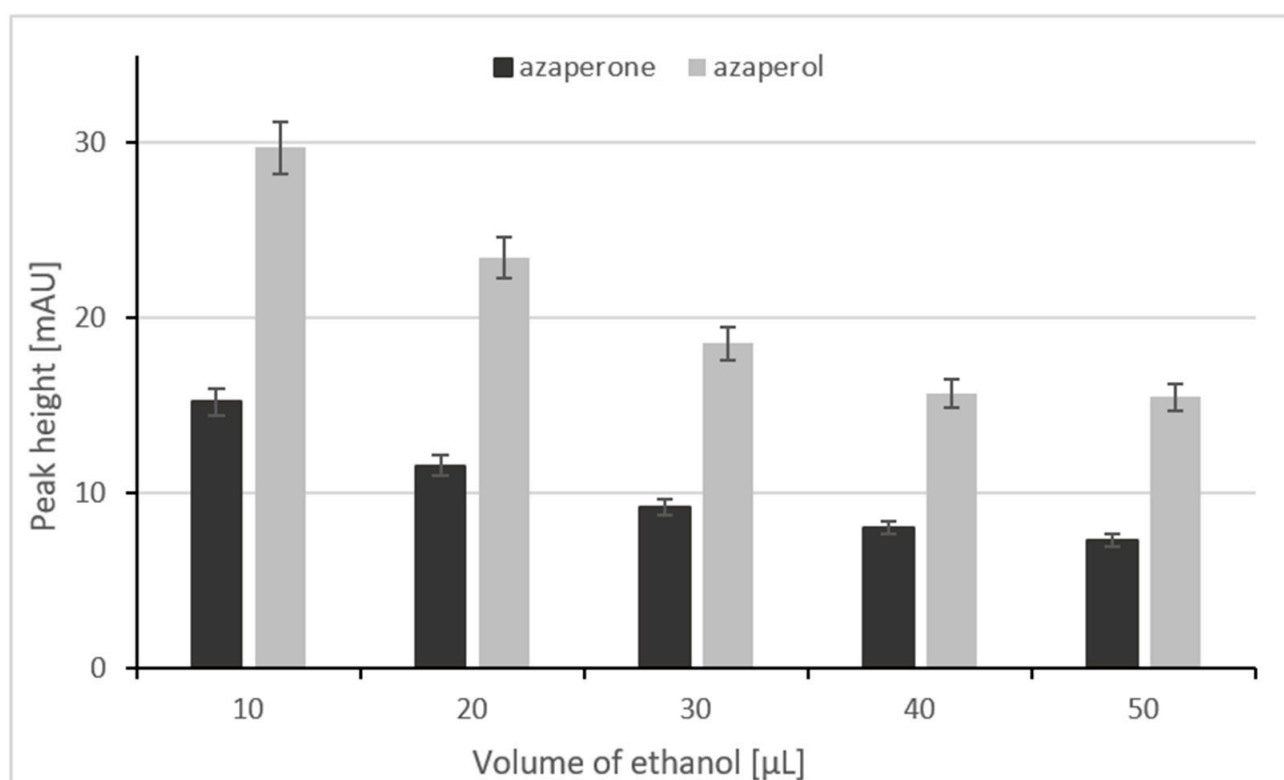
The next step was to choose the temperature of the samples lyophilization. The stability of AZN and AZL was checked at the following temperatures: 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, and 80 °C. The results depicted in the Figure 3 show that the analytes are stable at 40 °C and 50 °C, but that, above the temperature of 50 °C, the signals obtained from the analytes decrease. Another advantage of lyophilizing samples at 50 °C is the fact that the evaporation time is shortened (~20 min), and therefore the time required to complete the sample preparation is also shorter, which is extremely advantageous. Moreover, the results were better in this case, i.e., there were higher analytical signals and the reproducibility was satisfactory.



**Figure 3.** The relationship between the peak height and the temperature during lyophilization.

### 2.1.3. Optimization of Ethanol Volume after Lyophilization

In order to select the appropriate volume of ethanol to dissolve the residue after evaporation, the size of the analytical signal was checked in relation to the volume of the ethanol. For this purpose, the sample after evaporation was dissolved in 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{L}$ , and 50  $\mu\text{L}$  of ethanol. It was important to minimize this volume as much as possible to avoid excessive dilution of the sample, and, at the same time, to maintain a good reproducibility of the analytical signals. The highest signals were obtained for 10  $\mu\text{L}$  of ethanol; unfortunately, this volume is too small to repeatably mix the sample in a 2 mL Eppendorf tube. Hence, a small quantity of the evaporation residue can remain on the inner wall of the tube. When residue was dissolved in 20  $\mu\text{L}$  of ethanol, only a small decrease in the height of the analytical signal was observed (Figure 4); furthermore this greatly facilitates mixing. Finally, we decided to choose 20  $\mu\text{L}$  of the ethanol to efficiently dissolve the evaporation residue.



**Figure 4.** The relationship between the peak height and the volume of ethanol.

### 2.1.4. Optimization of Perchloric Acid Volume

PCA, trichloroacetic acid, or excess acetonitrile can be used to deproteinize the samples. Since PCA is one of the most popular deproteinization agents, we decided to use it in our methodology. This is a very important step in the sample preparation, because the proteins present in a sample could easily block the chromatography column. At the same time, it is essential not to add an unnecessary excess of deproteinizing reagent, as it further dilutes the sample, resulting in a poorer LOQ. For this purpose, we checked the volume of PCA at which complete deproteinization occurs. The following volumes of 3 mol/L PCA were tested: 5, 10, 15, 20, 25, and 30  $\mu\text{L}$ . After the addition of 15  $\mu\text{L}$  of PCA, we noticed that adding another volume of PCA did not cause further protein precipitation. Therefore, this volume of acid was selected for the experiments to avoid excessive dilution of the sample and ensure its complete deproteinization.

## 2.2. Chromatographic Conditions

One of the most used analytical techniques for the analysis of biological samples is reversed-phase liquid chromatography. Since the selection of the chromatographic conditions is crucial to the quality of the analyte separation, several parameters have been studied, including the type of mobile phase, pH, flow rate, gradient profile, and temperature.

### 2.2.1. Selection of Mobile Phase

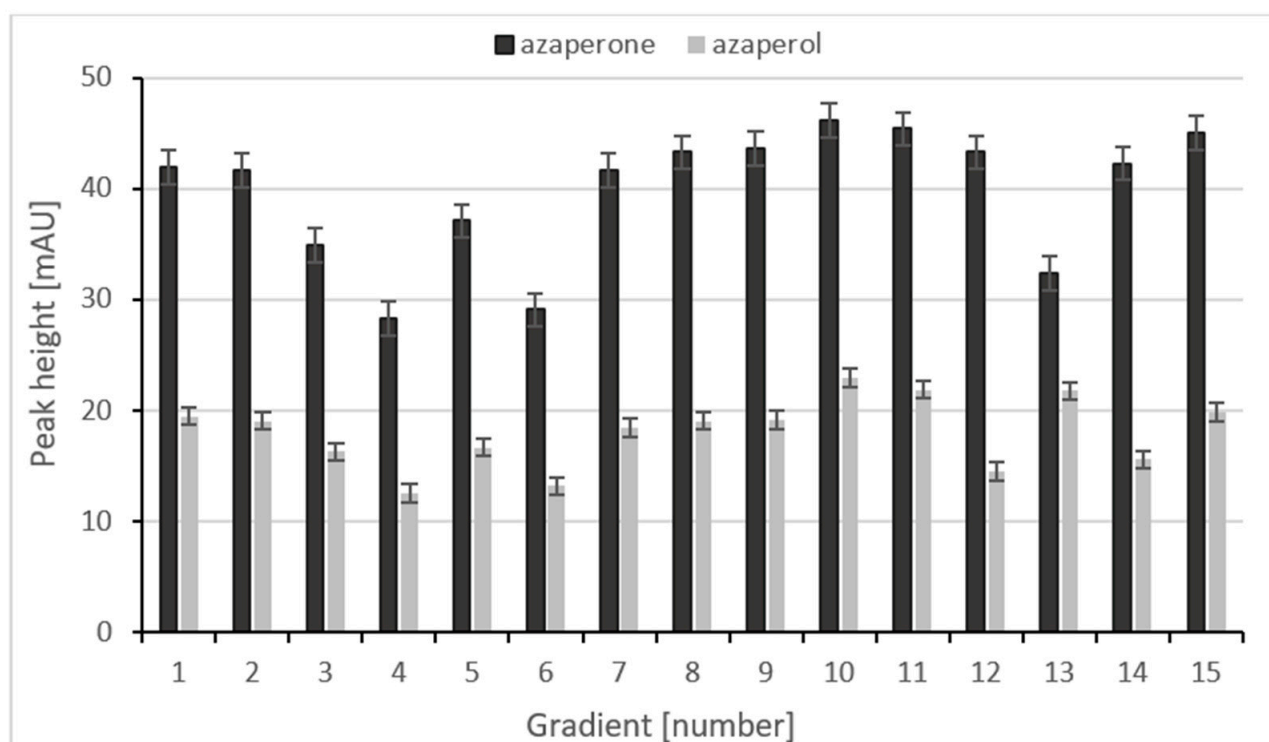
Various compositions of mobile phases were tested. As component A was tested: phosphate buffer, formic acid, and acetic acid in different pH. As component B was tested, acetonitrile was used in each case. It was observed that, for a phosphate buffer, the peaks are higher than otherwise. Therefore, we decided to perform a pH dependence of 0.05 mol/L phosphate buffer to check the effect of the pH of the mobile phase on the retention of the analytes. It was decided to use such a concentration of phosphate buffer because it is a concentration high enough to keep the pH of the mobile phase constant but also not high enough to crystallize in the column. The following pH values were verified in the buffering range of 0.05 mol/L phosphate buffer: 3, 6, 7, 8, 11, 12. The highest peaks and, at the same time, the most reproducible results of the analyses were obtained when a pH of 3 for the mobile phase was used. Therefore, 0.05 mol/L phosphate buffer with pH 3.00 (component A) and acetonitrile (component B) was chosen to serve as the mobile phase.

During the development of the method, both isocratic and gradient elution were considered. The chromatographic separation of AZN and AZL was achieved using gradient elution. When the isocratic elution was used, the peaks of the analytes did not separate from each other, and these peaks did not separate satisfactorily from other components of the sample. The best chromatographic separation of AZN and AZL was achieved using gradient elution. Several of the gradient profiles checked during development are presented in Table 1.

**Table 1.** Gradient profiles checked during development method.

Number of Gradient	Gradient Profile
1	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–50% B; 5–9 min, 50–15% B
2	0–0.5 min, 15% B; 0.5–4 min, 15–50% B; 4–9 min, 50–15% B
3	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–50% B; 5–6 min, 50% B; 6–9 min, 50–15% B
4	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–30% B; 5–9 min, 30–15% B
5	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–30% B; 5–7 min, 30–50% B; 7–10 min, 50–15% B
6	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–30% B; 5–6 min, 30% B; 6–10 min, 30–15% B
7	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–40% B; 5–10 min, 40–15% B
8	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–40% B; 5–7 min, 40–50% B; 7–10 min, 50–15% B
9	0–0.5 min, 15% B; 0.5–5 min, 15–40% B; 5–6 min, 40% B; 6–10 min, 40–15% B
10	0–7 min, 10–50% B; 7–9 min, 50–10% B
11	0–1 min, 10–15% B; 1–5 min, 10–15% B; 5–9 min, 50–10% B
12	0–0.5 min, 20% B; 0.5–5 min, 20–50% B; 5–9 min, 50–20% B
13	0–1 min, 20–30% B; 1–5 min, 30–50% B; 5–9 min, 50–20% B
14	0–1 min, 15–20% B; 1–5 min, 20–50% B; 5–9 min, 50–15% B
15	0–1 min, 20–30%; 1–5 min, 30–50% B; 5–9 min, 50–12% B

As can be seen in Figure 5, the use of the gradient profile 0–7 min, 10–50% B; 7–9 min, 50–10% B (gradient number 10) allows the highest analytical signals for both AZN and AZL. After a gradient run, the column was equilibrated with the starting concentration of the mobile phase for 1 min prior to the loading of next sample.



**Figure 5.** The relationship between the peak height and the gradient.

### 2.2.2. Optimization of Separation Temperature

The influence of the column temperature on the height of the analytical signals was checked. For this purpose, the column oven was heated to the following temperatures: 25 °C, 30 °C, 35 °C, and 40 °C. We realized that the changes in the column temperature did not significantly affect the height of the analytes' peaks or improve the separation, but merely led to narrower peaks and minimally shortened the analysis time. Therefore, all of the analyses were performed at room temperature.

### 2.3. Calibration and Other Validation Data

Validation parameters such as LOD, LOQ, the precision of the method, and its accuracy were determined in accordance with the FDA criteria for the analysis of biological samples [18]. The LOD and LOQ were determined experimentally using the signal-to-noise method. The concentration of an analyte that is equal to the LOD gives a signal three times higher than the baseline noise. The LOQ is the concentration of an analyte for which the signal height corresponds to nine times the height of the baseline noise. The LOD values evaluated for AZN and AZL were 1.0 µg/kg tissue and 0.4 µg/kg tissue, respectively. The LOQ values were 2.5 µg/kg for AZN and 1.2 µg/kg for AZL. Both the LOD and LOQ values for the method are lower than the MRL, which will allow the determination of the analytes at concentration levels similar to the MRL. The LOD and LOQ are similar to those in the LC-MS/MS method [1], and lower than those in the LC-MS/MS [7], LC-FLD [8], and LC-UV [8] methods. Detailed data are presented in Table 2.

Calibration curves for AZN and AZL in meat tissues were constructed for five concentrations in the range from 50, 75, 100, 200, and 300 µg/kg of tissue, and each series was performed in triplicate. The concentrations were selected in such a way that the calibration curve would allow us to estimate whether a given meat sample exceeds the MRL. The calibration curves obtained by the method described showed linearity in the whole concentration range studied. The square of the linear correlation coefficient ( $R^2$ ) for AZN was 0.9985, and that for AZL  $R^2$  was 0.9991. The equation of the calibration curve for AZN was  $y = (0.0222 \pm 0.0005)x + (0.2904 \pm 0.0843)$ , while for AZL it was  $y = (0.0510 \pm 0.0009)x + (1.1217 \pm 0.1484)$ .

**Table 2.** Comparison the LOD, LOQ, R<sup>2</sup>, precision and accuracy values of the described method with published methods.

Method	LOD (µg/kg)		LOQ (µg/kg)		R <sup>2</sup>	Precision [%]	Accuracy [%]
	AZN	AZL	AZN	AZL			
LC-MS/MS [2]	0.06–0.1	0.1	0.2–0.4	0.4	>0.99	<15	74.2–91.8
LC-MS/MS [7]	0.5	0.5	2.5	2.5	0.9826–0.9965	1.1–16.6	69.8–85.5
LC-FLD [8]	10	3	10	5	>0.99	<11.0	88.2–91.2
LC-UV [15]	1	no data	no data	no data	0.997	0.6–14.6	97.0–112.9
Presented method	1.0	0.4	2.5	1.2	0.9985–0.9991	2.6–9.9	93.4–109.5

The coefficient of variation (CV) of the points on the calibration curve for AZN was in the range from 0.8 to 10.6%, and that for AZL was from 0.7 to 5.3%. The recovery was in the range from 97.1% to 107.3% for AZN, and from 96.4 to 105.1% for AZL. The values that describe the calibration curves are consistent with the FDA criteria required for the analysis of biological samples [18]. The next step in the research was to check the intra-day and inter-day precision and accuracy of the method. For this purpose, three concentrations were selected (the first concentration represented the beginning of the calibration curve, the middle concentration was taken from the middle of the calibration curve, and the third concentration was near the end of the calibration curve). Meat tissue samples were prepared at the concentrations indicated above. The method precision for AZN and AZL does not exceed 15%, while the method accuracy is in the range of 85–115%. These values are at satisfactory levels; moreover, taking into account the simplicity of the sample preparation step, we believe that the method we developed can be used to determine the content of AZN and AZL in routine analyses of meat tissues. Any laboratory with basic equipment would be able to perform such analyses. All of the validation data are presented in Table 3.

**Table 3.** Validation data.

Added * [µg/kg]	Intra-Day			Inter-Day		
	Found ± SD [µg/kg]	CV [%]	Accuracy [%]	Found ± SD [µg/kg]	CV [%]	Accuracy [%]
	Azaperone					
80	78.51 ± 2.60	3.3	98.1	81.51 ± 4.50	5.5	101.9
150	156.59 ± 5.20	3.3	104.4	158.09 ± 4.50	2.9	105.4
250	273.71 ± 18.20	6.7	109.5	257.19 ± 20.64	8.0	102.9
	Azaperol					
80	74.74 ± 4.93	6.6	93.4	75.39 ± 6.30	8.4	94.2
150	159.05 ± 9.06	5.7	106.0	151.21 ± 11.32	7.5	100.8
250	272.12 ± 7.07	2.6	108.9	257.74 ± 25.59	9.9	103.1

\* n = 3.

An unquestionable advantage of the described analytical procedure is the simplicity of the sample preparation. During the development of the sample preparation procedure, the focus was on its usability. The procedure for the sample preparation was developed in such a way that this method could be used in any analytical laboratory where meat is tested; therefore, the method is simple and also not very time consuming. The total sample preparation time is 45 min; however, it should be taken into account that, during this time, as many samples can be prepared as the number of available places in the centrifuge and lyophilizer rotor allows (in the case of our laboratory where the procedure was developed, this is 48 samples at one time). Analyses of meat tissues for their AZN and AZL content using the method described require less time than those using the previously described LC-MS/MS [19], SPE-LC-MS/MS [2,20], and LLE-LC-MS/MS methods [21].

Despite the many advantages of this method, it has disadvantages, too. Its weaknesses include, above all, the use of large volumes of the toxic solvent acetonitrile, as well as a small concentration sensitivity when using UV-Vis detection that requires concentrating the sample. Table 4 contains the basic parameters describing a similar method taken from the literature [22] and the method presented here. However, the data in the Table 4 show that, despite having fewer steps in its preparation of samples, our methodology yielded more satisfactory LOD results.

