

# Određivanje ostataka tetraciklinskih antibiotika u mlijeku LC-MS/MS metodom

---

**Petek, Andreja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:159:556242>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2023.

Andreja Petek

**ODREĐIVANJE OSTATAKA  
TETRACIKLINSKIH  
ANTIBIOTIKA U MLIJEKU  
LC-MS/MS METODOM**

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

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Blaženki Kos na pruženoj pomoći i savjetima pri izradi diplomskog rada. Nadalje, želim se zahvaliti svim zaposlenicima u Laboratoriju za određivanje rezidua na Hrvatskom veterinarskom institutu na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada, a posebno se želim zahvaliti znanstvenoj suradnici dr. sc. Ivani Varenini koja mi je ukazala na važnost dobre suradnje, te je svojom pristupačnošću i stručnim vođenjem omogućila izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Također, želim zahvaliti svojoj obitelji na neizmjerne podršci i velikoj motivaciji tijekom svih godina studiranja.*

*Posebno hvala osobi koja je gotovo cijeli period studiranja provela uz mene na slušanju, podršci i vožnji na ispite.*

*I na kraju hvala svim kolegama i prijateljima koji su mi također bili pomoć i podrška tijekom studiranja, a posebno kolegici Luciji Vukšić na nesebičnom dijeljenju znanja, potpori i zalaganju tijekom pripreme ispita.*

# 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

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

## ODREĐIVANJE OSTATAKA TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA U MLIJEKU LC-MS/MS METODOM

*Andreja Petek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058209132*

**Sažetak:** Antibiotici se koriste u liječenju i prevenciji bolesti životinja, te kao promotori rasta što može dovesti do prisutnosti rezidua u hrani životinjskog podrijetla pa tako i u mlijeku. Prema regulativi Europske unije, NDK (najveća dopuštena koncentracija) za tetraciklinske antibiotike u mlijeku iznosi 100 µg/kg. Cilj ovog rada bio je primijeniti LC-MS/MS (tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa) metodu i ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) test, usporediti korištene ekstrakcijske metode i detektirati prednosti i nedostatke istih. Optimizirani parametri LC-MS/MS metode omogućili su bolju selektivnost, razdvajanje analita, te točnije rezultate analize. Usporedbom pročišćavanja uzoraka QuEChERS (engl. *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) i ekstrakcijom organskim otapalom dokazano je da je ekstrakcijski prinos veći, a matriks efekt manji, primjenom ekstrakcije organskim otapalom. Korištenjem natrijevog sulfata u odnosu na magnezijev sulfat u QuEChERS ekstrakciji postiže se veća efikasnost ekstrakcije. LC-MS/MS metoda može se koristiti u određivanju rezidua tetraciklinskih antibiotika dok se ELISA test zbog neponovljivosti rezultata ne može koristiti u kvantitativne svrhe niti kvalitativne svrhe s obzirom da ne pokriva sve tetraciklinske antibiotike koji se mogu naći kao rezidue u mlijeku.

**Ključne riječi:** *tetraciklinski antibiotici, LC-MS/MS, ELISA test, QuEChERS ekstrakcija, ekstrakcija organskim otapalom*

**Rad sadrži:** 59 stranica, 55 slika, 20 tablica, 47 literaturnih navoda, 5 priloga

**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

**Komentor:** dr. sc. Ivana Varenina, znan. sur., Hrvatski veterinarski institut

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
2. prof. dr. sc. Blaženka Kos
3. dr. sc. Ivana Varenina, znan. sur., Hrvatski veterinarski institut u Zagrebu
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjena)

**Datum obrane:** 07. lipanj 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**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

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### DETERMINATION OF TETRACYCLINE ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK BY LC-MS/MS METHOD

*Andreja Petek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058209132*

**Abstract:** Antibiotics are used in the treatment and prevention of animal diseases, and as growth promoters, which can lead to the presence of residues in food of animal origin, which includes milk. According to European Union regulations, MRL (maximum residue limit) for tetracycline antibiotics in milk is 100 µg/kg. The aim of this work was to apply the LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry) method and the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) test, to compare the used extraction methods and to detect their advantages and disadvantages. The optimized parameters of the LC-MS/MS method enabled better selectivity, analyte separation, and more accurate analysis results. By comparing the purification of samples after QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) and extraction with an organic solvent, it was proven that the extraction yield is higher, and the matrix effect is lower when using extraction with an organic solvent. By using sodium sulfate in relation to magnesium sulfate in QuEChERS extraction, a higher extraction efficiency is achieved. The LC-MS/MS method can be used to determine residues of tetracycline antibiotics, while the ELISA test cannot be used for quantitative or qualitative purposes due to the unreproducibility of the results and considering that it does not cover all tetracycline antibiotics that can be found as residues in milk.

**Keywords:** *tetracycline antibiotics, LC-MS/MS, ELISA test, QuEChERS extraction, organic solvent extraction*

**Thesis contains:** 59 pages, 55 figures, 20 tables, 47 references, 5 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Co-mentor:** PhD Ivana Varenina, Research associate, Croatian Veterinary Institute

#### **Reviewers:**

1. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor
2. Blaženka Kos, PhD, Full professor
3. Ivana Varenina, PhD, Research associate, Croatian Veterinary Institute Zagreb
4. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** June 07<sup>th</sup>, 2023

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. POJAVA REZISTENTNIH SOJEVA PATOGENA I „One Health“ KONCEPT</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Mehanizmi na kojima se temelji pojava i postojanost antimikrobne rezistencije u okolišu..	4
2.1.1.1. Na razini bakterije .....	4
2.1.1.2. Na razini bakterijske zajednice.....	5
2.1.1.3. Mehanizmi koji reguliraju bioraspoloživost i biodostupnost antibiotika .....	5
2.1.1.4. Prijenos ARG-a na patogene bakterijske vrste u okolišu .....	6
<b>2.2. TETRACIKLINSKI ANTIBIOTICI</b> .....	<b>7</b>
2.2.1. Razvoj tetraciklinskih antibiotika.....	7
2.2.2. Mehanizam djelovanja tetraciklina.....	8
2.2.3. Rezistencija i mehanizmi rezistencije na tetraciklinske antibiotike .....	8
<b>2.3. METODE PROČIŠĆAVANJA REZIDUA IZ MATRIKSA</b> .....	<b>9</b>
2.3.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	9
2.3.2. QuEChERS ekstrakcija .....	10
<b>2.4. METODE DETEKCIJE REZIDUA</b> .....	<b>10</b>
2.4.1. Orijentacijske „screening“ metode .....	11
2.4.1.1. Test mikrobne inhibicije.....	11
2.4.1.2. ELISA test .....	12
2.4.2. Potvrdne metode.....	13
2.4.2.1. Tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (LC-MS).....	13
2.4.2.2. Tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS).....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA-TANDEMSKA SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS)</b> .....	<b>18</b>
3.1.1. Laboratorijska oprema i kemikalije.....	18
3.1.1.1. Materijal .....	18
3.1.1.2. Kemikalije .....	18
3.1.1.3. Standardi.....	19
3.1.1.4. Laboratorijska oprema.....	19
3.1.2. Metode rada.....	20
3.1.2.1. Priprema otopina .....	20
3.1.2.2. Priprema standardnih radnih otopina tetraciklinskih antibiotika.....	20



3.1.2.3. Priprema obogaćenih uzoraka mlijeka i matriks kalibracijske krivulje.....	21
3.1.2.4. Priprema standardne krivulje na otapalu .....	22
3.1.3. Postupci pročišćavanja uzorka .....	23
3.1.3.1. QuEChERS ekstrakcija .....	23
3.1.3.2. Ekstrakcija potpomognuta organskim otapalom .....	24
3.1.4. Postupak i uvjeti provođenja analize LC-MS/MS metode .....	25
<b>3.2. ELISA TEST .....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Laboratorijska oprema i kemikalije.....	28
3.2.1.1. Materijal .....	28
3.2.1.2. Kemikalije .....	29
3.2.1.3. Standardi.....	29
3.2.1.4. Laboratorijska oprema.....	29
3.2.1.5. Sadržaj kita .....	29
3.2.2. Metode rada.....	30
3.2.2.1. Priprema otopina .....	30
3.2.2.2. Priprema standardnih radnih otopina tetraciklinskih antibiotika.....	31
3.2.2.3. Priprema obogaćenih uzoraka mlijeka i negativnog uzorka.....	31
3.2.2.4. Princip ELISA testa.....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA-TANDEMNA SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS) .....</b>	<b>33</b>
4.1.1. Optimizacija parametara LC-MS/MS.....	33
4.1.1.1. MS2 scan .....	34
4.1.1.2. Optimizacija fragmentora .....	35
4.1.1.3. Optimizacija kolizijske energije .....	37
4.1.1.4. LC kromatogrami .....	39
4.1.2. Kalibracijska krivulja na otapalu.....	40
4.1.3. QuEChERS ekstrakcija.....	41
4.1.4. Ekstrakcija organskim otapalom .....	44
<b>4.2. ELISA test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) .....</b>	<b>46</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>54</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>55</b>
<b>7. PRILOZI</b>	
<b>7.1. KROMATOGRAMI ODREĐIVANJA RT TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA</b>	

**7.2. KROMATOGRAMI ANALITA NAKON QuEACHERS EKSTRAKCIJE S Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> I Mg SO<sub>4</sub>**

**7.3. KALIBRACIJSKE KRIVULJE NA OTAPALU ZA POJEDINE ANALITE, DOBIVENE LC-MS/MS METODOM**

**7.4. MATRIKS KALIBRACIJSKE KRIVULJE POJEDINIH ANALITA, DOBIVENE LC-MS/MS METODOM NAKON PROČIŠĆAVANJA UZORKA QuEACHERS EKSTRAKCIJOM**

**7.5. MATRIKS KALIBRACIJSKE KRIVULJE POJEDINIH ANALITA, DOBIVENE LC-MS/MS METODOM NAKON PROČIŠĆAVANJA UZORKA EKSTRAKCIJOM ORGANSKIM OTAPALOM**

# 1. UVOD

Sve veći broj stanovnika i sve veći životni standard u cijelom svijetu zahtijevaju povećanu potražnju za proteinima životinjskog podrijetla, stoga je sve veća potreba za zaštitom životinja od zaraznih bolesti (Atta i sur., 2022). Vishnuraj i sur. (2016) navode da se 80 % od svih antibiotika koji se primjenjuju u veterini koriste kao promotori rasta. Neki lijekovi se koriste kroz određeni period života životinja, a neki od njih, kao što su stimulatori rasta, često se koriste tijekom cijelog života, iako je savjetovano da dugotrajnu uporabu antibiotika kao promotora rasta treba izbjegavati kako bi se spriječila pojava rezistentnih sojeva mikroorganizama (Singh i Bhunia, 2019). Većina detektiranih rezidua antibiotika potvrđenih u proizvodima životinjskog podrijetla bili su penicilini, streptomicini, polipeptidi, makrolidi, tetraciklini, kloramfenikol, sulfonamidi i kinoloni (Atta i sur., 2022). Tetraciklinski antibiotici intenzivno se koriste kao terapijski lijekovi za liječenje infekcija kod ljudi i životinja i kao dodaci hrani u subterapijskim dozama te kao promotori rasta. Većina tetraciklina koji se daju životinjama djelomično se metabolizira, a ti se metaboliti zajedno s izvornim spojevima izlučuju putem izlučevina pri čemu se primjenom stočnog otpada na poljoprivredna polja unose velike količine tetraciklina u ekosustav. Nadalje, tetraciklinski antibiotici se također izravno koriste u akvakulturi te u voćarstvu radi sprječavanja bolesti. Kao rezultat toga, tetraciklini se često nalaze u više okolnih medija, uključujući tlo, površinske vode i podzemne vode (Chen i sur., 2015). Meso i mesne prerađevine i dalje su primarni izvori rezidua antimikrobnih lijekova koji se koriste za liječenje životinjskih bolesti, međutim ostaci antibiotika mogu se pronaći i u mlijeku, jajima, pčelinjem vosku i medu (Atta i sur., 2022). U mliječnoj industriji zbog nekontroliranog rukovanja veterinarskim lijekovima kod životinja u laktaciji, nepostojanja evidencije o liječenju, korištenja neodobrenih lijekova i nepoštivanje vremena prekida uzimanja lijekova prije laktacije, dolazi do otpuštanja ovih lijekova u mlijeko što posljedično dovodi do velikih tehničkih problema u mliječnoj industriji, kao što su ometanje starter kulture i uzrokovanje prekida proizvodnje mliječnih proizvoda. Isto tako mogu inhibirati rast probiotičkih mikroorganizama tijekom proizvodnje jogurta, sira, acidofilnog mlijeka, itd. Nadalje, moguće zdravstvene opasnosti povezane s ostacima antibiotika u mlijeku su alergijske reakcije (penicilini i cefalosporini), kancerogeni učinci (sulfametazin i nitrofurazon), te nefrotoksičnost i ototoksičnost (aminoglikozidi) (Patel i Walker, 2004). Izloženost bakterija tetraciklinima u okolišu predstavlja prijetnju ekosustavu i ljudskom zdravlju. Niske koncentracije antibiotika u okolišu vrše selektivni pritisak na mikrobne zajednice pri čemu dolazi do razvoja i širenje bakterija otpornih na antibiotike. Koncentracije tetraciklina

pronađene u okolišu znatno su ispod koncentracija potrebnih za inhibicijski učinak bakterijske populacije osjetljive na antibiotike. Međutim, selektivni pritisak na bakterijske populacije izložene ovim antibioticima može rezultirati povećanjem gena za otpornost na antibiotike i povećanje broja bakterijskih sojeva otpornih na antibiotike, najvjerojatnije horizontalnim prijenosom gena između mikroorganizama (Chen i sur., 2015).

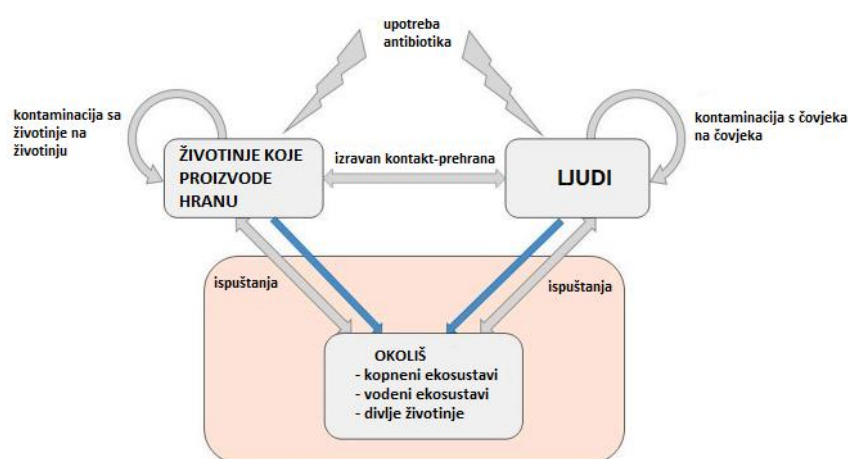
Analitičke metode mogu se koristiti u svrhu detekcije i/ili određivanje rezidua antibiotika u hrani, a dijele se u dvije kategorije: orijentacijske „screening“ metode te kvantitativne i/ili potvrdne metode (Wang i Turnipseed, 2012). U ovom radu za određivanje tetraciklinskih antibiotika u uzorcima mlijeka korištena je ELISA metoda i tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS) pri čemu su provedene različite metode ekstrakcije tetraciklina iz uzoraka. Korištene metode ekstrakcije su QuEChERS ekstrakcija pri čemu su korištene dva različita sorbensa ( $MgSO_4$  i  $Na_2SO_4$ ) te ekstrakcija tekuće-tekuće gdje je kao ekstraktant korišteno organsko otapalo acetonitril.

Cilj ovog rada bio je primijeniti LC-MS/MS metodu i ELISA test, usporediti korištene ekstrakcijske metode i detektirati prednosti i nedostatke istih.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. POJAVA REZISTENTNIH SOJEVA PATOGENA I „One Health“ KONCEPT

Jedan od glavnih problema postojanja rezidua lijekova je pojava rezistentnih sojeva bakterija koji mogu utjecati na samu životinju ili se prenijeti na ljudsku populaciju izravno iz okoline ili neizravno putem mlijeka, mesa i/ili jaja. Unatoč smanjenju primjene antibiotika, stopa rezistencije i distribucija bakterija otpornih na više lijekova raste (Atta i sur., 2022). Ako razvoj antimikrobne rezistencije nastavi rasti po trenutnoj stopi rasta, predviđa se da će „ako se ništa ne poduzme“, infekcije otporne na lijekove uzrokovati po 10 milijuna globalnih smrti do 2050. godine, nadmašujući one uzrokovane rakom. S obzirom na spomenuta predviđanja nacionalne i međunarodne vlasti razvile su i provode akcijske planove (nadzor, upravljanje, prevenciju i kontrolu infekcija te istraživanje i inovacije) za ublažavanje razvoja antimikrobne rezistencije. Antibiotici se u velikoj mjeri koriste u medicini ljudi i životinja te u proizvodnji hrane životinjskog porijekla (Haenni i sur., 2022), što dovodi do selektivnog pritiska pri čemu se antimikrobna rezistencija razvija kod ljudi i životinja koje koriste antibiotike (Furuya i Lowy, 2006). Nadalje, komenzalne ili patogene bakterije koje su otporne na antibiotike, razmjenjuju se između ljudi i životinja izravnim ili neizravnim prijenosom, putem prehrambenog lanca ili okoliša. Vezu između zdravlja životinja i ljudi, važnost okoline i ekosustava u toj vezi definira „One Health“ koncept (Hernando-Amado i sur., 2019). Žarišne točke za razvoj antimikrobne rezistencije i potencijalni putevi prijenosa bakterija otpornih na antimikrobne lijekove preko „One Health“ koncepta prikazani su na slici 1.



**Slika 1.** Tok antimikrobne rezistencije i antibiotika kroz životinje koje proizvode hranu, ljude i okoliš prikazano kroz „One Health“ koncept. Sive strelice ukazuju na tok gena rezistencije i rezistentnih bakterija; plave strelice označavaju protok rezidua antibiotika (Haenni i sur., 2022)

Općenito je poznato da će, kako bi bile uspješne, strategije za smanjenje razvoja i prijenosa bakterija otpornih na antimikrobne lijekove na ljude zahtijevati usklađeno djelovanje u cijelom sustavu „One Health“, tj. u sektoru ljudi, životinja i okoliša. Krajnji cilj u ljudskoj medicini i poljoprivrednoj proizvodnji je smanjenje korištenje antibiotika na najmanju moguću mjeru, kako bi se smanjio selekcijski pritisak i spriječio razvoj antimikrobne rezistencije kod ljudi i životinja koje se koriste u proizvodnji hrane i koje proizvode hranu (Haenni i sur., 2022).

### 2.1.1. Mehanizmi na kojima se temelji pojava i postojanost antimikrobne rezistencije u okolišu

Postoje određeni mehanizmi nastanka antimikrobne rezistencije te njene rasprostranjenosti u okolišu, a mogu se podijeliti na razini bakterije, bakterijske zajednice, mehanizama koji reguliraju bioraspoloživost i biodostupnost antibiotika te prijenosa gena odgovornih za otpornost na antibiotike (engl. *Antibiotic Resistance Genes*, ARG) na patogene bakterijske vrste u okolišu.

#### 2.1.1.1. Na razini bakterije

Na staničnoj razini, bakterijski odgovor induciran antibiotikom varirat će ovisno o dozi antibiotika kojoj su bakterije izložene te samoj bakterijskoj vrsti. Općenito je prihvaćeno da održavanje ARG-a predstavlja energetski trošak koji rezistentnu bakteriju stavlja u kompetitivno nepovoljniji položaj u odnosu na roditelje koji su osjetljivi na antibiotike. Ovaj nedostatak se može nadoknaditi kroz kompenzacijske mutacije koje su u ravnoteži s energetskim gubicima ili utjecajem vanjskih čimbenika poput prisutnosti subinhibitornih koncentracija antibiotika, tj. koncentracija ispod minimalne inhibitorne koncentracije. Ove niske koncentracije mogu pospješiti ekspresiju ARG-a tako što:

- (a) dolazi do inhibicije rasta populacije osjetljive na antibiotike pri čemu se promiče održavanje populacije otporne na antibiotike (Haenni i sur., 2022)
- (b) pogoduju stvaranju mutacija koje predstavljaju nizak biološki trošak za bakteriju, a koje omogućuju bakterijama postizanje niske razine otpornosti na različite klase antibiotika (Gullberg i sur., 2011)
- (c) dolazi do izazivanja SOS odgovora, koji zauzvrat ubrzava horizontalni prijenos ARG-a putem transdukcije ili konjugacije i smanjuje vjernost replikacije DNK, čime se povećava učestalost mutacija koje utječu, između ostalog, na gene koji su odgovorni za otpornost na antibiotike (Baharoglu i Mazel, 2014).

### 2.1.1.2. Na razini bakterijske zajednice

Unutar populacije ili zajednice, bakterije mogu surađivati kako bi se oduprle djelovanju antibiotika stvaranjem zaštitnih struktura kao što su biofilmovi, čijem nastanku može pogodovati izloženost bakterija subinhibitornim koncentracijama antibiotika. Većina bakterija se nalazi integrirana u biofilme, koji mogu biti izrazito heterogeni u strukturi, kemijski te sastavu bakterijske zajednice. Gradijenti pH, kisika i drugih akceptora elektrona te organskih hranjivih tvari mogu stvarati različita mikrookruženja. Bakterije koje žive u biofilmovima mogu biti otpornije na antibiotike od istih bakterija koje nisu u biofilmovima (Flemming i sur., 2016). Prvo, matriks biofilma predstavlja fizičku prepreku za transport antibiotika do bakterijskih stanica. Drugo, smanjenja koncentracija hranjivih tvari u mikrookolinama dovodi bakterije do održivog, ali nekultivirajućeg stanja (definiraju se kao žive bakterije, ali one nemaju sposobnost rasta niti dijeljenja) koje može smanjiti njihovu osjetljivost na antibiotike (Haenni i sur., 2022), što je strategija preživljavanja mnogih bakterija u okolišu kao odgovor na nepovoljne uvjete okoline. Takve bakterije nije moguće uzgajati na konvencionalnim podlogama (ne stvaraju kolonije na čvrstim podlogama, ne mijenjaju izgled bujona) (Fakruddin i sur., 2013). Treće, postojanje suradnje između bakterijskih zajednica, na primjer omogućujući bakterijama osjetljivim na  $\beta$ -laktamske antibiotike da prežive u neposrednoj prisutnosti bakterija koji proizvode  $\beta$ -laktamazu, enzim koji hidrolizira navedenu skupinu antibiotika. Unutar takve višestanične strukture trebala bi barem jedna bakterijska vrsta u zajednici proizvoditi enzim koji hidrolizira antibiotik kako bi bakterije koje su osjetljive na taj antibiotik bile zaštićene takvim mehanizmom rezistencije (Meredith i sur., 2015). Isto tako, *quorum sensing* može neizravno utjecati na otpornost bakterija na antibiotike (Haenni i sur., 2022).

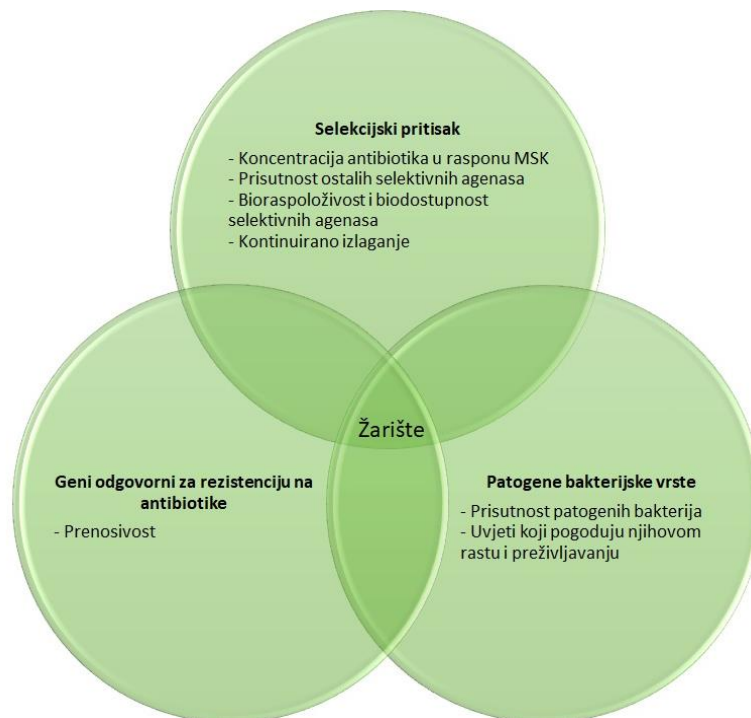
### 2.1.1.3. Mehanizmi koji reguliraju bioraspoloživost i biodostupnost antibiotika

Biodostupnost izražava ograničenje u vremenu i/ili prostoru, a povezana je sa staništem i mora se posebno razmatrati u složenim matriksima, gdje većina bakterija tvori biofilme koji predstavljaju fizičku barijeru transportu antibiotika do površina stanica (Flemming i sur., 2016). Bioraspoloživost ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima aktivnog spoja, a pod utjecajem je uvjeta okoline i interakcija s okolnim matriksom. Kod tetraciklinskih antibiotika, prisutnost dvovalentnih kationa  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , koji su široko rasprostranjeni u vodi, smanjuje bioraspoloživost tetraciklina stvaranjem stabilnog tetraciklin-metal kompleksa. Nadalje, njihova bioraspoloživost je i pod snažnim utjecajem njihove sposobnosti povezivanja s otopljenim organskim tvarima. Kompleksiranje tetraciklina s otopljenim organskim tvarima u vodenoj otopini može promijeniti bioraspoloživost tetraciklina bakterijama, čime se smanjuje

djelovanje selektivnog pritiska za razvoj rezistencije na antibiotike. Nadalje, adsorpcija organskih tvari na površinu bakterijskih stanica otežava difuziju do bakterijskih stanica, s time da brzina difuzije ovisi o količini adsorbirane organske tvari te afinitetu tetraciklina za organsku tvar, pri čemu se može zaključiti da se bioraspoloživost tetraciklina za bakterije smanjuje s povećanjem količine otopljene organske tvari. Smanjenom bioraspoloživošću tetraciklina bakterijama snižava se selektivni pritisak, pri čemu se smanjuje razvijanje otpornosti na antibiotike. Adsorpcija tetraciklina u tlu smanjuje njegovu bioraspoloživost bakterijama, čime se smanjuje selektivni pritisak na mikrobne zajednice (Chen i sur., 2015).

#### 2.1.1.4. Prijenos ARG-a na patogene bakterijske vrste u okolišu

Mikrobne zajednice u okolišu predstavljaju rezervoar ARG-ova koji imaju potencijal prijenosa u patogene bakterije putem mobilnih genetskih elemenata (Nesme i Simonet, 2015). Slika 2 prikazuje uvjete koji pogoduju pojavi patogenih bakterijskih sojeva koji sadrže nove ARG-ove. Vjerojatnost ovog nastanka povećava se s intenzitetom kontaminacije okoliša patogenim bakterijama i ovisi o prisutnosti selektivnih agenasa (Haenni i sur., 2022).



**Slika 2.** Uvjeti okoline koji pogoduju transferu gena odgovornih za otpornost na antibiotike na patogene bakterijske vrste (Haenni i sur., 2022)

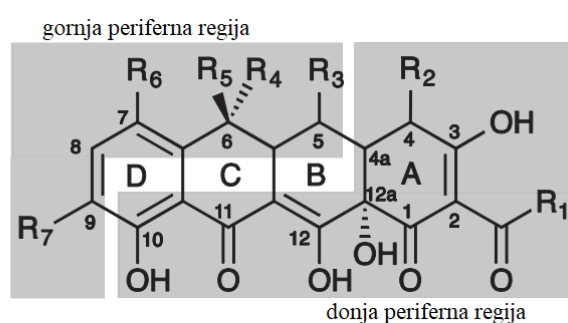
Selekcija bakterija otpornih na antimikrobne spojeve vjerojatnija je u okolišu kontaminiranom s jednim ili više antimikrobnih spojeva, okruženja bogata autohtonim bakterijama, alohtonim potencijalno patogenim bakterijama i prisutni antimikrobni spojevi su moguća žarišta za razvoj novih bakterija otpornih na antimikrobne lijekove koje sadrže nove



ARG-ove. Evolucija otpornosti na antibiotike u zajednicama bakterijskog biofilma brža je nego u planktonskim zajednicama, budući da fizička blizina bakterija unutar biofilma olakšava horizontalni prijenos gena konjugacijom. Horizontalan prijenos gena smatra se glavnim pokretačem evolucije bakterija, međutim stopa prijenosa uvelike ovisi o brojnim uvjetima okoline. Antropogene aktivnosti pogoduju diverzifikaciji ARG-a i njihovom širenju među različitim vrstama bakterija.

