

Validacijski postupci u određivanju streptomicina i dihidrostreptomicina u medu primjenom UHPLC-MS/MS metode

Buljan, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:629573>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Petra Buljan

968/USH

**VALIDACIJSKI POSTUPCI U
ODREĐIVANJU STREPTOMICINA
I DIHIDROSTREPTOMICINA
U MEDU PRIMJENOM
UHPLC-MS/MS METODE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar iz Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i neposrednim voditeljstvom znanstvene savjetnice dr. sc. Nine Bilandžić.

ZAHVALA

Ovim putem zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mirjani Hruškar na stručnom vodstvu tijekom diplomskog studija te članici Laboratorija za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji doc. dr. sc. Marini Krpan na pomoći, savjetima i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem znanstvenoj savjetnici dr. sc. Nini Bilandžić na ustupljenoj mogućnosti za izradu eksperimentalnog dijela ovog rada te pruženoj pomoći, kao i dr. sc. Božici Solomun Kolanović za vođenje pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Veliku zahvalu dugujem svojoj obitelji i svojim roditeljima, kao i prijateljima, bez čije pomoći i bezuvjetne podrške nikada ne bih došla do ovoga koraka.

Na kraju, zahvaljujem svom životnom partneru, bez kojega ništa od ovoga ne bi imalo smisla, koji me gurao unaprijed i onda kada sam željela stati i koji me iz dana u dan motivira na nove uspjehe.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Validacijski postupci u određivanju streptomicina i dihidrostreptomicina u medu primjenom UHPLC-MS/MS metode

Petra Buljan, 968/USH

Sažetak: Rast prisutnosti antibiotske rezistencije u 21. stoljeću zahtijeva strože analitičke kontrole prehrambenih proizvoda, a samim time i razvoj novih analitičkih metoda. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti validacijske postupke u određivanju streptomicina i dihidrostreptomicina u medu primjenom UHPLC-MS/MS metode. Određivani validacijski parametri bili su: specifičnost, linearnost, ponovljivost, unutarlaboratorijska reproducibilnost, preciznost, mjerna nesigurnost, granične koncentracije i robusnost. Metoda se pokazala brzom, jednostavnom, te su rezultati validacije zadovoljili sve kriterije zakonskog okvira donesenog uredbom Europske komisije 657/2002. S obzirom na dobivene rezultate, metoda je prikladna za određivanje streptomicina i dihidrostreptomicina u medu.

Ključne riječi: UHPLC-MS/MS, streptomicin, dihidrostreptomicin, validacija

Rad sadrži: 47 stranica, 11 slika, 21 tablicu, 29 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Pomoć pri izradi: Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Marina Krpan, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2. Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
3. Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb
4. Prof. dr. sc. Draženka Komes, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

Datum obrane: 18. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Validation procedures while determining Streptomycin and Dihydrostreptomycin residues in honey using UHPLC-MS/MS method

Petra Buljan, 968/USH

Abstract: Increase of antibiotic resistance in the 21st century demands more severe analytical control of food products, and hence the development of new analytical methods. The aim of this study was to determine validation procedures for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey using the UHPLC-MS/MS method. Determined validation parameters were: specificity, linearity, repeatability, intra-laboratory reproducibility, precision, measurement uncertainty, limit of detection and quantification, and robustness. The method had proven to be quick and simple, and the results of the validation met all the criteria given by the European Commission Regulation 657/2002. Considering the acquired data, this method is suitable for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey.

Keywords: *UHPLC-MS/MS, streptomycin, dihydrostreptomycin, validation*

Thesis contains: 47 pages, 11 figures, 21 tables, 29 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Mirjana Hruškar, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor

Reviewers:

1. PhD. Marina Krpan, Assistant professor
2. PhD. Mirjana Hruškar, Full professor
3. PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor
4. PhD. Draženka Komes, Full professor (substitute)

Thesis defended: 18 July 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MED I NJEGOVA OSNOVNA SVOJSTVA	2
2.2. ANTIBIOTICI	3
2.2.1. Aminoglikozidi	4
2.2.1.1. Streptomycin (STR).....	5
2.2.1.2. Dihidrostreptomycin (DSTR)	7
2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIBIOTIKA U HRANI	8
2.3.1. UHPLC-MS/MS	8
2.3.1.1. HPLC	8
2.3.1.2. Masena spektrometrija	10
2.3.2. ELISA metoda	10
2.3.3. Biosenzori	11
2.4. VALIDACIJA	11
2.4.1. Parametri validacije	11
2.4.1.1. Specifičnost	12
2.4.1.2. Preciznost.....	12
2.4.1.3. Istinitost	12
2.4.1.4. Linearnost	13
2.4.1.5. Robusnost	13
2.4.1.6. Analitičke granice	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. UZORCI	15
3.2. KEMIKALIJE	15
3.3. APARATURA I PRIBOR.....	15
3.4. METODA RADA	17
3.4.1. Čuvanje uzoraka do analize.....	17
3.4.2. Priprema otopina.....	17
3.4.3. Priprema standardnih otopina	17
3.4.4. Priprema standardne krivulje otapala.....	19
3.4.5. Priprema uzoraka sa standardnim dodatkom – matriks kalibracijska krivulja	20
3.4.6. Postupci kontrole kvalitete	20
3.5. PROČIŠĆAVANJE UZORAKA	22
3.6. ANALIZE LC-MS/MS	22
3.7. KVALITATIVNA PROCJENA	25
3.8. KVANTITATIVNA PROCJENA	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. SPECIFIČNOST.....	30
4.2. LINEARNOST KALIBRACIJSKE KRIVULJE	33
4.3. PONOVLJIVOST, UNUTARLABORATORIJSKA REPRODUCIBILNOST I TOČNOST	35
4.4. ODREĐIVANJE GRANIČNE KONCENTRACIJE (KOLIČINE) ANALITA I SPOSOBNOSTI DOKAZIVANJA.....	36
4.5. ODREĐIVANJE LOD I LOQ VRIJEDNOSTI.....	40
4.6. ROBUSNOST.....	41
4.7. MIJERNA NESIGURNOST.....	43
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Posljednjih je godina prisutnost antibiotika u hrani u razinama većim od dozvoljenih postala prepoznata od strane raznih vlasti. Ostaci antibiotika pojavljuju se u raznim vrstama hrane, kao što su mlijeko, jaja, meso i med zbog učestale uporabe antibiotika u veterinarskoj praksi. Oni predstavljaju ne samo problem u prehrambenoj industriji, već i neupitnu opasnost po ljudsko zdravlje. Uporaba antibiotika raširila se u periodu između 1950. i 1960., pri čemu se antibiotici često koriste kako bi se kompenzirali loši uvjeti uzgoja i proizvodnje. Većina antibiotika koja se koristi pri tretiranju životinja iste je klase kao oni koji se koriste kod ljudi (Singh i sur., 2014). Prisutnost rezidua veterinarskih antibiotika u hrani predstavlja potencijalan zdravstveni rizik za potrošača. Izloženost određenim količinama ostataka može izazvati alergijske reakcije, pospješiti antibiotsku rezistenciju, imati toksične i mikrobiološke učinke te prouzročiti teratogene ili kancerogene učinke. Zbog tih se razloga svakim danom pridodaje sve veća važnost praćenju pojave antibiotskih rezidua u prehrambenim proizvodima (Robert i sur., 2013).

Rastuća svijest potrošača o ostacima rezidua antibiotika u prehrambenim proizvodima zahtjeva djelovanje od strane prehrambene industrije i tijela nadležnih za kontrolu zdravstvene ispravnosti prehrambenih proizvoda. Učestalo se radi na utvrđivanju, razvoju i validaciji novih metoda pomoću kojih bi se brže i efikasnije moglo kvantificirati rezidue antibiotika u hrani.

U takvim se istraživanjima pritom vrlo često nađe med, kao proizvod u čijoj proizvodnji dolazi do potencijalne opasnosti zbog nepoštivanja karence nakon tretiranja pčela antibiotikom, te slučajnog prijenosa antibiotika iz prirode.

U ovom istraživanju provedeni su validacijski postupci u svrhu određivanja streptomicina i dihidrostreptomicina u medu primjenom UHPLC-MS/MS metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MED I NJEGOVA OSNOVNA SVOJSTVA

Prema Pravilniku (2015), med je prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*, Slika 1) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.

Sastoji se od šećera kao što su glukoza i fruktoza te mineralnih tvari poput magnezija, kalija, kalcija, natrijevog klorida, sumpora, željeza i fosfata. Sadrži vitamine B₁, B₂, C, B₅, B₆ i B₃, čiji se udio mijenja ovisno o kvaliteti nektara i peludi (Khan i sur., 2007).

Njegov sastav uvelike ovisi o podrijetlu nektara, kao i regionalnim, geografskim i klimatskim uvjetima. Kvaliteta meda određuje se procjenom senzorskih, kemijskih, fizikalnih i mikrobioloških karakteristika (Cuevas-Glory i sur., 2007).



Slika 1. *Apis mellifera*

Med se može podijeliti na dva načina, prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje.

Tako Pravilnik (2015) prema podrijetlu med dijeli na:

- Cvjetni ili nektarni med
 - med dobiven od nektara biljaka
- Medljikovac ili medun
 - med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka,

a prema načinu proizvodnje na:

- med u saću
- med sa saćem ili dijelovima saća
- cijedeni med
- vrcani med
- prešani med
- filtrirani med.

21. stoljeće je u prehrambenoj industriji obilježeno povratkom organskoj proizvodnji hrane te okretanjem ka malom proizvođaču i zelenom uzgoju. Jedna od namirnica koje se sve češće nalaze na stolu je i med, jer je jedan od rijetkih proizvoda koji „od polja do stola“ dolazi u gotovo izvornom obliku, bez industrijske prerade te dodatka aditiva i konzervansa. Ljudi ga često dodaju u svoju prehranu, zbog njegovih brojnih ljekovitih svojstava. Međutim, sve je češći problem pojava ostataka antibiotika u medu, kao posljedica tretiranja pčela od bolesti i njihovog nadohranjivanja.

Nadležna tijela nisu odredila najveće dopuštene količine rezidua antibiotika u medu, stoga prisutnost antibiotika u medu nije dozvoljena i bilo koja koncentracija u uzorku smatra se pozitivnom (Ashraf i Azad, 2017).

2.2. ANTIBIOTICI

Antibiotici se koriste kao veterinarski lijekovi za tretiranje bakterijskih infekcija ili kao promotori rasta, no njihova neprimjerena ili neumjerena uporaba može dovesti do zaostalih tragova u hrani, koji mogu prouzročiti alergijske reakcije te antibiotsku rezistenciju (Dubreil i sur., 2017).

Proizvodi oko kojih se najčešće vode polemike po pitanju rezidua antibiotika su meso, med i jaja, te je čest problem u prehrambenoj industriji nepoštivanje karence. Zbog nesavjesnih proizvođača, životinje tretirane veterinarskim lijekovima ili njihovi proizvodi (mlijeko, jaja), često završe u proizvodnom lancu prije vremena. Nerijetko se pojavljuje i problem s mliječnim proizvodima, no potrebno je naglasiti da se odmah pri otkupu mlijeka provodi obavezan test na antibiotike te se nesukladno mlijeko neškodljivo uklanja s tržišta u vrlo kratkom roku. Kod mliječnih proizvoda problem nije samo zdravstvene, već i tehnološke prirode. Naime,

antibiotici inhibiraju rast kultura bakterija mliječne kiseline te onemogućavaju proizvodnju (Giraldo i sur., 2017).