**Table 4.** Comparison of the presented method with a similar method described in the literature.

	Method Described in the Literature [22]	Presented Method
Mobile phase	acetonitrile—0.025% aqueous diethylamine mixture (2:3, <i>v/v</i> )	0.05 mol/L phosphate buffer pH 3 (component A) and acetonitrile (component B)
Column/Stationary phase	ODS column (Asahipak ODP-50 4D, 150 mm × 4.6 mm, Showa Denko K.K., Kanagawa, Japan)	Zorbax SB C-18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent Technologies).
Linearity	0.05–2 μg/mL	50–300 μg/kg of tissue
Applications	Tissues analysis	Tissues analysis
Merits	the method is applicable, good accuracy and precision, confirmation with LC/MS	not time consuming, easy to perform, does not require sophisticated equipment, good accuracy, good precision, lower LOD
Demerits	more steps in sample preparation, higher LOD, large volumes of toxic acetonitrile, UV-Vis detection (small concentration sensitivity)	large volumes of toxic acetonitrile, UV-Vis detection (small concentration sensitivity)

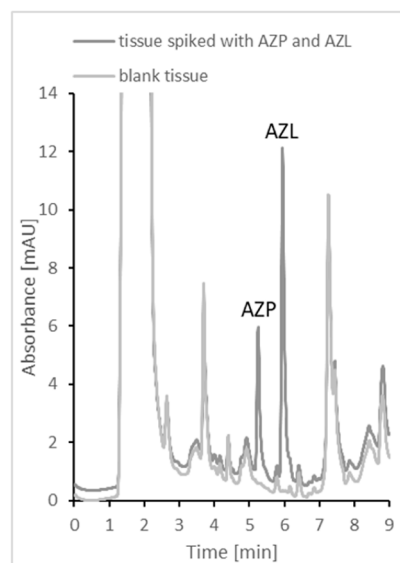
#### 2.4. Application to Real Samples

The validated procedure described in this paper was used to determine AZN and AZL in meat tissues, i.e., pork kidneys and livers. Samples 1–6 are kidneys, and samples 7–10 are livers. All samples were purchased from local meat breeders. The tissue samples were spiked with a known amount of AZN and AZL to give a concentration of 230 μg/kg tissue for both analytes and prepared as described in the “Sample collection and preparation” section. The samples were then analyzed using HPLC. All data presented the results of the assays are summarized in Table 5. The results obtained and collected in Table 3 indicate that the described methodology can be successfully used for routine analysis of meat for its content of AZP and AZL. The results thus obtained are repeatable and consistent. Representative chromatograms obtained for the tissue sample and the spiked tissue sample are shown in Figure 6. In developing this method, we used a large number of different animal tissue samples that had been purchased over a long period of time, and we did not notice any interference. Azaperone is the sedative drug most commonly used in animals for this purpose. Unfortunately, we do not have standards for other drugs in this group to check their potential interference. However, it is very unlikely that an animal would receive several sedatives at the same time. In addition to sedatives, farm animals may also receive other medications, including antibiotics, such as fluoroquinolones, to treat infections or prevent them. Several of these drugs (i.e., ofloxacin and ciprofloxacin) were checked by us for potential chromatogram interference, and we did not notice any. However, if the tissue samples contain a large number of interfering agents, a modification of the extraction step could be necessary during sample preparation. The CV values do not exceed 15%. This method can be successfully applied to the analysis of real samples for AZN and AZL content.

**Table 5.** Determination of AZN and AZL in tissues (livers, kidneys)—results.

Sample Number	Added * [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Found $\pm$ SD [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	CV [%]
Azaperone			
1	230.00	218.15 $\pm$ 9.38	4.3
2	230.00	222.65 $\pm$ 2.60	1.2
3	230.00	225.66 $\pm$ 4.50	2.0
4	230.00	214.40 $\pm$ 3.19	1.5
5	230.00	227.16 $\pm$ 2.60	1.1
6	230.00	225.66 $\pm$ 7.80	3.5
7	230.00	236.17 $\pm$ 5.20	2.2
8	230.00	222.65 $\pm$ 6.88	3.1
9	230.00	234.67 $\pm$ 13.51	5.8
10	230.00	212.14 $\pm$ 7.80	3.7
Azaperol			
1	230.00	225.06 $\pm$ 7.84	3.5
2	230.00	225.06 $\pm$ 7.07	3.1
3	230.00	223.10 $\pm$ 10.38	4.7
4	230.00	217.22 $\pm$ 8.32	3.8
5	230.00	223.10 $\pm$ 3.92	1.8
6	230.00	221.80 $\pm$ 9.67	4.4
7	230.00	234.21 $\pm$ 6.30	2.7
8	230.00	217.22 $\pm$ 5.55	2.6
9	230.00	234.21 $\pm$ 6.30	2.7
10	230.00	213.30 $\pm$ 3.92	1.8

\* n = 3.

**Figure 6.** Representative chromatograms of blank tissue and tissue spiked with AZP and AZL (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tissue). Chromatographic conditions are as described in Section 3.3.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Instruments

The Agilent 1220 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled with the diode-array detector and equipped with a binary pump, degasser, automatic injector, and column oven was used to perform all of the experiments. Separation was performed on the Zorbax SB C-18 chromatographic column (150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The peaks corresponding to the analytes were assigned by comparing both the diode-array spectra and the retention times recorded for the real samples with the matching set of data achieved for authentic compounds. For instrument control, data acquisition, and quantitative analysis, the OpenLAB ChemStation



Edition software was used. The Millipore Milli-Q-RG System (Waterford, Ireland) deionizer was used for water purification. Deionized water (Type 1) was obtained with a resistivity of 18 k $\Omega$ ·cm at 25 °C. The water was filtered using a membrane filter with a pore diameter of 0.22  $\mu$ m. The pH meter (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) was used to adjust the pH of the buffer solutions, for proteins removal a centrifuge with a fast cooling function (Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) was applied, and the Labconco CentriVap (Kansas, MO, USA) was used to lyophilize the samples.

### 3.2. Chemicals

The standards of the analytes, i.e., azaperone (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>3</sub>O) and azaperol (C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O) were from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Sodium phosphate dibasic (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), sodium dihydrogen phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), trisodium phosphate (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), and acetonitrile were purchased from Sigma (Steinheim, Germany). Perchloric acid (HClO<sub>4</sub>) and ethanol (99.8%) were obtained from POCH (Gliwice, Poland).

### 3.3. Chromatographic Conditions

For the chromatographic separation of AZN and AZL, a reversed-phase Zorbax SB C-18 (150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) column was applied. The mobile phase consisted of 0.05 mol/L phosphate buffer pH 3 (component A) and acetonitrile (component B). The chromatographic separation of AZN and AZL from the other components of the sample was achieved using gradient elution: 0–7 min 10–50% B; 7–9 min 50–10% B. All analyses were performed with a constant flow rate of the mobile phase of 1 mL/min and at room temperature. UV-Vis detection at 245 nm for both analytes was used. The peaks were identified through the comparison of the retention times and the diode-array spectra, taken at the real time of the analysis, with the corresponding set of data obtained by analyzing authentic compounds.

### 3.4. Sample Collection and Preparation

Animal tissues, such as kidneys, were purchased at markets and local stores. To prepare each sample, 0.5 g of tissue was placed in a 3 mL polypropylene tube with 2 mL of acetonitrile and homogenized. The homogenate was centrifuged at 13,680  $\times$  g (12,000 rpm) for 15 min, and then the supernatant was collected and transferred to a 2 mL polypropylene tube. The sample was lyophilized at 50 °C, which led to the evaporation of acetonitrile, and then the residue was dissolved in 20  $\mu$ L of ethanol. For deproteinization, 15  $\mu$ L of PCA was added, the sample was centrifuged at 13,680  $\times$  g (12,000 rpm) for 10 min, and then 25  $\mu$ L of supernatant solution was collected in chromatographic vial. Finally, 5  $\mu$ L of the sample prepared in this way was injected into the column and analyzed using HPLC.

### 3.5. Method Validation

After the optimization of all parameters, the method was validated. The validation parameters, such as the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), and the precision and accuracy of the method, were determined according to the Food and Drug Administration (FDA) criteria for analytical procedures and method validation [18].

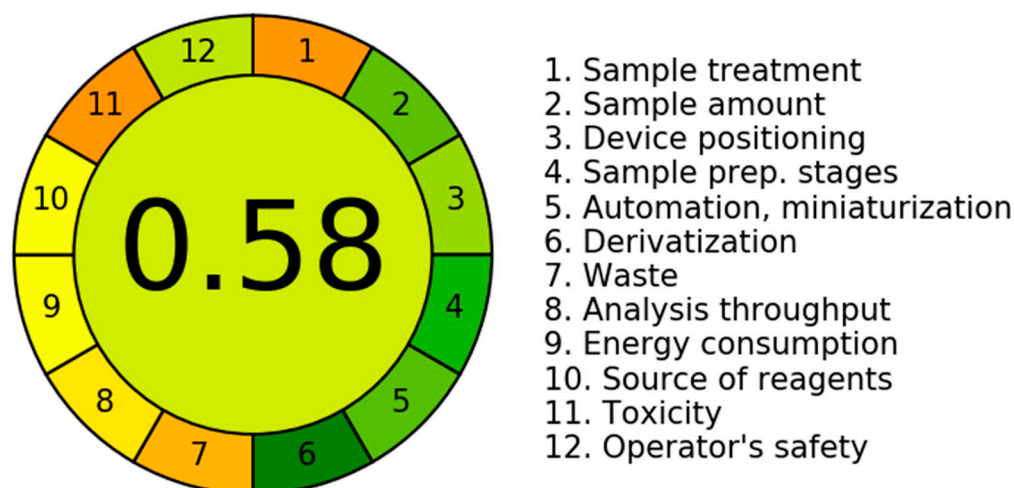
### 3.6. Calibration of the Method

Stock solutions of 1 mg/mL AZN and AZL were prepared by dissolving appropriate amounts of the compounds in 1 mL of ethanol. To perform the calibration, standard solutions were prepared in three series in the concentration range of 50–300  $\mu$ g/kg tissue. Calibration solutions were prepared according to the following procedure: 0.5 g of kidney tissue was placed in a polypropylene tube with 2 mL of acetonitrile, and then the sample was homogenized and spiked with an ethanolic solution of the analytes in an appropriate concentration. The homogenate was centrifuged at 13,680  $\times$  g (12,000 rpm) for 15 min, and next, the supernatant was transferred to a 2 mL polypropylene tube. Each sample was lyophilized at 50 °C, and then the evaporation residue was dissolved in 20  $\mu$ L of ethanol. Subsequently, 15  $\mu$ L of PCA was added for deproteinization, the sample was centrifuged

and 25  $\mu\text{L}$  of supernatant solution was collected, and 5  $\mu\text{L}$  of the sample was injected into a chromatographic column and analyzed. After the analysis, the peak heights of AZN and AZL were plotted against the corresponding concentrations of analytes and the calibration curves were fitted using a least-squares linear regression analysis.

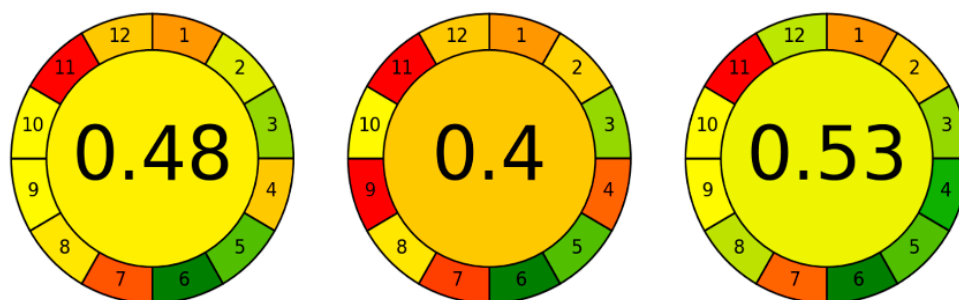
### 3.7. Greenness

Green analytical chemistry focuses on making analytical procedures more environmentally benign and safer to humans [23]. We decided to check how the proposed method looks in this regard. We used very smart software dedicated for this purpose, i.e., the Analytical GREENness calculator for the assessment of greenness of analytical procedures based on the SIGNIFICANCE principles [23]. The calculated greenness of the presented method is 0.58 (Figure 7). Our procedure is based on combined sample homogenization and analytes extraction and on the separation of analytes by HPLC with UV detection. The procedure consisted of an external sample treatment with a reduced number of steps (principle 1), and 0.5 g of tissue sample is needed (principle 2). The measurement is off-line (principle 3), and the procedure involves four distinct steps, such as homogenization, lyophilization, centrifugation, and separation (principle 4). The procedure is semi-automated and miniaturized (principle 5). During the analysis, no derivatization step was required (principle 6). The analytical wastes include 2 mL of acetonitrile for homogenization, 20  $\mu\text{L}$  of ethanol for dilution, 15  $\mu\text{L}$  of PCA for deproteinization, and 10.1 mL (including 2.9 mL of acetonitrile) of the HPLC mobile phase (principle 7). Two analytes are determined in a single run, and the sample throughput is  $\sim 4$  samples per hour, if we assume that about 48 samples can be prepared simultaneously (principle 8). The lyophilization system is the most energy-demanding analytical technique in our protocol (principle 9). Some of the reagents can be obtained from bio-based sources (principle 10). The procedure requires 4.9 mL of toxic solvents (principle 11), and acetonitrile is considered explosive (fumes) and highly flammable (principle 12).



**Figure 7.** Calculated greenness of the method.

An important question to ask is whether our methodology is better or worse in terms of greenness compared to other methods for the determination of azaperone and azaperol in animal tissues. Unfortunately, in the works compared, the authors do not specify the degree of greenness of their procedures. Therefore, we tried to estimate the greenness of these methods using a dedicated calculator and the data available in the articles. As can be seen on Figure 8, our methodology (score 0.58) is comparable in terms of greenness to the HPLC-FL (score 0.53) method [8] and better than the HPLC-MS/MS (score 0.40) [5] and HPLC-UV (score 0.48) [22] methods.



**Figure 8.** Comparison of greennesses of the methods, from the left [5,8,22].

Our procedure achieved a better score, mainly because it does not use a complicated and multi-step liquid-liquid extraction or SPE. Efforts should continue to be made to improve procedures in order to offset their negative impacts on the environment and human health.

#### 4. Conclusions

A simple and cheap chromatographic procedure has been developed to simultaneously determine AZN and AZL in meat tissues. The preparation of the tissue samples is very quick and involves sample homogenization and deproteinization, as well as concentration of the analytes. The procedure is simple and does not require sophisticated equipment; it is based on HPLC separation with UV-Vis detection. Both the sample preparation, and the chromatographic analysis cause this method to stand out among other HPLC methods for determining these analytes in animal tissues. Apart from its simplicity and speed of execution, the method presented is characterized by high sensitivity and precision. Due to the very high precision and accuracy of the method, we strongly believe that it can be used in the future for the routine analysis of meat for its content of azaperone, which is very often administered to animals, and its metabolite azaperol. The described method can be used both in veterinary medicine and in food safety testing. Since eating the residues of these compounds with meat when the withdrawal period has not been respected is hazardous to the health of consumers, the method may be helpful in protecting human health.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.K. and P.K.; methodology, I.K. and P.K.; software, I.K. and P.K.; validation, I.K. and P.K.; formal analysis, I.K. and P.K.; investigation, I.K. and P.K.; resources, I.K. and P.K.; data curation, I.K.; writing—original draft preparation, I.K. and P.K.; writing—review and editing, I.K. and P.K.; visualization, I.K. and P.K.; supervision, P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** HPLC data are available from the authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. He, L.; Wang, J.; Zhang, G.; Liu, R.; Fang, B. Simultaneous Determination of Tranquilizers and Carazolol Residues in Swine Tissues by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Bioanalytical* **2012**, *45*, 1377–1389. [[CrossRef](#)]
2. Brian, K.; O'Mahony, J.; Malone, E.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Furey, A.; Danaher, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A* **2000**, *1216*, 7977–8015. [[CrossRef](#)]
3. Scarth, J.P.; Tealea, P.; Kuuranne, T. Drug metabolism in the horse: A review. *Drug Test Anal.* **2011**, *3*, 19–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mendoza, F.J.; Perez-Ecija, A.; Toribio, R.E. Clinical Pharmacology in Donkeys and Mules. *Vet. Clin. Equine.* **2019**, *35*, 589–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Fluchard, D.; Kiebooms, S.; Dubois, M.; Delahaut, P. Determination of a method for detecting and quantifying azaperone, azaperol and carazolol in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2007**, *44*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sell, B.; Posyniak, A.; Gbylik, M. Screening procedure for simultaneous determination of azaperone, carazolol, and chlorpromazine in animal urine. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. **2011**, *55*, 513–517.
7. Oliveira, L.G.; Barreto, F.; Hoff, R.; Rübensam, G.; Scherer Kurz, M.H.; Galle, G.; Gonçalves, F.F. Validation of a method for sedatives and  $\beta$ -blockers determination in swine, bovine and equine kidney using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2017**, *34*, 32–39. [[CrossRef](#)]
8. Cerkvenik-Flajs, V. Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *586*, 374–382. [[CrossRef](#)]
9. De Brabander, H.F.; Noppe, H.; Verheyden, K.; Bussche, J.V.; Wille, K.; Okerman, L.; Vanhaecke, L.; Reybroeck, W.; Ooghe, S.; Croubels, S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7964–7976. [[CrossRef](#)]
10. Stolker, A.A.M.; Brinkman, U.A.T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—A review. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 15–53. [[CrossRef](#)]
11. Oca, M.L.; Rubio, L.; Ortiz, M.C.; Sarabia, L.A.; García, I.; Bañuelos, M.; Burgos, S. Robustness testing in the determination of seven drugs in animal muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2016**, *151*, 172–180. [[CrossRef](#)]
12. Bock, C.; Stachel, C.S. Development and validation of a confirmatory method for the determination of tranquilisers and a  $\beta$ -blocker in porcine and bovine kidney by LC-MS/MS Development and validation of a confirmatory method for the determination of tranquilisers and a  $\beta$ -blocker in porcine and bovine kidney by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam: Part A* **2013**, *30*, 1000–1011. [[CrossRef](#)]
13. Mitrowska, K.; Posyniak, A.; Zmudzki, J. Rapid method for the determination of tranquilizers and a beta-blocker in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2009**, *637*, 185–192. [[CrossRef](#)]
14. Chen, L.; Hu, X.; Xing, Y.; Sun, Y.; Hu, M.; Zhang, G. Highly sensitive immunochromatographic assay for simultaneous determination of azaperone and azaperol in pork. *Food Chem.: X* **2023**, *17*, 100525. [[CrossRef](#)]
15. Keukens, H.J.; Aerts, M.M.L. Determination of residues of carazolol and a number of tranquilizers in swine kidney by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **1991**, *464*, 149–161. [[CrossRef](#)]
16. Choi, J.H.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; Park, J.H.; Rahman, M.M.; El-Aty, A.M.A.; Spitteller, M.; Shim, J.H. Determination of anxiolytic veterinary drugs from biological fertilizer blood meal using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 751–759. [[CrossRef](#)]
17. Choi, J.-H.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; Park, K.H.; Shim, J.-H.; Spitteller, M. Determination of sedatives and adrenergic blockers in blood meal using accelerated solvent extraction and Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1260*, 111–119. [[CrossRef](#)]
18. FDA. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations*; FDA: Washington, DC, USA, 2018.
19. Delahaut, P.; Levaux, C.; Eloy, P.; Dubois, M. Validation of a method for detecting and quantifying tranquilisers and a-blocker in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2003**, *483*, 335–340. [[CrossRef](#)]
20. Delahaut, P.; Brasseur, P.Y.; Dubois, M. Multiresidue method for the detection of tranquilisers, xylazine, and a  $\beta$ -blocker in animal production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1054*, 373–378. [[CrossRef](#)]
21. Sun, L.; Zhang, L.; Xu, Q.; Wang, S.; Wang, X. Determination of ten sedative residues in pork and kidney by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese J. Chromatogr.* **2010**, *28*, 38–42. [[CrossRef](#)]
22. Aokia, Y.; Hakamatab, H.; Igarashia, Y.; Uchidaa, K.; Kobayashia, H.; Hirayamaa, N.; Kotanib, A.; Kusu, F. Simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal tissues by HPLC with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 166–172. [[CrossRef](#)]
23. Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 10076–10082. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publikacja D4: **I. Kośka**, P. Kubalczyk, M. Cichomski, A. Kisielewska, *The application of extraction on C18-silica-modified magnetic-nanoparticles in the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues*, *Molecules*, 28 (2023) 6123.