## 2.2. TETRACIKLINSKI ANTIBIOTICI

Tetracikline je prvi otkrio Benjamin Duggar, 1948. godine, kao prirodne proizvode vrste *Streptomyces*, a od tada je dokazano da spadaju u ekonomski vrijednu skupinu lijekova. Prema kemijskoj strukturi svrstavaju se u skupinu aromatskih poliketidnih antibiotika. Takva struktura tetraciklina omogućuje mnoge interakcije zbog prisutnosti keto-enolnih funkcionalnih skupina na jednoj strani strukturnog „kostura“ molekule, dajući im sposobnost za keliranje dvovalentnih kationa, što ima značajnu ulogu za njihove biološke funkcije (Zakeri i Wright, 2008). Temeljna struktura tetraciklinskih antibiotika sastoji se od četiri ugljikovodična prstena koji su linearno povezani te sadrže različite funkcionalne skupine (slika 3).



SPOJ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
TETRACIKLIN	NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 4S konfiguracija	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H
OKSITETRACIKLIN	NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 4S konfiguracija	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H	H
KLORTETRACIKLIN	NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 4S konfiguracija	H	CH <sub>3</sub>	OH	Cl	H

**Slika 3.** Struktura tetraciklinskih antibiotika (proizvoda *Streptomyces* vrsta) (Petković i sur., 2017; Nelson i Levy, 2011)

### 2.2.1. Razvoj tetraciklinskih antibiotika

Prvi opisani tetraciklinski antibiotici su klortetraciklin i oksitetraciklin, a otkriveni su krajem 1940-ih godina, tijekom ranog razdoblja zlatnog doba otkrića antibiotika. Otkrićem prve

generacije tetraciklinskih antibiotika, Pfizer i Lederle započeli su razvoj druge generacije tetraciklina s boljim farmakokinetičkim i antimikrobnim svojstvima te reduciranom toksičnošću (Nguyen i sur., 2014). Ovi spojevi su lipofilniji od svojih matičnih spojeva i kao rezultat toga imaju bolje apsorpcijske i farmakokinetičke parametre (Agwuh i MacGowan, 2006). Doksiciklin, a posebice minociklin, pokazuju jače antimikrobno djelovanje u usporedbi s tetraciklinom kod niza Gram-negativnih (npr. *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) i posebno Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*) bakterija (Nguyen i sur., 2014). Nedavno su razvijeni tetraciklini treće generacije, koji uključuju polusintetske glicilcikline i amino-metilcikline (Zakeri i Wright, 2008). Mnogi od spojeva bili su djelotvorni protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, inhibirajući oboje, osjetljive i rezistentne sojeve. U tetracikline treće generacije spada i tigeciklin, koji je za kliničku upotrebu odobren 2006. godine od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*), a karakterizira ga veći afinitet za ribosom od minociklina (Petković i sur., 2017; Nguyen i sur., 2014).

### 2.2.2. Mehanizam djelovanja tetraciklina

Tetraciklinski antibiotici djeluju inhibirajuće na biosintezu proteina, transportom difuzijom te aktivnim transportom (nasuprot koncentracijskom gradijentu) ulaze u stanicu bakterija, a koncentracija tetraciklina unutar stanice puno je veća od koncentracije tetraciklina izvan nje. Princip djelovanja uključuje vezanje tetraciklina na receptore 30S ribosomalne podjedinice mikroorganizama, pri čemu se blokira vezanje aminoacil-tRNA (transportna RNA) na akceptorsko mjesto na mRNA ribosomalnom kompleksu što sprječava ugradnju novih aminokiselina u rastući polipeptidni lanac tj. produljivanje peptidnog lanca (Reeves, 2012). Stanice sisavaca ne posjeduju ovakav aktivni oblik transportnog sistema, što znači da tetraciklini neće imati učinak na sintezu proteina u humanim stanicama (Bedenić, 2009).

### 2.2.3. Rezistencija i mehanizmi rezistencije na tetraciklinske antibiotike

Otpornost bakterijama na tetracikline omogućeno je uz pomoć najmanje tri mehanizma. Jedan mehanizam uključuje efluks tetraciklina iz bakterijskih stanica i rezultat je gena otpornosti koji kodira za membranski protein koji aktivno pumpa tetracikline iz bakterijskih stanica (Reeves, 2012). Efluks je najrašireniji mehanizam otpornosti na tetracikline pri čemu najveću skupinu „pumpi“ čine antibiotik- $H^+$  antiporter, koji su odgovorni za izmjenu protona ( $H^+$ ) i tetraciklinske molekule suprotno gradijentu koncentracije (Nguyen i sur., 2014). Drugi mehanizam uključuje prekomjernu ekspresiju gena koji kodira za protein koji sprječava vezanje

tetraciklina na bakterijske ribosome. Treći i najrjeđi mehanizam uključuje acetilaciju tetraciklina, pri čemu prelazi u inaktivan oblik (Reeves, 2012). Isto tako u manje prevladavajući mehanizam otpornosti bakterija na tetraciklinske antibiotike spada modifikacija tetraciklina koja uključuje dva različita gena koji kodiraju za monooksigenaze, koje modificiraju tetracikline i promiču njihovu degradaciju i mutacije unutar 16S rRNA koje smanjuju afinitet vezanja lijeka za ribosom (Caryl i sur., 2012). Monooksigenaze su odgovorne za hidroksilaciju tetraciklina pri čemu dolazi do promjene kemijskih svojstava lijeka tako da se smanjuje afinitet lijeka za ribosom. S obzirom na to da je za aktivnost monooksigenaza potreban kisik, ovakav mehanizam rezistencije može se pronaći samo kod bakterija koje rastu u aerobnim uvjetima (Nguyen i sur., 2014).

### **2.3. METODE PROČIŠĆAVANJA REZIDUA IZ MATRIKSA**

Potrebno je provesti efikasnu ekstrakciju te pročišćavanje, kako bi uspješno detektirali široki spektar antibiotika koji se potencijalno mogu pronaći u hrani životinjskog podrijetla. Potrebno je ukloniti što više matriksa kako bi on imao što manje utjecaja na rezultate masene spektrometrije. Zbog ekstenzivnog metabolizma kod životinja nakon primjene antibiotika, količina prisutnih rezidua može uvelike varirati između ciljanih tkiva. Ciljani analit koji se analizira je ponekad samo matični spoj, ali također može biti metabolit, zbroj matičnog spoja i/ili metabolita ili spoj nastao kemijskom pretvorbom matičnog spoja i metabolita. Slobodni rezidui matičnih spojeva i metabolita lako se ekstrahiraju organskim otapalima, vodom ili vodenim puferima, ovisno o njihovoj topivosti i polarnosti (Stolker i Danaher, 2012).

#### **2.3.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće**

Ekstrakcija tekuće-tekuće bila je jedna od prvih tehnika pripreme uzoraka te i dalje ima široku primjenu kod analize bioloških uzoraka. Temelji se na prijenosu analita iz vodenog medija u otapalo koje se ne miješa s vodom. Općenito, većina ekstrakcija tekuće-tekuće kao učinkovita sredstva za ekstrakciju koriste organska otapala. Stoga, acetonitril spada među poželjna ekstrakcijska otapala jer daje dobre prinose ekstrahiranih rezidua, niske koncentracije koekstrakata matriksa te je učinkovit u denaturiranju proteina i inaktivaciji enzima. Tijekom analize više rezidua postoji balans između ekstrakcijskog prinosa i čistoće ekstrakta. Razrjeđivanje ekstrakata može smanjiti utjecaj matriksa na kasnija mjerenja (Stolker i Danaher, 2012).

### 2.3.2. QuEChERS ekstrakcija

Naziv QuEChERS označava brzo, jednostavno, jeftino, učinkovito, robusno i sigurno (engl. *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*), a metoda spada među postupke ekstrakcije. U QuEChERS-u se dodaje uzorak visoke vlažnosti te se provodi ekstrakcija organskim otapalom (acetonitril, etilacetat ili aceton). Dodavanje soli (bezvodni magnezijev sulfat ( $MgSO_4$ ), natrijev klorid ( $NaCl$ ) i/ili sredstva za puferiranje) u ekstrakcijski medij izaziva odvajanje otapala i vodene faze. Ciljani analiti nalaze se u organskoj fazi tj. u ekstraktantu, a matriks i koekstrakti prelaze u vodenu fazu. Nakon miješanja i centrifugiranja, supernatant tj. organska faza podvrgava se daljnjem pročišćavanju koristeći disperzivnu ekstrakciju na čvrstoj fazi (dSPE, engl. *dispersive solid phase extraction*), miješanjem sorbensa kao što su  $MgSO_4$ , primarni sekundarni amin (PSA) i/ili aktivni ugljen s ekstraktom. U QuEChERS metodi dSPE se koristi za adsorpciju matriksa iz ekstrakta na sorbens, ostavljajući analite od interesa u ekstraktu kako bi imali što bolje pročišćavanje. Dodaje se bezvodni  $MgSO_4$  kako bi se osiguralo dodatno uklanjanje vode, poboljšala ekstraktivna sposobnost otapala i uklonile komponente matriksa. Nakon centrifugiranja supernatant se može analizirati izravno ili se može podvrgnuti koncentriranju i/ili izmjeni otapala ako je potrebno. dSPE je iznimno učinkovita tehnika, a može se prilagoditi različitim analitima i matriksima pažljivim odabirom sorbensa (Stolker i Danaher, 2012).

## 2.4. METODE DETEKCIJE REZIDUA

Detekcija rezidua provodi se korištenjem osjetljivih testova s niskom stopom lažno negativnih rezultata, a strategija se temelji na dva koraka. Prvi korak obuhvaća „screening“ metode, nakon kojih slijedi potvrdna metoda za pozitivne rezultate (Mensah i sur., 2014). Mikrobna „screening“ metoda koristi se za detekciju inhibitornih supstancija u proizvodima životinjskog podrijetla, a najčešće se koristi za detekciju antibiotika. Nespecifična je metoda i obuhvaća širok spektar antimikrobnih lijekova. Može se izvoditi u epruveti s hranjivim medijom te Petrijevoj zdjelici s inokuliranim hranjivim agarom. Odsutnost ili kašnjenje razvijanja boje zbog nastale kiseline koju stvara rastuća kolonija bakterija u epruveti ili pojava inhibicijske zone u zdjelici koja sadrži inokulirani hranjivi agar ukazuje na inhibiciju rasta što pak označava pozitivan uzorak tj. prisutnost rezidua antimikrobne tvari. Ova se metoda još uvijek koristi kao brzi test na rezidue antibiotika (Wu i sur., 2021). Trenutno su dostupne različite vrste brzih testova kao „screening“ metoda za rezidue antibiotika, a mogu se općenito

klasificirati kao imunotestovi ili enzimski testovi prema principu rada. Brzi testovi općenito daju kvalitativne ili polukvantitativne rezultate. Imunološka metoda koristi se za otkrivanje antimikrobnih tvari, hormona i  $\beta$ -agonista u mesu, mlijeku ili jajima (Chen i sur., 2015). Izraz imunotest opisuje metode koje detektiraju specifične interakcije između antitijela i antigenog analita (Stead i Stark, 2012; Rosner i sur., 1991), a dijele se u dvije osnovne kategorije, izravne ili neizravne, ovisno o tome mjeri li se primarna reakcija antitijelo-antigen ili sekundarna reakcija. Prednosti koje se povezuju s imunotestovima uključuju niske granice detekcije, specifičnost, jednostavnost, lakoću automatizacije i smanjeno vrijeme analize. U imunotestove za analizu rezidua veterinarskih lijekova spada ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) test (Stead i Stark, 2012). Kromatografske metode su široko primijenjene za određivanje velikog broja veterinarskih lijekova kao ostataka u hrani životinjskog podrijetla, primjerice u mesu, mlijeku, jajima, propolisu i ostalim proizvodima. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) i tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (engl. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) kombinirana s masenom spektrometrijom mogu se koristiti za detekciju više različitih rezidua. Primjena HPLC-a kombiniranog s masenom spektrometrijom, koristi se kao potvrdna metoda u pozitivnim uzorcima nakon inicijalnih „screening“ metoda (Chen i sur., 2015).

#### 2.4.1. Orijentacijske „screening“ metode

##### 2.4.1.1. Test mikrobne inhibicije

Testovi mikrobne inhibicije pripadaju u „screening“ metode koje nude prednost određivanja biološke aktivnosti nepoznatih rezidua (neciljana analiza). Koriste se kada je potrebno procijeniti prisutnost antimikrobnih spojeva, a baziraju se na osjetljivosti na spojeve koji inhibiraju ili ometaju rast ispitivanog mikroorganizma (Stead, 2000). Sposobnost bakterija da proizvode kiselinu dovela je do razvoja mikrobioloških metoda za detekciju antimikrobnih spojeva. Kultura *Streptococcus agalactiae* korištena je za detekciju penicilina u kravljem mlijeku inkubiranjem uzoraka nekoliko dana na 37 °C koristeći lakmus kao indikator boje (Stead i Stark, 2012; Watts i McLeod, 1946). Metoda difuzije u agaru, temeljena na određivanju inhibicijske zone standardnog testnog mikroorganizma necijepljenog na ploče s agarom, spada među najraširenije „screening“ metode (Stead i Stark, 2012).

#### 2.4.1.2. ELISA test

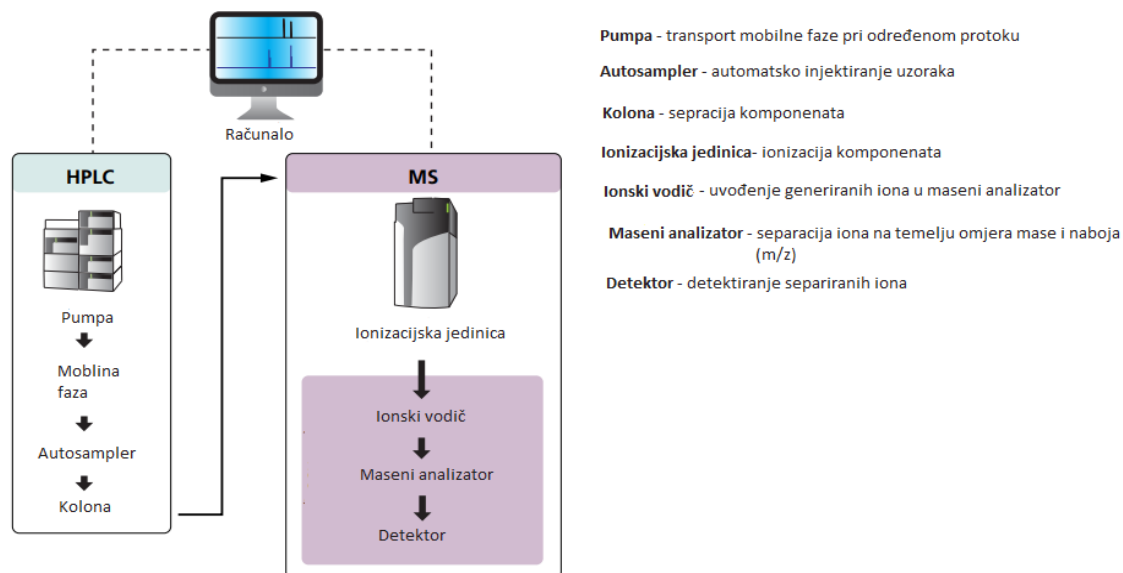
ELISA spada među najkorištenije imunotestove. U svom najjednostavnijem obliku, ELISA je direktni kompetitivni test u kojem je antigen ili antitijelo vezano za čvrstu površinu, pri čemu nema problema tijekom separacije jer dolazi do reakcije između nevezane i vezane komponente, ostatak se uklanja, a vezana komponenta zaostaje u obliku u kojem je moguće provesti mjerenje. Mjerenje se postiže upotrebom enzimske oznake koja se može vezati na antigen ili antitijelo, a najčešće korištene oznake su peroksidaza hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*), alkalna fosfataza i  $\beta$ -d-galaktozidaza (Bonwick i Smith, 2004). Dodatkom odgovarajućeg enzimskog supstrata, označena komponenta se može detektirati pa čak i kvantificirati. Konverzija supstrata u produkt dovodi do oslobađanja iona koji reagira sa sekundarnim spojem, što rezultira promjenom koja se može mjeriti spektrofotometrijski ili elektrokemijski (Stead i Stark, 2012; Adrian i sur., 2008). Stoga se kod direktne ELISE analit natječe s analitom koji je enzimski označen za vezanje s određenom količinom antitijela koja su imobilizirana u jažice. Slijedi inkubacija te uklanjanje nevezanih spojeva ispiranjem, a zatim se dodaje kromogeni supstrat pri čemu će izmjerena enzimaska aktivnost biti obrnuto proporcionalna koncentraciji analita. Kod indirektnog testa analit je konjugiran s makromolekularnim nosačem, nanesen preko jažica u fazi inkubacije, u koje se zatim dodaje ekstrakt uzorka te specifično antitijelo. Imobilizirani analit i analit koji se nalazi u uzorku natječu se za povezivanje s antitijelom te se nakon faze ispiranja količina vezanog specifičnog antitijela određuje se uz pomoć sekundarnog antitijela koji je označen enzimom (Goryacheva i De Saeger, 2011). Postoji tzv. „sendvič“ ELISA u kojoj je ciljani analit vezan između dva antitijela, prihvatnog (nalazi se vezan na površinu nosača) i detektirajućeg antitijela, pri čemu je važno da oni prepoznaju strukturne regije na ciljanom analitu, koje se međusobno ne preklapaju. Kada se antigen veže za prihvatno antitijelo, područje koje prepoznaje detektirajuće antitijelo ne smije biti zaklonjeno ili promijenjeno na bilo koji način. Prvo dolazi do prihvata, a zatim do detekcije antigena dodatkom te konverzijom supstrata u obojeni produkt. Monoklonska protutijela imaju svojstvenu monospecifičnost prema jednoj regiji koja pruža izvanredne granice detekcije i pouzdanu kvantifikaciju, stoga se često koriste kao detekcijsko protutijelo. Komplementarno poliklonsko antitijelo se može koristiti kao prihvatno antitijelo za oporavak što je više moguće antigena. Kalibracijski standardi koriste se u ELISA testu za dobivanje standardne krivulje pri čemu se može odrediti količina ciljnog analita u nepoznatom uzorku. Tipično se koriste kromogeni supstrati, čijim korištenjem dolazi do razvijanja obojenja

i većina primjene ELISA testa opisane u literaturi ili komercijalno dostupne za analizu rezidua antibiotika temelje se na spomenutom (Stead i Stark, 2012; Adrian i sur., 2008).

## 2.4.2. Potvrđne metode

### 2.4.2.1. Tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (LC-MS)

Temelj analitičke metode spektrometrije masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je razdvajanje iona pod utjecajem električnog ili magnetskog polja u plinskoj fazi koja se nalazi pod visokim vakuumom, pri čemu se razdvojeni ioni detektiraju na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Dobiveni spektar masa predstavlja skup svih ionizabilnih masa pojedinačnih sastojaka u uzorku te je pomoću dobivenog spektra moguće odrediti sastav uzorka. Ionizacija elektroraspršivanjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) i matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) najčešće su tehnike spektrometrije masa (Butorac i sur., 2013), a među najbitnije komponente masene spektrometrije spada i analizator pri čemu se najviše primjenjuju kvadrupolni i TOF (engl. *Time of Flight*) analizatori (Cindrić i sur., 2009). Spektrometrija masa nerijetko se koristi u kombinaciji s kromatografskim instrumentima pri čemu se uglavnom koriste separacijske tehnike tekućinska (engl. *Liquid Chromatography*, LC) i plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) (Butorac i sur., 2013). Tipični LC-MS sustav prikazan je na slici 4.



**Slika 4.** Temeljne komponente LC-MS sustava (Ichiro, 2019)

LC omogućuje separaciju tvari na temelju različite razdiobe istih između stacionarne i mobilne faze. Najčešće je korištena kromatografija obrnutih faza u kojoj je mobilna faza polarno otapalo, a stacionarna faza je nepolarna, silika-gel pokriven dugolančanim

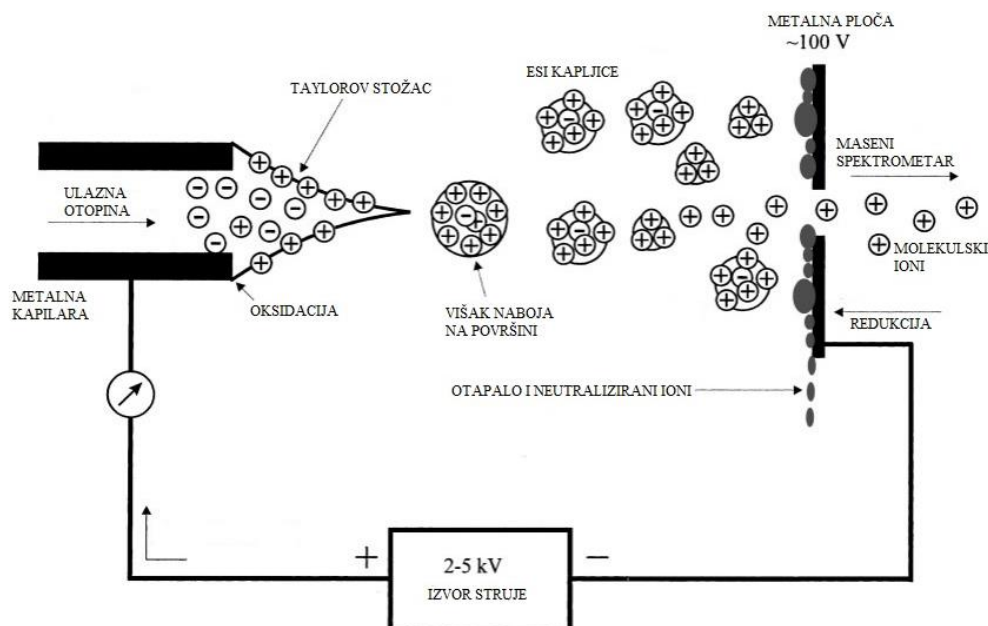
ugljikovodicima C8 ili C18. Pri određivanju pojedinih sastojaka hrane većinom se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) koju karakterizira iznimno dobra razlučivost i reproducibilnost, stoga se koristi kod odjeljivanja aminokiselina, vitamina, organskih kiselina, šećera, mikotoksina, antibiotika, pesticida, proteina, lipida i pigmenata (Reuhs i Rounds, 2010). Povezivanjem LC-a s MS-om, maseni spektri dobiveni ovakvim mjerenjem pružaju informacije o molekularnim masama te strukturne informacije za eluirane komponente, a spomenute informacije nadopunjuju kvalitativne informacije temeljene na retencijskim vremenima dobivenim LC mjerenjem (Ichiro, 2019). Održavanje LC-MS sustava je potrebno kako bi se osigurala ponovljivost kromatograma i osjetljivost MS-a, a uključuje temeljito čišćenje kolone i regeneraciju, čišćenje ionskog izvora MS-a i/ili korištenje ventila za preusmjerenje (Stolker i Danaher, 2012).

### **Ionizacija elektroraspršenjem (ESI)**

Kako bi mogli provesti analizu uzorka pomoću spektrometrije masa, potrebno je uzorak prevesti u plinovito stanje i ionizirati. ESI (engl. *Electrospray Ionization*) je pogodna metoda za ionizaciju slabo hlapljivih i termički nestabilnih uzoraka, a spada među desorpcijske metode ionizacije pri čemu se uzorak iz tekućeg stanja direktno prevodi u ionizirani plin pri čemu takav način omogućuje izravno spajanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. ESI se sastoji od tri ključna događaja: proces nastajanja kapljica, smanjivanja kapljica te nastajanje iona u plinovitoj fazi (Cech i Enke, 2001). Mehanizam uključuje više uzastopnih elektrokemijskih reakcija čiji je cilj prevođenje iona analita u plinovito stanje. Princip se sastoji od prolaska otopine u kojoj je prisutan analit kroz metalnu kapilaru (slika 5) protokom od 0,1 do 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , na čijem se vrhu primjenjuje jako električno polje čiji napon može biti negativan i pozitivan ovisno o analitu, stvarajući gradijent električnog polja koji je bitan da bi se desilo razdvajanje naboja na površini tekućine. Kao rezultat tekućina izlazi iz vrha kapilare u obliku „Taylorovog stošca“ (Taflin i sur., 1989). Točka u kojoj su odbojne Coulombove sile na površine jednake napetosti površine tekućeg stanja, naziva se Rayleighov limit te nakon njegovog dostizanja, dolazi do odvajanja kapljica koje sadrže višak negativnog ili pozitivnog naboja s vrha stošca. Odvojene kapljice kreću se prema ulazu u maseni spektrometar pri čemu se generiraju nabijene molekule analita (molekulske ione) čije nastajanje se događa zbog isparavanja otapala i povećane gustoće naboja pri čemu se veće kapljice dijele u manje kapljice dok u konačnici zaostaje kapljica radijusa 1 nm u kojoj se nalazi jedan ion tj. isparavanjem



otapala zaostaje ion u plinovitoj fazi što potpomaže inertni plin, kao što je dušik (Cech i Enke, 2001).

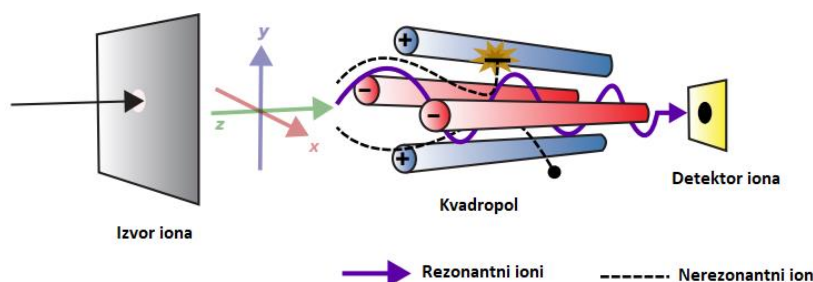


**Slika 5.** Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem (Cech i Enke, 2001)

ESI spada među najblaže metode ionizacije, što znači da je fragmentacija minimalna i može se koristiti za visoko polarne, nehlapljive ili termički nestabilne spojeve. Rezultat ESI ionizacije spojeva su protonirani (ili deprotonirani) molekularni ioni i adukcijski ioni te je determinacija molekularne mase spojeva vrlo jednostavna (Ichiro, 2019).

### Kvadrupolni maseni analizator

Masena spektrometrija uključuje kontrolu kretanja iona primjenom elektrostatskih polja. Jedan od glavnih dijelova masenog spektrometra je analizator masa u kojemu dolazi do razdvajanja iona različitog  $m/z$ . Najčešće korišteni maseni analizatori su kvadrupol i TOF analizator te hibridni analizatori nastali kombinacijom spomenutih. Kvadrupolni maseni analizator, kao što mu ime kaže, sadrži četiri paralelne cilindrične metalne šipke (elektrode s hiperboloidnom unutarnjom površinom) koje se nalaze unutar vakuumske komore, smještene na jednakoj udaljenosti od središnje osi (slika 6).



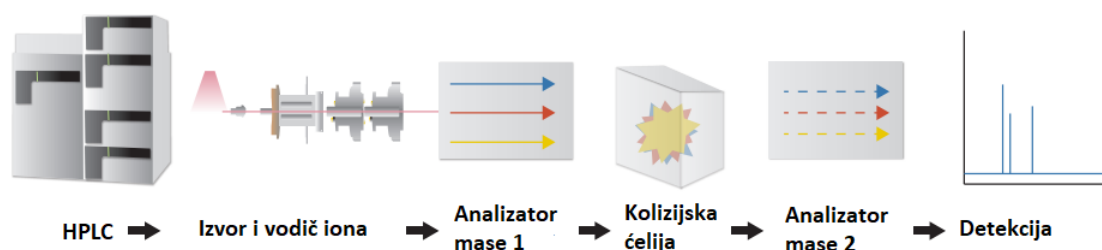
**Slika 6.** Shematski prikaz rada kvadrupolnog analizatora masa (Ichiro, 2019)

Istosmjerna struja i izmjenična struja visoke frekvencije ili radiofrekvencija primjenjuju se na kvadrupol, tako da samo ioni s ciljnim  $m/z$  uspješno prolaze kroz isti te dolaze do detektora. Količina iona koja dođe do detektora pretvara se u signal koji je vidljiv na računalu. Kontinuirani izvor iona generiranih u jedinici za ionizaciju prvo se ubrzava u  $z$ -smjeru (slika 6, zelena strelica) relativno slabim naponom od samo nekoliko desetaka volti. Ovi ioni prolaze kroz maleni otvor te ulaze u kvadrupol. Napon istog polariteta primjenjuje se na dijagonalno suprotne elektrode, a napon suprotnog polariteta primjenjuje se na susjedne elektrode što je prikazano kao plave i crvene šipke na slici 6. Kada kombinaciju istosmjernog napona i visokofrekventnog izmjeničnog napona primijenimo na svaku elektrodu, unutar kvadrupola stvara se električno polje s brzo promjenjivom fazom (pulsirajuće električno polje). Posljedično, ioni koji prolaze ovo električno polje osciliraju u smjerovima  $x$  i  $y$ . Kada se zadani skup parametara primjeni na elektrode, ioni određenog  $m/z$  raspon zadržavaju stabilne oscilacije te prolaze kroz kvadrupol i stižu do detektora. Spomenuti ioni nazivaju se rezonantni ioni (slika 6). Nasuprot tome, oscilacije iona s drugim vrijednostima  $m/z$  vrijednosti postaju nestabilne, zbog čega se ioni sudaraju sa šipkama, izletavajući izvan sustava pri čemu ne budu detektirani. Takvi ioni su nerezonantni ioni. Budući da je načelo razdvajanja kvadrupolnog masenog spektrometra jednostavno, njime je relativno lako upravljati te ga održavati. Također, kvadrupol je kompaktan u dizajnu, robustan i relativno jeftin. Stoga je naširoko prihvaćen kao analitički instrument opće namjene (Ichiro, 2019).