Problem je kod antibiotika, za razliku od prisutnosti patogena u životinjskim proizvodima, u tome što su istraživanja pokazala da termička obrada nema nikakvog utjecaja na prisutnost nekih antibiotika, čak niti nakon pečenja, prženja, kuhanja pod tlakom, obrade u mikrovalnoj pećnici, itd. (Roca i sur., 2010).

Tijekom godina se kao najveći razlog kontrole rezidua antibiotika u hrani pojavila antimikrobna rezistencija.

U posljednjih nekoliko desetljeća, kampilobakterioze, salmoneloze i infekcije izazvane bakterijom *E. coli* predstavljaju najčešći izvor zoonoza u EU koje se prenose sa životinja na ljude putem hrane. Međutim, zdravstveni problem koji je u začecima, a koji predstavlja ozbiljnu prijetnju za javno zdravstvo u svijetu je otpornost tih bakterija na antibiotike. Na ishranu i terapijsko liječenje domaćih životinja troši se pola svjetske količine antibiotika, što je tijekom godina rezultiralo pojavom povećane antibiotske rezistencije, tj. pojavom antibiotski rezistentnih bakterija u tim životinjama. Bakterije otporne na antibiotike na taj se način mogu unijeti u ljudski probavni sustav, gdje prenose rezistentne gene na nerezistentne bakterije koje su u njemu već prisutne.

Kao uznemirujući podatak treba navesti da je 1990-ih godina manje od 10 % bakterija iz roda *Staphylococcus* bilo otporno na penicilin dok ih je 2000. godine više od 90 % postalo otporno na njega.

Sve veći broj bakterija razvio je otpornost na uglavnom sva dostupna terapijska sredstva pa je tako višestruka otpornost na antibiotike primijećena kod mnogih bakterijskih vrsta. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthomonas* i *Burkholderia* samo su neke od njih (Džidić i sur., 2008).

2.2.1. Aminoglikozidi

Aminoglikozidi su hidrofilni, polikationski ugljikohidrati koji sadrže amino skupinu. Međusobno se razlikuju po broju i vrsti aminošećera. Bazična svojstva aminoglikozidi dobivaju od amino skupina, dok je dobra topljivost u vodi, a slaba u mastima, uzrokovana hidrosilnim skupinama šećera. Aminoglikozidi djeluju tako da onemogućavaju sintezu proteina u bakteriji

vežući se za prokariotske 30S ribosome čime onemogućavaju translokaciju aminokiselina djelujući baktericidno i oštećujući citoplazmatsku membranu (Mingeot-Leclercq i sur., 1999).

Aminoglikozidi su iznimno važna skupina antibiotika, kojima se tretiraju Gram negativne i Gram pozitivne bakterije. Zbog svoje ototoksičnosti i nefrotoksičnosti koriste se samo kod ozbiljnih infekcija (Diez i sur., 2015), pri čemu se neki koriste u ljudskoj medicini, a drugi, poput dihidrostreptomicina, za tretiranje životinja. Njihova se prisutnost trenutno prati u bubregu, mišiću i jetri životinja, mlijeku, jajima i medu.

Aminoglikozidi, kao grupa lijekova, posebno su djelotvorni protiv enterobakterija, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, i *Providencia spp.*, a od gram-pozitivnih bakterija djeluju dobro na stafilokoke, a znatno slabije na streptokoke. Postoje razlike u spektru djelovanja između pojedinih aminoglikozida (Bedenić, 2009).

Najpoznatiji predstavnici ove grupe antibiotika su:

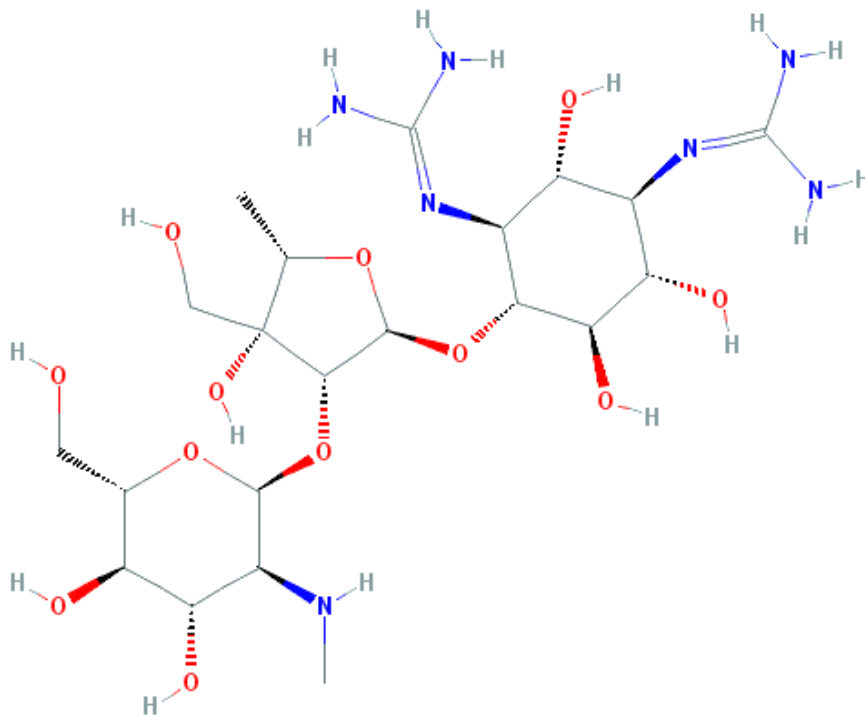
- streptomicin,
- dihidrostreptomicin,
- neomicin,
- kanamicin,
- gentamicin,
- tobramicin,
- amikacin,
- sisomicin,
- netilmicin.

2.2.1.1. Streptomicin (STR)

Streptomicin (Slika 2) je aminoglikozidni antibiotik, koji je posebno učinkovit protiv aerobnih, Gram negativnih bakterija. Njegov je toksikološki učinak dosta proučavan, te je poznato da postoji mogućnost uzrokovanja alergijske reakcije. Kao veterinarski lijek, streptomicin se koristi za liječenje stoke i svinja, no nije dopušten za uporabu kod tretiranja pčela. Streptomicin se u medu može pronaći zbog slučajnog prijenosa sa stabla jabuke u košnicu, no može potjecati i od nedopuštenog tretiranja pčela tim antibiotikom (Bohm i sur., 2012).

Streptomycin se počeo koristiti 1944., kao prvi aminoglikozid, za terapiju teških infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama. Međutim, danas je ograničen spektar zbog proširene pojave rezistencije među gram-negativnim bacilima. Streptomycin se primjenjuje kao monoterapija za liječenje tularemije (uzročnik *F. tularensis*) i kuge (*Yersinia pestis*), a u kombinaciji s tetraciklinima koristi se za liječenje bruceloze.

Među aminoglikozidima, streptomycin ima naj snažnije djelovanje na *M. tuberculosis*, a može se koristiti, u kombinaciji s penicilinom ili vankomicinom, za terapiju infektivnog endokarditisa uzrokovanog viridans streptokokima ili enterokokima, ukoliko uzročnici nemaju ribosomsku ili enzimatsku rezistenciju visokog stupnja na streptomycin (Bedenić, 2009).



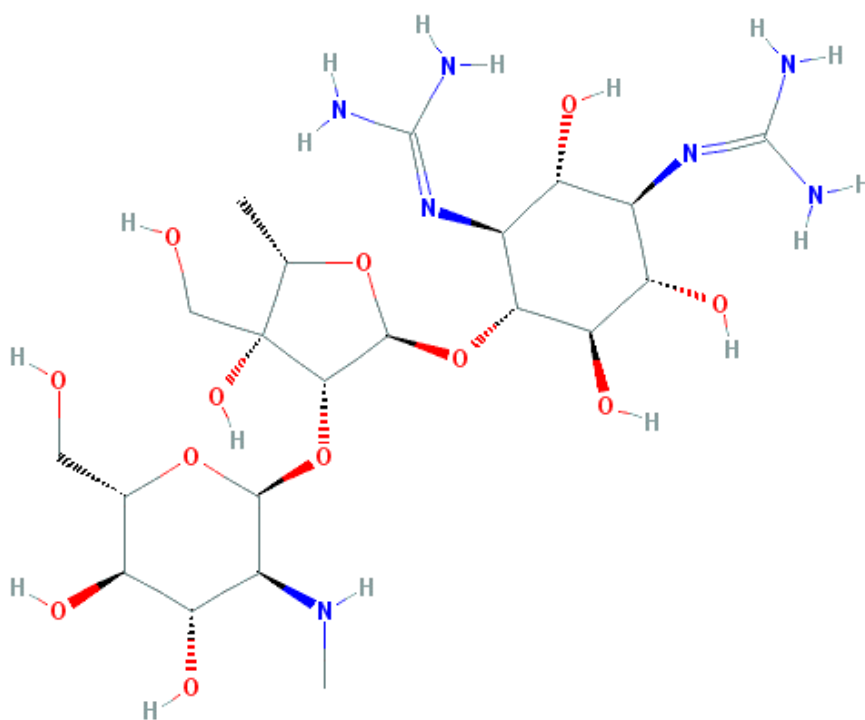
Slika 2. Streptomycin (NCBI, 2018a)

Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama ostataka veterinarskih lijekova u hrani ne definira najveću dopuštenu količinu (NDK) za streptomycin u medu, za razliku od njegovih ostataka u mlijeku i mesu, te iz toga proizlazi da je bilo kakva prisutnost navedenog aminoglikozida u medu nedopuštena (Pravilnik 2005a).

2.2.1.2. Dihidrostreptomicin (DSTR)

Dihidrostreptomicin (Slika 3) je derivat streptomicina, aminoglikozidni antibiotik, s baktericidnim djelovanjem. On je ovisan o aktivnom transportu kroz bakterijsku staničnu membranu, te se veže na 30S ribosomsku podjedinicu. Njegovo vezivanje rezultira interferiranjem između mRNA i bakterijskog ribosoma, te sintezom disfunkcionalnih proteina, što posljedično vodi do smrti bakterijske stanice (NCBI, 2018b).

Kao i kod streptomicina, Pravilnik o najvišim dopuštenim količinama ostataka veterinarskih lijekova u hrani (2005a) ne definira NDK za dihidrostreptomicin u medu, za razliku od njegovih ostataka u mlijeku i mesu, te iz toga proizlazi da je bilo kakva prisutnost dihidrostreptomicina u medu nedopuštena.



Slika 3. Dihidrostreptomicin (NCBI, 2018b)

2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIBIOTIKA U HRANI

Razvoj analitičkih metoda omogućio je preciznu analizu prehrambenih proizvoda te detekciju raznih komponenata u hrani, tako i antibiotika. Neke od metoda pokazale su mogućnost određivanja čak 73 različita antibiotika u jednom uzorku (Dubreil i sur., 2017). Važno je odrediti odgovarajuću metodu za određivanje pojedine komponente, te ju provesti u skladu s protokolom.

Analitičke metode dijele se na orijentacijske i potvrdne.

Orijentacijske (engl. *Screening*) metode su metode koje se primjenjuju kako bi se dokazala prisutnost neke tvari ili vrste tvari na razini značajnosti. Ove metode odlikuje sposobnost brze obrade velikog broja uzoraka i koriste se za pregledavanje velikog broja uzoraka s ciljem otkrivanja mogućih pozitivnih rezultata.

Potvrdne metode su metode kojima se dobiju potpuni ili dodatni podaci na temelju kojih je određenu tvar moguće jednoznačno identificirati i po potrebi kvantificirati, na razini značajnosti (Pravilnik, 2005b).

Neke od metoda koje se koriste u određivanju ostataka antibiotika u hrani su kromatografija, elektroforeza, imunološki testovi, mikrobiološki testovi i biosenzori pri čemu se najčešće koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u kombinaciji s masenom spektrometrijom (Guillén i sur., 2017).

