

Rapport nr. 103/21
NY ANALYSEMETODE
Antibiotikarester i ensilasje



KVALITET

RAPPORT-TITTEL

NY ANALYSEMETODE - Antibiotikarester i ensilasje

RAPPORTNUMMER	103/21	PROSJEKTNUMMER	103
UTGIVER	RUBIN	DATO	Desember 1993

UTFØRENDE INSTITUSJONER

NORGES VETERINÆRHØGSKOLE

Institutt for farmakologi, mikrobiologi og næringsmiddelhygiene

Postboks 8146 Dep

0033 Oslo

Kontaktpersoner: Magne Yndestad og Victor Hormazábal

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

For at dødfisk fra oppdrettsanlegg skal kunne utnyttes til husdyrfôr, må det etableres en effektiv kildesortering ved det enkelte anlegg slik at fisk (ensilert) som er fersk og antibiotikafri holdes adskilt fra annen dødfisk. Også mottaksbedriftene som produserer ensilasjekonsentrat må ha separate tanker for disse kvalitetene.

For å kunne stole på slike sorteringsrutiner er det avgjørende at man har en kontrollordning som sikrer at antibiotikafri ensilasje holder mål. I praksis vil det si at det ferdige ensilasjekonsentratet analyseres før leveranse til fôrindustrien. Analyser må også foretas av innholdet i de tankene med råensilasje som er klare for produksjon. Med oppbevaring av prøver fra hvert parti ensilasje som hentes på oppdrettsanleggene, vil det være mulig å spore opp åpenbare "syndere".

Til nå har det vært svært vanskelig og tidkrevende å foreta kvantitative analyser av antibiotika av typen oksolinsyre og flumequin i ensilasje. Ensilasje er et svært sammensatt produkt, som består av et utall av ulike forbindelser som forstyrrer letingen etter svært mikroskopiske mengder antibiotika. Opprensingen av prøvene for å fjerne forstyrrende forbindelser har vært så tidkrevende at det har tatt over én dag å få analysert 1 prøve når man opererer med følsomhet på 10 ng/g, som er påvisningsgrensen for den tilgjengelige metoden. Man har derfor stått uten noen operativ analyseordning på dette området.

På oppdrag fra Stiftelsen RUBIN har Norges Veterinærhøgskole på denne bakgrunn utviklet en forenklet analysemetode som har en påvisningsgrense på 40-50 istedet for 10 ng/g. Den er fortsatt basert på HPLC (High Performance Liquid Chromatography), men selve opprenskingsarbeidet er forenklet. Med denne metoden kan et laboratorium klare rundt 18 analyser pr. dag.

Det er blitt arrangert en temadag ved Norges Veterinærhøgskole der metoden er demonstrert for andre analyselaboratorier, slik at disse skal kunne tilby analysetjenester på dette området. Metoden er videre publisert i Journal of Liquid Chromatography.

Stiftelsen RUBIN
Pirsenteret, Brattøra
7005 Trondheim

Telefon 73 51 82 15
Telefax 73 51 70 84

STIFTELSEN
RUBIN
Resirkulering og utnyttelse av
organiske biprodukter i Norge

**NY ANALYSEMETODE FOR PÅVISNING AV
OXOLINSYRE OG FLUMEQUINE I FISKE-ENSILASJE**

Magne Yndestad og Victor Hormazabal



Norges veterinærhøgskole

**INSTITUTT FOR FARMAKOLOGI, MIKROBIOLOGI OG
NÆRINGSMIDDELHYGIENE**

29. oktober 1993

RAPPORT

Ny analysemetode for påvisning av oxolinsyre og flumequine i fiske-ensilasje

av
Magne Yndestad og Victor Hormazabal

Biprodukter fra norsk fiskeoppdrett utgjør omlag 39100 tonn. Dette fremgår av NFFR nytt nr. 3, 1993 hvor RUBIN omtales spesielt.

