

„One Health“ koncept u prevenciji pojave ostataka β -laktamskih antibiotika u mlijeku

Širić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:319900>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2020.

Ana Širić
1314/MB

**„ONE HEALTH“ KONCEPT U
PREVENCIJI POJAVE
OSTATAKA β -LAKTAMSKIH
ANTIBIOTIKA U MLIJEKU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ivane Varenine, znanstvene suradnice, i dr. sc. Nine Bilandžić, znanstvene savjetnice u trajnom zvanju, te pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos iz Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem 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 te stručnoj pomoći tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada.

Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i učinili ovaj period posebnim te pomogli da ovih 5 godina studiranja smatram najljepšim dijelom svoga života.

Posebno se zahvaljujem sestri i bratu, kao i Maji i Mati, zbog nesebičnog pomaganja i podrške te nećacima koji su me uveseljavali kad god je bilo teško.

Veliko hvala Nikoli na velikoj podršci, razumijevanju i strpljenju.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla i što sam postala, pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek bili tu, uz mene, u sretnim, ali i teškim trenucima i bez kojih ovo ništa ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

„ONE HEALTH“ KONCEPT U PREVENCIJI POJAVE OSTATAKA β -LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKA U MLIJEKU

Ana Širić, 1314/MB

Sažetak: Pretjerana uporaba antibiotika u terapijama te kao promotora rasta životinja na farmama uzrokovala je naglo širenje antibiotske rezistencije među mikroorganizmima. Također, javlja se problem ostataka antibiotika u životinjskoj hrani, koju konzumira čovjek, kao i u okolišu, gdje dolazi do zagađenja tla i vode. Za siguran život ljudi i životinja te očuvanje okoliša, nužan je „One Health“ koncept koji podrazumijeva sveobuhvatnu brigu za zdravlje ljudi, životinja i ekosustava te njegova primjena ima potencijala u globalnom poboljšanju uvjeta života na Zemlji. Cilj ovog rada je bio ispitivanje i identifikacija ostataka β -laktamskih antibiotika u uzorcima mlijeka, kao i razvoj metode i ispitivanje utjecaja metode za identifikaciju rezidua β -laktama u kravljem i kozjem mlijeku primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS). Primjenom ove metode utvrđen je jedan pozitivan uzorak na rezidue amoksicilina pri koncentraciji većoj od najveće dopuštene količine (NDK) utvrđene Uredbom Komisije (EU) (2010) br. 37/2010.

Cljučne riječi: „One Health“, ostaci β -laktamskih antibiotika, UHPLC/Q-TOF-MS

Rad sadrži: 50 stranica, 26 slika, 15 tablica, 26 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*

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ivana Varenina, znan. sur. i dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj. u trajnom zvanju

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. *Jagoda Šušković*
2. prof. dr. sc. *Blaženka Kos*
3. dr. sc. *Ivana Varenina*, znan. sur.
4. prof. dr. sc. *Ksenija Durgo* (zamjena)

Datum obrane: 18. prosinca 2020.

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

PREVENTING β -LACTAM ANTIBIOTIC RESIDUES APPEARANCE IN MILK BY „ONE HEALTH“ APPROACH

Ana Širić, 1314/MB

Abstract: Excessive usage of antibiotics in therapies and as animal growth factors on farms, cause sudden spread antibiotic resistance among microorganisms. Besides that, problem is not only with antibiotic residues in animal food which human consumes, but also in environment, where soil and water pollution occurs. „One Health“ approach is necessary for safe human and animal life and environmental protection and it includes human, animal and environment health care. Its appliance has potential in global improvement of life on Earth. The objective of this paper was to identify and quantify β -lactams residues in milk samples as well as to develop a method and to examine the effect of the method on β -lactam residues determination in goat's and cow's milk using ultra-high performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry (UHPLC/Q-TOF-MS) Using this method, one positive sample was found for amoxicillin residues at a concentration higher than the maximum residue level (MRL) prescribed by the European Commission Regulation (EC) no. 37/2010.

Keywords: „One Health“ approach, β -lactam antibiotics residues, UHPLC/Q-TOF-MS

Thesis contains: 50 pages, 26 figures, 15 tables, 26 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

Technical support and assistance: PhD Ivana Varenina, research associate, and PhD Nina Bilandžić, scientific adviser having a tenure

Reviewers:

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Ivana Varenina*, Research Associate
4. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 18 December 2020

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. „One Health“ koncept i ostaci antibiotika u hrani	2
2.1.1. Menadžment dinamike mliječnih proizvoda „One Health“ koncepta	4
2.2. β -laktamski antibiotici	8
2.2.1. Mehanizam djelovanja β -laktamskih antibiotika	9
2.2.2. Biosinteza β -laktama	11
2.2.3. Mehanizmi bakterijske rezistencije na β -laktamske antibiotike	12
2.2.4. Primjena β -laktamskih antibiotika	14
2.3. Određivanje rezidua antibiotika suvremenim analitičkim metodama	14
2.3.1. UHPLC/Q-TOF-MS	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijali	17
3.2. Kemikalije	17
3.3. Standardi	17
3.4. Oprema i materijali	17
3.5. Priprema kontrolnih otopina materijala, otopala i standardnih otopina	18
3.5.1. Postupanje s uzorcima	18
3.5.2. Priprema otopina	18
3.5.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova	18
3.5.4. Priprema matriks kalibracijske krivulje	19
3.6. Kontrolni uzorak stanja instrumenta	19
3.6.1. Postupak pročišćavanja uzorka	20
3.7. Mjerenje na LC-Q-TOF uređaju	20
3.8. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata	23
3.8.1. Izražavanje rezultata i korekcija iskorištenja	23
3.9. Validacija metode za određivanje β -laktamskih antibiotika	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Optimizacija	25
4.2. Kontrola TOF detektora	25
4.3. Razvoj i validacija metode za određivanje β -laktamskih antibiotika	27
4.3.1. Specifičnost	27
4.3.2. Preciznost metode	28
4.3.3. Primjenjivost	33
4.3.4. Određivanje utjecaja matriksa	34
4.4. Primjena metode na realnim uzorcima, analiza mlijeka na prisutnost β -laktamskih antibiotika	37
4.4.1. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata	38
4.5. Primjena metode	45
5. ZAKLJUČCI	46

6. LITERATURA	47
----------------------------	----

1. UVOD

Koegzistencija čovjeka s ostalim živim svijetom i okolišem je podjednako povoljna i nepovoljna. Za preživljenje ljudske populacije, životinje i biljke su neophodne, no u tom odnosu potrebno je zadovoljiti potrebe svih strana, kao i okoliša, kako bi taj odnos bio održiv i siguran za sve. Zbog brojnih slabosti u tim odnosima, javlja se potreba za razvoj koncepta koji objedinjuje potrebe i djeluje holistički, osigurava zdrav život čovjeka, životinja, biljaka i siguran okoliš. Takav koncept se naziva „One Health“ koncept i predstavlja kompleksnu filozofiju koja se razvila kao odgovor na pojavu brojnih zoonoza, grupe zaraznih bolesti koje su zajedničke ljudima i nekim životinjama, a prelaze s životinja na ljude i obrnuto (Bhatia, 2019).

Kako bi se smanjila oboljenja kod životinja, te istovremeno povećao njihov prirast, u uzgoju se često koriste antibiotici. Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprečavajući im rast ili uništavajući ih. Problem s korištenjem antibiotika u uzgoju životinja, javlja se zbog mogućih ostataka antibiotika u hrani, što predstavlja opasnost za buduće potrošače.

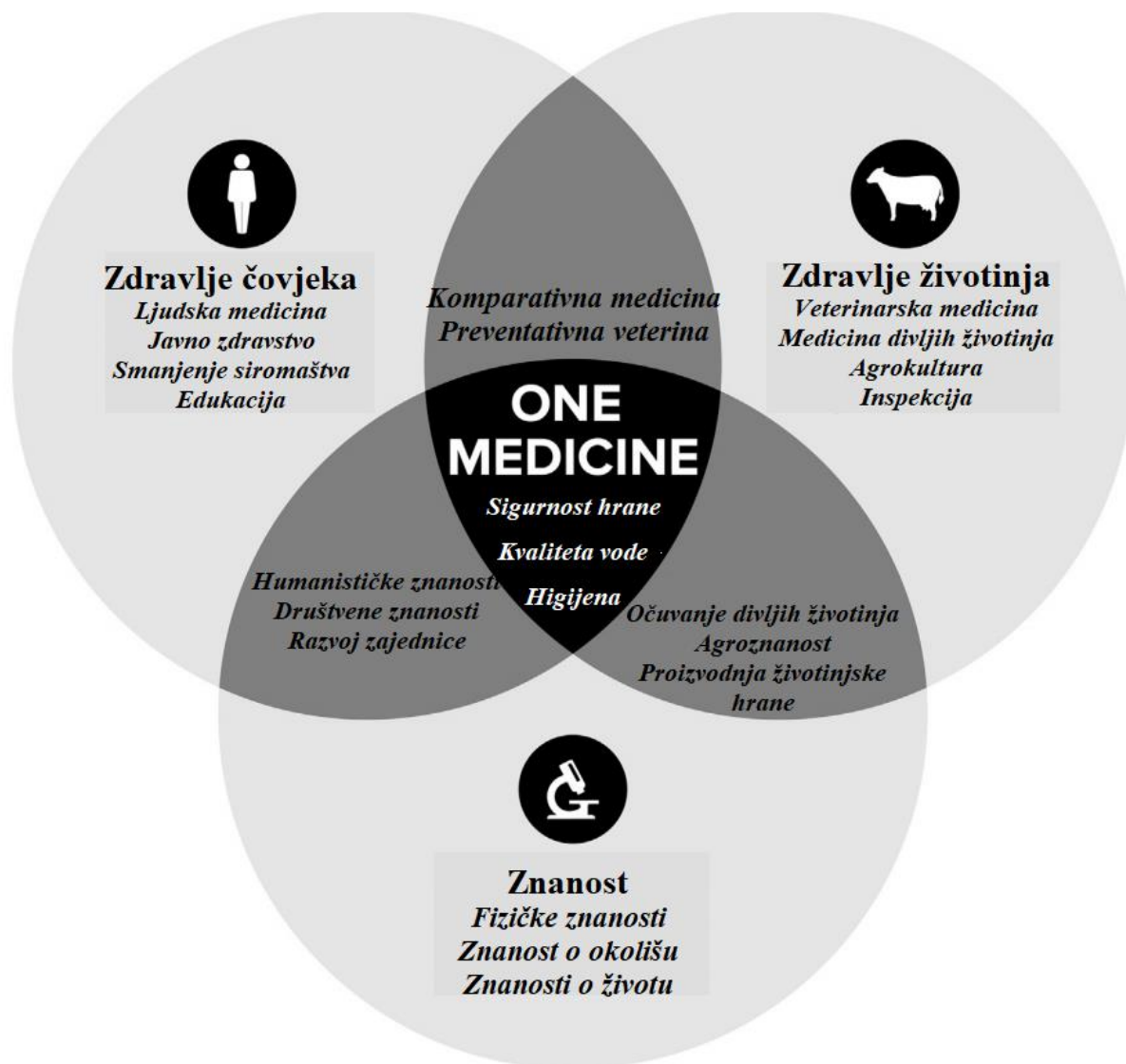
Cilj ovog rada je bio provesti analizu rezidua β -laktamskih antibiotika u kravljem i kozjem mlijeku i razviti metodu za određivanje rezidua β -laktamskih antibiotika primjenom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa visoke rezolucije (UHPLC/Q-TOF-MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. „One Health“ koncept i ostaci antibiotika u hrani

Preteča naziva „One Health“ bio je „One Medicine“, koji je predložio Dr. Calvin Schwabe u svojoj knjizi „Veterinarska medicina i ljudsko zdravlje“. Schwabe se smatra ocem moderne epidemiologije i začetnikom „One Health“ koncepta (Garcia i sur., 2019). „One Health“ koncept obuhvaća zdravlje ljudi, životinja i ekosustava te njegova primjena ima potencijal u poboljšanju globalnog zdravlja i života (Slika 1). Cilj je osigurati zdravu okolinu i pravilno tretiranje životinja u proizvodnji hrane, a posebice mliječnih proizvoda, osigurati ispravnu hranu krajnjem potrošaču te smanjiti zagađenje okoliša, voda te smanjiti opasne kemikalije u sveukupnoj proizvodnji. Također, cilj koncepta je zadovoljiti zdravlje pojedinca, populacije i ekosustava. Ovaj pristup nam pokazuje važnost interdisciplinarnosti u svrhu očuvanja čitavog živog svijeta. „One Health“ naziv je prvi put upotrijebljen nakon širenja teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS) početkom 2003. godine, nakon kojeg je uslijedilo širenje ptičje gripe (H5N1). Pojava SARS-a je pokazala kako se nepoznati patogen može iznenada pojaviti, ugroziti zdravlje čitave ljudske populacije, društvo i ekonomiju. Osim toga, ovakva pandemija je ukazala na potrebu brzih reakcija i pripremljenosti. Rješavanje problema izazvanih patogenima nevidljivim ljudskom oku, moguće je jedino uz globalnu kooperaciju te pokazuje nužnost postojanja „One Health“ koncepta (Mackenzie i Jeggo, 2019). Brz razvoj ovakvih bolesti upućuje na važnost primjene koncepta te potrebu za njegovom kompleksnošću i sveobuhvatnošću, kako bi se moglo spriječiti, smanjiti i tretirati bolesti.

Mliječni proizvodi, koji su pasterizirani i ispravno procesirani, u razvijenim zemljama, imaju visok stupanj sigurnosti konzumacije. Problem se javlja pri konzumaciji nepasteriziranog mlijeka u razvijenim zemljama gdje postoji manjak regulacije mliječne industrije. U takvoj situaciji, mliječni proizvodi su „vektori“ za transmisiju zoonoza te mogu sadržavati ostatke antibiotika. Razvoj genomike doveo je do detaljnijeg istraživanja mikrobioma, simbiotske poveznice bioaktivnih komponenti ljudskog i kravljeg mlijeka te važne sastavnice, *Bifidobacterium*. Novorođenčad i djeca, čija je mikrobiota kolonizirana s *Bifidobacterium*, imaju razvijenu intestinalnu mikrobiotu s zaštitnom ulogom. Djeca kojoj su prepisani antibiotici ili su izloženi ostacima antibiotika, izloženi su većem riziku poremećaja temeljnih bakterija gastrointestinalnog trakta jer su *Bifidobacterium* izrazito osjetljive na antibiotike (Garcia i sur., 2019).



Slika 1. „One Medicine“ koncept koju je predložio Dr. Calvin Schwabe (Garcia i sur., 2019)

Pretjerano korištenje antibiotika kod ljudi, životinja i u industrijskim sektorima, dovelo je do stvaranja globalne prijetnje zdravstvu i sveopćem zdravlju, zbog organizama otpornih na antibiotike. Rezultat toga je i ostatak antibiotika u hrani, što dodatno povećava potrebu za primjenom „One Health“ koncepta na samom početku proizvodnje hrane, posebice mliječnih proizvoda. Jedan od načina provođenja koncepta je „HACCP“, engleska kratica za „Hazard Analysis and Critical Control Point“. Možemo ga definirati kao proces analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka koji obuhvaća cijeli niz preventivnih postupaka s krajnjim ciljem – osiguravanje zdravstveno ispravne hrane. Baziran je na znanstvenim činjenicama. Najjednostavnije se može reći da je HACCP zapravo sustav samokontrole, ali i sustav kvalitete kojim osiguravamo neškodljivost hrane. Jedna od takvih kontrola je i kontrola ostataka β -laktamskih antibiotika, kako bi se prevenirala pojava ostataka antibiotika u količini većoj od NDK (najveće dopuštene količine). Utvrđivanje antibiotskih ostataka u mlijeku i mliječnim

proizvodima je nužnost i cilj djelovanja „One Health“ koncepta u unaprjeđenju života, osiguravanju nutritivno bogate i sigurne hrane (Slika 2).