2.3.1. UHPLC-MS/MS

2.3.1.1. HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography, HPLC*) temelji se na principu različitog zadržavanja sastojaka uzorka na nepokretnoj fazi na osnovi specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija, a vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi sastojka koji se analizira, nepokretnoj fazi, kao i o sastavu pokretne faze.



Slika 4. UHPLC Agilent Tech. 1290 Infinity (Vlastita fotografija)

Tekućinski kromatograf na slici 4 sastoji se od:

- degazera za uklanjanje plinova iz mobilne faze,
- kvarterne pumpe,
- automatskog injektora uzoraka i
- termostata kolone

Posljednjih godina, tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC*) postala je standard. UHPLC je s kraćim vremenom analize i bržim uravnoteženjem kolona idealna kod brzog razvoja metoda (Dong i Zhang, 2014).

UHPLC-MS/MS metoda razvijena je za analizu preko 160 analita različite vrste: antihelmintika, antibiotika, beta-agonista, kortikosteroida, steroida, itd. Metoda je jednostavna, i pruža brzu analizu rezidua u jajima, medu, mlijeku i uzorcima mišića (Robert i sur., 2013).

Uporaba UHPLC značajno povećava produktivnost u svim fazama razvoja metode, od inicijalnog ispitivanja, optimizacije, do kvalifikacije i validacije (Dong i Zhang, 2014).

2.3.1.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija temelji se na analizi molekula prema omjeru mase i naboja iona (m/z) i sastoji se od tri osnovna procesa analize: nastajanje iona u izvoru ionizacije, odjeljivanje iona u masenom analizatoru te detekcija iona. Analit se prevodi u električni signal u detektoru, koji podatke šalje u sustav za obradu te se rezultati prikazuju na računalu kao maseni spektar.

Masena je spektrometrija, zahvaljujući svojoj visokoj selektivnosti i osjetljivosti, najbolji način detekcije za screening više različitih ostataka u kompleksnim matriksima, kao što su matriksi hrane (Kaufmann i sur., 2011). Najraširenija vrsta analizatora u masenoj spektrometriji su trostruki kvadrupolni analizatori, a posljednje vrijeme pojavljuju se i analizatori u vremenu leta (engl. *Time-of-flight*) koji mogu sadržavati sken cijelog spektra sa srednjom do visokom rezolucijom i točnom mjerom mase, tako da generiraju spektar bolje kvalitativne vrijednosti, a s dovoljnom osjetljivošću da kvantificiraju kontaminante pri dovoljno niskim koncentracijama.

2.3.2. ELISA metoda

Imunoenzimskim testom ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) određuje se prisutnost i količina antigena. Reakcija se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje. Ovom visoko osjetljivom i selektivnom metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko ng kg^{-1} ispitivanog uzorka (Butorac i sur., 2013).

Znanstvenici u svojim istraživanjima koriste ELISA testove kao metodu određivanja aminoglikozida u hrani.

Istraživanje Gaudina i suradnika (2005) uključivalo je tri vrste ELISA kitova, za streptomycin/dihidrostreptomycin, gentamicin i neomicin, te je rezultiralo zadovoljavajućim rezultatima što se tiče kvalitativnog određivanja, te se može koristiti kao orijentacijska metoda.

2.3.3. Biosenzori

Biosenzori su analitički uređaji koji se sastoje od osjetljivog biološkog elementa, bioreceptora, sonde ili elementa za detekciju i uređaja za čitanje elektronskih signala. Pri otkrivanju željenog analita (biološkog ili kemijskog) dolazi do nastanka kompleksa s bioreceptorom po principu antitijelo-antigen, enzim-supstrat odnosno receptor-ligand (Butorac i sur., 2013).

Gaudin i suradnici su 2007. u svom istraživanju koristili biosenzore za utvrđivanje antibiotika u uzorcima mlijeka i mesa. U odnosu na svoje istraživanja iz 2005. godine s ELISA metodom, postigli su znatan napredak, sa zadovoljavajućom osjetljivošću i simultanom detekcijom osam različitih antibiotika.

2.4. VALIDACIJA

Validacija metode je proces dokazivanja prikladnosti analitičke metode za njenu namijenjenu svrhu. Validacija metode doprinosi njenoj vrijednosti tako što daje informaciju o njezinoj istinitosti i preciznosti, o odnosu između koncentracije uzorka i odziva metode, o mogućim interferencijama iz matrice uzorka, o najmanjim koncentracijama koje će se moći utvrditi ili kvantificirati tom metodom s odgovarajućom točnošću i preciznošću. Validacija analitičkih metoda je regulatorni zahtjev akreditiranih laboratorija kao i profesionalna odgovornost analitičara (Lazarić, 2012) i važno ju je provesti prije rutinske primjene metode u laboratoriju.

2.4.1. Parametri validacije

Brojne institucije kao što su *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, *Food and Drug Administration (FDA)*, *International Conference on Harmonisation (ICH)* i druge izdaju priručnike u kojima iznose smjernice za validaciju analitičkih metoda kako bi se osiguralo da razvijena metoda služi namijenjenoj svrsi. Pri tome se parametri validacije koje je potrebno ispitati razlikuju ovisno o samoj metodi, a nazivi pojedinih parametara ovise o priručniku koji je primijenjen prilikom same validacije.

Parametri su:

- specifičnost
- preciznost
 - repetibilnost (ponovljivost),
 - reproducibilnost (obnovljivost)
- istinitost
- linearnost
- granica detekcije
- granica kvantifikacije
- granična koncentracija tvari ($CC\alpha$)
- sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)
- robusnost

2.4.1.1. Specifičnost

Specifičnost je svojstvo metode da razlikuje analit koji se mjeri od ostalih prisutnih tvari u uzorku.

To je neophodan parametar kod validacije metoda za identifikacijska ispitivanja, određivanje onečišćenja i određivanje sadržaja (Europska Komisija, 2002).

2.4.1.2. Preciznost

Ponovljivost je preciznost u uvjetima ponovljivosti.

Obnovljivost unutar laboratorija (reproducibilnost) je preciznost dobivena u istom laboratoriju pod propisanim (unaprijed određenim) uvjetima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okoliš) u opravdanim vremenskim razmacima (Europska Komisija, 2002).

2.4.1.3. Istinitost

Istinitost je određena kao srednje iskorištenje metode (engl. *recovery*) te je izračunata kao postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. Određuje se tijekom vrjednovanja metode, ako potvrđeni referentni materijal nije dostupan ((Europska Komisija, 2002).

2.4.1.4. *Linearnost*

Linearnost je mogućnost metode da unutar danog područja daje ispitne rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku (Europska Komisija, 2002).

2.4.1.5. *Robusnost*

Robusnost je mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Ispitivanjem se određuje učinak radnih parametara na rezultate analize. Mijenjaju se radni parametri unutar realnih granica i prati kvantitativna promjena rezultata. Ako je utjecaj parametra unutar specifikacije metode, kaže se da je parametar u području robusnosti metode. Npr. kod HPLC metode ispituju se utjecaji sastava i pH mobilne faze, različitih kolona, temperature i protoka mobilne faze (Europska Komisija, 2002).

2.4.1.6. *Analitičke granice*

Granica detekcije (LOD)

Granica detekcije (engl. *Limit Of Detection*) najmanja je koncentracija analita u uzorku koja se može detektirati, tj. točka gdje je mjerena vrijednost veća od nesigurnosti koja se mjeri (Europska Komisija, 2002).

Granica kvantifikacije (LOQ)

Granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantitation*) najmanja je koncentracija analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost (Europska Komisija, 2002).

Granična koncentracija (količina) analita (CC α)

Granična koncentracija (količina) analita (CC α) je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost α pogreške da uzorak ne udovoljava. Pogreška je vjerojatnost lažno pozitivne odluke. Za zabranjene tvari ne smije prelaziti 1 % (Europska Komisija, 2002).

Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)

Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$) je najmanji udio tvari koji je moguće metodom dokazati, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost β pogreške. U slučaju tvari za koje nije utvrđena dopuštena količina, sposobnost dokazivanja je najniža koncentracija koja se može dokazati sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$ u kontaminiranom uzorku. U slučaju tvari za koje je utvrđena dopuštena količina, sposobnost dokazivanja je koncentracija koja se može dokazati, sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$, uz ustanovljenu dopuštenu koncentraciju. β pogreška je vjerojatnost lažno negativne odluke te je ograničena na 5 % (Europska Komisija, 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZORCI

U svrhu razvoja metode odabrani su slijepi uzorci meda različitih proizvođača. Od svake je vrste meda analizirano pet uzoraka. Korišteni su uzorci:

- livadnog meda
- meda od lipe
- šumskog meda
- meda od kadulje
- meda od kestena i
- meda od bagrema.

3.2. KEMIKALIJE

Kemikalije korištene pri provedbi ove metode su:

- Standardi aminoglikozida
 - Streptomycin seskvisulfat hidrat, Sigma-Aldrich
 - Dihidrostreptomycin seskvisulfat, Sigma-Aldrich
 - Higromicin B, Dr. Ehrenstorfer
- Ultračista voda Milliq Advantage A10 sustav za pročišćavanje, Millipore
- Metanol (HPLC čistoće), Riedel De Haen
- Acetonitril (LC-MS čistoće), Merck
- Amonijev acetat (HPLC čistoće), Fluka
- Mravlja kiselina, 98%, Fluka
- Trikloroctena kiselina, Sigma-Aldrich
- Titriplex III (Na₂EDTA x 2 H₂O), Sigma-Aldrich

3.3. APARATURA I PRIBOR

Aparatura korištena u provedbi metode je:

- Analitička vaga (preciznost ± 0,0001 g) Analytical Plus AP110, OHAUS

- Tehnička vaga (preciznost $\pm 0,001$ g) Pioneer TM Precision Balance PA413C, OHAUS
- Vortex miješalica Vortex Model MS2 Mini Shaker, Ika
- Miješalica neoLab Vortexer, Laborbedarf
- Laboratorijsko posuđe (polipropilenske čašice visoke čistoće i stakleno posuđe)
- Automatske pipete (5-50 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L, 500-5000 μ L)
- Centrifuga do 4000 rpm i s termostatom Rotanta 460R Hettich Zentrifugen
- Centrifuga Thermo Scientific SL16R do 15200 rpm, USA
- Hladnjak +2 do +8 °C
- Zamrzivač s najnižom temperaturom od -18 °C
- Digestor
- Plastične polipropilenske mikroeprevete za centrifugiranje od 2 mL (Eppendorf Safe-Lock)
- Plastične tamne bočice od 30 mL HDPE za čuvanje standardnih otopina
- Tamne plastične PP vialice 2 mL
- Tamne plastične PP vialice s insertom 300 μ L
- Plastični čepovi na navoj PTFE sa silikonskom septom
- Plastične cjevčice za SPE pročišćavanje Supelco Disposable flow control valve liners
- SPE kolonice Chromabond HR-X Macherey Nagel - 6 mL/200 mg
- Sustav uparavanja tekućim dušikom sa kupelji N-Evap Model 112 Orgamotion Associates Inc.
- Dušik 99,999% Sol SPA
- Ultrazvučna kupelj za degaziranje Sonorex Model RK255H Bandelin Electronic
- Kromatografska kolona: Sequant ZIC-HILIC - 5 μ m, 200A, 100 x 2.1 mm, Merck
- Predkolona s držačem ZIC HILIC Guard kit 20 x 2.1 mm – PEEK coated guard column with coupler, Merck
- Uređaj UHPLC-MS/MS: UHPLC Agilent Tech. 1290 Infinity(s pripadajućom kvaternarnom pumpom: Quat Pump G4204A, termostatom: Thermostat G1330B, uređajem za samouzorkovanje: Sampler G4226A, odjeljkom za kolonu: TCC G1313C) i Triple Quad LC/MS 6460 opremljen s Jet Stream ESI sustavom za ionizaciju, povezan s računalom sa softverom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka (MassHunter Acquisition version B.07.00), Agilent Technologies

3.4. METODA RADA

3.4.1. Čuvanje uzoraka do analize

Med koji je donesen u laboratorij do analize se pohranjuje na sobnoj temperaturi.

