

# Određivanje rezidua cefalosporina u mišiću goveda, svinje, peradi i ribe primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS)

---

Oguić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:928719>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018

Ana Oguić

997/N

**Određivanje rezidua cefalosporina u  
mišiću goveda, svinje, peradi i ribe  
primjenom tekućinske  
kromatografije ultravisoke  
djelotvornosti sa spektrometrijom  
masa i analizatorom vremena preleta  
(UHPLC/Q-TOF-MS)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod mentorstvom red.prof.dr.sc. Blaženke Kos iz Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, neposrednim voditeljstvom znanstvene savjetnice dr. sc. Nine Bilandžić te uz pomoć dr.sc. Ivane Varenine.

## **ZAHVALA**

U prvom redu se zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Blaženki Kos na stručnoj pomoći i korisnim savjetima prilikom izrade rada. Zahvaljujem se i dr.sc. Nini Bilandžić, znan.savj. te dr.sc. Ivani Varenini na prijateljskom pristupu, srdačnoj i stručnoj pomoći tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada. Upućujem zahvalu i cijelom Laboratoriju za određivanje rezidua na Hrvatskom veterinarskom institutu bez kojeg izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Zahvala i onima koji su uvijek tu: mami, tati, Ivanu.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### ODREĐIVANJE REZIDUA CEFALOSPORINA U MIŠIĆU GOVEDA, SVINJE, PERADI I RIBE PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI SA SPEKTROMETRIJOM MASA I ANALIZATOROM VREMENA PRELETA (UHPLC/Q-TOF-MS)

*Ana Oguić, 997/N*

**Sažetak:**

Neadekvatna uporaba antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini dovodi do razvoja antimikrobne rezistencije, širenja otpornosti mikroorganizma te pojave njihovih ostataka u namirnicama životinjskog porijekla. Jedna od najčešće primijenjenih vrsta antibiotika su cefalosporini. Da bi ih adekvatno identificirali i kvantificirali bilo je potrebno razviti metodu i ispitati utjecaj metode za identifikaciju rezidua cefalosporina u mišićima goveda, svinje, peradi i ribe primjenom tekućinske kromatografije ultraviske djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS), što je ujedno i glavni cilj ovog rada. Također, validirana metoda za određivanje cefalosporina u mišićima različitih životinjskih vrsta visoke je specifičnosti, točnosti i preciznosti te zadovoljava kriterije o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata prema važećoj Uredbi komisije 2002/657/EZ. Metoda je primijenjena u rutinskoj analizi na Hrvatskom veterinarskom institutu. Na prisustvo 9 najčešćih cefalosporina testirana su 42 uzorka pri čemu nije pronađen ni jedan pozitivan uzorak.

**Ključne riječi:** cefalosporini, UHPLC, Q-TOF, MS

**Rad sadrži:** 56 stranica, 40 slika, 10 tablica, 53 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof.dr.sc. Blaženka Kos*

**Neposredni voditelj:** *dr.sc. Nina Bilandžić, znan. savj.*

**Pomoć pri izradi:** *dr.sc. Ivana Varenina*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Jagoda Šušković*
3. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos*
3. Dr.sc. *Nina Bilandžić, znan.savj.*
4. Prof.dr.sc. *Anita Slavica (zamjena)*

**Datum obrane:** 20. rujna, 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for technology antibiotics, enzyme, probiotic and starter culture  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

Graduate Thesis

### DETERMINATION OF CEPHALOSPORIN RESIDUE IN CATTLE, PIGS, POLUTRY AND FISH MUSCLE USING THE ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY (UHPLC/Q-TOF-MS)

*Ana Oguić, 997/N*

#### **Abstract:**

Inadequate use of antibiotics in human and veterinary medicine leads to the development of antimicrobial resistance, the spread of microorganism resistance and the appearance of their residues in food of animal origin. One of the most frequently used types of antibiotics are cephalosporins. In order to identify and quantify, it was necessary to develop a method and to examine the effect of the method for identifying the residual cephalosporin residues in cattle, pigs, poultry and fish muscles using ultra-high performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry (UHPLC/Q-TOF-MS), which is also the main objective of this paper. Validated method for the determination of cephalosporin in the muscles of different animal species is of high specificity, accuracy and precision and meets the criteria for the conduct of analytical methods and interpretation of results under the current Commission Regulation 2002/657 / EC. The method was applied in a routine analysis at the Croatian Veterinary Institute. In the presence of 9 most common cephalosporins, 42 samples were tested and no positive samples were found

**Keywords:** cephalosporin, UHPLC, Q-TOF, MS

**Thesis contains:** 56 pages, 40 figures, 10 tables, 53 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD Blaženka Kos, Full professor*

**Principal investigator:** *PhD Nina Bilandžić, Scientific advisor*

**Technical support and assistance:** *PhD Ivana Varenina*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Nina Bilandžić*, Scientific advisor
4. PhD. *Anita Slavica*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 20 October, 2018.

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Antibiotici.....	2
2.1.1. Podjela antibiotika prema ciljnim mikroorganizmima na koje djeluju.....	2
2.1.2. $\beta$ -laktamski antibiotici .....	3
2.2. Rezidui antibiotika .....	6
2.2.1. Učinci antibiotika na ekosustav.....	8
2.2.2. Antibiotička rezistencija .....	10
2.3. Metode za određivanje rezidua antibiotika u hrani.....	11
2.3.1. UHPLC/Q-TOF-MS .....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. Materijal.....	14
3.2. Kemikalije .....	15
3.3. Standardi.....	15
3.4. Oprema i materijali.....	15
3.5. Priprema kontrolnih otopina materijala, otapala i standardnih otopina .....	16
3.5.1. Uzorkovanje mišića .....	16
3.5.2. Priprema otopina.....	16
3.5.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova.....	16
3.6. Priprema uzoraka.....	17
3.6.1. Postupak pročišćavanja uzoraka .....	18
3.7. Mjerenje na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju .....	18
3.8. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata .....	21
3.9. Validacija metode za određivanje cefalosporina .....	22
3.9.1. Rezultati validacije izračunati InerVAL Plus programom .....	22
3.9.2. Primjenjivost metode .....	22



3.9.3. Specifičnost.....	23
3.9.4. Stabilnost.....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>24</b>
4.1. Optimizacija.....	25
4.2. Spektri masa cefalosporina.....	28
4.3. Kromatografija i pregled retencija analita .....	32
4.4. Razvoj i validacija metode za određivanje cefalosporina .....	33
4.4.1. Specifičnost metode .....	33
4.4.2. Ponovljivost/preciznost metode.....	34
4.4.3. Određivanje utjecaja matriksa .....	36
4.5. Primjena metode.....	42
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>50</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>51</b>

# 1. UVOD

Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji svojim djelovanjem mogu spriječiti rast ili u potpunosti uništiti razne vrste organizama kao što su bakterije, virusi, plijesni ili protozoe. U veterinarskoj medicini, antibiotici se prvenstveno koriste zbog liječenja oboljenja, prevencije bolesti te poboljšanja učinkovitosti hranjenja (kao promotori rasta) životinja. Njihova neadekvatna uporaba u humanoj i veterinarskoj medicini može dovesti do širenja otpornosti mikroorganizma te razvoja antimikrobne rezistencije. Ostaci antibiotika predstavljaju potencijalnu opasnost za potrošače pa se redovito kontroliraju u namirnicama životinjskog porijekla kao što su meso, mlijeko i med. U legislativi Europske Unije utvrđene su najviše dozvoljene količine rezidua antibiotika u namirnicama životinjskog porijekla.  $\beta$ -laktamski antibiotici trenutno su najčešće korišteni razred antibiotika u veterinarskoj medicini te se koriste za prevenciju i liječenje bolesti domaćih životinja. Jedna od glavnih skupina  $\beta$ -laktamskih antibiotika su cefalosporini. Zbog sve veće uporabe antibiotika prilikom uzgoja životinja namijenjenih za prehranu ljudi, potrebno je osmisliti i validirati metode za identifikaciju i kvantifikaciju njihovih rezidua.

U ovom radu, za analizu rezidua cefalosporina u mišiću goveda, svinje, peradi i ribe, korištene su tekućinska kromatografija i spektrometrija masa visoke rezolucije (UHPLC/Q-TOF-MS). Udruživanje spektrometrije masa s TOF analizatorom omogućava razvijanje metoda s boljom selektivnosti, osjetljivosti i brzinom. Također, boljoj selektivnosti Q-TOF metoda u usporedbi sa LC-MS/MS-om doprinosi udruživanje TOF analizatora sa UHPLC tehnikama visoke rezolucije.

Glavni cilj ovog rada bio je razvoj i ispitivanje utjecaja metode za identifikaciju rezidua antibiotika cefalosporina u mišićima goveda, svinje, peradi i ribe primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Antibiotici

Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji pokazuju visoku fiziološku aktivnost prema različitim grupama organizama kao što su bakterije, virusi, plijesni, protozoe ili zloćudni tumori. Svojim djelovanjem mogu spriječiti njihov rast ili ih u potpunosti uništiti. Danas se koriste prirodni antibiotici, dobiveni mikrobnom biosintezom te polusintetski i sintetski antibiotici, nastali određenim kemijskim modifikacijama (Makovec i sur., 2014; Grenni i sur., 2018). Zakonom o veterinarsko-medicinskim proizvodima (VMP) (NN 84/2008), VMP je definiran kao svaka tvar ili mješavina tvari koja ima svojstvo liječenja ili sprječavanja bolesti životinja; ili svaka tvar ili mješavina tvari koje se mogu primijeniti na životinjama u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili postavljanjem medicinske dijagnoze, te sredstva za redukciju mikroorganizama za primjenu u veterini. Od ukupne količine primijenjenih antibiotika na svjetskoj razini, gotovo polovica ih se primjenjuje na životinjama namijenjenim ljudskoj prehrani, prvenstveno zbog liječenja oboljenja, prevencije bolesti te poboljšanja učinkovitosti hranjenja (kao promotori rasta) (Wegener, 2003; Jank i sur., 2017; Chen i sur., 2016). U veterinarske svrhe, najčešće se primjenjuju: tetraciklini, sulfonamidi, fluorokinoloni, makrolidi, linkozamidi, aminoglikozidi, beta-laktami i cefalosporini (Jank i sur., 2017). Porast uporabe veterinarskih lijekova prilikom uzgoja životinja dovodi do prisutnosti njihovih ostataka u hrani životinjskog porijekla (Chen i sur., 2016) zbog čega je njihova uporaba regulirana na razini Europske unije. Također, utvrđeni su postupci za utvrđivanje najviših dopuštenih količina ostataka (NDK ili MRL, engl. *maximum residue limit*) veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla (mesu, ribi, mlijeku, jajima i medu).

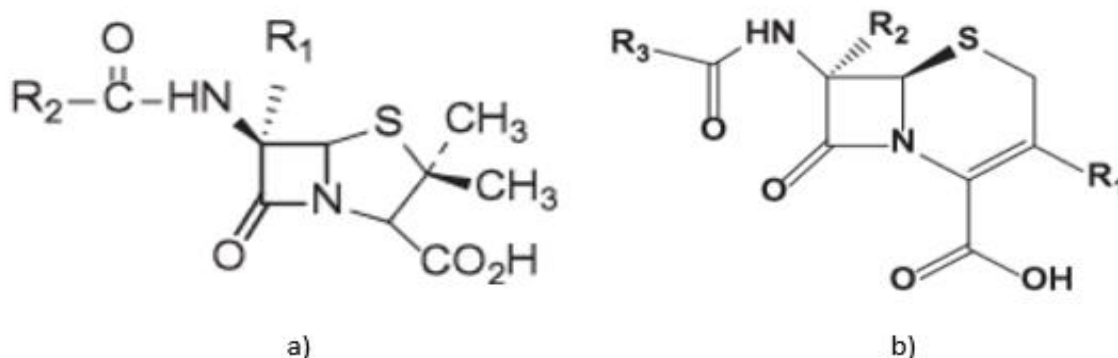
#### 2.1.1. Podjela antibiotika prema ciljnim mikroorganizmima na koje djeluju

Prema spektru djelovanja, antibiotike možemo podijeliti u dvije skupine:

- a) Antibiotici uskog spektra djelovanja: biosintetski proizvedeni penicilini i cefalosporini koji su proizvod sekundarnog metabolizma mikroorganizama te polusintetski penicilini, cefalosporini i makrolidni antibiotici. Antibiotici ove skupine djeluju samo na Gram-pozitivne bakterije.
- b) Antibiotici širokog spektra djelovanja: tetraciklini, aminoglikozidni antibiotici, kloramfenikol i neki polusintetski penicilini, djeluju i na Gram-pozitivne i na Gram-negativne bakterije (Šušković, 2015; Varenina, 2015).

### 2.1.2. $\beta$ -laktamski antibiotici

$\beta$ -laktamski antibiotici koriste se za prevenciju i liječenje bolesti domaćih životinja (npr. mastitisa) (Msagati i Nindi, 2007) i trenutno su najčešće korišteni razred antibiotika u veterinarskoj (Perez-Burgos i sur., 2012) i humanoj medicini. Široko se primjenjuju zbog snažnog antimikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti te čine gotovo 65% svih propisanih antibiotika u Sjedinjenim Američkim Državama. Njihova glavna toksičnost za ljude povezana je s alergijskim reakcijama malog postotka pacijenata koje se najčešće javljaju nakon primjene penicilina i cefalosporina, dok je zanemariva reakcija zabilježena kod pacijenata koji su koristili monobaktame (Bush i Bradford, 2016). Također, nakon konzumacije hrane životinjskog porijekla s visokim udjelom rezidua  $\beta$ -laktamskih antibiotika, moguća je alergijska reakcija kod osjetljivih ljudi, zbog čega su zakonski definirane njihove maksimalne dozvoljene količine (MDK) (Becker i sur., 2004).  $\beta$ -laktamski antibiotici dijele se u tri skupine: peniciline (benzilpenicilin, penicilin V, oksacilin, amoksicilin, ampicilin, kloksacilin), cefalosporine (cefaleksin, cefazolin, ceftiofur, cefapirin, cefkvinom, cefuroksim, cefoperazon i dr.) te monobaktame (Gentili i sur., 2005). Penicilini i cefalosporini imaju jednaki  $\beta$ -laktamski prsten iako se razlikuju u osnovnoj strukturi. Cefalosporini sadrže 7-amino cefalosporonsku kiselinu i šesteročlani dihidrotiazinski prsten spojen na laktamski dio, dok penicilini sadrže peteročlani tiazolidini prsten spojen na laktamski dio (Perez-Burgos i sur., 2012) (Slika 1).



**Slika 1.** Kemijske strukture glavnih predstavnika  $\beta$ -laktamskih antibiotika: a) penicilini, b) cefalosporini (Bush i Bradford, 2016).

Mehanizam djelovanja  $\beta$ -laktamskih antibiotika uključuje inhibiciju biosinteze peptidoglikanskog polimera u staničnoj stijenci bakterija, što dovodi do gubitka mehaničke čvrstoće, lize i pucanja stanice (Bush i Bradford, 2016). Ovi antibiotici specifični su inhibitori peptidoglikan transpeptidaze, enzima koji umrežava peptidoglikan u Gram-negativnim i Gram

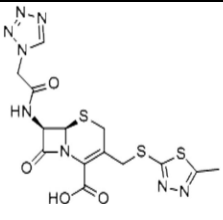
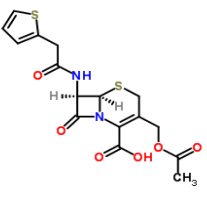
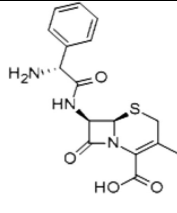
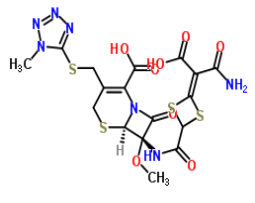
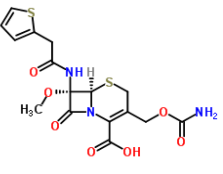
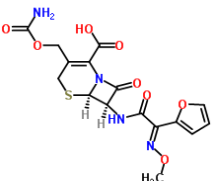
pozitivnim bakterijama (Džidić i sur., 2008). Penicilin, ili neki drugi  $\beta$ -laktam, veže se na serinski ostatak u aktivnom mjestu tog penicilin-vezujućeg proteina (engl. *penicillin-binding proteins*, *PBPs*), pri čemu dolazi do njegove inaktivacije, sprječavanja umrežavanja peptidoglikanskog sloja stanične stijenke bakterije te njezinog pucanja (Bush i Bradford, 2016; Lees i Toutain, 2012; Varenina, 2015).

### 2.1.3. Cefalosporini

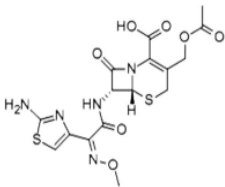
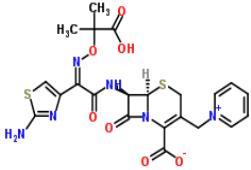
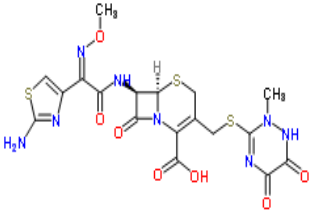
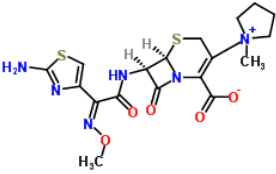
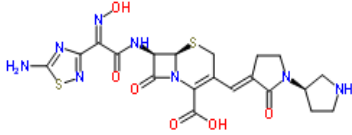
Cefalosporini su jedna od najvažnijih skupina  $\beta$ -laktamskih antibiotika s niskom toksičnošću, visokom učinkovitošću, širokim spektrom djelovanja i malo zabilježenih alergijskih reakcija kod ljudi (Wang i sur., 2017). Topljivi su u vodi i razmjerno stabilni u kiselinama. Kemijska svojstva slična su svojstvima penicilina no stabilniji su na promjene pH vrijednosti i temperature (Solomon Kolanović i sur., 2011). Njihova je struktura u osnovi ista kao struktura penicilina, uz dodatak drugih bočnih lanaca. Danas postoji nekoliko generacija cefalosporina (Tablica 1) koje su nastale dodavanjem raznih bočnih lanaca na osnovnu strukturu, a  $\beta$ -laktamski prsten neophodan je za njihovo antibakterijsko djelovanje. Nastankom svake sljedeće generacije cefalosporina, poboljšani su određeni aspekti spektra antimikrobne aktivnosti (Reygaert, 2011). U usporedbi s penicilinima, cefalosporini pokazuju visoku stabilnost prema  $\beta$ -laktamazi koju proizvode bakterije što ih čini izvrsnim antibakterijskim agensima (Wang i sur., 2017). Općenito, njihova je aktivnost slabija u usporedbi s penicilinima, ali imaju širi raspon djelovanja (Solomon Kolanović i sur., 2011). Ipak, MRSA (*Staphylococcus aureus* otporan na meticilin) i ESBL bakterijski sojevi (bakterijski sojevi koji proizvode  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra djelovanja) otporni su na cefalosporine. Petu generaciju cefalosporina karakterizira širok spektar aktivnosti protiv bakterija koje su otporne na cefalosporine treće i četvrte generacije. Zbog toga se vjeruje da će ceftobiprol, cefalosporin pete generacije, biti učinkovit protiv soja *Staphylococcus aureus* otpornog na meticilin (MRSA), bakterije koja je rezistentna na velik broj antibiotika (Reygaert, 2011). Mehanizam djelovanja cefalosporina sličan je djelovanju svih  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Oni onemogućavaju sintezu bakterijske stanične stijenke što u konačnici dovodi do pucanja stanice (Hornish i Kotarsky, 2002). Cefalosporini se danas široko koriste u veterinarskoj medicini prvenstveno za liječenje oboljenja uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama kod životinja. Europska komisija naglašava važnost korištenja antibiotika uskog spektra djelovanja kada god je to moguće, zbog rastuće antibiotske rezistencije. Cefalosporine treće i četvrte generacije treba primijeniti samo kada životinje ne

reagiraju na antibiotike uskog spektra djelovanja. Stoga, većina odobrenih cefalosporina za liječenje domaćih životinja spada u prvu generaciju (Di Rocco i sur., 2017).

**Tablica 1.** Učinkovitost svake generacije cefalosporina s primjerima (Reygaert, 2011; Solomun Kolanović i sur., 2011) i strukturnim formulama (Wang i sur., 2017; ChemSpider)

Generacija (primjeri)	Upotreba
<b>Prva</b>	
<p>Cefazolin</p> 	<p>Najučinkovitiji su protiv aerobnih Gram-pozitivnih koka, nekih Gram-negativnih <i>Enterobacteriaceae</i> i anaerobnih koka. Djeluju i na <i>E. Coli</i>, <i>Klebsiellapneumoniae</i> i <i>Proteusmirabilis</i></p>
<p>Cefalotin</p> 	
<p>Cefaleksin</p> 	
<b>Druga</b>	
<p>Cefotetan</p> 	<p>Manje djelotvorni protiv Gram-pozitivnih aerobnih koka, učinkovitiji protiv Gram-negativnih <i>Enterobacteriaceae</i>, neki su učinkoviti protiv anaerobnih Gram-negativnih bakterija. Za razliku od cefalosporina prve generacije, otporniji su na <math>\beta</math>-laktamaze Gram-negativnih uzročnika.</p>
<p>Cefoksitin</p> 	
<p>Cefuroksim</p> 	

**Tablica 1. (nastavak)** Učinkovitost svake generacije cefalosporina s primjerima (Reygaert, 2011; Solomun Kolanović i sur., 2011) i strukturnim formulama (Wang i sur., 2017; ChemSpider)

<b>Treća</b>	
Cefotaksim	
Ceftazidim	
Ceftriakson	
<b>Četvrta</b>	
Cefepim	
<b>Peta</b>	
Ceftobiprol	

Slabo učinkoviti protiv Gram-pozitivnih koka, najbolje su aktivni protiv Gram-negativnih *Enterobacteriaceae*, također učinkoviti protiv drugih Gram-negativnih i nekih anaerobnih bakterija. Najvažnija je indikacija liječenje meningitisa uzrokovanog Gram-negativnim aerobima.