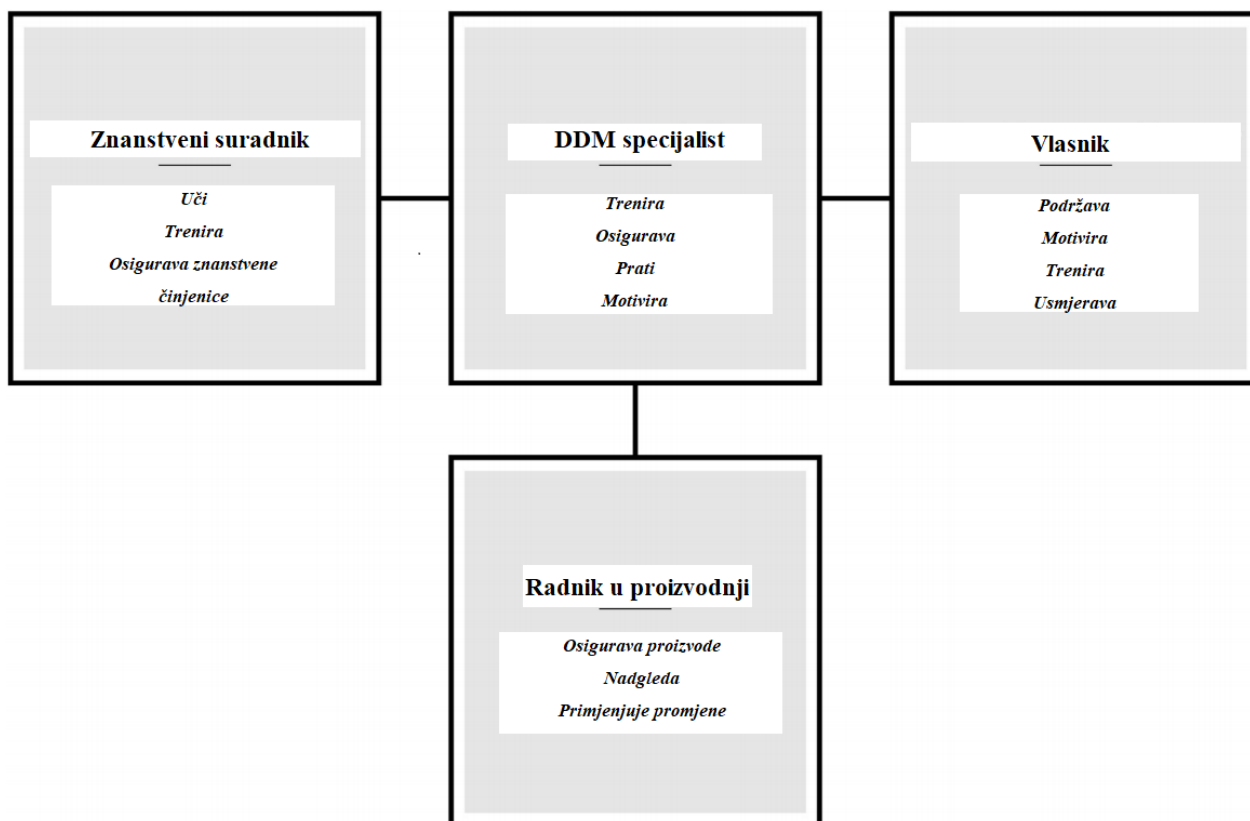
Intramamarni tretmani koriste se u prevenciji i tretiranju infekcija u suhostaju krava. Uporaba antibiotika tijekom tretmana dovodi pojave patogena rezistentnih na antibiotike (Garcia i sur., 2019.)



Slika 2. „One Health“ pristup u proizvodnji mliječnih proizvoda (Garcia i sur., 2019)

2.1.1. Menadžment dinamike mliječnih proizvoda „One Health“ koncepta

Menadžment dinamike mliječnih proizvoda ili „Dairy Dynamic Management (DDM) je pristup „One Health“ koncepta u proizvodnji mliječnih proizvoda, koji se bavi sigurnošću i kvalitetom mlijeka te pretpostavlja kako se sigurnost i kvaliteta mlijeka osiguravaju na farmi. Ovaj pristup je zasnovan na filozofiji „One Health“ koncepta i koristi se u rješavanju problema već na početku proizvodnje. Stručni tim čine znanstveni suradnici koji shvaćaju da sigurnost hrane započinje na farmi i opasnost bolesti koje se mogu prenijeti među životinjama, ljudima i okolišem (Slika 3). Ovaj pristup je nužan za povećanje globalne proizvodnje hrane, s istodobnim osiguravanjem sigurnih uvjeta, kao i proizvodnje nutritivno bogate hrane. (Garcia i sur., 2019).



Slika 3. Hijerarhija menadžmenta u proizvodnji mliječnih proizvoda (Garcia i sur., 2019)

Cjepiva, mikrobnih proizvoda, fitokemikalije, imunološki proizvodi i enzimi uklapaju se u ideju „One Health“ pristupa u proizvodnji mliječnih proizvoda kao alternativni oblici antibiotika u organskom uzgoju s ciljem prevencije bolesti korištenjem organskih i ekološki prihvatljivih proizvoda koji ne predstavljaju zdravstveni rizik ljudima, životinjama ili ekosustavu. „One Health“ filozofija u proizvodnji mliječnih proizvoda i menadžmenta odnosi se na čistu vodu, sigurnu hranu i higijenu putem efektivnog menadžmenta u uzgoju, kao što je menadžment dinamike mliječnih proizvoda (Garcia i sur., 2019).

2.1.2. Ostaci antibiotika u mlijeku i mliječnim proizvodima i „One Health“ koncept

Od njihovog otkrića, antibiotici se primarno koriste u liječenju i prevenciji humanih i animalnih bolesti. Osim njihovog terapijskog djelovanja, sposobnost poboljšanja rasta i produktivnosti hrane, dovela je do širenja i korištenja antibiotika kao stočnih dodataka. Približno 80% životinja uključenih u proizvodnju hrane se tretira s veterinarskim lijekovima u određenom dijelu ili tijekom cijelog njihovog života (Bacanli i Başaran, 2019). Svake se godine $63,1511 \pm 1560$ tona antibiotika koristi u uzgoju životinja i proizvodnji hrane diljem svijeta. Globalna

upotreba antimikrobnih lijekova kod životinja je dvostruko veća od ljudske upotrebe (Sachi i sur., 2019). Po puštanju antibiotika u okoliš, većina je otporna i biološki aktivna, što dovodi do daljnjih komplikacija u njihovoj uporabi. Ostaci antibiotika u hrani mogu imati štetne učinke na ljude, uzrokujući oštećenja organskih sustava, dovodeći i do smrtnih posljedica. Određeni štetni učinci ostataka antibiotika, kao što su alergijske reakcije, nepravilna funkcija probavnog sustava i kronični toksični efekti su dokazani kao rezultat izloženosti antibioticima u niskim koncentracijama (Chen i sur., 2019).

Ostaci ili rezidui su farmakološki aktivne supstance, zaostale u hrani animalnog podrijetla, nakon uporabe veterinarsko-medicinskih proizvoda. Prema Uredbi 470/2009 Europske Komisije: „rezidue farmakološki djelatnih tvari” su sve farmakološki djelatne tvari, izražene u mg kg^{-1} ili $\mu\text{g kg}^{-1}$ na težinu svježeg uzorka, bilo da su to djelatne tvari, pomoćne tvari ili su proizvod razgradnje i njihovi metaboliti koji ostaju u hrani dobivenoj od životinja. Nakon ulaska u tijelo životinje, većina lijekova se metabolizira u svrhu detoksikacije i ekskrecije. U pravilu, većina proizvoda i njihovih metabolita se izlučuje putem urina i u manjoj količini putem fecesa. Međutim, nakon izlučivanja, određena količina lijeka može ostati u mlijeku, jajima i mesu određeno vrijeme kao ostatak antibiotika (Sachi i sur., 2019).

Neosporna je činjenica da su antibiotici već zagadili ljudsku zalihu hrane, uključujući proizvode dobivene u stočarstvu i peradarstvu (meso, jaja, mlijeko), akvakulturi te voće i povrće (Kirchhelle, 2018). Najmanje su tri izvora odgovorna za ostatke antibiotika u stočarskim i peradarskim proizvodima (meso, mlijeko i jaja):

1. Direktna injekcija za potrebe prevencije i liječenja bolesti
2. Izravan unos iz krmnog bilja i vode, u kojim se antibiotici koriste kao aditivi za rast
3. Mjesni kontakt, intramamarna ili intrateurinska infuzija

Antibiotska rezistencija u mlijeku je sve veći razlog za brigu i većina ostataka antibiotika u mlijeku rezultat je svakodnevnog korištenja lijekova za tretiranje mastitisa goveda te hrane kontaminirane ostacima antibiotika. Komercijalna proizvodnja etanola predstavlja sektor u kojem se gomilaju ostaci antibiotika, ali ujedno i zanemaren sektor. Etanol koji se proizvodi od kukuruza, proizvodi se fermentacijom koristeći kulture kvasca. Kulture kvasca su često kontaminirane s bakterijama mliječne kiseline. Kako bi se prevenirala proliferacija bakterijskih kontaminanata, brojni proizvođači etanola koriste ogromne količine antibiotika u fermentacijskom procesu. Ovo dovodi do dodatnog problema, jer se ostaci kukuruza iz

proizvodnje prodaju kao životinjska hrana proizvođačima mesne i mliječne industrije. Iako nesrodna industrija mliječnoj, komercijalna proizvodnja etanola je jedan od puteva ulaska ostataka antibiotika na farmu te tako utječe na sigurnost hrane, ljudskog i životinjskog zdravlja i pokazuje potrebu za „One Health“ pristupu u animalnoj proizvodnji (Garcia i sur., 2019).

Antibiotički ostatci najčešće su prisutne inhibitorne tvari u mlijeku koje nepovoljno djeluju na ljudsko zdravlje, tehnološka svojstva i kakvoću mlijeka i mliječnih proizvoda. Ostatci antibiotika u mlijeku mogu biti posljedica liječenja od bilo koje bolesti, oni su kod muznih životinja najčešće prisutni u mlijeku nakon liječenja upale vimena. Također, koncentracija izlučenih antibiotičkih ostataka u mlijeku ovisi o individualnim osobinama grla, zdravstvenom stanju vimena, količini i vrsti primljenih antibiotika, količini proizvedenog mlijeka i načinu unošenja antibiotika u organizam (Samaržija i Antunac, 2002). Zemlje u razvoju su u većem riziku od razvijenih, za pojavu rezidua u mlijeku. Razlog tome su nedovoljno opskrbljene ustanove, kao i nedostatak ispravnog sustava za praćenje rezidua u mlijeku, što dovodi do većeg rizika za ostatke antibiotika u mlijeku (Sachi i sur., 2019).

Uredba 470/2009 Europske komisije propisuje postupak za utvrđivanje najveće dopuštene količine (NDK) ostatka veterinarsko-medicinskog proizvoda u hrani animalnog podrijetla. Najveća dopuštena količina je količina lijeka ili kemikalije koja nije štetna i odobrena je od strane regulatornih tijela na ili u hrani, namijenjena je za konzumaciju ljudi i životinja i izražava se u mg kg^{-1} ili $\mu\text{g kg}^{-1}$ svježe sirovine. Uredbom 37/2010 su propisane farmakološki djelatne tvari i klasificirane u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla. Mlijeko, kao i drugi mliječni proizvodi, koji sadrže ostatke antibiotika iznad NDK, uzrokuju ozbiljne zdravstvene probleme potrošača. U tablici 1 su prikazane najveće dopuštene količine (NDK) ostataka antibiotika u mlijeku, određene Uredbom 37/2010.

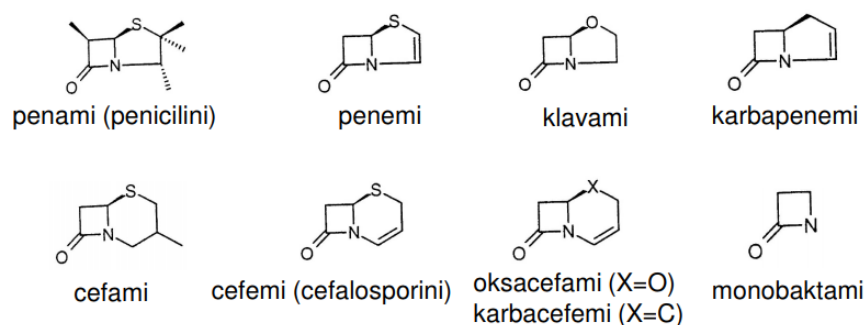
Tablica 1. Najveće dopuštene količine ostataka β -laktamskih antibiotika u mlijeku (Uredba 37/2010)

Farmakološki djelatna tvar (β -laktamski antibiotik)	NDK	Vrsta životinje	Farmakološki djelatna tvar (β -laktamski antibiotik)	NDK	Vrsta životinje
Amoksicilin	4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Sve vrste životinja/ za proizvodnju hrane	Ceftiour	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Svi sisavci / za proizvodnju hrane
Ampicilin	4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Sve vrste životinja/ za proizvodnju hrane	Klavulanska kiselina	200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda
Benzilpenicilin	4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Sve vrste životinja/ za proizvodnju hrane	Kloksacilin	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Sve vrste životinja/ za proizvodnju hrane
Cefacetril	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda	Dikloksacilin	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Sve vrste životinja/ za proizvodnju hrane
Cefaleksin	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda	Nafcilin	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Sve vrste preživača
Cefalonij	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda	Oksacilin	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Sve vrste životinja/ za proizvodnju hrane
Cefapirin	60 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda	Fenoksimetilpenicilin	/	Nije primjenjiv
Cefazolin	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda, ovce i koze			
Cefaperazon	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda			
Cefkvinom	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Goveda			

2.2. β -laktamski antibiotici

Prema definiciji, antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprečavajući im rast ili uništavajući ih. Osim prirodnih, dobivenih mikrobnom biosintezom, postoje sintetski i polusintetski antibiotici odnosno kemijski spojevi nastali kemijskom modifikacijom, mikrobnom biosintezom proizvedenih antibiotika (Šušković, 2017).

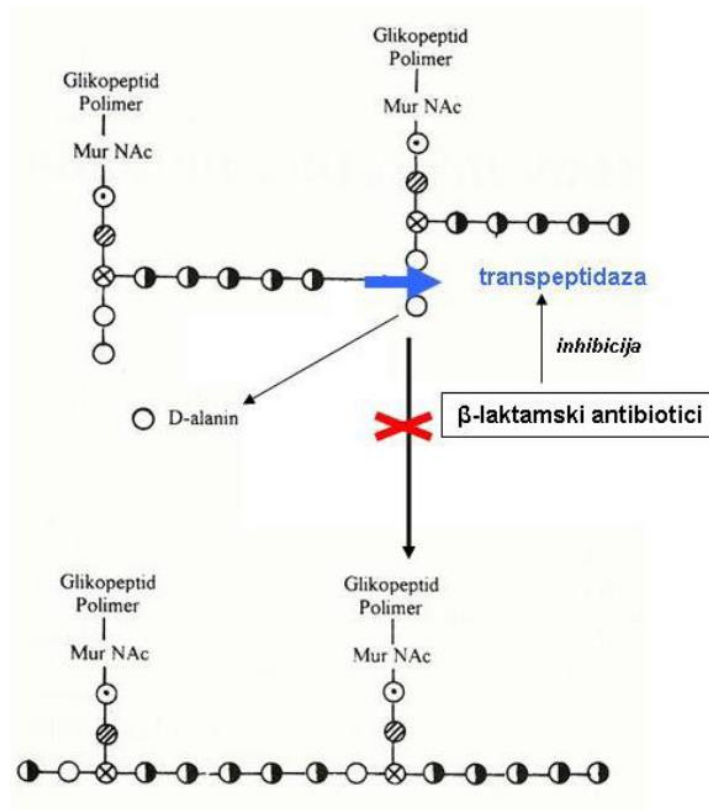
Najupotrebljavanija skupina antibiotika, β -laktami predstavljaju najrašireniju skupinu antimikrobnih lijekova koji se zbog vrlo snažnog antimikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti najčešće koriste u humanoj i veterinarskoj medicini prilikom tretiranja i liječenja bakterijskih infekcija. Ime su dobili po četveročlanom β -laktamskom prstenu koji je sastavni dio njihove kemijske strukture. Osim sličnosti u kemijskoj građi, β -laktamski antibiotici imaju isti mehanizam djelovanja te sličnosti u farmakološkim i imunološkim obilježjima (Šalković-Petrišić i Bradamante, 2014). U β -laktamske antibiotike ubrajaju se penicilini, cefalosporini, cefamicini, 7- α -formilaminocefalosporini, karbapenemi, oksapenami (klavami), nokardicini i monobaktami (Slika 4). Mnogi od ovih spojeva imaju slabu antibiotičku aktivnost, ali neki poput klavulanske kiseline (klavami) inhibitori β -laktamaze imaju terapijsku primjenu (Šušković, 2017). β -laktami su dobro podnošljivi, efektivni i često pripisivani lijekovi. Izrazito niske toksičnosti, pri čemu se toksičnost javlja kao alergijska reakcija pacijenata osjetljivih na peniciline i cefalosporine te minimalnom reaktivnošću uzrokovanom monobaktamima. (Bush i Bradford, 2016)



Slika 4. Osnovne strukture β -laktamskih antibiotika (Šušković, 2017.)