#### 2.4.2.2. *Tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)*

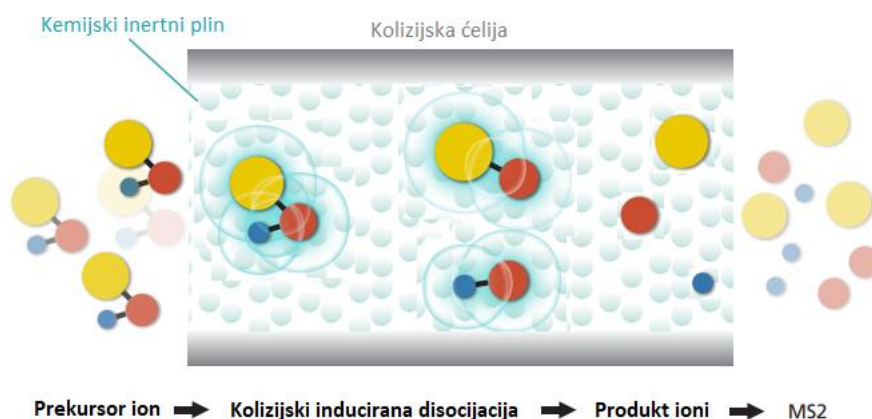
MS je vrlo koristan alat u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi jer se njime mogu identificirati analiti na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) i pružiti točne informacije o masi, elementarnom sastavu, izotopnom sastavu i strukturne informacije. Međutim, postoje ograničenja u korištenju jednog masenog spektrometra koji možda neće pružiti pouzdane podatke kvantitativne i kvalitativne informacije u slučajevima u kojima je razlučivost nedostatna (teško odvojive komponente) u slučaju kromatografije i omjera mase i naboja (npr. izomeri). Takav je slučaj kad je matriks složen, a ciljni analiti se nalaze u koncentraciji u tragovima. Stoga, tehnika koja osigurava veću selektivnost, specifičnost i osjetljivost te daje dodatne jedinstvene informacije o masi i strukturi ciljnih analita je MS/MS sustav, poznat kao tandemska spektrometrija masa, a sastoji se od dva povezana analizatora mase u nizu s kolizijskom ili fragmentacijskom ćelijom između. Ioni se separiraju u prvom analizatoru mase (MS1), ulaze u kolizijsku ćeliju što rezultira stvaranjem iona (produkt ioni) koji se odvajaju u drugom analizatoru mase (MS2) te zatim odlaze na detektor. MS/MS ima mnoge primjene kao

što su otkrivanje i razvoj lijekova, strukturna analiza polisaharida i proteina i kvantitativne analize. Osnovne komponente LC-MS/MS sustava prikazane su na slici 7.



**Slika 7.** Osnovne komponente LC-MS/MS sustava (Ichiro, 2019)

Kolizijski inducirana disocijacija (CID) je preferirana metoda fragmentacije u kolizijskoj ćeliji (slika 8), a fragmentacijom prekursor iona dobivaju se jedinstveni spektri fragmentiranih iona. Pomoću MS1 odabiru se prekursor ioni određenog omjera mase i naboja te ulaze u kolizijsku ćeliju ispunjenu s kemijski inertni plin (npr. He, Ar, Xe i N<sub>2</sub>) gdje dolazi do kolizije između prekursor iona i molekula inertnog plina primjenom oscilirajućeg elektromagnetskog polja.



**Slika 8.** Shematski prikaz CID-a u kolizijskoj ćeliji MS/MS sustava (Ichiro, 2019)

Kolizije izazivaju pretvorbu kinetičke energije u unutarnju energiju pri čemu dolazi do pucanja kemijske veze stvarajući produkt ione. Stupanj fragmentacije prekursorskog iona i vrsta produkt iona ovisi o količini dovedene energije jer neke veze zahtijevaju veću aktivacijsku energiju od drugih za pucanje. Trostruki kvadrupol (engl. *Triple Quadrupole*, TQ) najjednostavniji je i najčešći MS/MS sustav. Sastoji se od tri kvadrupola raspoređenih u seriji s time da prvi i treći kvadrupol djeluju kao MS1 odnosno MS2, a CID ćelija se nalazi u drugom kvadrupolu (Ichiro, 2019).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA-TANDEMSKA SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS)

##### 3.1.1. Laboratorijska oprema i kemikalije

###### 3.1.1.1. Materijal

Materijali su uzorci kravljeg mlijeka. Odvage kravljeg mlijeka korištenog prilikom ekstrakcije organskim otapalom te QuEACHERS ekstrakcije prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1.** Mase uzoraka mlijeka korištenih u pročišćavanju uzoraka ekstrakcijom i QuEACHERS ekstrakcijom

Redni broj uzorka mlijeka	Masa mlijeka (g) način pročišćavanja: ekstrakcija organskim otapalom	Masa mlijeka (g) način pročišćavanja: QUEACHERS ekstrakcija
1.	2,021	5,026
2.	2,004	5,021
3.	2,019	5,019
4.	2,031	5,028
5.	2,006	5,031
6.	2,004	5,033
7.	2,020	5,013
8.	2,023	5,037
9.	-	5,023
10.	-	5,003
11.	-	5,016

###### 3.1.1.2. Kemikalije

- Acetonitril ( $C_2H_3N$ ), LC-MS čistoće, Biosolve Chimie
- Amonijev acetat ( $CH_3COONH_4$ ), Sigma Aldrich
- Dimetil sulfoksid (DMSO,  $C_2H_6OS$ ), HPLC grade, Honeywell Burdick Jackson
- Dinatrijev etilendiamintetraacetat ( $Na_2EDTA$ ,  $C_{10}H_{14}N_2O_8 \times 2Na \times 2H_2O$ ), Sigma Aldrich
- Magnezijev sulfat ( $MgSO_4$ ), Honeywell Burdick Jackson

- Metanol (MeOH, CH<sub>3</sub>OH), LC-MS čistoće, Biosolve Chimie
- Metanska kiselina (HCOOH), LC-MS čistoće, Honeywell Burdick Jackson
- Natrijev sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Sigma Aldrich
- Ultračista voda (H<sub>2</sub>O), Milli-Q system Millipore®
- Quechers soli; EMR-Lipid dSPE tube (Agilent), Agilent Technologies

#### 3.1.1.3. Standardi

- Demeklociklin (Demecl), 46161, Vetranal
- Doksiciklin (DOXY), 33429, Vetranal
- Epiklortetraciklin (epiCITTC), C426501, TRC, (engl. *Toronto Research Chemicals*)
- Epioksitetraciklin (epioxyTTC), O877505, TRC
- Epi-tetraciklin (epiTTC), 37918, Vetranal
- Klortetraciklin (CITTC), 46133, Vetranal
- Oksitetraciklin (oxyTTC), 46598, Vetranal
- Tetraciklin (TTC), 31741, Vetranal
- Interni standard: Doksiciklin-d3 (DOXY-d3), D561503, TRC
- Interni standard: Tetraciklin-d6 (TTC-d6), T291402, TRC

#### 3.1.1.4. Laboratorijska oprema

- Analitička vaga (Ohaus)
- Analitičke pipete volumena od 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL i 5 mL (Eppendorf)
- Automatske multikanalne pipete (Eppendorf)
- Ultracentrifuga 15 000 o/min (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA)
- Centrifuga 4600 o/min (Rotanta 460R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany))
- Epruvete od 15 mL (Eppendorf)
- Epruvete od 50 mL s čepom (Eppendorf)
- Epruvete za ultracentrifugu od 2 mL, (Eppendorf)
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1x150 mm (Waters)
- LC/MS sustav: HPLC uređaj (Agilent Technologies 1290 Infinity II), Agilent Triple Quad 6470
- Predkolona: Acquity HSS T3 1,8 µm VanGuard Pre-Column (Waters)
- Staklene epruvete od 15 mL (Schott)
- Sustav za otparavanje u struji dušika (MultiVap 54, LabTech)
- Ultrazvučna kupelj (ultrasonic bath Grant (Grant instruments, Cambridge, UK))

- Viale bez inserta (Agilent)
- Viale s insertom (Agilent)
- Vortex homogenizator (IKA<sup>®</sup> Vortex model MS2 Minishaker (IKA<sup>®</sup>-WERKE GMBH & CO.KG, Staufen, Germany))
- Vrtložna miješalica (multi-tube vortexer (VWR International GmbH, Ulm, Germany))

### 3.1.2. Metode rada

#### 3.1.2.1. Priprema otopina

- 0,5 % Na<sub>2</sub>EDTA priprema se odvagom 0,5 g Na<sub>2</sub>EDTA u odmjernu tikvu od 100 mL nakon čega je tikvicu potrebno nadopuniti vodom do oznake
- 0,5 % otopina metanske kiseline u acetonitrilu dobivena je pipetiranjem 2,5 ml mravlje kiseline u tikvicu od 500 mL nakon čega je tikvicu potrebno nadopuniti do oznake acetonitriлом
- 5 M (mol/L) amonijev acetat priprema se odvagom 38,5 g amonijevog acetata te otapanjem u 100 mL ultračiste vode
- 5 mM amonijev acetat dobiva se pipetiranjem 200 μL 5M amonijevog acetata u tikvicu od 200 mL koja se zatim nadopuni do oznake ultračistom vodom
- Mješavina acetonitril/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) priprema se miješanjem 400 mL acetonitrila s 100 mL ultračiste vode
- Mobilna faza A (MF) je 0,1 % otopina mravlje kiseline, a priprema se tako da se doda 1 ml mravlje kiseline u tikvicu od 1000 ml s ultračistom vodom, zatim se nadopuni do oznake s ultračistom vodom. Valjanost mobilne faze A je 4 dana, pri čemu treba biti čuvana na sobnoj temperaturi u zatamnjenom posuđu
- Mobilna faza B je metanol (LC-MS čistoće)

#### 3.1.2.2. Priprema standardnih radnih otopina tetraciklinskih antibiotika

Bazne otopine pripremaju posebno za svaki analit u koncentraciji od 1 mg/mL. Otopine standarda koncentracije S1 dobivaju se pipetiranjem određenog volumena bazne otopine u tikvicu te nadopunjavanjem s metanolom do oznake. Otopine standarda koncentracija S2 pripremaju se u vialama pipetiranjem 200 μL otopine standarda S1 i 800 μL mobilne faze A. Postupak pripreme otopina standarda koncentracije S1 i S2 prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Priprema otopina standarda S1 i S2

Ime spoja	Koncentracija baznih otopina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen bazne otopine ( $\mu\text{L}$ )	Volumen tikvice za pripremu otopine standarda S1 (mL)	Koncentracija otopine standarda S1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Koncentracija otopine standarda S2 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Tetraciklin	1000	100	10	10	2
Epitetraciklin		100	10	10	2
Klortetraciklin		100	10	10	2
Epiklortetraciklin		100	10	10	2
Oksitetraciklin		100	10	10	2
Epioksitetraciklin		100	10	10	2
Doksiciklin		100	10	10	2
Demeklociklin		100	10	10	2
Tetraciklin-d6		100	10	10	2
Doksiciklin-d3		100	10	10	2

- Otopina mješavine standarda (MIX-S1) priprema se u koncentraciji od 10  $\mu\text{g/mL}$  tako da se u tikvicu od 10 mL otpipetira po 100  $\mu\text{L}$  otopine standarda S1 svakog analita, a zatim se tikvica nadopuni s metanolom do oznake.
- Standardna radna otopina koja obuhvaća sve antibiotike zajedno (MIX-S2) radi se u koncentraciji od 1000 ng/mL, pri čemu se otpipetira 1 mL otopine mješavine standarda (MIX-S1) u tikvicu od 10 mL koja se zatim nadopuni do oznake s metanolom.
- Standardna radna otopina koja obuhvaća sve antibiotike zajedno (MIX-S3) priprema se u koncentraciji 10 ng/mL tako da se u tikvicu od 10 mL otpipetira 100  $\mu\text{L}$  MIX-S2 te se nadopuni metanolom do oznake.

### 3.1.2.3. Priprema obogaćenih uzoraka mlijeka i matriks kalibracijske krivulje

Prilikom svake analize potrebno je pripremiti matriks kalibracijsku krivulju tako da se mlijeko obogati na 3 koncentracijske razine ovisno o zadanom MRL-u ili najnižoj koncentraciji koja je ispitana u validacijskom postupku. MRL (engl. *Maximum Residue Limit*) odnosno najveća dopuštena koncentracija (NDK) tetraciklinskih antibiotika u mlijeku iznosi 100  $\mu\text{g/kg}$ . Obogaćeni kontrolni uzorak koristi se u analizi mlijeka pri čemu se negativni uzorak mlijeka

koji ne sadrži ispitivane analite (engl. *Matrix blank*) obogati sa standardnim otopinama mješavine analita te im se dodaje interni standard (MIX-Q-TOF-ISTD2, ISTD2). U tablici 3 prikazan je način pripreme uzorka i matriks kalibracijske krivulje prilikom postupka pročišćavanja uzorka QuEChERS ekstrakcijom te ekstrakcijom organskim otapalom. Uzorci broj 3, 4, 5, 6, 7 i 8 predstavljaju uzorke korištene za pripremu matriks kalibracijske krivulje, a uzorci broj 9, 10 i 11 su obogaćeni na istoj koncentracijskoj razini kao uzorci 5 i 6, ali s otopinama radnog standarda (S2A i S2B) te služe kao kontrola.

**Tablica 3.** Matriks kalibracijska krivulja na mlijeku

			Postupak pročišćavanja uzorka					Ekstrakcija organskim otapalom	
			QuEChERS						
Redni broj uzorka	Obogaćenje (ng/g)	Koncentracijske razine (L)	V (MIX-S2) $\mu$ L	V (ISTD2) $\mu$ L	V (S2A mlijeko) $\mu$ L	V (S2B mlijeko) $\mu$ L	Korištena sol u QuEChERS ekstrakciji	V (MIX-S2) $\mu$ L	V (ISTD2) $\mu$ L
1.	0	-	-	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	-	100
2.	0	-	-	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	-	100
3.	10	L1	50	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	20	100
4.	10	L1	50	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	20	100
5.	50	L2	250	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	100	100
6.	50	L2	250	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	100	100
7.	100	L3	500	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	200	100
8.	100	L3	500	250	-	-	MgSO <sub>4</sub>	200	100
9.	50	L2	-	250	125	125	MgSO <sub>4</sub>	-	-
10.	50	L2	-	250	125	125	MgSO <sub>4</sub>	-	-
11.	50	L2	-	250	125	125	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-

#### 3.1.2.4. Priprema standardne krivulje na otapalu

Kalibracijska krivulja na otapalu priprema se za kontrolu linearosti odziva instrumenta te stabilnosti standardnih otopina. Za izradu standardne krivulje na otapalu potrebno je pripremiti koncentracijske razine L1 do L7, koristeći pripremljene otopine tetraciklinskih antibiotika koncentracije 1000 ng/mL (MIX-S2) te 10 ng/mL (MIX-S3), kako je prikazano u tablici 4.



**Tablica 4.** Standardna krivulja na otapalu za mlijeko

Volumen	L1 (5 ng/mL)	L2 (10 ng/mL)	L3 (50 ng/mL)	L4 (100 ng/mL)	L5 (250 ng/mL)	L6 (500 ng/mL)	L7 (1000 ng/mL)	Slijepa proba
MFA ( $\mu$ L)	800	800	800	800	800	800	800	800
MeOH ( $\mu$ L)	195	190	150	100	175	150	100	200
MIX-S2 ( $\mu$ L)	5	10	50	100	-	-	-	-
MIX-S3 ( $\mu$ L)	-	-	-	-	25	50	100	-

### 3.1.3. Postupci pročišćavanja uzorka

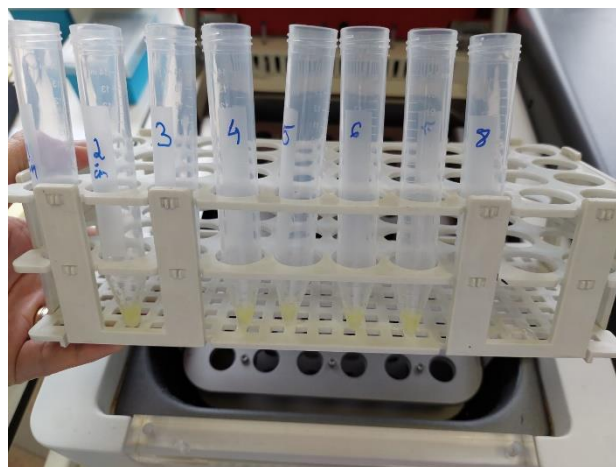
#### 3.1.3.1. QuEChERS ekstrakcija

Kako bi proveli QuEChERS ekstrakciju potrebno je odvagati  $5 \pm 0,05$  g mlijeka (tablica 1) u epruvetu od 50 mL s čepom te je zatim u uzorke potrebno dodati 250  $\mu$ L internog standarda (MIX-Q-TOF-ISTD2). U uzorke za kalibraciju potrebno je dodati mješavinu standarda MIX S2 (priprema je opisana u poglavlju 3.1.2.2.) kako je prikazano u tablici 3. Slijedi dodavanje 10 mL 0,5 %-tne metanske kiseline u acetonitrilu nakon čega je potrebno odmah provesti vorteksiranje, a zatim miješanje na vrtložnoj miješalici 10 minuta pri 2000 okretaja po minuti (o/min). Zatim je potrebno centrifugirati pri 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4 °C. Da bi aktivirali EMR prašak treba dodati 3 mL 5 mM amonijevog acetata u epruvetu s EMR praškom te potom odmah vorteksirati kroz 20 sekundi, dodajući pufer dok je epruveta s praškom na vorteksu i pritom pazeći da se stvorila jednolika emulzija. Nakon centrifugiranja potrebno je prebaciti 7 mL supernatanta u aktivirani EMR prašak te odmah vorteksirati u vremenu od 5 minuta i zatim ponovno provesti centrifugiranje pri 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4 °C. Nakon centrifugiranja provodi se dekantiranje supernatanta u epruvetu od 50 mL s čepom, a zatim slijedi dodatak sadržaja soli MgSO<sub>4</sub> ili Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (tablica 3) iz vrećice te snažno mućkati radi razbijanja stvrdnutih komada soli i potom odmah vorteksirati ručno te na vrtložnoj miješalici u vremenskom periodu od 2 min. Nakon završenog miješanja potrebno je provesti centrifugiranje na 4000 o/min kroz 10 minuta pri 4 °C i prebaciti 2 mL supernatanta u staklenu epruvetu od 15 mL te automatskom pipetom dodati 50  $\mu$ L DMSO i staviti otaparavati u struji dušika (slika 9) pri 40 °C do zaostatka volumen od otprilike 50  $\mu$ L (slika 10). Zaostatak uzorka u epruveti potrebno je otopiti dodatkom 100  $\mu$ L MeOH, vorteksiranjem i zatim dodatkom 850  $\mu$ L H<sub>2</sub>O te staviti na otapanje u ultrazvučnu kupelj kroz 5 minuta, nakon čega se otopina prebaci

u epruvetu za ultracentrifugu volumena 2 mL te centrifugira pri 15000 o/min u vremenskom periodu od 5 min pri 4 °C, a potom se bistra otopina uzorka volumena 400 µL prebaci u vialu s insertom. Napomena, faktor razrjeđenja iznosi 1.



**Slika 9.** Sustav za otparavanje u struji dušika (*vlastita fotografija*)



**Slika 10.** Uzorci nakon otparavanja u struji dušika (*vlastita fotografija*)

### 3.1.3.2. Ekstrakcija potpomognuta organskim otapalom

Kako bi uzorke mlijeka pročistili ekstrakcijom organskim otapalom, uzorke mlijeka je potrebno odvagati tako da masa iznosi  $2 \pm 0,02$  g u plastičnu epruvetu od 50 mL s čepom, a točne vrijednosti odvaga su prikazane u tablici 1. Zatim je potrebno u uzorke dodati 100 µL mješavine internog standarda (ISTD2). U uzorke za matriks kalibracijsku krivulju dodaje se otopina mješavine standarda MIX-S2 (priprema je opisana u poglavlju 3.1.2.2.) Potom je u

uzorke potrebno dodati 8 mL 0,5 %-tne otopine metanske kiseline u acetonitrilu, koja se dodaje ohlađena na temperaturi od 2 °C do 8 °C, te vorteksirati kratko pojedinačno, a potom i 10 minuta na vrtložnoj miješalici. Sadržaj epruvete je zatim potrebno centrifugirati na 4600 o/min pri temperaturi od 4 °C. Supernatant se, nakon centrifugiranja, prebaci u plastičnu epruvetu od 15 mL te se potom automatskom pipetom doda 50 µL DMSO u svaku epruvetu sa supernatantom. Sadržaj epruveta potrebno je upariti do približno 50 µL pri 40 °C u struji dušika. Nakon uparavanja uzorak se otapa na način da se doda 150 µL 0,1 %-tne otopine metanske kiseline, vorteksira te se stavi 5 minuta u ultrazvučnu kupelj. Uzroci se zatim prebace u epruvete za ultracentrifugu volumena 2 mL i centrifugiraju na 15000 o/min pri temperaturi od 4 °C kroz vremenski period od 5 minuta. Bistri supernatant je zatim potrebno prebaciti u viala bez prethodnog filtriranja. Napomena, faktor razrjeđenja je 0,1.

#### 3.1.4. Postupak i uvjeti provođenja analize LC-MS/MS metode

Analiza je provedena na uređaju Agilent Technologies 6470 Triple Quad LC/MS u kojem su umreženi instrument za HPLC te instrument za MS te je za analizu podataka i obradu rezultata korišten MassHunter Acquisition računalni program to jest MassHunter Qualitative i Quantitative Analysis. Korišteni sustav za ionizaciju je ESI sustav u pozitivnom načinu rada pri MRM skeniranju (engl. *Multi reaction monitoring*), a ionske tranzicije analita i optimirani parametri prikazani su na slici 11 te retencijska vremena u tablici 5.

Grupa analita	Analit	Interni standard	Prekursor ion	Produkt ion	Fragmentor	Kolizijska energija
TTC	CITTC	No	479.1	462.2	130	18
TTC	epiCITTC	No	479.1	462.2	130	18
TTC	CITTC	No	479.1	444.2	130	24
TTC	epiCITTC	No	479.1	444.2	130	24
TTC	Demecl	No	465.1	448.1	130	18
TTC	Demecl	No	465.1	430.1	130	24
TTC	oxyTTC	No	461.1	443.2	130	10
TTC	epioxyTTC	No	461.1	443.2	130	10
TTC	oxyTTC	No	461.1	426.2	130	18
TTC	epioxyTTC	No	461.1	426.2	130	18
TTC	TTC-d6	Yes	451.2	433.2	130	10
TTC	DOXY-d3	Yes	448.2	431.1	130	10
TTC	DOXY	No	445.1	428.2	130	18
TTC	TTC	No	445.1	427.2	130	10
TTC	epiTTC	No	445.1	427.2	130	10
TTC	TTC	No	445.1	410.2	130	20
TTC	epiTTC	No	445.1	410.2	130	20
TTC	DOXY	No	445.1	410	130	20

**Slika 11.** Ionske tranzicije i optimirani parametri detekcije analita (*vlastita fotografija*)

**Tablica 5.** Retencijska vremena pojedinih analita iz grupe tetraciklina

	Analit							
	TTC	epiTTC	CITTC	epiCITTC	oxyTTC	epioxyTTC	DOXY	Demecl
<b>Retencijsko vrijeme (min)</b>	7,40	7,10	8,20	7,90	7,50	7,35	8,80	7,80

Ostali uvjeti za provedbu analize su:

a) kromatografski uvjeti

- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1x150 mm

- Predkolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1x5mm VanGuard Pre-Column
- Protok: 0,4 mL/min
- Temperatura odjeljka kolone: 40  $^{\circ}\text{C}$
- Sustav za uzorkovanje: volumen injektiranja 10  $\mu\text{L}$ , temperatura 10  $^{\circ}\text{C}$ , injektiranje s ispiranjem igle 10 s (MeOH/ACN/PropOH u omjeru 5: 2,5: 2,5)
- Mobilna faza: otopina A (0,1 % metanska kiselina, otopina B (MeOH, LC-MS čistoće) pri čemu je gradijent mobilne faze prikazan na slici 12

	Vrijeme (min)	A (%)	B (%)
1	3.00 min	100.00 %	0.00 %
2	10.00 min	5.00 %	95.00 %
3	13.00 min	5.00 %	95.00 %
4	13.50 min	100.00 %	0.00 %
5	17.00 min	100.00 %	0.00 %

**Slika 12.** Gradijent mobilne faze (*vlastita fotografija*)

b) uvjeti spektrometrije masa

- *Gas Temp*: 150  $^{\circ}\text{C}$
- *Gas Flow*: 11 L/min
- *Nebulizer*: 35 psi
- *SheathGasHeater*: 300
- *SheathGasFlow*: 10
- *Capillary*: 4000 V
- *VCharging*: 500

Prije samog početka analize potrebno je optimizirati kolonu propuštajući mobilnu fazu kroz istu u vremenskom periodu oko 30 minuta, dok na trenutnom prikazu stanja krivulja tlaka pumpe ne postane stabilna. Redosljed injektiranja uzoraka iz tablice 3 je:

1) Kalibracijsku krivulju na otapalu

- *blank*
- uzorci razine L1-L7
- MF

2) za uzorke pročišćene QuEChERS ekstrakcijom

- Matriks *blank* (uzorak 1)
- Matriks *blank* (uzorak 2)
- uzorak 3
- uzorak .
- uzorak 5
- uzorak 6
- uzorak 7
- uzorak 8
- uzorak 9
- uzorak 10
- uzorak 11
- *blank* (otapalo; 0,5 % metanske kiseline u ACN)
- MF

3) za uzorke pročišćene ekstrakcijom organskim otapalom

- Matriks *blank* (uzorak 1)
- Matriks *blank* (uzorak 2)
- uzorak 3
- uzorak 4
- uzorak 5
- uzorak 6
- uzorak 7
- uzorak 8
- MF

### **3.2. ELISA TEST**

3.2.1. Laboratorijska oprema i kemikalije

#### *3.2.1.1. Materijal*

Materijali su uzorci kravljeg mlijeka volumena 10 mL.