Djelotvoran protiv Gram-pozitivnih koka i nekih Gram-negativnih bakterija, povećana otpornost na hidrolizu kromosomskim  $\beta$ -laktamazama

Široki spektar aktivnosti protiv Gram-pozitivnih koka i Gram-negativnih bakterija

## 2.2. Rezidui antibiotika

Zbog sve češće primjene veterinarskih lijekova u profilaktične i terapijske svrhe, doneseni su pravilnici kojima se propisuju dozvoljene količine njihovih ostataka u hrani (Wegener, 2003). Najčešći uzroci pojave rezidua u hrani životinjskog podrijetla su: primjena lijeka pri dozama koje premašuju propisane, neispravan način primjene te pogreške u praćenju vremena zadržavanja lijeka. O karenci pojedinog antibiotika ovisi njegovo poluvrijeme izlučivanja, pa

nepoštivanje karence može imati izravni toksični učinak na potrošača. Rezidui antimikrobnih tvari za koje najviša dopuštena količina (NDK) nije utvrđena ili se nalaze iznad zadanih propisanih najvećih dopuštenih količina, također predstavljaju izravnu opasnost za ljudsko zdravlje. Moguće negativne posljedice su brojne pa tako može doći do izravne toksičnosti stanica domaćina, imunotoksičnosti (razvoja alergija), pojave antibiotske rezistencije bakterija prisutnih u intestinalnoj mikroflori čovjeka te prijenosa antibiotske rezistencije na patogene bakterije (Shankar i sur., 2010; Lees i Toutain, 2012). Prema legislativi Europske Unije, u tablici 2 nalaze se najviše dopuštene količine rezidua antibiotika cefalosporina koji se najčešće koriste u veterinarskoj medicini (Europska Komisija, 2010). U stalnoj je upotrebi više od četrdeset cefalosporina i u nekim slučajevima isti se lijekovi primjenjuju na životinjama namijenjenim za proizvodnju hrane i kod ljudi. Rezidui cefalosporina uključuju lijek, njegove metabolite i konjugate. Neka istraživanja ističu moguću nefrotoksičnost, hepatotoksičnost te alergijske reakcije kod preosjetljivih pojedinaca nakon primjene cefalosporina (Hong i sur., 2017). Američka Agencija za sigurnost hrane i lijekova (engl. *U.S. Food and Drug Administration*) utvrdila je najviše dopuštene količine samo dva cefalosporina za primjenu u životinja namijenjenih za proizvodnju hrane dok su ostali zabranjeni.

**Tablica 2.** Najviše dopuštene količine rezidua cefalosporina koji se najčešće upotrebljavaju u veterinarskoj medicini (Europska Komisija, 2010)

Cefalosporin	Vrsta životinje	Ciljno tkivo	NDK ( $\mu\text{gkg}^{-1}$ )
Cefaleksin	Goveda	mišić	200
		masno tkivo	200
		jetra	200
		bubreg	1000
		mlijeko	100
Cefazolin	Goveda, ovce, koze	mlijeko	50
		ostala tkiva	NDK nije potreban ni za jedno tkivo osim za mlijeko
Cefalonij	Goveda	mlijeko	50
		ostala tkiva	NDK nije potreban ni za jedno tkivo osim za mlijeko



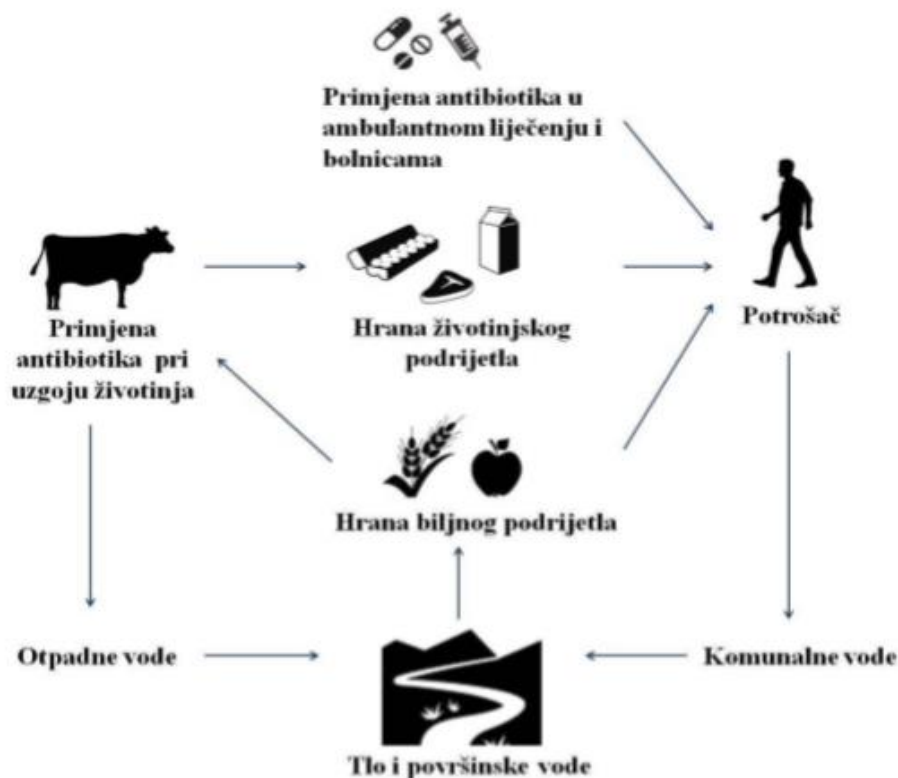
**Tablica 2. (nastavak)** Najviše dopuštene količine rezidua cefalosporina koji se najčešće upotrebljavaju u veterinarskoj medicini (Europska Komisija, 2010)

<b>Cefoperazon</b>	Goveda	mlijeko	50
		ostala tkiva	NDK nije potreban ni za jedno tkivo osim za mlijeko
<b>Cefkvinom</b>	Goveda, svinje i kopitari	mišić	50
		masno tkivo	50
		jetra	100
		bubreg	200
	Goveda	mlijeko	20
<b>Ceftiofur (izražen kao desfuroilceftiofur)</b>	Svi sisavci koji se koriste za proizvodnju hrane	mišić	1000
		masno tkivo	2000
		jetra	2000
		bubreg	6000
		mlijeko	100
<b>Cefapirin (zbroj cefapirina i desacetilcefapirina)</b>	Goveda	mišić	50
		masno tkivo	50
		bubreg	100
		mlijeko	60

### 2.2.1. Učinci antibiotika na ekosustav

Lijekovi su neophodni za održavanje javnog zdravlja i kvalitetu života, no tijekom zadnjih 20 godina pronađeni su u tlu i vodenim ekosustavima kao mikrokontaminanti (Carvalho i Santos, 2016). Prisutnost antibiotika u ekosustavu tla i vode ukazuje na njihovu sve veću primjenu što posljedično može dovesti do razvoja multirezistentnih bakterija. Nakon primjene (bilo u veterinarskoj ili humanoj medicini), antibiotici se samo djelomično metaboliziraju i velika količina se izlučuje nepromijenjeno ili kao aktivni metaboliti putem urina i izmeta te dopijevaju u okoliš u kojem je moguće i njihovo kruženje (Slika 2) (Grenni i sur., 2018; Varenina, 2015). Koncentracije antibiotika u prirodnim ekosustavima kao što su voda ili tlo kreće se od nekoliko nanograma pa do nekoliko stotina nanograma po litri vode ili kilogramu tla. Najveće količine rezidua antibiotika utvrđene su na područjima u kojima dolazi do ispuštanja otpadnih voda iz bolnica te na tlima tretiranim gnojivima (Kay i sur., 2004). Mikrobne zajednice najviše se akumuliraju u tlu koje ima važnu ulogu u nastanku i

širenju otpornosti na antibiotike. Bakterije prisutne u tlu nisu samo izvori antibiotika, već predstavljaju rezervoar rezistentnih gena koji ih čine otpornim na njihovo djelovanje (Makovec i sur., 2014). Također, na rezistentnost utječe i primjena organskih gnojiva. U radu Xie i suradnika (2018) prikazani su rezultati u kojima su koncentracije antibiotika u gnojivima iz Kine znatno veće od onih otkrivenih u SAD-u. Antibiotici pri koncentracijama  $\text{mg kg}^{-1}$  ili čak  $\mu\text{g kg}^{-1}$  mogu inhibirati mikrobnu aktivnost u tlu kao što su disanje, nitrifikacija, smanjenje željeza tj. mogu izazvati ekotoksični učinak na organizme tla (Xie i sur., 2018). Njihova prisutnost u okolišu posljedica je, ne samo kontinuiranog otpuštanja, već i visoke perzistentnosti nekih vrsta antibiotika, npr. fluorokinolona (ciprofloksacin), makrolida (tilozin) ili tetraciklina. Ti antibiotici najčešće se analiziraju i otkrivaju zbog svoje postojanosti ali i važnosti za ljudsku i veterinarsku medicinu. Ipak, kod nekih antibiotika dolazi do biorazgradnje što je jedan od najvažnijih procesa uklanjanja ksenobiotika iz okoliša (Caracciolo i sur., 2014). Biorazgradnja ovisi o kemijskoj strukturi spoja i o prisutnosti populacije mikroorganizama koji su otporni na njegova štetna djelovanja jer su, zbog prethodne izloženosti tom spoju, razvili otpornost. Osim toga, abiotički čimbenici kao što su temperatura, prisutnost vode, tekstura tla i prisutnost drugih kontaminanata mogu utjecati na bioraspoloživost i biorazgradnju antibiotika (Amorim i sur., 2013; Grenni i sur., 2018).



**Slika 2.** Kruženje antibiotika u prirodnim ekosustavima (Varenina, 2015)

### 2.2.2. Antibiotička rezistencija

Antibiotici se međusobno razlikuju, imaju različit učinak na mikroorganizme i bakterijski odgovori ovise o njihovim koncentracijama. U visokim koncentracijama, antibiotici mogu imati baktericidno (ubijanje bakterija) i bakteriostatsko (inhibicija rasta bakterija) djelovanje, dok u niskim koncentracijama induciraju biološki odgovor u bakterijama (Bernier i Surette, 2013). Niske koncentracije antibiotika podrazumijevaju koncentracije ispod takozvane minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *minimal inhibitory concentration*, MIC) te mogu imati dugoročne, neizravne učinke na mikrobnе vrste. To su ne-smrtonosne koncentracije koje inhibiraju vidljiv rast ciljane bakterijske populacije (Unger i sur., 2012) i mogu djelovati na tri različita načina:

- a) selektivnom rezistencijom (obogaćivanjem već postojećih rezistentnih bakterija i odabirom rezistencije „de novo“)
- b) generiranjem genetske i fenotipske varijabilnosti (povećanjem brzine adaptivne evolucije, uključujući razvoj otpora)
- c) kao signalne molekule (koje utječu na razne fiziološke aktivnosti, uključujući virulenciju, formiranje biofilma i ekspresiju gena).

Istraživanja su pokazala da bakterije razvijaju rezistenciju na određeni antibiotik kada se on primjenjuje u niskim koncentracijama. To je prirodna adaptacija mikroorganizama na tvar koja pokušava spriječiti njihov rast i stoga su razvijeni mehanizmi obrane od smrtonosnih učinaka antibiotika: proizvodnja enzima koji inaktiviraju antibiotike (npr. hidroliza pomoću  $\beta$ -laktamaze), promjene u bakterijskoj permeabilnosti stanične stijenke (mutacije u porinima), sprečavanje ulaska antibiotika, promjene u aktivnim mjestima na koje se vežu antibiotici unutar stanice, sprečavanje nakupljanja antibiotika unutar stanice te alternativni metabolički putevi (Grenni i sur., 2018). Osim navedenih, glavnih mehanizama, moguće je razviti različite mehanizme rezistencije zbog velike bioraznolikosti bakterijskih vrsta. To ovisi prvenstveno o strukturi antibiotika, njegovom ciljnom mjestu djelovanja te genetičkim promjenama unutar bakterijske stanice koje mogu biti posljedica transfera gena za antibiotsku rezistenciju i/ili različitih mutacija (Makovec i sur., 2014). Stjecanje otpornosti na antibiotike može dovesti do specifičnih promjena u bakterijskom metabolizmu koje im omogućuju rast u različitim staništima i okolišnim uvjetima (Roose-Amsaleg i Laverman, 2015), što dovodi do nastanka niza metaboličkih fenotipova. Kod ne smrtonosnih koncentracija, bakterije mogu koristiti antibiotike kao izvan stanične signalne molekule koje

služe za pokretanje različitih staničnih odgovora i regulaciju funkcioniranja mikrobnog zajednice (Liu i sur., 2014; Xie i sur., 2018).

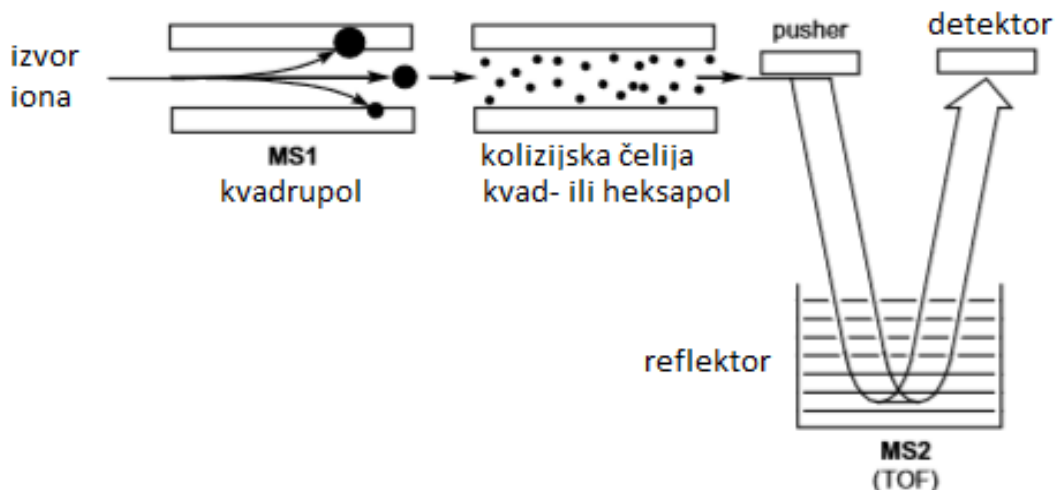
Problem nastaje prilikom horizontalnog prijenosa gena s bakterija iz okoliša na ljudske patogene koji razvijaju rezistenciju na antibiotike. Također, bakterijske vrste koje čine humanu mikrobiotu mogu međusobno prenositi gene za antibiotsku rezistenciju što dovodi do toga da bezopasne, komensalne bakterije, razvijaju patogeni oblik. Jednom stečeni geni za antibiotsku rezistenciju su stabilni te lako postaju dio bakterijskog genoma (Makovec i sur., 2014). To predstavlja veliki javnozdravstveni problem jer neke pacijente ostavlja bez terapijskih mogućnosti. Upravo zbog pojačane i nekritičke primjene antibiotika u humano i veterinarskoj medicini, Europska unija zabranila je uporabu antibiotika kao promotora rasta te ograničila njihovu uporabu u akvakulturi (Grenni i sur., 2018).

### **2.3. Metode za određivanje rezidua antibiotika u hrani**

Za određivanje rezidua antibiotika u hrani koriste se brojne analitičke metode. Prema nekim autorima, dijele se u dvije osnovne skupine: orijentacijske ili probirne metode (engl. *screening methods*) i potvrdne metode (engl. *confirmatory methods*). Određivanje rezidua u hrani je postupno pa se prvo pristupa tzv. orijentacijskim metodama koje mogu otkriti traženu vrstu antibiotika, no daju polukvantitativne rezultate. Ukoliko se pokaže da je testirani uzorak sumnjiv ili pozitivan na prisustvo antibiotika, on ide na daljnju analizu. Pozitivni uzorci potom se analiziraju kvantitativnom potvrdnom metodom koja omogućuje jasnu identifikaciju i kvantifikaciju analita. Potvrdne metode najčešće su zasnovane na tekućinskoj kromatografiji (LC) povezanoj sa spektrometrijom masa (MS) (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*) te na plinskoj kromatografiji sa spektrometrijom masa, GC-MS (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*) (Chafer-Pericàs i sur., 2010; Varenina, 2015). Važnost spektrometrije masa prvenstveno je u sposobnosti određivanja molekularnih i fragment iona pomoću njihove specifične molekularne mase, što omogućava preciznu identifikaciju i kvantifikaciju spojeva (Gentili i sur., 2005). Analiza rezidua antibiotika može dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate zbog niske razlučivosti MS/MS detektora, što dovodi do razvoja suvremenih analitičkih metoda i uređaja. Jedan od njih je ultradjelotvorna tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS) te prvenstveno služi za identifikaciju nepoznatih spojeva (Herms i sur., 2013; Hong i sur., 2017). Također, ima veliki potencijal za određivanje rezidua cefalosporina u namirnicama životinjskog podrijetla, primjenom adekvatne metode (Hong i sur., 2017).

### 2.3.1. UHPLC/Q-TOF-MS

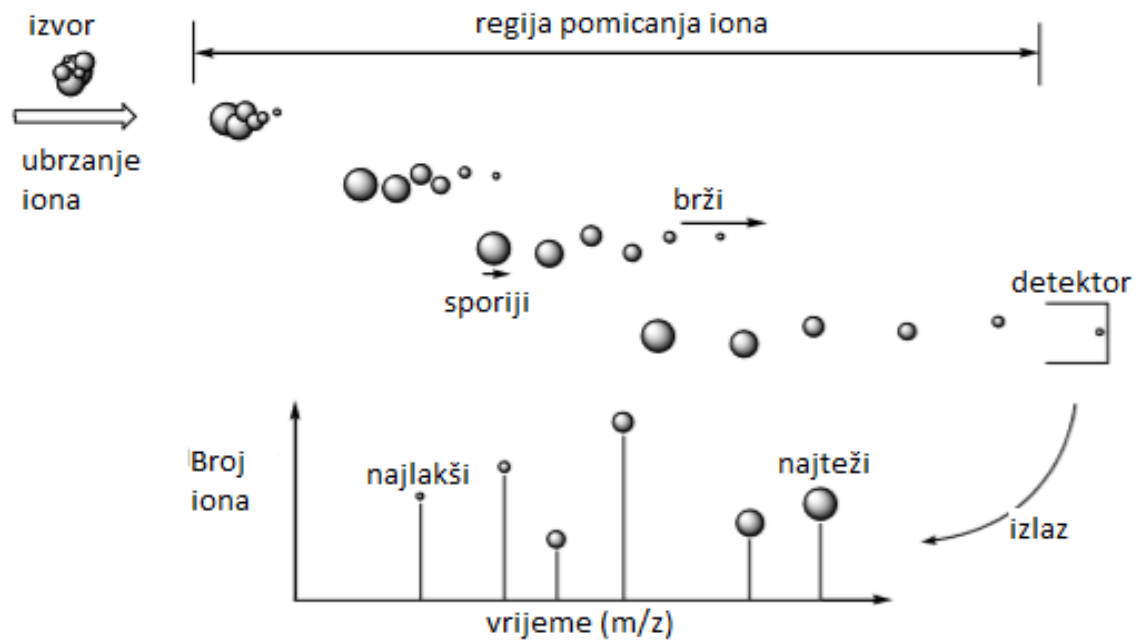
Analitičke metode koje se koriste za identifikaciju veterinarskih lijekova tradicionalno se oslanjaju na tandem spektrometriju masa (LC-MS/MS) zbog velike selektivnosti i osjetljivosti. Spektrometrijom masa s trostrukim kvadrupolom mogu se provesti ciljana skeniranja, kao i potvrdne analize, ali one su razvijene za specifične skupine analita i mogu se koristiti samo za ciljanu analizu. Također, spektrometrija masa visoke razlučivosti razvijena je kako bi se postigla visoka rezolucija i točnost određivanja masa u analizi poznatih i nepoznatih tvari. To je omogućilo razvoj brojnih metoda za identifikaciju širokog raspona antibiotika. Pretraživanje i identifikacija nepoznatih spojeva vrlo je važna u otkrivanju nepoznatih metabolita lijekova (Henderson i McIndoe, 2005).



**Slika 3.** Shema Q-TOF uređaja (Henderson i McIndoe, 2005)

Osnovni princip rada analizatora mase je mjerenje ioniziranih molekula analita u odnosu na njihov omjer mase i naboja ( $m/z$ ), pri čemu se naboj proizvodi dodavanjem ili gubitkom protona, kationa, aniona ili elektrona. Dodavanje naboja omogućuje utjecaj električnog polja na molekulu, čime se omogućuje mjerenje mase. Primarne komponente spektrometra masa su: ulaz za uzorke, izvor ionizacije, analizator mase i detektor. Q-TOF se sastoji od dvije vrste analizatora: kvadrupolni analizator masa (MS) i analizator vremena preleta (TOF). Kao i kod LC-MS/MS, kod Q-TOF uređaja ioni se stvaraju u ionskom izvoru te bez selekcije prolaze prvi kvadrupol, gdje kao takav služi samo kao vodič iona (MS1 kvadrupol). Kada dospiju u kolizijsku ćeliju stvaraju se fragmenti molekulskih iona. Struja generiranih iona ubrzanih u elektromagnetskom polju ulaze u TOF analizator (Slika 4). Ioni se separiraju u zoni razdvajanja s obzirom na njihovu vrijednost omjera mase i naboja. Ioni s manjom  $m/z$  imaju

veću brzinu i prvi stižu do detektora. Detektor mjeri signale pristiglih iona i s obzirom na vrijeme dolaska generira spektar masa (Henderson i McIndoe, 2005).



**Slika 4.** Osnove rada Q-TOF analizatora (Henderson i McIndoe, 2005)

Udruživanje masene spektrometrije s TOF analizatorom omogućava razvijanje metoda s boljom selektivnosti, osjetljivošću i brzinom. Boljoj selektivnosti Q-TOF metoda u usporedbi sa starijim LC-MS/MS doprinosi udruživanje TOF analizatora sa UPLC tehnikama visoke rezolucije (Kaufmann i sur., 2007; Henderson i McIndoe, 2005).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijal

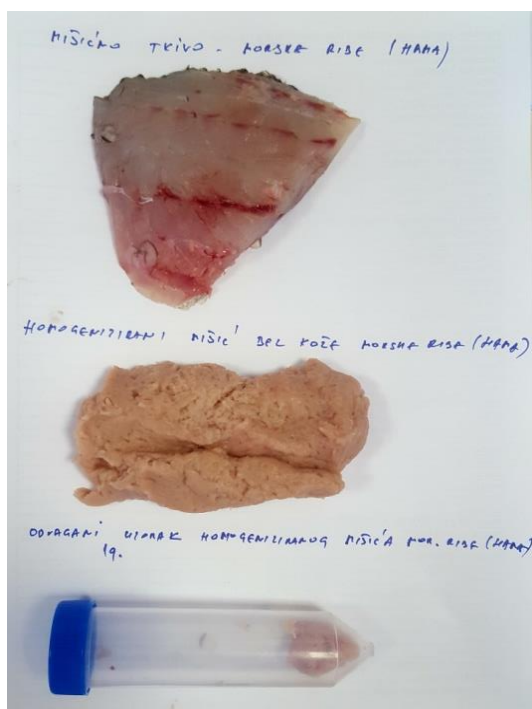
Materijal predstavljaju slijepi, homogenizirani uzorci mišića goveda, svinje, peradi i ribe (Slika 5) odvagani u količini od 2 g i poslani na daljnju pripremu.