2.2.1. Mehanizam djelovanja β -laktamskih antibiotika

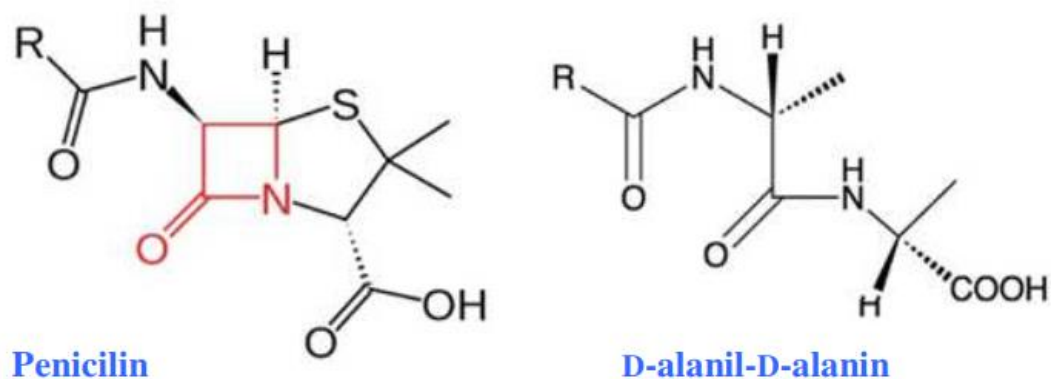
β -laktamski antibiotici imaju bakteriocidno djelovanje i mehanizam njihovog djelovanja se temelji na inhibiciji biosinteze bakterijske stanične stijenke (Slika 5).



Slika 5. Inhibicija sinteze peptidoglikana iz stanične stijenke bakterija pomoću β -laktamskih antibiotika (Šalković-Petričušić i Bradamante, 2014)

Gram-pozitivne i gram-negativne bakterije u svojoj građi imaju sloj umreženih polimera peptidoglikanskih lanaca. Peptidoglikanski sloj čini staničnu stijenku koji obavija citoplazmatsku membranu bakterijske stanice te osigurava čvrstoću, sprječava lizu stanice pri visokom osmotskom tlaku i daje stanici oblik. Peptidoglikani, kojih nema u stanicama životinjskog i humanog podrijetla, su građeni od polisaharida, u kojima se izmjenjuju N-acetilglukozamin i N-acetilmuraminska kiselina, i pentapeptid koji se pričvršćuje za N-acetilmuraminsku kiselinu, a završava D-alanil–D-alanin aminokiselinskim ostatcima. Nastajanje peptidoglikana čini niz nekoliko reakcija, koje kataliziraju dvije transpeptidaze, peptidoglikan transpeptidazu i D-alanin karboksipeptidazu. Nakon što su se vezali za specifične proteinske receptore bakterija (penicillin binding proteins, PBP), β -laktamski antibiotici inhibiraju transpeptidacijski enzim koji poprečno povezuje peptidne lance pričvršćene na peptidoglikansku okosnicu te inaktiviraju inhibitore enzima autolize u staničnoj stijenci, što dovodi do raspadanja bakterije (Solomon Kolanović i sur., 2011). β -laktamski antibiotici su strukturni analozi D-alanil–D-alanin formacije (Slika 6) i kovalentno se vežu za aktivno mjesto PBP-a, inhibirajući time reakciju transpeptidacije u posljednjoj fazi nastajanja

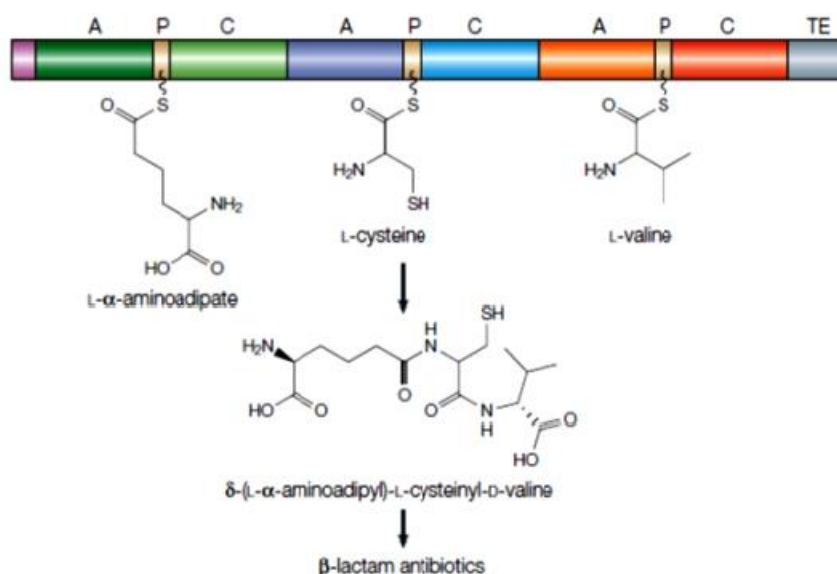
stanične stijenke. Postoji nekoliko vrsta PBP-a koje se razlikuju po afinitetu vezanja β -laktamskih antibiotika te po svojim dodatnim ulogama, osiguravanju štapičastog oblika bakterije, sprečavanju lize i formiranju septuma. β -laktamski antibiotici istovremeno inaktiviraju više različitih vrsta PBP-a i djeluju u staničnom ciklusu selektivno na fazu aktivnog rasta i sinteze stanične stijenke te dodatno aktivacijom autolitičkih enzima. Mikroorganizmi koji nemaju staničnu stijenku (npr. *Mycoplasma*) ili zbog metaboličke neaktivnosti ne sintetiziraju peptidoglikane, nisu osjetljivi na β -laktamske antibiotike (Šalković-Petričušić i Bradamante, 2014).



Slika 6. Sličnost steričkih struktura penicilina i D-alanil-D-alanina (Zeng i Lin, 2013.)

2.2.2. Biosinteza β -laktama

Klasični β -laktamski antibiotici (penicilini i cefalosporini) su izolirani iz sojeva različitih funga (plijesni). Iako se dugo smatralo da prokarioti ne mogu sintetizirati ove strukture, danas se zna da aktinomiceti sintetiziraju penicilin N, cefalosporin C i cefamicine (7-metoksi cefalosporini) pa čak i neke gram-negativne zemljišne bakterije sintetiziraju molekule nekih cefalosporina. Prva dva koraka biosinteze penicilina i cefalosporin su identična. Svi prirodni penicilini i cefalosporini koje proizvode eukariotski ili prokariotski mikroorganizmi se sintetiziraju iz tri aminokiseline: L- α -aminoadipinske kiseline (L- α -AAA), L-cisteina i L-valina. Prva reakcija biosintetskog puta je povezivanje L- α - aminoadipinske kiseline, L-cisteina i L-valina u tripeptid L- δ -aminoadipoil-L-cisteinil-D-valin. Reakciju katalizira multifunkcionalni enzim, δ -(L- α -aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valin sintetaza, ACV sintetaza (Slika 7).



Slika 7. ACV sintetaza i prvi korak u biosintezi β -laktama (Šušković, 2017.)

2.2.3. Mehanizmi bakterijske rezistencije na β -laktamske antibiotike

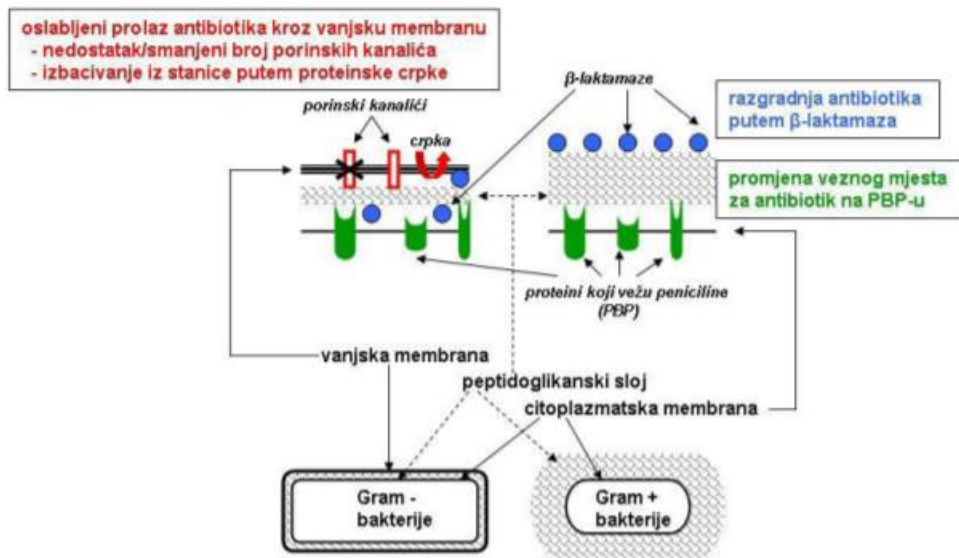
Mikrobiološka rezistencija na antibiotike (antimikrobna rezistencija, AMR) u današnje vrijeme predstavlja ozbiljnu prijetnju javnom zdravlju zbog izrazitog povećanja broja multirezistentnih bakterija (Roca i sur., 2015). Samo 4 godine nakon početka primjene penicilina izolirane su penicilin-rezistentne bakterije, što je pokazalo razvoj moguć bakterijske rezistencije u kratkom periodu. Neki pacijenti ostaju bez terapijskih mogućnosti s obzirom da su neke bakterije rezistentne na sve antibiotike. Razlog tome je uzimanje antibiotika prečesto, na što bakterije razvijaju otpornost i izbjegavaju načine na koje antibiotici djeluju (Martinez, 2014). Glavni rastući problem je antibiotska rezistencija bakterijskih sojeva vrsta: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Salmonella* i *Clostridium difficile* (Šušković, 2018).

Četiri su mehanizma bakterijske rezistencije na β -laktamske antibiotike:

- 1) Inaktivacija antibiotika putem bakterijskih enzima β -laktamaza koje cijepaju β -laktamski prsten, dovode do brze hidrolize te gubitka strukturnog integriteta molekule antibiotika, a time i njegove antibakterijske aktivnosti. β -laktamaze se razlikuju i prema svojoj specifičnosti za inaktivaciju pojedinih vrsta β -laktamskih

antibiotika, pa one sa specifičnom aktivnosti nazivamo penicilinazama, cefalosporinazama ili karbapenemazama (Slika 8).

- 2) Gram-negativne bakterije koje ne luče β -laktamaze mogu bit rezistentne zbog nemogućnosti ili smanjenog prolaza antibiotika kroz vanjsku nepropusnu membranu bakterijske stanice koja se nalazi s vanjske strane stanične stijenke (a nema je u gram-pozitivnih bakterija). β -laktamski antibiotici prolaze ovu vanjsku membranu kroz porinske kanaliće u membrani, čije odsustvo ili smanjeni broj može značajno smanjiti ulaz β -laktamskih antibiotika i dolazak na mjesto njihovog djelovanja (PBP) u gram-negativnih bakterija. Ampicilin, amoksisicilin i većina cefalosporina brzo prolazi kroz porinske kanaliće *E. coli* (brže nego penicilin G).
- 3) Rezistencija se može pojaviti zbog brzog izbacivanja β -laktamskog antibiotika natrag kroz vanjsku membranu putem membranske proteinske crpke. To je naročito značajno kod *Pseudomonas aeruginosa*, te kod *E. coli* i *Neisseria gonorrhoeae*, posebno ako je kombinirano s drugim mehanizmima rezistencije (nedostatak porina, razgradnja putem β -laktamaza) koji zajedno bitno smanjuju količinu antibiotika dostupnu za vezanje na PBP-ove.
- 4) Rezistencija može nastati kad je zbog strukturnih promjene PBP-a smanjen afiniteta PBP-a za vezanje β -laktamskih antibiotika, što može biti posljedica mutacije gena za PBP (penicilin-rezistentni pneumokoki, *Neisseria spp.*) ili prisutnosti PBP-a velike molekularne mase koji imaju izuzetno mali afinitet za vezanje ovih antibiotika (meticilin-rezistentni stafilokoki, *Streptococcus pneumoniae*). Zbog slabog afiniteta ovakvi PBP-i ne vežu β -laktamske antibiotike, osim u slučaju visokih koncentracija antibiotika koje se obično ne postižu uobičajenom kliničkom primjenom.



Slika 8. Mehanizmi rezistencije na peniciline i cefalosporine (Šalković-Petričušić i Bradamante, 2014.)

2.2.4. Primjena β -laktamskih antibiotika

Penicilini svoju primjenu često pronalaze u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima. Penicilini s užim spektrom djelovanja, kao što su penicilin G i V, imaju dobro djelovanje na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Penicilini s širim spektrom djelovanja (ampicilin, amoksicilin), djeluju dodatno na gram-negativne bakterije na koje penicilin G ne djeluje (npr. *Salmonella*, *Shigella*, *Haemophilus*, *E. coli*), kao i na gram-pozitivne (npr. enterokoki). Ampicilin i amoksicilin se primjenjuju u liječenju infekcija gornjeg respiratornog trakta, urinarnog trakta te akutnog bakterijskog meningitisa. Cefalosporini djeluju na *E. Coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis*. Često se koriste u liječenju kožnih infekcija uzrokovanih streptokokima i *Staphylococcus aureus*. Izrazito djelotvorni protiv gram negativnih i gram-pozitivnih bakterija uključujući *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* i *Alcaligenes faecalis*. Prema *Pseudomonas aeruginosa* pokazuju slabu aktivnost (Solomon-Kolanović i sur., 2011).

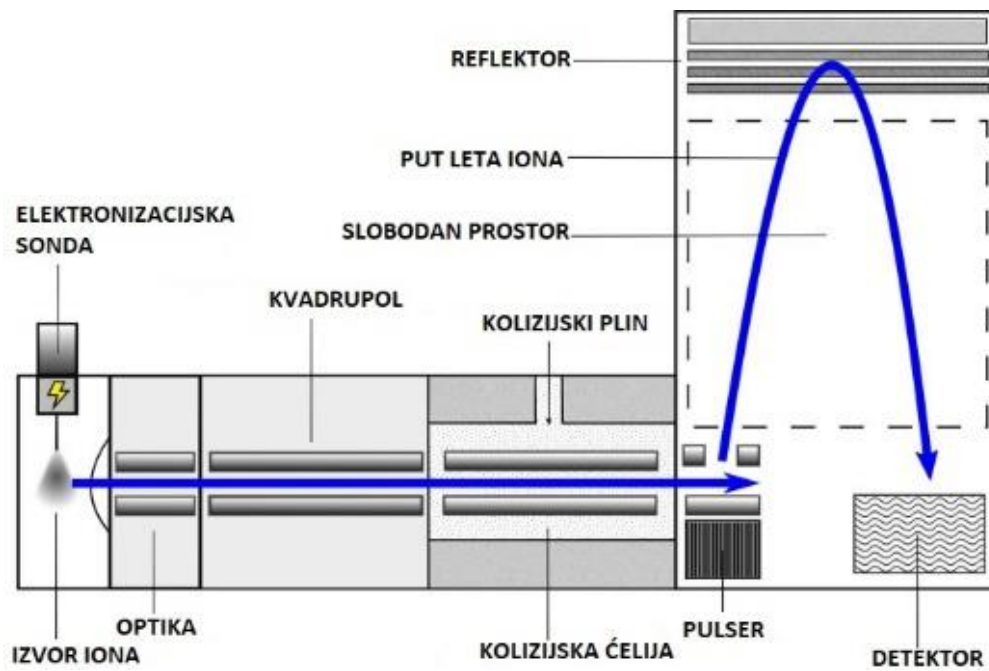
2.3. Određivanje rezidua antibiotika suvremenim analitičkim metodama

Prema *Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*, analitičke metode za određivanje rezidua antibiotika mogu se podijeliti na orijentacijske (engl. *screening methods*) i potvrdne metode (engl. *confirmatory methods*). Ispitivanje započinje primjenom orijentacijskih

metoda te ukoliko se javi sumnja na pozitivan rezultat, slijedi daljnja analiza potvrdnim metodama. Većinu antibiotika je moguće analizirati potvrdnim metodama zasnovanim na tekućinskoj kromatografiji (LC). Tekućinska kromatografija povezana sa spektrometrijom masa je zamjenila većinu analitičkih metoda za kvantifikaciju i identifikaciju rezidua antibiotika zbog njene visoke specifičnosti i osjetljivosti (Kos. 2017, Fejzuli i sur. 2018). U ovom radu opisan je razvoj metode za određivanje rezidua antibiotika ultradjelotvornom tekućinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS).