Biproduktene omfatter slakteavfall som slo og avskjær samt skinn og bein fra filétproduksjonen. Denne verdifulle ressursen kan utnyttes ved ensilering. Ensilasjekonsentratet kan deretter blandes i kraftfôr til ulike dyrearter.

Høsten 1991 fikk Institutt for næringsmiddelhygiene ved Norges veterinærhøgskole (NVH) forespørsel fra ulike instanser om man kunne foreta analyser av ensilasje med henblikk på oxolinsyre og flumequine. Instituttet hadde tidligere utarbeidet en metode for dette. Metoden var imidlertid svært tidkrevende og en god analytiker klarte bare mellom 1 og 2 analyser pr. dag.

Analysene viste at slo og avskjær fra fisk som var godkjent til humant konsum inneholdt rester av oxolinsyre. Mengdene var lave fra 10 til 50 ppb, med noen få unntak som lå høyere. Grunnen til disse restene er den akkumulerte effekt i blant annet skinn og bein som en får under en behandling ved nevnte medikamenter. Dette er publisert tidligere av instituttets forskergruppe på medikamentrester.

Nye analyser våren 1992 blant annet fra konsentrert ensilasje eksportert til Danmark, viste omlag de samme restnivåene som tidligere, men nå ble flumequine også påvist. Dette var naturlig da bruken av flumequine var økende.

Etter anmodning fra STIL foretok undertegnede i 1992 en faglig vurdering av betydningen for menneskers og dyrs helse av de små rester en fant i ensilasjen før denne ble tilblandet kraftfôret. Konklusjonen var at det ikke var faglige argumenter for ikke å godta innblanding ved restkonsentrasjoner av oxolinsyre og flumequine som var lavere enn ca. 50 ppb.

Etter diverse møter hvor blant annet RUBIN, SFT, STIL, SNT, Fiskerdirektoratets kontrollverk og NVH deltok synes det å være enighet om følgende punkter:

- Det må utarbeides en HPLC kontrollmetode for påvisning av oxolinsyre og flumequine i ensilasje. Metoden må være enklere og raskere å utføre enn den gamle. Den må videre ha en deteksjonsgrense på ca. 50 ppb for å sikre at ensilasjen ikke inneholder høyere verdier enn dette. I praksis blir 50 ppb da å betrakte som en grenseverdi.
- Det må i tillegg foretas en streng kontroll/kvalitetssikring for å hindre at "antibiotikaholdig" fisk (fisk som dør under behandling og i løpet av karenstider) ikke blir tilført ensilasjen.

Etter anmodning fra RUBIN besluttet Institutt for næringsmiddelhygiene å forsøke å utarbeide en analysemetode for oxolinsyre og flumequine i ensilasje. Metoden skulle tilfredsstille myndighetenes krav til kontrollmetode. Oppdraget gikk i korthet ut på følgende:

- I løpet av 6 måneder fra ca. 1. april 1993 skulle instituttet utarbeide en analysemetode for oxolinsyre og flumequine i ensilasje.
- Metoden skulle ha en følsomhet på ca. 50 ppb.
- En vanlig trent analytiker skulle klare minst 10 analyser pr. dag.
- Metoden skulle publiseres i et internasjonalt tidsskrift.
- Det skulle holdes kurs hvor aktuelle miljøer fikk gjennomgå metoden i detalj.
- I løpet av prosjektperioden skulle instituttet utføre 30 analyser av ensilasje etter RUBIN's ønske.

Instituttet tok forbehold om at en måtte få Forskningsrådets godkjenning til å ta avd.ing. Victor Hormazabal bort fra det NFR-prosjektet han var engasjert på, og la ham utelukkende konsentrere seg om oppgaven. Etter telefonisk kontakt med direktør Hepsøy avdeling NLVF, fikk en godkjenning på dette.

Arbeid med metoden

Det er viktig å forstå at fiskeensilasje er et uhyre komplisert materiale å analysere. Fiskeensilasje er heller ikke et entydig produkt i analytisk forstand f.eks. kan konsistensen variere fra grøtaktig til en suppelignende sterkt luktende masse. Produktet har et varierende innhold fra mage/tarm med fôr-rester til gjeller, lever, milt, skin, bein, hode osv. Under nedbryting dannes det et utall av ukjente forbindelser. Blant disse forbindelsene skal en finne igjen minst 50 ppb (0,05 mg pr. kg) av oxolinsyre eller flumequine.