3.4.2. Priprema otopina

Pokretne faze

Za pripremu pokretne faze A odvaž se 15,4 grama 200 mM amonijevog acetata te otopi u 990 mL mješavine vode i acetonitrila u omjeru 95:5 (950 mL H₂O + 50 mL acetonitrila; v/v), te se dodaje 10 mL 98 %-tne mravlje kiseline. Pokretna faza A je visoko ionizirana i ima veliku jakost, zbog visoke koncentracije amonijevog acetata i mravlje kiseline koji se dodaju kao aditiv mobilnoj fazi i pospješuje ionizaciju molekula.

Pokretna faza B korištena je organska pokretna faza, acetonitril. Acetonitril je najučinkovitija pokretna faza za izdvajanje antibiotika, jer rezultira najčišćim ekstraktima.

Otopina za ekstrakciju

Kao otopina za ekstrakciju koristi se 2 %-tna trikloroctena kiselina s Na₂EDTAxH₂O, pri čemu se prvo otopi 1 gram Na₂EDTAxH₂O u ultra čistoj vodi, a zatim se dodaje 20 grama trikloroctene kiseline, da se spriječi stvaranje taloga. Tikvica se zatim nadopuni ultra čistom vodom do 1000 mL.

Prije povezivanja s uređajem, otopine je potrebno degazirati u ultrazvučnoj kupelji 2-3 minute, kako bi se uklonili plinovi koji bi mogli ometati analizu.

3.4.3. Priprema standardnih otopina

Za kvantitativnu potvrdnu analizu aminoglikozida koriste se standardne i matriks krivulje u različitim koncentracijskim područjima koja su ovisna o zadanim MRL vrijednostima za svaki pojedini analit.

Standardne kalibracijske otopine pripremljene su u svrhu testiranja linearnosti dok je za kvantitativnu procjenu korištena isključivo matriks kalibracija.

Izrada standardne i matriks kalibracije bazirana je na izradi ukupne mješavine standardne otopine koja sadrži svaki pojedini analit u različitim koncentracijama. Postupci pripreme standardnih otopina aminoglikozida i internog standarda higromicina opisan je u Tablici 1 i Tablici 2.

Tablica 1. Postupak pripreme mješavine standardnih otopina aminoglikozida

Standardna otopina		POLAZNA OTOPINA (ppm)	Polazni v1 (mL)	Ciljana konc. c2 (ppm)	Ciljani vol. v2 (mL) - tikvica	Oznaka std RS-AMG-
MS		1000	1	100	10	RS1
Oznaka polaznog std RS-AMG	Analit	POLAZNA OTOPINA (ppb)	Polazni v1 (mL)	Ciljana konc. c2 (ppb)	Ciljani vol. v2 (mL) - tikvica	Oznaka std mješavine RS-AMG -MIX-med
RS1	STR	100 000	0.25	1000	25	RS2
	DSTR		0.25	1000		

Tablica 2. Postupak pripreme otopine internog standarda

MJEŠAVINA INTERNIH STANDARDARDA						
Standardna otopina		POLAZNA OTOPINA (ppm)	Polazni v1 (mL)	Ciljana konc. c2 (ppb)	Ciljani vol. v2 (mL) - tikvica	Oznaka std mješavine RS-AMG-IS-
MS		1000	1	100	10	IS1
MED						
IS1	HIG	100 000	1.25	5000	25	IS2

Otopine se pripremaju u zatamnjenom plastičnom odmjernom posuđu kvalitete A serije. Bazine otopine MS su stabilne tijekom 1 godine pri uvjetima skladištenja u zamrzivaču pri -20 °C.

Standardne otopine za obogaćivanje uzoraka RS1 i IS1 su stabilne 6 mjeseci pohranjene u zamrzivaču pri -20 °C, a standardne otopine za obogaćivanje uzoraka RS2 i IS2 stabilne su tijekom 3 mjeseca pri uvjetima skladištenja u hladnjaku pri +4 °C.

Za pripremu bazne otopine koristi se mješavina voda/metanol (90/10, v/v) pri čemu se standard najprije otopi u vodi.

Standardne otopine za obogaćivanje uzoraka otopine se pripremaju u vodi.

Čistoće standarda među šaržama mogu varirati pa se proračun odvage prilikom pripreme bazne otopine treba napraviti prilikom svake pripreme uračunavajući postotak čistoće standarda i čistoću oblika u kojem je prisutan.

3.4.4. Priprema standardne krivulje otapala

Kod pripreme standardne krivulje za streptomycin i dihidrostreptomycin, kao interni standard se koristi higromicin (HIG). Postupak pripreme naveden je u Tablici 3.

Tablica 3. Postupak pripreme standardne krivulje otapala

Analit	Razina				
	1	2	3	4	5
Streptomycin, Dihidrostreptomycin ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	10	20	40	80	120
Higromicin ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100				
Volumen RS-AMG-MIX-MED (μL)	20 RS2	40 RS2	80 RS2	160 RS2	240 RS2
Volumen RS-AMG-MIX-IS (μL)	40 IS2				
Volumen H₂O (μL)	440	420	380	300	220

Standard razine 3 se priprema u svakoj analizi kao kontrola stabilnosti metode i sustava LC-MS/MS-a.

3.4.5. Priprema uzoraka sa standardnim dodatkom – matriks kalibracijska krivulja

Tablica 4. Postupak pripreme standardne krivulje matriksa

Analit	Razina				
	1	2	3	4	5
Streptomycin, Dihidrostreptomycin ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	5	10	20	40	60
Higromicin ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100				
Volumen RS-AMG-MIX-MED (μL)	10 RS2	20 RS2	40 RS2	80 RS2	120 RS2
Volumen RS-AMG-MIX-IS (μL)	40 IS2				

U Tablici 4 naveden je sastav potreban za pripremu određenih razina potrebnih za izradu matriks kalibracijske krivulje.

U slučaju pojave nižih ili viših koncentracija od predviđenih potrebno je prilagoditi kalibracijsko područje očekivanoj koncentraciji u uzorku kako bi rezultat bio unutar krivulje.

Dodavanje standarda provodi se izravno na odvagano količinu uzorka, nakon čega se uzorci ostave 10 minuta da se izjednače koncentracije.

Interni standard se dodaje u sve uzorke (uzorke i matriks kalibraciju) osim u matriks blank.

S obzirom da ne postoji NDK za streptomycin i dihidrostreptomycin u medu, za 1. točku koristi se najniža vrijednost određena metodom; inače se 3. točka od 5 točaka krivulje postavlja na razinu NDK vrijednosti.

3.4.6. Postupci kontrole kvalitete

Za kvantitativnu orijentacijsku analizu uzorak je dovoljno pripremiti u jednoj probi. Analiza se smatra prihvatljivom ako je iskorištenje internog standarda najmanje 25 %. Ukoliko iskorištenje internog standarda ne odgovara za određeni uzorak tada se mora ponoviti u sljedećoj analizi.

Za kvantitativnu potvrđnu analizu uzorak je potrebno pripremiti u minimalno dvije probe.

Svaka serija mjerenja mora uključivati 6 uzorka kontrole kvalitete.

Prije provođenja analize, bitno je pročistiti kolonu i izvor iona masenog spektrometra ispiranjem mobilnom fazom.

Interni standard se dodaje u uzorke za matriks kalibraciju, u uzorke za analizu i negativni kontrolni uzorak.

Kontrolni uzorak stanja instrumenta

Kontrolni uzorak za kontrolu stanja instrumenta se analizira na početku i na kraju svake serije. Predstavlja ga standardna otopina razine L3 koja se injektira odgovarajućim postupkom. Dobivene S/N vrijednosti moraju odgovarati području navedenom Tablici 5.

Tablica 5. Prihvatljiva vrijednost omjera signala i šuma za kontrolni uzorak stanja instrumenta

Analit i 1° tranzicija	S/N
Streptomicin 582 → 263	> 1859 (med)

Također potrebno je provjeriti retencijska vremena analita te uskladiti vrijeme segmenta kako ne bi presijecao pikove analita.

Slijepi kontrolni uzorak

Uzorak kojeg predstavlja otopina vode i acetonitrila u omjeru 1:1 je slijepi kontrolni uzorak.

Negativni kontrolni uzorak otapala

Negativni kontrolni uzorak otapala su otapala bez matriksa pripremljena kao i uzorci, u svrhu detektiranja moguće kontaminacije prilikom pripreme ili u instrumentu.

Negativni kontrolni uzorak matriksa

Slijepi uzorak predstavlja bilo koji uzorak kojem je prethodnim analizama utvrđena odsutnost bilo kojeg od analita. Potrebno je pripremiti 1 uzorak slijepog matriksa i provesti ga kroz cijelu analizu. Analiza na instrumentu se provodi na početku i na kraju serije.

Isti uzorak služi za pripremu kalibracijske matriks krivulje.

Obogaćenje matriksa

U svakoj analizi potrebno je postaviti kalibracijsku krivulju u 5 točaka.

3.5. PROČIŠĆAVANJE UZORAKA

Pročišćavanje uzorka bitan je korak u samoj metodi, jer omogućuje postizanje veće osjetljivosti i specifičnosti metode. Odvaži se 2 grama uzorka (s tolerancijom odstupanja od 0,3 %) na analitičkoj vagi, u plastičnoj epruveti te se doda interni standard i standardi analita, zatim se ostavi stajati deset minuta. Potom treba dodati 10 mililitara otapala za ekstrakciju (2 % TCA + 0.1 % Na₂EDTA x 2 H₂O), te 20 minuta miješati na vrtložnoj miješalici. Nakon isteka 20 minuta, potrebno je uzorke staviti u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta, te nakon toga kratko vorteksirati. Uzorci potom idu na centrifugu na 10 minuta (4600 rpm, 5 °C), nakon čega se supernatant prebacuje u polietilensku epruvetu od 15 mL. S obzirom da se aminoglikozidi apsorbiraju na staklo, pročišćavanje uzoraka se provodi u plastičnom posuđu.

Pročišćavanje se provodi na SPE kolonama (Chromabond HR-X), bez vakuuma, s plastičnim cjevčicama umjesto metalnih igala. Kolone se kondicioniraju metanolom, zatim vodom, te otapalom za ekstrakciju, nakon čega se na kolonice iz epruveta kvantitativno prenese uzorak. Kolone se nakon toga ispiru s 1 mL vode i suše pola sata u struji zraka pod vakuumom, nakon čega se analit eluira u plastične epruvete s dva puta po 3 mL metanola.

Uzorak se zatim uparava u blagoj struji dušika pri temperaturi od 40 °C ± 5 °C. Ostatak se otapa s 0,5 mL H₂O, te kako bi se sasvim otopilo epruvete se stavljaju u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta, nakon čega se sadržaj prebacuje u plastične mikroeprovete.

Mikroeprovete se centrifugiraju na brzini od 15200 rpm, 5 minuta pri 5 °C, te se sadržaj prebacuje u polipropilenske vialne, nakon čega može ili odmah ići na injektiranje ili se čuva 1 dan na -20 °C.

3.6. ANALIZE LC-MS/MS

Instrumentalna analiza provedena je na instrumentu MassHunter Acquisition software.