2.3.1. UHPLC/Q-TOF-MS

Tekućinska kromatografija je metoda za analizu analita razdvajanjem ciljanog analita na kromatografskoj koloni i detekciju istog analita. Ova analitička tehnika koja se koristi za separaciju otopljenih tvari, lako se spreže s spektrometrom masa. Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su izvorom iona (engl. *Ion source*) koji ima višestruku ulogu: otparavanje tekućine, ionizacija neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator. Nakon ionizacije analita dolazi do razdvajanja iona različitog omjera mase i naboja (m/z) u kvadrupolu masenog spektrometra. Kvadrupol se sastoji od četiri paralelne šipke kroz koje se primjenjuje određena istosmjerna struja i napon o kojima ovisi prolazak iona s određenim m/z nabojem. Nakon propuštanja prekursor iona kroz kvadrupole dolazi do fragmentacije koja se provodi u kolizijskoj ćeliji. Kolizijsku ćeliju predstavlja heksapol ispunjen inertnim plinom (dušikom) čije se molekule sudaraju s prekursor ionima te dolazi do fragmentacije. Tako stvoreni fragmenti ulaze u analizator s vremenom preleta (engl. *TOF- Time Of Flight*) (Slika 9). Princip rada analizatora vremena leta temelji se na pravilu da brzina iona ovisi o masi iona. Pri ulasku u analizator, ioni imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi; manji ioni veću brzinu, a veći ioni manju brzinu. Separacija iona vrši se u odnosu na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima (Cindrić i sur., 2009).



Slika 9. Shematski dijagram Q-TOF uređaja (Allen i McWhinney, 2019)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.Materijali

Materijale predstavljaju kravlje i kozje mlijeko, odmjereni u količini od 2 ml.

3.2.Kemikalije

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

3.3.Standardi

- Amoksicilin (Vetranal)
- Ampicilin (Vetranal)
- Cefaleksin (Vetranal)
- Cefalonij (Vetranal)
- Cefazolin (Sigma)
- Cefapirin (Sigma)
- Cefaperazon (Vetranal)
- Ceftiofur (Vetranal)
- Cefkvinom (Vetranal)
- Desacetilcefapirin (Toronto Research Chemicals)
- Desfuroilceftiofur (Toronto Research Chemicals)
- Dikloksacilin (Vetranal)
- Kloksacilin (Vetranal)
- Nafcilin (Vetranal)
- Oksacilin (Vetranal)
- Penicilin G (Sigma)

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^{-1} i max 15000 o min^{-1}
- Sustav za otparavanje s dušikom
- Vortex homogenizator
- Epruvete za ultracentrifugu volumena do 2 mL (Eppendorf)
- HPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity
- *Time of flight* TOF analizator Q-TOF G6550A
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1x150 mm, Part No.186003540, Waters
- Predkolona: Acquity HSS T3 1.8 μM vanguard Pre-Col, Waters

3.5. Priprema kontrolnih otopina materijala, otapala i standardnih otopina

3.5.1. Postupanje s uzorcima

Uzorci doneseni u laboratorij na analizu, pohranjuju se u hladnjak na temperaturi 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 15 mL odmjeri se 2 mL mlijeka.

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 zatamnjenoj posudi
- 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 vrijednostima - najvećim dopuštenim količinama (eng. maximum residue levels – MRLs) za svaki pojedini analit.

Standardne radne otopine pripremaju se ovisno o njihovim MRL koje su propisane Uredbom komisije (EZ) br. 37/2010. MRL ampicilina, amoksisicilina i penicilina G iznosi 4 ng mL⁻¹, kloksacilina, dikloksacilina, nafcilina i oksacilina 30 ng mL⁻¹, cefaleksina, ceftiofura i desfuroilceftiofura 100 ng mL⁻¹, cefalonija i cekvinoma 20 ng mL⁻¹, cefazolina i cefoperazona 50 ng mL⁻¹, cefapirina i desacetilpirina 30 ng mL⁻¹.

3.5.4. Priprema matriks kalibracijske krivulje

U svakoj analizi priprema se matriks kalibracijska krivulja na način da se određeno mlijeko (kravlje i kozje) obogati na 3 koncentracijske razine ovisno o postavljenom MRL-u ili najnižoj koncentraciji ispitanoj u validacijskom postupku. Ovisno o tome koja životinjska vrsta se pretražuje, priprema se i dodatni materijal te vrste kao kontrola iskorištenja. Za pripremu matriks kalibracijske krivulje u tri točke potrebno je dodati standard u količini od 50, 100 i 150 µL (1/2 MRL, MRL, 1,5 MRL) na 2 mL uzorka slijepe probe. Dodaje se mješavina standarda RS-Q-TOF-MIX-MLIJEKO-S2A prema tablici 2.

Tablica 2. Matriks kalibracija na mlijeku (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014)

MATRIKS		M1	M2	M3	Slijepa
		(µL)	(µL)	(µL)	proba (µL)
MLIJEKO	2	50	100	150	-
ml	RS-Q-TOF-MIX- MLIJEKO-S2A				

3.6. Kontrolni uzorak stanja instrumenta

Kontrolni uzorak osjetljivosti instrumenta predstavlja mješavina standardne radne otopine razrijeđena u omjeru 1:20.

Kontrolni uzorak slijepe probe

Kontrolni uzorak slijepe probe (Blank) predstavlja mješavinu metanola i vode (500 µL +500 µL)

Negativni kontrolni uzorak otapala

Kontrolni uzorak slijepa probe otapala (Solvent blank) predstavlja uzorak proveden kroz ekstrakciju bez prisustva matriksa.

Negativni kontrolni uzorak matriksa

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

Obogaćeni kontrolni uzorak – analiza mišićnog tkiva i mlijeka

Negativni uzorci mlijeka obogaćuju se mješavinom standardnih otopina u skladu s MRL vrijednostima (1/2 MRL, MRL i 1,5 MRL).

3.6.1. Postupak pročišćavanja uzorka

- Pipetirati 2 mL mlijeka u plastičnu epruvetu od 50 mL
- U uzorke dodati 100 μ L mješavine internog standarda MIX-Q-TOF-ISTD2
- U uzorke za matriks kalibracijsku krivulju dodati otopinu mješavine standarda pri različitim koncentracijama (Tablica 2.)
- Dodati 8 mL acetonitrila (hladnog, čuvanog na temp 2-8 °C) te SNAŽNO vorteksirati kratko pojedinačno, dok se matriks ne rasprši u otapalu
- 10 min vorteksirati na vrtložnoj mješalici
- Centrifugirati na 4600 o min^{-1} na 4°C
- Prebaciti supernatant u epruvetu od 15 mL
- Dodati 50 μ L DMSO u svaku epruvetu sa supernatantom
- Upariti do cca 50 μ L pri 40 °C pomoću dušika
- Otopiti uzorak na način da se doda 150 μ L ultračiste vode, vorteksirati i 5 min u UZV kupelj
- Prebaciti uzorke u pasteuve epruvetice od 2 mL i centrifugirati na 15000 o/min pri 4°C, 5 minuta
- Prebaciti bistri supernatant u viala (ne filtrirati) (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014)

3.7. Mjerenje na LC-Q-TOF uređaju

Za provođenje analize koristi se HPLC uređaj 1290 Infinity udružen s masenim analizatorom s vremenom preleta (MS Q-TOF) *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 načinu rada. Instrumentalna analiza se obavlja na instrumentu oznake I-2 117, koristeći *MassHunter Acquisition software* prema metodi: *AM02-Q-TOF-rev00-AllIon-POZ.m*.

Tablica 3. Parametri detekcije antibiotika pomoću Q-TOF spektrometra

Antibiotici	RT min	Prekursor	Formula	Ionizacija
<i>Penicilini</i>				
Amoksisilin	6,2	366,1118	C16H19N3O5S	Pozitivna
Ampicilin	7,5	350,1163	C16H19N3O4S	Pozitivna
Kloksicilin	9,9	436,0728	C19H18ClN3O5S	Pozitivna
Dikloksacilin	10,1	470,0339	C19H17Cl2N3O5S	Pozitivna
Nafcilin	10,0	415,1322	C21H22N2O5S	Pozitivna
Oksacilin	9,8	402,1118	C19H19N3O5S	Pozitivna
Penicilin G	9,4	335,1054	C16H18N2O4S	Pozitivna
<i>Cefalosporini</i>				
Cefaleks	7,3	348,1013	C16H17N3O4S	Pozitivna
Cefalonijum	7,0	459,0782	C20H18N4O5S2	Pozitivna
Cefazolin	7,6	455,0373	C14H14N8O4S3	Pozitivna
Cefoperazon	7,8	646,1497	C25H27N9O8S2	Pozitivna
Cefkvinom	6,8	529,1323	C23H24N6O5S2	Pozitivna
Ceftiofur	8,6	524,0363	C19H17N5O7S3	Pozitivna
Cefapirin	6,5	424,0631	C17H17N3O6S2	Pozitivna
Desacetilcefapirin	5,6	382,0526	C15H15N3O5S2	Pozitivna
Desfuroilceftiofur	7,7	430,0308	C14H15N5O5S3	Pozitivna

Tablica 4. Kromatografski uvjeti

Kromatografska kolona	Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m, 2,1x150 mm
Predkolona	Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m, 2,1x5mm VanGuard Pre-Column
Protok	0,4 mL min ⁻¹
Temperatura odjeljka kolone	40°C
Sustav za uzorkovanje	Volumen injektiranja 10 μ L Temperatura 10 °C Injektiranje s ispiranjem igle 15 s (MeOH/ACN/PropOH 5: 2,5: 2,5)
Mobilna faza	Otopina A: 0,1 % mravlja kiselina Otopina B: MeOH LC-MS grade

Tablica 5. Uvjeti Q-TOF spektrometra

Način rada snimanja	Acquisition Mode MS1 u rasponu od m/z 50-1500
Stupanj skeniranja	4 spektra sec ⁻¹
Parametri instrumenta	Temperatura plina 150 °C Protok plina 18 l min ⁻¹ Nebulizacija 30 psig Temperatura plina (sheath) 400°C Protok plina (sheath) 12 l min ⁻¹ Funnel Exit DC 50 Funnel RF HP 150 Funnel RF LP 60
Segmenti skeniranja	Kolizijske energije 0; 10; 20; 40 eV
Parametri segmentima	po Napon kapilare Vcap 3500 V Napon mlaznice <i>Nozzle</i> 0 V <i>Fragmentor</i> 350 <i>Skimmer1</i> 45 <i>Octopole RFPeak</i> 750

Referentne mase (m/z)	pozitivni	negativni
	121,05087	112,98558
922,00979	1033,98811	
Nebulizacija ref otopine 13 psig		

3.8. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata

Potvrдна analiza supstancija provodi se u MS načinu rada Q-TOF masenog spektrometra, All Ion skeniranjem analita.

Prilikom kvantitativne procjene rezultata ukoliko ponovljivost i linearnost kontrolnih uzoraka nije odgovarajuća potrebno je napraviti Targeted MS/MS analizu

Potvrda analita prilikom potvrdne metode zasniva se na nekoliko uvjeta:

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

3.8.1. Izražavanje rezultata i korekcija iskorištenja

Koncentracija analita izražava se u ng g^{-1} ili $\mu\text{g kg}^{-1}$ koristeći 3 značajne decimale. Korekcija iskorištenja uračunata je u rezultat jer se kvantitativno određivanje vrši pomoću matriks kalibracijske krivulje te se koristi interni standard. 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 β -laktamskih antibiotika

Validaciju je potrebno provesti prema odluci komisije 2002/657/EC uz pomoć validacijskog programa InterVAL Plus Quo Data. U validaciju su uključeni različiti parametri obzirom na vrstu uzoraka koji će se analizirati, priprema sheme prema kojoj će se provesti validacija i

proračun validacijskih parametara te faktori koji bi mogli utjecati na ishod rutinskih analiza: životinjski matriks mlijeka te analitičar.

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 MRL vrijednosti, tj. na temelju C_0 vrijednosti za supstance bez utvrđenih graničnih koncentracija (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014).

Prema postavljenim zahtjevima, matriks mlijeka različitih vrsta potrebno je obogatiti na $\frac{1}{2}$ MRL, MRL i na 1,5 MRL za supstance s propisanim MRL, te na C_0 , $2C_0$ i $3C_0$ za supstance koje nemaju propisan MRL. Kod supstanci kod kojih je postavljen MRL kao suma dva ili više analita, matriks treba obogatiti na $\frac{1}{4}$ MRL, $\frac{1}{2}$ MRL i $\frac{3}{4}$ MRL-a. Svaku analizu potrebno je provesti na 3 koncentracijske razine. Kvantitativna procjena različitih životinjskih vrsta provodi se na temelju matriks kalibracijskih krivulja specifičnih za svaku od vrsta. Specifičnost se provjerava injektiranjem strukturno sličnih supstanci. Analite je moguće razlučiti prema njihovoj specifičnoj masi, fragmentaciji i ionskom odnosu te retencijskom vremenu. Injektiranjem različitih vrsta mlijeka (kozje i kravlje) potrebno je uočiti eventualne kromatografske pikove koji potječu od matriksa koji se mogu eluirati na retencijskom vremenu analita, te na taj način utjecati na integraciju pika analita (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014).