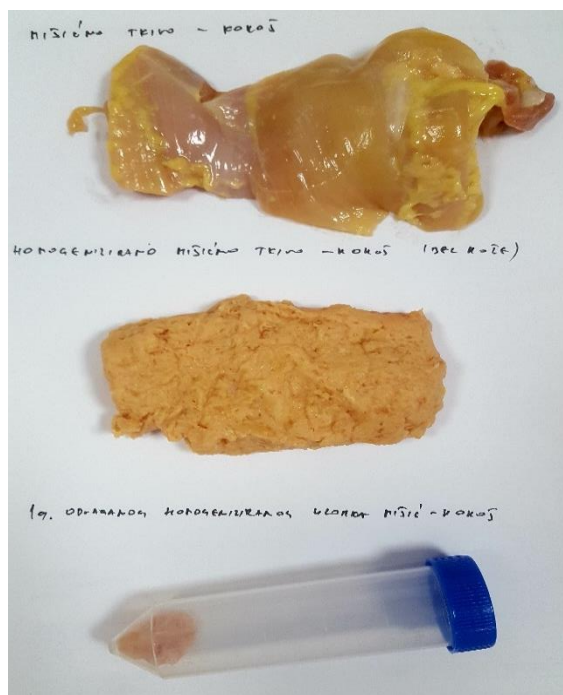
a)



b)



c)



d)

**Slika 5.** Uzorci: a) mišić goveda, b) mišić svinje c) mišić ribe d) mišić peradi (vlastite fotografije)

### 3.2. Kemikalije

- Acetonitril, LC-MS čistoće
- Metanol, LC-MS čistoće
- Mravlja kiselina, 98-100%, LC-MS čistoće
- Ultračista voda

### 3.3. Standardi

- Cefaleksin (Vetranal, Njemačka)
- Cefazolin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Cefoperazon (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Cefalonij (SigmaAldrich, Njemačka)
- Cefkvinom (Vetranal, Njemačka)
- Cefapirin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Desacetilcefapirin (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Ceftiofur (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Desfuroilceftiofur (Toronto Research Chemicals, Kanada)

### 3.4. Oprema i materijali

- Polipropilenske epruvete 15 mL
- Precizna analitička vaga
- Precizne analitičke pipete volumena od 10 µL do 5 mL
- Centrifuga s max. 4600 o/min
- Centrifuga s max. 15000 o/min
- Sustav za otparavanje s dušikom
- Vortexhomogenizator
- Epruvete za ultracentrifugu volumena do 2 mL (Eppendorf)
- HPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity
- Analizator vremena preleta TOF (engl. *Time of flight*) Q-TOF G6550A
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1x150 mm, Waters
- Predkolona: Acquity HSS T3 1.8 µM vanguardPre-Col, Waters



### **3.5. Priprema kontrolnih otopina materijala, otapala i standardnih otopina**

#### **3.5.1. Uzorkovanje mišića**

Uzorci doneseni u laboratorij na analizu, pohranjuju se u hladnjak na temperaturi od 2 - 8 °C na 24 sata ili se homogeniziraju te se mogu čuvati do tri mjeseca na temperaturi -18 °C. Prije analize homogenizirani uzorak se ostavi na sobnoj temperaturi da se otopi. Za analizu, u epruvetu od 50 mL odvaže se 2 g uzorka homogeniziranog mišića.

#### **3.5.2. Priprema otopina**

- Mobilna faza A: 0,1% Mravlja kiselina (u tikvicu od 1000 mL s ultračistom vodom dodati 1 ml mravlje kiseline, nadopuniti do oznake ultračistom vodom). Valjanost mobilne faze A je 4 dana čuvana na sobnoj temperaturi u zatamnjenu posuđu
- Mobilna faza B: MeOH (LC-MS čistoće)

#### **3.5.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova**

Bazne otopine standarda služe za obogaćivanje kontrolnih uzoraka tj. pripremu matriks kalibracijske krivulje. Za kvantitativnu analizu cefalosporina koriste se standardne i matriks krivulje u različitim koncentracijskim područjima, koja su ovisna o zadanim MRL vrijednostima za svaki pojedini analit (Varenina i sur., 2016).

Bazne standardne otopine cefalosporina cefaleksina, cefapirina i cefoperazona pripremaju se u otopini metanola i vode (MeOH/H<sub>2</sub>O, u omjeru 50:50) i čuvaju na temperaturi -20°C najviše 1 godinu. Ceftiofur i desfuroilceftiofur pripremaju se u metanolu (MeOH) i također čuvaju na temperaturi -20°C najviše godinu dana. Cefalonium i cefkvinom pripremaju se u otopini acetonitrila i vode (ACN/H<sub>2</sub>O) u omjeru 25:75 te čuvaju na temperaturi od 2 do 8°C s rokom trajanja cefaloniuma 1 mjesec i cefkvinoma 2 mjeseca. Cefazolin se priprema u dimetilsulfoksidu (DMSO), čuva na temperaturi -20°C 1 godinu, a desacetilcefapirin se može pripremiti ili u dimetilsulfoksidu (DMSO) ili u otopini acetonitrila i vode (ACN/H<sub>2</sub>O) u omjeru 25:75 i čuva se na temperaturi od 2-8 °C 1 mjesec. Bazne otopine svih cefalosporina pripremljene su u koncentraciji 1 mgmL<sup>-1</sup>. One služe za pripremu radne otopine mješavine cefalosporina koja se onda koristi za pripremu kalibracijske krivulje. Standardne radne otopine pripremaju se ovisno o njihovim MRL vrijednostima (maksimalnim dozvoljenim količinama) koje su propisane Uredbom komisije (EZ) br. 37/2010. MRL cefaleksina iznosi 200 ngmL<sup>-1</sup>, cefazolina, cefoperazona, cefalonija, cefkvinoma 50 ngmL<sup>-1</sup>, cefapirina i desacetilcefapirina 25 ngmL<sup>-1</sup> ili suma MRL-a 50 ngmL<sup>-1</sup> te ceftiofura i desfuroilceftiofura 1000 ngmL<sup>-1</sup>. Za pripremu standardne radne otopine potrebno je pomiješati 1 mL bazne

otopine cefaleksina, po 0,25 mL baznih otopina cefazolina, cefoprazona, cefaloniuma i cefkvinoma, 0,125 mL bazne otopine cefapirina, 0,125 mL desacetilcefapirina te po 5 mL baznih otopina ceftiofura i desacetilceftiofura u odmjernu tikvicu od 25 mL koja se potom napuni metanolom do oznake. Mješavina je zatim razrijeđena u omjeru 1:10 te se kao takva upotrebljavala kao standardna radna otopina. Koncentracije cefalosporina u standardnoj radnoj otopini iznose: 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  cefaleksina, po 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  cefazolina, cefoprazona, cefaloniuma i cefkvinoma, 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  cefapirina i desacetilcefapirina te 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ceftiofura i desfuroilceftiofura. Za pripremu matriks kalibracijske krivulje u tri točke potrebno je dodati standard u količini od 50, 100 i 150  $\mu\text{L}$  (1/2 MRL, MRL i 1,5 MRL) na 2 g slijepog uzorka.

### 3.6. Priprema uzoraka

#### *Kontrolni uzorak stanja instrumenta*

Kontrolni uzorak osjetljivosti instrumenta (engl. **Response Check**) predstavlja mješavina standardne radne otopine razrijeđena u omjeru 1:20.

#### *Slijepi kontrolni uzorak*

Slijepi kontrolni uzorak (engl. **Blank**) predstavlja mješavinu acetonitrila i vode (200  $\mu\text{L}$  +800  $\mu\text{L}$ )

#### *Negativni kontrolni uzorak otapala*

Slijepi kontrolni uzorak otapala (engl. **Solvent blank**) predstavlja uzorak proveden kroz ekstrakciju bez prisustva matriksa, kako bi se lako detektirala moguća kontaminacija otapala korištenih u ekstrakciji.

#### *Negativni kontrolni uzorak matriksa*

Negativni kontrolni uzorak matriksa (engl. **Matrix blank**) predstavlja uzorak mišića koji ne sadrži analite koji se pretražuju ovom metodom.

#### *Obogaćeni kontrolni uzorak – matriks kalibracijska krivulja*

Negativni uzorci mišića obogaćuju se standardnom radnom otopinom u skladu s MRL vrijednostima (1/2 MRL, MRL i 1,5 MRL).

### 3.6.1. Postupak pročišćavanja uzoraka

Prethodno odvagana 2 g uzorka mišića u plastičnoj epruveti od 50 mL (Slika 6) potrebno je adekvatno označiti. U one pripremljene za matriks kalibracijsku krivulju dodati otopinu mješavine standarda na različitim koncentracijama (ovisno o MRL-u). Potom, u sve uzorke dodati 8 mL acetonitrila (Slika 6) te kratko pojedinačno izmiješati. Sve uzorke 10 min miješati na vrtložnoj miješalici. Nakon 10 minuta, centrifugirati na 4600 o/min na 4°C te prebaciti supernatant u epruvetu od 15 mL. Upariti do suhoga u laganoj struji dušika (Slika 7) pri 40 °C pa ga otopiti u 200 µL vode i 50 µL metanola, miješati i 5 min držati u ultrazvučnoj kupelji. Prebaciti uzorke u *pasteurove* epruvetice od 2 mL i centrifugirati na 15000 o/min pri 4°C, 5 minuta te na kraju prebaciti bistri supernatant u vialu (Varenina, 2015; Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014).



Slika 6. Priprema uzoraka (vlastita fotografija)



Slika 7. Postupak uparavanja uzoraka (vlastita fotografija)

### 3.7. Mjerenje na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju

Za provođenje analize koristi se HPLC uređaj *1290 Infinity* udružen s analizatorom mase s vremenom preleta (Q-TOF-MS) *Agilent 6550 Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer G6550A* s *Dual AJS ESI* sustavom za elektrosprej ionizaciju. Instrumentalni parametri dani u tablici 3 pokazali su se optimalni za provođenje analize. Analiti se ioniziraju u pozitivnom i negativnom načinu rada te je potrebno uzorak injektirati s metodom za obje polarnosti. Koristeći *Mass Hunter Acquisition software* postavljaju se parametri metode i optimizirani uvjeti za provođenje analize. (Agilent Technologies, 2012).



**Slika 8.** HPLC uređaj Agilent 1290 *Infinity* udružen s analizatorom mase s vremenom preleta (Agilent UHPLC/Q-TOF-MS G6550) (vlastita fotografija)

**Tablica 3.** Baza podataka analita koja sadrži informaciju o svakom analitu

Supstancije	Retencijsko vrijeme (min)	Prekursor ion	Formula	Ionizacija
<b>Cefaleksin</b>	7,3	348,1013	$C_{16}H_{17}N_3O_4S$	Pozitivna
<b>Cefalonij</b>	7,0	459,0782	$C_{20}H_{18}N_4O_5S_2$	Pozitivna
<b>Cefazolin</b>	7,6	455,0373	$C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$	Pozitivna
<b>Cefoperazon</b>	7,8	646,1497	$C_{25}H_{27}N_9O_8S_2$	Pozitivna
<b>Cefkvinom</b>	6,8	529,1323	$C_{23}H_{24}N_6O_5S_2$	Pozitivna
<b>Ceftiofur</b>	8,6	524,0363	$C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$	Pozitivna
<b>Cephapirin</b>	6,5	424,0631	$C_{17}H_{17}N_3O_6S_2$	Pozitivna
<b>Desacetilcefapirin</b>	5,6	382,0526	$C_{15}H_{15}N_3O_5S_2$	Pozitivna
<b>Desfuroilceftiofur</b>	7,7	430,0308	$C_{14}H_{15}N_5O_5S_3$	Pozitivna

Određivanje cefalosporina provedeno je pri kromatografskim uvjetima prikazanim u tablici 4, a gradijent za analizu prikazan je u tablici 5.

**Tablica 4.** Kromatografski uvjeti

<b>Kromatografska kolona</b>	Acquity UPLC HSS T3 1,8 $\mu\text{m}$ , 2,1x150 mm
<b>Predkolona</b>	Acquity UPLC HSS T3 1,8 $\mu\text{m}$ , 2,1x5 mm Van Guard Pre-Column
<b>Protok</b>	0,4 mLmin <sup>-1</sup>
<b>Temperatura odjeljka kolone</b>	40°C
<b>Sustav za uzorkovanje</b>	Volumen injektiranja 10 $\mu\text{L}$ Temperatura 10 °C Injektiranje s ispiranjem igle 15 s (MeOH/ACN/PropOH 5: 2,5: 2,5)
<b>Mobilna faza</b>	Otopina A: 0,1 % mravlja kiselina Otopina B: MeOH LC-MS grade

**Tablica 5.** Gradijentna kromatografija za analizu cefalosporina

	<b>Vrijeme</b>	<b>Otapalo A</b>	<b>Otapalo B</b>	<b>Protok</b>
<b>1</b>	3 min	100 %	0 %	0,400 mLmin <sup>-1</sup>
<b>2</b>	10 min	5 %	95 %	0,400 mLmin <sup>-1</sup>
<b>3</b>	13 min	5 %	95 %	0,400 mLmin <sup>-1</sup>
<b>4</b>	13,5 min	100 %	0 %	0,400 mLmin <sup>-1</sup>
<b>5</b>	17 min	100 %	0 %	0,400 mLmin <sup>-1</sup>

**Uvjeti Q-TOF spektrometra:**

Način rada snimanja: Raspon snimanja masa od  $m/z$  50-1500  
 Stupanj skeniranja: 4 spektra/sec  
 Parametri instrumenta: Temperatura plina 150 °C  
 Protok plina 18 l/min  
 Nebulizacija 30 psig

Temperatura plina (*sheath*) 400°C  
 Protok plina (*sheath*) 12  
 Funnel Exit DC 50  
 Funnel RF HP 150  
 Funnel RF LP 60  
 Segmenti skeniranja: Kolizijske energije 0; 10; 20; 40  
 Parametri po segmentima: Napon kapilare Vcap 3500 V  
*Nozzle* 0 V  
 Fragmentor 350  
*Skimmer1* 45  
*OctopoleRFPeak* 750

Referentne mase:	pozitivni	negativni
	121,05087	112,98558
	922,00979	1033,98811

Nebulizacija referentne otopine - 13 psig

### 3.8. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata

Potvrдна analiza supstancija provodi se u MS načinu rada Q-TOF spektrometra masa, snimanjem cjelokupne struje iona (engl. *All Ion*). Potvrda analita prilikom potvrđne metode zasniva se na nekoliko uvjeta:

- Retencijsko vrijeme, odstupanje  $\pm 0,5$  min
- Prisutnost iona prekursora analita,  $S/N > 10$
- Točnost određivanja mase  $\leq 10$  ppm (engl. *Mass accuracy*)
- Prisutnost minimalno 2 produkt iona,  $S/N > 10$
- Odstupanje ionskog odnosa prekursora i produkta mora biti manji od 20-30% u odnosu na kalibracijsku krivulju

Koncentracija analita izražava se u  $\text{ngg}^{-1}$  ili  $\mu\text{kg}^{-1}$  koristeći 3 značajne decimale. Korekcija iskorištenja uračunata je u rezultat jer se kvantitativno određivanje vrši pomoću matriks kalibracijske krivulje. Iskorištenja moraju odgovarati propisanim limitima određenim u Odluci komisije 2002/657/EC. Vrijednosti trebaju odgovarati onim utvrđenim u validacijskom postupku.

### **3.9. Validacija metode za određivanje cefalosporina**

Validaciju je potrebno provesti prema odluci komisije 2002/657/EC uz pomoć validacijskog programa InterVAL Plus Quo Data. Važno je uključiti različite parametre s obzirom na vrstu uzoraka koji će se analizirati, pripremiti shemu prema kojoj će se provesti validacija i proračun validacijskih parametara te uzeti u obzir faktore koji bi mogli utjecati na ishod rutinskih analiza: životinjska vrsta za matriks mišića te različiti analitičar.

Odluka komisije 2002/657/EC zahtijeva ispitivanje metode oko MDK vrijednosti kad se radi o supstancama s propisanim MDK-om, ili pri što nižim koncentracijama kada za njih nisu propisane granične vrijednosti. Prema postavljenim zahtjevima, matriks mišića različitih vrsta potrebno je obogatiti na  $\frac{1}{2}$  MDK, MDK i na 1,5 MDK za supstance s propisanim MDK, te na C0, 2C0 i 3C0 za supstance koje nemaju propisan MDK. Kod supstanci kod kojih je postavljen MDK kao suma dva ili više analita, matriks treba obogatiti na  $\frac{1}{4}$  MDK,  $\frac{1}{2}$  MDK i  $\frac{3}{4}$  MDK-a. Svaku analizu potrebno je provesti na 3 koncentracijske razine. Uzorke je potrebno obogatiti s 20, 50, 100 i 150  $\mu$ L mješavine standardnih otopina RS-Q-TOF-MIX-S2A i RS-Q-TOF-MIX-S2B. Kvantitativna procjena različitih životinjskih vrsta provodi se na temelju matriks kalibracijskih krivulja specifičnih za svaku od vrsta (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014).

#### **3.9.1. Rezultati validacije izračunati InerVAL Plus programom**

Validacijske parametre određene u validaciji; graničnu koncentraciju analita  $CC\alpha$ , sposobnost dokazivanja  $CC\beta$ , ponovljivost (Rel.sr), unutar-laboratorijsku reproducibilnost (Rel.swR) te iskorištenje, potrebno je proračunati prema Odluci komisije 2002/657/EC. Nakon unošenja dobivenih koncentracija analiziranih obogaćenih uzoraka, InterVAL programom dobit će se validacijski parametri i kalibracijski pravci. Proračun validacijskih parametara provodi se na temelju MDK vrijednosti, tj. na temelju C0 vrijednosti za supstance bez utvrđenih graničnih koncentracija (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014).

#### **3.9.2. Primjenjivost metode**

Metoda je namijenjena za analizu cefalosporina u 2 g uzorka mišića goveda, svinje, peradi i ribe u širokom koncentracijskom području, od 1 do 1500  $\mu$ g $L^{-1}$ . Prisutnost supstance moguće je potvrditi na osnovu prisutnosti prekursor iona analita,  $S/N > 10$ , točnosti određivanja mase  $\leq 10$  ppm, prisutnosti minimalno 2 produkt iona koji odgovaraju spektru tog analita te odstupanje ionskog odnosa prekursora koja mora biti  $< 30$  %.

### **3.9.3. Specifičnost**

Specifičnost se provjerava injektiranjem strukturno sličnih supstanci. Analite je moguće razlučiti prema njihovoj specifičnoj masi, fragmentaciji i ionskom odnosu te retencijskom vremenu. Utjecaj matriksa je značajan pa je potrebno pripremiti zasebnu matriks kalibracijsku krivulju za svaku vrstu (Varenina, 2015; Saito-Shida i sur., 2017).

### **3.9.4. Stabilnost**

Pojedini standardi su vrlo nestabilni kako u standardnim otopinama tako i u ekstraktima pripremljenih uzoraka pa je pripremljene uzorke potrebno analizirati unutar 48 sati (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014).



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

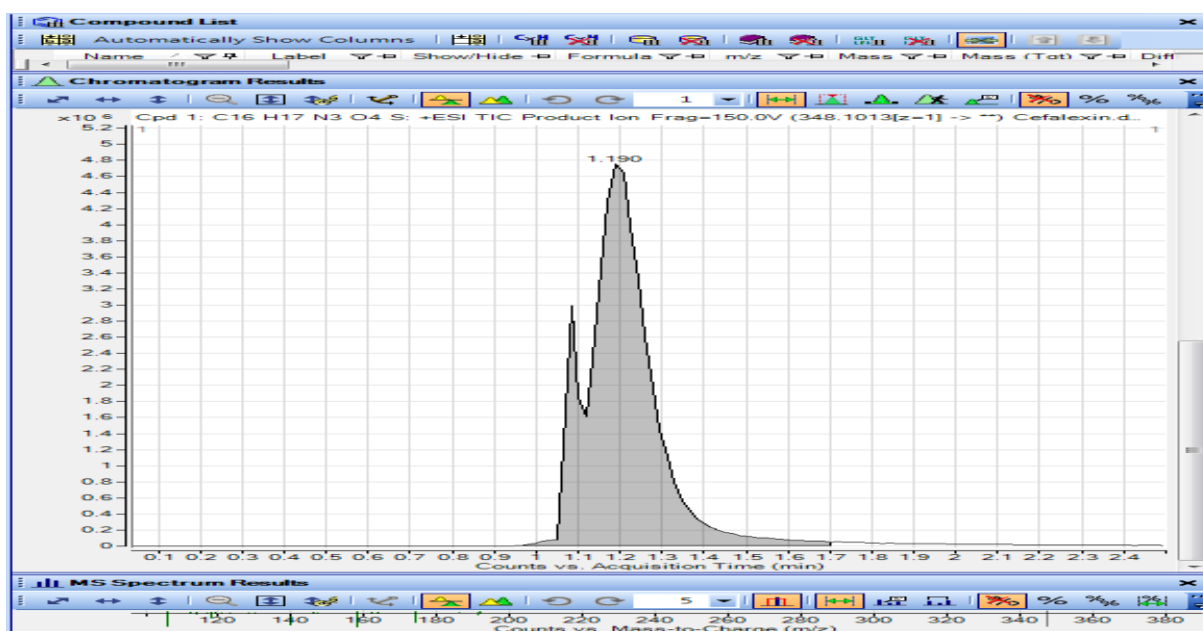
Veterinarski lijekovi primjenjuju se prvenstveno zbog prevencije bolesti kod životinja, no moguća je njihova primjena i kao agenasa koji doprinose proizvodnji u smislu prinosa finalnog proizvoda (promotori rasta) (Jank i sur., 2017). Zbog njihove sve veće uporabe prilikom uzgoja životinja namijenjenih za prehranu ljudi, potrebno je osmisliti i validirati metode za identifikaciju i kvantifikaciju njihovih rezidua (Chico i sur., 2008). Razvoj analitičkih metoda za određivanje veterinarskih lijekova u životinjskim tkivima je vrlo zahtjevan jer se radi o složenim matriksima, različitim vrstama analita s različitim kemijskim svojstvima (Anumol i sur., 2017). Glavni cilj ovog rada je bio razvoj i ispitivanje utjecaja metode za identifikaciju rezidua antibiotika cefalosporina u mišićima goveda, svinje, peradi i ribe primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS). Kako bi se mogla provesti identifikacija potrebno je snimiti spektre masa analita pri različitim kolizijskim energijama. U ovom eksperimentalnom radu ispitan je utjecaj različitih vrsta mišića na postupak pročišćavanja i odziv analita u spektrometru masa. Također je provedena analiza slučajno odabranih mišića na prisutnost cefalosporina gdje su praćeni parametri za identifikaciju analita. Prednost upotrebe HRMS-a ili spektrometra masa visoke rezolucije kao što je Q-TOF, prvenstveno je sposobnost mjerenja točne mase detektiranih iona (Anumol i sur., 2017).