Podczas opracowania ostatniej metody analitycznej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej skupiłam się na zastosowaniu ekstrakcji na nanocząstkach magnetycznych ze zmodyfikowaną powierzchnią za pomocą krzemionki, a dodatkowo z przyłączonymi do niej łańcuchami C-18. Takie podejście umożliwiło selektywną ekstrakcję wybranych FQLs w tkankach mięsnych, a ponadto uproszczenie matrycy próbki i znaczące zateżenie analitów. Czyni to metodę bardzo użyteczną w połączeniu z technikami separacyjnymi, które wyróżniają się ograniczoną czułością jak np. CE, ale również innymi technikami analitycznymi jak chociażby popularna HPLC. Taki typ ekstrakcji można porównać do typowej ekstrakcji do fazy stałej, jednak złoże kolumnienek jest w tym przypadku zamienione na nanocząstki magnetyczne (MPs), a same kolumnienki mogą tutaj być zastąpione tradycyjnymi próbkami polipropylenowymi. Zaletami takiego podejścia jest przede wszystkim fakt, że nie wymaga ono wyspecjalizowanych narzędzi, a próbki polipropylenowe znajdują się w niemal każdym laboratorium. Inną zaletą może być to, że ekstrakcję SPE przeprowadza się głównie z wykorzystaniem pompy próżniowej, natomiast magnetyczna ekstrakcja wymaga jedynie posiadania tanich i łatwo dostępnym magnesów.

Przygotowanie nanocząstek prowadziłam we współpracy z pracownikami Katedry Technologii i Chemii Materiałów Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, według procedury opracowanej przez zespół T. Baciū [117]. Pierwszy etap syntezy obejmował modyfikację powierzchni nanocząstek  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  za pomocą krzemionki. W tym celu 1 g sześciennych nanocząstek  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o średniej średnicy 50-100 nm zdyspergowaliśmy w 100 ml mieszaniny izopropanol/woda dejonizowana (90:10, v/v) stale mieszając pod strumieniem  $\text{N}_2$ , a pH roztworu doprowadziliśmy do 9 za pomocą 1,5 mol/l roztworu amoniaku, po czym wkropliliśmy 5 ml ortokrzemianu tetraetylu. Mieszanie kontynuowaliśmy w temperaturze pokojowej przez 16 godzin, a następnie ogrzewaliśmy do temperatury 50 °C przez dodatkowe 8 godzin. Otrzymane MPs pokryte krzemionką przemywaliśmy wodą dejonizowaną, izopropanolem, a następnie suszyliśmy próżniowo przez noc. W kolejnym kroku przeprowadziliśmy modyfikację łańcuchami C18 krzemionki pokrywającej powierzchnię MPs. W tym celu 0,5 g powlekanych krzemionką MPs zdyspergowaliśmy w 100 ml mieszaniny dimetyloformamid/toluen (80:20, v/v) w strumieniu  $\text{N}_2$ , stale mieszając. Następnie wkropliliśmy 10 ml trimetoksyoktadecylosilanu i roztwór pozostawiliśmy do mieszania na

24 godziny w temperaturze pokojowej. Na koniec gotowe sfunkcjonalizowane cząstki magnetyczne przemyliśmy trzy razy toluenem i suszyliśmy pod próżnią przez noc. Otrzymane w ten sposób MPs zastosowałam do eksperymentów w celu opracowania warunków przygotowania próbki tkanki mięsnej do oznaczania Cpx oraz Ofx. Zoptymalizowałam następujące parametry ekstrakcji: masę MPs, czasy adsorpcji oraz desorpcji, a także objętość rozpuszczalnika potrzebną do desorpcji analitów.

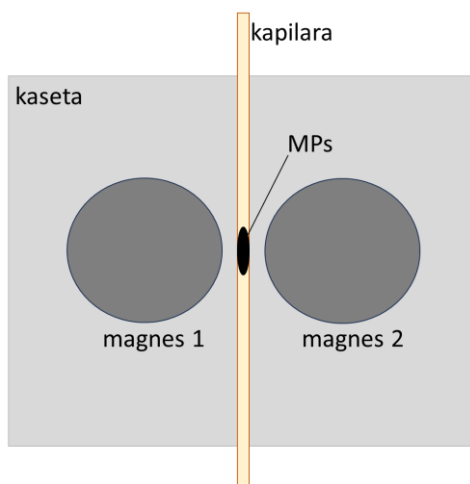
W celu przygotowania próbki tkanki mięsnej do analizy, początkowo przeprowadzałam homogenizację tkanki (parametry homogenizacji zaczerpnięto z D1) w celu jej przeprowadzenia w ciekły stan skupienia. 0,2 g tkanki umieszczałam w 3 ml próbówce polipropylenowej z 2 ml 0,2 mol/l buforu fosforanowego (pH 7) i homogenizowałam. Mieszaninę następnie odwirowałam przy  $13680 \times g$  (12000 obr./min) i zebrałam supernatant do poddania dalszej procedurze. Dla każdej próbki odważyłam po 30 mg MPs i umieściłam w próbówce polipropylenowej. Następnie do MPs dodawałam 1,5 ml metanolu i wytrząsałam przez 5 min w celu kondycjonowania powierzchni MPs. W następnym etapie metanol zebrałam i dodawałam 1,5 ml H<sub>2</sub>O i wytrząsałam przez 2 min, a po usunięciu wody dodawałam 1,5 ml wcześniej przygotowanego roztworu tkanki. Adsorpcję analitu prowadziłam przez 30 min, następnie usunęłam roztwór próbki i MPs wysuszyłam do sucha. W celu desorpcji analitu do MPs dodawałam 800 µl mieszaniny 0,1 mol/l HCl:ACN (1:1 v/v) i wytrząsałam przez 20 min. Tak przygotowaną próbkę kolejno pobierałam do próbki polipropylenowej i odparowałam do sucha wykorzystując koncentrator, następnie pozostałość po odparowaniu rozpuszczałam w 50 µl 0,002 mol/l HCl, po czym poddawałam analizie elektroforetycznej. Pomimo faktu, że FQLs najlepiej rozpuszczają się w 0,1 mol/l HCl, pozostałość po odparowaniu musiałam rozpuścić w roztworze HCl o znaczenie niższym stężeniu t.j. 0,002 mol/l ze względu na konieczność zmniejszenia przewodnictwa próbki w celu poprawy wyników analizy CE. Warunki elektroforetyczne zaczerpnęłam z poprzednio opracowanych metod, a więc jako BGE zastosowałam 0,1 mol/l bufor fosforanowo-boranowy o pH 8,4. Napięcie, które zastosowałam w celu separacji wynosiło 16 kV, a temperatura kapilary 23 °C. Hydrodynamiczne wprowadzanie roztworu próbki prowadziłam pod ciśnieniem 25 mbar przez 10 s. Natomiast w detekcji UV-Vis wykorzystywałam różne analityczne długości fal, odpowiednio 271 nm dla Cpx i 285 nm dla Ofx.

Opracowaną metodę poddałam w kolejnym kroku walidacji. Skonstruowałam pięciopunktową krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń od 2 do 10 nmol/g tkanki. Wybrałam taki zakres stężeń, aby MRL analitów w mięsie znajdował się w środku zakresu krzywej

kalibracyjnej. Otrzymane krzywe kalibracyjne wykazywały liniowość w badanym zakresie stężeń. Precyzja punktów krzywej kalibracyjnej dla Cpx mieściła się w zakresie od 3,1 do 9,3%, a punktów krzywej kalibracyjnej dla Ofx w zakresie od 0,5 do 7,9%. Dokładność metody dla Cpx mieściła się w zakresie od 97,3% do 103,4%, a dla Ofx od 98,0% do 101,7%. Aby zbadać precyzję wewnątrz i międzydniową, wybrałam trzy stężenia z zakresu krzywej kalibracyjnej. Pierwsze stężenie (3 nmol/g tkanki) z początku zakresu krzywej kalibracyjnej, kolejne stężenie (5 nmol/g tkanki), które odpowiadało stężeniu z środka zakresu krzywej kalibracyjnej, a końcowe stężenie odpowiadało końcu krzywej kalibracyjnej (9 nmol/g tkanki). Zarówno precyzja (RSD 3-11%) i dokładność (w zakresie 93-110%) metody oraz inne jej parametry są zgodne z kryteriami zawartymi w przewodniku FDA [113] dla analiz próbek biologicznych, co potwierdza użyteczność opracowanej procedury do analizy próbek mięsnych na zawartość FQLs.

Uzyskane w trakcie badań wyniki są bardzo pozytywne biorąc pod uwagę również aspekt praktycznego zastosowania ekstrakcji z wykorzystaniem MPs w oznaczaniu leków weterynaryjnych. Wskazuje to na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie oraz próbę zautomatyzowania tego typu ekstrakcji wewnątrz układu CE.

Zasada wykonania powyżej opisanego typu ekstrakcji, tj. wewnątrz układu CE, jest niezwykle podobna do ekstrakcji na MPs poza układem, ale wymaga kilku modyfikacji związanych z konstrukcją samego układu. W tym celu wewnątrz kasety, w której montowana jest kapilara, należy umieścić magnesy, w taki sposób, aby znajdowały się w niewielkiej odległości od kapilary (rysunek 8). Następnie do wnętrza kapilary wprowadza się sposobem hydrodynamicznym zawiesinę MPs. Teoretycznie takie postępowanie powinno umożliwić zatrzymanie MPs w części kapilary umieszczonej w polu magnetycznym pomiędzy magnesami.



**Rysunek 8. Schemat układu do ekstrakcji na MPs wewnątrz układu CE**

W kolejnych krokach przeprowadza się kondycjonowanie MPs metanolem, następnie wodą dejonizowaną, po czym przez kapilarę przepuszcza się dużą objętość roztworu próbki - na tym etapie analyty adsorbowane są na powierzchni MPs. Przepłukanie kapilary BGE, a następnie mieszaniną ACN oraz 0,1 mol/l HCl powoduje desorbcję analitów i po przyłożeniu napięcia migrację analitów w kierunku wylotowego końca kapilary i ich separację.

Pragnę podkreślić że podjęłam próbę, niestety nie zakończoną sukcesem, zautomatyzowania procesu ekstrakcji na MPs wewnątrz układu CE. Pierwsze kroki w kierunku wykonania takiego eksperymentu polegały na zmontowaniu opisanego powyżej układu, a następnie podjęciu próby analizy próbek standardów FQLs. Udało mi się wstępnie ustalić rodzaj i wymiary kapilary, a także objętości wprowadzanych do kapilary rozpuszczalników i buforów. Podczas wykonywania eksperymentu napotkałam niestety wiele trudności związanych zarówno z doбором odpowiednich warunków ekstrakcji jak i przebiegiem rozdzielania elektroforetycznego. Problemy w głównej mierze dotyczyły otrzymania dobrze wykształconych sygnałów analitów oraz braku lub zaniku przepływu prądu podczas analiz. Podsumowując, należy prowadzić dalsze eksperymenty w celu doboru poprawnych parametrów ekstrakcji oraz separacji, poprawienia wydajności i powtarzalności procedury, obniżenia LOQ i LOD, co umożliwiłoby zautomatyzowanie elektroforetycznej metody oznaczania FQLs w próbkach tkanek mięsnych.



## Article

# The Use of Extraction on C18-Silica-Modified Magnetic Nanoparticles for the Determination of Ciprofloxacin and Ofloxacin in Meat Tissues

Izabella Końska<sup>1,2,\*</sup>, Paweł Kubalczyk<sup>2,\*</sup> , Michał Cichomski<sup>3</sup> and Aneta Kisielewska<sup>3</sup><sup>1</sup> Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland<sup>2</sup> Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163, 90-236 Lodz, Poland<sup>3</sup> Department of Materials Technology and Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163, 90-236 Lodz, Poland; [michal.cichomski@edu.uni.lodz.pl](mailto:michal.cichomski@edu.uni.lodz.pl) (M.C.); [aneta.kisielewska@edu.uni.lodz.pl](mailto:aneta.kisielewska@edu.uni.lodz.pl) (A.K.)\* Correspondence: [izabella.koska@edu.uni.lodz.pl](mailto:izabella.koska@edu.uni.lodz.pl) (I.K.); [pawel.kubalczyk@chemia.uni.lodz.pl](mailto:pawel.kubalczyk@chemia.uni.lodz.pl) (P.K.); Tel.: +48-4263-558-44 (P.K.)

**Abstract:** A simple, fast, and low-cost method of extraction using magnetic nanoparticles was developed for sample preparation in the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues with the use of capillary electrophoresis. This study is the first utilization of silica-coated magnetic nanoparticles with attached C18 chains to extract fluoroquinolones from meat tissues. This method is therefore characterized by a very simple sample preparation procedure, but on the other hand, by satisfactory precision and accuracy. Magnetic nanoparticles with an appropriately modified surface were placed in an Eppendorf tube, then conditioned with methanol, next rinsed with water and, finally, a homogenized tissue sample was added. At the neutral pH of the sample solution, these compounds do not have a charge and are able to adsorb on the modified particles. After extraction, the nanoparticles were dried and, then, desorption of analytes was conducted with the use of a mixture of 0.1 mol/L HCl and acetonitrile (1:1). This approach made it possible to purify the sample matrix and to obtain satisfactory LOQ levels for the method using the CE technique with UV-Vis detection. In this method, the LOD and LOQ values for both analytes were 0.04 nmol/g tissue and 0.15 nmol/g tissue, respectively. The calibration curves were linear in the entire concentration range, and the accuracy and the recovery of the method were at the satisfactory levels. The square value of the linear correlation coefficients ( $R^2$ ) for Cpx and Ofx were 0.9995 and 0.9992, respectively. The precision value of the method was within the range of 3–11% and accuracy was in the range of 93–110%.

**Keywords:** antibiotics; ciprofloxacin; sorptive extraction; magnetic nanoparticles; ofloxacin

**Citation:** Końska, I.; Kubalczyk, P.; Cichomski, M.; Kisielewska, A. The Use of Extraction on C18-Silica-Modified Magnetic Nanoparticles for the Determination of Ciprofloxacin and Ofloxacin in Meat Tissues. *Molecules* **2023**, *28*, 6123. <https://doi.org/10.3390/molecules28166123>

Academic Editors: Anna Oniszczuk and Dorota Wianowska

Received: 10 July 2023

Revised: 15 August 2023

Accepted: 17 August 2023

Published: 18 August 2023

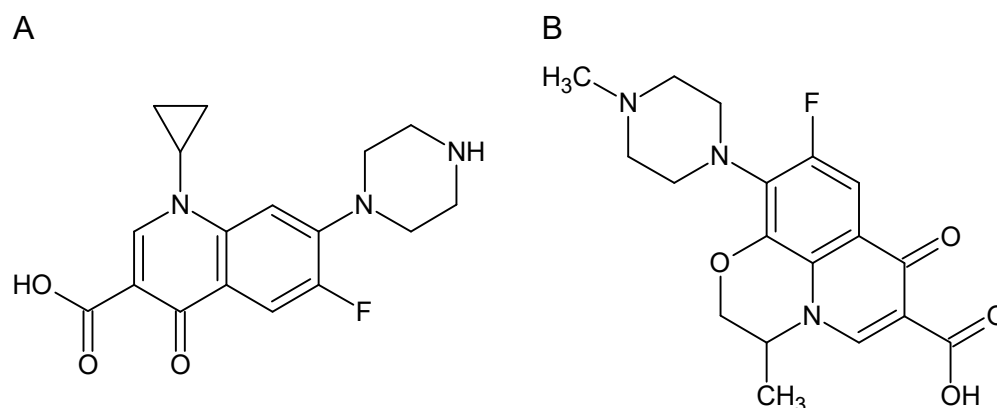


**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

At present, it is difficult to imagine animal husbandry without the prophylactic use of drugs to avoid diseases or as growth promoters, so more and more breeders are choosing to administer drugs to animals, including antibiotics. The growth-intensive method of animal husbandry is forcing breeders to use such drugs for artificial, but rapid, weight gain in animals [1–3]. A frequently used group of compounds in veterinary medicine are fluoroquinolones (FQLs), of which ciprofloxacin (Cpx) and ofloxacin (Ofx) are representatives [4]. FQLs exhibit a much broader spectrum of activity against bacteria, but also much better pharmacokinetics compared to first-generation quinolones (a group of antibiotics containing a bicyclic core bound to a 4-quinolone compound); they also exhibit a lower binding to proteins, higher drug tolerance, lower toxicity and longer half-life [5,6]. Cpx (1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ylquinoline-3-carboxylic acid) and Ofx (7-fluoro-2-methyl-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-10-oxo-4-oxa-1-azatricyclotrideca-5(13),6,8,11-tetraene-11-carboxylic acid) are quinolone compounds, belonging to the second

generation of FQLs, having cyclopropyl, carboxylic group, fluorine atom and piperazin-1-yl in its structure [7], as shown in Figure 1.



**Figure 1.** Structures of ciprofloxacin (A) and ofloxacin (B).

FQLs inhibit DNA synthesis by cutting bacterial DNA in DNA gyrase and type IV topoisomerase enzyme complexes, causing rapid bacterial death. They exhibit a broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria [6,8,9].

As a result, they are considered very universal antibiotics, and consequently they are used very often and unfortunately not infrequently overused. This is dangerous due to the fact that the misuse of these drugs can cause public health difficulties, such as allergic reactions and antibiotic resistance. Antibiotic resistance is one of the headline public health problems at present, as bacterial resistance to antibiotics makes it difficult and often impossible to treat bacterial infections. Therefore, the administration of antibiotics to animals should be discontinued for an appropriate time before the animal is slaughtered—the withdrawal time—so the residues of compounds harmful to consumer health are not found in the food. If such a recommendation is not respected, residues of veterinary drugs may remain in the food until the meat is consumed by humans, posing a potential health risk to consumers [10,11].

As a result, laboratories are focusing on developing new, simple but sensitive and precise methods for the determination of hazardous compounds in food [12–14]. Several methods for the determination of FQLs in different matrices based on HPLC-UV (in plasma [9,15,16], urine [15,16] and wastewaters [17]) or LC-MS (in animal products [18,19] and wastewaters [8,20]) techniques were developed. The CE technique was also used for the determination of FQLs in water [21] or in water, urine and milk [22]. These methods are significant analytical tools mainly due to their high efficiency and satisfactory sensitivity. Unfortunately, the majority of these methods are based on chromatographic techniques that require the use of large volumes of harmful organic solvents, mainly for the preparation of mobile phases. In addition, methods that utilize MS detection require very expensive and sophisticated equipment, and laboratories often do not possess such apparatus. Considering the above, CE-based methods should gain popularity and be more developed.

The CE technique especially equipped with a UV-Vis detector is an excellent tool for separating compounds that acquire a charge in appropriate environments. Although it is among the universal ones and seems to be an ideal solution, it has some important limitations [23]. Unfortunately, due to the small volume of the sample introduced into the capillaries and the short optical pathway of the detector, this technique has relatively low concentration sensitivity. Therefore, in practice, it is decided to implement an analyte concentration step in the sample preparation procedure or in the capillary directly prior to the analysis. In the present work, a method of concentration with the use of magnetic particles (MPs) of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  coated with silica and modified with C-18 chains is developed. MPs perform a function comparable to the stationary phase in the classical SPE technique.