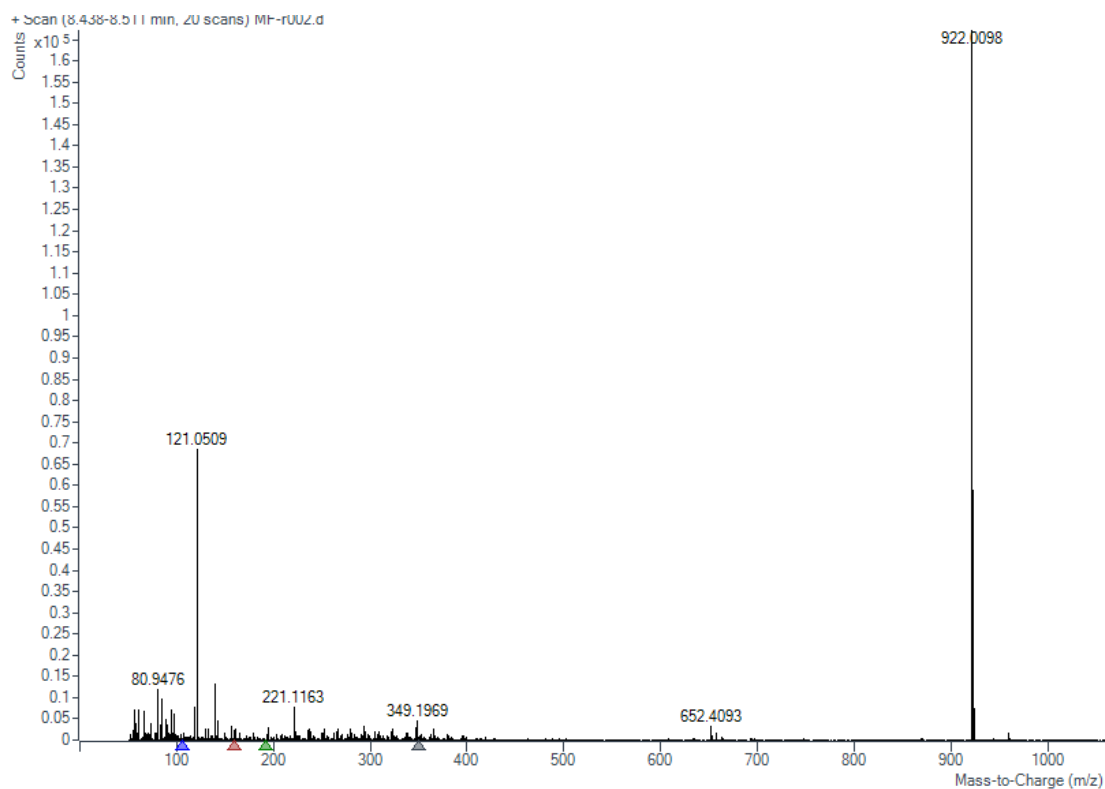
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija

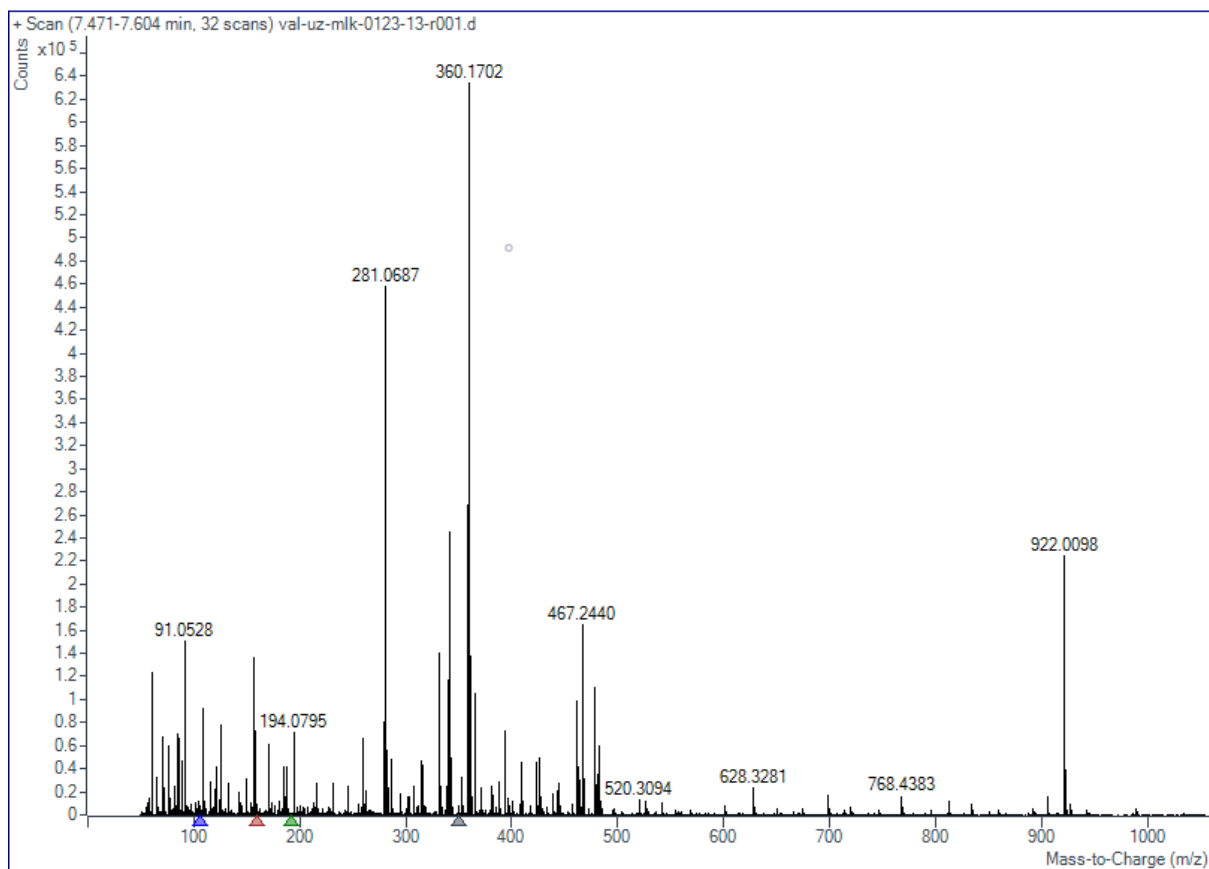
Prije samog validacijskog postupka instrument je optimiziran za svaki analit podešavanjem fragmentora, kolizijske energije, temperature plina u izvoru, protoka plina, tlaka u nebulizeru, voltaže kapilare i akceleracijske voltaže u kolizijskoj ćeliji. Kao adukt ioniziranih oblika analita u pozitivnom načinu rada bio je vodikov ion $[M+H]^+$. Injektirano je 2 μL pojedinačnih otopina β -laktamskih antibiotika direktnim injektiranjem analita u spektrometar masa. Snimanje spektra masa β -laktamskih antibiotika provedeno je pri različitim kolizijskim energijama: 0, 10, 20 i 40 eV. Svaki od spektara spremljen je u bazu podataka, gdje su navedeni podaci o ionskim tranzicijama te njihovim relativnim intenzitetima.

4.2. Kontrola TOF detektora

Za vrijeme svake kromatografske analize u izvor iona se injektiraju referentne mase (m/z 121,0509 i 922,0098) na osnovu čije snimljene m/z mase se detektiraju eventualna odstupanja od teoretske vrijednosti i time se vrši korekcija snimljene mase supstanci u nepoznatom uzorku. Maseni spektar obogaćenog i uzorka slijepe probe prikazani su na slikama 10 i 11 te prikazuju odzive referentnih masa, ionskih tranzicija analita (za primjer obogaćenog matriksa) i ostale ionske tranzicije koje su rezultat matriksa zaostalog u ekstraktu uzorka (za primjer uzorka slijepe probe).



Slika 10. Maseni spektar matriksa slijepe probe (kravlje mlijeko)

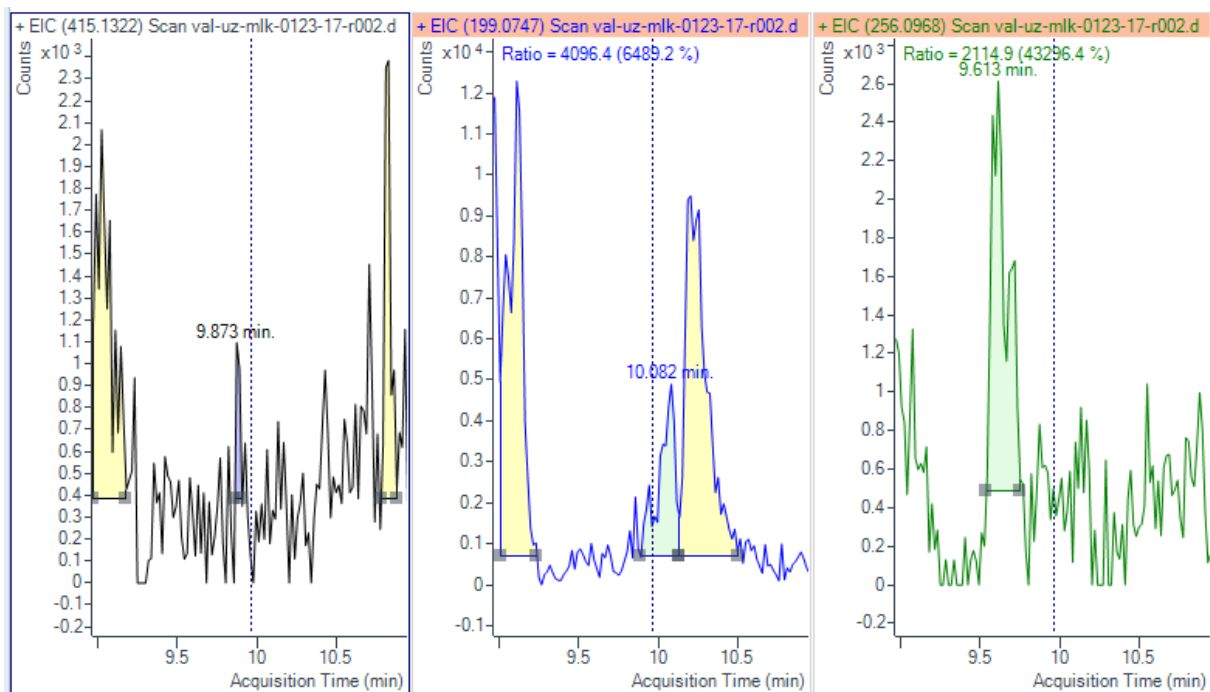


Slika 11. Maseni spektar obogaćenog uzorka

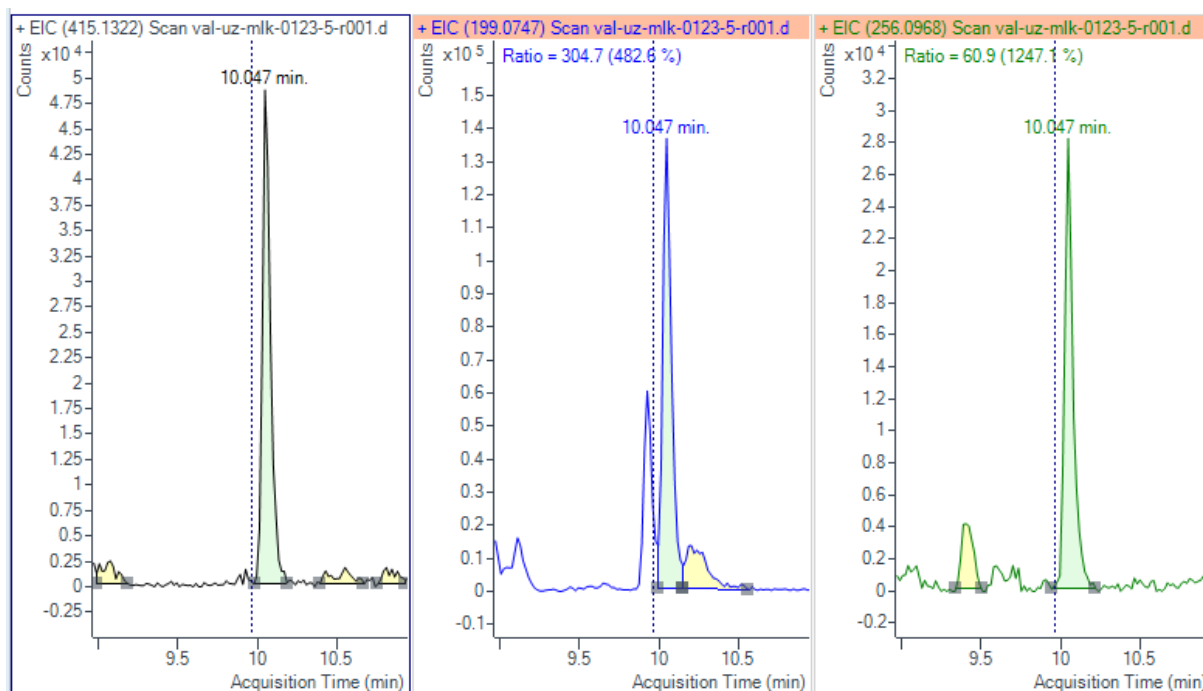
4.3. Razvoj i validacija metode za određivanje β -laktamskih antibiotika

4.3.1. Specifičnost

Specifičnost metode testirali smo na kromatografskim snimkama reprezentativnih matriks uzoraka slijepih proba (engl. Blank). Ukupno smo analizirali 20 uzoraka (15 uzoraka kravljjeg mlijeka i 5 uzoraka kozjeg mlijeka) na čijim kromatogramima spektrometra nisu pronađeni pikovi koji bi mogli interferirati s analitom. Nisu pronađeni ni lažno pozitivni ni lažno negativni rezultati, što nam direktno ukazuje na dobru specifičnost metode. Na slici 12 i 13 navedena je usporedba kromatograma nafcilina kod slijepe probe i obogaćenog uzorka.



Slika 12. Kromatogram uzorka slijepe probe za nafcilin



Slika 13. Kromatografski prikaz nafcilina u obogaćenom uzorku

4.3.2. Preciznost metode

Ponovljivost metode testirana je unutar jednog dana analizom obogaćenih uzoraka na 4 koncentracijske razine s 4 ponavljanja po razini (ukupno 16 uzoraka) te su uzorci injektirani u duplikatu. Cilj postupka bio je utvrditi rezultate koji se dobivaju primjenom ove metode u uvjetima ponovljivosti.

Tablica 6. Marker antibiotka za određivanje veterinarskih lijekova te propisane MRL vrijednosti za mlijeko (Uredba Komisije (EZ) br. 37/2010)

Grupa farmakološki djelatnih tvari	Antibiotik, eng.	Marker rezidua	Životinjska vrsta	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Penicilini	<i>Amoxicillin</i>	Izvorni spoj	sve	4
	<i>Ampicillin</i>	Izvorni spoj	sve	4
	<i>Benzylpenicillin (Penicillin G)</i>	Izvorni spoj	sve	4
	<i>Cloxacillin</i>	Izvorni spoj	sve	30
	<i>Dicloxacillin</i>	Izvorni spoj	sve	30

	<i>Naphcillin</i>	Izvorni spoj	sve	30
	<i>Oxacillin</i>	Izvorni spoj	sve	30
Cefalosporini	<i>Cefalexin</i>	Parent	Govedo	100
	<i>Cefalonium</i>	Parent	Govedo	20
	<i>Cefapirin</i>	Suma Cefapirin + Desacetylcephapirin	Govedo	60
	<i>Cefazolin</i>	Parent	Govedo, ovca, koza	50
	<i>Cefoperazone</i>	Parent	Govedo	50
	<i>Cefquinome</i>	Parent	Govedo	20
	<i>Ceftiofur</i>	Suma svih rezidua s β -laktamskim prstenom izraženi kao Desfuroylceftiofur	sve	100

S obzirom na postavljene MRL vrijednosti navedenih u tablici 6 provedena su obogaćenja navedenih u tablici 7 gdje se uzorci obogaćuju na 1/10 MRL, 1/2 MRL, MRL i 1,5 MRL.

Tablica 7. Uzorci mlijeka obogaćeni antibioticima

Oznaka uzorka	Oznaka razine obogaćenja	Volumen RS-Q-TOF-MIX-S2 (μ L)
VAL-UZ-1a	M1	20
VAL-UZ-1b	M1	20
VAL-UZ-2a	M1	20
VAL-UZ-2b	M1	20
VAL-UZ-3a	M1	20

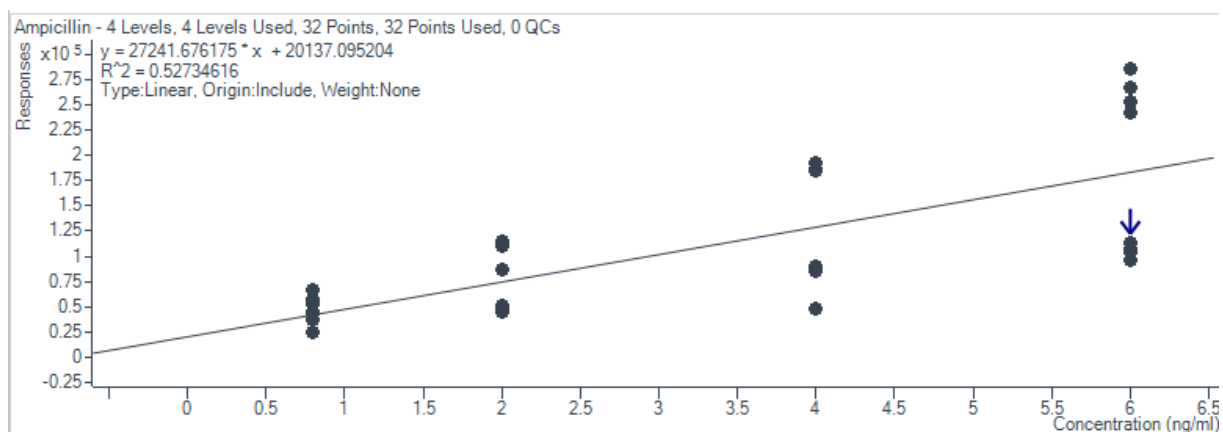
VAL-UZ-3b	M1	20
VAL-UZ-4a	M1	20
VAL-UZ-4b	M1	20
VAL-UZ-5a	M2	50
VAL-UZ-5b	M2	50
VAL-UZ-6a	M2	50
VAL-UZ-6b	M2	50
VAL-UZ-7a	M2	50
VAL-UZ-7b	M2	50
VAL-UZ-8a	M2	50
VAL-UZ-8b	M2	50
VAL-UZ-9a	M3	100
VAL-UZ-9b	M3	100
VAL-UZ-10a	M3	100
VAL-UZ-10b	M3	100
VAL-UZ-11a	M3	100
VAL-UZ-11b	M3	100
VAL-UZ-12a	M3	100
VAL-UZ-12b	M3	100
VAL-UZ-13a	M4	150
VAL-UZ-13b	M4	150
VAL-UZ-14a	M4	150

VAL-UZ-14b	M4	150
VAL-UZ-15a	M4	150
VAL-UZ-15b	M4	150
VAL-UZ-16a	M4	150
VAL-UZ-16b	M4	150

U tablici 8 prikazane su vrijednosti nekoliko odabranih analita analiziranih tijekom validacijskog postupka. Minimalna vrijednost točnosti određivanja masa u potpunom validacijskom postupku je -9,4 ppm-a, a maksimalna vrijednost iznosi 10,45 ppm-a. Obzirom da je lošija točnost masa zabilježena na najnižoj koncentracijskoj razini, a bolja točnost na najvišoj koncentracijskoj razini, možemo zaključiti kako točnost određivanja masa ovisi o koncentraciji u uzorku.