Den 20. mars 1993 startet avd.ing. Victor Hormazabal arbeidet med den nye metoden. Etter 3 måneders arbeid hadde han konturene av metoden klar. Det ble da foretatt analyser av prøver fra Hordafôr både etter gammel og ny metode. Resultatene ble deretter sammenholdt, og arbeidet med den nye metoden fortsatte etter visse justeringer. Det ble også foretatt en del analyser på materiale innsendt fra forskergrupper på RUBIN-prosjekter ved Norges landbrukshøgskole.

Etter ytterligere justeringer var metoden gjennomprøvet med tilfredsstillende sensitivitet, "recovery" og "repeatability". En god analytiker kan uten vanskeligheter analysere ca. 18 prøver pr. dag. Det ble utarbeidet fagmanuskript som ble sendt Journal of Liquid Chromathography den 22.10.1993.

Svar på om metoden er antatt for publisering foreligger ennå ikke. Det tar erfaringsmessig 2-3 mnd.

Den 17. september inviterte NVH sammen med RUBIN aktuelle analysemiljøer til en temadag hvor den nye metoden ble demonstrert og gjennomgått i detalj. Fiskeridirektoratets kontrollverk, NLH og Akvaforsk var representert på møtet. Program for temadagen vedlegges.

Konklusjon

Instituttet har utviklet en ny HPLC analysemetode for påvisning av oxolinsyre og flumequine i fiske-ensilasje. Metodens følsomhet er 40 ppb for oxolinsyre og 50 ppb for flumequine. Det er


avholdt en temadag hvor aktuelle analysemiljøer fikk gjennomgått metoden i detalj. Metoden er også sendt til publisering i et internasjonalt tidsskrift med refereesystem. En god analytiker vil kunne klare ca.18 analyser pr. dag.

Instituttet har fått tilbakemelding fra Fiskeridirektoratets kontrollverk om at metoden fungerer. Dette at metoden kan brukes av andre miljøer anser vi for å være meget viktig.

Det kan også tilføyes at Hormazabal nettopp har analysert 13 prøver av ensilasje innsamlet gjennom STIL og metoden har fungert tilfredsstillende på alle prøvene.

Instituttet takker RUBIN for godt samarbeid. En håper at et viktig problem nå er ryddet av veien med hensyn til å kunne bruke fiskeensilasje til kraftfôr idet det nå finnes en anvendelig kontrollmetode.

Instituttet anser hermed oppdraget for fullført.


Magne Yndestad
instituttstyrer, professor

HPLC-ANALYSE AV OXOLINSYRE OG FLUMEQUINE I FISKEENSILASJE

TEMADAG PÅ NORGES VETERINÆRHØGSKOLE, INSTITUTT FOR FARMAKOLOGI, MIKROBIOLOGI OG NÆRINGSMIDDELHYGIENE

Tema: Praktisk gjennomgang av en ny analysemetode (HPLC) for påvisning av oxolinsyre og flumequine i fiskeensilasje. Deltagerne får gjennomgått hele metoden ved at instituttet demonstrerer metoden trinn for trinn gjennom analyse på en negativ og en positiv prøve. Til slutt foretas en vurdering av de ferdige kromatogrammene.

Praktiske opplysninger: Deltagerne betaler selv reise og eventuelt opphold. Det er ingen deltageravgift. Forøvrig nevnes at RUBIN har finansiert utviklingen av metoden.