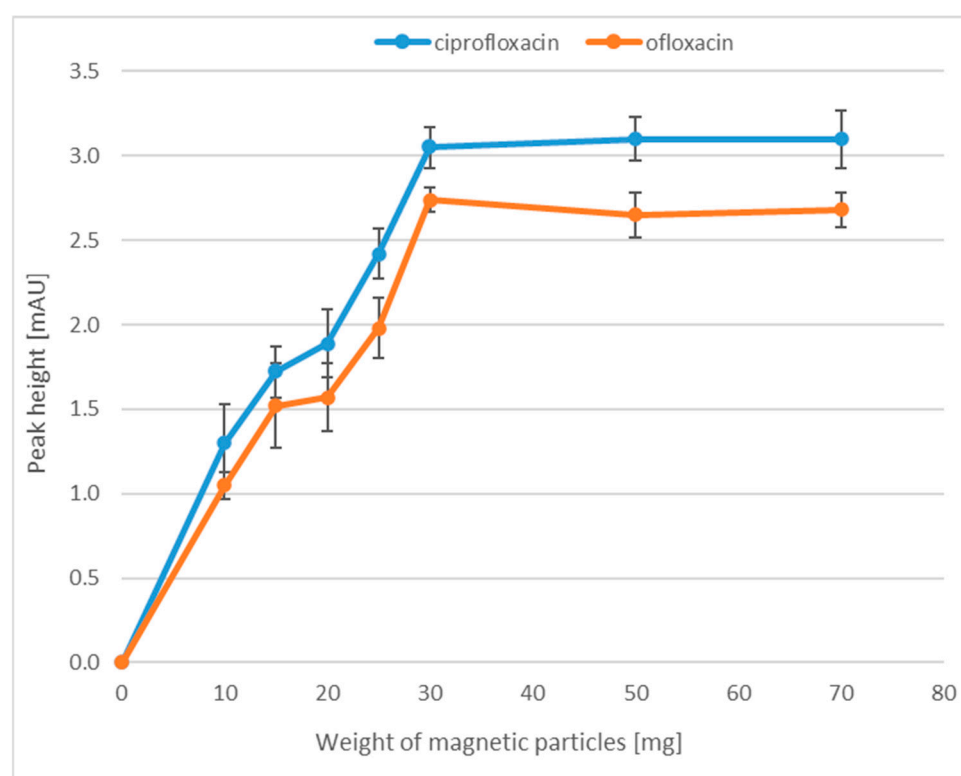
It also turns out that, due to the ease of manipulation of the position of the MPs inside the CE capillary using a magnetic field, such extraction can be successfully conducted during the in-line analysis, thus automating the process and minimizing the number of errors made by the analyst. In the literature, there are several methods describing the application of magnetic SPE using CE [24–30]. However, there is no method for the determination of FQLs that uses CE combined with magnetic SPE extraction on silica-coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  particles modified with C-18 chains. Therefore, we decided to develop such a methodology for FQL determination in animal tissues. During the experiments, Cpx and Ofx were used as example compounds representing FQLs.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Sample Preparation

#### 2.1.1. Weight of the Magnetic Nanoparticles

In the first step of the optimization of the magnetic particle extraction, we focused on the selection of the appropriate MP weight for the extraction. This is a very important step in the selection of sample preparation parameters, because an insufficient number of MPs causes a low extraction efficiency, while too many nanoparticles make it difficult to collect the liquid above them (the turbid solution). We checked what weight of MPs would ensure a high efficiency and at the same time would not cause difficulties during the extraction process. For this purpose, all tested samples were prepared in accordance with Section 3.6, whereas for the extraction of FQLs, the following weight of MPs, i.e., 10, 15, 20, 25, 30, 50 and 70 mg, were tested. Each sample was prepared in three replicates. As shown in Figure 2, the highest efficiency was observed when the weight of nanoparticles was 30 mg. A further increase in MP mass did not increase the extraction efficiency.

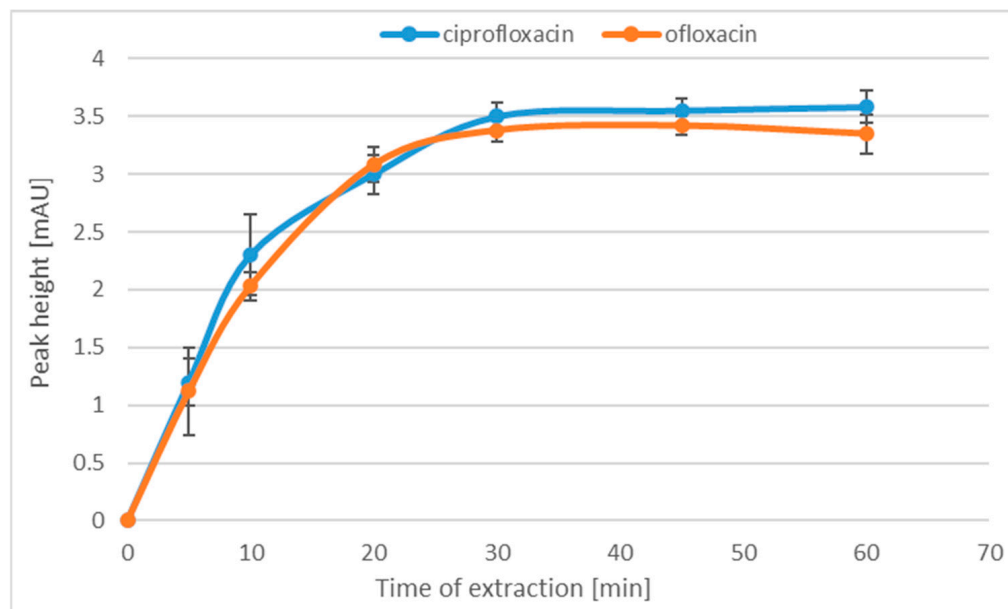


**Figure 2.** The relationship between the peak height and the weight of MPs.

#### 2.1.2. Time of Adsorption

The next extraction-optimized parameter was the adsorption time of the analytes on the MPs. In this step, the influence of the adsorption time on the extraction efficiency was checked. For this purpose, the extraction of MPs was conducted for 5, 10, 20, 30, 45

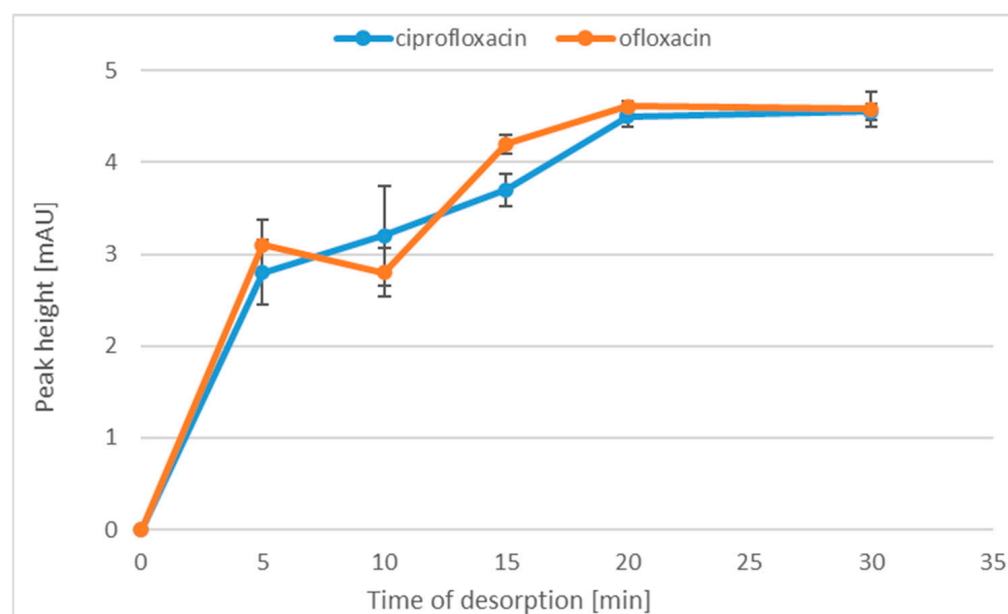
and 60 min. Each sample was prepared in three replicates. As can be seen in Figure 3, the extraction efficiency increases only up to 30 min and the subsequent extension of the extraction time does not increase the efficiency of the process.



**Figure 3.** The relationship between the peak height and the time of extraction.

#### 2.1.3. Time of Desorption

After the optimization of the adsorption time, we decided to check the relation between the extraction efficiency and the analyte desorption time. Therefore, desorption was conducted successively for: 5, 10, 15, 20 and 30 min. Each sample was prepared in triplicate. The results of the experiments are presented in Figure 4. It was found that the extraction yield increased up to the desorption time of 20 min. For longer desorption times, no changes in the height of analytical signals were noted. Therefore, in order not to extend the sample preparation procedure, we chose the MP analyte desorption time of 20 min.



**Figure 4.** The relationship between the peak height and the time of desorption.

#### 2.1.4. The Volume of the Desorbing Solvent

In the last step of the extraction procedure optimization, the influence of the solvent volume on the analyte desorption efficiency was checked. The following solvent volumes of HCl:ACN (1:1 *v/v*) mixture were tested: 200, 400, 600, 800 and 1000  $\mu\text{L}$ . As expected, because a smaller volume of the solvent ensures less dissolution of the sample, the best extraction efficiency was obtained when the analyte was desorbed with 200  $\mu\text{L}$  of the solvent. The reason for testing the volume of the HCl:ACN (1:1 *v/v*) mixture within the range of 200–1000  $\mu\text{L}$  is that a volume of desorption solvent lower than 200  $\mu\text{L}$  caused difficulty in sample mixing, while a volume of solvent greater than 1000  $\mu\text{L}$  diluted the sample too much. We also checked whether a better efficiency would be obtained when the analytes were desorbed with a solvent volume of 800  $\mu\text{L}$  and then the sample was evaporated to dryness, and then the residue was dissolved in a smaller (50  $\mu\text{L}$ ) volume of solvent. It turned out that such a solution, i.e., introducing the evaporation step into the sample preparation process, is much more advantageous. Therefore, we decided to add this step to the sample preparation procedure.

The main aim of the research was to develop the parameters for the extraction of fluoroquinolones with the use of magnetic iron nanoparticles coated with C-18 modified silica. Very similar results of the experiments in terms of the weight of MPs, sorption and desorption times, and the volume of desorbing solvent were obtained for both analytes.

#### 2.1.5. Sensitivity Enhancement Factor

The sensitivity enhancement factor (*SEF*) for the method was also determined. *SEF* characterizes the degree of concentration of the analyte with the use of the developed method, where the extraction efficiency is determined by the comparison of the size of the analyte peak obtained using the method with the extraction step and the analyte peak without extraction step. In this work, the following formula was used to calculate the *SEF* coefficient:

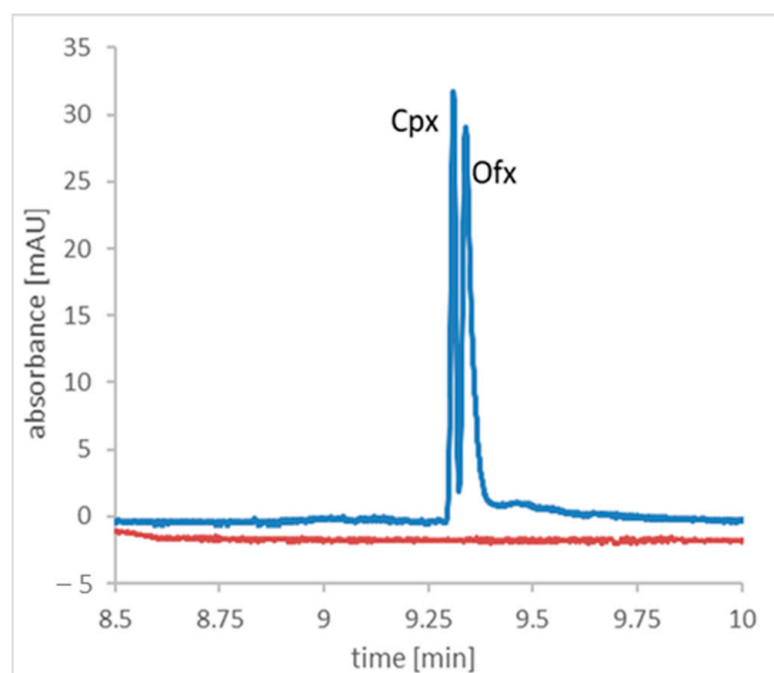
$$SEF = \frac{A_{after\ extraction}}{A_{without\ extraction}} \cdot \frac{C_{without\ extraction}}{C_{after\ extraction}}$$

where  $A_{after\ extraction}$ —peak area of the analyte for tissue analysis after sample extraction;  $A_{without\ extraction}$ —peak area of the analyte for tissue analysis without extraction;  $C_{after\ extraction}$ —concentration of the analyte in the sample, which was analyzed with the extraction step; and  $C_{without\ extraction}$ —concentration of the analyte in the sample, which was analyzed without the extraction step. The tissue samples were prepared according to the procedure described in the Sample preparation Section. Each sample was prepared in triplicate, and the *SEFs* for Cpx and Ofx calculated from the above equation were 127.4 and 103.7, respectively.

#### 2.1.6. Calibration and Other Validation Data

The developed procedure was validated in accordance with the criteria defined for the analysis of biological samples [31]. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined experimentally. The LOD value was the concentration of the analyte for which the signal is three times higher than the baseline noise, and the LOQ was the concentration of the analyte for which the signal was nine times higher than the baseline noise (0.2 mAU). In this method, the LOD and LOQ values for both analytes were 0.04 nmol/g tissue and 0.15 nmol/g tissue (5 ng/mL for Cpx and 5.4 ng/mL for Ofx), respectively. The LOD and LOQ values for our procedure were higher than for the methods that use MS detection [1]: the LOD value for Cpx and Ofx was 0.005 ng/mL and the LOQ value was 0.015 ng/mL for both analytes [32]; the LOD values for Cpx and Ofx were 0.15 ng/L and 3.0 ng/L, respectively; the LOQ for Cpx and Ofx was 0.2 ng/L and 10 ng/L, respectively [33]; the LOD value for Cpx and Ofx was 10.1 ng/L and 3.1 ng/L, respectively; the values of LOQ for Cpx and Ofx were 33.8 and 10.4 ng/L, respectively. However, they were lower than for the CIEF method [34] (LOD value for Cpx was 0.34  $\mu\text{g/mL}$  and for Ofx was 1.20  $\mu\text{g/mL}$ ) and for other CE procedures [35] (for Cpx, the LOQ value was

0.0125 mg/mL). In turn, the LOQ value of our proposed methodology was similar to that of another CE method [36], where the LOQ for Cpx was 0.3 nmol/g tissue and for Ofx was 0.25 nmol/g tissue. The total analysis time for our method was 77 min. This time is similar to that of the LLL-SDME-CE procedure [23] (61 min), but shorter than that of the EEM-ANWE approach [4] (155 min) and longer than that of the CE procedure [36] (32 min). Five-point calibration curves for both Cpx and Ofx were constructed in the concentration range from 2 to 10 nmol/g tissue. Each series was repeated three times. The resulting calibration curves (Figure 5) were linear in the concentration range tested. The square value of the linear correlation coefficients ( $R^2$ ) for Cpx and Ofx were 0.9995 and 0.9992, respectively. The calculated equations of the calibration curves were as follows:  $y = (23.648 \pm 0.310)x + (0.465 \pm 0.026)$  for Cpx and  $y = (16.021 \pm 0.263)x + (0.715 \pm 0.017)$  for Ofx. The calibration data are summarized in Table 1.



**Figure 5.** The representative electropherogram of the tissue sample (orange line) and tissue sample spiked with 4 nmol/g ciprofloxacin and ofloxacin (blue line).

**Table 1.** Analytical data.

LOD	LOQ	Calibration Concentration Range	Equations of the Calibration Curve	$R^2$
Ciprofloxacin 0.04 nmol/g tissue	0.15 nmol/g tissue	2 to 10 nmol/g tissue	$y = (23.648 \pm 0.310)x + (0.465 \pm 0.026)$	0.9995
Ofloxacin 0.04 nmol/g tissue	0.15 nmol/g tissue	2 to 10 nmol/g tissue	$y = (16.021 \pm 0.263)x + (0.715 \pm 0.017)$	0.9992

The precision (expressed as *RSD*) of the points of the calibration curve for Cpx ranged from 3.1% to 9.3%, and that of the points of the calibration curve for Ofx ranged from 0.5% to 7.9%, while the accuracy (expressed as recovery) for Cpx ranged from 94.6% to 99.5% and for Ofx from 90.1% to 95.7%. *RSD* was calculated based on the formula shown below:

$$RSD[\%] = \frac{SD \cdot 100\%}{x}$$

where  $x$  is the average value of the concentration and *SD* is the standard deviation of  $x$ .

The accuracy was calculated by the formula shown below:

$$\text{accuracy} [\%] = 100\% - \text{Error Rate}$$

$$\text{where Error Rate} = \frac{|\text{Observed Value} - \text{Actual Value}|}{\text{Actual Value}} \cdot 100\%$$

These values are in accordance with the criteria for the analysis of biological samples [31]. To test the intra-day and inter-day precisions of the method, three concentrations were selected from a range of the calibration curve, and the samples were prepared and analyzed. We chose the first concentration (3 nmol/g tissue) from the beginning of the range of the calibration curve, the next concentration (5 nmol/g tissue) represented the middle of the range of the calibration curve, and the final concentration was at the end of the range of the calibration curve (9 nmol/g tissue). Both the precision (RSD of 3–11%) and accuracy (in the range of 93–110%) of the method were at a satisfactory level according to the criteria for the analysis of biological samples [31]. After the analysis of the calibration samples, the peak areas of Cpx and Ofx were plotted against the corresponding concentrations of the analyte, and then the calibration curves were fitted using a least-squares linear regression analysis. In the essence of this method, the equation of the calibration curve is a certain averaging of the results of the dependence of the peak area on the analyte concentration. Therefore, the points of the calibration curve may lie above the averaged curve—then, the recovery is above 100%. Another reason may be the result of the errors made by the analyst. All validation data are shown in Table 2.

**Table 2.** Validation data—results.

Added * (nmol/g Tissue)	Intra-Day				Inter-Day			
	Found ± SD (nmol/g Tissue)	Confidence Interval (nmol/g Tissue)	RSD (%)	Accuracy (%)	Found ± SD (nmol/g Tissue)	Confidence Interval (nmol/g Tissue)	RSD (%)	Accuracy (%)
Ciprofloxacin								
3.0	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.4	6.4	97.9	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.4	5.7	98.8
5.0	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.5	3.2	99.5	5.3 ± 0.4	5.3 ± 0.9	7.0	94.6
9.0	8.9 ± 1.0	8.9 ± 2.5	11.2	98.4	9.3 ± 0.3	9.3 ± 0.8	3.7	96.6
Ofloxacin								
3.0	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.3	3.7	95.7	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.1	94.6
5.0	5.3 ± 0.4	5.3 ± 0.9	7.8	93.0	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.9	7.7	93.0
9.0	9.3 ± 0.9	9.3 ± 2.2	9.3	94.0	9.9 ± 0.3	9.9 ± 0.7	3.0	90.1

\*  $n = 3$ .