#### 4.1. Optimizacija

Da bi se postigla maksimalna osjetljivost i selektivnost instrumenta, postupak smo započeli optimizacijom instrumentalnih parametara i definiranjem ionskih oblika analita. U ESI izvoru spektrometra masa, adukt ioniziranih oblika analita u pozitivnom načinu rada bio je vodikov ion  $[M+H]^+$ . Za snimanje spektra masa odabranih cefalosporina pri različitim kolizijskim energijama, injektirane su pojedinačne otopine cefalosporina, pomoću analize bez kromatografije, tj. direktnim injektiranjem analita u spektrometar masa (engl. *flow injection analysis*, FIA). U analizama je injektirano 2  $\mu\text{L}$  supstance, pri koncentraciji od 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , što je dovoljno za detekciju analita. Glavni parametri metode optimizacije su:

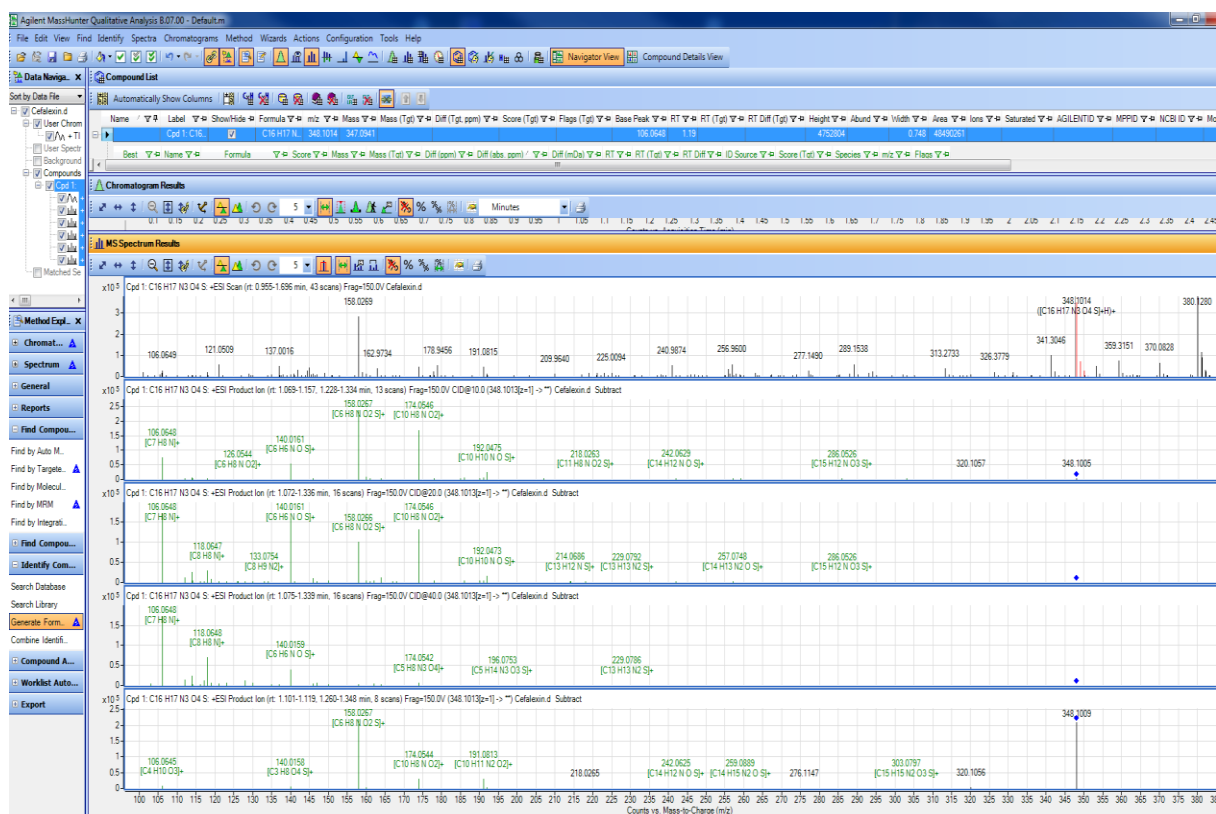
- Način rada spektrometra masa: ciljana MS/MS analiza (engl. *Targeted MS/MS*)
- Prošireni raspon snimanja 2 GHz
- Kolizijske energije od 0, 10, 20 i 40 eV

Prilikom ciljane MS/MS analize potrebno je unijeti odgovarajuće  $m/z$  vrijednosti traženih cefalosporina. Praćen je intenzitet fragmenata nastalih pri svakoj od primijenjenih energija. Praćen je intenzitet fragmenata nastalih pri svakoj od primijenjenih energija. Nakon toga započeli smo analizu prilikom koje je došlo do fragmentacije molekulskih iona antibiotika u kolizijskoj ćeliji i snimanja novonastalih fragment iona. Nakon snimanja kromatograma ukupne struje nastalih iona, proveli smo analizu s ciljem dobivanja željenog spektra. Analiza je provedena pomoću softvera Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis (Slika 9).



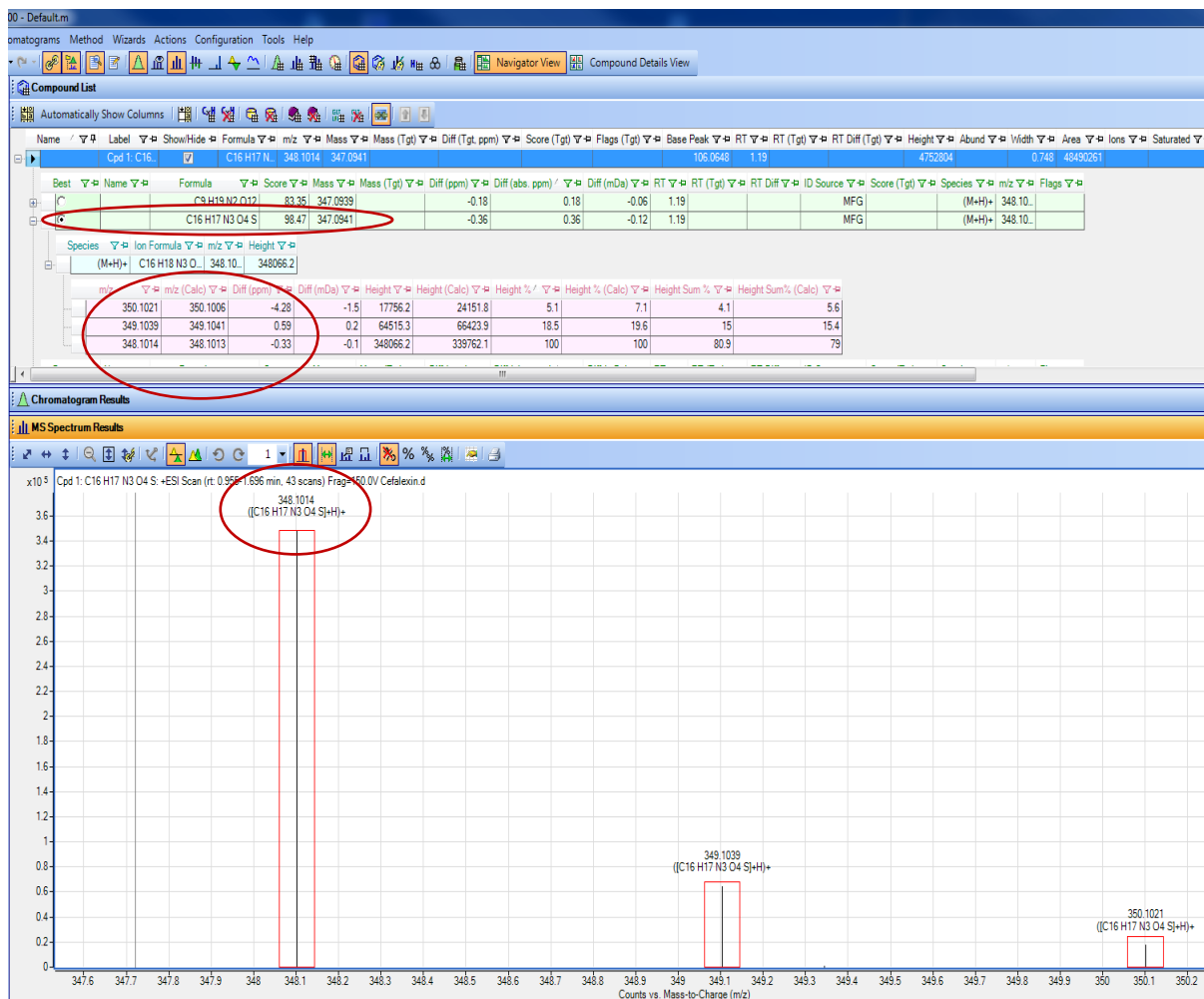
Slika 9. Kromatogram cefaleksina

Dobivanjem kromatograma spoja (Slika 9) i dalje nismo mogli biti sigurni radi li se o traženom spoju. Prema izmjerenim spektrima, korištenjem kvalitativnog računalnog programa, bilo je potrebno generirati formule i zabilježiti maksimume pikova fragment iona za svaki uzorak, pri različitim kolizijskim energijama. Na primjer, cefaleksin je molekulske formule  $C_{16}H_{17}N_3O_4S$  (Pubchem, 2018) što nam sugerira da softveru predložimo ugljik, vodik, dušik, kisik i sumpor kao molekule karakteristične spoju kojeg želimo detektirati.



**Slika 10.** Generiranje formule cefaleksina

Potom softver primjenom složenog algoritma predloži moguće spojeve te, s obzirom na rezultat (engl. *Score*) i grešku određivanja mase, predloži spoj koji najbolje odgovara postavljenim parametrima. Generiranje formule na primjeru cefaleksina prikazano je na slici 10. Prilikom kreiranja spektara potrebno je odrediti najčešće produkt ione. Da bi spoj identificirali potrebno je imati barem dva karakteristična fragment iona na snimljenom spektru. Kada smo utvrdili da se radi o željenom spoju, procijenili smo izotopnu raspodjelu prema kojoj točno identificiramo taj spoj (Slika 11).



**Slika 11.** Procjena izotopne raspodjele cefaleksina

Program je s obzirom na zadane parametre predložio veliki broj spojeva i istaknuo onaj koji najbolje odgovara zadanim uvjetima. Iz slike 11 je vidljivo da je program predložio spoj formule  $C_{16}H_{17}N_3O_4S$  s 98,47%-tnom sigurnošću. Također, greška određivanja masa je mala ( $<10$  ppm) te iznose -4,28, 0,59 i -0,33 (Dif ppm-) za izotope cefaleksina, što je još jedan od pokazatelja da se radi upravo o tom spoju. Na prikazu izotopne raspodjele cefaleksina vidljiva su tri karakteristična pika  $m/z$  348,1014,  $m/z$  349,1039 i  $m/z$  350,1021 te je točnost njihovog određivanja prikazana na način da su signali na spektru unutar zadanih granica (crveni kvadrat).

Nakon identifikacije traženih spojeva, spektri se pohranjuju u bazi spojeva (Slika 12) i tako kreirana baza s molekularnim i fragment ionima koji potvrđuju svaki od odabranih cefalosporina, koristi se u daljnjim analizama. Istraživanja naglašavaju važnost stvaranja baza spojeva i točnog definiranja puta fragmentacije kako bi se što brže i efikasnije identificirali

spojevi koji pripadaju istim skupinama (Fu i sur., 2017). Jednak postupak proveden je za svih devet cefalosporina čiji se rezidui određuju u namirnicama životinjskog podrijetla.

MassHunter PCDL Manager - Forensics D:\MassHunter\PCDL\VetDrugs-Antibiotics-Dyes-MIXA-RTWatersH55.cdb

File View PCDL Configuration Links Help

Find Compounds

Compounds Spectra Ion Mobility Input

Compounds search criteria

Enter one attribute per line.  
Examples:  
140-87-4  
Glycine  
200.01  
Note: Formula must be exact for searching.

Must also contain

Must not contain

Ion search mode

Include neutrals  
 Include anions  
 Include cations

Tolerances

Mass: 10.0 ppm mDa  
RT: 0.1 min  
RI: 10.00

Search only visible columns  Search all columns  With spectra  With CCS

Advanced Search

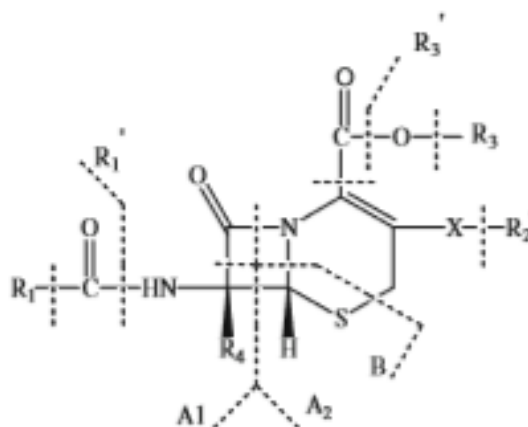
Compound Results: 97 hits

Name	Formula	Mass	Retention Time	Cation	Anion	CAS	ChemSpider	IUPAC	NumSpectra	Description
Desacetylcefapim	C15H15N3O5S2	381.04531	5.6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Cephapim	C17H17N3O6S2	423.05588	6.5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Cefalonium	C20H18N4O5S2	458.07186	8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Cefquinome	C23H24N6O5S2	528.12496	6.8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Cefalexin	C16H17N3O4S	347.09398	7.3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Cefazolin	C14H14N8O4S3	454.03001	7.6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Cefoperazone	C25H27N9O8S2	645.1424	7.8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Ceftiofur	C19H17N5O7S3	523.02901	8.6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin
Desfuryleftiofur	C14H15N5O5S3	429.02353	7.7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				4	Cefalosporin

Slika 12. „PCDL“ – baza spojeva

## 4.2. Spektri masa cefalosporina

Chong i Hu (2008) istraživali su moguće puteve fragmentacije antibiotika cefalosporina i penicilina te su rezultate saželi na temelju dobivenih ESI spektara masa (Slika 13). Najčešće reakcije fragmentacije cefalosporina su: cijepanje  $\beta$ -laktamskog prstena prilikom čega nastaju A1, A2 ili B fragmenti, gubitak R2' na položaju C3, gubitak -COOR3 na položaju C4 i gubitak R1 ili R1' skupine na položaju C7. Nakon osnovnih reakcija fragmentacije karakterističnih za svaki cefalosporin, ostali fragment ioni nastaju gubitkom malih fragmenata.



Slika 13. Mogući putevi fragmentacije cefalosporina (Chong i Hu, 2008)

Identifikacija cefalosporina temeljena je na podacima o spektru masa usporedbom dobivenih prekursor ( $m/z$ ) i fragment iona ( $m/z$ ) s literaturnim podacima. Također, dobiveni podaci uspoređeni su s prethodno kreiranom bazom spojeva (Slika 12).

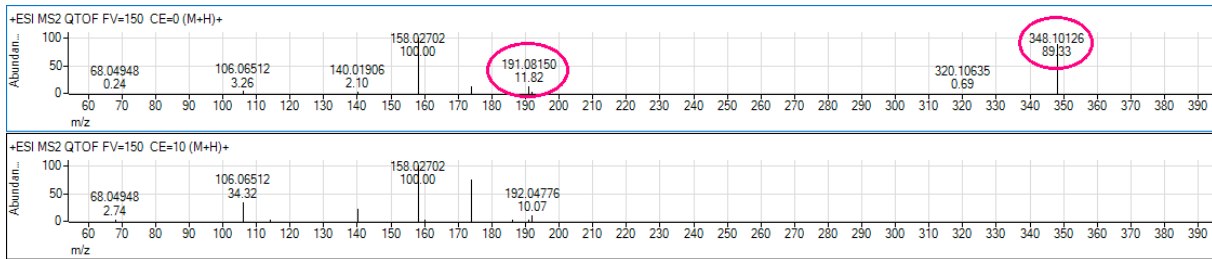
Cefalosporin okarakteriziran molekularnim ionom  $m/z$  348 i fragment ionima  $m/z$  158 i 174 identificiran je kao cefaleksin. Na spektru masa cefaleksina možemo opaziti fragmentaciju i kod kolizijske energije od 0 eV dok kod 10 eV prekursor ion više nije prisutan, što nam ukazuje na nestabilnu kemijsku strukturu spoja (Slika 14). To se može zapaziti i kod ostalih cefalosporina, osim kod desfuroilceftiofura gdje je odziv fragmenata vrlo nizak pri kolizijskoj energiji 0 eV te kod kolizijske energije 10 eV još uvijek imamo jak signal prekursora. Spoj cefazolin identificiran je prema putu fragmentacije s molekularnim ionom  $m/z$  455 i fragment ionima  $m/z$  323, 156 i 295 (Slika 15). Također, Becker i suradnici (2004) te Gentili i suradnici (2005) u svojim su istraživanjima dobili jednake puteve fragmentacije za cefaleksin i cefazolin. Snimka spektra bez primjene kolizijske energije pokazuje prisutnost molekularnog iona, dok su fragment ioni vidljivi i nakon primjene kolizijske energije od 10 eV.

Cefalosporin okarakteriziran molekularnim ionom  $m/z$  459 i fragment ionima  $m/z$  337, 152 i 123 odgovara strukturi cefaloniuma (Slika 16). Usporedbom slike 16 pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV jasno je vidljivo smanjenje pika molekularnog iona  $m/z$  459. Smanjenjem pika molekularnog iona, posljedično se povećavaju pikovi različitih fragment iona karakterističnih za pojedini spoj.

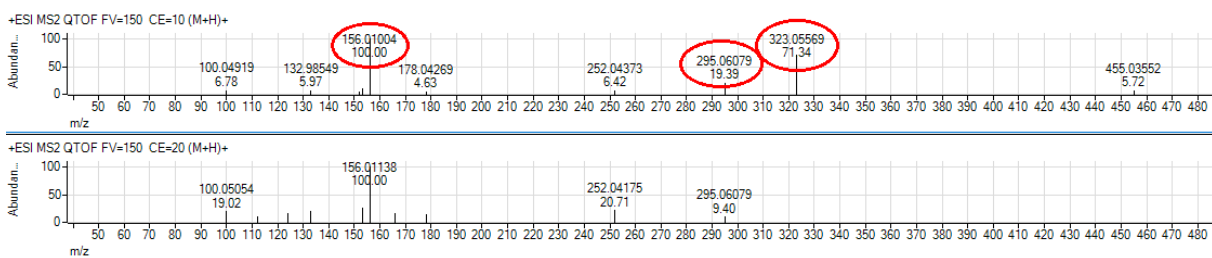
Sljedeći analizirani spoj pokazao je molekularni ion  $m/z$  646 te fragment ione  $m/z$  530 i 143 što odgovara strukturi cefoperazona i njegova fragmentacija prikazana je na slici 17. Potom, spoj s molekularnim ionom  $m/z$  529 i fragment ionom  $m/z$  134 identificiran je kao cefkvinom (Slika 18). Becker i suradnici (2004) u svom istraživanju dobili su jednak put fragmentacije za navedene cefalosporine.

Ceftiofur (Slika 19) je okarakteriziran molekularnim ionom  $m/z$  524 i produkt ionima  $m/z$  241 i 285. Sljedeći spoj pokazao je molekularni ion  $m/z$  424 i fragmentne ione  $m/z$  292, 226, 124, 111 i 79 te odgovara strukturi cefapirina, što su potvrdili i Gentili i suradnici (2005) u svom istraživanju (Slika 20). Desacetilcefapirin je, prema literaturnim podacima, okarakteriziran molekularnim ionom  $m/z$  382 i fragment ionima  $m/z$  152, 111 i 193 (Slika 21), a spoj s molekularnim ionom  $m/z$  430 i fragment ionima  $m/z$  125, 126 i 227 identificiran je kao desfuroilceftiofur (Slika 22). Jednake puteve fragmentacije za ceftiofur, cefapirin, desacetilcefapirin i desfuroilceftiofur potvrdili su i Becker i suradnici (2004) te Hong i

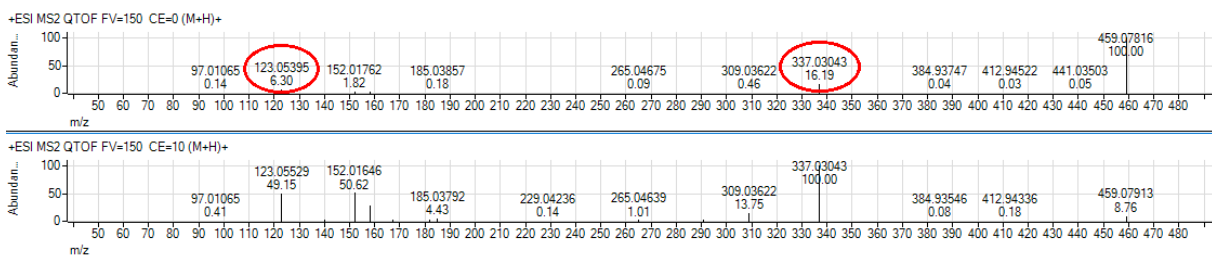
suradnici (2017) u svojim radovima. Na prikazanim spektrima zaokruženi su karakteristični fragment ioni koje smo dalje pratili na analizama za svaki od cefalosporina. Za svaki analit poželjno je pratiti molekularni ion i minimalno dva fragment iona kako bi identifikacija bila valjana (Odluka, 2002; Patyra i sur., 2017).