Sted: Institutt for farmakologi, mikrobiologi og næringsmiddelhygiene, Seksjon for næringsmiddelhygiene, Norges veterinærhøgskole

Antall deltagere: Maks.5

Tid: Fredag den 17/9 kl. 0900 - 1600

Program:

0900 - 0915 Kort innledning om problemstillingen
Magne Yndestad

0915 - 1200 Praktisk gjennomføring av analyser på aktuelt materiale Victor Hormazabal

1200 - 1230 Instituttet inviterertil lunsj

1230 - 1500 Analysene fortsetter
Victor Hormazabal

1500 - 1600 Avlesning av kromatogrammer. Spørsmål og diskusjon.
Alle

1600 Avslutning

SIMULTANEOUS EXTRACTION AND DETERMINATION OF
OXOLINIC ACID AND FLUMEQUINE IN FISH SILAGE
BY HPLC.

Victor Hormazabal and Magne Yndestad

ABSTRACT

A simple and rapid method for the simultaneous extraction and determination of residues of oxolinic acid (OX) and flumequine (FQ) in fish silage, is presented. The samples were extracted with acetone and ammonia. When applying traditional liquid-liquid extraction, clean extracts were obtained, the recovery being 95.3 - 96.2 % for OX and 96.9 - 99.2 % for FQ. The detection limits were 40 ng/g for OX and 50 ng/g for FQ.

INTRODUCTION

In recent years, the quinolones oxolinic acid (OX) and flumequine (FQ) have been the most used drugs for treatment of infectious diseases in Norwegian fish farming.

In 1992 for instance, the total consumption of OX and FQ was 7687 kg and 9833 kg, respectively (Statistics provided by the Norwegian Medicinal Depot, Oslo).

The annual production of farmed fish in Norway is about 160.000 tons, a substantial proportion of the fish being treated with drugs during the growing period.

The slaughter of fish for human consumption is not allowed until the fish have been screened for residues of drugs in liver and muscle.

Residues of OX and FQ have appeared to be especially bound to bone and skin (1) and can be detected in these organs even though edible tissue like muscle and liver from the same fish are free of drugs.

A lot of fish waste, such as guts, skin and bone arise from the fish processing industry. In Norway, in order to utilize this waste, it is ensilaged. This silage can then further be mixed into animal feed.

According to Norwegian regulations, the addition of antibiotics to feed for food-producing animals is not allowed. An official method of analysis for OX and FQ in silage is therefore needed.

Several analytical methods have been developed for the determination of OX in biological materials using microbiological and high performance liquid chromatographic procedures (2, 3, 4, 5, 6). Analytical methods have also been developed for the determination of FQ in plasma, urine and tissues (7, 8, 9, 10). Tao *et al.* (11) published a microbiological method for residue analysis of FQ in fish tissues.

Rogstad *et al.* (12), Steffenak *et al.* (13) and Rasmussen *et al.* (14) have published methods for the simultaneous determination of OX and FQ in fish tissues.

However, none of the published methods appeared to be applicable to such a complex material as fish silage, because of problems with interfering peaks in the HPLC chromatograms, or unspecific inhibition zones in microbiological test-systems.

The purpose of the present study was thus to develop a rapid and efficient HPLC method for routine analysis of OX acid and FQ in fish silage.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Reagents

The fish silage which served as sample material, was supplied by Stormøllen A/S (Vaksdal, Norway).

All chemicals were of analytical or HPLC grade. OX was supplied by Sigma Co. (St. Louis, MO, USA.), and FQ by Solchem Italiana s.p.a. (Mulazzano, Italy).

Solvents were of analytical and HPLC grade. Stock solutions (1 mg/ml) of OX and FQ were prepared in 0.03 M sodium hydroxide, and working standards were prepared by dilution with 0.002 M phosphoric acid-acetonitrile-tetrahydrofurane (68:17:15).

The solutions were stored in the refrigerator in dark stoppered flasks.