Injektiranje uzoraka provodilo se prema sljedećem rasporedu:

1. Slijepi kontrolni uzorak
2. Kontrolni uzorak obogaćenog uzorka M3
3. Kontrolni uzorak stanja instrumenta L3

4. Slijepi kontrolni uzorak
5. Matriks kalibracijska krivulja
6. Kontrolni uzorak stanja instrumenta L3
7. Slijepi kontrolni uzorak
8. Negativni kontrolni uzorak matriksa
9. Uzorci
 - a. Nakon svakih 10 injektiranja stanje instrumenta se testiralo s kontrolnim uzorkom, nakon čega se prije daljnjeg injektiranja uzoraka injektirao slijepi uzorak
10. Negativni kontrolni uzorak otapala (engl. *Blank reagens*)
11. Kontrolni uzoraka stanja instrumenta L3
12. Slijepi kontrolni uzorak

Nakon završetka svake serije uzoraka potrebno je pripremiti kolonu za čuvanje ispiranjem s 50 % vode i 50 % acetonitrila na protoku metode kroz 30 minuta.

Kromatografski uvjeti

Odvajanje se provodi na koloni Sequant ZIC-HILIC - 5 μ m, 200 Å, 100 x 2.1 mm.

Početni kromatografski uvjeti su 25 % NH₄CH₃CO₂ 200 mM (A) i 75 % acetonitril (B), uz gradijentno eluiranje po planu navedenom u Tablici 6.

Tablica 6. Plan gradijentnog eluiranja

Vrijeme (min)	% B
0	75
2	30
4	30
5	0
10	0
10,01	75
16	75

Uvjeti analize

Protok mobilne faze: 0,4 mL min⁻¹.

Vrijeme kromatografske analize: 16 minuta.

Temperatura kolone: 40 °C.

Volumen injektiranja: 15 µL

- uz ispiranje igle u poziciji za pranje (FlushPort) kroz 20 sekundi s otopinom acetonitrila i vode (1:1, v/v).

Uvjeti masene spektrometrije

Snimanje ionskih tranzicija se provodi u 4 segmenta pri čemu se u 1. i 4. segmentu pokretna faza iz HPLC-a preusmjerava u otpad kako bi se izbjegla nepotrebna kontaminacija masenog spektrometra.

Ionske tranzicije snimaju se MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) tipom skeniranja, snimanje jednog prekursora s dvije tranzicije u produkt ione, te su navedene u Tablici 7 zajedno sa naponom fragmentatora, kolizijskom energijom i akceleracijskim naponom u kolizijskoj ćeliji (engl. *Cell accelerator voltage, CAV*). U Tablici 8 navedeni su parametri izvora koji utječu na proces ionizacije i prijenos iona kroz maseni analizator.

Tablica 7. Parametri procesa ionizacije i prijenos iona

Tvar	Seg	ISTD	Ionizacija	RT (min)	Ion precursor	Ion produkt	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)	CAV
STR	2	HIG	+	3,91	582	263* 246	190	32 39	1 1
DSTR	2	HIG	+	3,84	584	263* 246	140	29 38	1 1
HIG	2	-	+	3,85	528	177*	140	27	3

*Najzastupljenija tranzicija

Tablica 8. Parametri izvora

Parametar	1.- 4.segment
Temperatura plina	350
Protok plina	12
Nebulizer (psi)	50
Temperatura plina	400
Protok plina	11
Kapilara	4000
Napon raspršivača	300

Ionizacija se odvija u ESI izvoru u pozitivnom načinu rada ($\Delta EMV = 400$).

3.7. KVALITATIVNA PROCJENA

Prije proračuna rezultata potrebno je provjeriti da li su svi uvjeti kontrole kvalitete zadovoljeni. Kvalitativna procjena glede prisutnosti određenog aminoglikozida, utvrđena analizom UHLC-MS/MS, izvodi se usporedbom vremena zadržavanja, to jest retencijskog vremena (RT) pikova eventualno prisutnih u otopini uzorka s vremenima zadržavanja u standardnim uzorcima.

U *blank* otapalu i *blank* uzorku ne smiju biti prisutni pikovi koji su u području retencije analita $RT \pm 2,5$ % od retencije zadane validacijom.

U slučaju kada se u otopini uzorka ne pronađu pikovi koji posjeduju RT usporediv s retencijom analita iz kalibracije, uzimajući kao interval pouzdanosti vrijednosti $\pm 2,5$ %, uzorak se smatra negativnim, a rezultat se prikazuje kao sukladan.

U slučaju da postoji sukladnost između retencijskih vremena, potrebno je procijeniti prisutnost iona prekursora ili iona produkta karakterističnih za taj analit analize.

U slučaju prisutnosti dijagnostičkih iona analita u uzorku analize, izračunati ionski odnos (R) između dvije tranzicije ion prekursor – ion produkt:

$$R = \frac{A_{n2}}{A_{n1}} \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

R- ionski odnos

A_{n1} - površina ionske tranzicije intenzivnijeg iona u otopini uzorka

A_{n2} - površina ionske tranzicije manje intenzivnog iona u otopini uzorka

Ionski odnos dobiven za otopine uzorka mora biti uspoređen sa ionskim odnosom matriks kalibracijske krivulje.

Izračunati devijaciju ionskog odnosa ΔR sa sljedećom formulom:

$$\Delta R = \frac{R_{uzorka} - R_{kal.uz.}}{R_{kal.uz.}} \times 100 \quad [2]$$

gdje je:

R_{uzorka} - ionski odnos 1° i 2° tranzicije analita u otopini uzorka

$R_{kal.uzorka}$ - ionski odnos 1° i 2° tranzicije analita u otopini uzoraka matriks kalibracijske krivulje.

Odnos izmjerenih intenziteta iona produkata mora odgovarati uvjetima navedenima u Tablici 9.

Tablica 9. Maksimalna dozvoljena odstupanja relativnih intenziteta

Relativni intenzitet (% baznog pika)	LC-MS ⁿ
>50 %	± 20 %
od 20 % do 50 %	± 25 %
od 10 % do 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

Da bi se potvrdila prisutnost analita u uzorku, osim navedenih kriterija važno je da omjer signala i šuma za svaki dijagnostički ion bude najmanje 3:1.

Navedeni kvalitativni parametri prate se i uz pomoć računalnog programa instrumenta MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.03.01.

3.8. KVANTITATIVNA PROCJENA

Za kvantitativnu procjenu potrebno je rezultate proračunati s matriksom kalibracijske krivulje, čija upotreba isključuje potrebu izražavanja rezultata uz korekciju iskorištenja. Mjerna nesigurnost je već uračunata u $CC\alpha$ vrijednost. Rezultat analize se smatra pozitivnim ukoliko je koncentracija premašila graničnu koncentraciju analita $CC\alpha$ (engl. *Decision limit*).

Rezultat analize se smatra negativnim ukoliko koncentracija nije premašila graničnu koncentraciju analita CC α .

U Tablici 10 prikazane su NDK vrijednosti i parametri određeni u validaciji za svaki pojedinačni analit za matriks meda.

Tablica 10. NDK vrijednosti i parametri određeni u validaciji metode za med

ANALIT \ PARAMETAR $\mu\text{g kg}^{-1}$	NDK $\mu\text{g kg}^{-1}$	CC α c α $\mu\text{g kg}^{-1}$	Mjerna nesigurnost %
Streptomicin	Nije određen MRL	8,26	34,6
Dihidrostreptomicin	Nije određen MRL	7,73	29,1

Proračun rezultata se izvodi pomoću računalnog programa instrumenta MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.07.00.

Kalibracijska krivulja je grafički prikaz odnosa relativnog odgovora (engl. *Relative response*) izmjerene površine analita i odgovarajućeg internog standarda i teoretske koncentracije kalibracijske točke. Kalibracijska krivulja uključuje i točku T (0,0).

Program preračunava koncentracije ispitnih uzoraka prema dobivenoj krivulji.

Ukoliko se ne koristi navedeni program potrebno je:

Izračunati faktor odgovora (RF) za svaki od analita u odnosu na interni standard za uzorke matriks kalibracije i ispitne uzorke, u skladu sa slijedećom formulom:

$$R_{fn} = \frac{A_n^1 \cdot c_{istd}}{A_{istd}^1 \cdot c_n} \quad [3]$$

Gdje je:

A_n^1 - površina pika najzastupljenije tranzicije standarda

c_n - koncentracija standarda u matriks kalibraciji

A_{istd}^1 - površina pika najzastupljenije tranzicije internog standarda

c_{istd} - koncentracija internog standarda u matriks kalibraciji.

Izračunati srednju vrijednost faktora odgovora za standardne otopine i standardnu devijaciju te CV %:

$$CV\% = \frac{SD_{RF_n}}{RF_n} \times 100 \quad [4]$$

gdje je:

SD_{RF_n} – standardna devijacija RF vrijednosti za standard
 RF_n – srednja vrijednost RF za standarde.

Vrijednost % RDS ne bi trebala biti veća od 25 %.

Izračunati koncentraciju analita c_n u otopini uzorka izraženu u $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) sa navedenom formulom:

$$c_n = \frac{A_n^1 \cdot c_{\text{istd}}}{A_{\text{istd}}^1 \cdot \overline{RF}_n} \quad [5]$$

gdje je:

A_n^1 – površina pika najzastupljenije tranzicije standarda
 c_n – koncentracija standarda u matriks kalibraciji
 A_{istd}^1 – površina pika najzastupljenije tranzicije internog standarda
 c_{istd} – koncentracija internog standarda u matriks kalibraciji
 \overline{RF}_n – srednja vrijednost RF kod uzoraka matriks kalibracije.

Faktor koncentriranja uzoraka f :

$$f = \frac{V_{\text{ekstrakta}} \cdot F}{m_{\text{uzorka}}} \quad [6]$$

gdje je:

$V_{\text{ekstrakta}}$ – volumen konačnog ekstrakta
 F – faktor razrjeđenja u postupku pročišćavanja
 m_{uzorka} – masa uzorka.

Za koncentracije analita izvan kalibracijskog područja potrebno je izvesti produljenje krivulje umjeravanja kako bi uvjeti lineariteta bili zadovoljeni, ili razrijediti uzorak u dano područje linearnosti.

Izraziti konačan rezultat u $\mu\text{g kg}^{-1}$.