### 3.2.1.2. *Kemikalije*

- ELISA kit za tetracikline, Eurofins Technologies, kataloški broj HU0050025, sadržaj kita opisan je u poglavlju 3.2.1.5.
- Fosfatni pufer (PBS, engl. phosphate buffer saline); pH 7,4; Sigma Aldrich
- Metanol, Biosolve Chimie
- Destilirana voda, Milli-Q system Millipore®

### 3.2.1.3. *Standardi*

- Demeklociklin (Demecl), 46161, Vetranal
- Doksiciklin (Doxy), 33429, Vetranal
- Epiklortetraciklin (EpiCITTC), C426501, TRC, (engl. *Toronto Research Chemicals*)
- Epioksitetraciklin (EpiOxyTTC), O877505, TRC
- Epi-tetraciklin (EpiTTC), 37918, Vetranal
- Klortetraciklin (CITTC), 46133, Vetranal
- Oksitetraciklin (Oxy), 46598, Vetranal
- Tetraciklin (TTC), 31741, Vetranal

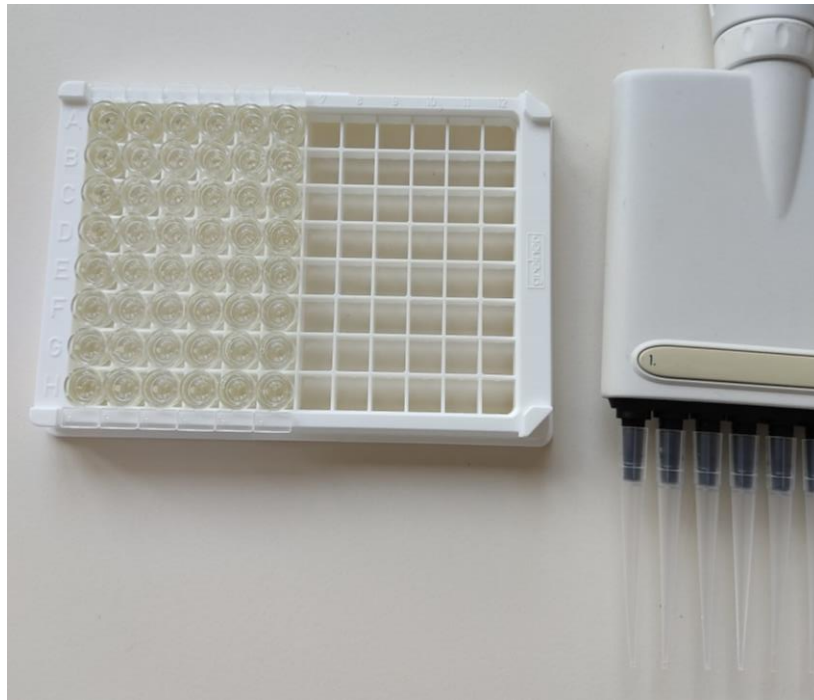
### 3.2.1.4. *Laboratorijska oprema*

- Analitička vaga (Ohaus)
- Analitičke pipete volumena od 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL i 5 mL (Eppendorf)
- Automatske pipete (Eppendorf)
- Automatske multikanalne pipete (Eppendorf)
- Mikročitač (spektrofotometar) za mjerenje optičke gustoće (Tecan Trading AG, Switzerland)
- Vortex homogenizator (IKA® Vortex model MS2 Minishaker (IKA®-WERKE GMBH & CO.KG, Staufen, Germany))

### 3.2.1.5. *Sadržaj kita*

Kit za ELISA test sadrži opis procedure i materijale koji su potrebni za provedbu analize. U navedenom se nalazi:

- Mikrotitarska pločica (slika 13) s 48 jažica koje su presvučene s anti-tetraciklin antitijelima, organiziranih u 6 redova s po 8 jažica



**Slika 13.** Mikrotitarska pločica s 48 jažica (*vlastita fotografija*)

- Pufer za razrjeđivanje, 6 mL, spremno za korištenje
- Tetraciklinski *zero* standard (Std 0), 3 mL, otopina standarda koncentracije 0 ng/mL, spremno za korištenje
- Liofilizirani enzimski konjugat, 2x1 mL, kada liofilizirani enzimski konjugat dosegne sobnu temperaturu potrebno ga je resuspendirati u 1 mL pufera za razrjeđivanje enzimskog konjugata, zatim je resuspendirani enzimski konjugat potrebno razrijediti u omjeru 1/20 s puferom za razrjeđivanje enzimskog konjugata
- Pufer za razrjeđivanje enzimskog konjugata, 2x12 mL, spremno za korištenje
- Pufer za razrjeđivanje uzorka, 25 mL, razrijediti u omjeru 1/10 s destiliranom vodom
- Pufer za ispiranje, 100 ml, razrijediti u omjeru 1/5 s destiliranom vodom, razrijeđeni pufer za ispiranje stabilan je na sobnoj temperaturi 24 sata ili na temperaturi +2-+8 °C najduže 2 tjedna
- Otopina kromogenog supstrata, 12 mL, spremno za korištenje
- Stop otopina, 6 mL, spremno za korištenje

### 3.2.2. Metode rada

#### 3.2.2.1. Priprema otopina

- PBS je pripremljen na način da je odvagano 0,772 g natrijevog hidrogenfosfata, 0,182 g kalijevog dihidrogenfosfata te 8,943 g natrijevog klorida. Odvagane soli su



kvantitativno prebačene u odmjernu tikvicu od 1000 mL, koja je zatim nadopunjena do oznake ultračistom vodom, a pH je podešen na 7,39. Tako pripremljeni PBS čuva se na temperaturi 2-8 °C kroz 1 mjesec.

### 3.2.2.2. Priprema standardnih radnih otopina tetraciklinskih antibiotika

- Standardne radne otopine (S1a) koncentracije 1000 ng/mL pripremaju se za svaki antibiotik posebno iz baznih otopina koncentracije 1mg/mL, tako da se 10 µL bazne otopine antibiotika otpipetira u odmjernu tikvicu od 10 mL te se nadopuni metanolom do oznake
- Standardna radna otopina (S2a) priprema se za svaki antibiotik posebno u koncentraciji 20 ng/mL tako da se u epruvetu od 2 mL otpipetira 40 µL S1a te doda 1960 µL PBS pufera
- Standardna radna otopina (S2b) priprema se za svaki antibiotik posebno u koncentraciji 1,25 ng/mL tako da se u epruvetu od 2 mL otpipetira 125 µL S2a te se pomoću automatske pipete doda 1875 µL PBS pufera
- Standardna radna otopina (S2c) priprema se za svaki antibiotik posebno u koncentraciji 2,5 ng/mL tako da se u epruvetu od 2 mL otpipetira 250 µL S2a te se pomoću automatske pipete doda 1750 µL PBS pufera

### 3.2.2.3. Priprema obogaćenih uzoraka mlijeka i negativnog uzorka

Mlijeko je obogaćeno na koncentracijsku razinu 50 ng/g kako je prikazano u tablici 6.

**Tablica 6.** Priprema uzoraka mlijeka koncentracije analita 50 ng/g

Analit	Volumen mlijeka (mL)	Volumen S1a (µL)
Tetraciklin	10	500
Epitetraciklin		500
Klortetraciklin		500
Epiklortetraciklin		500
Oksitetraciklin		500
Epioksitetraciklin		500
Doksiciklin		500
Demeklociklin		500

Obogaćeni uzorci mlijeka zatim su razrijeđeni 40 puta tako da je u epruvetu od 2 mL otpipetirano 50 µL mlijeka obogaćenog na koncentraciju 50 ng/g te je dodano 1950 µL pufera za razrjeđivanje uzorka.

Negativni uzorak mlijeka to jest slijepa proba koja ne sadrži obogaćenje antibioticima razrijeđen je 40 puta tako da je u epruvetu od 2 mL otpipetirano 50 µL mlijeka koncentraciju te je dodano 1950 µL pufera za razrjeđivanje uzorka.

#### 3.2.2.4. Princip ELISA testa

Korišteni ELISA test, sadrži kit koji se koristi za kompetitivnu imunoenzimsku analizu za kvantitativno određivanje tetraciklina, a granica detekcije tetraciklina u mlijeku iznosi 4 ppb (0,004 µg/mL). ELISA test provodi se u jažicama koje su presvučene s anti-tetraciklinskim antitijelima. U jažice se dodaju pufer za razrjeđivanje (50 µL), otopina tetraciklinskog *zero* standarda ili uzoraka (100 µL) te enzimski konjugat (50 µL). U tablici 7 prikazan je sadržaj pojedine jažice mikrotitarske pločice, pri čemu OM označava obogaćene uzorke mlijeka na 50 ng/g, a SP označava slijepu probu, razrijeđene 40 puta.

**Tablica 7.** Princip popunjavanja mikrotitarske pločice

	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	Std 0	Demecl (S2b)	Demecl (S2c)	CITTC (OM)	EpiOxy TTC(OM)	Demecl (OM)
<b>B</b>	TTC (S2b)	TTC (S2c)	TTC (OM)	CITTC (OM)	EpiOxy TTC(OM)	SP
<b>C</b>	EpiTTC (S2b)	EpiTTC (S2c)	TTC (OM)	EpiCITTC (OM)	EpiOxy TTC(OM)	SP
<b>D</b>	CITTC (S2b)	CITTC (S2c)	TTC (OM)	EpiCITTC (OM)	Doxy (OM)	SP
<b>E</b>	EpiCITTC (S2b)	EpiCITTC (S2c)	EpiTTC (OM)	EpiCITTC (OM)	Doxy (OM)	TTC (OM)
<b>F</b>	Oxy (S2b)	Oxy (S2c)	EpiTTC (OM)	Oxy (OM)	Doxy (OM)	CITTC (OM)
<b>G</b>	EpiOxyTTC (S2b)	EpiOxyTTC (S2c)	EpiTTC (OM)	Oxy (OM)	Demecl (OM)	Oxy (OM)
<b>H</b>	Doxy (S2b)	Doxy (S2c)	CITTC (OM)	Oxy (OM)	Demecl (OM)	Doxy (OM)

Tijekom prve inkubacije (60 min, sobna temperatura), slobodne tetraciklinske molekule iz otopine uzorka i enzimski obilježene tetraciklinske molekule se natječu za vezanje s anti-tetraciklinskim antitijelima. Zatim se sve nevezane molekule uklanjaju iz jažica u koraku ispiranja korištenjem pufera za ispiranje, pri čemu treba paziti da nakon četvrtog završnog

ispiranje ne dođe do sušenja jažica. Aktivnost vezanih enzima se određuje dodavanjem otopine kromogenog supstrata (150  $\mu$ L) pri čemu dolazi do stvaranja enzim-supstrat kompleksa, a u konačnici se bezbojni supstrat konvertira u plavo obojeni produkt. Dodavanjem stop otopine (100  $\mu$ L) dolazi do promjene boje iz plave u žutu, nakon čega se mjeri apsorbancija u vremenskom okviru od 15 minuta na 450 nm, a razvijeno obojenje je obrnuto proporcionalno koncentraciji tetraciklina u uzorku.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

NDK za tetraciklinske antibiotike iznosi 100  $\mu$ g/kg (COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010). Za detektiranje i određivanje rezidua tetraciklinskih antibiotika najčešće se koriste visoko specifična tekućinska kromatografija (HPLC) u kombinaciji s masenom spektrometrijom (MS). Međutim, orijentacijske („screening“) metode i dalje se koriste, ali najviše u kvalitativne svrhe, zbog njihove niske cijene i jednostavnosti izvedbi metoda, iako je njihov glavni nedostatak niska osjetljivost i specifičnost. Direktna ELISA metoda ne zahtijeva prethodno pročišćavanje matriksa tj. ekstrakcijske tehnike (Gaurav i sur., 2014). Priprema uzorka utječe na sve kasnije korake analize te je stoga ključna za točnu identifikaciju, potvrdu i kvantifikaciju analita, a uključuje izolaciju spojeva od interesa iz različitih matriksa i prevođenje analita u pogodniji oblik koji je jednostavniji za izdvajanje i detekciju. Za pripremu uzorka najčešće se provode ekstrakcijske metode, koje moraju biti što efikasnije i omogućiti uklanjanje što više matriksa zbog manjeg utjecaja na MS rezultate (Stolker i Danaher, 2012). Nadalje, korištenjem optimalnih parametara i uvjeta u LC-MS/MS analizi, omogućuje se visoka razlučivost analita i bolja selektivnost (Soler i sur., 2006).

### **4.1. TEKUĆINSKA KROMATOLOGRAFIJA-TANDEMSKA SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS)**

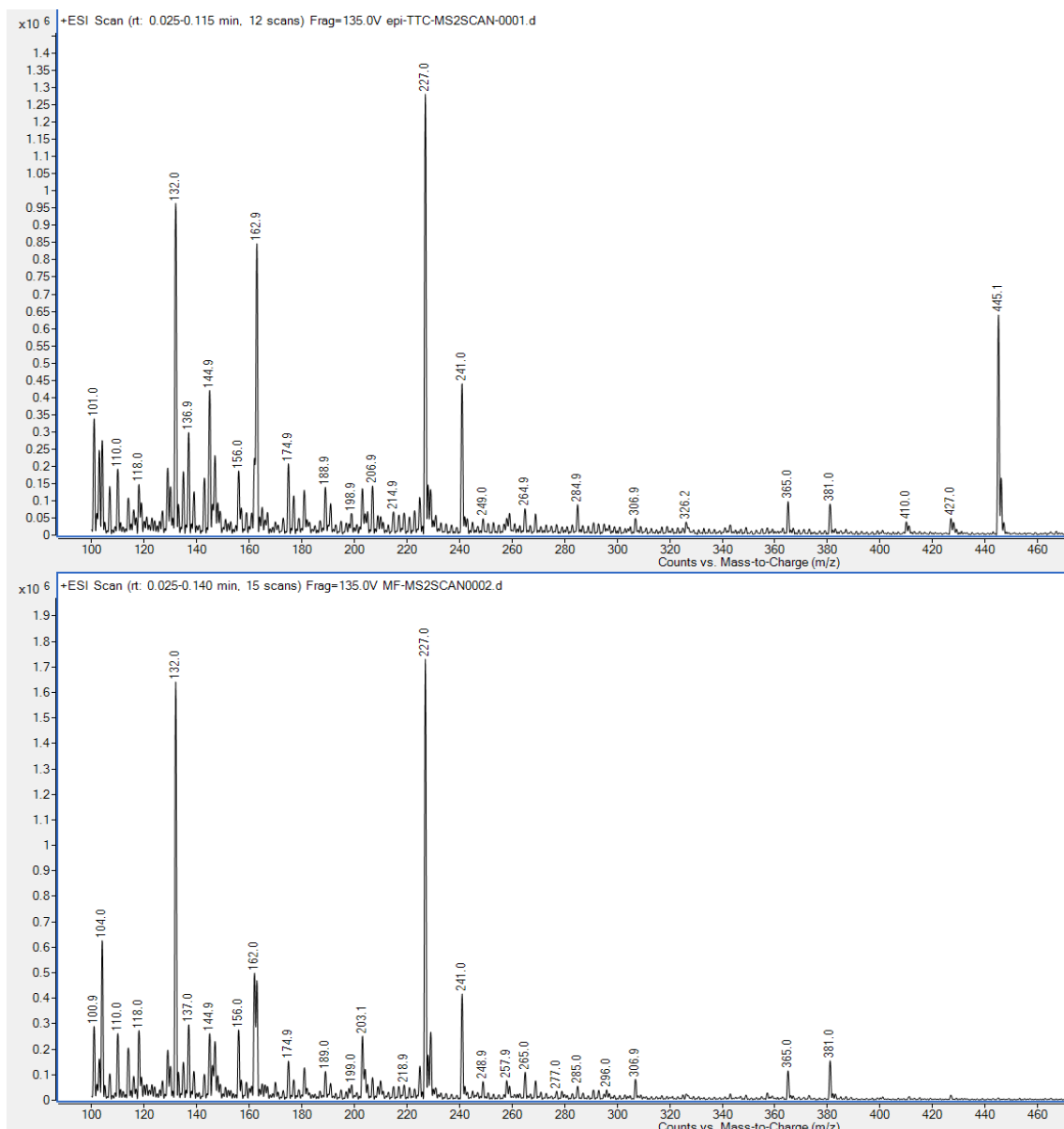
#### **4.1.1. Optimizacija parametara LC-MS/MS**

LC-MS/MS metodu karakterizira visoka selektivnost i preciznost određivanja analita pri vrlo niskim koncentracijama analita u uzorku, pri čemu se najčešće koristi trostruki kvadrupol koji daje metodi bolju osjetljivost i precizniju kvantifikaciju analita. Optimizacijom LC-MS/MS parametara i uvjeta, postiže se odgovarajuće razdvajanje analita u uzorku te bolja selektivnost, niske granice detekcije što omogućuje analizu složenih uzoraka s visokim stupnjem pouzdanosti (Soler i sur., 2006). Kako bi mogli provesti analizu uzoraka mlijeka te usporediti različite metode pročišćavanja uzorka (QuEChERS ekstrakcija i ekstrakciju

organskim otapalom) potrebno je prvo optimirati parametre provođenja LC-MS/MS analize što je opisano u poglavlju 4.1.1.

#### 4.1.1.1. MS2 scan

Identifikacija iona prekursora za svaki analit provedena je pomoću MS2 vrste skeniranja tj *scan mode-a* snimanjem u rasponu 100 do 600 m/z, s time da se ESI ionizacija odvijala u pozitivnom načinu rada. U tim uvjetima dobiveni spektri prikazuju da svi spojevi imaju samo jedan prevladavajući ion, koji odgovara protoniranoj molekuli  $[M + H^+]$ , stoga je protonirani oblik molekule uvijek korišten kao prekursor ion. Pripremljene zasebne otopine analita i mobilna faza podvrgnute su snimanju spektra na spomenutom načinu rada pri čemu su dobiveni različiti spektri za pojedine analite. Na slici 14 prikazan je dobiveni spektar epitetraciklina (gornji spektar) te mobilne faze (donji spektar).

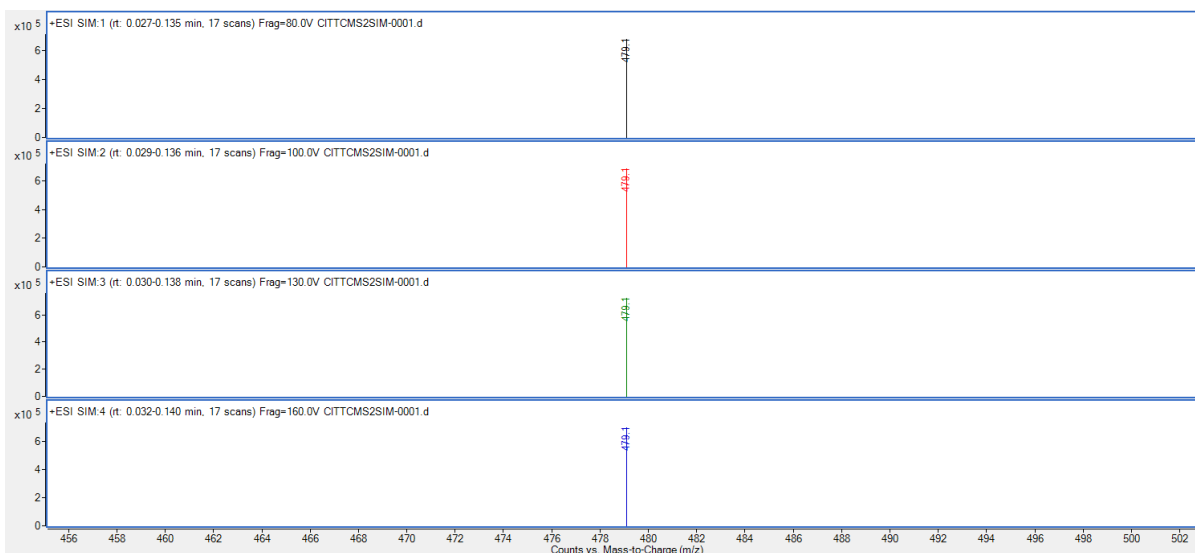


**Slika 14.** Maseni spektar epitetraciklina i mobilne faze

Usporedbom spektara mobilne faze i epitetraciklina vidljivo je da se analit pojavljuje u obliku  $m/z$  445,1, a da detektirane mase u rasponu od  $m/z$  100 do  $m/z$  320 potječu od nečistoća iz otapala. Za svaki pojedini analit je također provedena MS2 Scan analiza te su najznačajniji prekursor ioni prikazani u tablici 9.

#### 4.1.1.2. Optimizacija fragmentora

Optimizacija fragmentora to jest odabir optimalnog napona fragmentora za analizu određuje se snimanjem spektra za svaki pojedini analit korištenjem *SIM* načina rada (engl. *Selected Ion Monitoring*), pri čemu se prati intenzitet pika pri različitim vrijednostima napona fragmentora (slika 15).



**Slika 15.** Usporedba intenziteta pika prekursor iona klortetraciklina  $[M + H^+]$ , pri različitim vrijednostima napona fragmentora (80, 100, 130, 160 V)

Za optimizaciju fragmentora praćen je intenzitet pika pojedinog analita pri različitim vrijednostima napona fragmentora, a korištene vrijednosti napona su od 80 V, 100 V, 130 V i 160 V (tablica 8).

**Tablica 8.** Optimalne vrijednosti napona fragmentora

Analit	Napon fragmentora (V)			
	80	100	130	160
<b>Tetraciklin</b>			+	
<b>Epitetraciklin</b>			+	
<b>Klortetraciklin</b>			+	
<b>Epiklortetraciklin</b>			+	
<b>Oksitetraciklin</b>			+	
<b>Epioksitetraciklin</b>			+	
<b>Doksiciklin</b>			+	
<b>Demeklociklin</b>			+	
<b>Tetraciklin-d6</b>			+	
<b>Doksiciklin-d3</b>			+	

Iz tablice 8 vidljivo je da optimalna vrijednost napona fragmentora za dobivanje pika najvećeg intenziteta kod svih analita iznosi 130 V.

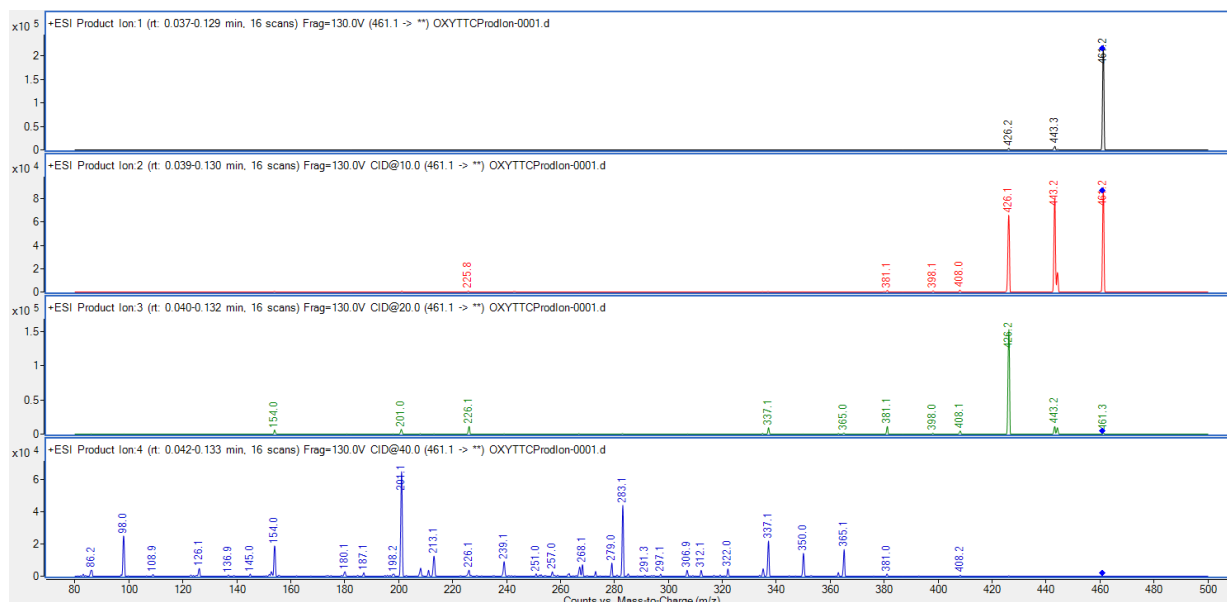
#### 4.1.1.3. Optimizacija kolizijske energije

Korištenjem optimalne vrijednosti fragmentora slijedi identifikacija najzastupljenijih produkt iona te odabir optimalne vrijednosti kolizijske energije za svaki pojedini analit što je provedeno u MRM *mode-u* (engl. *Multiple reaction monitoring*).

**Tablica 9.** Najzastupljeniji produkt ioni tetraciklinskih analita dobiveni pri različitim vrijednostima kolizijskih energija te optimalna vrijednost kolizijske energije

Analit	Prekursor ion	Značajni produkt ioni pri različitim kolizijskim energijama (eV)				Značajni produkt ioni	Optimalna vrijednost kolizijske energije na temelju značajnih produkt iona dobivenih pri različitim kolizijskim energijama (eV)
		0	10	20	40		
Tetraciklin	445,1	427,2	410,2	154	427,2	10	
			154		410,2	20	
Epitetraciklin	445,1	427,2	410,2	154	427,2	10	
			154		410,2	20	
Klortetraciklin	479,1	479,1	462,2	154	462,2	18	
			444,2		444,2	24	
Epiklortetraciklin	479,1	479,1	462,2	154	462,2	18	
			444,2		444,2	24	
Oksitetraciklin	461,1	443,2	426,2	201,1	443,2	10	
			201,1		426,2	18	
Epioksitetraciklin	461,1	444,2	426,2	283,1	443,2	10	
			283,1		426,2	18	
Doksiciklin	445,1	445,1	428,2	321,1	428,2	18	
			410		410	20	
Demeklociklin	465,1	465,1	448,1	289,1	448,1	18	
			430,1		430,1	24	
Tetraciklin-d6	451,2	433,2	416,2	269,1	433,2	10	
Doksiciklin-d3	448,2	431,2	413,1		431,2	10	

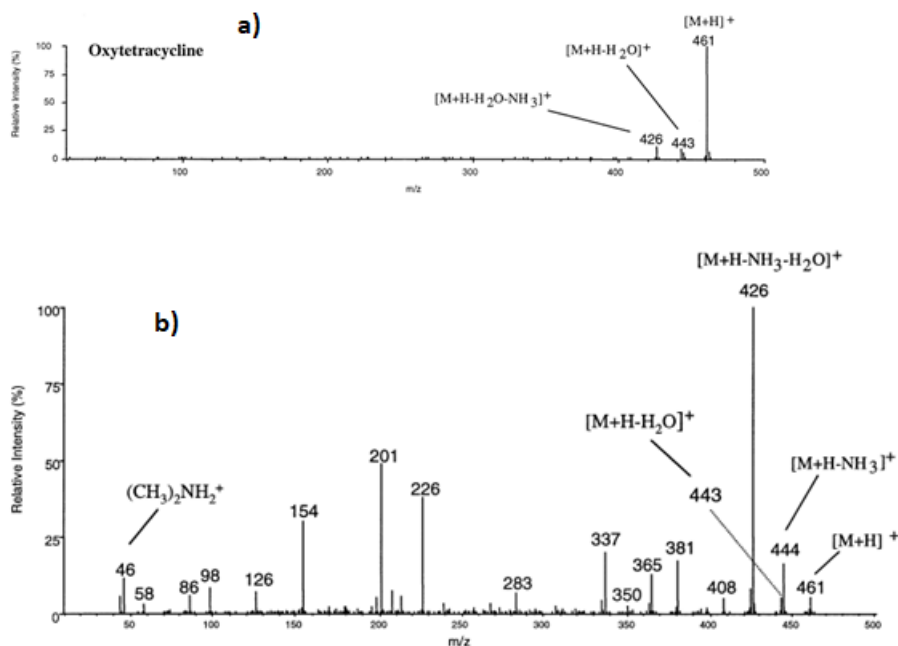
Dobiveni rezultati prikazani u tablici 9 prikazuju da se najznačajniji produkt ioni pojedinih analita dobivaju primjenom kolizijskih energija između 10 eV i 20 eV, stoga se daljnjom optimizacijom određuje optimalna kolizijska energija za dobivanje pika produkt iona s najvećim intenzitetom. Slika 16 prikazuje maseni spektar oksitetraciklina pri različitim vrijednostima kolizijske energije.



**Slika 16.** Maseni spektri oksitetraciklina pri kolizijskim energijama od 0 (crni pikovi), 10 (crveni pikovi), 20 (zeleni pikovi) i 40 eV (plavi pikovi)

Dobiveni maseni spektri prikazani na slici 16 podudaraju se s rezultatima Kamel i sur. (2002) koji su u svom istraživanju prikazali maseni spektar oksitetraciklina (slika 17) iz kojih je vidljivo da se vrijednosti  $m/z$  prekursor iona i značajnijih produkt ioni podudaraju pri sličnim vrijednostima kolizijskih energija.



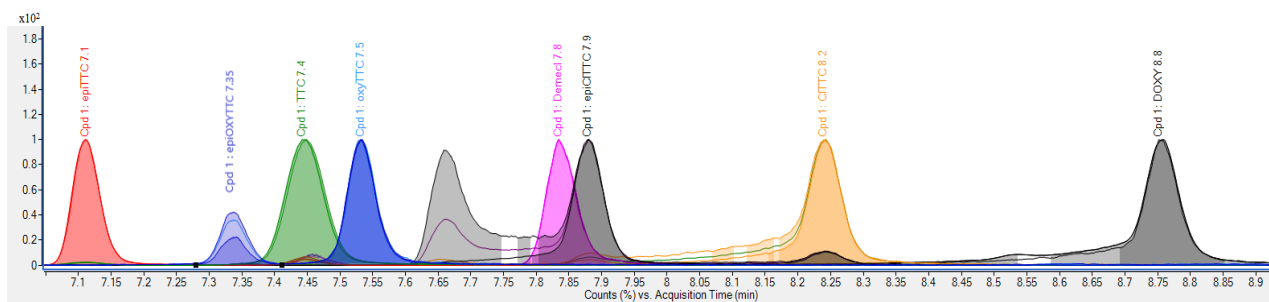


**Slika 17.** Spektar  $[M + H]^+$  iona oksitetraciklina dobiven kolizijski induciranom disocijacijom (CID) pri kolizijskoj energiji od 5 eV (a) te kolizijskoj energiji od 25 eV (b) (Kamel i sur., 2002)

Nadalje, spektar  $[M + H]^+$  prekursor iona oksitetraciklina dobivenog pri kolizijskoj energiji od 25 eV (slika 17) sadrži mnogo više fragmentarnih iona to jest produkt iona koji se mogu koristiti kao potvrda strukture oksitetraciklina, dok je pri kolizijskoj energiji od 5 eV spektar puno jednostavniji, tj. na spektru dominira ionizirani prekursor analita (Kamel i sur., 2002). Detaljnom optimizacijom postignuta je optimalna kolizijska energija od 10 i 18 eV pri kojima su produkt ioni oksitetraciklina najintenzivniji. Optimalne kolizijske energije pojedinih analita prikazane su u tablici 9.