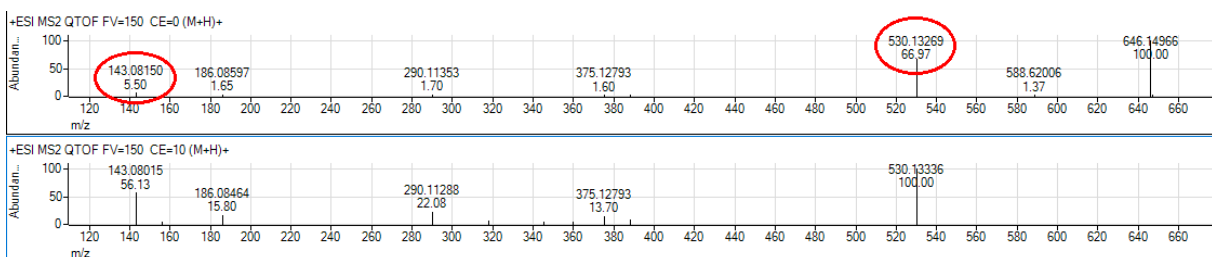
**Slika 14.** Fragmentacija cefaleksina pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



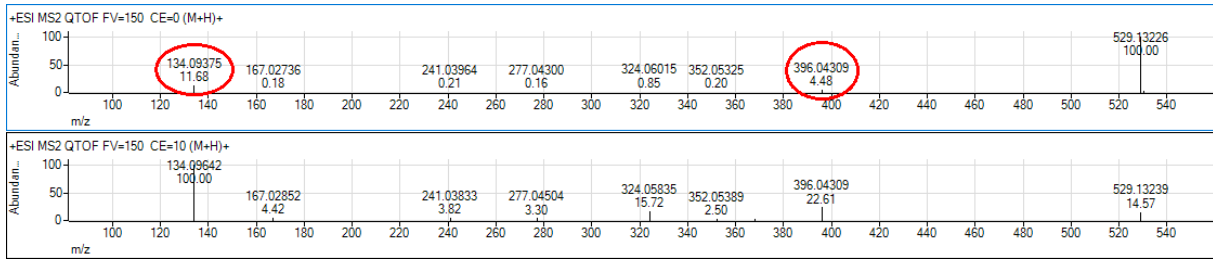
**Slika 15.** Fragmentacija cefazolina pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



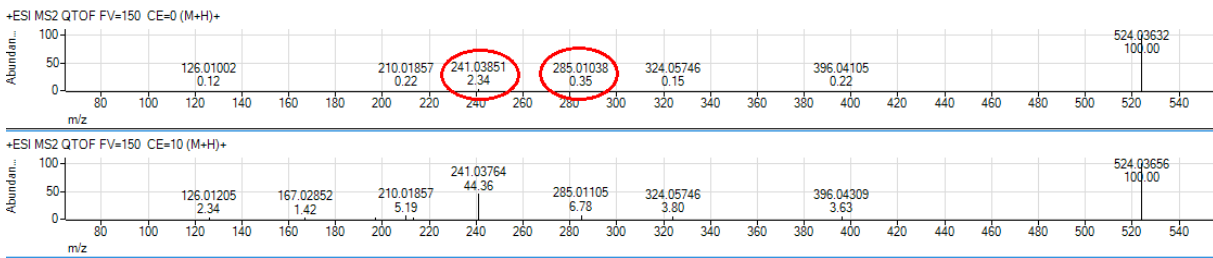
**Slika 16.** Fragmentacija cefaloniuma pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



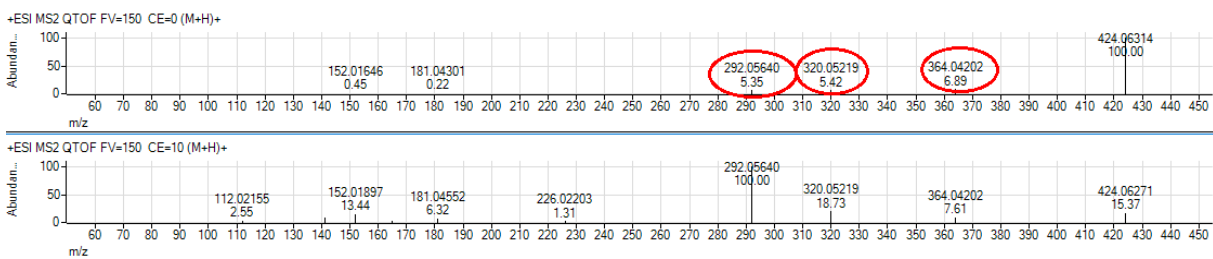
**Slika 17.** Fragmentacija cefoprazona pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



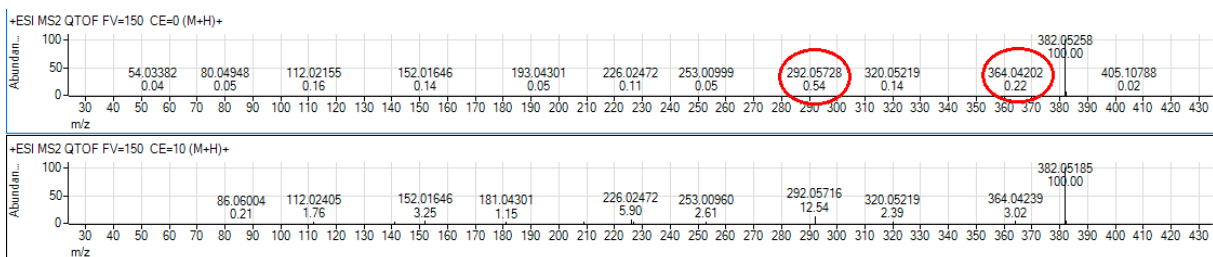
**Slika 18.** Fragmentacija cefkvinoma pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



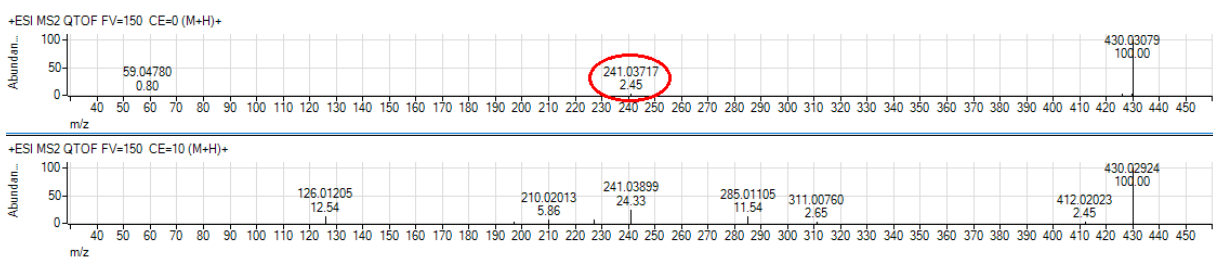
**Slika 19.** Fragmentacija ceftiofura pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



**Slika 20.** Fragmentacija cefapirina pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



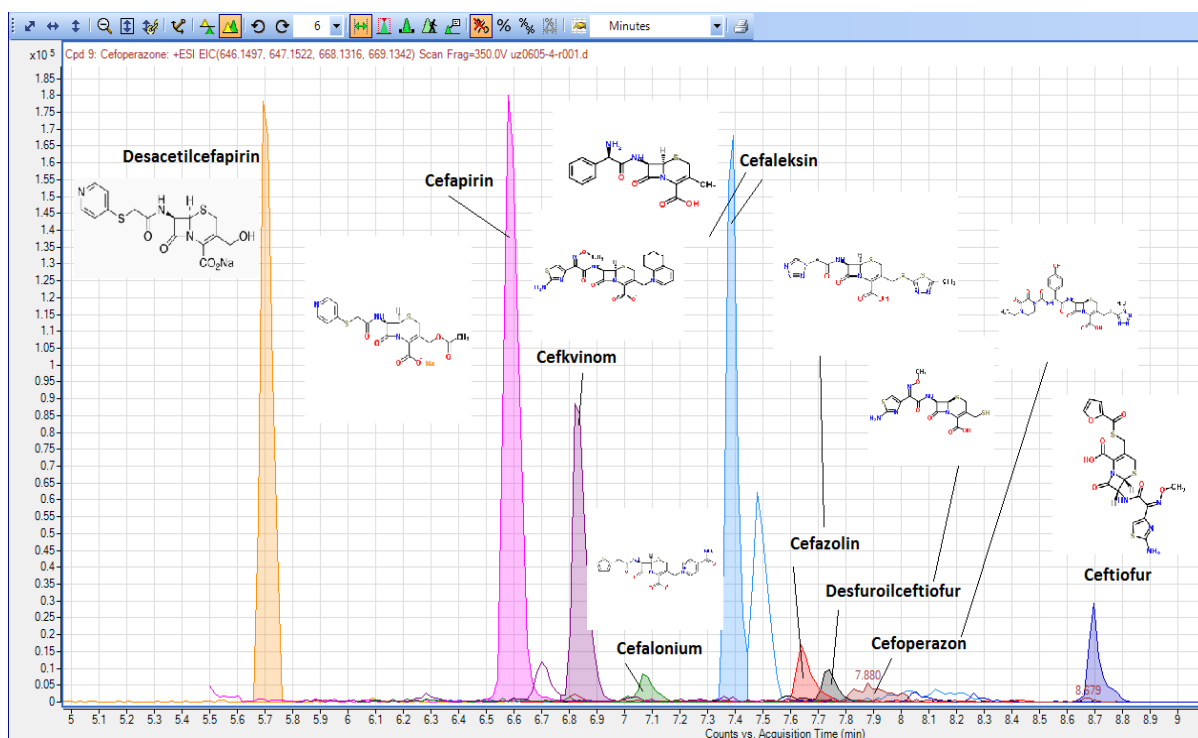
**Slika 21.** Fragmentacija desacetilcefapirina pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



**Slika 22.** Fragmentacija desfurolceftiofura pri kolizijskim energijama 0 i 10 eV



### 4.3. Kromatografija i pregled retencija analita



**Slika 23.** Kromatogram cefalosporina u standardu s odgovarajućim strukturnim formulama (ChemSpider)

Na slici 23 nalazi se kromatogram sa svim analiziranim cefalosporinima u prethodno pripremljenom standardu. Usporedbom slike 23 i tablice 5 mogu se vidjeti karakteristični pikovi za svaki od cefalosporina koji su detektirani pri njihovim retencijskim vremenima.

**Tablica 5.** Retencijska vremena, vrsta ionizacije te molekularni i fragment ioni cefalosporina

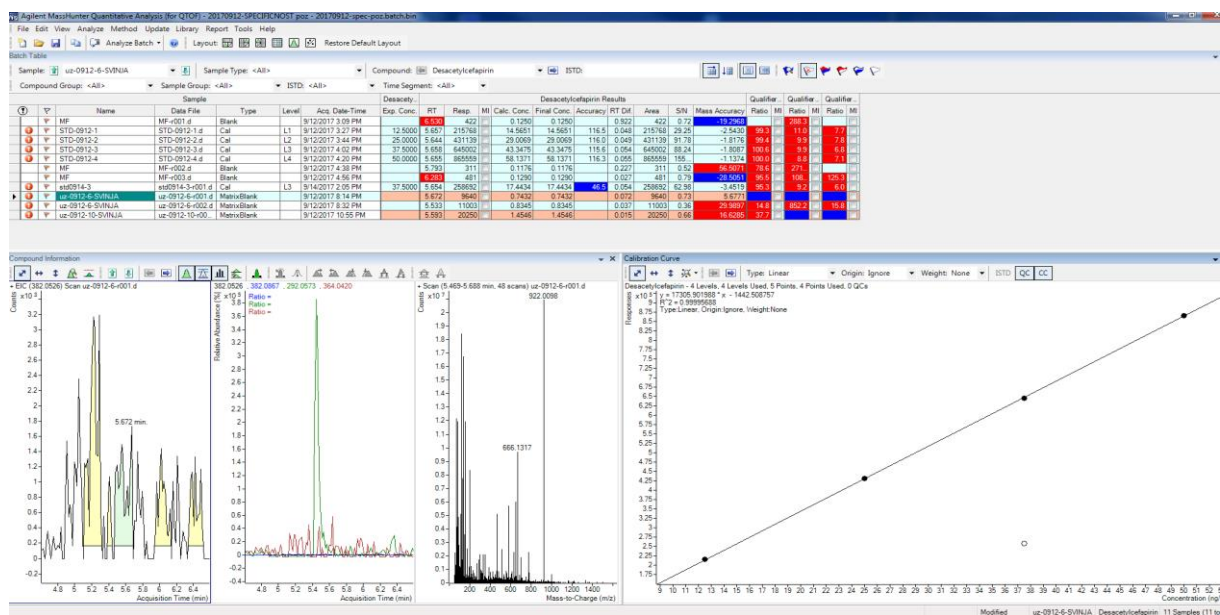
Cefalosporin	Retencijsko vrijeme (min)	Vrsta ionizacije	Molekularni ion	Fragment ioni
Desacetilcefapirin	5,7	+	382	292, 382
Cefapirin	6,6	+	424	292, 320
Cefkvinom	6,8	+	529	134, 167
Cefalonium	7,1	+	459	337, 123
Cefaleksin	7,4	+	348	158, 191
Cefazolin	7,7	+	455	156, 323
Desfuroilceftiofur	7,8	+	430	241, 285
Cefoperazon	7,9	+	646	530, 143
Ceftiofur	8,7	+	524	241, 285

Tablica 5 prikazuje devet cefalosporina koji se najčešće analiziraju u veterinarskoj medicini, njihova retencijska vremena, vrstu ionizacije te molekularne i fragment ione. Retencijsko vrijeme je vrijeme u kojem određeni spoj izlazi iz kolone odnosno vrijeme u kojem je spoj detektiran. Iz tablice je vidljivo da desacetilcefapirin ima najmanje retencijsko vrijeme odnosno prvi je detektiran, što je vidljivo i iz slike 23. Detekcija spoja prvenstveno ovisi o njegovoj polarnosti. Polarniji spojevi prije izlaze iz kolone i dolaze do detektora. Potom su detektirani redom: cefapirin, cefkvinom, cefalonium, cefaleksin, cefazolin, desfuroilceftiofur te cefoperazon. Najveće retencijsko vrijeme, 8,6 ima ceftiofur. Većina cefalosporina daje intenzivniji signal u pozitivnom ionizacijskom modu (Hong i sur., 2017; Gentili i sur., 2005) u kojem je rađena fragmentacija. U tablici 5 također su prikazani molekularni ioni  $m/z$  te dva karakteristična fragment iona za svaki cefalosporin, neophodni za identifikaciju spoja Q-TOF tehnikom.

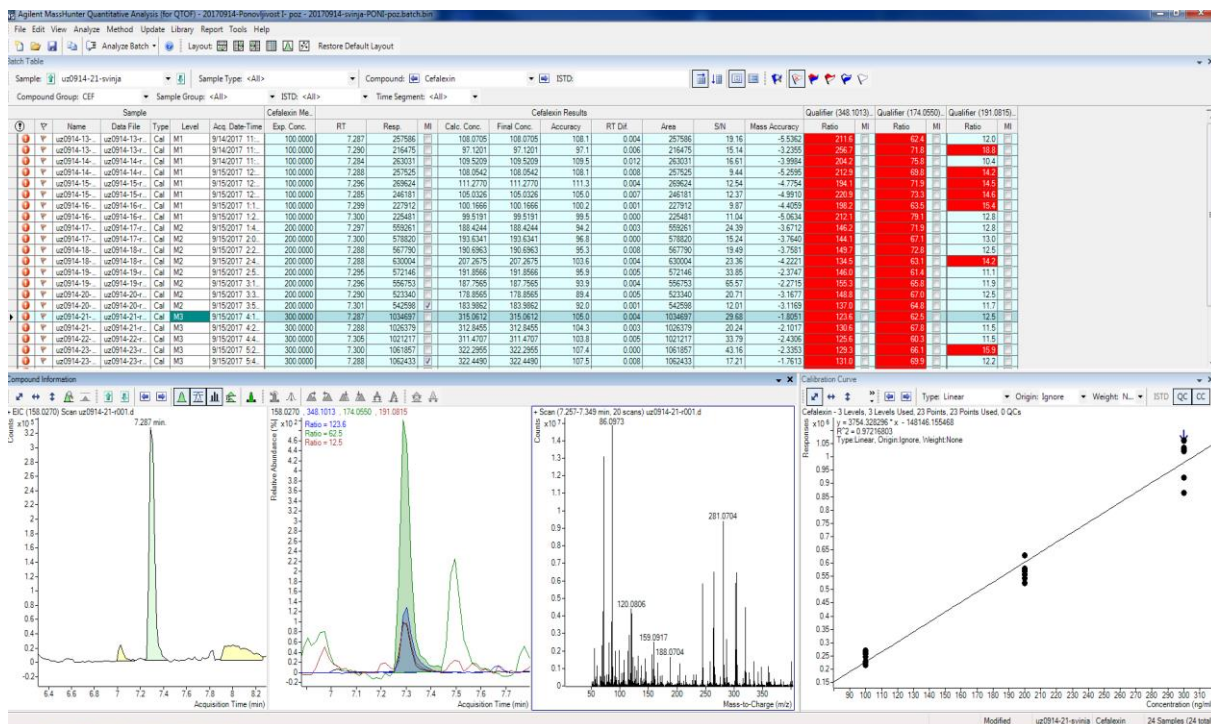
## 4.4. Razvoj i validacija metode za određivanje cefalosporina

### 4.4.1. Specifičnost metode

Specifičnost metode testirali smo na kromatografskim snimkama reprezentativnih slijepih matriks uzoraka (engl. *Blank*). Ukupno smo analizirali 20 uzoraka na čijim kromatogramima spektrometra masa nisu pronađeni pikovi koji bi mogli interferirati s analitom, što je vidljivo iz slika 22 i 23, poštujući uvjet odstupanja od retencijskog vremena pika  $\pm 2,5\%$ . Također, nisu pronađeni ni lažno pozitivni ni lažno negativni rezultati što nam sugerira dobru specifičnost metode.



Slika 24. Kromatogram slijepog (engl. *Blank*) matriksa (mišić svinje)



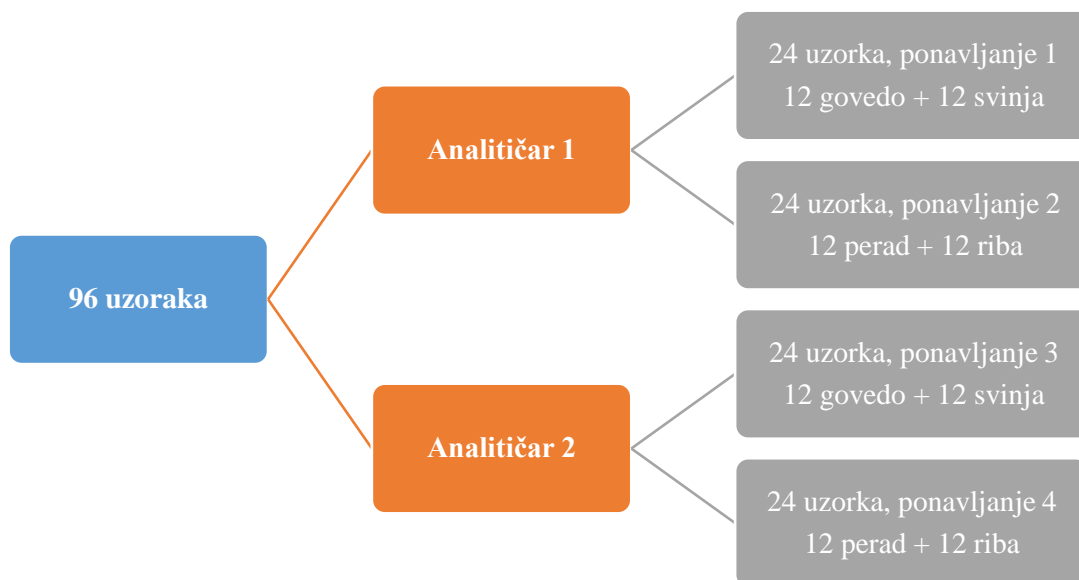
**Slika 25.** Kromatogram obogaćenog matriksa (mišić svinje)

Usporedbom slika kromatograma slijepog matriksa (engl. *blank*) i obogaćenog matriksa, vidljivo je da nema interferirajućih pikova analita i odziva matriksa. Također kod obogaćenog matriksa točnost određivanja masa je ispod 10 ppm te možemo detektirati fragment ione koji se pojavljuju u određenom retencijskom vremenu. Važno je da točnost određivanja mase ne prelazi 10 ppm-a, jer sve vrijednosti iznad toga upućuju na nedovoljnu preciznost metode. Isti parametri koji su praćeni kod slijepog i obogaćenog matriksa, ne podudaraju se što nam omogućava da ih višeznačno razlikujemo. Na kromatogramu slijepog matriksa nema vidljivih odziva pri retencijskim vremenima dok je kod obogaćenog matriksa na kromatogramu vidljiv karakterističan i jak pik pri retencijskom vremenu 7,3 minute. Također, kod kromatograma obogaćenog matriksa detektirani su i fragment ioni  $m/z$  348,1, 174,1 te 191,1, što odgovara strukturi cefaleksina. Prilikom razvoja metode snimljeni su i u bazu pohranjeni kromatogrami svih devet cefalosporina, koji će se koristiti u daljnjim analizama. Specifičnost metode na jednak je način testirana i u istraživanju Chica i suradnika (2008).

#### 4.4.2. Ponovljivost/preciznost metode

Validacija je provedena tijekom 4 dana od strane 2 različita analitičara koji su pripremili obogaćene matrikse mišića (goveda, svinje, ribe i peradi). Ukupno je analizirano 96 uzoraka prema shemi prikazanoj na slici 26. Cilj ovakvog validacijskog postupka bio je utvrditi ponašanje metode u uvjetima ponovljivosti. Ponavljanjem analiza obogaćenih uzoraka

proračunati su parametri točnosti i preciznosti analitičke metode, a usporedbom rezultata ponovljenih uzoraka, dobiveni su podaci o unutar - laboratorijskoj reproducibilnosti (Varenina i sur., 2016). Granelli i suradnici (2009) u svom radu ističu visoku osjetljivost i dobru točnost UHPLC/Q-TOF-MS metode za detekciju oko 100 veterinarskih lijekova.