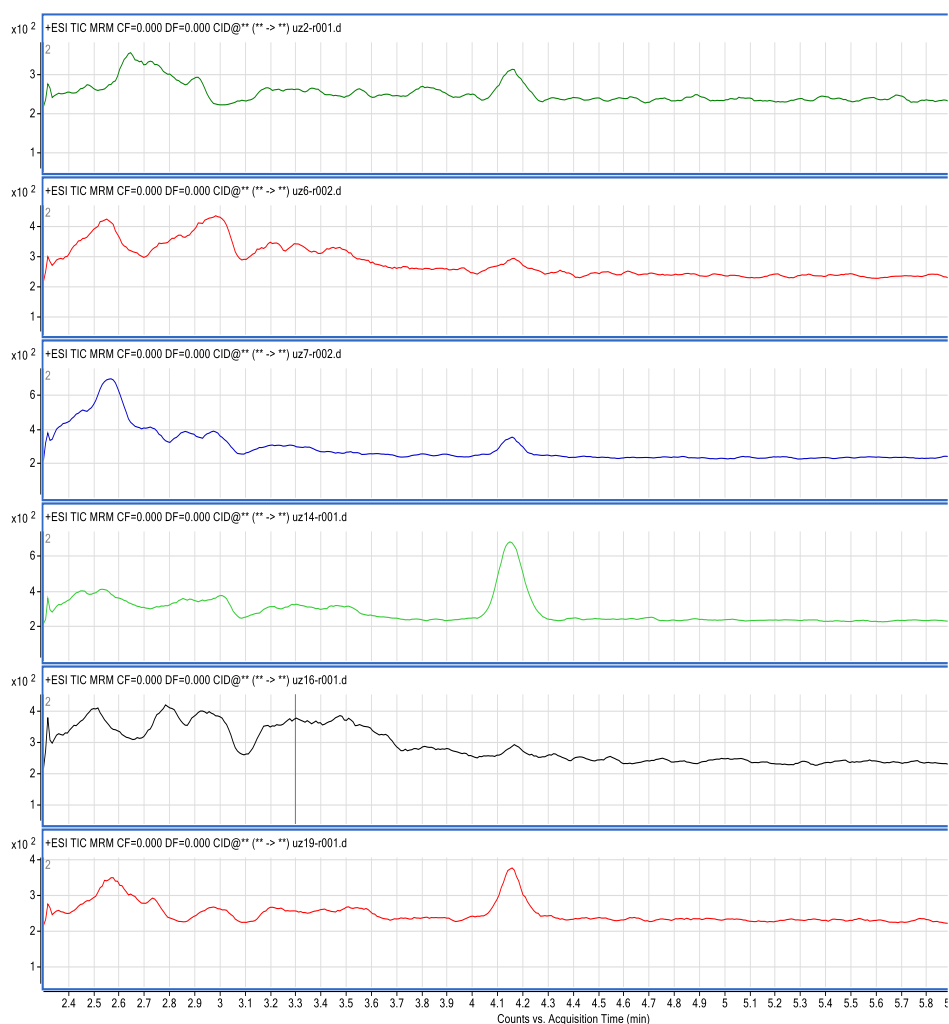
Za pozitivne uzorke na analit, potrebno je izvesti najmanje dvije analize, prikazujući konačan rezultat kao srednju vrijednost pojedinih rezultata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

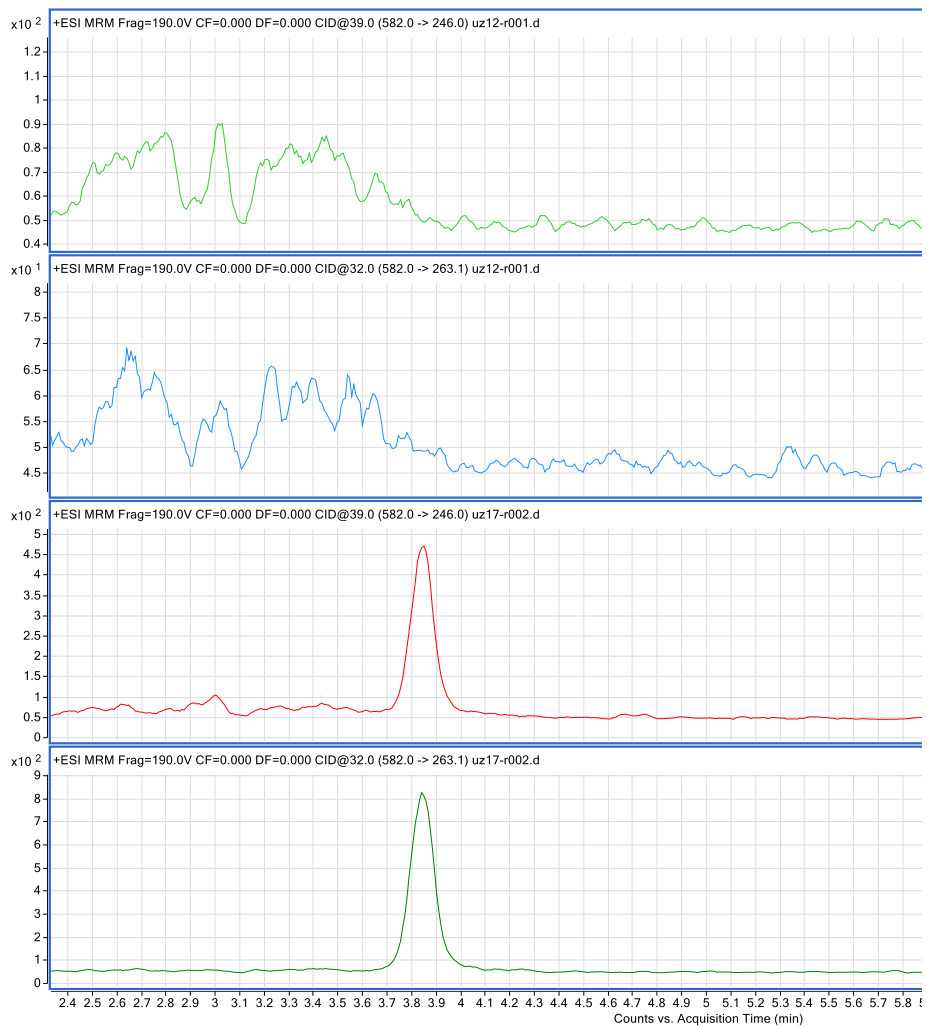
Učestala potreba za analizom prehrambenih proizvoda potiče na razvoj novih i boljih metoda. Cilj ovog istraživanja bio je validirati novu, brzu i učinkovitu metodu određivanja streptomicina i dihidrostreptomicina, uz uporabu internog standarda higromicina.

4.1. SPECIFIČNOST

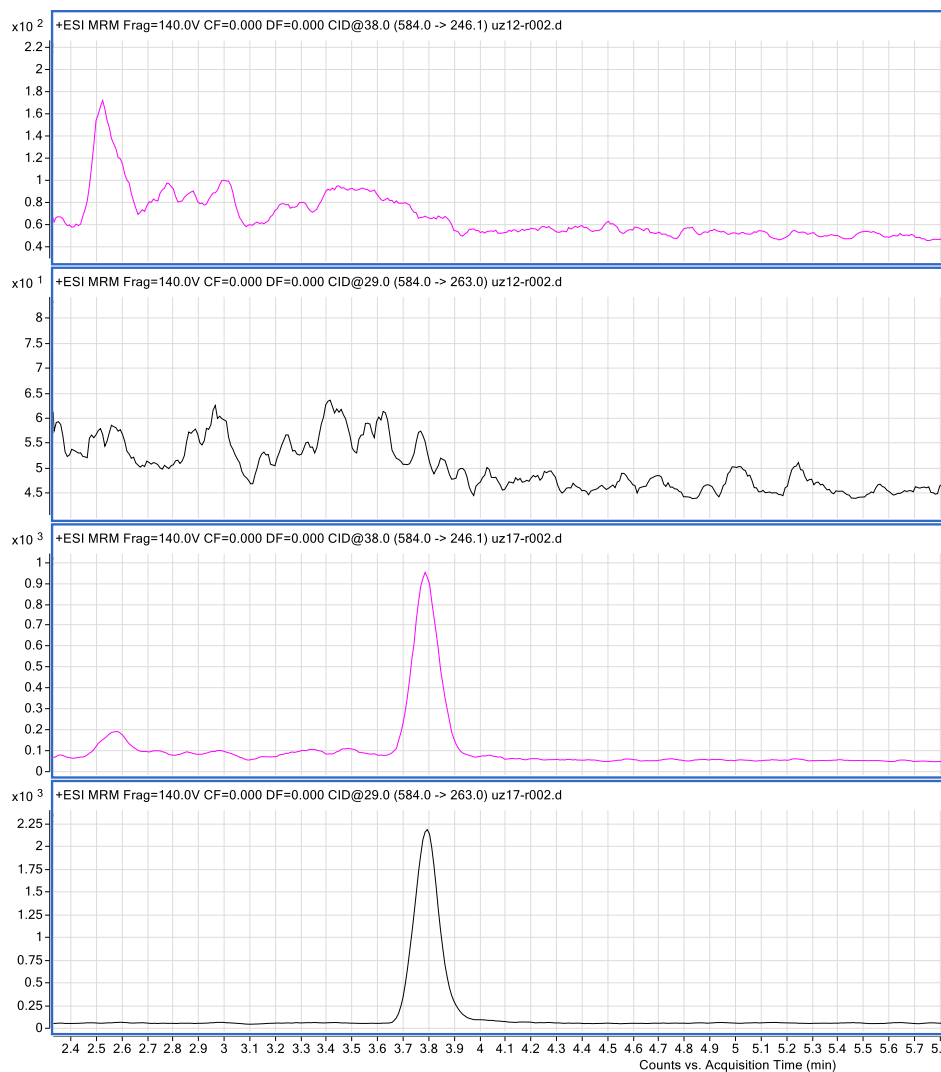
Specifičnost je testirana na slijepim matriksima uzoraka meda prateći postojanje značajnih pikova poteklih od matriksa koji bi mogli interferirati s pikom analita. Isto je testirano i unutar samog matriksa za med lipe, livadni med, šumski med, med od bagrema, kadulje i kestena. Niti u jednom uzorku nisu pronađeni pikovi koji bi interferirali s pikom AMG, poštujući uvjet odstupanja od retencijskog vremena pika od $\pm 2,5 \%$.



Slika 5. TIC kromatogram analize slijepih uzoraka livadnog meda, meda od lipe, šumskog meda, meda od kadulje, kestena i bagrema u pozitivnom načinu snimanja MRM



Slika 6. Kromatogram masenih prijelaza streptomicina u negativom uzorku meda i obogaćenom na 3 c₀

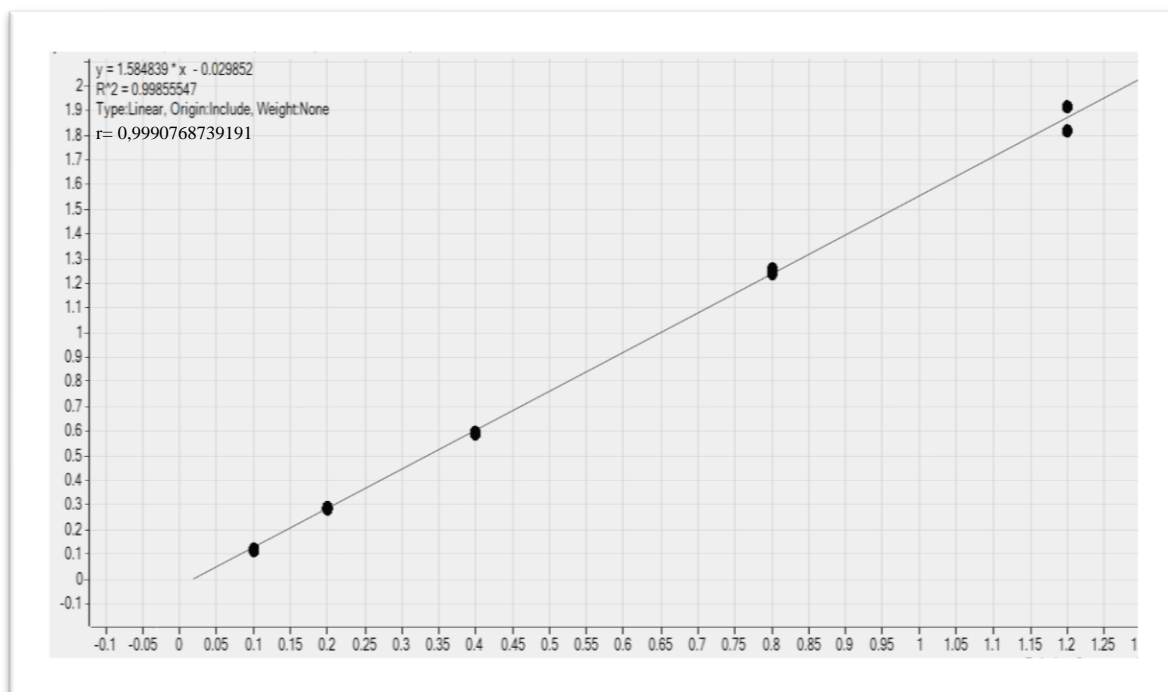


Slika 7. Kromatogram masenih prijelaza dihidrostreptomicina u negativom uzorku meda i obogaćenom na 3 c₀