The validated method was utilized to analyze a real meat tissue samples. For this purpose, different types of meat tissues were analyzed. It was found that there is no matrix influence in what is shown in the representative electropherogram obtained after the analysis of the chicken liver tissue and spiked chicken liver tissue (Figure 5). This type of tissue was chosen because FQLs are cumulated in the liver. Figure 5 shows that the peaks are not well-separated to the baseline, but this was not the aim of the work. The main aim of the work was to develop an MP extraction procedure and optimize its parameters. The electrophoretic conditions were taken from our previous work [37]. In addition, the signals of Cpx and Ofx was recorded at two different wavelengths, which greatly facilitated the integration of the peaks. Nevertheless, the validation parameters are in accordance with the criteria, which nevertheless makes the method reliable.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Instruments

For all experiments, an Agilent 7100 CE System (Waldbronn, Germany) coupled with UV-Vis absorbance diode-array detector and equipped with automatic injector was used. The bare fused silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with a total length of 40 cm (effective length of 31.5 cm) and an inner diameter of 75  $\mu\text{m}$  was used as the separation column. To measure migration times, peak heights, peak areas, and other data Agilent ChemStation Rev. B.04.02. SP1 software were used. The Millipore

Milli-Q-RG System (Waterford, Ireland) was used for the deionization of water. A pH meter (Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA) was used to adjust the pH of the buffer solutions and to shake the samples vortex. The Labconco CentriVap (Kansas City, MO, USA) was used to lyophilize samples, and a centrifuge with a fast cool function (Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) was used to centrifuge the samples. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was performed on a Nicolet iS50FT-IR spectrometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) with a DTGS detector and the EasyDiff (PIKE Technologies, Fitchburg, WI, USA) diffuse reflectance accessory over the spectral region from 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$ , using 64 sample scans and a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2. Chemicals

Sodium hydroxide (NaOH) was purchased from POCH (Gliwice, Poland); sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), trisodium phosphate ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), N,N-dimethylformamide, ammonium acetate and acetonitrile were purchased from Sigma (Steinheim, Germany); and methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) was obtained from J.T. Baker (Deventer, Netherlands). The standard of the analytes Cpx ( $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$ ) and Ofx ( $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ ), iron (II,III) oxide (size of 50–100 nm) and toluene were obtained from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, United States of America). Octadecyltrimethoxysilane was obtained from Thermo Scientific (Shanghai, China). The buffer pH was adjusted by potentiometric titration.

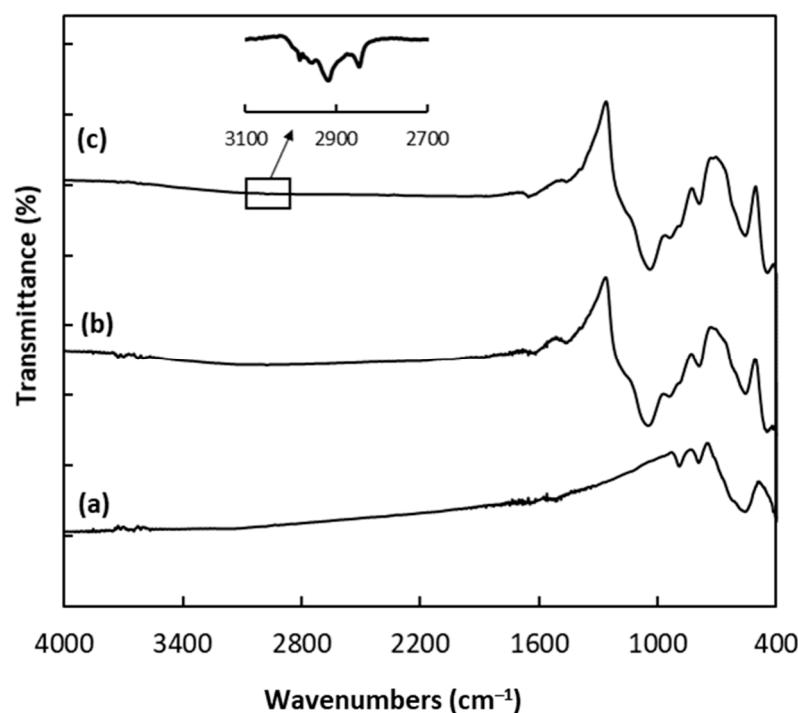
### 3.3. Preparation of the Magnetic Particles

The preparation of MPs was conducted according to the procedure of Baciu et al. [38]. Briefly, 1 g of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MPs (average diameter of 75 nm) was dispersed in 100 mL of isopropanol/deionized water (90:10, *v/v*) under  $\text{N}_2$  flow with constant stirring. Subsequently, the pH of the solution was adjusted to 9 with 1.5 mol/L ammonia solution, and 5 mL of tetraethyl orthosilicate was added dropwise.

The mixture was stirred at room temperature for 16 h and then heated to 50 °C for 8 h. The silica-coated MPs were sequentially washed with deionized water and isopropanol, and then vacuum-dried (24 °C, 500 Pa) for 24 h. In the next step, the surface modification of silica-coated magnetic particles with the use of C18 chains was conducted. For this purpose, the obtained silica-coated MPs (0.5 g) were dispersed in 100 mL of dimethylformamide/toluene (80:20, *v/v*) under a  $\text{N}_2$  flow with constant stirring. Then, 10 mL of trimethoxyoctadecylsilane was added dropwise, and the solution was stirred for 24 h at room temperature. Finally, the finished functionalized magnetic particles were washed three times with toluene and then dried under vacuum (24 °C, 500 Pa) overnight.

The FTIR spectra of the MPs at each stage of the synthesis were compared as shown in Figure 6. A characteristic band in the FTIR spectrum of MPs (Figure 6a) appears at 562  $\text{cm}^{-1}$  and was assigned to the Fe–O–Fe vibration in magnetite nanoparticles [38,39]. After the modification of the magnetic nanoparticles with the silica coating, two adsorption bands with the maximum in 1038  $\text{cm}^{-1}$  and 785  $\text{cm}^{-1}$  were observed, resulting from the asymmetric and the symmetric stretching vibrations of Si–O–Si groups [38,39]. Moreover, the peak at ~930  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to Si–OH stretching vibrations [38,39], while the band at 445  $\text{cm}^{-1}$  can be associated with Si–O rocking vibrations [40]. In addition, the peak at ~1620  $\text{cm}^{-1}$  comes from the O–H bending vibration of adsorbed water [38]. The introduction of C18 onto the surface of the silica coating resulted in the appearance of two bands (Figure 6c inset), which correspond to the asymmetric (2915  $\text{cm}^{-1}$ ) and the symmetric (2847  $\text{cm}^{-1}$ ) stretching vibration of methylene groups in the  $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$  chain [41]. Thus, the FTIR spectra confirm the modification of MPs with a silica coating and successful functionalization using C18.





**Figure 6.** FTIR spectra of (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MPs, (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  coated with silica and (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  coated with silica and C18.

### 3.4. Capillary Preconditioning

The new capillary was conditioned by flushing with a 1 mol/L NaOH solution for 20 min, 0.1 mol/L solution of NaOH for 20 min, then 2 min with deionized water and with BGE for 30 min. At every next day of the work, the capillary was flushed with 0.1 M NaOH solution for 20 min, deionized water for 2 min and 30 min with BGE. At the end of each day, the capillary was flushed with water for 20 min, and the capillary ends were left in the water overnight.

### 3.5. Electrophoretic Conditions

During electrophoretic analyses, 0.1 mol/L phosphate-borate buffer with a pH of 8.40 was used as the BGE. The voltage of 16 kV was applied for the separation, and the temperature of the capillary was 23 °C. The hydrodynamic introduction of the sample solution was conducted at 25 mbar for 10 s. The UV-Vis detection of Cpx and Ofx was performed at the analytical wavelengths of 271 nm and 285 nm, respectively.

### 3.6. Sample Preparation

The purchased animal tissues (liver and kidneys) from local stores were divided into smaller portions and stored at a reduced temperature (−20 °C). The homogenization parameters of the animal tissues were adapted from our previous method [41]. To homogenize the sample, 0.2 g of tissue weighed and then placed in a 3 mL polypropylene tube with 2 mL of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.00) and homogenized to allow for further sample preparation. This mixture was centrifuged at  $13,680 \times g$  (12,000 rpm) for 10 min, and the supernatant was used for the subsequent procedure. For each sample, 30 mg of MPs were weighed and placed in a polypropylene tube. Then, 1.5 mL of methanol was added to condition the surface of the MPs and vortexed for 5 min. In the next step, methanol was removed, and 1.5 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  was added, vortexed for 2 min, and then, after water removal, 1.5 mL of the sample solution (supernatant) was added. The adsorption of analytes was conducted for 30 min; then, the sample solution was removed, and the MPs were dried. Subsequently, in order to induce the desorption of the analytes, 800  $\mu\text{L}$  of the 0.1 mol/L HCl:ACN (1:1 v/v) mixture was added to the MPs and vortexed for 20 min. A sample was

then collected in a polypropylene tube and lyophilized to dryness. Next, the residue was dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of 0.002 mol/L HCl and subjected to electrophoretic analysis. To dissolve the evaporation residue, we used a low-concentration HCl to reduce the conductivity of the sample, which significantly improved CE separation.

### 3.7. Method Validation

After optimizing all sample preparation parameters, the method was validated. We decided to validate the method for two representatives of FQLs in order to prove that magnetic extraction can be performed for several antibiotics from this group simultaneously. Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), method precision and accuracy were determined in accordance with the Food and Drug Administration (FDA) Criteria for Analytical Procedures and Method Validation [31].

### 3.8. Calibration of the Method

Stock solutions of each analyte, which were then used to prepare the calibration solutions, were prepared by the appropriate dilutions of the standard solution of the analytes in 0.1 mol/L HCl. We prepared three series of Cpx and Ofx solutions with concentrations in the range of 2–10 nmol/g tissue for calibration. These solutions were prepared according to the following procedure: the animal tissue was homogenized with 0.2 mol/L, pH 7.00 and 1:10 phosphate buffer (g/mL) in a 3 mL polypropylene tube. The homogenate was then centrifuged at  $13,680 \times g$  (12,000 rpm) for 10 min. Subsequently, increasing amounts of the standard working solutions were added to the supernatant to obtain the following concentrations for both Cpx and Ofx: 2 nmol/g tissue, 4 nmol/g tissue, 6 nmol/g tissue, 8 nmol/g tissue and 10 nmol/g tissue. The calibration solutions were extracted according to the following procedure: A total of 30 mg of MPs were placed in a polypropylene tube. Then, 1.5 mL of methanol was added to condition the bed and vortexed for 5 min. In the next step, methanol was removed, and 1.5 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  was added and vortexed for 2 min; then, after the removal of water, 1.5 mL of the sample solution of the appropriate concentration was added. The extraction was conducted for 30 min; then, the aqueous phase of the sample was removed, and the nanoparticles were dried. Subsequently, in order to induce the desorption of the analytes, 800  $\mu\text{L}$  of the mixture of 0.1 mol/L HCl:ACN (1:1 *v/v*) was applied to the MPs and vortexed for 20 min. Next, the sample was lyophilized to dryness, dissolved in 50  $\mu\text{L}$  0.002 mol/L HCl and subjected to electrophoretic analysis. After the analysis, the peak areas of Cpx and Ofx were plotted against the corresponding concentrations of the analyte, and then the calibration curves were fitted using a least-squares linear regression analysis.

## 4. Conclusions

A new, fast and simple extraction procedure was developed that can be used for real sample preparation in the CE determination of Cpx and Ofx. The described procedure is characterized by a very simple and relatively quick extraction and allows obtaining results at a satisfactory level. In this study,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles coated with C-18 silica were selected as the stationary phase for the magnetic extraction of certain FQLs. The described procedure is very easy and does not require complicated equipment while maintaining a relatively high sensitivity—a plastic test tube and appropriate magnetic nanoparticles are enough. The developed procedure does not use significant large volumes of organic solvents. In our method, the consumption of solvents per sample is 1.525 mL. The usage of organic solvents in the presented methodology is much smaller than that in CE [36] (10 mL per sample) and UHPLC [2] (5.84 mL per sample) procedures, but larger than that in the LLL-SDME procedure [23] (350  $\mu\text{L}$ ). In addition, the developed method is sensitive and precise, and it is characterized by a good linearity and accuracy. In this method, the LOD and LOQ values for both analytes were 0.04 nmol/g tissue and 0.15 nmol/g tissue, respectively. The square values of the linear correlation coefficients ( $R^2$ ) for Cpx and Ofx were 0.9995 and 0.9992, respectively. The precision value of the method was within the

range of 3–11% and accuracy was in the range of 93–110%. The maximum residue limit for the tested antibiotics is 200 µg/kg tissue [42] (0.6 nmol/g tissue for Cpx and 0.55 nmol/g tissue for Ofx). It follows that it is possible to detect and quantify analytes with such content in meat with the use of the developed procedure. The SEFs for Cpx and Ofx calculated from the above equation were 127.4 and 103.7, respectively. The total analysis time, which includes sample preparation and electrophoretic analysis, of our method is 77 min. The time is similar to that of the LLL-SDME-CE procedure [23] (61 min), but shorter than that of the EEM-ANWE approach [4] (155 min) and longer than that of the CE procedure [36] (32 min).

The described work presented the use of silica-coated magnetic nanoparticles with attached C18 chains for the extraction of fluoroquinolones in meat tissues for the first time. The use of magnetic nanoparticles modified with the use of the described method seems to be an ideal application because of the physicochemical properties of fluoroquinolones. With the appropriate manipulation of the pH of the sample solution, these compounds do not have a charge and are able to adsorb on the modified particles. This approach enables the concentration of the analyte in the sample, but also the purification of the sample matrix. However, the concept for such an analytical procedure requires further development in order to use this type of extraction, e.g., inside the CE capillary, which would simplify sample preparation procedure and probably significantly improve SEF coefficients. Furthermore, better results can be achieved by using a properly selected internal standard in terms of the precision of the method. We believe that subsequent research in this direction is needed, as this approach seems to be an excellent, simple and cheap tool that will be useful in the analysis of meat in terms of its antibiotic content.

Considering all the advantages of our method, we believe that this type of extraction can be successfully used in the analysis of real samples for Cpx and Ofx content, which encourages further research in this area.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.K. and P.K.; methodology, I.K., P.K., M.C. and A.K.; validation, I.K.; formal analysis, I.K.; investigation, I.K., P.K., M.C. and A.K.; data curation, I.K.; writing—original draft preparation, I.K.; writing—review and editing, I.K., P.K., M.C. and A.K.; visualization, I.K.; supervision, P.K.; project administration, P.K.; funding acquisition, P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the University of Lodz, grant number 11/GNZPA/2022.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** CE data are available from the authors.

**Conflicts of Interest:** The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

**Sample Availability:** Meat tissue samples are not available from the authors.

## References

1. Wang, Z.; Wang, X.Y.; Tian, H.; Wei, Q.H.; Liu, B.S.; Bao, G.M.; Liao, M.L.; Peng, J.L.; Huang, X.Q.; Wang, L.Q. High through-put determination of 28 veterinary antibiotic residues in swine wastewater by one-step dispersive solid phase extraction sample cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **2019**, *230*, 337–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Aresta, A.; Cotugno, P.; Zambonin, C. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin, and marbofloxacin in bovine urine, serum, and milk by microextraction by a packed sorbent coupled to ultra-high performance liquid chromatography. *Food Anal.* **2018**, *52*, 790–802. [[CrossRef](#)]
3. Zheng, W.; El-Aty, A.M.; Kim, S.K.; Choi, J.M.; Park, D.H.; Yoo, K.H.; Kang, Y.S.; Jeon, J.S.; Hacımüftüoğlu, A.; Shim, J.H.; 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. *Biomed. Chromatogr.* **2019**, *33*, e4501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Ouyang, Y.-Z.; Wu, H.-L.; Fang, H.; Wang, T.; Sun, X.-D.; Chang, Y.-Y.; Ding, Y.-J.; Yu, R.-Q. Rapid and simultaneous determination of three fluoroquinolones in animal-derived foods using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *224*, 117458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Adjei, M.D.; Deck, J.; Heinze, T.M.; Freeman, J.P.; Williams, A.J.; Sutherland, J.B. Identification of metabolites produced from N-phenylpiperazine by *Mycobacterium* spp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *34*, 219–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kowalski, P.; Plenis, A. Simultaneous determination of six quinolone antibiotics in poultry and porcine samples by capillary electrophoresis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **2008**, *52*, 81–85.
7. Medical Economics Staff. *Physicians' Desk Reference*, 55th ed; Medical Economics Co.: Montvale, NJ, USA, 2001; p. 852.
8. Egunova, O.R.; Reshetnikova, I.S.; Kazimirova, K.O.; Shtykov, S.N. Magnetic solid-phase extraction and fluorimetric determination of some fluoroquinolones. *J. Anal. Chem.* **2020**, *75*, 24–33. [[CrossRef](#)]
9. Wang, M.; Gao, M.; Zhang, K.; Wang, W.; Fu, Q.; Gao, D. Magnetic covalent organic frameworks with core-shell structure as sorbents for solid phase extraction of fluoroquinolones, and their quantitation by HPLC. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Wang, H.; Liu, Y.; Wei, S. Selective extraction and determination of fluoroquinolones in bovine milk samples with montmorillonite magnetic molecularly imprinted polymers and capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 589–598. [[CrossRef](#)]
11. de Oliveira, L.G.; Barreto, F.; Hoff, R.; Rübensam, G.; Scherer Kurz, M.H.; Galle, G.; Gonçalves, F.F. Validation of a method for sedatives and  $\beta$ -blockers determination in swine, bovine and equine kidney using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2017**, *34*, 32–39. [[CrossRef](#)]
12. Ghoufran, K.; Mohammad, M.; Oussama, M.; Alhaj, S.A. Analytical methods of ciprofloxacin and its combinations review. *Res. J. Pharm. Technol.* **2018**, *11*, 2139–2148.
13. Czyrski, A. Analytical Methods for Determining Third and Fourth Generation Fluoroquinolones: A Review. *Chromatographia* **2017**, *80*, 181–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Peixoto, P.S.; Tóth, V.I.; Segundo, M.A.; Lima, H.L.F.C. Fluoroquinolones and sulfonamides: Features of their determination in water. A review. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2016**, *96*, 185–202. [[CrossRef](#)]
15. Cairoli, S.; Simeoli, R.; Tarchi, M.; Dionisi, M.; Vitale, A.; Perioli, L.; Dionisi-Vici, C.; Goffredo, B.M. A new HPLC–DAD method for contemporary quantification of 10 antibiotics for therapeutic drug monitoring of critically ill pediatric patients. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34*, e4880. [[CrossRef](#)]
16. Yıldırım, S.; Karakoç, H.N.; Yaşar, A.; Köksal, I. Determination of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin and gemifloxacin in urine and plasma by HPLC–FLD–DAD using pentafluorophenyl core–shell column: Application to drug monitoring. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34*, e4925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Selahle, S.K.; Nomngongo, P.N. Determination of fluoroquinolones in the environmental samples using vortex assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2020**, *100*, 282–294. [[CrossRef](#)]
18. Magalhães, D.; Freitas, A.; Sofia Vila Pouca, A.; Barbosa, J.; Ramos, F. The use of ultra-high-pressure-liquid-chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry as a confirmatory method in drug residue analysis: Application to the determination of antibiotics in piglet liver. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2020**, *1153*, 122264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Li, J.; Ren, X.; Diao, Y.; Chen, Y.; Wang, Q.; Jin, W.; Zhou, P.; Fan, Q.; Zhang, Y.; Liu, H. Multiclass analysis of 25 veterinary drugs in milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *257*, 259–264. [[CrossRef](#)]
20. Maia, A.S.; Paíga, P.; Delerue-Matos, C.; Castro, P.M.L.; Tiritan, M.E. Quantification of fluoroquinolones in wastewaters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* **2020**, *259*, 113927. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, H.; Deng, Y.; Zhao, M.Z.; Zhou, Y.L.; Zhang, X.X. Highly-sensitive detection of eight typical fluoroquinolone antibiotics by capillary electrophoresis–mass spectroscopy coupled with immunoaffinity extraction. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 4063–4071. [[CrossRef](#)]
22. Martinez-Perez-Cejuela, H.; Benavente, F.; Simo-Alfonso, E.F.; Herrero-Martinez, J.M. A hybrid nano-MOF/polymer material for trace analysis of fluoroquinolones in complex matrices at microscale by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis. *Talanta* **2021**, *233*, 122529. [[CrossRef](#)]
23. Gao, W.; Chen, G.; Chen, Y.; Zhang, X.; Yin, Y.; Hu, Z. Application of single drop liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 291–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Purgat, K.; Olejarz, P.; Koška, I.; Głowacki, R.; Kubalczyk, P. Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction. *Anal. Biochem.* **2020**, *596*, 113640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gao, Q.; Lin, C.Y.; Luo, D.; Suo, L.L.; Chen, J.L.; Feng, Y.Q. Magnetic solid-phase extraction using magnetic hypercrosslinked polymer for rapid determination of illegal drugs in urine. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 3083–3091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ibarra, I.S.; Rodríguez, J.A.; Paez-Hernandez, M.E.; Santos, E.M.; Miranda, J.M. Determination of quinolones in milk samples using a combination of magnetic solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 2041–2048. [[CrossRef](#)]
27. Tennico, Y.H.; Remcho, V.T. In-line extraction employing functionalized magnetic particles for capillary and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2548–2557. [[CrossRef](#)]
28. Gasilova, N.; Gassner, A.L.; Girault, H.H. Analysis of major milk whey proteins by immunoaffinity capillary electrophoresis coupled with MALDI-MS. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 2390–2398. [[CrossRef](#)]