**Slika 26.** Shema validacijskog postupka

**Tablica 6.** Validacijski parametri dobiveni InterVal računalnim programom

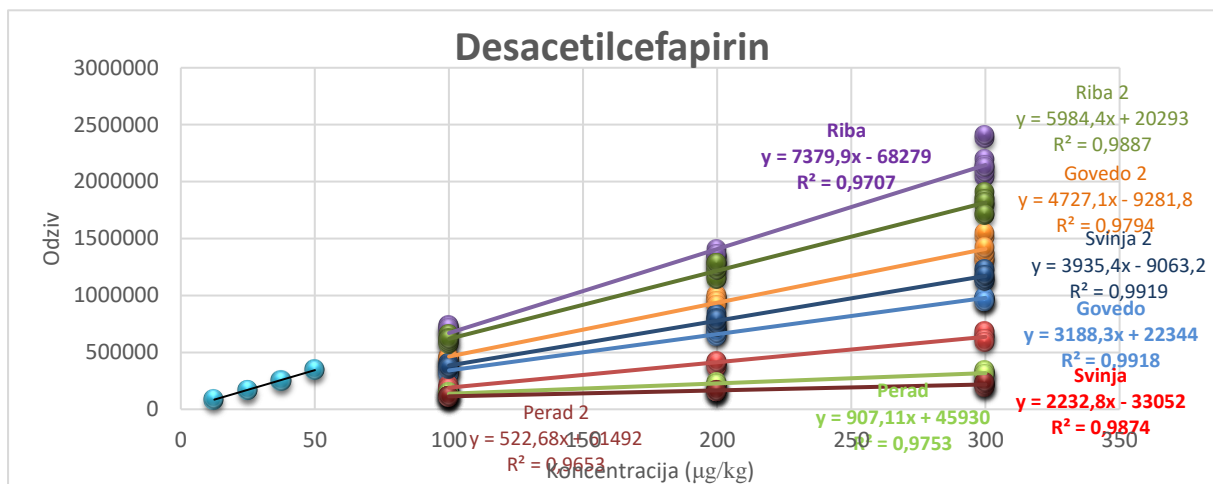
<b>Cefalosporin</b>	<b>MDK<sub>min</sub></b> <b>(<math>\mu\text{gkg}^{-1}</math>)</b>	<b>CC<math>\alpha</math></b> <b>(<math>\mu\text{gkg}^{-1}</math>)</b>	<b>CC<math>\beta</math></b> <b>(<math>\mu\text{gkg}^{-1}</math>)</b>	<b>Iskorištenje [%]</b> <b>na CC<math>\alpha</math></b>	<b>Rel SR [%]</b> <b>na CC<math>\alpha</math></b>
<b>Cefaleksin</b>	200	226,7	138,218	100	7,7
<b>Cefazolin</b>	25	27,98	31,366	99,1	6,8
<b>Cefalonium</b>	25	30,4	35,850	99,8	10,5
<b>Cefoperazon</b>	25	28,6	32,451	99,8	7,7
<b>Cefkvinom</b>	25	30,9	36,130	99,5	9,1
<b>Ceftiofur</b>	1000	1155,9	717,240	100,9	9,3
<b>Cefapirin</b>	50	56,0	16,150	98,9	7,1
<b>Desacetilcefapirin</b>	50	55,7	15,956	99,1	6,8
<b>Desfuroilceftiofur</b>	1000	1187,2	772,123	99,4	10,6

Svi rezultati izraženi su pri vrijednostima maksimalnih dozvoljenih količina (MDK). Nakon analize standardne devijacije, iz tablice 6 vidljivo je najveće odstupanje za desfuroilceftiofur koje iznosi 10,6%. Veće odstupanje predstavlja slabije reproducibilan rezultat. Također, veliko odstupanje utvrđeno je i za cefalonium (10,5%). Nešto niža odstupanja utvrđena su za ceftiofur, cefkvinom, cefaleksin, cefoperazon i cefapirin dok je za spojeve cefazolin i desacetilcefapirin utvrđeno najmanje odstupanje od 6,8%. Iz tablice 6 također je vidljivo iskorištenje metode za svaki cefalosporin pri maksimalnim dozvoljenim količinama. Iskorištenje je vrlo visoko, od 98,9% do 100,9%. Mjerna nesigurnost analitičkog rezultata izražena je preko graničnog masenog udjela analita ( $CC\alpha$ ) i sposobnosti dokazivanja ( $CC\beta$ ) jer računa reproducibilnosti metode te standardnu devijaciju ponovljivosti određene u validaciji.  $CC\alpha$  je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost  $\alpha$  pogreške, da je uzorak pozitivan.  $\alpha$  pogreška je vjerojatnost lažno pozitivne odluke te za zabranjene tvari ne smije prelaziti 1%. Sposobnost dokazivanja ili  $CC\beta$  predstavlja najmanji udio tvari kojeg je moguće metodom dokazati, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost  $\beta$  pogreške.  $\beta$  pogreška je vjerojatnost lažno negativne odluke, ograničena na 5% (Varenina i sur., 2016; Odluka, 2002). Za antibiotike s točno definiranom MDK vrijednošću dovoljno je da je metoda sposobna detektirati spojeve pri  $\frac{1}{4}$  MDK vrijednosti (Granelli i sur., 2008). U slučaju tvari za koje nije utvrđena maksimalna dopuštena količina, sposobnost dokazivanja je najniža koncentracija koja se može dokazati sa statističkom sigurnošću od  $1 - \beta$  u kontaminiranom uzorku.  $CC\beta$  predstavlja graničnu koncentraciju iznad koje postoji statistički značajna vjerojatnost da je analizirani uzorak pozitivan. Ukoliko su vrijednosti u analizama veće ili jednake  $CC\beta$ , te uzorke je potrebno ponoviti i utvrditi njihovu točnu koncentraciju (Guidi i sur., 2017; Odluka, 2002).

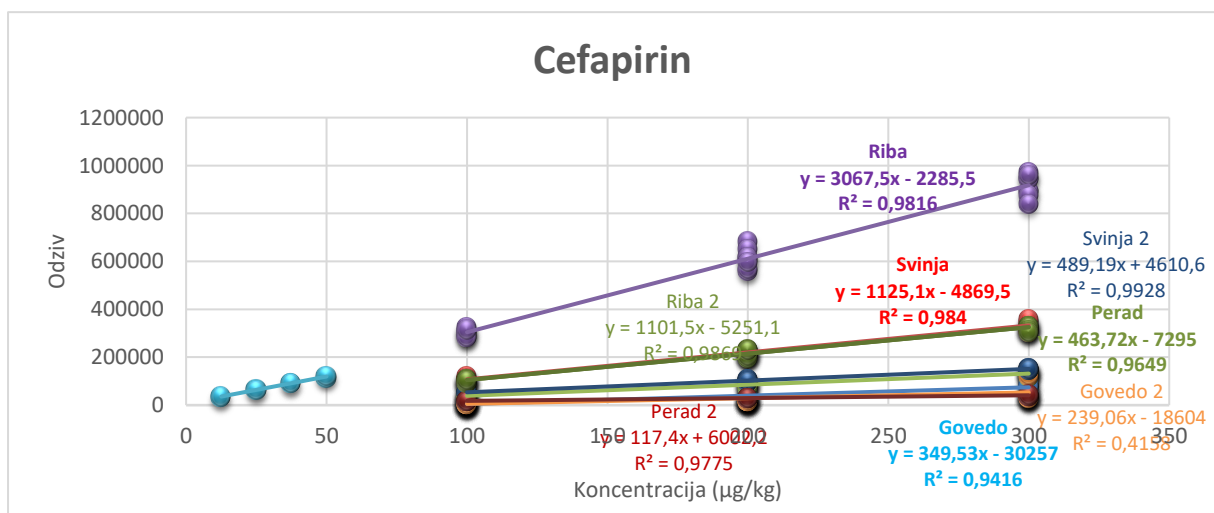
#### **4.4.3. Određivanje utjecaja matriksa**

Testiranje pojačanja ili supresije iona važno je u razvoju i validaciji metode kako bi se postigla precizna kvantifikacija analitičkih rezultata (Remane i sur., 2010; Becker i sur., 2004; Cazorla-Reyes i sur., 2014). Becker i suradnici (2004) ispitali su utjecaj matriksa na dobivene rezultate primjenom LC-MS-MS-a. U jednom eksperimentu mjerili su koncentraciju analita u ekstraktu koji je sadržavao matriks i onom koji nije sadržavao matriks (standard) te došli do zaključka da je razlika u koncentracijama analita uzrokovana komponentama matriksa koji nisu bili prisutni u standardnoj otopini. Pripremili su kalibracijske krivulje te su rezultati pokazali da matriks efekt prvenstveno ovisi o vrsti analiziranog životinjskog tkiva. Također su istaknuli da su u svim ispitivanim matriksima (mlijeko, mišić, bubreg) zabilježeni

ili supresija ili pojačanje signala pika. Meso je složeni matriks s visokim sadržajem proteina, fosfolipida i masti, koji mogu vezati cefalosporine te ometati njihovu ekstrakciju i pročišćavanje (Hong i sur., 2017). Iako validacija ukazuje na zadovoljavajuću linearnost metode, prisutnost matriksa može utjecati na odziv analita i rezultirati drugačijim parametrima linearnosti. U tu svrhu pripremljene su kalibracijske krivulje analita svakog pojedinog cefalosporina na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja tj. od strane dva analitičara (Slike 27-35). Matriks efekt definiran je kao postotak omjera nagiba kalibracijske krivulje matrice u odnosu na standardnu kalibracijsku krivulju,  $\frac{m}{s} * 100$  (Varenina i sur., 2016). Iz slika 27-35 vidljivo je da su sve kalibracijske krivulje matriksa linearne u danim rasponima.

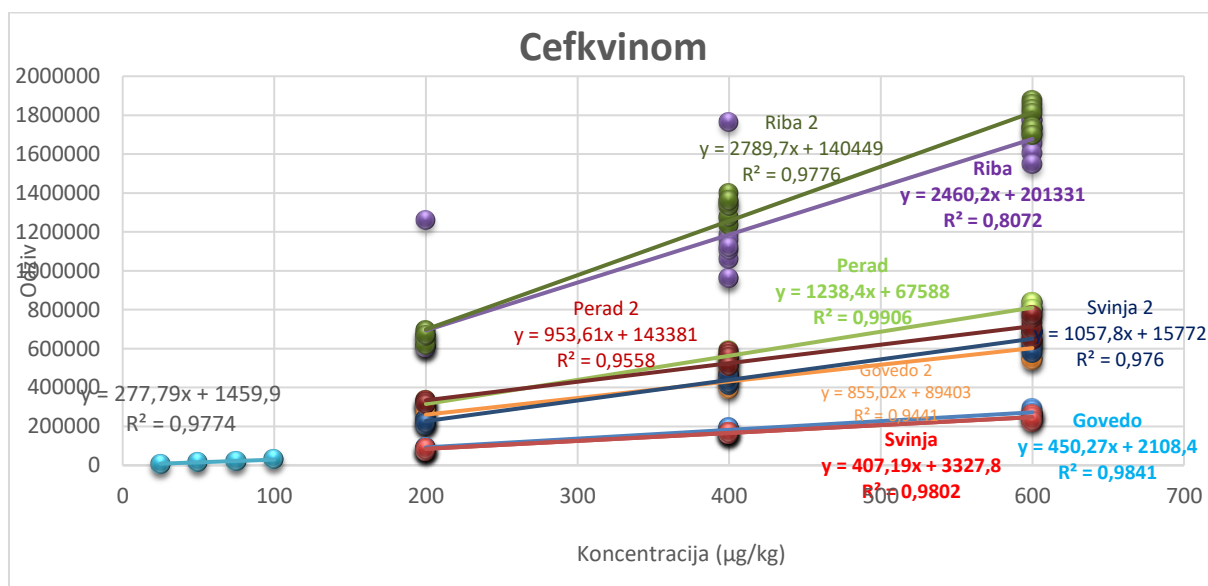


**Slika 27.** Kalibracijska krivulja desacetilcefapirina na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja.

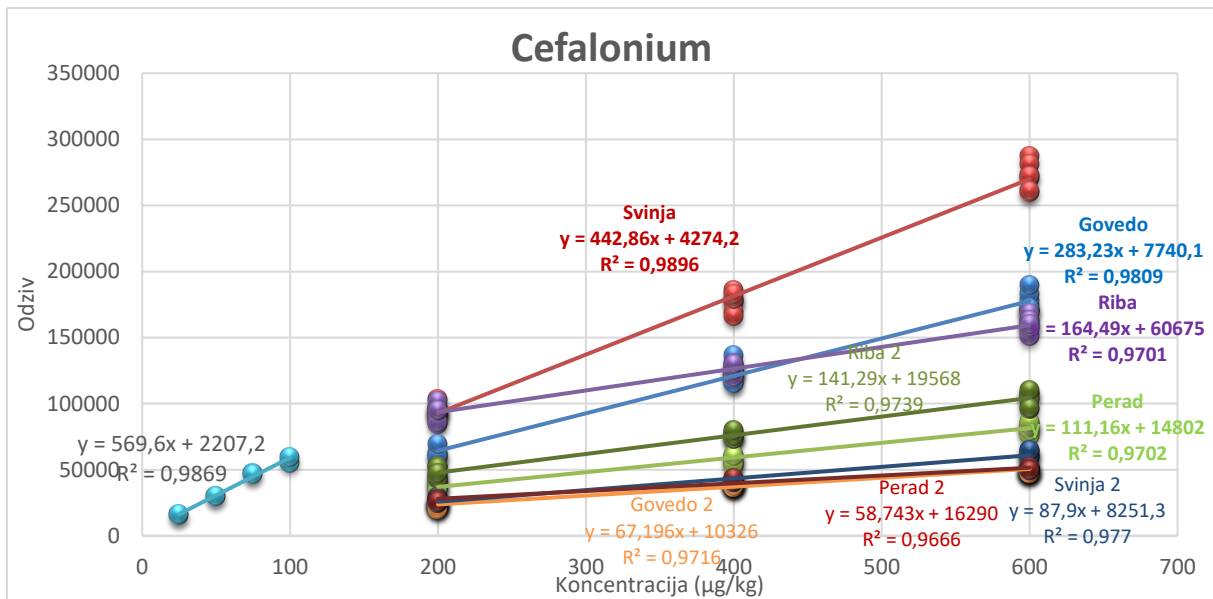


**Slika 28.** Kalibracijska krivulja cefapirina na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja

Kod desacetilcefapirina može se uočiti značajan utjecaj matriksa. U uzorcima peradi najviše je potisnuta ionizacija analita zbog prisutnosti matriksa kod oba analitičara, što je vidljivo iz slike 27. Iz slike se također može uočiti da je najmanji utjecaj matriksa na uzorcima ribe, neovisno o analitičaru koji provodi analizu. Na Slici 28 može se uočiti da je utjecaj matriksa kod analize cefapirina podjednak za sve vrste matriksa. U analizi prvog analitičara odziv ribe je pod manjim utjecajem matriksa, što može biti razlog osjetljivost instrumenta tog dana analize. Cefapirin se kvantitativno metabolizira do desacetilcefapirina i octene kiseline u nekim homogeniziranim uzorcima mišića životinje, stoga je određena maksimalna dozvoljena količina sume desacetilcefapirina i cefapirina u uzorcima koja se prati (Becker i sur., 2004; Fagerquist i Lightfield, 2003).

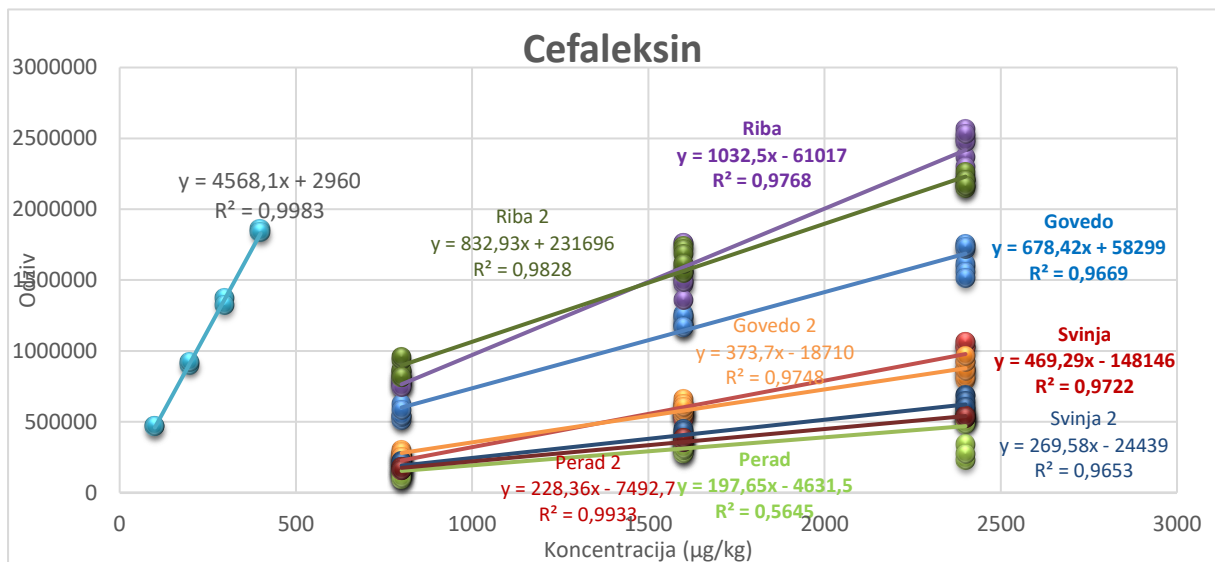


**Slika 29.** Kalibracijska krivulja cefkvinoma na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja



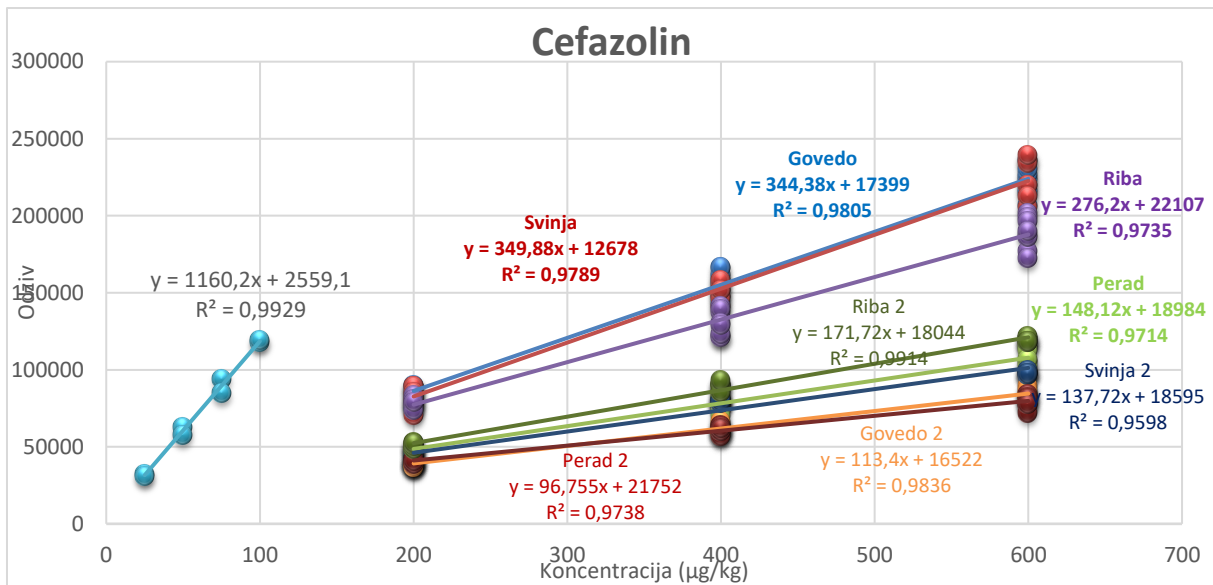
**Slika 30.** Kalibracijska krivulja cefaloniuma na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja

Velika odstupanja među matriks krivuljama različitih matriksa na kalibracijskoj krivulji cefaloniuma ne možemo povezati sa životinjskom vrstom, već predstavljaju rezultat trenutnog stanja osjetljivosti instrumenta i njegove čistoće (Slika 30).