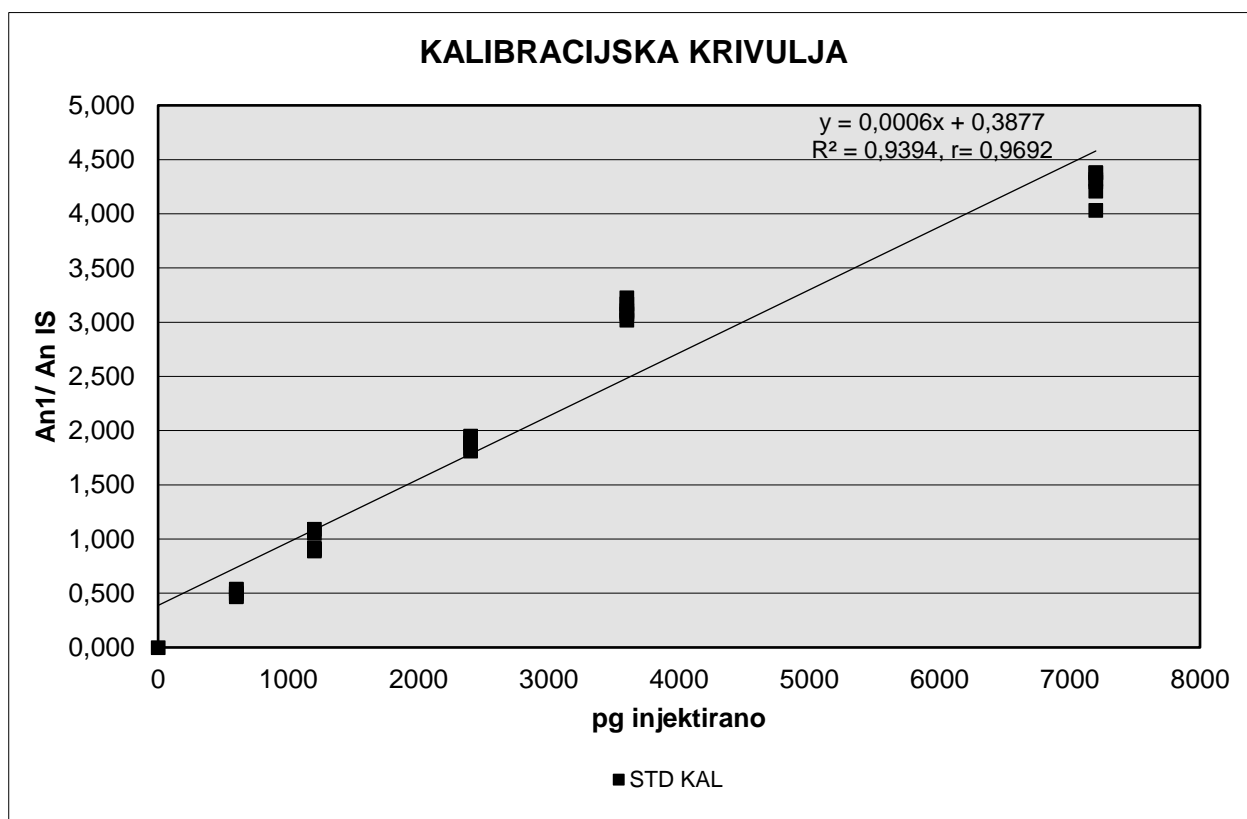
Usporedbom s kromatogramom analize streptomicina i dihidrostreptomicina u negativom uzorku meda i onom obogaćenom na 3 c₀ jasno se vidi razlika u odzivu između negativnog uzorka i onih obogaćenih.

Analizom rezultata prikazanih na slikama 5, 6 i 7. može se zaključiti da je metoda sposobna razlučiti pozitivne uzorke od negativnih. Vidljivo je da slijepi uzorak ne sadrži pikove u vremenu zadržavanja specifičnom za streptomicin i dihidrostreptomicin, za razliku od obogaćenog.

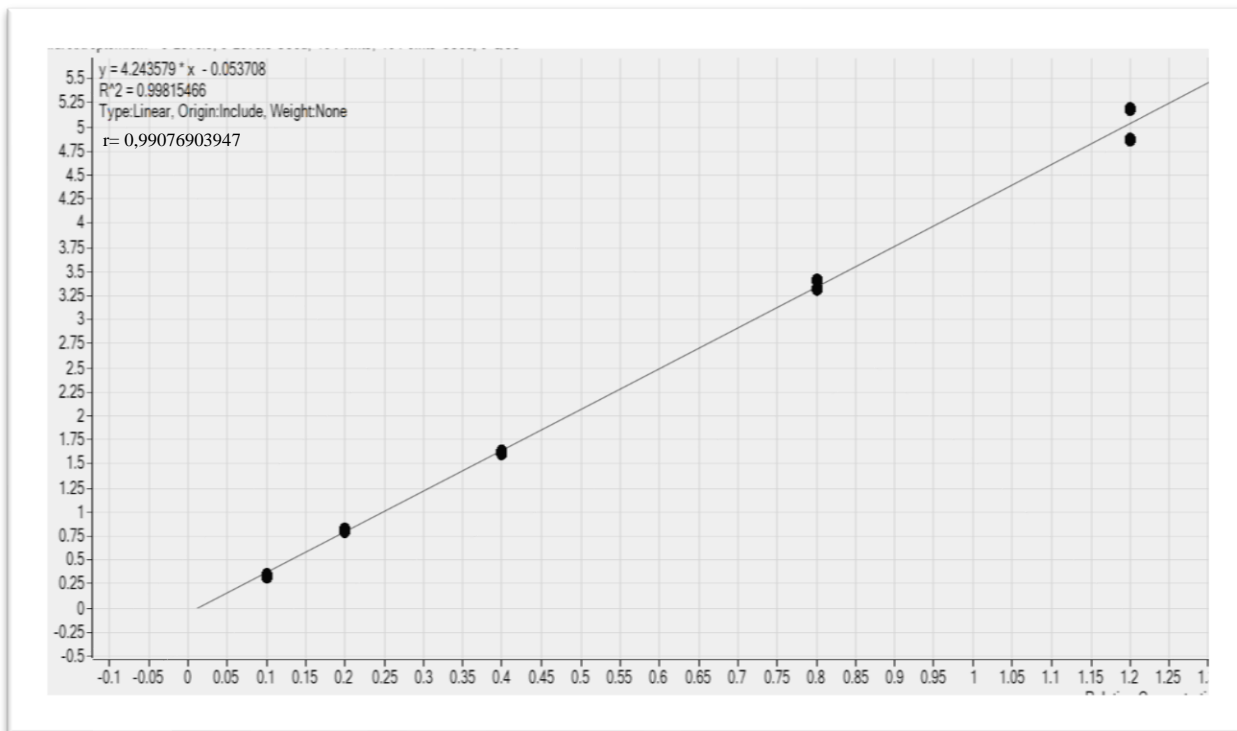
4.2. LINEARNOST KALIBRACIJSKE KRIVULJE



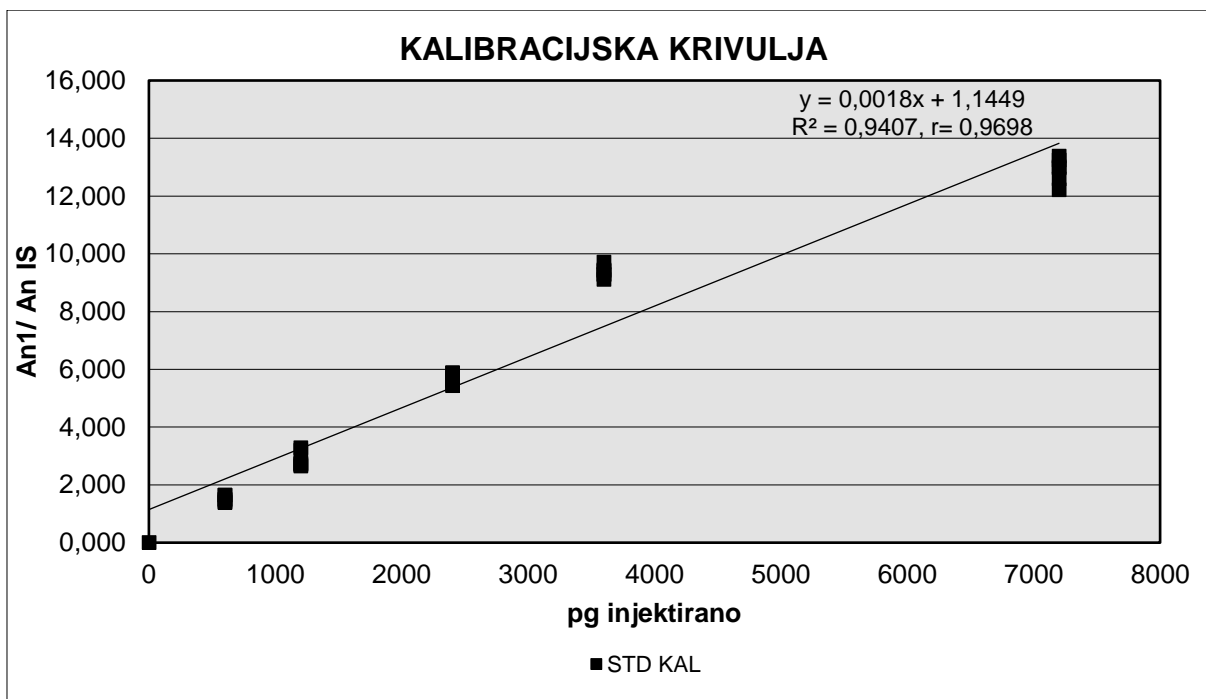
Slika 8. Kalibracijska krivulja na matriksu – streptomicin



Slika 9. Kalibracijska krivulja otapala - streptomicin



Slika 10. Kalibracijska krivulja na matriksu - dihidrostreptomicin



Slika 11. Kalibracijska krivulja otapala - dihidrostreptomicin

Regresijska analiza podataka (Slike 8-11) pokazala je linearnu ovisnost koncentracije analita u uzorku i omjera površine pika analita i internog standarda, s koeficijentima korelacije r većim od 0,999 na matriksu i 0,969 na otapalu.

Vrijednosti koeficijenta korelacije te nagib i odsječak pravca i prihvatljivi rasponi za vremena zadržavanja prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Prikaz faktora linearnosti na matriksu

ANALIT	r^2	k	l	RT \pm 2,5% (min)		
				min RT	RT	max RT
Streptomicin	0,999	1,584	-0,030	3,75	3,85	3,95
Dihidrostreptomicin	0,999	4,244	-0,054	3,69	3,79	3,88

4.3. PONOVLJIVOST, UNUTARLABORATORIJSKA REPRODUCIBILNOST I TOČNOST

Uzorci meda izuzeti za analizu obogaćeni su sa šest različitih koncentracija. Po svakoj koncentracijskoj razini napravljeno je 8 ponavljanja, što ukupno čini 48 testnih uzoraka. Unutar serije su uključeni faktori koji mogu utjecati na rezultate analize. U Tablici 12 dani su rezultati preciznosti i istinitosti. Rezultati zadovoljavaju kriterije da je istinitost kvantitativne metode unutar intervala -20 % do + 10 % za masene udjele veće od $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ odnosno unutar intervala -30 % do + 10 % za masene udjele od $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ do $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Preciznost kvantitativne metode također je zadovoljila uvjete da je $CV < 23 \%$, osim na najnižoj koncentraciji od 5 ppb streptomicina i dihidrostreptomicina u medu (34 % za STR i 28,6 % za DST) (prema odluci 2002/657/EZ za obogaćenja niža od $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ Horwitzova jednadžba daje neprihvatljivo visoke vrijednosti stoga CV za koncentracije niže od $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ moraju biti što je moguće manji).