Chromatographic Conditions

The analyses were performed on a Perkin-Elmer HPLC system consisting of a Series 410 Bio solvent delivery system, an ISS 100 sampling system equipped with a cooler (14°C) Lauda RMT6 from Messgeräte Werk Lauda, (Lauda-Königshafen, Germany), and a LS 240 fluorescence detector (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., USA). The detector was operated at an excitation wavelength of 325 nm and emission wavelength of 360 nm, with a Resp. 5 and a Factr. 256. The analytical column (stainless steel, 150 X 4.6 mm I.D.) and guard column (stainless steel, 5.0 X 3.0 mm I.D.) were packed with 5 µm particles of PLRP-S polymer adsorbent (Polymer Laboratories, Amherst, MA, USA). The mobile phase was 0.02 M phosphoric acid-acetonitrile-tetrahydrofurane (68:17:15). The flow rate was 0.7 ml/min. for 6 min. followed by 0.8 ml/min. for 3 min. The samples were injected at intervals of 10 min. Aliquots of 20 µl and 30 µl were injected onto the column for the determination of OX and FQ respectively.

Sample Preparation and Clean-up (Figure 1)

The tissue sample, 0.5 g of ground fish silage, was weighed into a 50 ml centrifuge tube with screw cap (NUNC); 1.5 ml H₂O, 1 ml NH₃ (25%), and 7 ml acetone were added. The sample was mixed for 5 s., and then left with the extraction fluid for 5 min. before again being whirlmixed for 5 s. The homogenate was then centrifuged for 3 min. at 5000 rpm.

Five ml of the supernatant was pipetted into a graduated glass-stoppered centrifuge tube, (Rep. 0.250 g). The acetone phase was evaporated to 0.5 -1 ml under a stream of nitrogen (60°C), and 0.5 ml 85% H₃PO₄, 3 ml H₂O and 4 ml CHCl₃ were added. The sample was shaken vigorously for 10 s. followed by centrifugation for approximately 1 min. (3000 rpm). The upper aqueous layer and all solid residues between the two phases were discarded. Two ml H₂O were added (no mixing). The water layer was discarded. Two ml of sodium hydroxide (2M) were added. The sample was then mixed for 10 s. After centrifugation (4000 rpm, 5 min.), the water phase was collected. The chloroform was blended twice more with 2 ml sodium hydroxide and centrifuged. The collected water phases were acidified (1 ml 85% H₃PO₄) and extracted once more with 4 ml chloroform. The water layer was discarded, 2 ml H₂O were added (no mixing), and the water layer was again discarded. The chloroform was evaporated to dryness under a stream of nitrogen (60°C), after which the residue was dissolved in 2 ml 0.002 M phosphoric acidacetonitrile-tetrahydrofurane (68:17:15), and approximately 0.5 ml filtered through a Costar Spin-X centrifuge filter (lowtype) with 0.22 µm cellulose

acetate binding by centrifugation for 5 min. at 10.000 rpm. Aliquots of the filtrate were injected onto the HPLC.

Calibration Curves and Recovery Studies

The precision, recovery, and linearity for OX and FQ were determined by spiking silage samples with standard solutions to yield 40, 50, 75, 100, 150, 200, 500 and 1 000 ng OX and FQ per gram of sample, respectively. The samples were extracted using the above procedures. Duplicate samples were used. The recovery rates were determined by comparing the results of analysis of spiked fish silage to those of pure standard solutions.

The linearity of the standard curves for OX and FQ in fish silage was calculated using peak height measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatograms of clean fish silage samples, spiked samples and real samples are shown in Figure 2.

The standard curves were linear in the investigated area 40-1000 ng/g for both OX and FQ in fish silage, while the corresponding correlation coefficients were $r=0.9994$ and $r=0.9987$, respectively.

The recovery of OX and FO varied from 95.3 - 96.2 % and from 96.9 - 99.2 %, respectively, with a standard deviation ranging from 1.56 to 6.70 and from 1.58 to 8.10, respectively (Table 1).

TABLE 1

Recovery of Oxolinic Acid and Flumequine from Spiked Samples of Fish Silage.