#### 4.1.1.4. LC kromatogrami

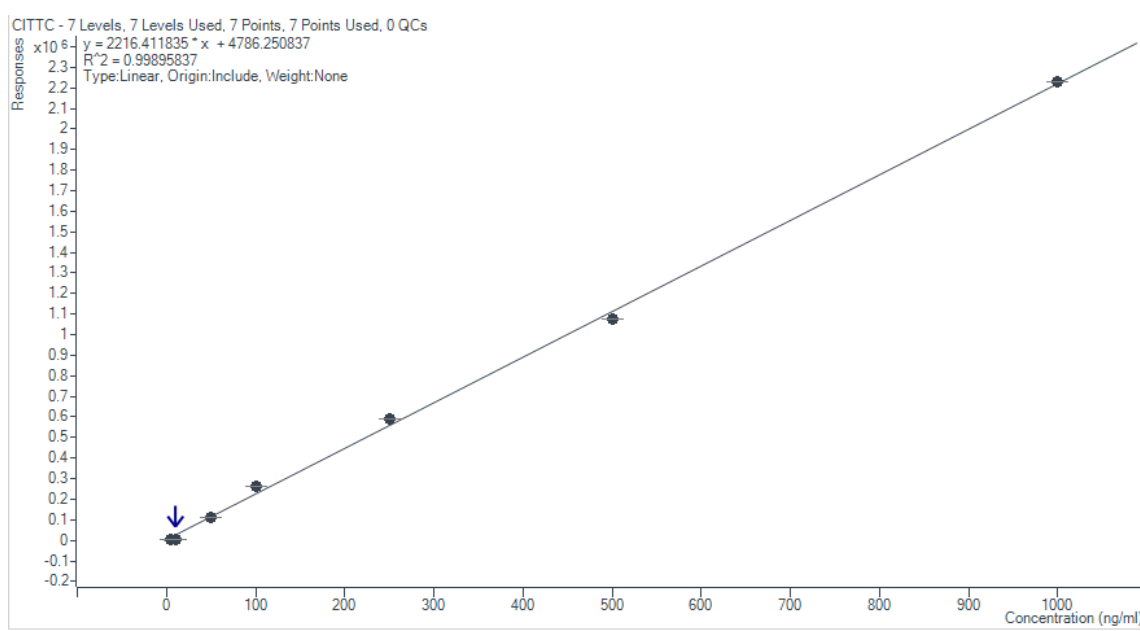
Zbog naknadne mogućnosti proširivanja metode na ostale antibiotike, optimirani su uvjeti gradijentne kromatografije te su određena vremena zadržavanja svakoga analita zasebno na kromatografskoj koloni (retencijska vremena, RT, engl. *Retention time*). Dobiveni kromatogram prikazan je na slici 18, dok su u prilogu (poglavlje 7.1.) prikazani pojedinačni kromatogrami tetraciklina.



**Slika 18.** Kromatogram svih tetraciklina: epiTTC (RT= 7,10; crveno), epiOxyTTC (RT= 7,35; ljubičasto), TTC (RT= 7,40; zeleno), OxyTTC (RT= 7,50; plavo), Demecl (RT= 7,80; rozo), epiCITTC (RT= 7,90; crno), CITTC (RT= 8,20; narančasto), Doxy (RT= 8,80; sivo)

#### 4.1.2. Kalibracijska krivulja na otapalu

Kalibracija prikazuje odnos koncentracije standarda i dobivenog signala (odziva instrumenta), a krivulja se dobiva pripremom i mjerenjem signala standarda poznatih vrijednosti koncentracija. U analitičkim metodama najčešće je prisutan linearan odziv instrumenta, a sama linearnost se može procijeniti koeficijentom determinacije  $R^2$  čija vrijednost bliža 1 označava bolju linearnost (González i Herrador, 2007). Kontrola linearnosti odziva instrumenta i stabilnosti standardnih otopina određuje se iz kalibracijske krivulje na otapalu. Kalibracijska krivulja na otapalu za klortetraciklin prikazana je na slici 19, a kalibracijske krivulje na otapalu za ostale analite prikazane su u prilogu (poglavlje 7.3.).



**Slika 19.** Kalibracijska krivulja na otapalu za klortetraciklin

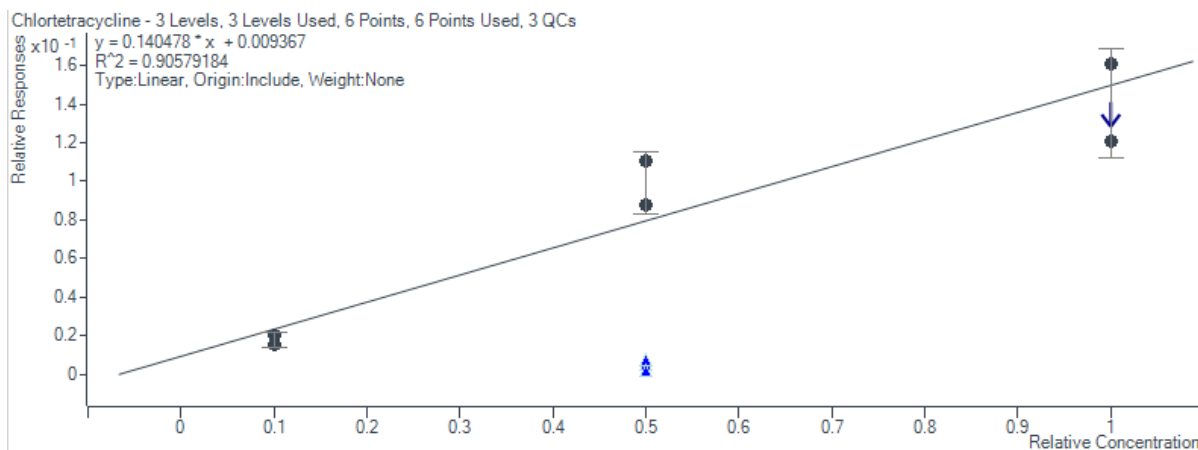
Mlijeko predstavlja matriks koji može utjecati na određivanje koncentracije analita u istom zbog prisutnih spojeva kao što su masti, proteini i ugljikohidrati što može utjecati na kromatografsku separaciju, uzrokovati supresiju intenziteta signala ili zagađenje i začepljene LC-MS sustava (Kaufmann i sur., 2022). Kako bi odredili utjecaj matriksa, računa se matriks faktor (MF, engl. *Matrix factor*) koji predstavlja omjer dobivenog signala uzoraka (gdje je prisutan matriks) obogaćenih analitom te signala otapala obogaćenih analitom. Ako je  $MF > 1$ , označava povećanje odziva iona u prisutnosti matriksa (povećanje signala),  $MF < 1$  označava supresiju iona pod utjecajem matriksa (smanjenje signala), a  $MF = 1$  implicira da u metodi nije prisutan učinak matriksa (Ghosh, 2014). Dobivene vrijednosti nagiba pravaca ( $\alpha$ ) (tablica 10) kalibracijskih krivulja na otapalu koriste se za usporedbu utjecaja matriksa nakon ekstrakcije organskim otapalom te QuEChERS ekstrakcije. Linernost odziva instrumenta prikazana je preko koeficijenta determinacije  $R^2$  (tablica 10), a vrijednosti  $R^2$  za sve tetracikline iznose 0,999 uz neznatna odstupanja što označava dobru linearnost odziva instrumenta u koncentracijskom području od 5-1000 ng/mL (tablica 4).

**Tablica 10.** Vrijednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) te nagiba pravaca ( $\alpha$ ) krivulje kalibracije na otapalu za pojedine analite

<b>Analit</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>Tetraciklin</b>	0,9987	6286,1133
<b>Epitetraciklin</b>	0,9997	7168,1170
<b>Klortetraciklin</b>	0,9990	2216,4118
<b>Epiklortetraciklin</b>	0,9994	2317,3522
<b>Oksitetraciklin</b>	0,9994	6506,3811
<b>Epioksitetraciklin</b>	0,9991	1037,6820
<b>Doksiciklin</b>	0,9885	8241,3247
<b>Demeklociklin</b>	0,9994	2629,2506

#### 4.1.3. QuEChERS ekstrakcija

Uzorci pročišćeni postupkom QuEChERS ekstrakcije (tablica 3) podvrgnuti su LC-MS/MS te su dobivene matriks kalibracijske krivulje svih analita što je prikazano u prilogu (poglavlje 7.4.), dok je na slici 20 prikazana matriks kalibracijska krivulja za klortetraciklin.



**Slika 20.** Matriks kalibracijska krivulja za klortetraciklin (crno) te obogaćeni uzorak pri istoj koncentraciji (plavo)

Dobivene vrijednosti nagiba pravaca ( $\alpha$ ) te koeficijenta determinacije  $R^2$ , prikazane su u tablici 11.

**Tablica 11.** Vrijednosti koeficijenta determinacije te nagiba pravaca matriks kalibracijske krivulje za pojedine analite

Analit	$R^2$	$\alpha$
Tetraciklin	0,9895	1,4641
Epitetraciklin	0,9934	4,9368
Klortetraciklin	0,9058	0,1405
Epiklortetraciklin	0,7160	0,0550
Oksitetraciklin	0,9935	0,6162
Epioksiteciciklin	0,9929	0,1358
Doksiciklin	0,9558	0,6068
Demeklociklin	0,9852	0,1631

Nadalje u tablici 12 prikazane su izračunate vrijednosti matriks faktora koji se računa kao omjer nagiba pravca matriks kalibracijske krivulje te nagiba pravca kalibracijske krivulje na otapalu, a rezultat je izražen u postocima.

**Tablica 12.** Vrijednosti matriks faktora za pojedine analite

Analit	TTC	EpiTTC	CITTC	EpiCITTC	OxyTTC	EpiOxyTTC	Doxy	Demecl
MF (%)	0,0233	0,0689	0,0063	0,0024	0,0095	0,0131	0,0074	0,0062

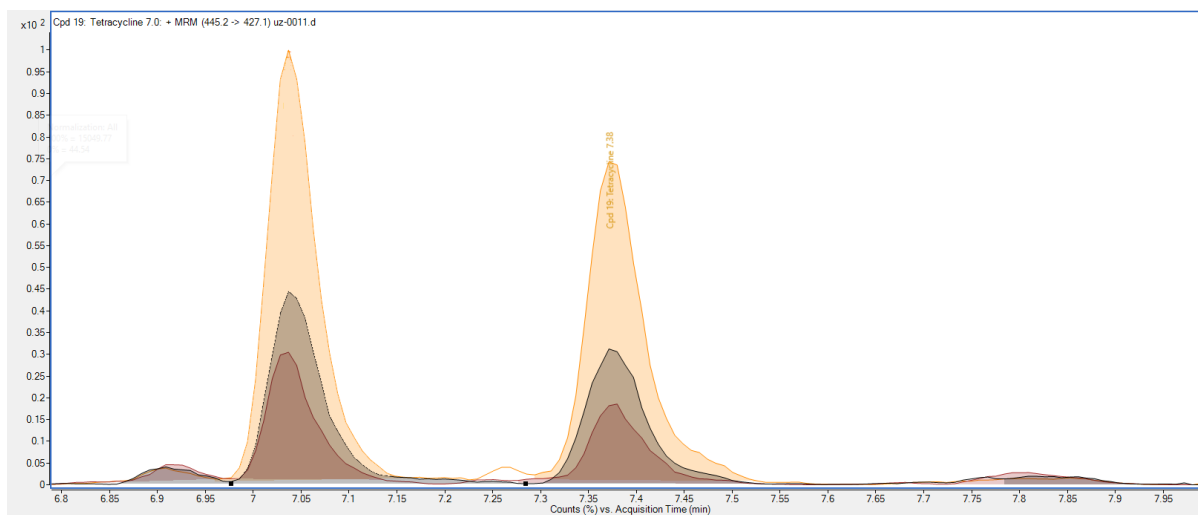
Kaufmann i sur. (2022) navode da korištenjem QuECHERS ekstrakcije u uzorcima mlijeka radi smanjenja utjecaja matriksa na mjerenja, tetraciklini pokazuju smanjeni ekstrakcijski prinos. Kako bi usporedili ekstrakcijski prinos tetraciklina nakon pročišćavanja QuECHERS ekstrakcijom i ekstrakcijom organskim otapalom određene su površine pikova za pojedine analite nakon korištenja QuECHERS metode (tablica 12).

**Tablica 13.** Prikaz vrijednosti površine ispod pika za pojedine analite u obogaćenim uzorcima mlijeka pročišćenog QuECHERS ekstrakcijom

Uzorak *	Koncentracijska razina	CITTC	Demecl	Doxy	EpiCl TTC	EpiOxy TTC	EpiTTC	OxyTTC	TTC
3.	L1	1558	136	302	2538	1888	45777	4870	11798
4.	L1	1426	1996	710	2307	1830	50297	5753	12794
5.	L2	8466	6451	2066	5016	5760	219703	22859	68395
6.	L2	7098	5665	1706	4763	5915	220535	20590	59353
7.	L3	11969	12518	3564	5847	10041	361237	45510	107401
8.	L3	8376	10598	3428	3930	10207	352004	43580	102240
9.	L2	416	477	201	743	3410	101869	12169	30229
10.	L2	529	337	166	639	4159	87694	9857	27068
11.	L2	239	1078	261	1551	5920	163767	32760	44274

\*numeracija uzorka odnosi se na uzorke iz tablice 3

Tetraciklinski antibiotici u prisutnosti  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  stvaraju stabilan tetraciklin-metalni kompleksa (Chen i sur., 2015). Nadalje, uočeno je da je prisutnost magnezijevog sulfata u smjesi soli, koja se koristi u QuECHERS ekstrakciji, odgovorna za stvaranje kompleksa koji što dovodi do gubitka tetraciklina, stoga se kao zamjena koriste natrijev ili amonijev sulfat (Kaufmann i sur., 2022).

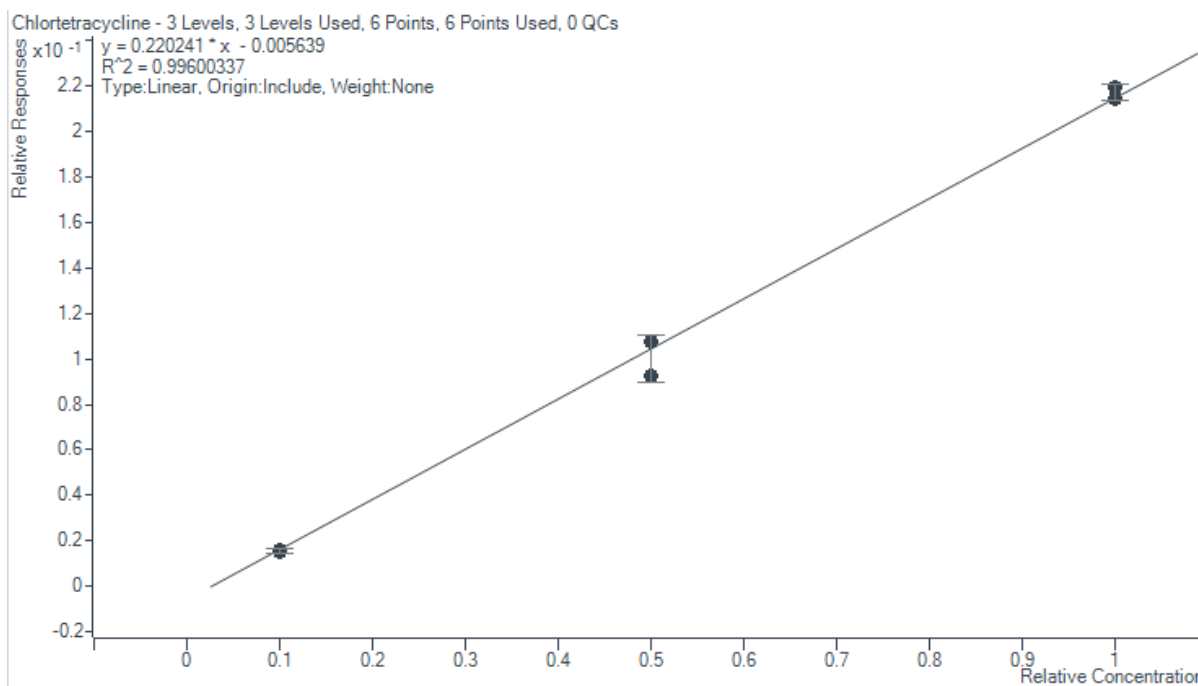


**Slika 21.** Kromatogram tetraciklina nakon QuEChERS ekstrakcije s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (uzorak 11, crni pik) i  $\text{MgSO}_4$  (uzorak 7, narančasti pik; uzorak 9, crveni pik)

Iz kromatograma (slika 21) vidljivo je da korištenjem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  prilikom pročišćavanja uzorka QuEChERS ekstrakcijom, pri istim koncentracijama tetraciklina u uzorku (iste razine obogaćenja uzorka), zaostaje više tetraciklina u uzorku pri čemu se dobije bolji odziv odnosno veći intenzitet pika nego korištenjem  $\text{MgSO}_4$ .

#### 4.1.4. Ekstrakcija organskim otapalom

Prijelaz analita iz vodene (donorske) faze u organsku (akceptorsku) fazu izravno je povezan s relativnom topljivošću analita u ove dvije faze, a to ne vrijedi samo za analite, već i za komponente matriksa. Komponente matriksa koje mogu utjecati na rezultate mjerenja su ugljikohidrati i proteini s velikom polarnošću i lipidi s malom. Slaba topljivost spomenutih komponenta matriksa u acetonitrilu jedan je od glavnih razloga zašto se on koristi u ekstrakciji (Kaufmann i sur., 2022). Uzorci pročišćeni postupkom ekstrakcije organskim otapalom (tablica 3) podvrgnuti su LC-MS/MS te su dobivene matriks kalibracijske krivulje svih analita što je prikazano u prilogu (poglavlje 7.5.), dok je na slici 22 prikazana matriks kalibracijska krivulja za klortetraciklin.



**Slika 22.** Matriks kalibracijska krivulja za klortetraciklin

Dobivene vrijednosti nagiba pravaca ( $\alpha$ ) te koeficijenta determinacije  $R^2$ , prikazane su u tablici 14.

**Tablica 14.** Vrijednosti koeficijenata determinacije te nagiba pravaca matriks kalibracijske krivulje za pojedine analite

Analit	$R^2$	$\alpha$
Tetraciklin	0,9983	0,9916
Epitetraciklin	0,9968	1,1331
Klortetraciklin	0,9960	0,2202
Epiklortetraciklin	0,9513	0,0161
Oksitetraciklin	0,9992	0,6375
Epioksitetraciklin	0,9960	0,0474
Doksiciklin	0,9534	0,4269
Demeklociklin	0,9957	0,1355

U tablici 15 prikazane su vrijednosti matriks faktora, dok su u tablici 16 prikazane površine ispod pikova za pojedine analite nakon korištenja ekstrakcije organskim otapalom kao metode pročišćavanja uzorka.

**Tablica 15.** Vrijednosti matriks faktora za pojedine analite

Analit	TTC	EpiTTC	CITTC	EpiCITTC	OxyTTC	EpiOxyTTC	Doxy	Demecl
MF (%)	0,0158	0,0158	0,0009	0,0007	0,0098	0,0046	0,0052	0,0052

Usporedbom MF nakon ekstrakcije organskim otapalom te QuEACHERS ekstrakcije uočeno je da je manji utjecaj matriksa prisutan u uzorcima u kojima je metoda pročišćavanja bila ekstrakcija organskim otapalom što dokazuju manje vrijednosti MF-a u odnosu na vrijednosti MF-a dobivenih u uzorcima u kojima je korištena QuEACHERS ekstrakcija. Isto tako, pošto je  $MF < 1$  došlo je do smanjenja signala što označava supresiju iona.

**Tablica 16.** Prikaz vrijednosti površine ispod pika za pojedine analite u obogaćenim uzorcima mlijeka pročišćenog ekstrakcijom organskim otapalom

Uzorak *	Koncentracijska razina	CITTC	Demecl	Doxy	EpiCl TTC	EpiOxy TTC	Epi TTC	Oxy TTC	TTC
Površina ispod pika									
3.	L1	25629	17768	3957	2150	5329	126891	74222	126186
4.	L1	26585	15433	3897	2225	6452	137278	88054	133090
5.	L2	140420	90596	16249	13132	32647	780498	454995	700751
6.	L2	172030	105336	26575	14354	34631	849128	507032	821876
7.	L3	335179	201442	40294	20858	75770	1799960	981744	1517631
8.	L3	324684	204581	50962	27134	66780	1594561	931018	1459272

\*numeracija uzorka odnosi se na uzorke iz tablice 3

Usporedbom površina ispod pikova za pojedine analite u tablicama 13 i 16, vidljivo je da se veći odzivi dobivaju pročišćavanjem obogaćenih uzoraka mlijeka ekstrakcijom organskim otapalom nego QuEACHERs ekstrakcijom. Stoga se može zaključiti da je više analita uklonjeno zajedno s matriksom u QuEACHERs ekstrakciji tj. manje je analita u ekstraktu (manji ekstrakcijski prinos) što potvrđuju Kaufmann i sur. (2022) koji spominju da prisutnost magnezijevog sulfata u QuEACHERS ekstrakciji dovodi do stvaranja kompleksa pri čemu dolazi do gubitka tetraciklina iz ekstrakta.

#### 4.2. ELISA test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

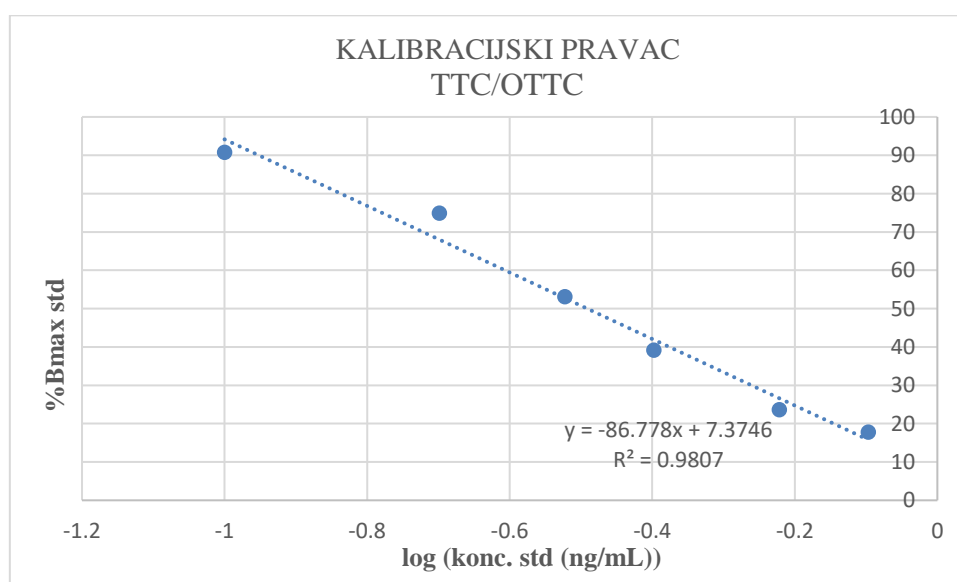
Uzorci mlijeka obogaćeni su analitima na razinu 50 ppb (ng/g) te nanaseni u triplikatu u jažice, za svaki od analita te su za kontrolu direktno u jažice nanaseni standardi analita. Vrijednosti dobivenih apsorbancija u pojedinim jažicama (tablica 7) prikazane su u tablici 17.



**Tablica 17.** Vrijednosti apsorbancije (%) dobivene ELISA metodom

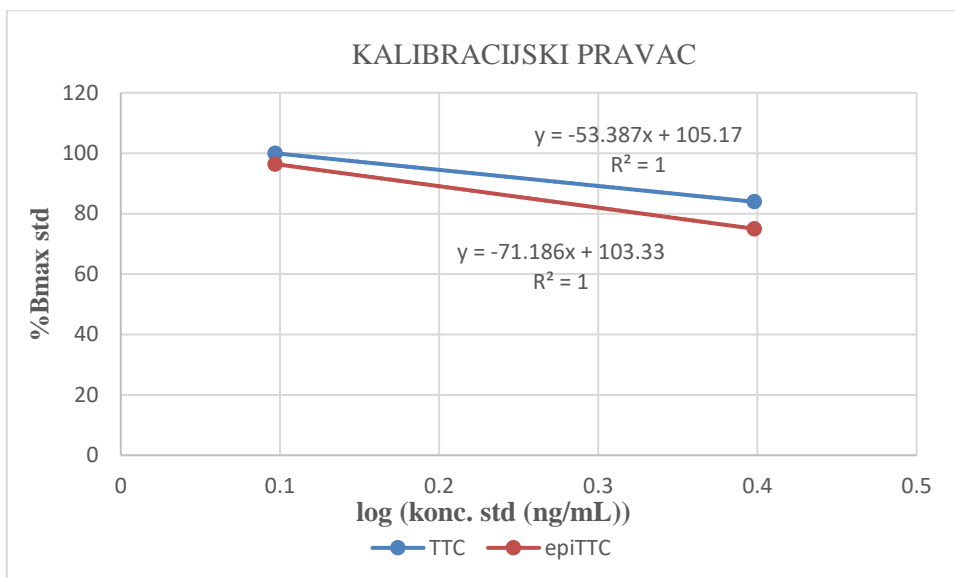
	1	2	3	4	5	6
A	100	109,82	93,75	90,179	92,857	95,536
B	100	83,929	86,607	95,536	92,857	98,214
C	96,429	75	84,821	95,536	85,714	100
D	86,607	80,357	76,786	101,79	89,286	108,93
E	92,857	86,607	84,821	92,857	88,393	85,714
F	93,75	82,143	81,25	91,071	90,179	87,5
G	91,071	84,821	77,679	91,964	92,857	87,5
H	101,79	87,5	89,286	92,857	100	95,536

Na slici 23 prikazan je kalibracijski pravac na temelju podataka koncentracija standarda i apsorbancije (%Bmax), dobivenih u certifikatu korištenog ELISA kita. Na apscisi se nalaze logaritamske vrijednosti koncentracije standarda, a na ordinati vrijednosti %Bmax.

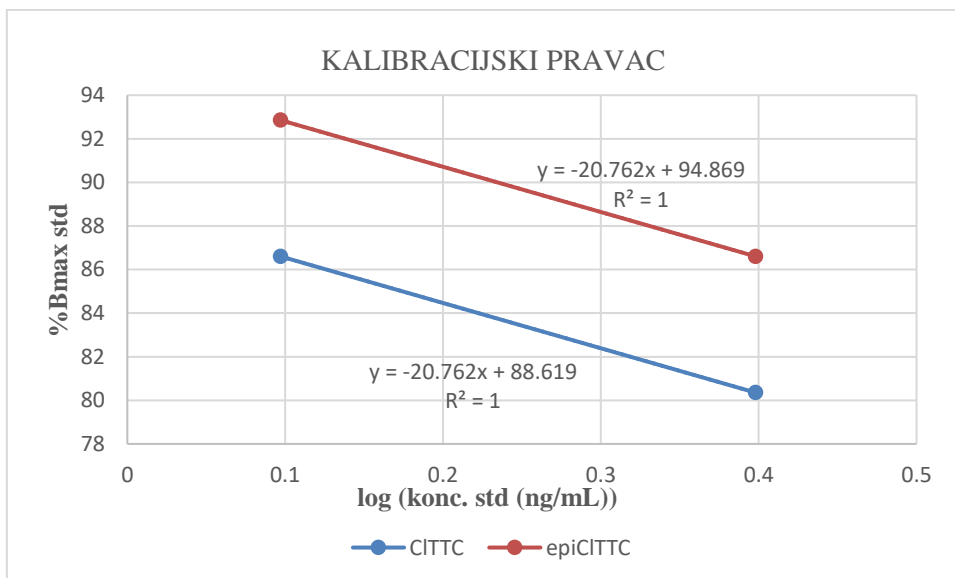


**Slika 23.** Kalibracijski pravac za standard tetraciklina

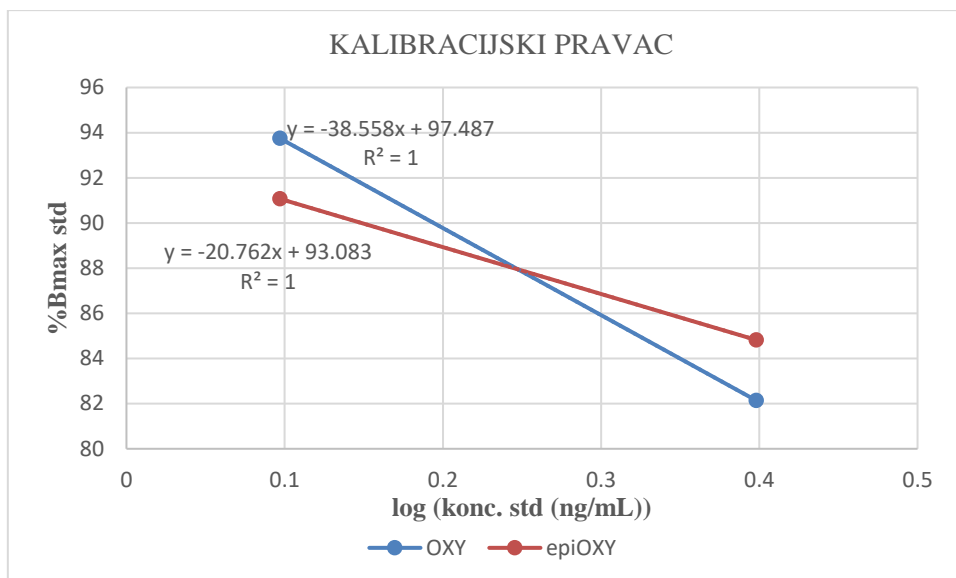
Kako bi odredili vrijednosti koncentracija analita (tablica 18) u obogaćenim uzorcima mlijeka, na temelju vrijednosti apsorbancija standarda pojedinih analita nanesenih direktno u jažice mikrotitarske pločice u koncentraciji 1,25 ng/mL i 2,5 ng/mL (tablica 7) dobiveni su kalibracijski pravci (slike 24-27).