29. Chen, H.-X.; Busnel, J.-M.; Gassner, A.-L.; Peltre, G.; Zhang, X.-X.; Girault, H.H. Capillary electrophoresis immunoassay using magnetic beads. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 3414–3421. [[CrossRef](#)]
30. Morales-Cid, G.; Diez-Masa, J.C.; de Frutos, M. On-line immunoaffinity capillary electrophoresis based on magnetic beads for the determination of alpha-1 acid glycoprotein isoforms profile to facilitate its use as biomarker. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *773*, 89–96. [[CrossRef](#)]
31. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceuticals Contains Nonbinding Recommendations. 2018. Available online: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (accessed on 17 August 2023).
32. Mejías, C.; Santos, J.L.; Martín, J.; Aparicio, I.; Alonso, E. Automated on-line SPE-chiral LC-MS/MS method for the enantiomeric determination of main fluoroquinolones and their metabolites in environmental water samples. *Microchem. J.* **2023**, *185*, 108217. [[CrossRef](#)]
33. Wei, D.; Guo, M. Facile preparation of magnetic graphene oxide/nanoscale zerovalent iron adsorbent for magnetic solid-phase extraction of ultra-trace quinolones in milk samples. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43*, 3093–3102. [[CrossRef](#)]
34. Horká, M.; Vykydalová, M.; Růžička, F.; Šalplachta, J.; Holá, V.; Dvořáčková, M.; Kubesová, A.; Šlais, K. CIEF separation, UV detection, and quantification of ampholytic antibiotics and bacteria from different matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 6285–6296. [[CrossRef](#)]
35. Paul, P.; Van Laeken, C.; Sanger-van de Griend, C.; Adams, E.; Van Schepdael, A. CE-C4D method development and validation for the assay of ciprofloxacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 1–8. [[CrossRef](#)]
36. Sun, H.-W.; He, P.; Lv, Y.-K.; Liang, S.-X. Effective separation and simultaneous determination of seven fluoroquinolones by capillary electrophoresis with diode-array detector. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *852*, 145–151. [[CrossRef](#)]
37. Koška, I.; Purgat, K.; Głowacki, R.; Kubalczyk, P. Simultaneous Determination of Ciprofloxacin and Ofloxacin in Animal Tissues with the Use of Capillary Electrophoresis with Transient Pseudo-Isotachophoresis. *Molecules* **2021**, *26*, 6931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Baciú, T.; Borrull, F.; Neus"uß, C.; Aguilar, C.; Calull, M. Capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction using magnetic particles as new adsorbents for the determination of drugs of abuse in human urine. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1232–1244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kim, M.T. Deposition kinetics of silicon dioxide from tetraethylorthosilicate by PECVD. *Thin Solid Films* **2000**, *360*, 60–68. [[CrossRef](#)]
40. Nair, K.K.; Kaur, R.; Iqbal, N.; Hasan, A.; Alam, S.; Raza, S.K. High yield, facile aqueous synthesis and characterization of C18 functionalized iron oxide nanoparticles. *Mater. Res. Express* **2015**, *2*, 045014. [[CrossRef](#)]
41. Hong, R.Y.; Li, J.H.; Zhang, S.Z.; Li, H.Z.; Zheng, Y.; Ding, J.; Wei, D.G. Preparation and characterization of silica-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles used as precursor of ferrofluids. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 3485–3492. [[CrossRef](#)]
42. EMEA. Committee for Veterinary Medicinal Products, EMEA/MRL/820/02-FINAL. 2002. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-extension-all-food-producing-species-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-extension-all-food-producing-species-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal_en.pdf) (accessed on 16 August 2023).

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Zalety i wady opracowanych metod

W każdej z metod, które wchodziły w skład niniejszej rozprawy wykorzystałam klasyczne techniki separacyjne, takie jak CE (D1, D2, D4) oraz HPLC (D3), ale również klasyczne techniki przygotowania próbek, w skład których wchodziły: ekstrakcja, homogenizacja oraz odbiałczanie. Zdecydowałam się na takie podejście ze względu na to, że opracowane metodyki miały w założeniu pozwalać na oznaczanie leków weterynaryjnych w mięsie oraz moczu, w jak najszybszy i najprostszy sposób, przy wykorzystaniu ogólnie dostępnej aparatury. Udało się osiągnąć ten cel, nie tracąc przy tym czułości, precyzji i dokładności zaprojektowanych metodologii.

Technika CE z detekcją UV-Vis, choć należy do uniwersalnych i wydawała się idealnym rozwiązaniem dla związków zyskujących ładunek w odpowiednim środowisku, to jednak posiada pewne ograniczenia. Niestety ze względu na niewielką objętość próbki wprowadzaną do kapilary oraz krótką drogę optyczną w przypadku stosowanej przeze mnie detekcji UV-Vis, technika ta charakteryzuje się stosunkowo niską czułością stężeniową. Przez ten fakt, aby opracowane metody mogły być przydatne do analizy mięsa (D1, D4) oraz moczu (D2) na zawartość śladowych pozostałości FQLs, byłam zmuszona wprowadzić do procedury przygotowania próbki etap ekstrakcji, który w końcowym efekcie pozwolił na wystarczające zateżnienie analitów oraz oczyszczenie próbki z potencjalnie przeszkadzających składników matrycy. Należy podkreślić, że w przypadku niektórych procedur niezbędna była implementacja dodatkowego etapu zateżniania analitów. Taki etap wprowadziłam do metod (D1 oraz D2), miał on miejsce w kapilarze separacyjnej, bezpośrednio w trakcie analizy próbki. Wykorzystałam tutaj technikę zateżniania tpITP. Postępowanie tego typu pozwoliło w znacznym stopniu obniżyć LOQ wskazanych metod, ale również wpłynęło korzystnie na skrócenie całkowitego czasu postępowania analitycznego (zateżnianie odbywa się w trakcie analizy CE) oraz wyeliminowanie potencjalnych błędów popełnianych w trakcie pracy analityka. Ze względu na to, że wykonanie analiz z wykorzystaniem zaproponowanych metodyk nie jest czasochłonne, a ekstrakcja może być prowadzona równocześnie dla wielu próbek, gdzie ograniczeniem jest tylko ilość próbek przygotowywanych równocześnie w wytrząsarce, metody te charakteryzują się stosunkowo dużą przepustowością, pozwalając na analizę wielu próbek w krótkim czasie. Fakt ten jest niezmiernie korzystny w kontekście rutynowych analiz mięsa na zawartość pozostałości antybiotyków. Zarówno mocz jak i tkanki zwierzęce stanowią bardzo skomplikowane matryce, a więc zastosowanie ekstrakcji pozwoliło na oczyszczenie

próbki ze związków, które mogłyby zakłócać separację analitów. Detekcja UV-Vis okazała się idealna w oznaczaniu Cpx oraz Ofx ze względu na to, że nie był wymagany wyspecjalizowany sprzęt, nie była też konieczna modyfikacja analitów. Ich cząsteczki posiadają w swojej strukturze ugrupowania, które efektywnie absorbują promieniowanie z zakresu UV, nie ma więc konieczności przeprowadzania reakcji derywatywacji, co znacznie wydłużyłoby czas analizy i mogłoby stanowić kolejne źródło błędów skutkujących obniżeniem precyzji oraz dokładności oznaczeń. Zaprojektowanie metod opartych na separacji techniką CE, pozwoliło na stworzenie metodologii przyjaznych środowisku, ze względu na między innymi zminimalizowanie objętości próbek, odczynników potrzebnych do ich przygotowania czy brak konieczności przeprowadzania reakcji derywatywacji.

Procedura oznaczania AZN oraz AZL oparta na technice HPLC z detekcją UV-Vis (D3) również stanowi metodę bardzo użyteczną ze względu na brak konieczności posiadania wyrafinowanego i często bardzo drogiego sprzętu, co jest niekwestionowaną zaletą tej metodologii. Detekcja UV-Vis nie wyróżnia się wysoką czułością stężeniową, jednak ze względu na wprowadzenie do procedury przygotowania próbki etapu zateżniania analitu poprzez redukcję jej objętości, metoda ta pozwala w łatwy sposób oznaczać pozostałości wybranych leków uspokajających poniżej poziomu MRL. Jest to bardzo korzystne z punktu widzenia rutynowych analiz mięsa na zawartość tych związków, ponieważ pozwala na sprawdzenie, który hodowca nie przestrzega okresu karencji podczas stosowania leków weterynaryjnych. Pomimo wad zastosowanego detektora, zdecydowałam się na jego wybór ze względu na to, że jest jednym z najbardziej popularnych detektorów i większość laboratoriów posiada go w swym standardowym wyposażeniu. Zarówno AZN jak i AZL ze względu na swoją budowę i właściwości chemiczne, nie wymagają modyfikacji poprzez derywatywację, co znacznie skraca czas konieczny na przygotowanie próbki. Tkanka mięsna to bardzo skomplikowana matryca, która zawiera duże ilości białka. Konieczne więc było odbiałczanie próbki, aby uniknąć zapchania kolumny chromatograficznej. Niestety, dodanie ACN oraz etanolu do próbki w początkowych etapach jej przygotowania, nie zapewniło całkowitego wytrącenia białek. W związku z tym zmuszona byłam do wprowadzenia dodatkowego etapu odbiałczania za pomocą PCA. Takie postępowanie zapewniło całkowite wytrącenie białek z roztworu próbki. W rezultacie, pomimo niewielkiego stopnia skomplikowania procedury przygotowania próbki, opracowana przeze mnie metodologia charakteryzuje się dobrą czułością, precyzją, jak również dokładnością analiz. Podsumowanie opracowanych przeze mnie metod zawarłam w Tabeli 6.

**Tabela 6. Metody oznaczania fluorochinolonów i azaperonu**

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbki do analizy	Całkowity czas analizy	LOD	LOQ	Zakres liniowości	Matryca próbki	Rodzaj detekcji
<b>FQLs</b>							
tpITP-CZE [D1]	homogenizacja, LLE	55 min	0,3 nmol/g (Cpx) 0,1 nmol/g (Ofx)	0,8 nmol/g (Cpx) 0,3 nmol/g (Ofx)	2 - 10 nmol/g	tkanka zwierzęca	UV-Vis
tpITP-CZE [D2]	LLE	68 min	0,05 nmol/ml (Cpx) 0,01 nmol/ml (Ofx)	0,2 nmol/ml (Cpx) 0,05 nmol/ml (Ofx)	1 - 6 nmol/ml moczu	mocz	UV-Vis
HPLC [D4]	homogenizacja, MSPE na nanocząstkach magnetycznych	77 min	0,04 nmol/g (Cpx) 0,04 nmol/g (Ofx)	0,15 nmol/g (Cpx) 0,15 nmol/g (Ofx)	2 - 10 nmol/g	tkanka zwierzęca	UV-Vis
<b>AZN i AZL</b>							
HPLC [D3]	homogenizacja, liofilizacja, odbiałczanie	54 min	1 µg/kg (AZN) 0,4 µg/kg (AZL)	2,5 µg/kg (AZN) 1,2 µg/kg (AZL)	50 - 300 µg/kg	tkanka zwierzęca	UV-Vis

Z uwagi na powyższe, pomimo wielu ograniczeń wykorzystanych technik analitycznych, udało mi się opracować metody oznaczania wybranych leków weterynaryjnych w taki sposób, aby z jednej strony były one możliwie szybkie, proste i tanie, z drugiej zaś charakteryzowały się dobrą czułością oraz zadowalającą precyzją i dokładnością.



## Podsumowanie i wnioski końcowe

Hodowcy zwierząt często podają im antybiotyki bez wyraźnej przyczyny, profilaktycznie lub też jako stymulatory wzrostu, nie przestrzegając przy tym okresu karencji. Konsumenci natomiast nieświadomie mogą spożywać pozostałości tych związków wraz z mięsem, a następnie wydalac je do środowiska z moczem i kałem. Z uwagi na powyższe jako pierwszy cel mojej pracy doktorskiej obrałam opracowanie narzędzi analitycznych w taki sposób, aby opracowana metodologia była jak najbardziej klasyczna, uniwersalna, użyteczna, ale z drugiej strony wiarygodna i czuła. W piśmiennictwie nie znalazłam elektroforetycznych metod wykorzystujących tpITP do analizy tkanek zwierzęcych na zawartość FQLs, jak również ekstrakcję tych związków chemicznych z zastosowaniem nanocząstek magnetycznych zmodyfikowanych krzemionką z grupami C-18. Opracowałam więc metodologie oznaczania FQLs w tkankach zwierzęcych [D1, D4] oraz w moczu [D2] z wykorzystaniem CE z detekcją UV, ale po raz pierwszy z jednoczesnym zatężaniem w kapilarze na drodze tpITP [D1, D2]. Takie podejście pozwoliło na uzyskanie czułych metod, w których etap przygotowania próbki do analizy nie wymaga poświęcania dużej ilości czasu, pracy i odczynników. W zależności od matrycy próbki, etap przygotowania próbki obejmował homogenizację [D1, D4], ekstrakcję, odparowanie fazy organicznej oraz rozpuszczenie jej w mniejszej objętości rozpuszczalnika niż początkowa objętość próbki [D1, D2, D4]. Takie podejście pozwoliło na opracowanie metod, które mogą być przydatne w rutynowej analizie mięsa oraz moczu na zawartość pozostałości wybranych antybiotyków.

Producenci mięsa oprócz antybiotyków podają zwierzętom również leki uspokajające podczas transportu do rzeźni. Celem jest ograniczenie stresu oraz agresji zwierząt, aby zapobiec pogorszeniu jakości pochodzącego od nich mięsa, ponieważ mięso uzyskane od zestresowanych zwierząt jest twarde i niesmaczne. Niestety, hodowcy często nie przestrzegają okresu karencji i w mięsie spożywanym przez konsumentów mogą znajdować się zakumulowane pozostałości leków. Z uwagi na to, drugi cel mojej pracy doktorskiej obejmował opracowanie narzędzi analitycznych, które umożliwiłyby w prosty i przystępny sposób analizować mięso na zawartość pozostałości wybranych leków uspokajających, AZN oraz jego metabolitu AZL. W metodologii opartej na analizie próbki techniką HPLC [D3] ograniczyłam liczbę etapów przygotowania próbki tylko do tych podstawowych, aby uczynić ją jak najłatwiejszą do odtworzenia w laboratoriach zajmujących się rutynową kontrolą mięsa.

Przygotowanie próbki opierało się na homogenizacji, ekstrakcji, odparowaniu, rozpuszczeniu pozostałości po odparowaniu w mniejszej objętości próbki niż początkowa oraz odbiałczaniu.

Na podstawie wykonanych eksperymentów wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, można sformułować wnioski bardzo ważne z praktycznego punktu widzenia:

- Opracowano cztery nowe metody oznaczania leków weterynaryjnych z grupy antybiotyków oraz leków uspokajających w tkankach oraz moczu, oparte na technikach HPLC lub CE z detekcją UV-Vis,
- Głównym problemem podczas opracowywania takich procedur analitycznych jest uzyskanie wartości LOQ umożliwiającej oznaczanie leków weterynaryjnych na poziomie maksymalnej wartości jaka dopuszczana jest jako zawartość w mięsie,
- W związku z powyższym niezbędne jest wprowadzenie do procedury przygotowania próbki np. procesu ekstrakcji, który pozwoli na zateżenie analitów oraz uproszczenie matrycy próbki,
- Elektroforeza kapilarna z detekcją UV-Vis oraz zateżaniem na drodze przejściowej pseudo-izotachforezy może być z powodzeniem wykorzystywana jako technika oznaczania wybranych FQLs w próbkach mięsa oraz w moczu,
- Chromatografia cieczowa z detekcją UV-Vis może być z kolei wykorzystywana jako technika do oznaczania wybranych leków uspokajających w próbkach mięsa,
- Opracowane metody do oznaczania FQLs w mięsie oraz moczu człowieka, są pierwszymi opartymi na elektroforezie kapilarnej z detekcją UV-Vis oraz jednoczesnym zateżaniem analitów na drodze tpITP,
- Zastosowanie tp-ITP oraz ekstrakcji ciecz-ciecz w opracowanej metodzie oznaczania Cpx oraz Ofx w moczu człowieka pozwoliło na duże zwiększenie czułości CE wyrażone współczynnikami wzmocnienia czułości (SEF) wynoszącymi dla metody 142,4 dla Cpx oraz 216 dla Ofx [D2]. Natomiast wykorzystanie ekstrakcji na MPs zapewniło w metodzie [D4] oznaczania tych związków w tkankach mięsnych zwiększyć czułość na poziomie SEF 127,4 dla Cpx oraz 103,7 dla Ofx,
- Duża trwałość Cpx oraz Ofx pozwala na odparowanie próbki w wysokich temperaturach do 100 °C, jednak świadczy też o tym, że podczas gotowania

posiłku skomponowanego na mięsie, związki te nie ulegną rozkładowi jeśli są w nim obecne,

- Opracowane procedury zastosowano do analizy próbek rzeczywistych. Nie stwierdzono obecności pozostałości FQLs w badanych próbkach mięsa, co jest niezwykle istotne i pozytywne, ponieważ w Polsce zakazane jest stosowanie antybiotyków z tej grupy jako dodatków do pasz,
- Konieczne jest prowadzenie dalszych badań nad wykorzystaniem magnetycznej ekstrakcji w oznaczaniu FQLs, a także próba automatyzacji procedury poprzez jej wykonanie w kapilarze w układzie CE.

Opracowane przeze mnie metody, jak się wydaje konkurencyjne w stosunku do istniejących procedur, mogą stanowić alternatywę dla tych bazujących na dużo droższej i bardziej wyrafinowanej aparaturze. Zaproponowane metodologie mogą w przyszłości posłużyć jako narzędzia dla laboratoriów wykonujących badania mięsa oraz pozwolić na monitorowanie, znajdowanie i usuwanie ze sklepów produktów spożywczych, które zawierają pozostałości leków podawanych zwierzętom. Z punktu widzenia analityki leków weterynaryjnych, rozwinięte procedury oznaczania tych związków istotnie wzbogacają praktyczne aspekty wiedzy z obszaru analizy próbek tkanek oraz moczu na zawartość FQLs i AZP.