Sample	No. og samples	Amount (µg/g)	Recovery %			
			OX		FQ	
			Mean	SD*	Mean	SD*
Silage 0.5 g	8	0.15	95.3	6.70		
	8	0.50	96.2	1.56		
	8	0.15			96.9	8.1 0
	8	0.50			99.2	1.58

SD* = standard deviation

The limit of determination for OX and FO was 40 ng/g and 75 ng/g tissue, respectively, when aliquots of 20 µl were injected onto the column. The limit of determination for FQ was 50 ng/g when aliquots of 30 µl were injected. However, when injecting 30 µl aliquots of OX, an interfering peak was sometimes observed close to the OX peak (Figure 2B). When 20 µl was injected onto the HPLC, for the determination of OX, no such interference was seen (Figure 2A).

The method presented in this paper should be useful for most work on residues of OX and FQ in fish silage. The method is selective, and robust, and should be generally applicable for

monitoring drug levels in fish silage. The method is also very rapid, a technician easily managing to analyse 18 samples a day. Moreover, the consumption of reagents is low.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by RUBIN (Circulation and Utilization of Organic By-products in Norway) Foundation.

REFERENCES

1. Steffenak, I., Hormazdabal, V. & Yndestad M. Reservoir of quinolone residues in fish. *Food Additi and Contami.*,1991, 8, 777, 1991.
2. Ringel, S. M., Turner, F. J., Roemer, S., Daly, J. M., Ziatanoff, R & Schwartz, B. S. Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent. III. Concentrations in serum, urine, and renal tissue. *Antimicrob. Agents Chemother*, 7, 486, 1967.
3. Ziv, G. Clinical pharmacology of oxolinic acid in young dairy calves. *Am. J. Vet. Res.* 37, 513, 1976.
4. Kasuga, Y., Sugitani, A. & Yamada, F. Simultaneous determination of oxolinic acid, nalidixic and piromidic acids in fishes by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 23, 344, 1982.
5. Kasuga, Y., Sugitani, A. & Yamada, F. Identification of oxolinic acid and two major metabolises of piromidic acid in fishes *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 24, 484, 1983.
6. Hamamoto, K. Rapid high performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in chicken plasma. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 381, 453, 1986.
7. Harrison, L. I., Schuppan, D., Rohifing, S. R., Hansen, A. R., Hansen, C. S., Funk, M. L, Collins, S. M. & Ober, R. E. Determination of flumequine and a hydroxy metabolise in biological fluids by high-pressure liquid chromatographic, fluorometric, and microbiological methods. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25, 301, 1984.
8. Decolin, D., Nicolas, A. & Siest, G. Determination of flumequine and its 7-hydroxy metabolise by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 414, 499, 1987.
9. Ellerbroek, L. & Bruhn, M. Determination of flumequine in biological fluids and meat by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 49, 314, 1989.
10. Samuelsen, O. B. Determination of flumequine in fish by highperformance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 497, 355, 1989.
11. Tao, S. H., Nicolas, M. & Bonnot, M. Méthode de recherche de résidus de la flumequine dans la chair des truites. *Rev. Méd. Vét.*, 1 36, 623,1985.

12. Rogstad, A., Hormazdbal, V., & Yndestad, M. Simultaneous extraction and determination of oxolinic acid and flumequine in fish tissues by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, 12, 3073,1989.
13. Steffenak, I., Hormazdbal, V., & Yndestad, M. Rapid assay for the simultaneous determination of oxolinic acid and flumequine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1), 61, 1991.
14. Rasmussen, K. E, Tonnesen, F., Thanh, H. H., Rogstad, A. & Aanesrud, A. Solid-phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of flumequine and oxolinic acid in salmon plasma. *J. Chromatogr. Biomed. Appi.*, 496, 355, 1989.