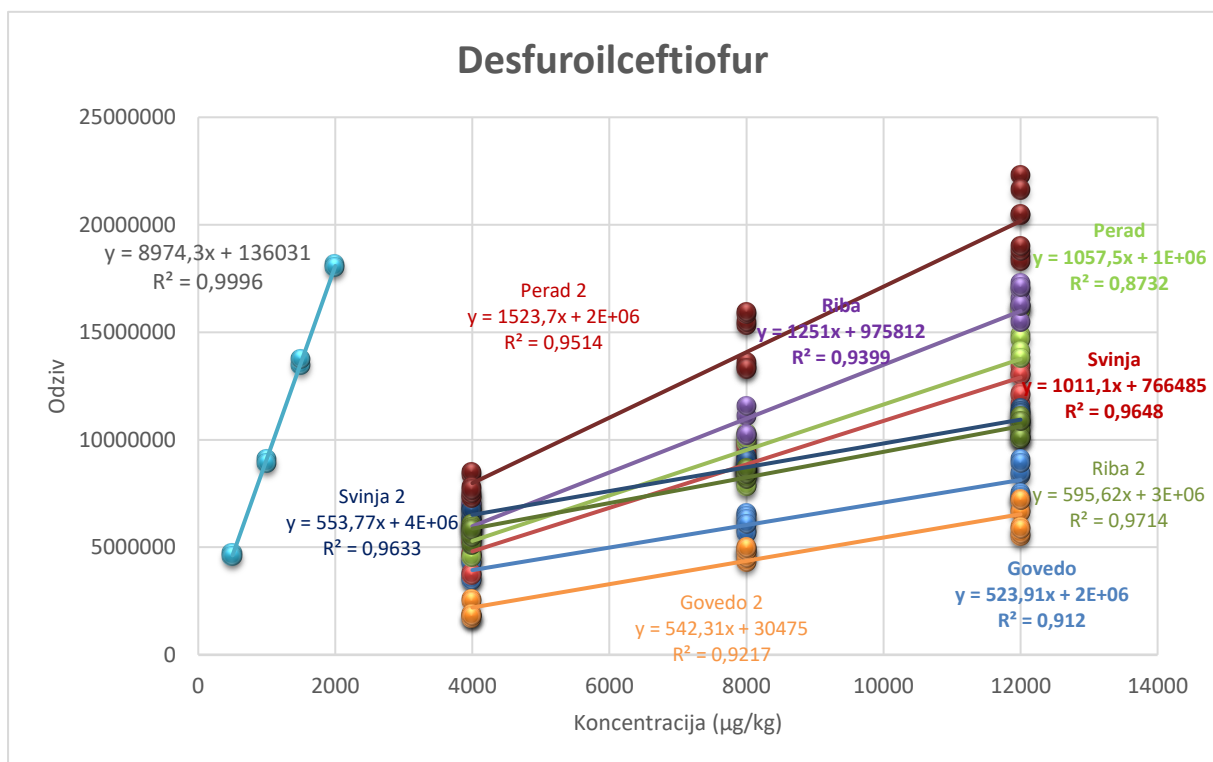


**Slika 31.** Kalibracijska krivulja cefaleksina na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja

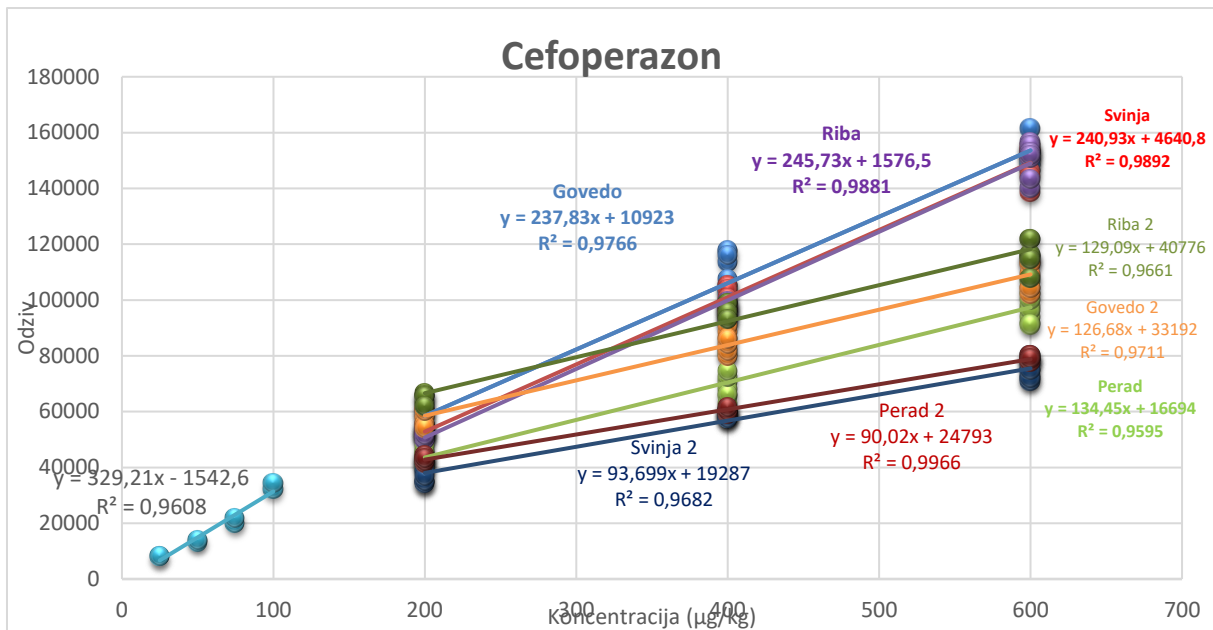




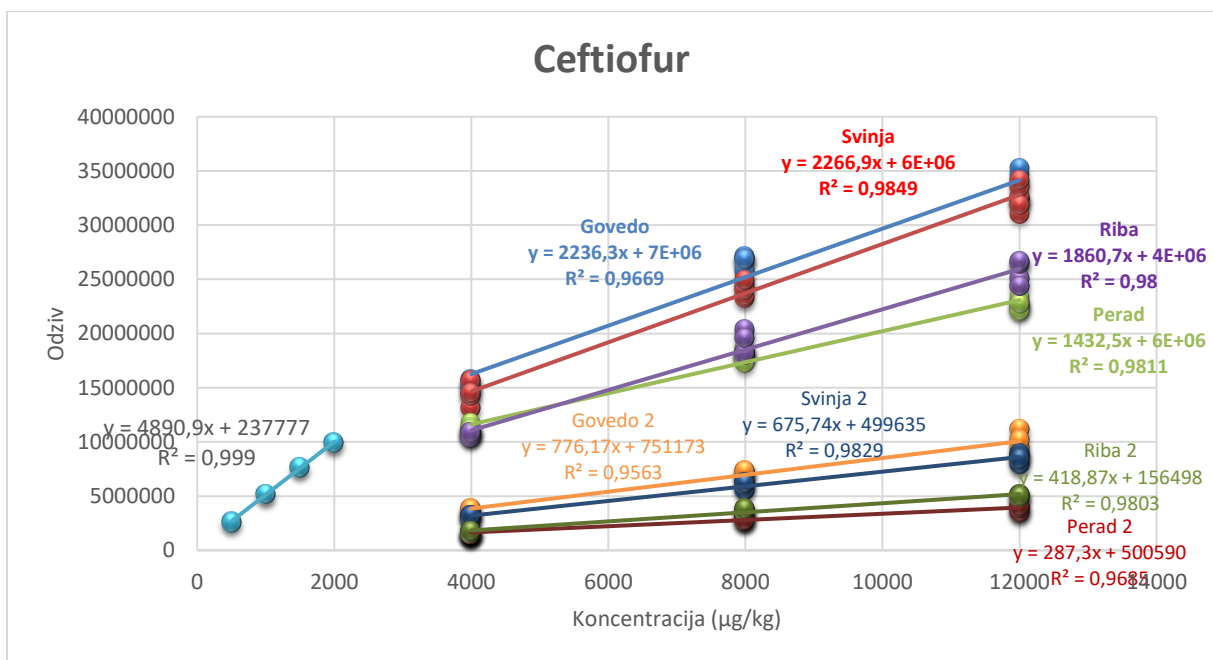
**Slika 32.** Kalibracijska krivulja cefazolina na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja



**Slika 33.** Kalibracijska krivulja desfuroilceftiofura na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja



**Slika 34.** Kalibracijska krivulja cefoperazona na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja



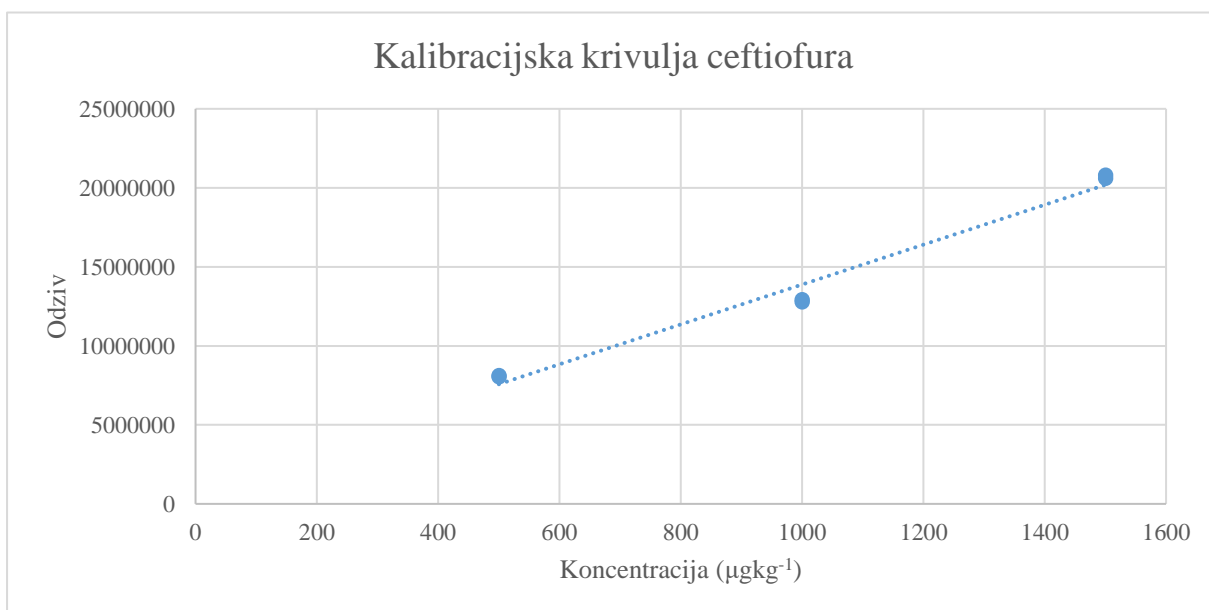
**Slika 35.** Kalibracijska krivulja ceftiofura na otapalu i matriksu (govedo, svinja, perad, riba) u dva ponavljanja

Odstupanje među krivuljama cefoperazona i ceftiofura izrazito ovise o analitičaru te o stanju instrumenta na dan analize; osjetljivosti te pozadini odziva zaostataka nečistoća koje mogu biti unesene preko mobilne faze. Odstupanje među vrstama moguće je uočiti u analizama svakog od analitičara.

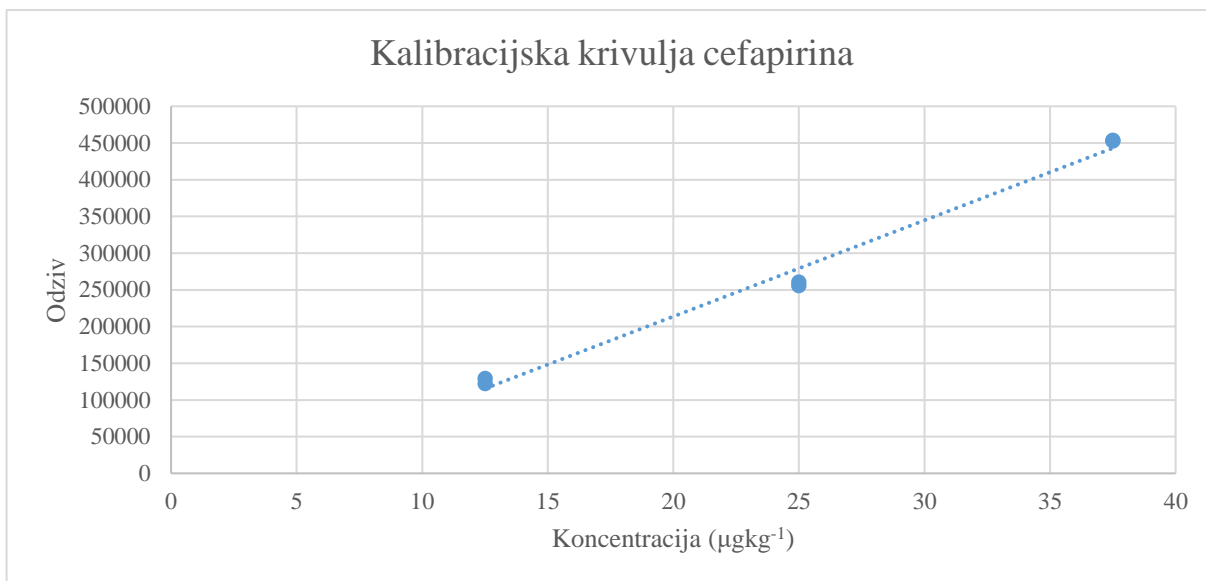
#### 4.5. Primjena metode

Metoda je uspješno razvijena i validirana te se može primijeniti kao rutinska metoda za određivanje rezidua antibiotika cefalosporina. Moguće ju je primijeniti za određivanje rezidua cefalosporina u četiri matriksa: mišiću peradi, goveda, ribe i svinje. Detaljno je ispitan utjecaj matriksa na odziv cefalosporina za četiri vrste mišićnog tkiva te su utvrđena značajna odstupanja matriks kalibracijske krivulje i standardne krivulje na otapalu. U redovnim analizama potrebno je analizirati kontrolne uzorke obogaćenih kontrolnih uzoraka mišića za sve vrste mišića koji se analiziraju. Ispitivanjem ponovljivosti i unutar laboratorijske reproducibilnosti utvrđeni su parametri sposobnosti dokazivanja ( $CC\beta$ ) i granične koncentracije određivanja ( $CC\alpha$ ) što omogućava provođenje precizne i točne analize uzoraka.

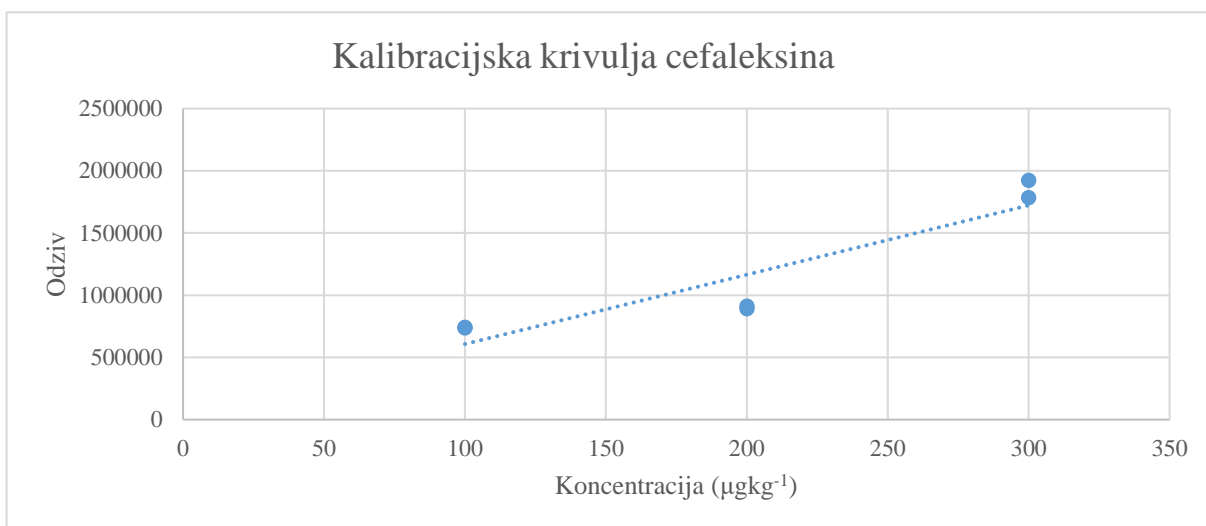
Ovo istraživanje doprinijelo je kvantitativnoj procjeni koncentracija cefalosporina u matriksima mišića različitih životinjskih vrsta. Metoda je primijenjena na Hrvatskom veterinarskom institutu u rutinskoj analizi 21-og uzorka u dva ponavljanja. Na kromatogramima slijepih uzoraka nisu pronađeni pikovi koji bi mogli interferirati s analitom, kao ni lažno pozitivni ni lažno negativni rezultati. Uzorci su testirani na prisustvo 9 cefalosporina. Na slici 36 je prikazana kalibracijska krivulja ceftiofura za matriks mišića goveda s dobrom linearnošću. Također, na navedenoj kalibracijskoj krivulji nije vidljiv značajan utjecaj matriksa, kao ni na kalibracijskoj krivulji cefapirina. Na kalibracijskoj krivulji cefaleksina (slika 38) vidljivo je odstupanje odziva analita zbog utjecaja različitih vrsta mišića.



**Slika 36.** Kalibracijska krivulja ceftiofura



**Slika 37.** Kalibracijska krivulja cefapirina



**Slika 38.** Kalibracijska krivulja cefaleksina

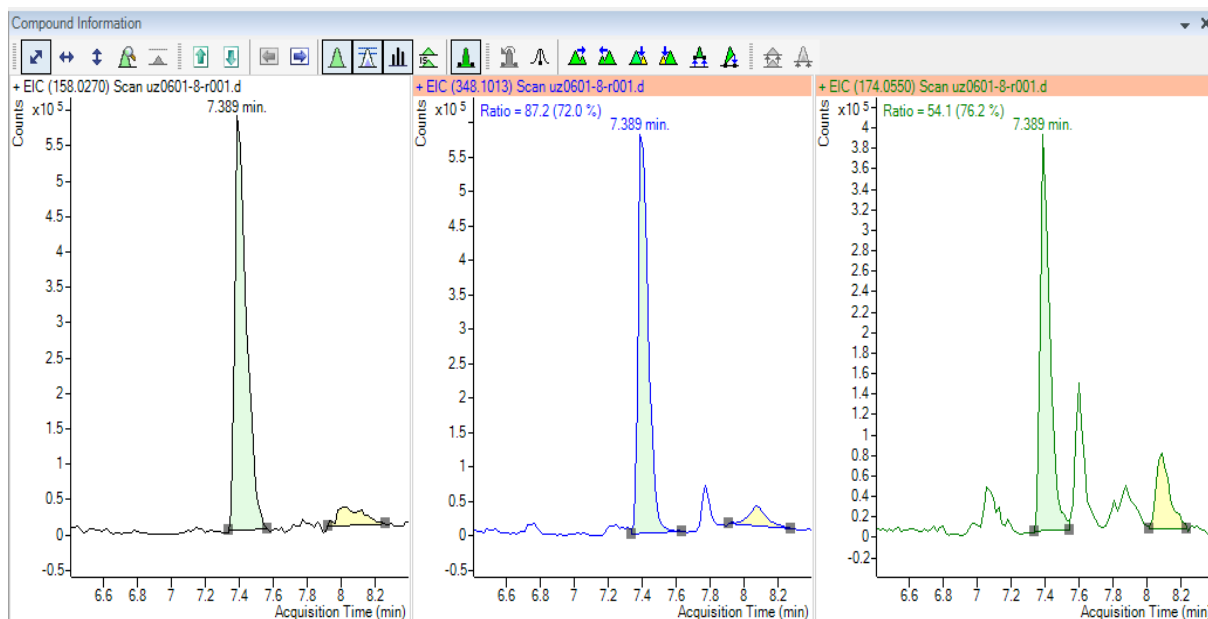
U tablici 7 prikazani su rezultati kalibracije za cefalosporin cefaleksin. Iz tablice je vidljiv raspon točnosti određivanja masa od -0,6 do 2,1 ppm-a. Raspon je manji od 10 ppm-a što upućuje na visoku točnost određivanja masa. Srednja vrijednost retencijskih vremena iznosi 7,4 te su u uzorcima pronađena sva tri karakteristična fragment iona kao i u standardu. Fragment ioni iznose  $m/z$   $118,5 \pm 5,3$ ,  $m/z$   $72,5 \pm 2,9$  te  $m/z$   $12,2 \pm 1,1$ . Kontrole za ostale vrste matriksa također su potvrđene pronalaskom sva tri karakteristična fragment iona.

**Tablica 7. Rezultati kalibracije cefaleksina**

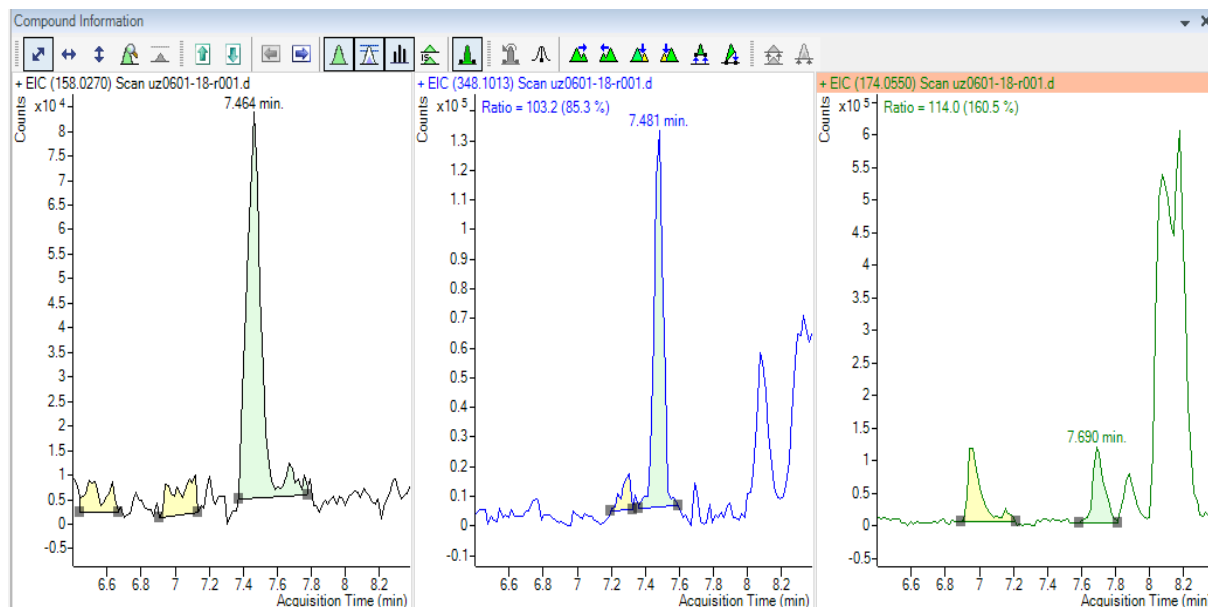
Kalibracija	Očekivana konc.	Konačna konc.	Točnost određivanja masa	Odziv	Retencijsko vrijeme	Fragment ion 1	Fragment ion 2	Fragment ion 3
GOVEDO KAL1	100	61,9	0,5	737170,2	7,4	120,2	74,8	11,0
GOVEDO KAL1	100	62,5	2,1	740701,4	7,4	123,9	74,1	11,9
GOVEDO KAL2	200	89,5	-0,6	891329,4	7,4	115,2	72,8	13,6
GOVEDO KAL2	200	93,3	-0,3	912362,3	7,4	121,7	71,1	13,5
GOVEDO KAL3	300	274,6	0,8	1922867,7	7,4	109,4	67,2	11,7
GOVEDO KAL3	300	249,8	0,8	1784697,2	7,4	120,8	74,6	11,3
srednja vrijednost			<b>raspon: -0,6-2,1</b>		<b>7,4</b>	<b>118,5</b>	<b>72,5</b>	<b>12,2</b>
standardna devijacija						<b>5,3</b>	<b>2,9</b>	<b>1,1</b>
rsd (%)						<b>4,5</b>	<b>4,0</b>	<b>9,3</b>
SVINJA (kontrola odziva)	200	411,7	0,9	2686982,4	7,4	87,2	54,1	8,4
SVINJA (kontrola odziva)	200	406,6	0,5	2658819,3	7,4	88,8	55,9	7,4
KOKOS (kontrola odziva)	200	17,2	-2,2	487793,4	7,4	175,6	52,7	11,8
KOKOS (kontrola odziva)	200	2,5	-3,6	406047,7	7,4	203,7	91,7	23,5
RIBA (kontrola odziva)	200	366,1	2,1	2432952,3	7,4	109,8	68,7	8,8
RIBA (kontrola odziva)	200	364,3	3,1	2422776,1	7,4	110,7	67,8	9,7

U tablici 8 prikazani su odziv, točnost određivanja masa te retencijsko vrijeme svakog analiziranog uzorka. Prilikom analize uzoraka prvo je potrebno promotriti točnost određivanja masa (engl. *Mass accuracy*) koja mora biti veća od 10 ppm-a ukoliko je uzorak negativan. Točnost određivanja masa manja od 10 ppm-a upućuje nas na moguće pozitivan uzorak. Da bi to potvrdili, potrebno je promotriti retencijsko vrijeme koje također mora odgovarati onom u standardu ukoliko se radi o pozitivnom uzorku ( $\pm 2,5\%$ ). Također, da bi uzorak proglasili pozitivnim, odziv mora biti visok i moraju biti prisutna sva tri karakteristična fragment iona s odgovarajućom točnošću određivanja masa. Iz tablice 8 je vidljivo da uzorci 4, 4a, 6, 6a, 7, 9, 9a, 15a, 18, 18a, 19, 19a, 20, 20a, 21 i 21a imaju točnost određivanja masa (engl. *Mass accuracy*) manju od 10 ppm-a. Kada smo to uočili, potrebno je bilo promotriti retencijska vremena i odziv. Uzorak koji u obje paralele ima visok odziv (465644,9 i 489078,2) i točnost

određivanja masa manju od 10 ppm-a je uzorak pod brojevima 9 i 9a. Daljnjom analizom vidljivo je nešto veće retencijsko vrijeme (7,5) dok je u standardu 7,4 te neodgovarajući fragment ioni. Navedeni uzorak promotren je i na kromatogramima (slike 39 i 40).