Tablica 8. Rezultati validacije rezidua ampicilina

Oznaka uzorka	Retencijsko vrijeme	Odziv	Konačna koncentracija	Točnost određivanja masa
VAL-UZ-1a	7,50	56926,2	1,35	0,30
VAL-UZ-3b	7,65	45164,8	0,92	10,45
VAL-UZ-5b	7,50	94431,18	2,73	-5,59
VAL-UZ-8a	7,51	45309,14	0,92	-8,50
VAL-UZ-9b	7,51	192444,37	6,33	-6,29
VAL-UZ-11a	7,50	89812,11	2,56	-7,94
VAL-UZ-14a	7,51	253124,5	8,55	-6,21
VAL-UZ-16b	7,52	96198,81	2,79	-9,06
sr.vr. RT	7,52	-	-	-



Slika 14. Kalibracijska krivulja validacije ampicilina

Svi rezultati su izraženi pri vrijednostima najveće dopuštene količine (eng. MRL). Nakon obavljene analize standardne devijacije, iz tablice 9 vidljivo je najveće odstupanje za penicilin G, 19,3%. Što je veće odstupanje, to je rezultat slabije reproducibilan. Najmanje odstupanje je utvrđeno za desfuroilcetiofur, 7,5%. Bitan podatak je i iskorištenje metode pri najvećim dopuštenim količinama. Za β -laktamske antibiotike u ovoj metodi, iskorištenje se kreće od 89,1% do 111,1%. Mjerna nesigurnost analitičkog rezultata izražena je preko graničnog masenog udjela analita ($CC\alpha$) i sposobnosti dokazivanja ($CC\beta$) jer uračunava reproducibilnosti metode te standardnu devijaciju ponovljivosti određene u validaciji (Ogüć, 2018.)

Granična koncentracija (količina) analita ($CC\alpha$) je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost α pogreške da uzorak ne udovoljava. α pogreška je vjerojatnost za lažno pozitivne odluke te za zabranjene tvari ne smije prelaziti 1%. Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$) predstavlja najmanji udio tvari koji je moguće metodom dokazati, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost β pogreške. β pogreška je vjerojatnost lažno negativne odluke, ograničena na 5%. U slučaju tvari za koje nije utvrđena dopuštena količina, sposobnost dokazivanja je najniža koncentracija koja se može dokazati sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$ u kontaminiranom uzorku. U slučaju tvari za koje je utvrđena dopuštena količina, sposobnost dokazivanja je koncentracija koja se može dokazati, sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$, uz ustanovljenu dopuštenu koncentraciju.

Proračunom standardne devijacije dobivene po svakoj koncentracijskoj razini računaju se validacijski parametri prikazani u tablici 9.

Tablica 9. Validacijski parametri dobiveni InterVal računanim programom

β-laktamski antibiotici	MRL min (μgkg^{-1})	CCα (μgkg^{-1})	CCβ (μgkg^{-1})	Iskorištenje [%] na CCα	Rel S_R [%] na CCα
Ampicilin	4	4,99	3,36	103	13,3
Amoksisilin	4	5,09	3,72	103,2	13,6
Penicilin G	4	5,79	5,14	103,2	19,3
Dikloksacilin	30	35	21,09	103,1	8,9
Kloksacilin	30	36,35	23,14	105,5	11,6
Nafcilin	30	35,18	21,21	103,4	9,4
Oksacilin	30	40,41	32,09	102,4	16,3
Cefaleksin	100	119,2	37,21	100,9	10,6
Cefalonij	20	25,72	13,88	99,9	13,5
Cefazolin	50	64,16	23,59	104,6	15,8
Cefoperazone	50	68,61	37,77	99,3	18,3
Cefkvinom	20	23,95	8,00	103,1	11,1
Ceftiofur	100	128,52	47,79	103	15,8
Cefapirin	60	74,66	12,3	111,1	13,5
Desacetilcefapirin	100	143,07	79,84	89,1	17,8
Desfuroilceftiofur	60	68,47	13,36	101,4	7,5

4.3.3. Primjenjivost

Metoda se može primjeniti za analizu penicilina i cefalosporina u 2g uzorka mlijeka u širokom koncentracijskom području od 1 do 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ za mlijeko. Prisutnost supstance moguće je

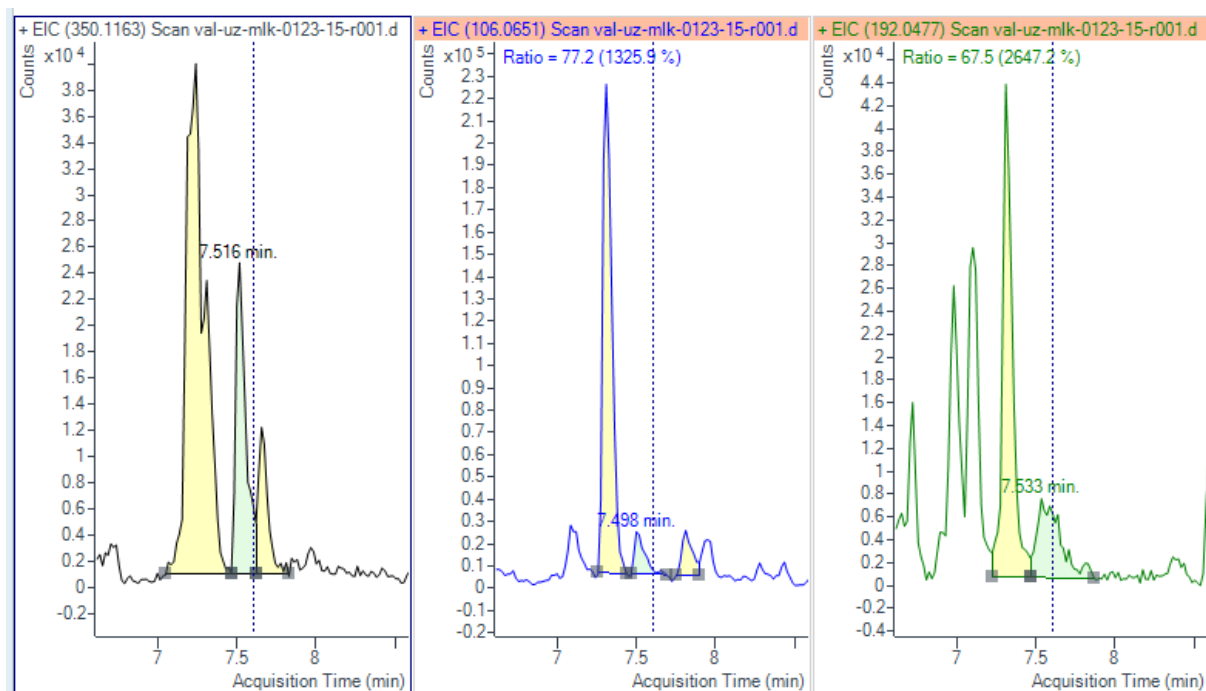
potvrditi na osnovu prisutnosti prekursor iona analita, $S/N > 10$, tačnosti određivanja mase ≤ 10 ppm, prisutnosti minimalno 2 produkt iona koji odgovaraju spektru tog analita te odstupanje ionskog odnosa prekursora koja mora biti $< 30\%$.

4.3.4. Određivanje utjecaja matriksa

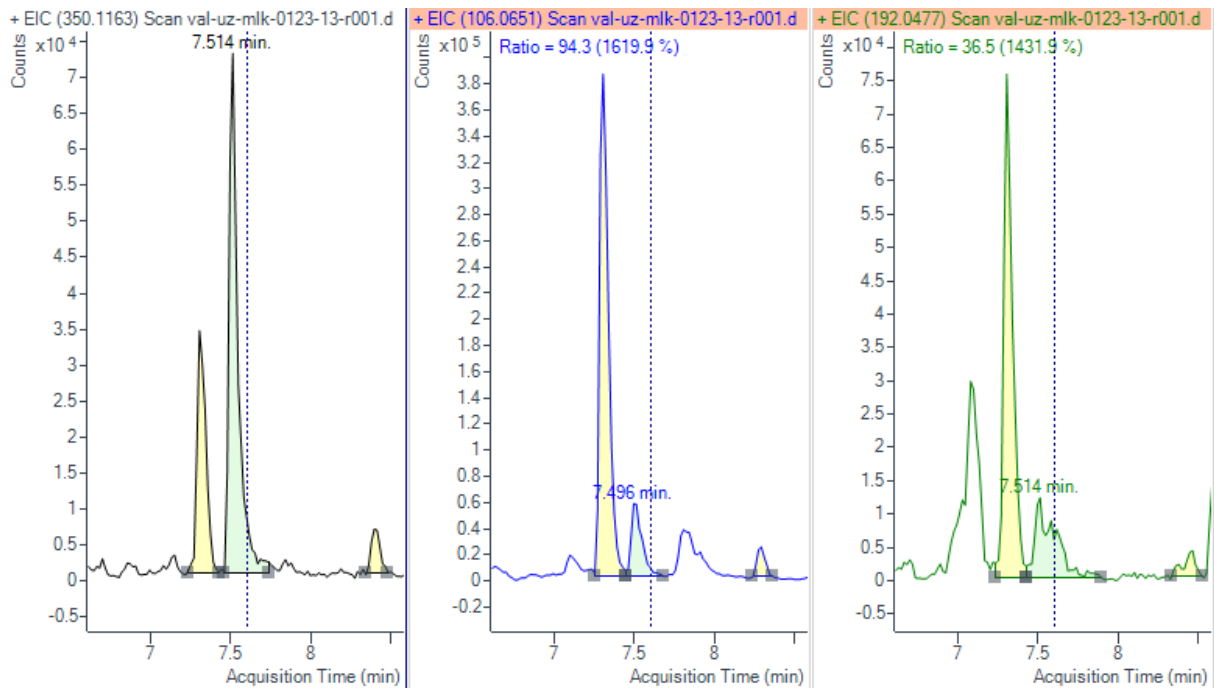
Matriks krivulja se izrađuje dodatkom točno određenog volumena određene koncentracije standarda na matriks na sam početak ekstrakcijskog postupka. Time matriks podliježe gubicima analita te se u finalni rezultat ne uračunava korekcija iskorištenja (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2014).

Kako bi se pravilno razvila i validirala metode te postigla precizna kvantifikacija analitičkih rezidua, potrebno je proučiti utjecaj matriksa na ionizaciju analita. Različite vrste mlijeka mogu utjecati na supresiju iona i smanjen odziv.

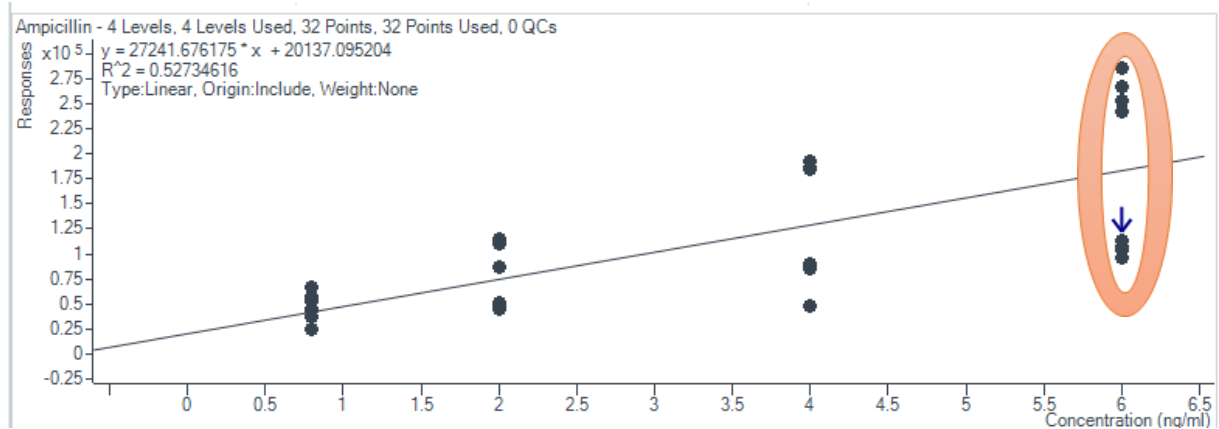
Na slici 15 i 16 vidimo usporedbu pika ampicilina kod kravljeg i kozjeg mlijeka te supresiju iona kod kozjeg mlijeka. Također, niži odzivi detektirani su za kozje mlijeko. Na slici 17 vidljivo je odstupanje matriks krivulja ampicilina za kozje i kravlje mlijeko, kao rezultat utjecaja matriksa na ionizaciju analita.