FIGURE 2

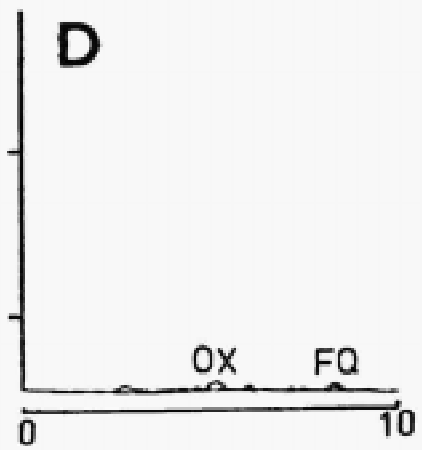
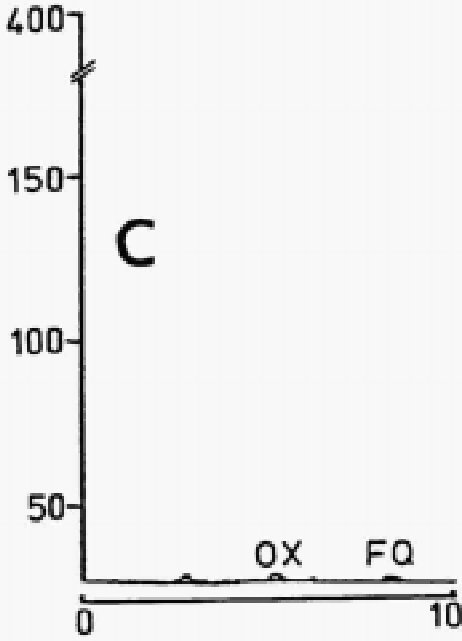
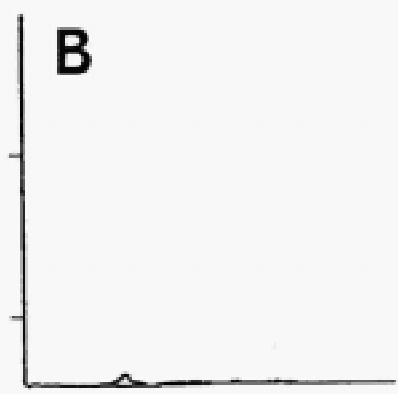
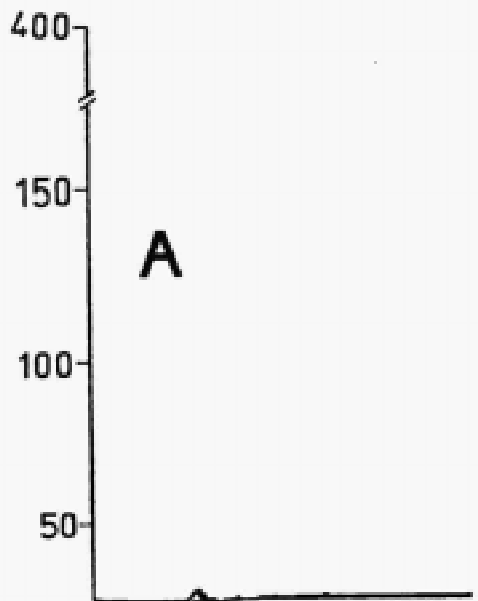
Chromatograms of extracts from 0,5 g fish silage for the determination of oxolinic acid and flumequine.

- A. Unspiked sample (20 µl injected onto the HPLC)
- B. Unspiked sample (30 µl injected onto the HPLC)
- C. Fish silage spiked with 200 ng OX and 200 ng FQ per gram sample (20 µl injected onto the HPLC)
- D. Chromatograms of real samples. The samples contained 259 ng/g OX and 190 ng/g FQ (20 µl injected onto the HPLC).

<u>FISH SILAGE (0,5g)</u>	
	Add H ₂ O-NH ₃ and acetone
Acetone/NH ₃ and fish silage residue Discard	Supernatant Evaporate to 0,5-1 ml Add H ₂ O-H ₃ PO ₄ and CHCl ₃
H ₂ O Discard	CHCl ₃ Clean with H ₂ O
H ₂ O Discard	CHCl ₃ 2x2 ml NaOH (2M)
CHCl ₃ Discard	NaOH Add. H ₃ PO ₄ and CHCl ₃
H ₂ O Discard	CHCl ₃ Clean with H ₂ O
H ₂ O Discard	CHCl ₃ Evaporate to dryness, 60°C Dissolve Spin-X filter
	HPLC

FIGURE 1

Extraction and Clean-up procedure for OX and FQ from Fish Silage



Retention time (min)