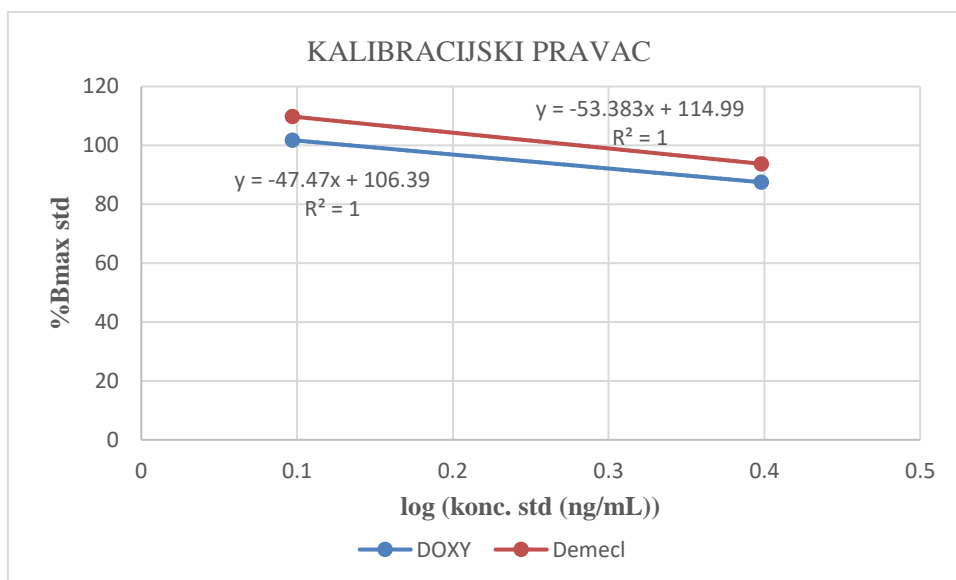
**Slika 24.** Kalibracijski pravac za standarde tetraciklina i epitetraciklina



**Slika 25.** Kalibracijski pravac za standarde klortetraciklina i epiklortetraciklina



**Slika 26.** Kalibracijski pravac za standarde oksitetraciklina i epioksitetraciklina



**Slika 27.** Kalibracijski pravac za standarde doksiciklina i demeklociklina

Korišteni kit koristi se za direktnu kompetitivnu ELISA metodu. Takva metoda se najčešće koristi, a nakon inkubacije enzimaska aktivnost (intenzitet obojenja) praćena je dodatkom kromogenog supstrata, a apsorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji analita (Goryacheva i De Saeger, 2011), što je i vidljivo u tablici 18.

**Tablica 18.** Određivanje tetraciklina, epitetraciklina, klortetraciklina, epiklortetraciklina, oksitetraciklina, epioksitetraciklina, doksiciklina i demeklociklina u uzorcima mlijeka obogaćenima na koncentraciju 50 ng/g (ppb)

broj u postupku	analit	matriks	%Bmax uzorka (maksimalna apsorbanca)	područje kalibracije %Bmax	log (konc TTC/ OTTC ng/mL)	ekvivalent TTC/ OTTC ng/mL	faktor razrj. metode	KONC TTC/ OTTC µg/kg
1	TTC	mlijeko	86,607	<MIN	0,347	2,227	40	89,091
2	TTC	mlijeko	84,821	<MIN	0,381	2,405	40	96,225
3	TTC	mlijeko	76,786	<MIN	0,531	3,402	40	136,081
4	epiTTC	mlijeko	84,821	<MIN	0,259	1,819	40	72,784
5	epiTTC	mlijeko	81,25	<MIN	0,310	2,042	40	81,696
6	epiTTC	mlijeko	77,679	<MIN	0,360	2,292	40	91,699
7	CLTTC	mlijeko	89,286	<MIN	-0,032	0,928	40	37,148
8	CLTTC	mlijeko	90,179	<MIN	-0,075	0,841	40	33,645
9	CLTTC	mlijeko	95,536	>MAX	-0,333	0,464	40	18,574
10	epiCLTTC	mlijeko	95,536	>MAX	-0,032	0,928	40	37,148
11	epiCLTTC	mlijeko	101,79	>MAX	-0,333	0,464	40	18,565
12	epiCLTTC	mlijeko	92,857	>MAX	0,097	1,250	40	50
13	OXYTTC	mlijeko	91,071	>MAX	0,166	1,467	40	58,675
14	OXYTTC	mlijeko	91,964	>MAX	0,143	1,391	40	55,628
15	OXYTTC	mlijeko	92,857	>MAX	0,120	1,318	40	52,739
16	epiOXYTTC	mlijeko	92,857	>MAX	0,011	1,025	40	41,015
17	epiOXYTTC	mlijeko	92,857	>MAX	0,011	1,025	40	41,015
18	epiOXYTTC	mlijeko	85,714	<MIN	0,355	2,264	40	90,571
19	DOXY	mlijeko	89,286	<MIN	0,360	2,292	40	91,702
20	DOXY	mlijeko	88,393	<MIN	0,379	2,394	40	95,761
21	DOXY	mlijeko	90,179	<MIN	0,342	2,195	40	87,814
22	DEMECL	mlijeko	92,857	>MAX	0,415	2,598	40	103,927
23	DEMECL	mlijeko	100	>MAX	0,281	1,909	40	76,369
24	DEMECL	mlijeko	95,536	>MAX	0,364	2,314	40	92,586
25	SP	mlijeko	98,214	>MAX	-1,047	0,089	40	3,591
26	SP	mlijeko	100	>MAX	-1,067	0,086	40	3,425
27	SP	mlijeko	108,93	>MAX	-1,170	0,068	40	2,703

U tablici 18 prikazani su rezultati postotka maksimalne apsorbance (%Bmax) u odnosu na slijepi uzorak. Kod uzoraka 25-27 koji predstavljaju slijepu uzorke, tj. mlijeko bez prisutnih rezidua tetraciklina %B max približno je jednak slijepoj kontroli kita. Pomoću kontrolnih uzoraka standardnih otopina pojedinih analita izrađene su kalibracijske krivulje (slike 24-27). Teoretski podaci iz certifikata kita također su uzeti u obzir za kalibracijsku krivulju (slika 23). S obzirom na %Bmax proračunate su koncentracije tetraciklinskih antibiotika u uzorcima. Dobivene koncentracije nisu ponovljive te ne odgovaraju razini obogaćenja mlijeka stoga ELISA metoda nije pouzdana metoda za kvantitativne svrhe. ELISA metoda se može koristiti samo u kvalitativne svrhe i to samo za neke od analita. Apsorbancije prikazane u tablici 18 ukazuju na prisutnost analita s obzirom na apsorbancu, te se usporedbom apsorbancija negativnih uzoraka mlijeka tj. slijepu probe i obogaćenih uzoraka može zaključiti da li uzorak sadrži analite. Kod slijepih uzoraka mlijeka vidljivo je da su one približno jednake apsorbanciji otopine tetraciklinskog *zero* standarda (%Bmax teorijska) koja teoretski iznosi 100 % s obzirom na to da je kod direktne ELISA metode apsorbancija (intenzitet obojenja) obrnuto proporcionalna koncentraciji tetraciklina u uzorcima. Nadalje usporedbom obogaćenih uzoraka mlijeka s tetraciklinom (TTC) i epitetraciklinom (epiTTC) intenzitet obojenja je slabiji tj. maksimalna apsorbancija je manja od 100 % te se kreće između 76,786 % i 86,607 %. S obzirom na to da su obogaćeni uzorci mlijeka nanešeni u triplikatu u jažice za svaki pojedini analit, u tablici 19 prikazane su izračunate srednje vrijednosti %Bmax obogaćenih uzoraka mlijeka za pojedine analite te je određena razlika između %Bmax teorijske i %Bmax.

**Tablica 19.** Prosjek vrijednosti maksimalnih apsorbancija za pojedine analite i razlika između prosjeka maksimalne apsorbancije i apsorbancije tetraciklinskog *zero* standarda

<b>Analit</b>	<b>prosjek %Bmax (%)</b>	<b><math>\Delta</math> (%Bmax teorijska- prosjek %Bmax) (%)</b>
<b>TTC i epiTTC</b>	81,994	18,006
<b>CITTC i epiCITTC</b>	94,197	5,803
<b>Oxy i epiOxy</b>	91,220	8,780
<b>Doxy</b>	89,286	10,714
<b>Demecl</b>	96,131	3,869

Razlika između %Bmax teorijske i %Bmax obogaćenih uzoraka mlijeka s tetraciklinom i epitetraciklinom je značajna i iznosi 18 % te se ELISA kit može koristiti kao „screening“ metoda samo za TTC i epiTTC. Za ostale analite spomenuta razlika je manja od 10 %, te kod doksiciklina 10,7 %, što ukazuje na to da pri koncentracijama analita od 50 ppb ovaj ELISA kit nije dovoljno selektivan i osjetljiv za navedene analite.

Najveće dopuštene koncentracije (NDK, engl. *maximum residue limit (MDL)*) tetraciklinskih antibiotika u određenim matriksima, pa tako i u mlijeku, propisane su od strane Europske unije (COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010), a prikazane su u tablici 20.

**Tablica 20.** Propisane NDK za tetraciklinske antibiotike u mlijeku (COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010)

<b>Analit</b>	<b>Marker rezidua</b>	<b>Vrsta životinje</b>	<b>NDK u mlijeku (µg/kg)</b>
<b>Klortetraciklin</b>	Suma parenta (primarnog spoja) i njegovog metabolita (4-epimera)	Sve životinje korištene u svrhu proizvodnje hrane	100
<b>Oksitetraciklin</b>	Suma parenta (primarnog spoja) i njegovog metabolita (4-epimera)	Sve životinje korištene u svrhu proizvodnje hrane	100
<b>Tetraciklin</b>	Suma parenta (primarnog spoja) i njegovog metabolita (4-epimera)	Sve životinje korištene u svrhu proizvodnje hrane	100
<b>Doksiciklin</b>	Doksiciklin	Sve životinje korištene u svrhu proizvodnje hrane	/

U regulativi Europske unije, matični spojevi tetraciklin, klortetraciklin i oksitetraciklin određuju se kao zbroj s njihovim odgovarajućim metabolitom (4-epimerom) (COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010). Kod mlijeka je NDK za sumu pojedinog tetraciklinskog antibiotika i njegovog metabolita iznosi 100 ppb-a (100 µg/kg), ELISA metodom trebalo bi biti moguće detektirati koncentracije od 50 ppb-a svakog od njih (npr. 50 ppb TTC + 50 ppb epiTTC

= 100 ppb). Stoga ovaj kit nije prikladan kao orijentacijska („screening“) metoda s obzirom na to da ne pokriva sve tetracikline koji mogu biti prisutni kao rezidue u mlijeku.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Optimizirani parametri LC-MS/MS metode omogućuju bolju selektivnost i razdvajanje analita, a samim time i točnije rezultate analize. U ovom radu utvrđeno je da optimalna vrijednost napona fragmentora za analizu tetraciklinskih analita iznosi 130 V, dok se optimalne vrijednosti kolizijske energije za dobivanje značajnijih produkt iona kreću u rasponu od 10 eV do 24 eV.
2. LC-MS/MS metoda linearna je za sve tetraciklinske analite u koncentracijskom području od 5-1000 ng/mL, uz vrijednost koeficijenta determinacije u iznosu od 0,999.
3. Kod pročišćavanja obogaćenih uzoraka mlijeka QuEACHERS ekstrakcijom veća efikasnost ekstrakcije dobivena je korištenjem natrijevog sulfata u odnosu na magnezijev sulfat.
4. Matriks efekt mlijeka određen je računanjem matriks faktora (MF). Veći matriks efekt uočen je kod pročišćavanja uzoraka QuEACHERS ekstrakcijom u odnosu na ekstrakciju acetonitrilom (organskim otapalom).
5. Veći ekstrakcijski prinos dobiven je nakon pročišćavanja obogaćenih uzoraka mlijeka ekstrakcijom organskim otapalom.
6. Zbog neponovljivosti rezultata određivanja koncentracije tetraciklinskih antibiotika dokazano je da se ELISA test ne može koristiti u kvantitativne svrhe. Isto tako, određene koncentracije ne odgovaraju koncentracijskoj razini obogaćenja mlijeka.
7. Direktna kompetitivna ELISA metoda ne može se koristiti u kvalitativne svrhe s obzirom na to da ne pokriva sve tetraciklinske antibiotike koji se mogu naći kao rezidue u mlijeku. S obzirom na razliku vrijednosti teorijske i dobivene apsorbancije, može se koristiti u kvalitativne svrhe isključivo za tetraciklin i epitetraciklin.
8. LC-MS/MS metoda može se koristiti u određivanju rezidua tetraciklinskih antibiotika u mlijeku dok se ELISA test ne može koristiti.



## 6. LITERATURA

Adrian J, Pinacho DG, Granier B, Diserens JM, Sanchez, Baeza F, Marco MP (2008) A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Anal Bioanal Chem* **391**, 1703–1712. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2106-9>

Agwuh KN, MacGowan A (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. *J. Antimicrob Chemother* **58**, 256–265. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl224>

Atta AH, Atta SA, Nasr SM, Mouneir SM (2022) Current perspective on veterinary drug and chemical residues in food of animal origin. *Environ Sci Pollut Res Int* **29**, 15282–15302. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18239-y>

Baharoglu Z, Mazel D (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>

Bedenić B (2009) Antibakterijski lijekovi. U: Uzunović Kamberović S (ured.) Medicinska mikrobiologija, Zenica: Štamparija Fojnica d.o.o, str. 221-252.

Bonwick GA, Smith CJ (2004) Immunoassays: Their history, development and current place in food science and technology. *Intnatl J Food Sci Technol* **39**, 817–818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00855.x>

Butorac A, Marić M, Badanjak Sabolović M, Hruškar M, Rimac Brnčić S, Bačun Družina V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *CJFSAU* **8**, 90-101. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/115923>

Caryl JA, Cox G, Trimble S, O'Neill AJ (2012) “tet(U)” is not a tetracycline resistance determinant. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 3378–3379. <https://doi.org/10.1128/aac.05957-11>

Cech NB, Enke CG (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev* **20**, 362–387. <https://doi.org/10.1002/mas.10008>

Chen Z, Zhang Y, Gao Y, Boyd S A, Zhu D, Li H (2015) Influence of Dissolved Organic Matter on Tetracycline Bioavailability to an Antibiotic-Resistant Bacterium. *Environ Sci Technol* **49**, 10903–10910. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b02158>

Cindrić M, Marković A, Horvatić A (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218–232. <https://hrcak.srce.hr/file/68074>. Pristupljeno 21. veljače 2023.

COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 Regulations on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:015:0001:0072:en:PDF> Pristupljeno 11. travnja 2023.

Fakruddin M, Mannan KSB, Andrews S (2013) Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. *ISRN Microbiol* 1–6. <https://doi.org/10.1155%2F2013%2F703813>

Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

Furuya EY, Lowy FD (2006) Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* **4**, 36–45. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>

Gaurav A, Gill JPS, Aulakh RS, Bedi JS (2014) ELISA based monitoring and analysis of tetracycline residues in cattle milk in various districts of Punjab. *Vet World* **7**, 26-29. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2014.26-29>

Ghosh C (2014) Relative matrix effects: A step forward using standard line slopes and ANOVA analysis. *Arab J Chem* 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.019>

González GA, Herrador AM (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem* **26**, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>

Goryacheva IY, De Saeger S (2011) Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection in food and feed U: De Saeger S (ured.) Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed, 1 izd., Woodhead Publishing Limited, str. 141.

Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilback C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog* **7**, 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>

Haenni M, Dagot C, Chesneau O, Bibbal D, Labanowski J, Vialette M, i sur. (2022) Environmental contamination in a high-income country (France) by antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes: Status and possible causes. *Environ Int* **159**, 107047. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107047>

Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL (2019) Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* **4**, 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>

Kamel AM, Fouada HG, Brown PR, Munson B (2002) Mass spectral characterization of tetracyclines by electrospray ionization, H/D exchange, and multiple stage mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **13**, 543–557. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(02\)00356-2](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00356-2)

Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M (2022) Improving the QuEChERS Liquid/Liquid Extraction of Analytes With Widely Varying Physicochemical Properties: Example of 201 Veterinary Drugs in Milk. *J AOAC Int* **105**, 1030–1042. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac013>

Mensah SE, Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M, Mensah GA, Abiola FA (2014) Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: public health risks. *Rev Sci Tech* **33**, 987-996.

Meredith H, Srimani J, Lee A (2015) Collective antibiotic tolerance: mechanisms, dynamics and intervention. *Nat Chem Biol* **11**, 182–188. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1754>

Nelson ML, Levy SB (2011) The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci* **1241**, 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>

Nesme J, Simonet P (2014) The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol* **17**, 913–930. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>

Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem* **395**, 559–575. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0292>

Patel D, Walker M (2004) Semi-solid cultured dairy products: Principles and applications. U: Hui Y.H., Chandan RC, Clak S, Cross N, Dobbs J, Hurst WJ, Nollet LM, Shimoni E, Sinha N,

Smith EB, Suripat S, Tilchenal A, Toldra F (ured.), Handbook of Food Products Manufacturing, 1 izd., John Wiley & Sons, Inc., New York, str. 113–124.

Petković H, Lukežič T, Šušković J (2017) Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*: Past, Present and Future Directions in the Development of Tetracycline Antibiotics. *Food Technol Biotechnol* **55**, 3–13. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4617>

Reeves PT (2012) Antibiotics: groups and properties. U: Wang J, MacNeil JD, Kay JF (ured.) Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food, 1 izd., John Wiley & Sons, Inc., str. 1-60.

Reuhs BL, Rounds MA (2010) High-Performance Liquid Chromatography. U: S.S. Nielsen (ured.) Food Analysis, 4 izd., Boston: Springer, str. 501-512. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_28)

Rosner MH, Grassman JA, Haas RA (1991), Immunochemical techniques in biological monitoring. *Environ Health Perspect* **94**, 131–134. <https://doi.org/10.1289/ehp.94-1567961>

Ichiro H (2019) Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS), e-book, 1. izd., Shimadzu Corporation.

Singh AK, Bhunia AK (2019) Animal-Use Antibiotics Induce CrossResistance in Bacterial Pathogens to Human Therapeutic Antibiotics. *Curr Microbiol* **76**, 1112–1117. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01744-2>

Soler C, Hamilton B, Furey A, James KJ, Mañes J, Picó Y (2006) Optimization of LC–MS/MS using triple quadrupole mass analyzer for the simultaneous analysis of carbosulfan and its main metabolites in oranges. *Anal Chim Acta* **571**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.033>

Stead DA (2000) Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *J Chromatogr B* **747**, 69–93. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00133-X)

Stead S, Stark J (2012) Bioanalytical screening methods. U: Wang J, MacNeil JD, Kay JF (ured.) Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food, 1 izd., John Wiley & Sons, Inc., str. 153-186.

Stolker AAM, Danaher M (2012) Sample preparation: extraction and clean-up. U: Wang J, MacNeil JD, Kay JF (ured.) Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food, 1 izd., John Wiley & Sons, Inc., str. 125-152.

Taflin DC, Ward TL, Davis EJ (1989) Electrified droplet fission and the Rayleigh limit. *Langmuir* **5**, 376–384. <https://doi.org/10.1021/la00086a016>

Vishnuraj MR, Kandeepan G, Rao KH, Chand S, Kumbhar V (2016) Occurrence, public health hazards and detection methods of antibiotic residues in foods of animal origin: A comprehensive review. *Cogent Food Agric* **2** 1235458. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1235458>

Wang J, Turnipseed SB (2012) *Chemical Analysis: Quantitative and Confirmatory Methods U*: Wang J, MacNeil JD, Kay JF (ured.) *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, 1 izd., John Wiley & Sons, Inc., str. 187-226.

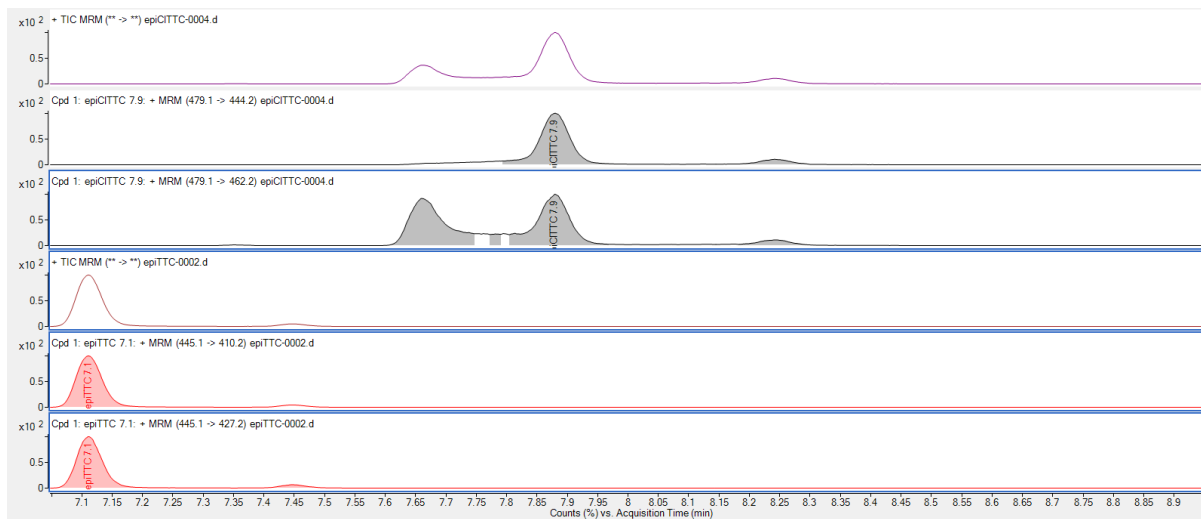
Watts PS, McLeod D (1946) The estimation of penicillin in blood serum and milk of bovines after intramuscular injection. *J Comp Pathol Therap* **56**, 170–176. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(46\)80015-8](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(46)80015-8)

Zakeri B, Wright GD (2008) Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochem Cell Biol* **86**, 124-133. <https://doi.org/10.1139/O08-002>

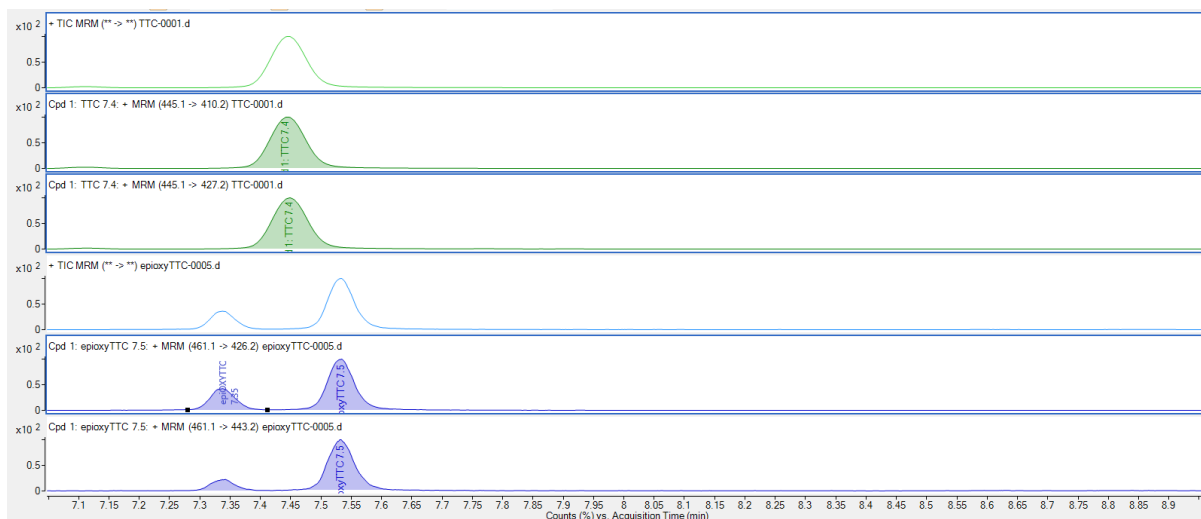
Wu Q, Shabbir MAB, Peng D, Yuan Z, Wang Y (2021) Microbiological inhibition-based method for screening and identifying of antibiotic residues in milk, chicken egg and honey. *Food Chem* **363**, 1-43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130074>

## 7. PRILOZI

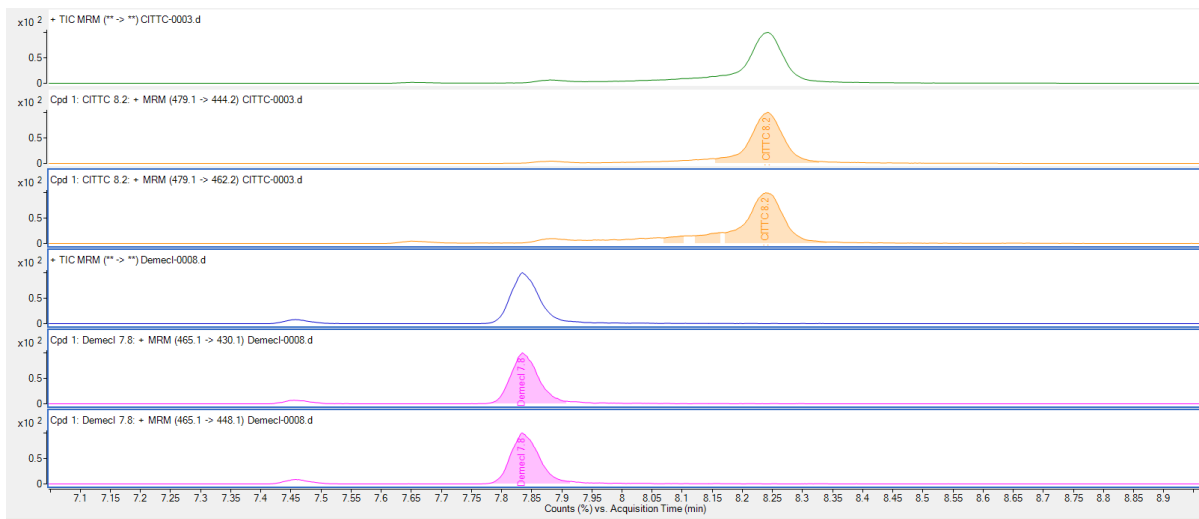
### 7.1. KROMATOGRAMI ODREĐIVANJA RT TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA



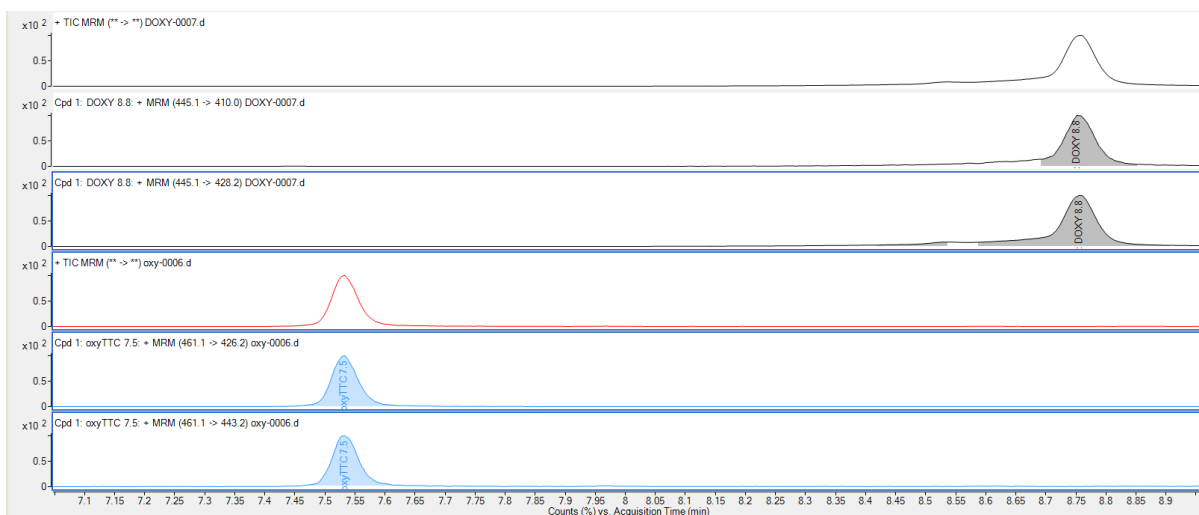
**Slika 28.** Kromatogram epiklortetraciklina (crno) i epitetraciklina (crveno).