**Slika 39.** Kromatogram slijepog uzorka mišića svinje



**Slika 40.** Kromatogram uzorka broj 9

U uzorku broj 9 određena je molekula cefaleksina sa visokom točnošću određivanja masa (0,5 ppm-a) te uzorak pokazuje značajan odziv od 465 tisuća. Analizom je detektiran i jedan od produkt iona, ali točnost određivanja masa tog fragment iona nije odgovarajuća stoga se

uzorak smatra negativnim. Da bi spoj identificirali potrebno je imati barem dva karakteristična fragment iona na snimljenom spektru. Usporedbom kromatograma vidljiva je razlika u retencijskim vremenima koja za cefaleksin iznosi 7,4 min, a spoj detektiran u uzorku ima retencijsko vrijeme 7,5 min. UHPLC je vrlo precizna metoda, pa već pri neodgovarajućim retencijskim vremenima možemo zaključiti da je uzorak negativan. Kod ostalih navedenih uzoraka s točnosti određivanja mase manjom od 10 ppm-a, pratili su se odziv i retencijsko vrijeme. Pošto su oni neodgovarajući, zaključujemo da su uzorci negativni.

**Tablica 8.** Rezultati analize uzoraka za cefalosporin cefaleksin

Uzorak	Odziv	Točnost određivanja masa	Retencijsko vrijeme
1	276213,2	72,7	7,4
1a	74856,8	59,1	7,5
2	23259,2	-	7,4
2a	35388,7	-	7,4
3	76952,6	86,2	7,6
3a	128269,8	87,1	7,6
4	110569,5	0,4	7,5
4a	110896,0	1,8	7,5
5	31798,2	22,7	7,4
5a	34503,1	11,5	6,6
6	938863,8	4,3	7,5
6a	897242,6	5,8	7,5
7	32159,7	-20,5	7,4
7a	12998,9	97,5	7,2
8	20348,9	82,0	7,3
8a	21338,2	93,2	7,4
9	465644,9	0,5	7,5
9a	489078,2	0,1	7,5
10	78591,8	79,2	7,8
10a	90872,0	91,5	7,1
11	36512,4	13,2	7,4
11a	29115,2	35,7	7,4
12	-	-	-
12a	19498,3	93,6	7,4
13	28398,5	27,6	7,8
13a	32808,5	26,5	7,8
14	31804,0	81,7	7,3

**Tablica 8. (nastavak) Rezultati analize uzoraka za cefalosporin cefaleksin**

<b>14a</b>	60832,3	85,4	7,6
<b>15</b>	322651,7	14,6	7,4
<b>15a</b>	325483,6	3,8	7,5
<b>16</b>	37130,1	84,8	7,4
<b>16a</b>	60575,9	-	7,6
<b>17</b>	220638,1	91,4	7,3
<b>17a</b>	67212,8	87,0	7,7
<b>18</b>	308506,9	0,1	7,5
<b>18a</b>	308142,4	1,7	7,5
<b>19</b>	14884,3	-0,3	7,4
<b>19a</b>	31766,3	-25,3	7,6
<b>20</b>	406974,9	7,5	7,5
<b>20a</b>	401212,7	6,1	7,5
<b>21</b>	43977,5	4,1	7,5
<b>21a</b>	39876,3	-3,1	7,5

**Tablica 9. Rezultati kalibracije ceftiofura**

Kalibracija	Očekivana konc.	Konačna konc.	Točnost određivanja masa	Odziv	Retencijsko vrijeme	Fragment ion 1	Fragment ion 2
<b>GOVEDO KAL1</b>	500	569,9	-1,3	8050526,3	8,7	22,7	6,0
<b>GOVEDO KAL1</b>	500	575,9	-1,2	8125430,6	8,7	22,9	5,7
<b>GOVEDO KAL2</b>	1000	956,0	-1,5	12921719,5	8,7	22,5	6,0
<b>GOVEDO KAL2</b>	1000	944,5	-1,1	12776348,5	8,7	23,2	6,0
<b>GOVEDO KAL3</b>	1500	1565,1	-1,9	20605115,1	8,7	23,4	6,2
<b>GOVEDO KAL3</b>	1500	1580,7	-1,6	20802290,5	8,7	24,1	6,04
<b>srednja vrijednost</b>					<b>8,7</b>	<b>23,1</b>	<b>6,0</b>
<b>standardna devijacija</b>						<b>0,6</b>	<b>0,2</b>
<b>rsd (%)</b>						<b>2,5</b>	<b>2,5</b>
<b>SVINJA (kontrola odziva)</b>	1000	1044,9	-1,5	14042977,9	8,7	22,8	6,1
<b>SVINJA (kontrola odziva)</b>	1000	1041,6	-1,7	14001631,9	8,7	23,3	6,0
<b>KOKOS (kontrola odziva)</b>	1000	995,2	-1,4	13416130,5	8,7	22,9	5,9
<b>KOKOS (kontrola odziva)</b>	1000	988,6	-1,4	13332392,9	8,7	23,2	6,1
<b>RIBA (kontrola odziva)</b>	1000	854,0	-1,1	11634504,8	8,7	22,9	5,8
<b>RIBA (kontrola odziva)</b>	1000	883,5	-1,2	12007065,8	8,7	22,5	5,7



Tablica 9 prikazuje rezultate kalibracije ceftiofura na matriksu goveda. Raspon točnosti određivanja masa je od -1,8 do -1,1 ppm-a što upućuje na visoku točnost određivanja masa. Srednja vrijednost retencijskog vremena iznosi 8,7 min te su snimljena dva karakteristična fragmenta iona  $m/z$  23,1  $\pm$  0,6 te  $m/z$  6,0  $\pm$  0,2. Iz slike 36 vidljiva je dobra linearnost kalibracijske krivulje ceftiofura s minimalnim utjecajem matriksa.

**Tablica 10.** Rezultati analize uzoraka za cefalosporin ceftiofur

Uzorak	Odziv	Točnost određivanja masa	Retencijsko vrijeme
1	46035,2	60,2	8,7
1a	58832,1	68,5	8,7
2	14912,4	27,5	8,6
2a	20902,7	32,7	8,7
3	27142,8	10,2	8,6
3a	22356,0	27,7	8,5
4	16637,8	16,9	8,7
4a	20680,6	25,8	8,7
5	958,5	41,1	8,3
5a	18555,0	32,7	8,6
6	33715,8	31,4	8,6
6a	28180,6	23,2	8,7
7	14125,7	31,6	8,6
7a	19132,7	36,2	8,6
8	18987,3	89,4	8,7
8a	25615,2	84,4	8,7
9	14765,9	71,0	8,8
9a	11163,5	9,8	8,7
10	32731,5	10,1	8,5
10a	32673,4	40,9	8,5
11	45984,4	91,7	8,7
11a	39396,8	87,1	8,7
12	13461,2	51,5	8,7
12a	7631,7	71,3	8,7
13	8673,4	51,0	8,7
13a	3950,4	80,2	8,7
14	25883,3	-82,9	9,1
14a	8960,7	39,1	8,7
15	19994,4	37,9	8,6
15a	24826,3	38,6	8,5
16	14713,9	17,8	8,5

**Tablica 10. (nastavak) Rezultati analize uzoraka za cefalosporin ceftiofur**

<b>16a</b>	8518,0	17,4	8,6
<b>17</b>	7890,7	16,1	8,5
<b>17a</b>	7568,4	18,7	8,6
<b>18</b>	7093,8	31,8	8,6
<b>18a</b>	4594,1	27,5	8,5
<b>19</b>	18785,7	-3,8	8,7
<b>19a</b>	12216,3	90,2	8,7
<b>20</b>	20440,4	32,4	8,6
<b>20a</b>	26696,2	35,0	8,6
<b>21</b>	20657,9	87,7	8,7
<b>21a</b>	20360,6	85,8	8,7

Analizom tablice 10 vidljivo je da ni jedan uzorak nema točnost određivanja masa manju od 10 ppm-a u obje paralele. Također, u većini uzoraka retencijsko vrijeme ne odgovara te u snimljenim spektrima nisu pronađeni karakteristični fragment ioni pa zaključujem da su uzorci negativni.

Na jednak način analizirani su uzorci na prisutnost ostalih 7 cefalosporina (ukupno 9) te nije pronađen ni jedan pozitivan uzorak u redovnoj analizi.

## 5. ZAKLJUČCI

1. U ovom radu opisan je razvoj metode za identifikaciju rezidua antibiotika cefalosporina u mišićima goveda, svinje, peradi i ribe primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS).
2. Validirana metoda za određivanje cefalosporina u mišiću goveda, svinje, peradi i ribe visoke je specifičnosti, točnosti i preciznosti za orijentacijske i potvrdne postupke određivanja 9 najčešćih cefalosporina s graničnim masenim udjelima određivanja ( $CC\alpha$ ) ispod propisanih najvećih dopuštenih količina (NDK) cefalosporina u mišiću.
3. Validacija ukazuje na zadovoljavajuću linearnost metode, no prisutnost matriksa može utjecati na odziv analita i rezultirati drugačijim parametrima linearnosti. Da bi se minimizirao matriks efekt potrebno je pripremiti kalibracijske krivulje analita svakog pojedinog cefalosporina na otapalu i matriksu.
4. Metoda za određivanje cefalosporina u mišićima različitih životinjskih vrsta (govedo, svinja, perad, riba) zadovoljava kriterije o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata prema važećoj Uredbi komisije 2002/657/EZ.
5. Rezultati rutinske analize 21-og uzorka mišića u dvije paralele, nisu pokazali prisustvo antibiotika cefalosporina.
6. Ovo istraživanje doprinijelo je kvantitativnoj procjeni koncentracija cefalosporina u matriksima mišića različitih životinjskih vrsta

## 6. LITERATURA

Agilent Technologies (2012) Agilent 6500 Series Q-TOF LC/MS Techniques and Operation for Small Molecules. Course Number R1904A, USA.

Amorim, C.L., Moreira, I.S., Maia, A.S., Tiritan, M.E., Castro, P.M.L. (2013) Biodegradation of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin as single and mixed substrates by *Labrys portucalensis* F11. *Appl microbiol biot.* **98**, 3181–3190. doi: 10.1007/s00253-013-5333-8

Anumol, T., Lehotay, S.J., Stevens, J., Zweigenbaum, J. (2017) Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole–time-of-flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. *Anal Bioanal Chem.* **409** (10), 2639-2653. doi: 10.1007/s00216-017-0208-y

Becker, M., Zittlau, E., Petz, M. (2004) Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* **520**, 19–32. doi: 10.1016/j.aca.2004.04.022

Bernier, S.P., Surette, M.G. (2013) Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front Microbiol.* **4**. doi: 10.3389/fmicb.2013.00020

Bush, K., Bradford, P.A. (2016)  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **6** (8).

Caracciolo, A.B., Topp, E., Grenni, P. (2014) Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A Review. *J Pharmaceut Biomed.* **106**, 25-36. doi: 10.1016/j.jpba.2014.11.040

Carvalho, I.T., Santos, L. (2016) Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ Int.* **94**, 736-757. doi: 10.1016/j.envint.2016.06.025

Cazorla-Reyes, R., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Rodríguez Maresca, M.A., Martínez Vidal, J.L. (2014) Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed.* **89**, 203–212. doi: 10.1016/j.jpba.2013.11.004

Chafer-Pericas, C., Maquieira, A., Puchades, R. (2010) Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trend Anal Chem.* **29**, 1038-1049. doi: 10.1016/j.trac.2010.06.004

ChemSpider (2015) Royal Society of Chemistry, <<http://www.chemspider.com/Search.aspx>> Pristupljeno 10. lipnja 2018.

Chen, D., Yu, J., Tao, Y., Pan, Y., Xie, S., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Wang, Y., Liu, Z., Yuan, Z. (2016) Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* **1017-1018**, 82-88. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.02.037

Chico, J., Rúbies, A., Centrich, F., Companyó, R., Prat, M.D., Granados, M. (2008) High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **1213**, 189–199. doi:10.1016/j.chroma.2008.10.023

Chong, X.M., Hu, C.Q. (2008) Compilation of an ESI-MS Library of b-Lactam Antibiotics for Rapid Identification of Drugs. *Chromatographia.* **68**, 759-766. doi: 10.1365/s10337-008-0790-4 0009-5893/08/11

Di Rocco, M., Moloney, M., O’Beirne, T., Earley, S., Berendsen, B., Furey, A., Danaher, M. (2017) Development and validation of a quantitative confirmatory method for 30 -lactam antibiotics in bovine muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **1500**, 121-135. doi: 10.1016/j.chroma.2017.04.022

Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol.* **46** (1), 11–21.

Fagerquist, C.K., Lightfield, A.R. (2003) Confirmatory analysis of b-lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 660–671. doi: 10.1002/rcm.964

Frenich, A.G, Romero-González, R., Gómez-Pérez, M.L., Martínez Vidal, J.L. (2011) Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **1218**, 4349–4356. doi:10.1016/j.chroma.2011.05.005

- Fu, Y., Zhao, C., Lu, X., Xu, G. (2017) Nontargeted screening of chemical contaminants and illegal additives in food based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* **96**, 89-98. doi: 10.1016/j.trac.2017.07.014
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S. (2005) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends Anal. Chem.* **24** (7), 704-733. doi: 10.1016/j.trac.2005.02.007
- Granelli, K., Elgerud, C., Lundström, A., Ohlsson, A., Sjöberg, P. (2009) Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim. Acta.* **637**, 87–91. doi: 10.1016/j.aca.2008.08.025
- Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A. B. (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem J.* **136**, 25–39. doi: 10.1016/j.microc.2017.02.006
- Guidi, L.R., Santos, F.A., Ribeiro, A.C.S.R., Fernandes, C., Silva, L.H.M., Gloria, M.B.A. (2017) Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Food Chem.* **15**, 1232-1238. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.094
- Henderson, W., McIndoe, J.S. (2005) Mass Spectrometry of inorganic, coordination and organometallic Compounds, 1. izd., John Wiley & Sons, New Jersey.
- Hermo, M.P., Gómez-Rodríguez, P., Barbosa, J., Barrón, D. (2013) Metabolomic assays of amoxicillin, cephapirin and ceftiofur in chicken muscle: Application to treated chicken samples by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed.* **85**, 169–178.
- Hong, Y.H. Xu, X.L., Li, W.Q., Xu, B.Z., Wu, H.Q., Cheng, Y., Chen, H., Zhangb, B.S., Zhang, F. (2017) A high-accuracy screening method of 44 cephalosporins in meat using liquid chromatography quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometry. *Anal. Methods.* **9**, 6534–6548. doi: 10.1039/c7ay01903c
- Hornish, R.E., Kotarski, S.F. (2002) Cephalosporins in Veterinary Medicine – Ceftiofur Use in Food Animals. *Curr Top Med Chem.* **2**, 717-731.
- Jank, L., Targa Martins, M., Bazzan Arsand, J., Magalhães Campos Motta, T., Corrêa Feijó, T., dos Santos Castilhos, T., Barcellos Hoff, R., Barreto, F., Mara Pizzolato, T. (2017) Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Multiclass Method for 46 Antibiotics Residues

in Milk and Meat: Development and Validation. *Food Anal. Methods*. **10**, 2152–2164. doi: 10.1007/s12161-016-0755-4

Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Widmer, M. (2007) Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC–TOF): A novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine. *Anal Chim Acta*. **586**, 13-21. doi: 10.1016/j.aca.2006.10.026

Kay, P., Blackwell, P.,A., Boxall, A.B.A. (2004) Fate of veterinary antibiotics in a macroporus tile drained clay soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 1136–1144.

Lees, P., Toutain, P.L. (2012) Pharmacokinetics, distribution, bioavailability, and relationship to antibiotic residues. U: Chemical analysis of antibiotic residues in food (Wang, J., MacNeil, J.D., Kay, J.F., ured.), 1.izd., John Wiley & Sons, New Jersey.

Liu, B., Li, Y., Zhang, X., Wang, J., Gao, M. (2014) Combined effects of chlortetracycline and dissolved organic matter extracted from pig manure on the functional diversity of soil microbial community. *Soil Biol Biochem*. **74**, 148-155. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.03.005

Makovec, S., Kos, B., Šušković, J., Bilandžić, N. (2014) Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. **9** (1-2), 7-16.

Msagati, T.A.M., Nindi, M.M. (2007) Determination of b-lactam residues in foodstuffs of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chem*. **100**, 836–844. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.021

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=27447, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/27447>>. Pristupljeno: 13. srpnja 2018.

Odluka komisije (2002) od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, 2002/657/EZ.

Patyra, E., Nebot, C., Gavilán, R.E., Cepeda, A., Kwiatek, K. (2017) Development and validation of multi-residue and multi-class method for antibacterial substances analysis in non-target feed by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam A*. **35**(3), 467-478. doi: 10.1080/19440049.2017.1414961

Perez-Burgos, R., Grzelak, E.M., Gokceci, G., Saurina, J., Barbosaa, J., Barróna, D. (2012) Quenchers methodologies as an alternative to solid phase extraction (SPE) for the

determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC–MS/MS. *J Chromatogr B*. **899**, 57–65. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.05.002.

Remane, D., Meyer, M.R., Wissenbach, D.K., Maurer, H.H. (2010) Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization or electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 3103–3108. doi: 10.1002/rcm.4736

Reygaert, W.C. (2011) ceftobiprole: An emerging Therapeutic Option for Resistant and complicated Infections. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*. **3**, 57–66. doi: 10.4137/CMT.S5032

Roose-Amsaleg, C., Laverman, A.M. (2015) Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. *Environ Sci Pollut Res*. **23**(5), 4000-12. doi: 10.1007/s11356-015-4943-3

Saito-Shida, S., Sakai, T., Nemoto, S., Akiyama, H. (2017) Quantitative analysis of veterinary drugs in bovine muscle and milk by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Addit Contam A*. **34**(7), 1153-1161. doi: 10.1080/19440049.2017.1333161

Shankar, B.P., Manjunatha Prabhu, B.H., Chandan, S., Ranjith, D., Shivakumar, V. (2010) Rapid Methods for detection of Veterinary Drug residues in Meat. *Veterinary World*. **3** (5), 241-246.

Solomon Kolanović, B., Bilandžić, N., Đokić, M., Varenina, I., Sedak, M. (2011) Mehanizam djelovanja, biosinteza i identifikacija beta-laktamskih antimikrobnih lijekova. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**(2), 65-75.

Šušković, J. (2015): predavanja iz modula “Tehnologija antibiotika”, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <<http://moodle.srce.hr/2014-2015/course/view.php?id=6181>>. Pristupljeno 18. lipnja 2018.

Unger., I.M., Goyne, K.W., Kennedy, A.C., Kremer, R.J., McLain, J.E.T., Williams, C.F. (2012) Antibiotic Effects on Microbial Community Characteristics in Soils under Conservation Management Practices. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **77**, 100–112. doi: 10.2136/sssaj2012.0099



Uredba Komisije (EU) (2010) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. godine o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla (SL L 15, 20. 1. 2010., sa svim izmjenama i dopunama).

Varenina, I. (2015) Raspodjela i eliminacija maduramicina u jajima nakon oralne primjene kod nesilica i razvoj LC/MS metode za određivanje maduramicina. Doktorska disertacija. Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Varenina, I., Bilandžić, N., Solomun Kolanović, B., Božić, Đ., Sedak, M., Đokić, M., Varga, I. (2016) Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in muscle, egg, milk and honey. *Food Addit Contam A*. **33**(4), 656-667. doi: 10.1080/19440049.2016.1152569

Wang, J., Fan, X., Liu, Y., Du, Z., Feng, Y., Jiab, L., Zhang, J. (2017) Extraction optimization of sixteen cephalosporins in milk by filtered solid phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*. **9**, 1282-1289. doi: 10.1039/c6ay03444f

Wegener, H.C. (2003) Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*. **6**, 439–445. doi: 10.1016/j.mib.2003.09.009

Xie, W.Y., Shen, Q., Zhao, F.J. (2018) Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *Eur J Soil Sci*. **69**, 181–195. doi: 10.1111/ejss.12494

Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima (2008) *Narodne novine* **84**, Zagreb.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Oguc

Ime i prezime studenta