## Abstract

This doctoral dissertation is based on the development of new, fast, simple, and not requiring sophisticated equipment methods for the determination of selected veterinary drugs, such as Cpx and Ofx in meat tissues and human urine, as well as some sedative drugs such as AZN and also its metabolite, i.e. AZL, in meat tissues. Developed methodologies are based on the use of popular and classic separation techniques such as CE with UV-Vis detection and HPLC also with UV-Vis detection. Due to the low concentration sensitivity of CE, especially in the case of the use with UV-Vis detection, I decided to perform the extraction during sample preparation step, but also to use an additional concentration stage during the analysis, inside the capillary, i.e. concentration by transient pseudo-isotachopheresis. The methods I developed for the determination of FQLs are the first ones to be based on CE with transient pseudo-isotachopheresis. As a result of the research being the subject of the dissertation, new analytical methods were developed.

Taking the above considerations into account, the main goal I set myself for the conducted experiments was to develop analytical methods based on popular separation techniques, consisting of as few steps as possible in sample preparation. These steps includes homogenization of meat tissues to enable analysis of a solid sample, extraction for concentration of analytes, but also for purification of the sample matrix, evaporation of the organic solvent to dryness, and dissolution of the evaporation residue in a reduced solvent volume. However, in the case of my HPLC-based method, deproteinization had to be included in the sample preparation stage. In addition, I wanted the developed methods to be also sensitive and reliable.

During my research, I developed four new, original analytical procedures. The first one concerns the electrophoretic determination of Cpx and Ofx in meat tissues using transient pseudo-isotachopheresis. The second method I developed allows for the determination of Cpx and Ofx in human urine using the same analytical technique. The third method is based on the chromatographic determination of AZN and AZL in meat tissues. However, in the fourth developed method, I decided to use a modern extraction technique on magnetic functionalized nanoparticles. These methods are based on simple sample preparation procedure and subsequent analysis using an appropriate separation technique for detection and quantification of analytes. Finally, the methods were validated and I proved that these methodologies are

characterized by satisfactory validation parameters such as low enough LOD and LOQ, and good precision and accuracy. I also proved that these methods can be successfully used for routine analysis of meat and urine samples for the determination of selected veterinary drugs.

## Wykaz literatury:

- [1] T.D.M. Pham, Z.M. Ziora, M.A.T. Blaskovich, *Quinolone antibiotics*, *Med. Chem. Commun.* 10 (2019) 1719-1739.
- [2] G.S. Bisacchi, *Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded "Discovery Story"*, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 4874-4882.
- [3] H. Liu, S.G. Mulholland, *Appropriate antibiotic treatment of genitourinary infections in hospitalized patients*, *Am. J. Med.* 118 (2005) 14-20.
- [4] A.M. Emmerson, *The quinolones: decades of development and use*, *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2003) 13-20.
- [5] M.D. Adjei, J. Deck, T.M. Heinze, J.P. Freeman, A.J. Williams, J.B. Sutherland, *Identification of metabolites produced from N-phenylpiperazine by Mycobacterium spp*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (2006) 219-224.
- [6] P. Kowalski, A. Plenis, *Simultaneous determination of six quinolone antibiotics in poultry and porcine samples by capillary electrophoresis*, *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 52 (2008) 81-85.
- [7] W. Gao, G. Chen, Y. Chen, X. Zhang, Y. Yin, Z. Hu, *Application of single drop liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879(3-4) (2011) 291-295.
- [8] Physicians' Desk Reference. 55th ed. Montvale, NJ: Medical Economics Co, (2001) str. 852.
- [9] G.K. McEvoy, (ed.). *American Hospital Formulary Service- Drug Information 2001. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 2001 (Plus Supplements).*, str. 739
- [10] K. Torniainen, S. Tammilehto, V. Ulvi, *The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin*, *Int. J. Pharm.* 132 (1996) 53-61.
- [11] A.R. Prasad, J.V. Ratna, *Development and validation of a simple UV-spectrophotometric method for the determination of ciprofloxacin HCL present in taste masked drug resin complex*, *Int. J. App. Pharm.* 10 (2018) 37-41.
- [12] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4583#section=Solubility>, data odwiedzin: styczeń, 2023.
- [13] J. Tolls, *Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review*, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3397-3406.
- [14] J.M. Blondeau, *Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance*, *Surv. Ophthalmol.* 49 (2004) S73-S78.

- [15] P.C. Sharma, A. Jain, S. Jain, *Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects*, Acta Pol. Pharm. 66 (2009) 587-604.
- [16] G.L. Patrick, *An introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2003, pp. 379-435.
- [17] D.L. Van Caekenberghe, S.R. Pattyn, *In vitro activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperazinyl-substituted quinoline derivatives*, Antimicrob. Agents Chemother. 25 (1984) 518-521.
- [18] L.R. Peterson, *Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity*, Clin. Infect. Dis. 33 (2001) S180-S186.
- [19] A.A.E. Solh, A. Alhajhusain, *Update on the treatment of Pseudomonas aeruginosa pneumonia*, J. Antimicrob. Chemother. 64 (2009) 229-238.
- [20] J.M. Domagala, *Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials*, J. Antimicrob. Chemother. 33 (1994) 685-706.
- [21] P. Ball, *Moxifloxacin (avelox): an 8-methoxyquinolone antibacterial with enhanced potency*, Int. J. Clin. Pract. 54 (2000) 329-332.
- [22] K.E. Brighty, T.D. Gootz, *The chemistry and biological profile of trovafloxacin*, J. Antimicrob. Chemother. 39 (1997) 1-14.
- [23] M.N. Lowe, H.M. Lamb, *Gemifloxacin*, Drugs, 59 (2000) 1137-1147.
- [24] Y. Dong, C. Xu, X. Zhao, J. Domagala, K. Drlica, *Fluoroquinolone Action against Mycobacteria: Effects of C-8 Substituents on Growth, Survival, and Resistance*, Antimicrob. Agents Chemother. 42 (1998) 2978-2984.
- [25] W.L. Cuypers, J. Jacobs, V. Wong, E.J. Klemm, S. Deborggraeve, S. Van Puyvelde, *Fluoroquinolone resistance in Salmonella: insights by whole-genome sequencing*, Microb. Genomics 4 (2018) e000195.
- [26] K. Patel, J. L. Goldman, *Safety Concerns Surrounding Quinolone Use in Children*, J. Clin. Pharmacol, 56 (2016) 1060-1075.
- [27] K. Shimoda, *S16/L1 - Mechanisms of quinolone phototoxicity*, Toxicol. Lett. 95 (1998) 19.
- [28] J. Kawakami, K. Yamamoto, A. Asanuma, K. Yanagisawa, Y. Sawada, T. Iga, *Inhibitory effect of new quinolones on GABA(A) receptor-mediated response and its potentiation with felbinac in Xenopus oocytes injected with mouse-brain mRNA: correlation with convulsive potency in vivo*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 145 (1997) 246-254.
- [29] G. Eikelenboom, D. Minkema, *Prediction of pale, soft, exudative muscle with a nonlethal test for the halothane induced porcine malignant hyperthermia syndrome*, Tijdschr. Diergeneesk. 99 (1974) 421-426.

- [30] G.J. Benson, J.C. Thurmon, *Anesthesia of swine under field conditions*, J. Am. Vet. Med. Assoc. 174 (1979) 594-596.
- [31] G. Rauws, M. Olling, J. Freudenthal, M. ten Ham, *Azaperol, a new metabolite of the veterinary butyrophenone tranquilizer azaperone*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 35 (1976) 333-339.
- [32] [https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/EP9/EP9.0\\_02\\_\\_118.pdf](https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/EP9/EP9.0_02__118.pdf), data odwiedzin: styczeń 2023.
- [33] [https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1321320\\_EN.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1321320_EN.htm), data odwiedzin: styczeń 2023.
- [34] R. Dantzer, *New aspects of the use of tranquilizers in animal husbandry, with particular reference to pigs*, Vet. Sci. Commun. 1 (1977) 161-169.
- [35] D.N. D'Souza, F.R. Dunshea, B.J. Leury, R.D. Warner, *Effect of mixing boars during lairage and pre-slaughter handling on pork quality*, Aust. J. Agric. Res. 50 (1999) 109-113.
- [36] R.D. Donald, K.M.D. Rutherford, A.B. Lawrence, *Effect of Azaperone on the behaviour of pigs in an elevated-plus maize*, Proceedings of the UFAW Conference; 30.06.2010.
- [37] M.R. Read, R.B. McCorkell, *Use of azaperone and zuclopenthixol acetate to facilitate translocation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)*, J. Zoo. Wildl. Med. 33 (2002) 163-165.
- [38] FAO, *Residues of some veterinary drugs in animals and foods*. FAO food and nutrition paper 41/7, Rome, 1, 1994.
- [39] EC (1998) Commission Regulation (EC) No 1958/98 of 15 September 1998 amending Annexes I, II and III of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (1) (OJ L 4, 16.9.1998).
- [40] EMEA, Azaperone. Summary Report (2). EMEA/MRL/300/97-Final, Listopad 1997.
- [41] N. Mestorino, M.L. Marchetti, M. Daniele, *Tissue depletion of azaperone and its metabolite azaperol after oral administration of azaperone in food-producing pigs*, Rev. Toxicol. 30 (2013) 209-214.
- [42] Z. Wang, X.Y. Wang, H. Tian, Q.H. Wei, B.S. Liu, G.M. Bao, M.L. Liao, J.L. Peng, X.Q. Huang, L. Wang, *Through-put determination of 28 veterinary antibiotic residues in swine wastewater by one-step dispersive solid phase extraction sample cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, Chemosphere 230 (2019) 337-346.



- [43] S. Cairoli, R. Simeoli, M. Tarchi, M. Dionisi, A. Vitale, L. Perioli, C. Dionisi-Vici, B.M. Goffredo, *A new HPLC–DAD method for contemporary quantification of 10 antibiotics for therapeutic drug monitoring of critically ill pediatric patients*, Biomed. Chromatogr. 34 (2020) e4880.
- [44] A.S. Maia, P. Paíga, C. Delerue-Matos, P.M.L. Castro, M.E. Tiritan, *Quantification of fluoroquinolones in wastewaters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Environ. Pollut. 259 (2020) 113927.
- [45] W. Zheng, A.M.A. El-Aty, S.K. Kim, J.M. Choi, D.H. Park, K.H. Yoo, Y.S. Kang, J.S. Jeon, A. Hacımüftüoğlu, J.H. Shim, H.C. Shin, *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*, Biomed. Chromatogr. 33 (2019) e4501.
- [46] I. Timofeeva, K. Stepanova, A. Shishov, L. Nugbienyo, L. Moskvin, A. Bulatov, *Fluoroquinolones extraction from meat samples based on deep eutectic solvent formation*, J. Food Compos. Anal. 93 (2020) 103589.
- [47] W. Gao, G. Chen, Y. Chen, X. Zhang, Y. Yin, Z. Hu, *Application of single drop liquid–liquid–liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. B 879 (2011) 291-295.
- [48] L. Vera–Candioti, C.M. Teglia, M.S. Cámara, *Dispersive liquid–liquid microextraction of quinolones in porcine blood: Optimization of extraction procedure and CE separation using experimental design*, Electrophoresis 37 (2016) 2670-2677.
- [49] P. Paul, C. Van Laeken, C. Sängler-van de Griend, E. Adams, A. Van Schepdael, *CE–C<sup>4</sup>D method development and validation for the assay of ciprofloxacin*. J. Pharm. Biomed. Anal. 129 (2016) 1-8.
- [50] K. Ghoufran, M. Mohammad, M. Oussama, S.A. Alhaj, *Analytical methods of ciprofloxacin and its combinations review*, Res. J. Pharm. Technol. 11 (2018) 2139-2148.
- [51] A. Czyski, *Analytical Methods for Determining Third and Fourth Generation Fluoroquinolones: A Review*, Chromatographia 80 (2017) 181-200.
- [52] P.S. Peixoto, V.I. Tóth, M.A. Segundo, H.L.F.C. Lima, *Fluoroquinolones and sulfonamides: Features of their determination in water. A review*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 96 (2016) 185-202.
- [53] Q.Yu, Y.Y. Wu, M. Zhou, P. Cao, *Determination of fluoroquinolones in environmental water samples by capillary electrophoresis with dispersive liquid-liquid microextraction based on ultrasonic-assisted in-situ formation and solidification of floating deep eutectic solvent*, JINST, 42(2023)715-721.

- [54] K. Pauter, M. Szultka-Młyńska, M. Szumski, P. Pomastowski, B. Buszewski, *CE-DAD-MS/MS in the simultaneous determination and identification of selected antibiotic drugs and their metabolites in human urine samples*, *Electrophoresis*, 43 (2022) 978-989.
- [55] K. Yu, M.E. Yue, J. Xu, T.F. Jiang, *Determination of fluoroquinolones in milk, honey and water samples by salting out-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent combined with MECC*, *Food Chem.* 332 (2020) 127371.
- [56] W. Zhang, F. Yang, H. Wang, C. Gu, K. Zhou, *Determination of four residues of fluoroquinolones with similar structure in fish by modified QuEChERS protocol coupled to capillary electrophoresis (CE) with end-column electrochemiluminescence (ECL)*, *Int. J. Electrochem. Sci.* 15 (2020) 6802-6814.
- [57] S. Lahouidak, M. L. Soriano, R. Salghi, M. Zougagh, Á.Ríos, *Graphene quantum dots for enhancement of fluorimetric detection coupled to capillary electrophoresis for detection of ofloxacin*, *Electrophoresis*, 40 (2019) 2336-2341.
- [58] Z.B. Chen, X. Wang, Y.C. Yin, G.N. Chen, *Determination of four fluoroquinolones drug residues in aquatic products by capillary electrophoresis-electrochemiluminescence with modified gold nanoparticles enrichment*, *JINST*, 38 (2019),176-181.
- [59] D. Moreno-González, A.M. Hamed, B. Gilbert-López, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, *Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples*, *J. Chromatogr. A* 1510 (2017)100-107.
- [60] V.H. Springer, A.G. Lista, *In-line coupled single drop liquid-liquid-liquid microextraction with capillary electrophoresis for determining fluoroquinolones in water samples*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 1572-1579.
- [61] X. Xu, L. Liu, Z. Jia, Y. Shu, *Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in foods of animal origin by capillary electrophoresis with field amplified sample stacking-sweeping technique*, *Food Chem.* 176 (2015) 219-225.
- [62] Z. Haiyun, Z. Lanchun, P. Yufang, Y. Kaisong, H. Lu, Y. Xiao, *Simultaneous determination of chloramphenicol, ciprofloxacin, nitrofurantol antibiotics and their metabolites in fishery products by CE*, *Chromatographia* 78 (2015) 551-556.
- [63] V. Springer, J. Jacksén, P. Ek, A.G. Lista, Å. Emmer, *Capillary electrophoretic determination of fluoroquinolones in bovine milk followed by off-Line MALDI-TOF-MS analysis*, *Chromatographia*, 78 (2015) 285-290.

- [64] Y. Deng, N. Gasilova, L. Qiao, Y.L. Zhou, X.X. Zhang, H.H. Girault, *Highly sensitive detection of five typical fluoroquinolones in low-fat milk by field-enhanced sample injection-based CE in bubble cell capillary*, *Electrophoresis*, 35 (2014) 3355-3362.
- [65] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, *Determination of fluoroquinolone antibiotics by microchip capillary electrophoresis along with time-resolved sensitized luminescence of their terbium(III) complexes*. *Microchim. Acta* 181 (2014) 1897-1904.
- [66] M. Horká, M. Vykydalová, F. Růžicka, J. Šalplachta, V. Holá, M. Dvořáčková, A. Kubesová, K. Šlais, *CIEF separation, UV detection, and quantification of ampholytic antibiotics and bacteria from different matrices*. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6285-6296.
- [67] D. Moreno-González, F.J. Lara, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, *Molecularly imprinted polymer as in-line concentrator in capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the determination of quinolones in bovine milk samples*, *J. Chromatogr. A* 1360 (2014) 1-8.
- [68] A. Rusu, G. Hancu, G. Völgyi, G. Tóth, B. Noszál, Á. Gyéresi, *Separation and determination of quinolone antibacterials by capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 919-925.
- [69] S. Zhao, H. Zhao, H. Zhu, C. Li, X. Lu, S. Bi, *Determination of norfloxacin and ciprofloxacin in chicken meat based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary zone electrophoresis*, *J. Chem.* 2014 (2014) 610120.
- [70] R.H.O. Montes, M.C. Marra, M.M. Rodrigues, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Fast determination of ciprofloxacin by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*, *Electroanalysis*, 26 (2014) 432-438.
- [71] G. Hancu, A. Rusu, B. Simon, G. Boia, Á. Gyéresi, *Simultaneous separation of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin by micellar electrokinetic chromatography*, *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2012) 1889-1894.
- [72] M.Y. Piñero, R. Garrido-Delgado, R. Bauza, L. Arce, M. Valcárcel, *Easy sample treatment for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in raw bovine milk by capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 33 (2012) 2978-2986.
- [73] I.S. Ibarra, J.A. Rodriguez, M.E. Páez-Hernández, E.M. Santos, J.M. Miranda, *Determination of quinolones in milk samples using a combination of magnetic solid-phase extraction and capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 33 (2012) 2041-2048.

- [74] A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.Á. Rodríguez-Delgado, *Dispersive liquid–liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters*, *Electrophoresis*, 31 (2010) 3457-3465.
- [75] Z. Yang, W. Qin, *Separation of fluoroquinolones in acidic buffer by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5327-5332.
- [76] Z. Fu, Y. Liu, L. Wang, Y. Wang, *Simultaneous quantitation of quinolone residues in biological fluid by CE combined with electrogenerated-chemiluminescent detection*, *Chroma*. 69 (2009) 1101-1105.
- [77] Y.M. Liu, Y.X. Jia, W. Tian, *Determination of quinolone antibiotics in urine by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection*. *J. Sep. Science* 31 (2008) 3765-3771.
- [78] H. Sun, W. Zhao, P. He, *Effective Separation and Simultaneous Determination of Four Fluoroquinolones in Milk by CE with SPE*, *Chroma* 68 (2008) 425-429.
- [79] X. Zhou, D. Xing, D. Zhu, Y. Tang, L. Jia, *Development and application of a capillary electrophoresis–electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk*, *Talanta* 75 (2008) 1300-1306.
- [80] A.F. Faria, M.V.N. de Souza, M.A.L. de Oliveira, *Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations*, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 389-396.
- [81] H. Sun, P. He, Y. Lv, S. Liang, *Effective separation and simultaneous determination of seven fluoroquinolones by capillary electrophoresis with diode-array detector*, *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 145-151.
- [82] Y.Y. Zhao, L.J. Wang, Y.Q. Li, Y.Y. Han, G.L. Du, *On-line sweeping determination of quinolines in pork tissue by micellar capillary electrophoresis*, *Chem. J. Chin. Univ.* 28 (2007) 62-64.
- [83] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, J.M. Bosque-Sendra, L.E. García-Ayuso, *Multiresidue method for the determination of quinolone antibiotics in bovine raw milk by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry*, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7665-7673.
- [84] H. Sun, P. He, Y. Lv, X. Zhao, S. Liang, *Simultaneous determination of ciprofloxacin, ofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis*, *CJI*, 8 (2006).