**Slika 29.** Kromatogram tetraciklina (zeleno) i epioxitetraacyklina (plavo, lijevi pik)

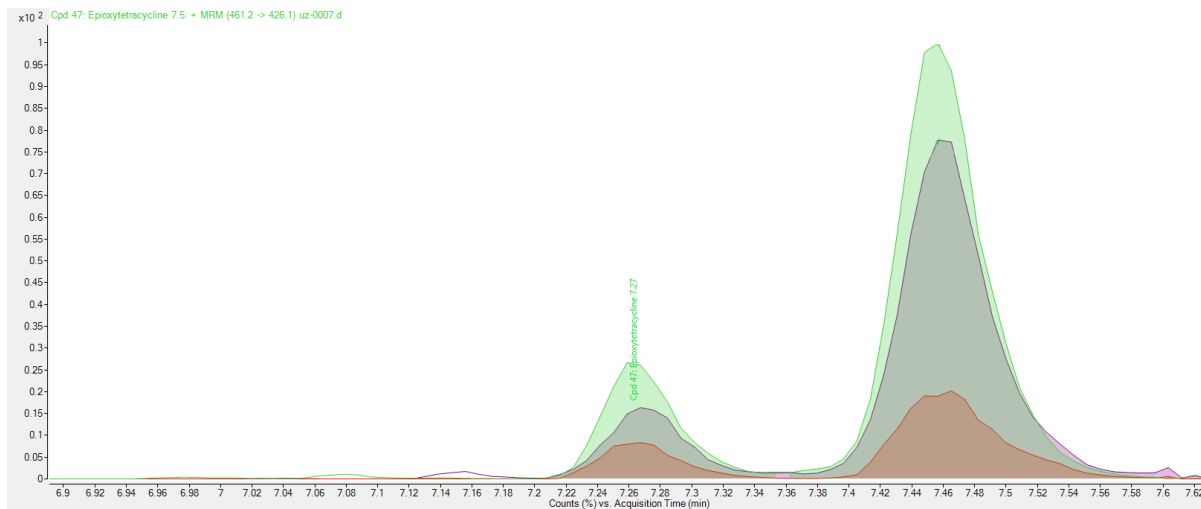


**Slika 30.** Kromatogram klortetraciklina (narančasto) i demeklociklina (rozo)

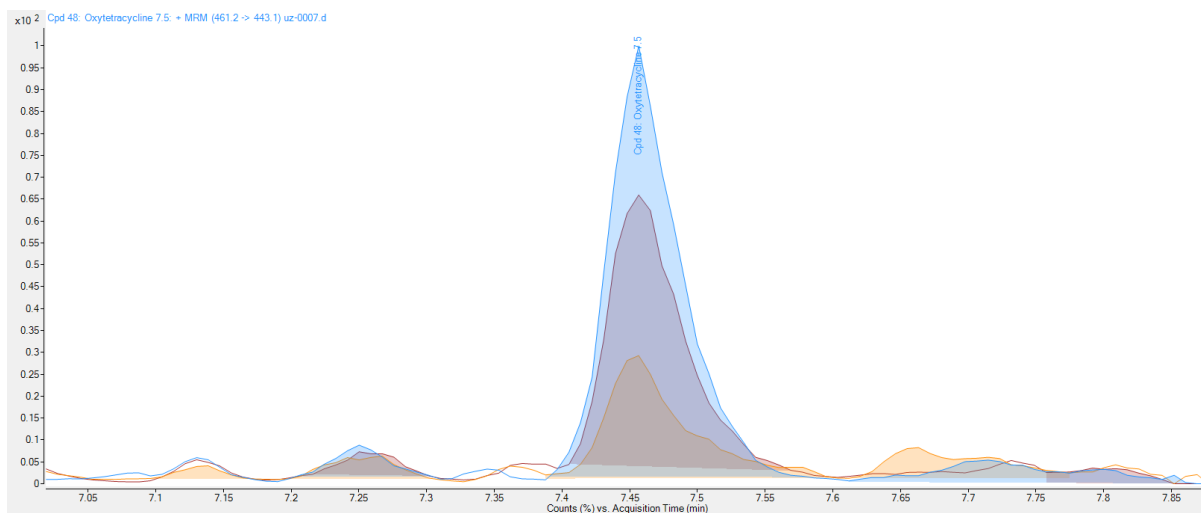


**Slika 31.** Kromatogram doksiciklina (crno) i oksitetraciklina (plavo)

## 7.2. KROMATOGRAMI ANALITA NAKON QuEACHERS EKSTRAKCIJE S Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> I Mg SO<sub>4</sub>

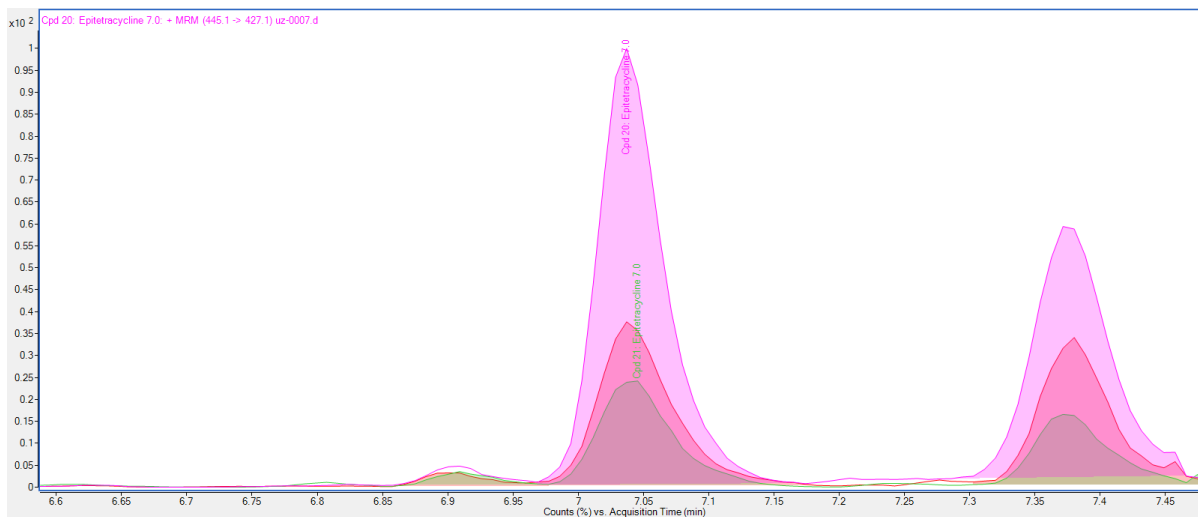


**Slika 32.** Kromatogram epioksitetraciklina nakon QuEACHERS ekstrakcije s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (uzorak 11, ljubičasti pik) i Mg SO<sub>4</sub> (uzorak 7, zeleni pik; uzorak 9, crveni pik)



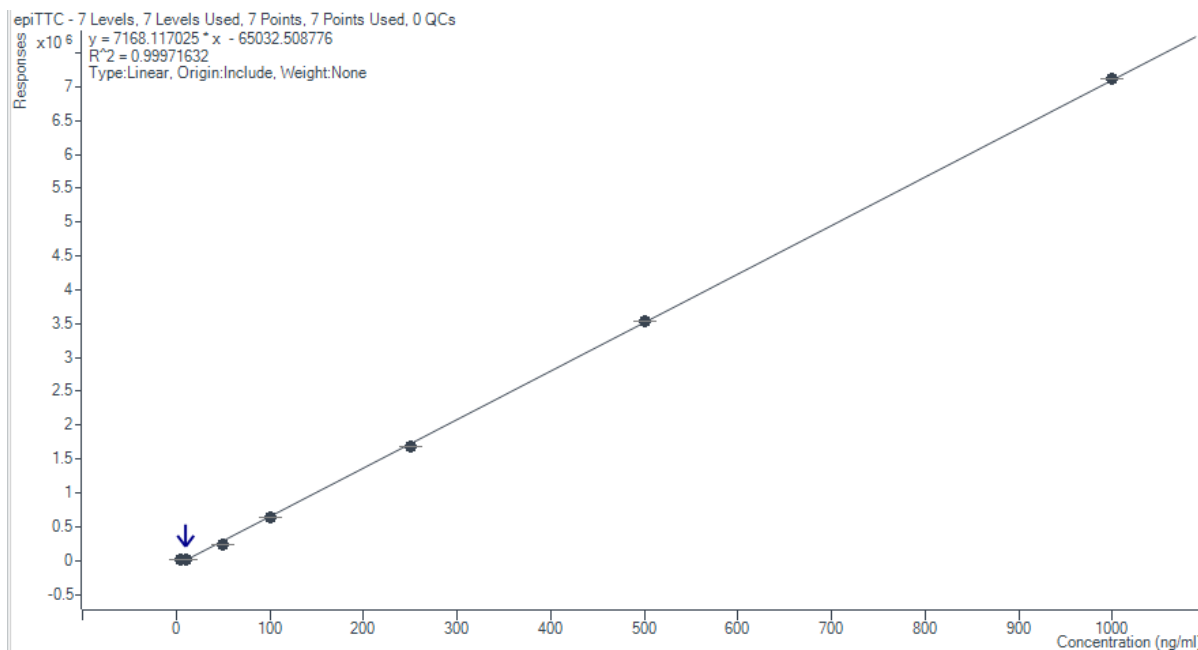
**Slika 33.** Kromatogram oksitetraciklina nakon QuEACHERS ekstrakcije s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (uzorak 11, crveni pik) i Mg SO<sub>4</sub> (uzorak 7, plavi pik; uzorak 9, narančasti pik)



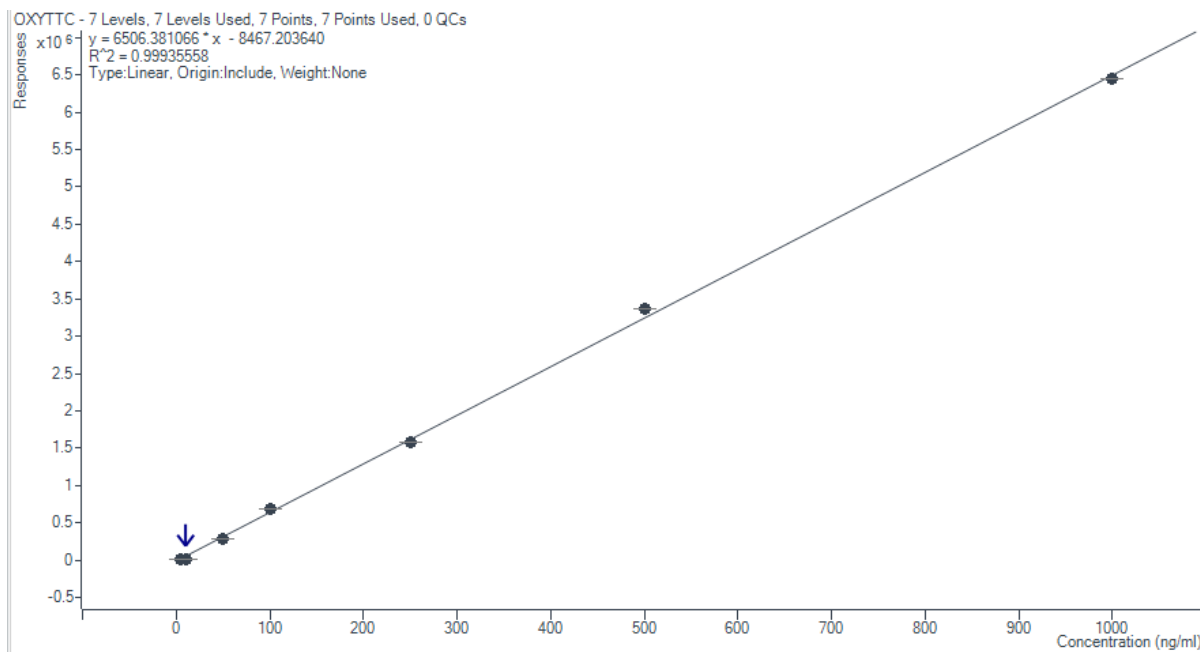


**Slika 34.** Kromatogram epitetraciklina nakon QuEChERS ekstrakcije s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (uzorak 11, tamno rozi pik) i Mg SO<sub>4</sub> (uzorak 7, rozi pik; uzorak 9, zeleni pik)

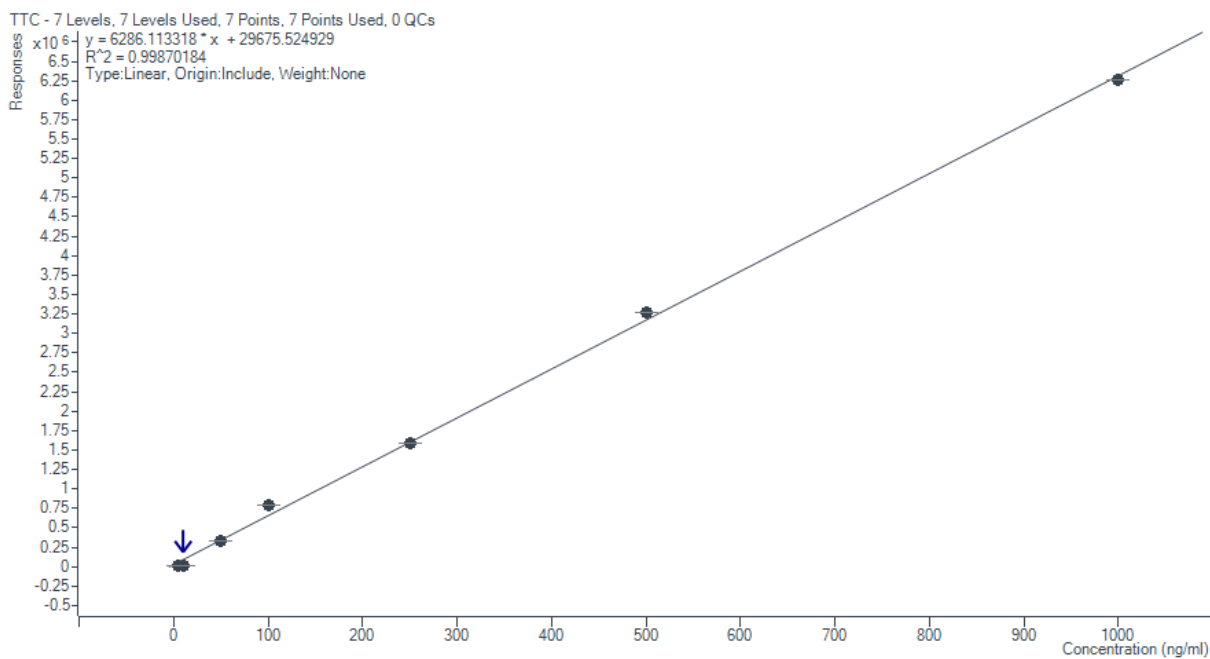
### 7.3. KALIBRACIJSKE KRIVULJE NA OTAPALU ZA POJEDINE ANALITE, DOBIVENE LC-MS/MS METODOM



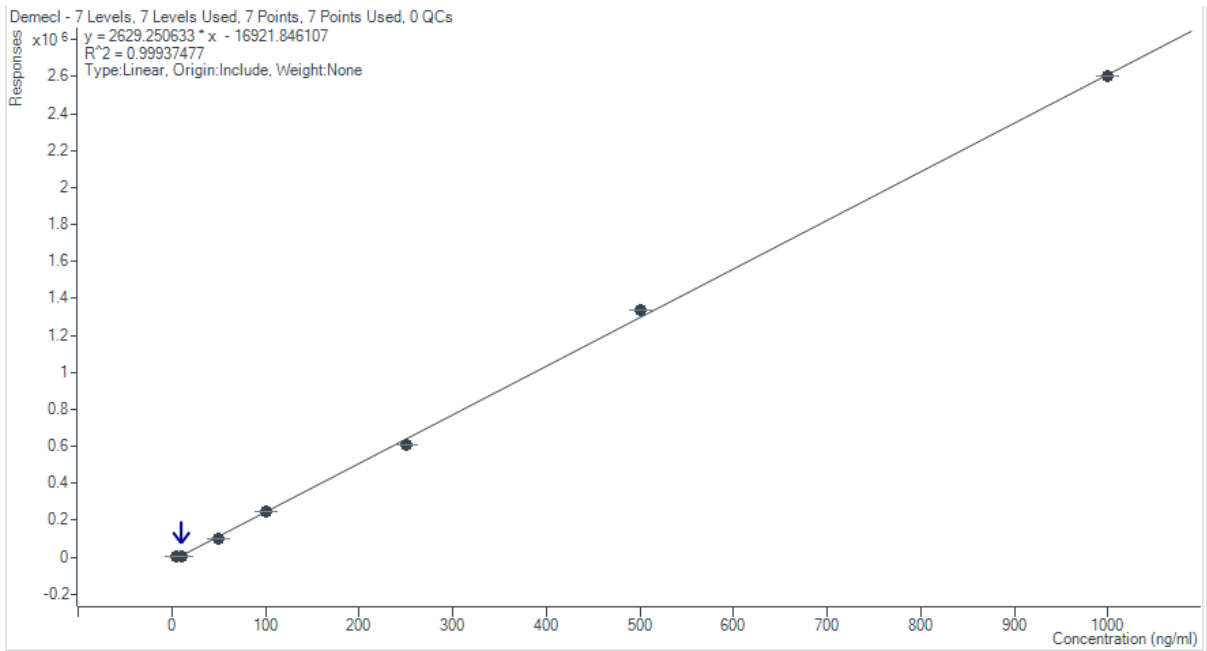
**Slika 35.** Kalibracijska krivulja na otapalu za epiklortetraciklin



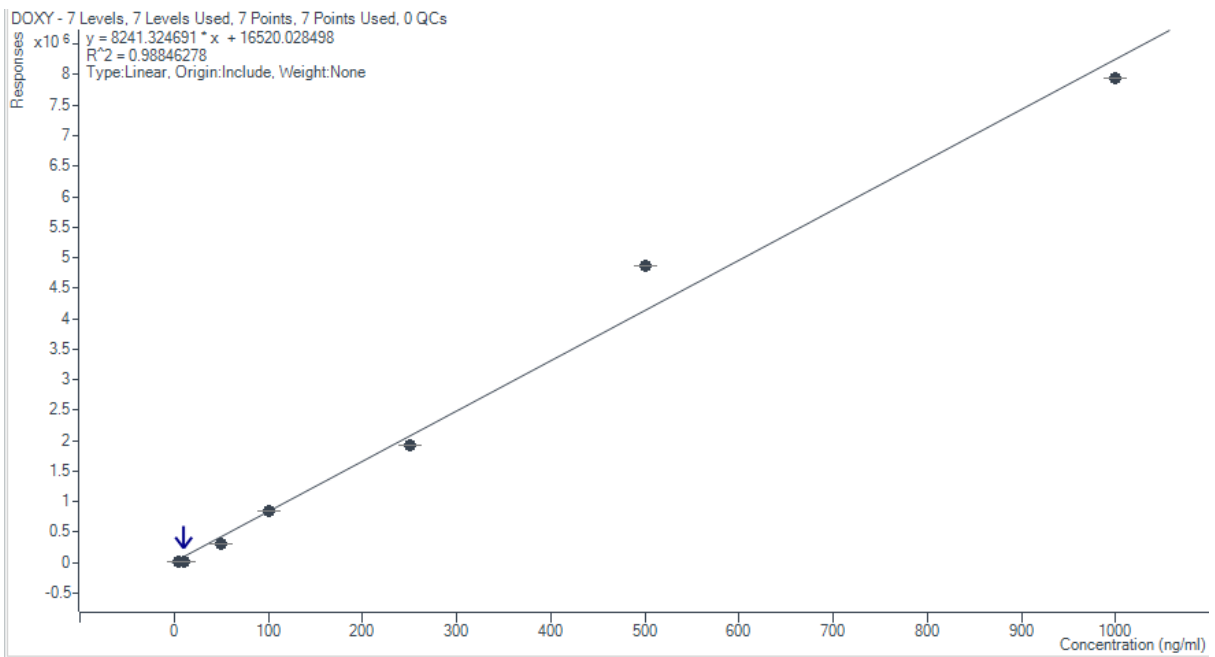
**Slika 36.** Kalibracijska krivulja na otapalu za okistetraciklin



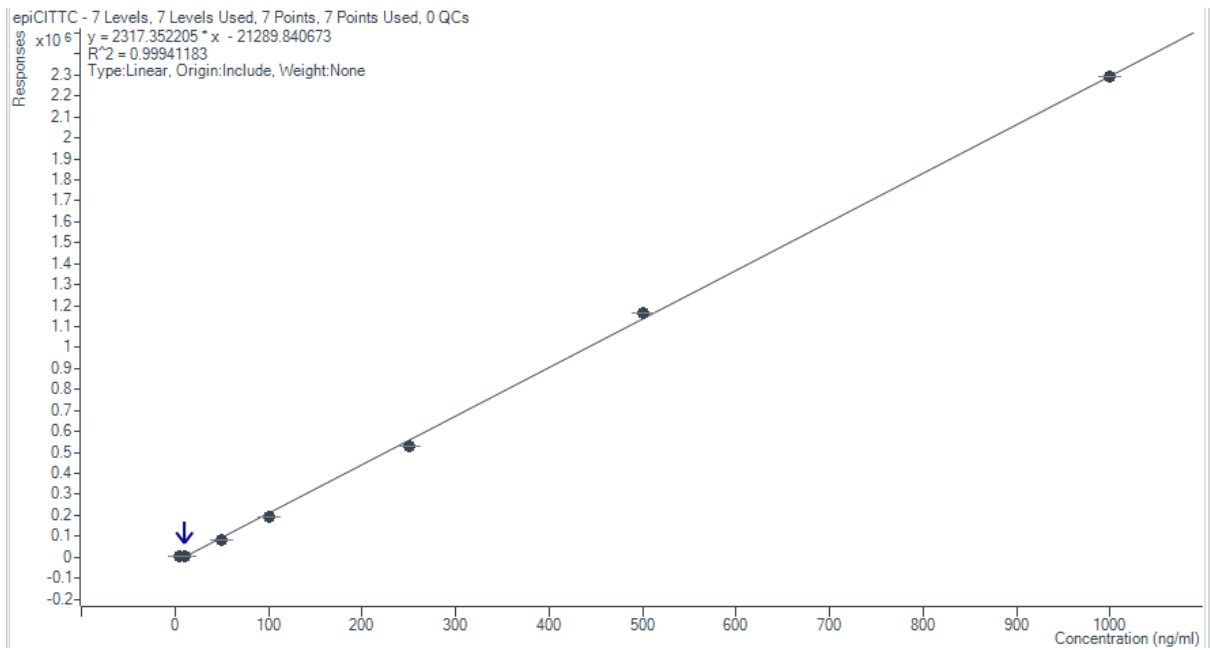
**Slika 37.** Kalibracijska krivulja na otapalu za tetraciklin



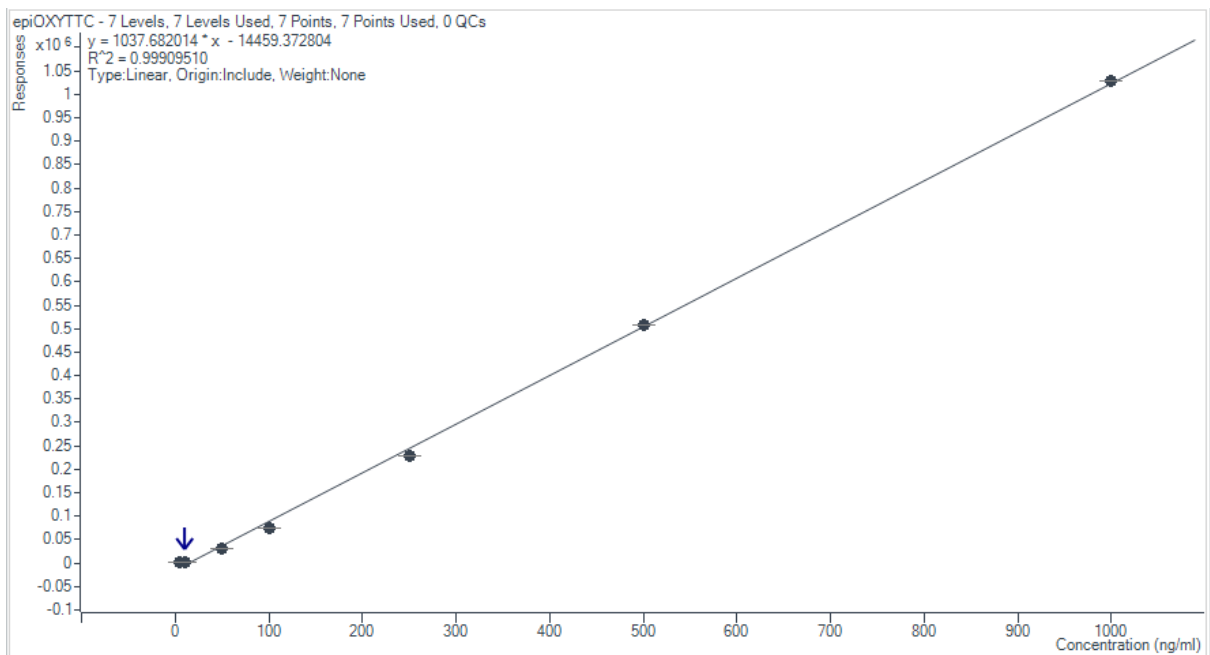
**Slika 38.** Kalibracijska krivulja na otapalu za demeklociklin



**Slika 39.** Kalibracijska krivulja na otapalu za doksiciklin

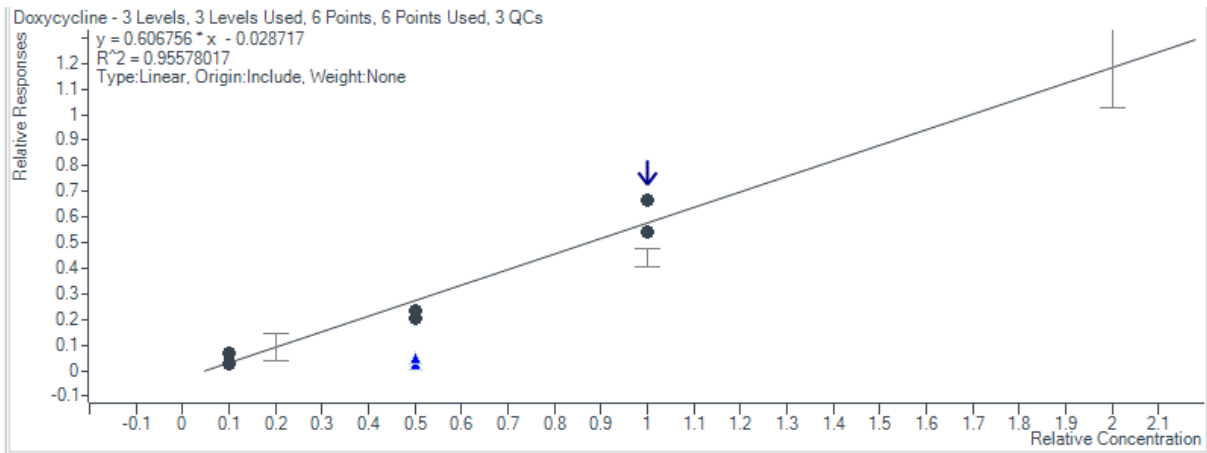


**Slika 40.** Kalibracijska krivulja na otapalu za epiklortetraciklin

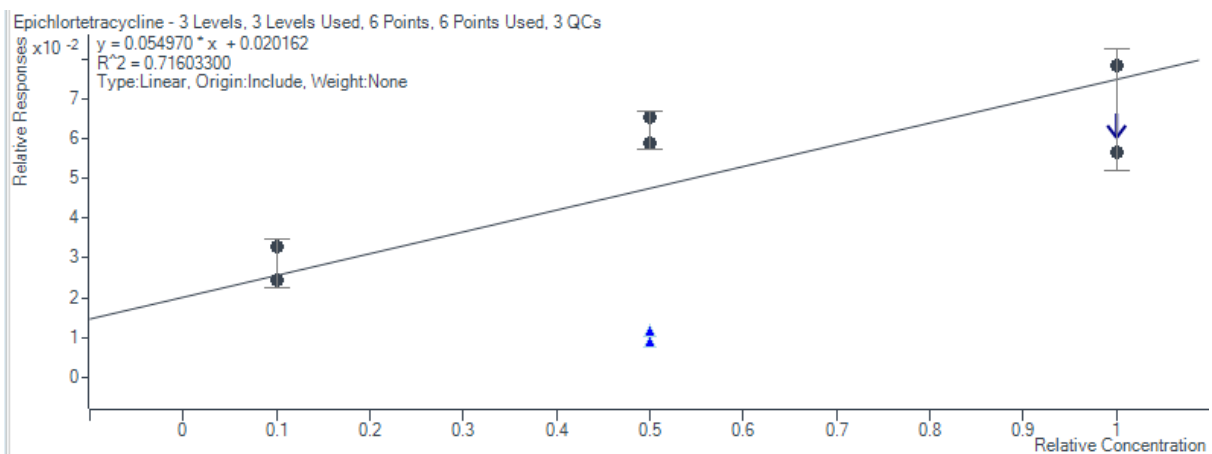


**Slika 41.** Kalibracijska krivulja na otapalu za epioksitetraciklin

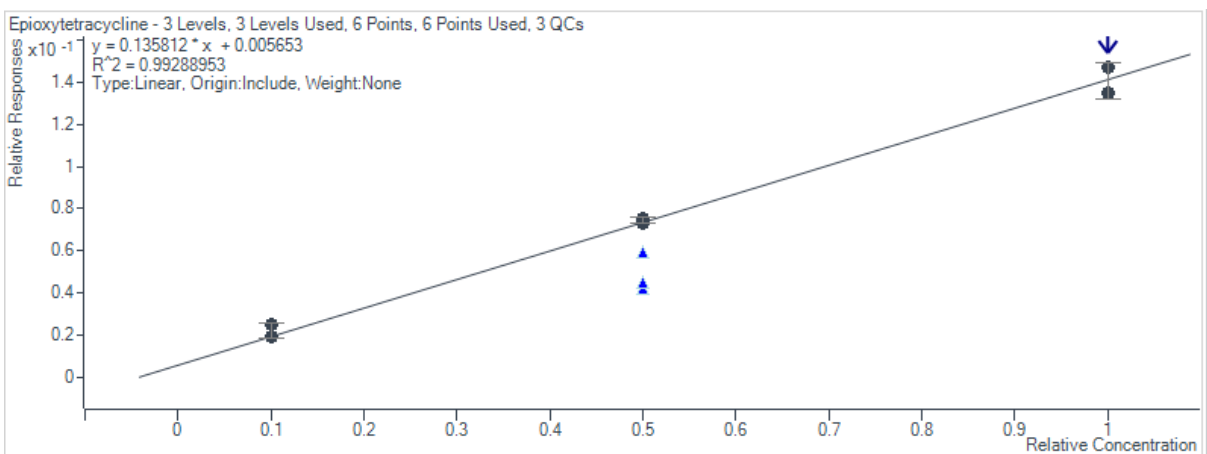
## 7.4. MATRIKS KALIBRACIJSKE KRIVULJE POJEDINIH ANALITA, DOBIVENE LC-MS/MS METODOM NAKON PROČIŠĆAVANJA UZORKA QuECHERS EKSTRAKCIJOM