Slika 15. Kromatogram ampicilina u matriksu kozjeg mlijeka

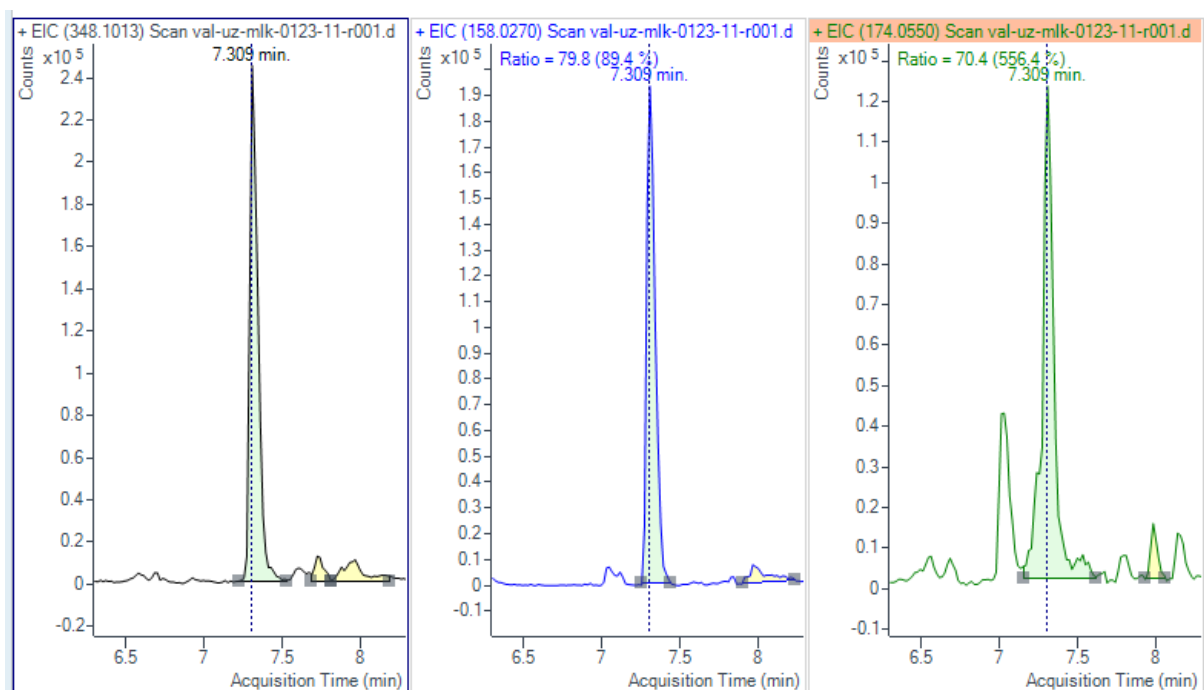


Slika 16. Kromatogram ampicilina u matriksu kravljeg mlijeka

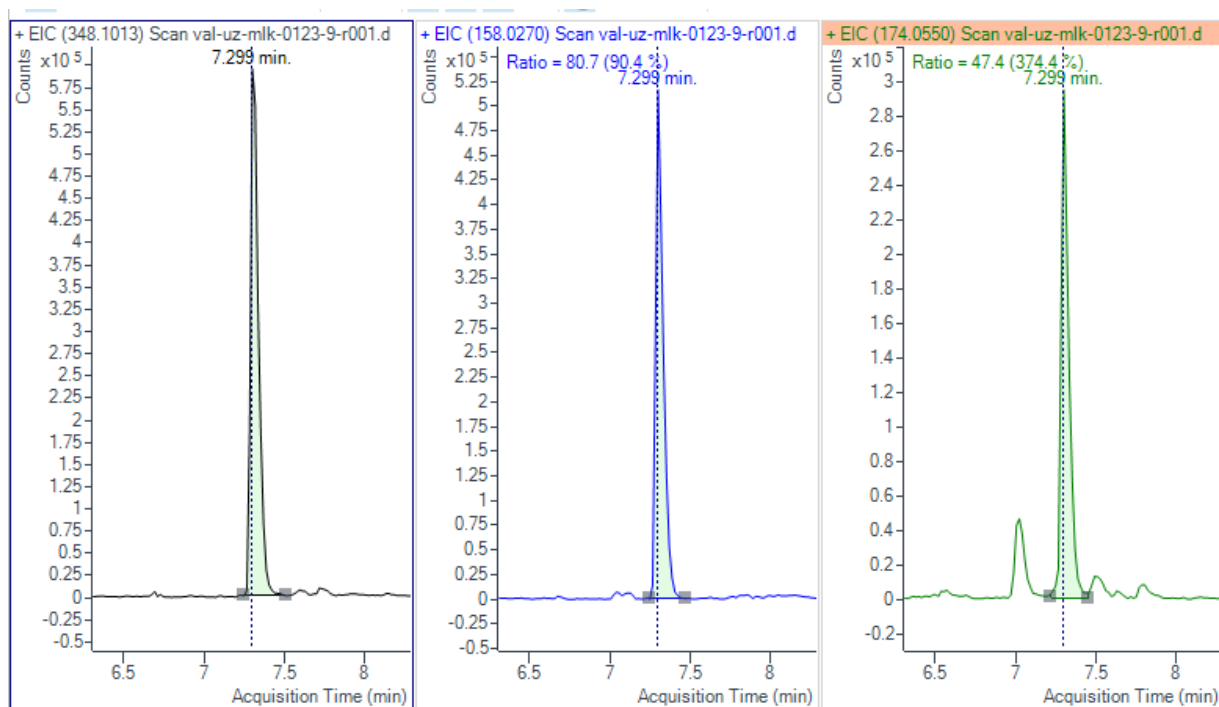


Slika 17. Matriks kalibracija ampicilina u mlijeku

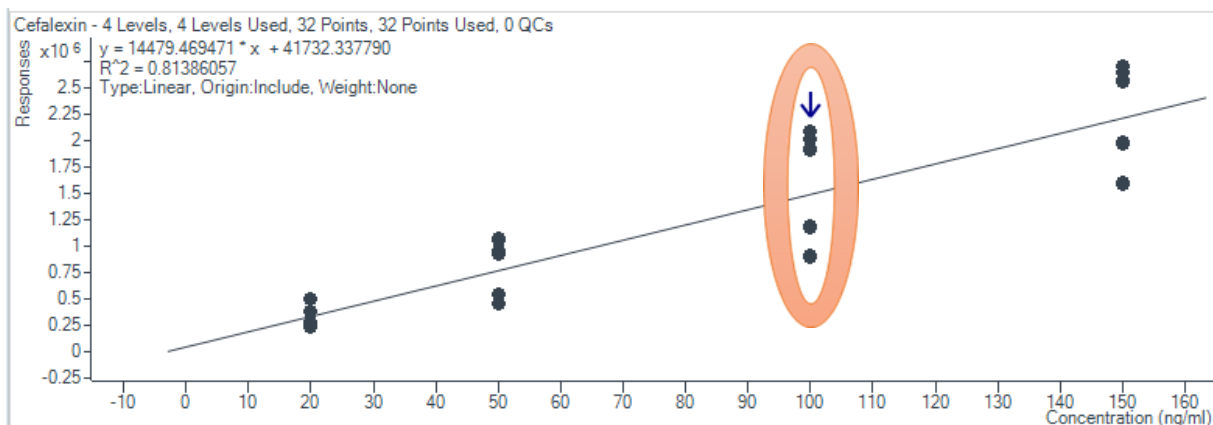
Na slikama 18 i 19 vidimo usporedbu pika cefaleksina kod kravljeg i kozjeg mlijeka te supresiju iona kod kozjeg mlijeka. Također, niži odzivi detektirani su za kozje mlijeko. Na slici 20 vidljivo je odstupanje matriks krivulja cefaleksina za kozje i kravlje mlijeko, kao rezultat utjecaja matriksa na ionizaciju analita.



Slika 18. Kromatogram cefaleksina u matriksu kozjeg mlijeka



Slika 19. Kromatogram cefaleksina u matriksu kravljeg mlijeka



Slika 20. Matriks kalibracija cefaleksina u mlijeku (niži odzivi su detektirani za kozje mlijeko)

4.4. Primjena metode na realnim uzorcima, analiza mlijeka na prisutnost β -laktamskih antibiotika

U analizi je obrađeno 16 uzoraka, od toga 6 kalibracijskih i 10 redovnih uzoraka. U tablici 10 je prikazan popis uzoraka i dodatak standardnih otopina za obogaćenje.

Tablica 10. Uzorci mlijeka za kalibraciju i analizirani uzorci mlijeka

Oznaka uzorka	RS-Q-TOF-MIX-S2(μ L)	MIX-Q-TOF-ISTD2(μ L)
KAL1	50	100
KAL1	50	100
KAL2	100	100
KAL2	100	100
KAL3	150	100
KAL3	150	100
UZ-1a	-	100
UZ-1b	-	100
UZ-2a	-	100

UZ-2b	-	100
UZ-3a	-	100
UZ-3b	-	100
UZ-4a	-	100
UZ-4b	-	100
UZ-5a	-	100
UZ-5b	-	100

4.4.1. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata

Potvrda analita prilikom potvrdne metode zasniva se na nekoliko uvjeta:

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

Procjenu rezultata provodimo prema zadanim uvjetima u tablici 11.

Tablica 11 prikazuje β -laktamske antibiotike te njihova retencijska vremena, vrstu ionizacije te prekursor ion. Retencijsko vrijeme je vrijeme u kojem određeni spoj izlazi iz kolone odnosno vrijeme u kojem je spoj detektiran. Na retencijsko vrijeme spoja utječe polarnost, polarniji spojevi prije izlaze iz kolone i dolaze do detektora. Od navedenih β -laktamskih antibiotika, desacetilcefapirin se najkraće zadržava u koloni, te on prvi izlazi iz kolone prema detektoru. Prema retencijskom vremenu, možemo ih poredati od najpolarnijeg: desacetilcefapirin, amoksicilin, cefapirin, cefkvinom, cefalonij, cefaleksin, ampicilin, cefazolin, desfuroilceftiofur, cefoperazon, ceftiofur, penicilin G, oksacilin, kloksacilin, nafcilin i dikloksacilin sa najvećim retencijskim vremenom. Molekularni ion i fragment ion su podaci neophodni za identifikaciju spoja Q-TOF tehnikom.

Tablica 11. Retencijska vremena, vrsta ionizacije te molekularni i fragment ioni

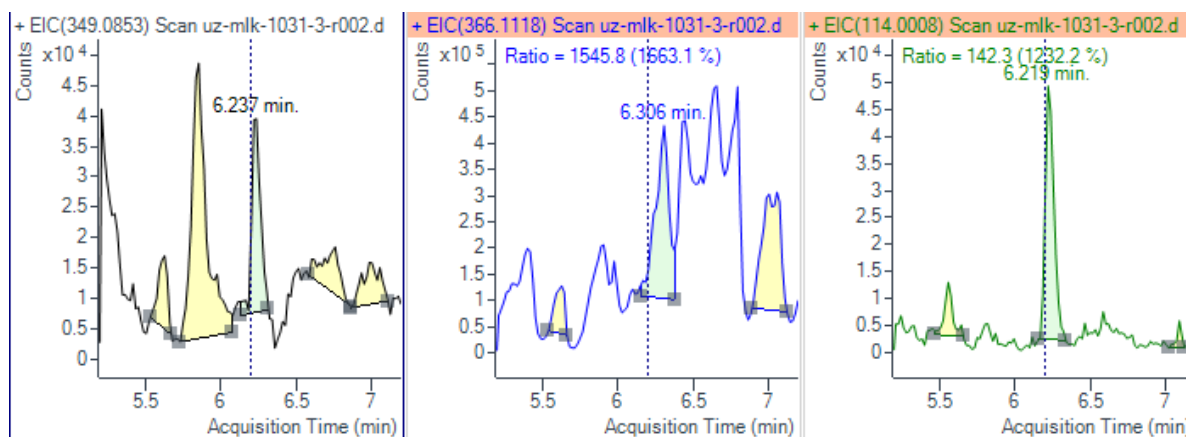
β -laktamski antibiotici	Retencijsko vrijeme (min)	Vrsta ionizacije	Prekursor ion m/z
Dikloksacilin	10,1	+	470,0339
Oksacilin	9,8	+	402,1118
Ampicilin	7,5	+	350, 1163
Penicilin G	9,4	+	335,106
Amoksicilin	6,2	+	349,0853
Kloksacilin	9,9	+	436,0728
Nafcilin	10,0	+	415,1322
Desacetilcefapirin	5,6	+	382,0526
Cefapirin	6,5	+	424,0631
Cefalonij	7,0	+	459,0782
Cefkvinom	6,8	+	529,1323
Cefaleksin	7,3	+	348,1013
Cefazolin	7,6	+	455,0373
Cefoperazon	7,8	+	646,1497
Ceftiofur	8,6	+	524,0363
Desfuroilceftiour	7,7	+	430,0308

U tablici 12 prikazani su retencijsko vrijeme, omjer odziv produkt iona, očekivana koncentracija, konačna koncentracija i točnost određivanja masa kalibracijskih uzoraka na amoksicilin. Iz tablice je vidljiv raspon točnosti određivanja masa od -29,853 do -1,55 ppm. Raspon je manji od 10 ppm-a za drugu i treću kalibracijsku točku što upućuje na visoku točnost određivanja masa. Za prvu kalibracijsku točku je očitana lošija točnost masa zbog lošije osjetljivosti urđaja na niskim koncentracijama. Srednja vrijednost retencijskih vremena iznosi 6,2.

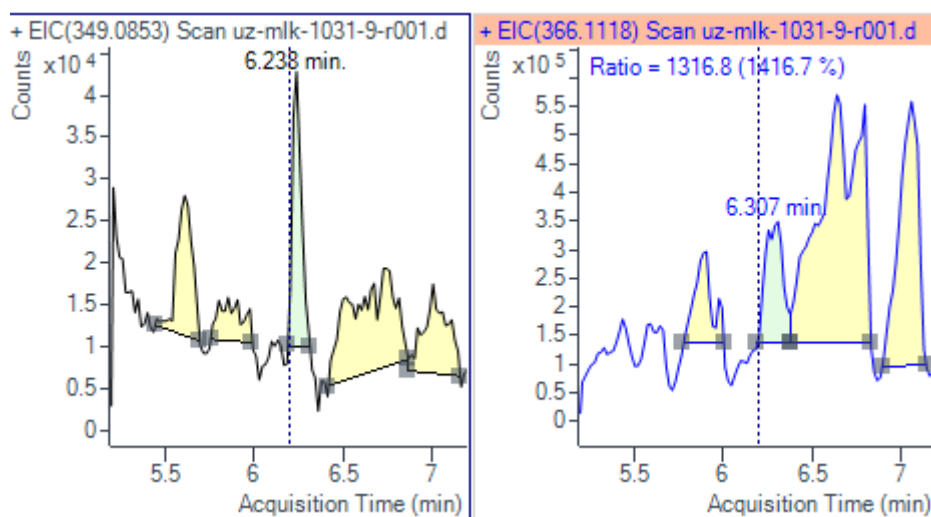
Tablica 12. Rezultati kalibracije amoksicilina

Uzorak	Retencijsko vrijeme	Omjer odziva produkta iona	Očekivana koncentracija	Konačna koncentracija	Točnost određivanja masa
KAL1	6,222	129,6	2	1,8113	-24,4266
KAL1	6,273	155,6	2	1,7574	-29,853
KAL2	6,233	134,9	4	4,2814	-3,1248
KAL2	6,237	142,3	4	3,8507	-2,2632
KAL3	6,237	157,6	6	5,7901	-1,5544
KAL3	6,221	143,9	6	7,0757	-2,3005
Srednja vrijednost			-	-	-

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. Za potvrdu pozitivnog uzorka, odnosno prisutnost analita u uzorku, retencijsko vrijeme mora odgovarati onom u standardu ($\pm 2,5\%$), površina pika bi trebala biti veća od prve kalibracijske točke, točnost određivanja masa treba biti manja od 10 ppm, te odnos produkt iona mora odgovarati kalibraciji. Prednost korištenja UHPLC je upravo u tome da već pri neodgovarajućem retencijskom vremenu i točnosti masa možemo zaključiti da je uzorak negativan. Na slici 21 prikazan je kromatogram amoksicilina obogaćenog matriksa mlijeka u uzorku KAL-2.



Slika 21. Kromatogram amoksicilina obogaćenog matriksa mlijeka u uzorku KAL-2

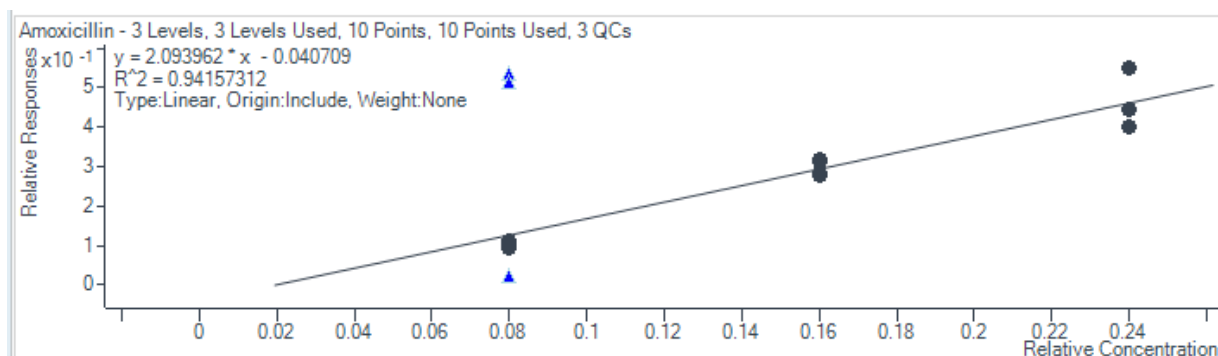


Slika 22. Kromatogram amoksicilina u uzorku mlijeka UZ-5a

U tablici 13 prikazani su rezultati analize uzoraka mlijeka na amoksicilin. Uzorak oznake UZ-5 (Slika 22) ima retencijsko vrijeme 6,2 u obje paralele, što odgovara retencijskom vremenu standarda, također ima točnost određivanja masa manju od 10 ppm-a u obje paralele te visok odziv u obje paralele. Omjer odziva produkta iona odstupa više od 20%, ali s obzirom na moguć utjecaj matriksa na odzive produkt iona uzorak se označava kao sumnjiv te se proračunava koncentracija. Koncentracija se proračunava iz kalibracijske krivulje (Slika 23) te su dobivene vrijednosti $11,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $10,3 \mu\text{g kg}^{-1}$, stoga obzirom na koncentraciju možemo zaključiti kako je ovaj uzorak pozitivan jer sadrži koncentraciju veću od najveće dopuštene količine (eng. MRL) amoksicilina.