- [85] L. Wang, X. Wu, Z. Xie, *Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin by high performance capillary electrophoresis with end-column amperometric detection*, J. Sep. Science 28 (2005) 1143-1148.
- [86] M. Ferdig, A. Kaleta, V.T.D. Thanh, W. Buchberger, *Improved capillary electrophoretic separation of nine (fluoro)quinolones with fluorescence detection for biological and environmental samples*, J. Chromatogr. A 1047 (2004) 305-311.
- [87] Y. Zhao, G. Yang, H. Yan, Q. Yue, Y. Chen, *Determination of ciprofloxacin in plasma by micelle capillary electrophoresis on-line sweeping concentration technique*, Chin. J. Anal. Chem. 32 (2004) 485-488.
- [88] J. McCourt, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *Development of a capillary zone electrophoresis-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the analysis of fluoroquinolone antibiotics*, J. Chromatogr. A 990 (2003) 259-269.
- [89] M. Hernández, C. Aguilar, F. Borrull, M. Calull, *Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. B 772 (2002) 163-172.
- [90] C. Horstkötter, E. Jiménez-Lozano, D. Barrón, J. Barbosa, G. Blaschke, *Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection*, Electrophoresis, 23 (2002) 3078-3083.
- [91] Barrón, D. E. Jiménez-Lozano, J. Cano, J. Barbosa, *Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis*, Chromatogr. B 759 (2001), 73-79.
- [92] C. Fierens, S. Hillaert, W. Van den Bossche, *The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis*, J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) 763-772.
- [93] L. He, J. Wang, G. Zhang, R. Liu, B. Fang, *Simultaneous Determination of Tranquilizers and Carazolol Residues in Swine Tissues by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Anal. Lett. 45 (2012) 1377-1389.
- [94] H.J. Keukens, M.M.L. Aerts, *Determination of residues of carazolol and a number of tranquilizers in swine kidney by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection*, J. Chromatogr. A 464 (1991) 149-161.
- [95] V. Cerkvenik-Flajs, *Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection*. Anal. Chim. Acta. 586 (2007) 374-382.

- [96] B. Sell, A. Posyniak, M. Gbyl, *Screening procedure for simultaneous determination of azaperone, carazolol, and chlorpromazine in animal urine*, Bull. Vet. Inst. Pulawy 55 (2011) 513-517.
- [97] K. Mitrowska, A. Posyniak, J. Zmudzki, *Rapid method for the determination of tranquilizers and a beta-blocker in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, Anal. Chim. Acta. 637 (2009) 185-192.
- [98] M.L. Oca, L. Rubio, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, I. García, M. Bañuelos, S. Burgos, *Robustness testing in the determination of seven drugs in animal muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 151 (2016) 172-180.
- [99] L.G. Oliveira F. Barreto, R. Hoff, G. Rübensam, M.H. Scherer Kurz, G. Galle, F.F. Gonçalves, *Validation of a method for sedatives and  $\beta$ -blockers determination in swine, bovine and equine kidney using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 34 (2017) 32-39.
- [100] L. Chen, X. Hu, Y. Xing, Y. Sun, M. Hu, G. Zhang, *Highly sensitive immunochromatographic assay for simultaneous determination of azaperone and azaperol in pork*. Food Chem.: X 17 (2023) 100525.
- [101] H. Moon, A.J. Nam, K.E. Muambo, J.E. Oh, *Simultaneous multi-residue analytical method for anesthetics and sedatives in seafood samples by LC-ESI/MSMS*, Food Chem. 404 (2023) 134157.
- [102] J.K.Y. Wong, G.H.M. Chan, T.L.S. Choi, K.Y. Kwok, M.Y. Lau, G.N.W. Leung, T.S.M. Wan, E.N.M. Ho, *A high-throughput and broad-spectrum screening method for analysing over 120 drugs in horse urine using liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry*, Drug Test Anal. 12 (2020) 900-917.
- [103] L.G. de Oliveira, F. Barreto, R. Hoff, G. Rübensam, M. H. Scherer Kurz, G. Galle, F.F. Gonçalves, *Validation of a method for sedatives and  $\beta$ -blockers determination in swine, bovine and equine kidney using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, Food Addit. Contam. 34 (2017) 32-39.
- [104] L.G. De Oliveira, M.H.S. Kurz, F.F. Gonçalves, F. Barreto, G. Rübensam, R. Hoff, *Development of extraction procedure for analysis of sedatives and  $\beta$ -blockers in swine kidney*, Quim. Nova 37 (2014) 1342-1350.
- [105] C. Bock, C.S. Stachel, *Development and validation of a confirmatory method for the determination of tranquilisers and a  $\beta$ -blocker in porcine and bovine kidney by LC-MS/MS*, Food Addit. Contam. 30 (2013) 1000-1011.

- [106] L. He, J. Wang, G. Zhang, R. Liu, B. Fang, *Simultaneous determination of tranquilizers and carazolol residues in swine tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Anal. Lett. 45 (2012) 1377-1389.
- [107] I. Zawadzka, L. Rodziewicz, *Determination of azaperone and carazolol residues in animals kidney using LC-MS/MS method*, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 60 (2009) 19-23.
- [108] Y. Aoki, H. Hakamata, Y. Igarashi, K. Uchida, H. Kobayashi, N. Hirayama, A. Kotani, F. Kusu, *Simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal tissues by HPLC with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 877 (2009) 166-172.
- [109] D. Fluchard, S. Kiebooms, M. Dubois, P. Delahaut, *Determination of a method for detecting and quantifying azaperone, azaperol and carazolol in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 744 (2000) 139-147.
- [110] J. Wang, D. Leung, W. Chow, J. Chang, J.W. Wong, *Development and validation of a multiclass method for analysis of veterinary drug residues in milk using ultrahigh performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole orbitrap mass spectrometry*, Agric. Food Chem. 63 (2015) 9175-9187.
- [111] V. Mersch-Sundermann, J. Stein, *Szkodliwe działanie zanieczyszczeń żywności i pozostałości występujących w produktach spożywczych*. [w:] Bronkowska M. [red.], *Wybrane zagadnienia z zakresu toksykologii żywności oraz wpływu pokarmu na farmakoterapię*. MedPharm Polska, (2016) 121.
- [112] P. Kubalczyk, E. Bald, *Methods of analyte concentration in a capillary*. [w:] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski [red.], *Electromigration Techniques – Theory and Practice*, wyd. 1, Springer Series in Chemical Physics 105, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Springer Ser. Chem. Phys. (2013) 215-235.
- [113] FDA, *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations* (2018).
- [114] M.L. Guzmán, C.B. Romañuk, M.F. Sanchez, L.C. Luciani Giacobbe, L.P. Alarcón-Ramirez, F.D. Battistini, F.L. Alovero, A.F. Jimenez-Kairuz, R.H. Manzo, M.E. Olivera, *Urinary excretion of ciprofloxacin after administration of extended release tablets in healthy volunteers. Swellable drug-polyelectrolyte matrix versus bilayer tablets*, Drug Deliv. and Transl. Res. 8 (2017) 123-131.

- [115] B. Verzola, C. Gelfi, P.G. Righetti, *Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis quantitative study on the chemical composition of the background electrolyte for minimising the phenomenon*, J. Chromatogr. A 868 (2000) 85-99.
- [116] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, *AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software*, Anal. Chem. 92 (2020) 10076–10082.
- [117] T. Baciú, F. Borrull, C. Neus-uß, C. Aguilar, M. Calull, *Capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction using magnetic particles as new adsorbents for the determination of drugs of abuse in human urine*, Electrophoresis 37 (2016) 1232-1244.



## Życiorys/dorobek naukowy

### Przebieg kształcenia:

10.2019-obecnie	Uniwersytet Łódzki, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, dziedzina: nauki chemiczne
10.2017-07.2019	Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, studia stacjonarne, II stopień, kierunek: analityka chemiczna, temat pracy: <i>Oznaczanie witaminy C z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej</i> , tytuł zawodowy: Magister
10.2017-07.2019	Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, studia stacjonarne, II stopień, kierunek: nauczanie chemii, temat pracy: <i>Opracowanie instrukcji do ćwiczenia studentkiego „Spektrofotometryczne oznaczanie witaminy C w preparatach farmaceutycznych”</i> , tytuł zawodowy: Magister
10.2014-06.2017	Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, studia stacjonarne, II stopień, kierunek: analityka chemiczna, temat pracy: <i>Wykorzystanie suchych testów w analizie krwi</i> , tytuł zawodowy: Licencjat

### Efekty działalności naukowo-badawczej podczas studiów II stopnia:

#### Publikacje naukowe oraz popularnonaukowe:

- I. Kośka, P. Kubalczyk, *Wykorzystanie suchych testów w analizie krwi*, Chemia w szkole, 2019
- I. Kośka, P. Kubalczyk, *Elektroforeza jako metoda oznaczania kwasu askorbinowego w preparatach farmaceutycznych oraz w próbkach moczu*, Chemia w szkole, 2019

#### Komunikaty konferencyjne - referaty:

- 24.06.2019: Łódź, Polska, X Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, *Wykorzystanie mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w oznaczaniu tiolaktonu homocysteiny za pomocą elektroforezy kapilarnej*, K. Purgat, I. Kośka, P. Kubalczyk

### **Komunikaty konferencyjne - plakaty:**

- 20.02.2019: Łódź, Polska, Młodzi zdolni, *Spektrofotometryczne oznaczanie kwasu askorbinowego w suplementach diety*, **I. Kośka**, P. Kubalczyk, A. Szcześniak
- 9-10.05.201: Łódź, Polska, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, *Utilization of single drop microextraction for urine sample preparation*, K. Purgat, **I. Kośka**, P. Kubalczyk
- 24.06.2019: Łódź, Polska, X Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, *Opracowanie warunków elektroforetycznych do oznaczania witaminy C w preparatach farmaceutycznych*, **I. Kośka**, P. Kubalczyk
- 24.06.2019: Łódź, Polska, X Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, *Instrukcja do ćwiczenia studenckiego „Spektrofotometryczne oznaczanie witaminy C w preparatach farmaceutycznych*, **I. Kośka**, A. Szcześniak

### **Udział w projektach badawczych:**

- 02.2019-04.2019: **Kierownik** w projekcie Studencki Grant Badawczy UŁ, wniosek nr 133, *Opracowanie elektroforetycznej metody oznaczania kwasu askorbinowego w preparatach farmaceutycznych oraz w próbkach moczu.*

### **Efekty działalności naukowo-badawczej podczas kształcenia w Szkole Doktorskiej:**

### **Publikacje naukowe oraz popularnonaukowe:**

- K. Purgat, P. Olejarz, **I. Kośka**, R. Głowacki, P. Kubalczyk, Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction, *Analytical Biochemistry*, 596 (2020) 113640.
- **I. Kośka**, K. Purgat, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachophoresis*, *Molecules*, 26 (2021) 6931.
- K. Purgat, P. Olejarz, **I. Kośka**, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *The use of single drop microextraction and field amplified sample injection for CZE determination of homocysteine thiolactone in urine*, *Molecules* 26 (2021) 5687.

- **I. Kośka**, K. Purgat, P. Kubalczyk, *Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine*, Scientific Reports, 12 (2022) 7729.
- **I. Kośka**, P. Kubalczyk, *Development of the chromatographic method for simultaneous Simulperone and azaperol in animal kidneys and livers*, International Journal of Molecular Sciences, 24 (2023) 100.
- **I. Kośka**, P. Kubalczyk, M. Cichomski, A. Kisielewska, *The use of extraction on C18-silica-modified magnetic nanoparticles for the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues*, Molecules, 28 (2023) 6123.

#### **Komunikaty konferencyjne - referaty:**

- 13-17.09.2021: Łódź, Polska, 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Proste, szybkie i tanie sposoby poprawy czułości w elektroforezie kapilarnej*, P. Kubalczyk, **I. Kośka**, K. Purgat
- 19-23.06.2022: Łódź, Polska, XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, *Zastosowanie elektroforezy kapilarnej do oznaczania fluorochinolonów w moczu*, P. Kubalczyk, **I. Kośka**
- 19-23.06.2022: Łódź, Polska, XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, *Rozwijanie elektroforetycznej metody oznaczania niektórych fluorochinolonów w tkankach zwierzęcych*, **I. Kośka**, P. Kubalczyk
- 18-19.05.2023: Łódź, Polska, X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, *Chromatograficzne oznaczanie azaperonu i azaperolu w tkankach zwierzęcych*, **I. Kośka**, P. Kubalczyk

#### **Komunikaty konferencyjne - plakaty:**

- 10-12.09.2020: I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Utilization of simple extraction procedure for human urine preparation for determination of ofloxacin and ciprofloxacin*, **I. Kośka**, P. Kubalczyk
- 2-4.11.2020: Nanjing, China, 27th International Symposium on Electrophoretic and Liquid Phase Separation Techniques, ITP 2020, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine by capillary electrophoresis*, **I. Kośka**, K. Purgat, P. Kubalczyk

- 15-16.05.2021: Wrocław, Polska, XVII Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, *Oznaczanie cyprofloksacyny i ofloksacyny w wybranych tkankach zwierząt za pomocą elektroforezy kapilarnej*, P. Nowak, **I. Kośka**, P. Kubalczyk
- 13-17.09.2021: Łódź, Polska, 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Elektroforetyczne oznaczanie wybranych fluorochinolonów w moczu człowieka*, **I. Kośka**, P. Kubalczyk, K. Purgat
- 11-16.09.2022: Lublin, Polska, 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Zastosowanie elektroforezy kapilarnej do oznaczania wybranych fluorochinolonów w tkankach zwierząt*, **I. Kośka**, P. Kubalczyk
- 25-28.06.2023: Katowice, Polska, XIII Polska Konferencja Chromatograficzna, *Wykorzystanie ekstrakcji do fazy stałej na nanocząstkach magnetycznych w przygotowaniu próbki do analizy techniką CE*, P. Kubalczyk, **I. Kośka**, M. Cichomski, A. Kisielewska

#### **Udział w projektach badawczych:**

- 05.2022-10.2023 **Wykonawca** w projekcie Grant na zwiększenie potencjału aplikacyjnego w ramach projektu Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza, 11/GNZPA/2022, *Zastosowanie ekstrakcji na nanocząstkach magnetycznych w elektroforetycznym oznaczeniu leków z grupy fluorochinolonów*
- 01.2023-06.2023: **Kierownik** w projekcie Doktorancki Grant Badawczy UŁ, B2311109000167.07, *Chromatograficzne oznaczenie wybranych środków uspokajających w tkankach zwierzęcych*

#### **Staże zagraniczne:**

- 05-08.09.2022: Braszów, Rumunia, International Summer School - *Food Safety and Healthy Living* - FSHL 2022

#### **Prowadzenie zajęć dydaktycznych:**

- 09.20219-08.2023: prowadzenie zajęć dydaktycznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego obejmujących laboratoria z przedmiotów: Techniki przygotowania próbek do analizy, Techniki elektromigracyjne w analizie chemicznej, Pracowania specjalizacyjna, Dydaktyka chemii oraz Praktyczne aspekty przygotowania próbek do analizy

**Działalność organizacyjna:**

- 2021-2023: członek Rady Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego
- 19-23.06.2022: udział w organizacji XI Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej
- 30.06.2022: organizacja oraz moderacja Drzwi Otwartych Szkół Doktorskich Uniwersytetu Łódzkiego w ramach V Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego
- 2022-2023: członek Rady Samorządu Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego

**Dodatkowe osiągnięcia:**

- **Nagrody Rektora za działalność:**
  - w Radzie Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego,
  - w Radzie Samorządu Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego,
  - pełnienie funkcji Sekretarza Rady Samorządu Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego,
  - organizację oraz moderację Drzwi Otwartych Szkół Doktorskich Uniwersytetu Łódzkiego w ramach V Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego.



WYDZIAŁ  
CHEMII

Uniwersytet Łódzki

Miejscowość, dnia Łódź, 12.09.2023r.

Dr hab. Paweł Kubalczyk, prof. UŁ  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska  
e-mail: pawel.kubalczyk@chemia.uni.lodz.pl

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w wymienionych poniżej pracach, włączonych przez Panią mgr Izabellę Kośka do rozprawy doktorskiej polegał na zarysowaniu koncepcji badawczej, pomocy w dyskusji wyników oraz pomocy w redakcji manuskryptów.

1. I. Kośka, K. Purgat, R. Głowacki, **P. Kubalczyk**, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachophoresis*, *Molecules*, 26 (2021) 6931
2. I. Kośka, K. Purgat, **P. Kubalczyk**, *Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine*, *Scientific Reports*, 12 (2022) 7729
3. I. Kośka, **P. Kubalczyk**, *Development of the chromatographic method for simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal kidneys and livers*, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023) 100
4. I. Kośka, **P. Kubalczyk**, M. Cichomski, A. Kisielewska, *The application of extraction on C18-silica-modified magnetic-nanoparticles in the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues*, *Molecules*, 28 (2023) 6123

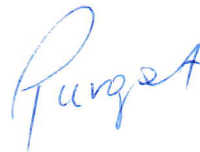
Katedra Chemii Środowiska  
tel.: +48426355835, fax: +48426355832,  
ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź

Mgr Krystian Purgat  
e-mail: krystian.purgat@edu.uni.lodz.pl

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w niżej wymienionych pracach, włączonych przez Panią mgr Izabellę Kośką do rozprawy doktorskiej polegał na pomocy w redakcji manuskryptów.

1. I. Kośka, K. Purgat, R. Głowacki, **P. Kubalczyk**, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachophoresis*, *Molecules*, 26 (2021) 6931
2. I. Kośka, **K. Purgat**, P. Kubalczyk, *Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine*, *Scientific Reports*, 12 (2022) 7729





WYDZIAŁ  
CHEMII

Uniwersytet Łódzki

Miejscowość, dnia 16.09.2023

Prof. dr hab. Rafał Głowacki  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska  
e-mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy zatytułowanej *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachophoresis*, *Molecules*, 26 (2021) 6931, włączonej przez Panią mgr Izabellę Kośka do rozprawy doktorskiej polegał na konsultacjach naukowych oraz pomocy w redakcji manuskryptów.





WYDZIAŁ  
CHEMII

Uniwersytet Łódzki

Miejscowość, dnia 14, 09, 2023r

Dr Aneta Kisielewska  
Wydział Chemii  
Katedra Technologii i Chemii Materiałów  
e-mail: aneta.kisielewska@chemia.uni.lodz.pl

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy zatytułowanej *The application of extraction on C18-silica-modified magnetic-nanoparticles in the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues*, *Molecules*, 28 (2023) 6123, włączonej przez Panią mgr Izabellę Kośka do rozprawy doktorskiej polegał na konsultacjach naukowych w zakresie przygotowania próbki do analizy, przygotowaniu powierzchni nanocząstek magnetycznych oraz w dyskusji wyników jak i pomocy w redakcji manuskryptów.

Aneta Kisielewska



**WYDZIAŁ  
CHEMII**

Uniwersytet Łódzki

Miejscowość, dnia 14.08.2023r.

Dr hab. Michał Cichomski, prof. UŁ  
Wydział Chemii  
Katedra Technologii i Chemii Materiałów  
e-mail: [michal.cichomski@chemia.uni.lodz.pl](mailto:michal.cichomski@chemia.uni.lodz.pl)

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy zatytułowanej *The application of extraction on C18-silica-modified magnetic-nanoparticles in the determination of ciprofloxacin and ofloxacin in meat tissues*, *Molecules*, 28 (2023) 6123, włączonej przez Panią mgr Izabellę Kośka do rozprawy doktorskiej polegał na zarysowaniu koncepcji badawczej, pomocy w dyskusji wyników oraz pomocy w redakcji manuskryptów.