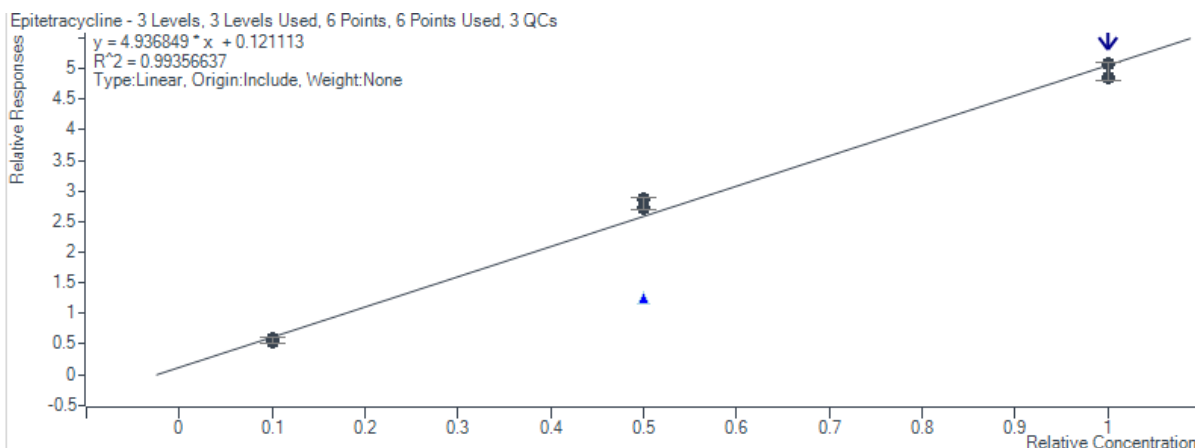
Slika 42. Matriks kalibracijska krivulja za doksiciklin



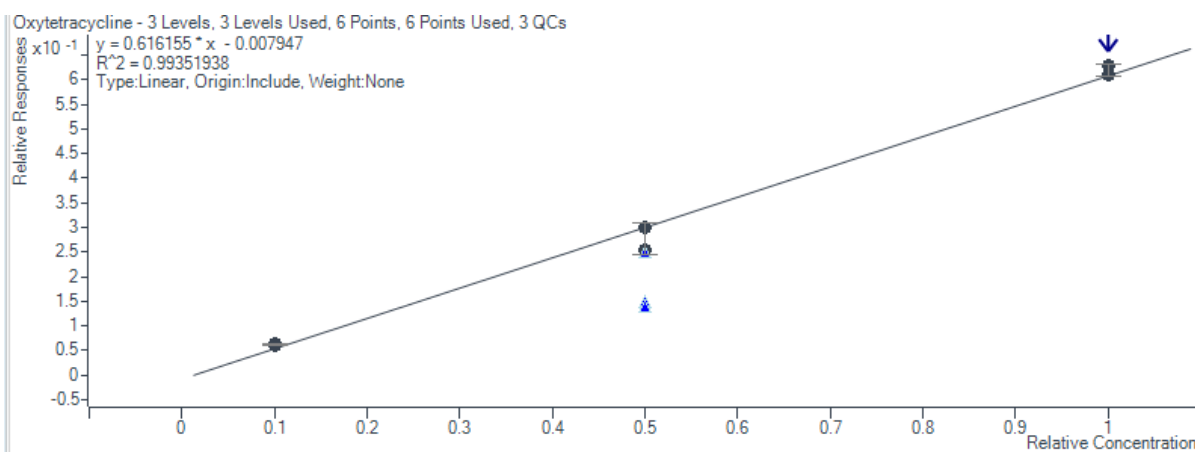
Slika 43. Matriks kalibracijska krivulja za epiklortetraciklin



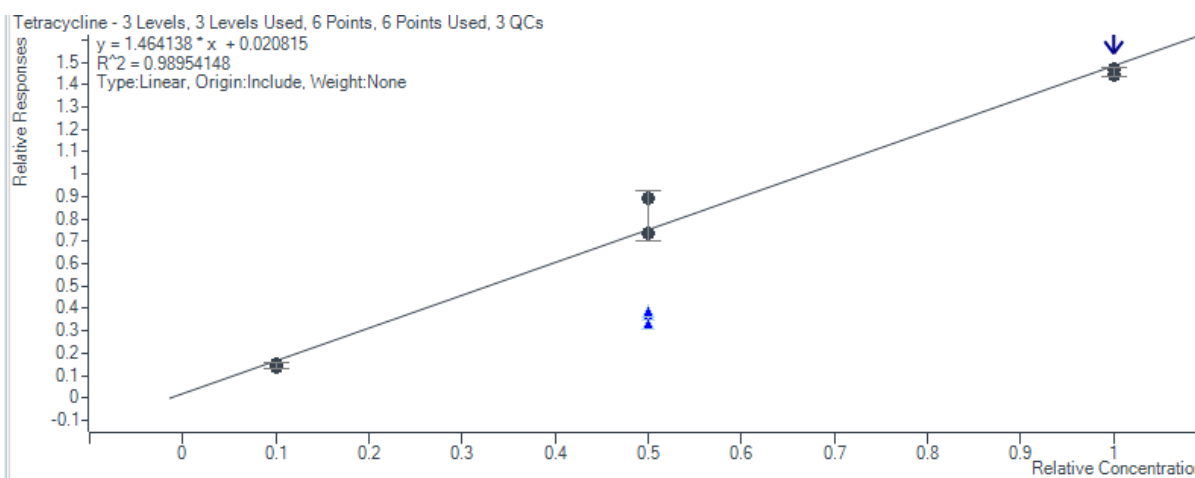
Slika 44. Matriks kalibracijska krivulja za epioksitetraciklin



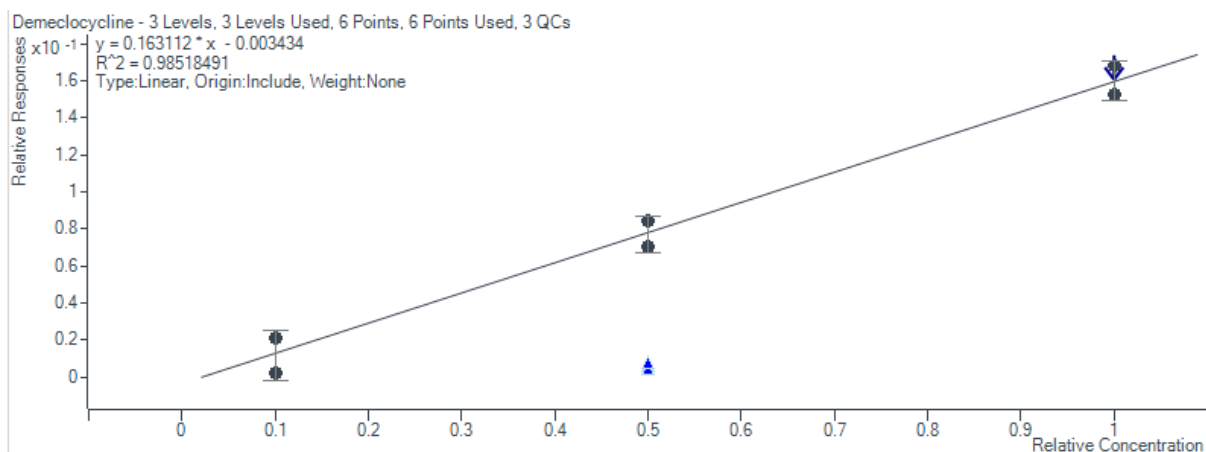
**Slika 45.** Matriks kalibracijska krivulja za epitetraciklin



**Slika 46.** Matriks kalibracijska krivulja za oksitetraciklin

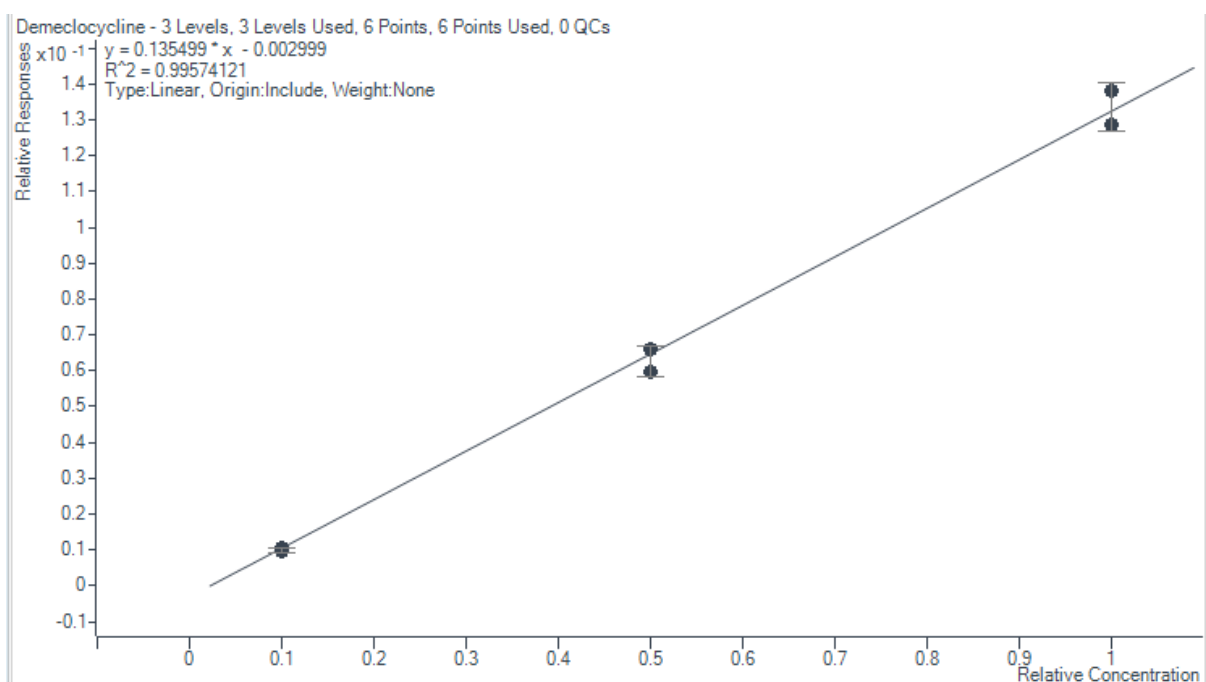


**Slika 47.** Matriks kalibracijska krivulja za tetraciklin

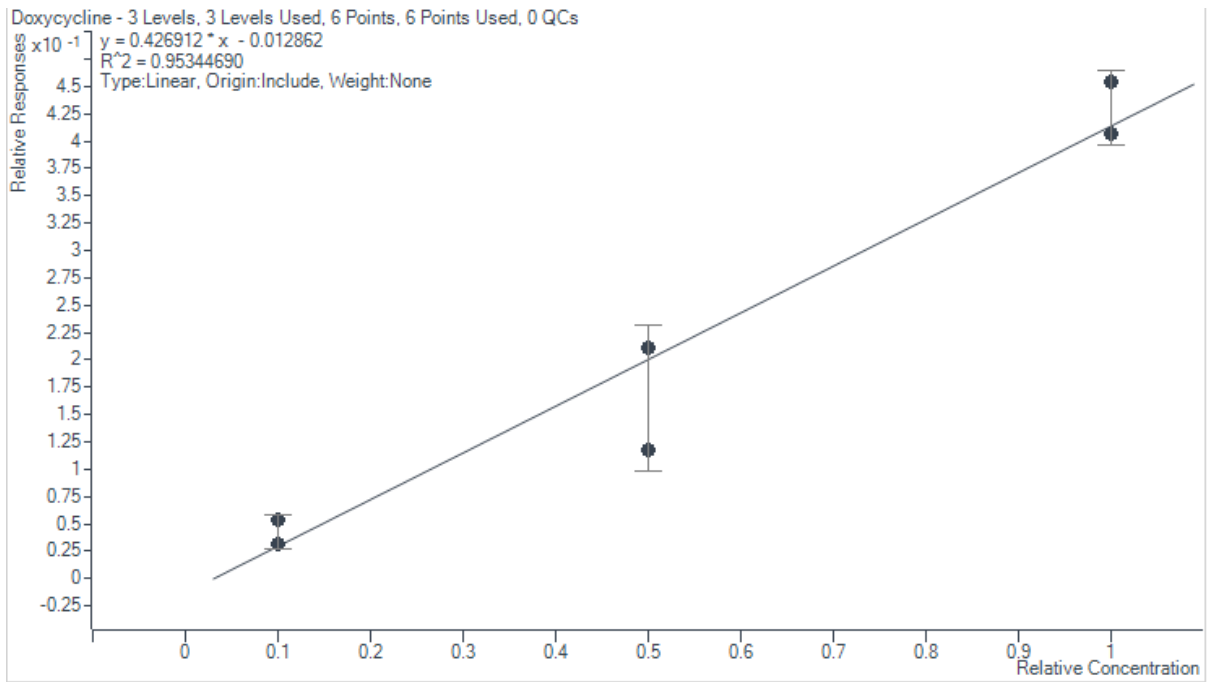


Slika 48. Matriks kalibracijska krivulja za demeklociklin

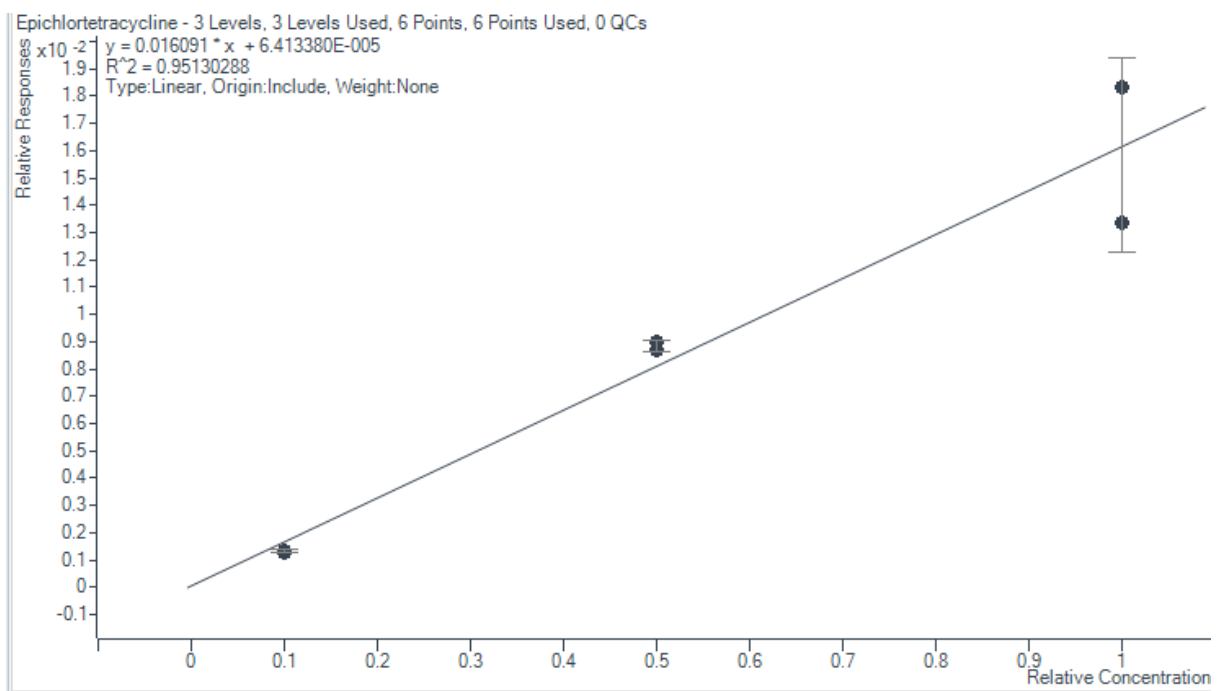
## 7.5. MATRIKS KALIBRACIJSKE KRIVULJE POJEDINIH ANALITA, DOBIVENE LC-MS/MS METODOM NAKON PROČIŠĆAVANJA UZORKA EKSTRAKCIJOM ORGANSKIM OTAPALOM



Slika 49. Matriks kalibracijska krivulja za demeklociklin

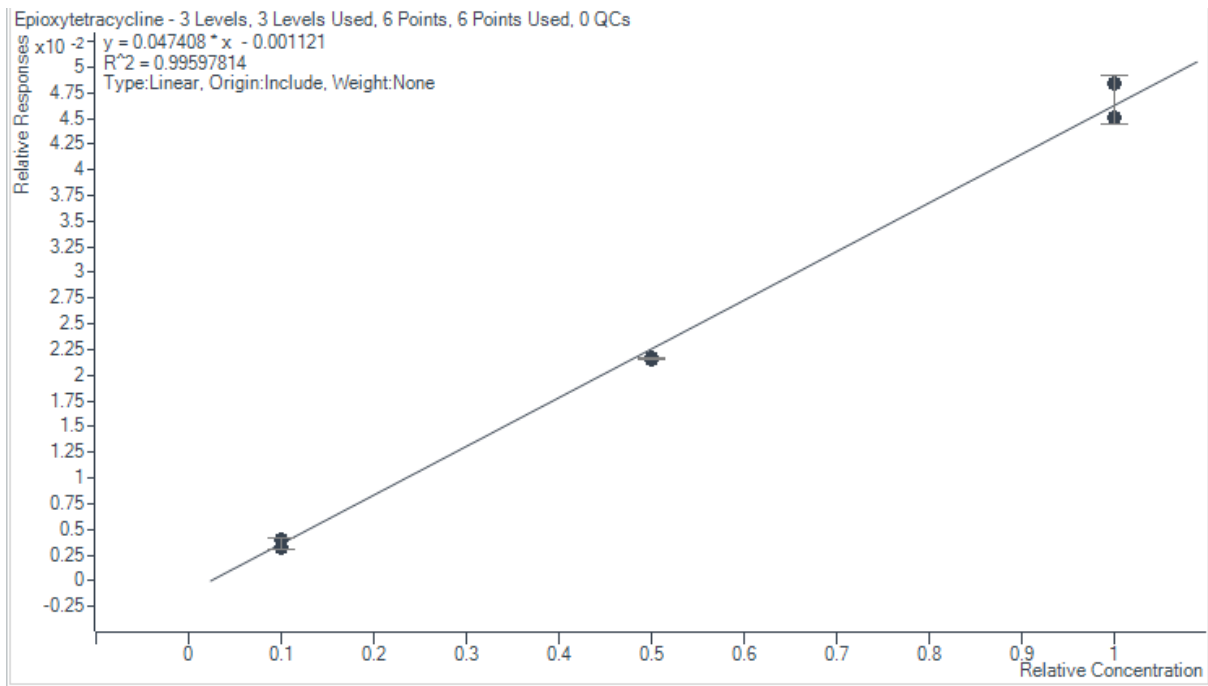


**Slika 50.** Matriks kalibracijska krivulja za doksiciklin

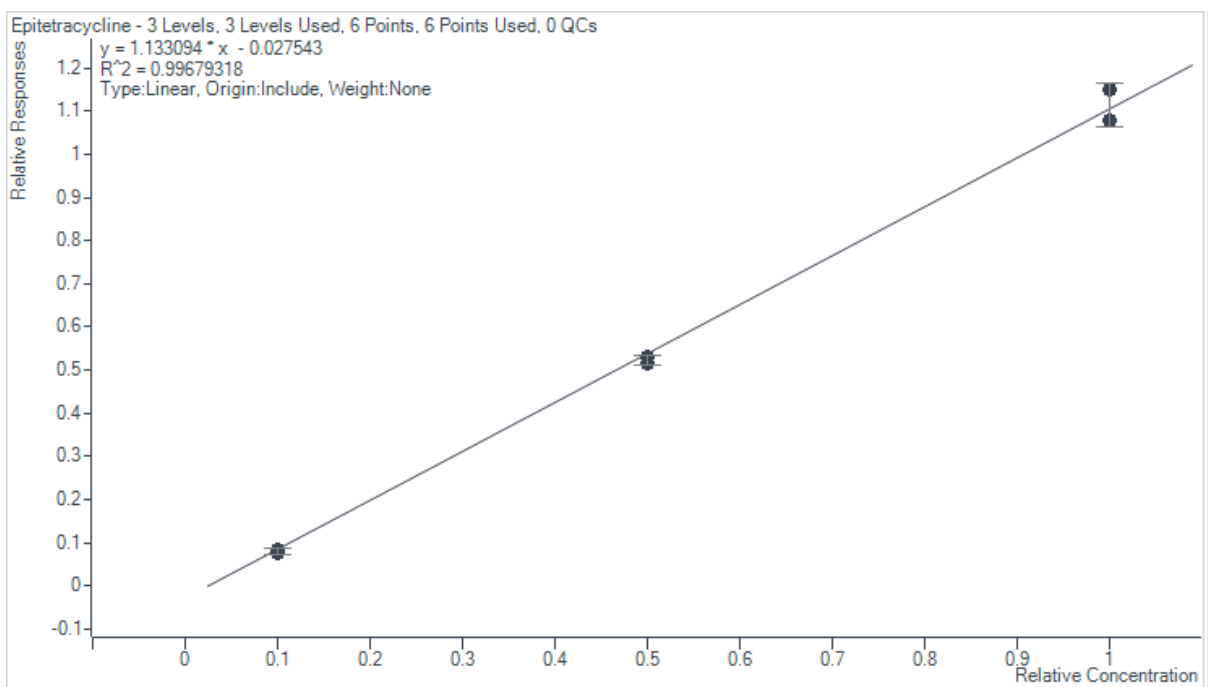


**Slika 51.** Matriks kalibracijska krivulja za epiklortetraciklin

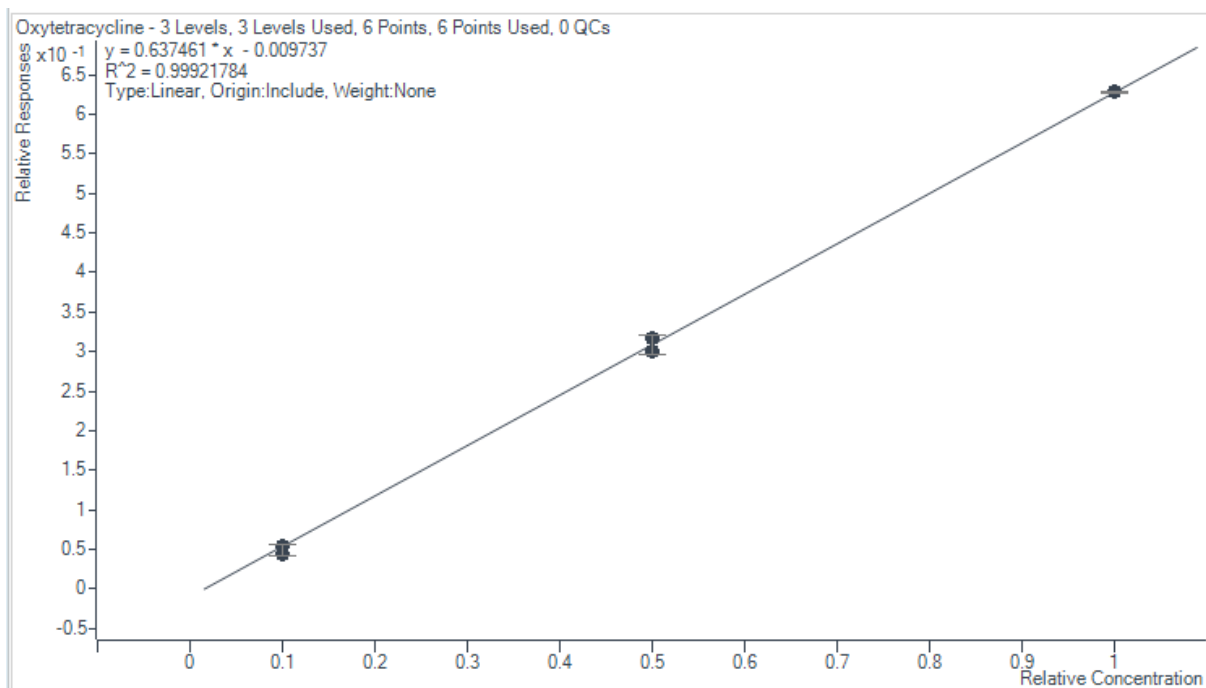




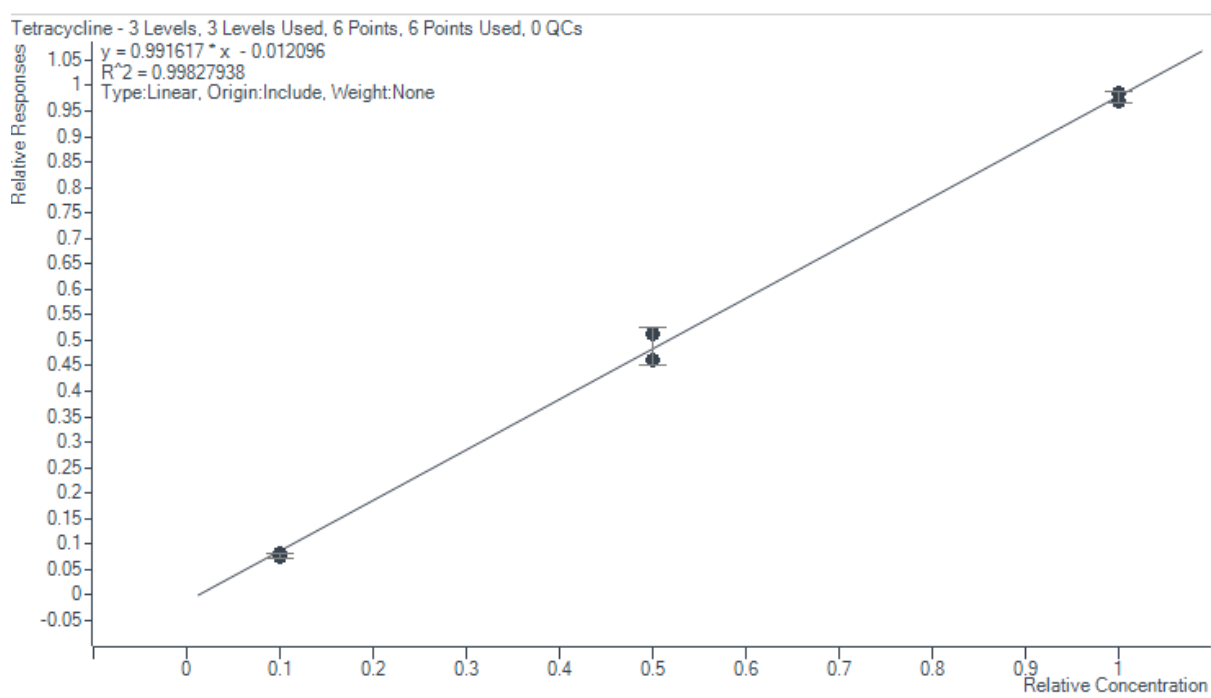
**Slika 52.** Matriks kalibracijska krivulja za epioksitetraciklin



**Slika 53.** Matriks kalibracijska krivulja za epitetraciklin



**Slika 54.** Matriks kalibracijska krivulja za oksitetraciklin



**Slika 55.** Matriks kalibracijska krivulja za tetraciklin

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Andreja Petek) 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.

---

Vlastoručni potpis