Tablica 13. Rezultati analize uzoraka mlijeka na amoksicilin

Uzorak	RT	Odziv	Omjer odziva produkta iona	Konačna koncentracija	Točnost određivanja masa
UZ-1a	6,3	32479	-	2,1	-90,41
UZ-1b	6,3	49266	-	2,5	-80,9
UZ-2a	6,3	41297	-	1,6	-44,3
UZ-2b	6,5	39483	-	1,5	-24,9
UZ-3a	6,8	83900	-	2,4	-36,9
UZ-3b	6,0	35269	-	1,3	-34,996
UZ-4a	6,8	52613	12,6	2,0	-78,1
UZ-4b	6,8	58386	41,6	2,1	-50,4
UZ-5a	6,2	111453	148,5	11,6	-1,1
UZ-5b	6,2	126021	125,7	10,3	-2,1



Slika 23. Kalibracijska krivulja amoksicilina u matriksu mlijeka

U tablici 14 prikazani su retencijsko vrijeme, omjer odziv produkt iona, očekivana koncentracija, konačna koncentracija i točnost određivanja masa kalibracijskih uzoraka na nafcilin. Točnost određivanja masa je manja od 10 ppm, što upućuje na visoku točnost određivanja masa. Srednja vrijednost retencijskih vremena iznosi 10,04.

Tablica 14. Rezultati kalibracije nafcilina

Uzorak	Retencijsko vrijeme	Omjer odziva produkta iona	Očekivana koncentracija	Konačna koncentracija	Točnost određivanja masa
KAL1	10,041	272,5	15	14,8273	-0,0153
KAL1	10,041	283	15	14,9285	-0,1799
KAL2	10,035	290,4	30	30,9876	-0,151
KAL2	10,039	297,4	30	28,9814	-0,2575
KAL3	10,04	290,4	45	42,3547	-0,4399
KAL3	10,041	280,7	45	49,2835	-0,2919
KAL1	10,041	290,7	15	13,891	0,1695
KAL2	10,041	294,9	30	32,1972	-0,0643
KAL3	10,036	292	45	41,3638	0,0453
Srednja vrijednost	10,04	288	-	-	-

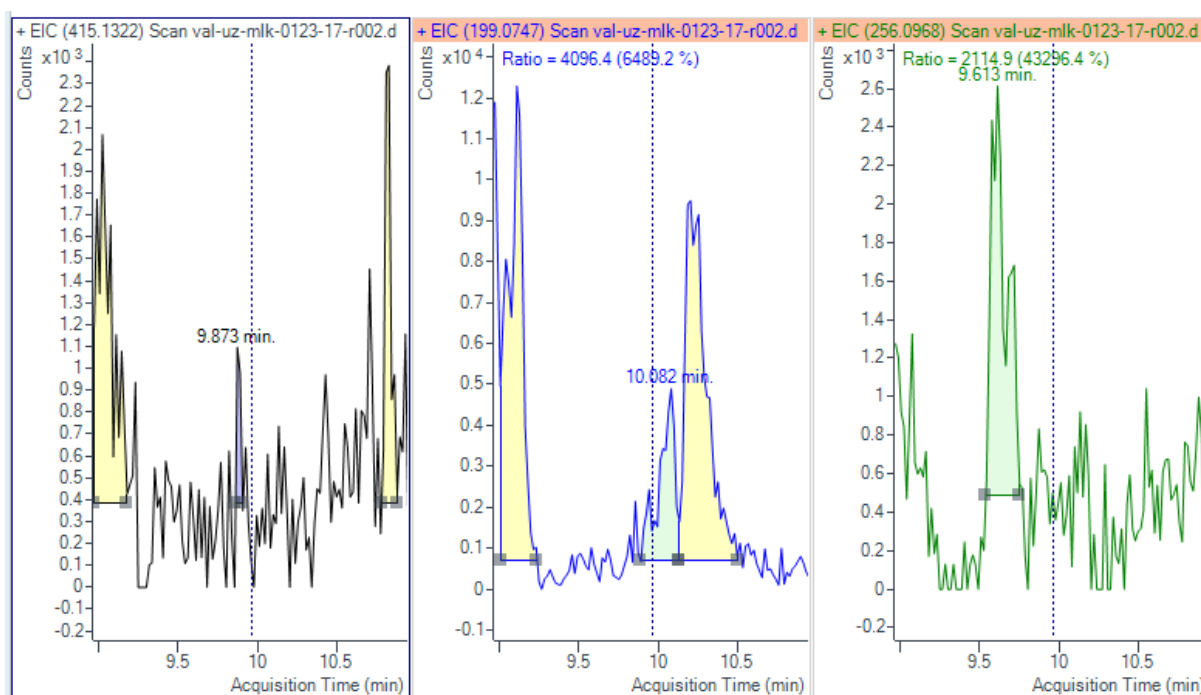
U tablici 15 prikazani su retencijsko vrijeme, odziv, omjer odziva produkta iona i točnost određivanja masa svakog analiziranog uzorka. U uzorku 3492, retencijsko vrijeme odgovara retencijskom vremenu standarda, no već pri proučavanju ostalih vrijednosti, kao što je točnost određivanja masa, vidljivo je kako ovaj uzorak nije pozitivan, obzirom da točnost određivanja masa nije manja od 10 ppm-a. Ni u jednom uzorku omjer odziva produkt iona ne odgovara omjeru odziva na kalibracijskoj krivulji (Slika 26) te možemo zaključiti kako su svi uzorci negativni.

Tablica 15. Rezultati analize uzoraka mlijeka za nafcilin

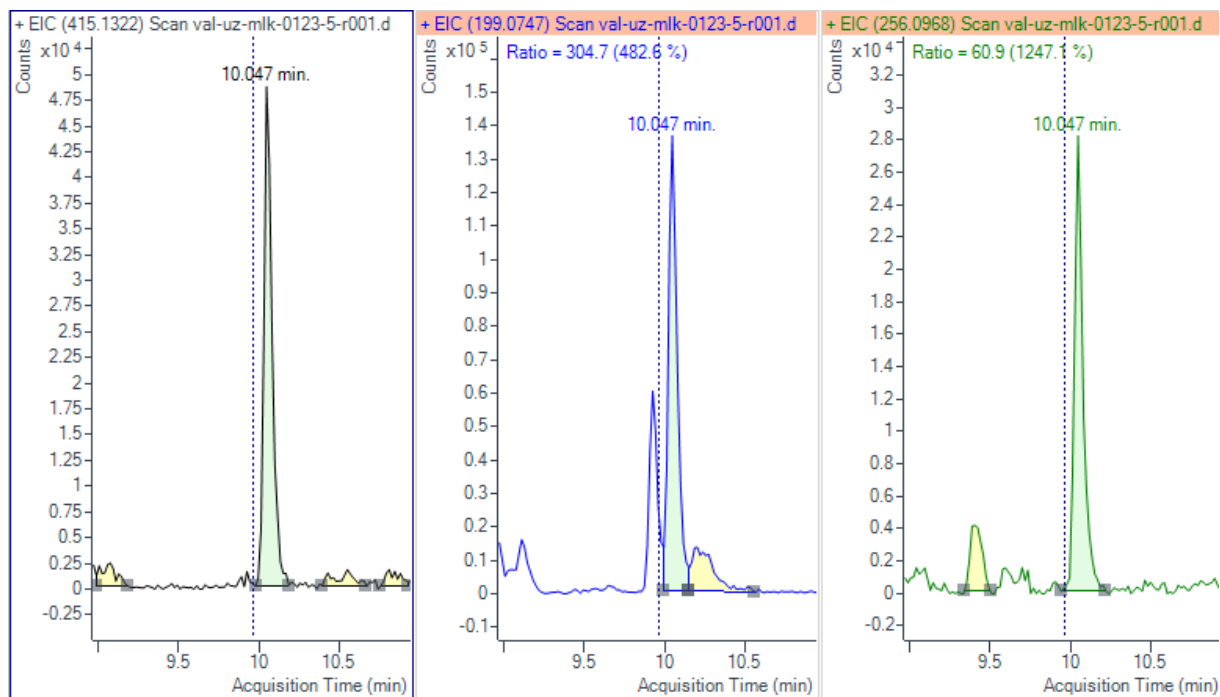
Uzorak	RT	Odziv	Omjer odziva produkta iona	Točnost određivanja masa
UZ-1a	10,3	24115	132,1	-66,6653

UZ-1b	10,28	31499	110,1	-66,7047
UZ-2a	10,036	42431	112,7	85,4888
UZ-2b	10,054	58026	108,5	91,1529
UZ-3a	9,915	23466	113,8	-67,6878
UZ-3b	9,875	5329	118,6	-72,0322
UZ-4a	9,929	18273	122,9	-64,1246
UZ-4b	9,926	22343	118,2	-70,1399
UZ-5a	9,918	11477	137,5	-73,6783
UZ-5b	9,933	8410	102,1	-63,6386

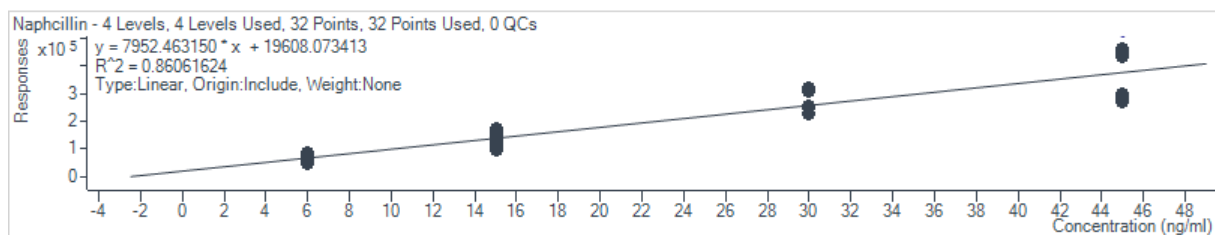
Na slici 24 prikazan je kromatogram nafcilina za uzorak mlijeka slijepe probe te na slici 25, prikazan je kromatogram nafcilina obogaćenog uzorka mlijeka.



Slika 24. Kromatogram nafcilina za uzorak mlijeka slijepe probe



Slika 25. Kromatogram nafcilina obogaćenog uzorka mlijeka



Slika 26. Kalibracijska krivulja nafcilina u matriksu mlijeka

Na jednak način analizirani su uzorci na prisutnost ostalih β -laktamskih antibiotika te nije pronađen ni jedan pozitivan uzorak u redovnoj analizi.

4.5. Primjena metode

Opisana metode je uspješno razvijena i validirana te se može primijeniti kao metoda za određivanje rezidua β -laktamskih antibiotika u kozjem i kravljem mlijeku. Tijekom redovnih analiza, analiziraju se kontrolni uzorci obogaćenih kontrolnih uzoraka mlijeka. Kako bi se utvrdili parametri granične koncentracije ($CC\alpha$) i sposobnosti dokazivanja ($CC\beta$), ispituje se ponovljivost i reproducibilnost. Na kromatogramima uzoraka slijepih proba nisu pronađeni pikovi koji bi mogli interferirati s analitom, kao ni lažno pozitivni ni lažno negativni rezultati.

5. ZAKLJUČCI

1. U ovom radu opisan je razvoj metode za identifikaciju rezidua β -laktamskih antibiotika u kravljem i kozjem mlijeku primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS).
2. Validacija ukazuje na zadovoljavajuću linearnost i reproducibilnost metode. Prisutnost matriksa može utjecati na odziv analita i rezultirati drugačijim parametrima linearnosti. Da bi se umanjio matriks efekt potrebno je pripremiti kalibracijske krivulje analita svakog pojedinog β -laktamskog antibiotika na otapalu i specifičnom matriksu.
3. Analizirani su uzorci na prisutnost β -laktamskih antibiotika primjenom ove razvijene metode, te su utvrđeni negativni i jedan pozitivan uzorak. U pozitivnom uzorku detektiran je amoksicilin pri koncentraciji većoj od najveće dopuštene količine (NDK) utvrđene Uredbom Komisije (EU) (2010) br. 37/2010.
4. Ovo istraživanje doprinijelo je kvantitativnoj procjeni koncentracija β -laktamskih antibiotika u matriksima mlijeka 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.

Allen, D. R., & McWhinney, B. C. (2019). Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, **40(3)**, 135–146.

Bacanli, M., & Bařaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food Chem. Toxicol: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **125**, 462–466

Bhatia R. (2019) Implementation framework for One Health approach, *Indian J Med Res.* **149(3)**, 329–331.

Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspect Med.*, **6(8)**, a025247.

Chen, J., Ying, G. G., & Deng, W. J. (2019). Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. *J. Agric. Food Chemistry*, **67(27)**, 7569–7586

Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A. (2009). Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. Institut “Ruđer Bošković”, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za sistemsku biomedicinu, Zagreb

Fejzuli, L., Solomun Kolanović, B., Šušković, J., Kos, B., Bilandžić, N. (2018) Aminoglikozidni antibiotici - primjena u veterinarstvu i kontrola u hrani životinjskog podrijetla. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **13(3-4)**, 95-106.

Garcia, S. N., Osburn, B. I., & Cullor, J. S. (2019). A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One health* **7**, 100086.

Kirchhelle, C. (2018) Pharming animals: A global history of antibiotics in food production (1935–2017). *Nature*, **4** (1), 1–13

Kos, B. (2017): predavanja iz modula “Ostatci antibiotika u hrani”, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_biokemijsko_inzenjerstvo/laboratorij_za_tehnologiju_antibiotika_enzima_probiotika_i_starter_kultura/ostatci_antibiotika_u_hrani.

Pristupljeno 2.prosinca 2020.

Mackenzie J.S., Jeggo M. (2019) The One Health Approach—Why Is It So Important? *Trop Med Infect. Dis.* 4(2), 88.

Martinez J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. Drug discovery today. *Technologies*, **11**, 33–39.

Odluka komisije (EU) (2003) od 22. prosinca 2003. o izmjeni Odluke 2002/657/EZ u pogledu određivanja najmanjih zahtijevanih granica učinkovitosti metode (MRPL) za određene ostatke u hrani životinjskog podrijetla.

Oguić, A. (2018) 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) (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heure, O.E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J.-M., Segovia, C., Sigauque, B., Tacconelli, E., Wellington, E., Vila, J. (2015) The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbe and New Infect*, **6**, 22–29.

Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M. H., & Azizul Karim Hussani, S. M. (2019) Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *J Adv Vet Anim Res*, **6**(3), 315–332.

Samaržija D. i Antunac N. (2002) Važnost dokazivanja prisutnosti antibiotičkih ostataka u mlijeku. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*. **52**, 61-70.

Solomun Kolanović, B., Bilandžić, N., Đokić, M., Varenina, I. & Sedak, M. (2011) Mehanizam djelovanja, biosinteza i identifikacija beta-laktamskih antibiotika. *Croatian Journal for Food Science and Technology*, **3** (2), 65-75.

Šalković-Petrišić, M. i Bradamante, V. (2014) Beta-laktamski antibiotici (i): Penicilini. *Medicinar*, e-nastavni članak. Katedra za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,

< <http://medicinar.mef.hr/assets/arhiva/penicilini.pdf> >. Pristupljeno 22.6.2020.

Šušković, J. (2017): predavanja iz modula “Tehnologija antibiotika”, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

< <https://moodle.srce.hr/2017-%202018/course/view.php?id=29048> >. Pristupljeno 15.6.2020.

Šušković, J. (2017): predavanja iz modula “Biotehnologija 4 ”, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu ,

< <https://moodle.srce.hr/2017-2018/course/view.php?id=21286> >. Pristupljeno 20.6.2020.

Uredba (EZ) (2009) br. 470/2009 Europskog parlamenta i vijeća od 6. svibnja 2009. o propisivanju postupaka Zajednice za određivanje najvećih dopuštenih količina rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla, o stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 2377/90 i o izmjeni Direktive 2001/82/EZ Europskog parlamenta i Vijeća i Uredbe (EZ) br. 726/2004 Europskog parlamenta i Vijeća.

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).

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2017.

< <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/antibiotska-rezistencija/> >. Pristupljeno 20.6.2020.

Zeng, X., & Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, **4**, 128.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Arđević', is written above a horizontal line.

Ime i prezime studenta