Iskorištenje metode u okviru raspona dozvoljenih Odlukom komisije 657/2002 i koeficijenti varijacije rezultata niži od vrijednosti izračunatih Horwitzovom jednadžbom ukazuju na vrlo dobru istinitost i ponovljivost metode.

Tablica 12. Rezultati preciznosti i istinitosti

ANALIT	Obogaćenje ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	SD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV (%)	Iskorištenje (%)
Streptomycin	5	1,7	34,0	99,5
	10	1,7	17,0	99,8
	20	1,7	8,5	99,9
	40	1,7	4,2	100,0
	60	1,7	2,8	100,0
Dihidrostreptomycin	5	1,4	28,6	99,1
	10	1,4	14,2	99,6
	20	1,4	7,1	99,9
	40	1,4	3,5	100,0
	60	1,4	2,4	100,0

U svome istraživanju Bohm i suradnici (2012) dobili su standardnu devijaciju ponovljivosti od 6,5 % za streptomycin i 5,2 % za dihidrostreptomycin, dok je standardna devijacija unutarlaboratorijske reproducibilnosti iznosila 16,4 % za streptomycin i 20,8 % za dihidrostreptomycin.

Njihovo je iskorištenje 97 % za streptomycin i 101 % za dihidrostreptomycin. Usporedbom sa rezultatima ovoga istraživanja možemo zaključiti da je postignuto veće iskorištenje za dihidrostreptomycin, ali manje za streptomycin.

4.4. ODREĐIVANJE GRANIČNE KONCENTRACIJE (KOLIČINE) ANALITA I SPOSOBNOSTI DOKAZIVANJA

Granica odlučivanja ($CC\alpha$) i sposobnost detekcije ($CC\beta$) izračunati su u skladu s postupkom opisanim u Odluci 2002/657/EZ.

$CC\alpha$ za zabranjene tvari se računa iz sljedeće formule:

$$CC\alpha = C_0 + 2.33 \times S_{rC_0} \quad [7]$$

gdje je

C_0 - najniža razina ispitivanja,

Sr_{C_0} - standardna devijacija reproducibilnosti pri C_0 .

$CC\beta$ se računa iz sljedeće formule:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times Sr_{CC\alpha} \quad [8]$$

gdje je

$Sr_{CC\alpha}$ -standardna devijacija reproducibilnosti pri $CC\alpha$.

$CC\alpha$ i $CC\beta$ su određeni pomoći InterVal računalnog programa na način da se uzimaju u obzir svi analizirani uzorci te se proračunava na osnovu razine C_0 odstupanje u odnosu na unutar laboratorijsku reproducibilnosti. Podaci o određenim $CC\alpha$ i $CC\beta$ vrijednostima nalaze se u Tablici 13.

Tablica 13. $CC\alpha$ i $CC\beta$ određene za MED

ANALIT	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
STR	8,26	13,7
DSTR	7,73	12,3

Dobivene $CC\alpha$ i $CC\beta$ vrijednosti su izrazito niske u usporedbi s vrijednostima dobivenima u postupku validacije iste metode od strane Bohma i suradnika (2012), gdje je $CC\alpha$ za streptomycin iznosila $11,8 \mu\text{g kg}^{-1}$, a za dihidrostreptomycin $11,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, te $CC\beta$ $18,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ za streptomycin i $19,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ za dihidrostreptomycin.

U Tablicama 14 i 15 vidljivi su podaci 8 analiza koji su zatim obrađeni programom InterVal.

Tablica 14. Proračun $CC\alpha$ i $CC\beta$ za streptomycin

TEORETSKA KONCENTRACIJA (koncentracija ng g⁻¹ prema matriks krivulji)	5	10	20	40	60
1. analiza	5,88	11,23	19,70	35,23	63,76
	5,93	11,94	20,16	36,22	63,58
	5,90	9,82	19,19	35,20	62,18
	5,73	9,83	19,09	34,80	62,71
2. analiza	4,55	11,59	21,31	41,01	57,16
	4,64	9,49	19,07	41,95	60,48
	4,51	10,93	19,54	40,04	62,68
	4,54	9,76	19,34	39,27	58,27
3. analiza	5,27	10,09	20,75	41,06	59,17
	5,32	9,60	20,85	39,61	61,05
	5,05	8,30	19,97	41,77	58,1
	5,07	9,02	18,26	44,47	57,57
4. analiza	5,04	11,02	17,86	39,21	63,13
	5,50	10,61	18,40	38,66	61,31
	4,57	9,04	21,59	43,98	56,99
	4,46	8,98	20,48	44,07	55,28
5. analiza	5,75	9,54	20,25	40,05	58,37
	5,89	9,30	20,00	41,11	61,21
	5,93	9,67	18,82	37,87	61,68
	5,86	9,39	18,77	38,64	61,07
6. analiza	5,25	8,76	19,79	44,81	62,72
	5,16	9,01	18,81	45,56	63,49
	5,84	9,14	17,18	41,07	54,47
	5,87	9,36	18,03	41,28	53,34
7. analiza	4,08	9,17	17,39	44,27	59,88
	4,28	9,48	17,93	44,92	58,64
	3,96	10,11	21,81	44,15	55,51
	3,99	10,00	21,63	44,81	54,79
8. analiza	4,78	10,85	18,75	39,74	57,44
	4,60	10,24	19,13	40,44	58,61
	4,46	9,46	20,03	43,78	61,30
	4,49	9,60	21,07	42,46	58,82

Tablica 15. Proračun $CC\alpha$ i $CC\beta$ za dihidrostreptomycin

TEORETSKA KONCENTRACIJA (koncentracija ng g⁻¹ prema matriks krivulji)	5	10	20	40	60
1. analiza	6,21	11,66	18,59	34,82	64,54
	6,15	11,95	18,8	35,38	63,82
	6,03	10,15	19,34	34,60	62,88
	5,98	9,75	19,29	35,04	62,57
2. analiza	4,91	9,94	19,29	41,39	59,93
	4,90	10,36	19,26	41,85	60,27
	5,05	10,17	19,8	40,05	59,84
	4,48	9,69	20,77	40,01	58,08
3. analiza	5,32	10,55	20,69	40,06	59,58
	5,25	9,96	21,42	40,63	59,71
	5,31	8,96	18,73	41,78	58,86
	4,86	9,67	18,32	40,91	59,96
4. analiza	5,61	10,52	18,04	37,14	61,46
	5,61	10,64	18,38	38,51	62,83
	5,25	10,34	19,96	40,47	59,39
	5,15	10,28	19,4	40,65	59,44
5. analiza	5,79	8,89	19,65	39,09	59,79
	5,98	9,38	19,54	40,23	60,34
	6,08	9,28	19,01	39,48	60,98
	6,11	9,26	19,41	38,76	61,51
6. analiza	4,98	9,28	19,46	44,57	57,13
	5,02	9,84	19,76	45,43	58,11
	5,32	8,96	18,33	40,52	60,08
	5,46	9,16	18,51	40,30	59,18
7. analiza	4,48	9,09	18,25	47,28	60,39
	4,77	9,69	18,05	42,67	60,40
	4,92	10,63	20,83	38,15	58,34
	4,53	10,66	21,35	38,79	56,89
8. analiza	5,84	10,90	19,08	38,98	59,96
	5,87	9,76	18,85	40,25	58,41
	4,38	10,26	19,73	41,34	60,81
	4,73	9,05	19,21	43,55	59,06

4.5. ODREĐIVANJE LOD I LOQ VRIJEDNOSTI

Granica detekcije i kvantifikacije su određene uzimajući u obzir standardnu devijaciju rezultata analiza uzoraka obogaćenih na najnižu kvantifikacijsku razinu te su računane prema slijedećim formulama:

$$LOD = S_{Co} * t_{0,02} \quad [9]$$

$$LOQ = 10 * S_{Co} \quad [10]$$

gdje je

$t_{0,02}$ - vrijednost pri n-1 stupnjeva slobode i vjerojatnost od 98 %

S_{Co} - standardna devijacija reproducibilnosti rezultata pri C_0 .

Tablice 16 i 17 prikazuju vrijednosti korištene pri izračunu limita detekcije i kvantifikacije oba aminoglikozida.

Tablica 16. Limit detekcije i kvantifikacije streptomicina

S	0,6540
N	32
t 98%	2,4528
LOD	1,6042
LOQ	6,5401
S/N	7,7478

Tablica 17. Limit detekcije i kvantifikacije dihidrostreptomicina

S	0,5584
N	32
t 98%	2,4528
LOD	1,3696
LOQ	5,5838
S/N	9,5348

Tablica 18. Vrijednosti limita detekcije i kvantifikacije određene za MED

ANALIT	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Streptomycin	1,60	6,54
Dihidrostreptomycin	1,37	5,58

U Tablici 18 možemo vidjeti usporedbu LOD i LOQ vrijednosti za streptomycin i dihidrostreptomycin. Ovom je metodom moguće odrediti niže koncentracije dihidrostreptomicina u odnosu na streptomycin.

Svojim istraživanjem i validacijom procesa određivanja ostataka antibiotika u medu pomoću HPLC-MS/MS metode, Gallina i suradnici (2005) dobili su LOD za streptomycin $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, s iskorištenjem od svega 85 %, što je u usporedbi sa ovom metodom značajna razlika.

Izračunate analitičke granice $CC\alpha$ i $CC\beta$, kao i LOD i LOQ, u ovoj su metodi izrazito niske i ukazuju na dovoljnu osjetljivost metode da detektira analit pri koncentraciji u tragovima te kompatibilnost za rutinsku primjenu u određivanju streptomicina i dihidrostreptomicina u medu u redovnim uzorcima u okviru Monitoringa rezidua.

Usprkos tome, uvijek ima mjesta za napredak. Staub Spörri i suradnici (2014) uspjeli su u svom istraživanju postići LOD od $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, sa standardnom devijacijom od 15 % za ponovljivost koristeći UHPLC-MS/MS sa analizatorom vremena leta.

4.6. ROBUSTNOST

Robusnost metode testirana je na način da su u analizama uključeni faktori koji bi mogli utjecati na rezultat analize (Tablica 19).

Tablica 19. Parametri analize robusnosti

Analitičar	Analitičar 1- Analitičar 2
Boja meda	Svijetli - tamni
HPLC kolona	Stara - Nova
Lot SPE kolonica	A - B
Pohrana ekstrakta	Svjež – pohranjen u hladnjak preko noći
Pohrana eluata	Svjež – pohranjen u hladnjak preko noći
Vrijeme čuvanja uzoraka na -20°C	3 dana – 2 tjedna

Rezultati su izraženi u Tablici 20 kao proporcionalna devijacija po svakom faktoru zasebno na način da je izražena prosječno odstupanje % nagiba odgovarajuće kalibracijske funkcije od ukupne srednje vrijednosti nagiba.

Tablica 20. Devijacija iskorištenja u %

Faktor	Proporcionalna devijacija (%)	
	Streptomycin	Dihidrostreptomycin
Boja meda	0,014	0,046
Analitičar	0,264	0,218
HPLC kolona	0,149	0,020
Lot SPE kolonica	0,046	0,089
Pohrana ekstrakta	-0,022	-0,020
Pohrana eluata	0,143	0,254

Utjecaji faktora su zanemarivi jer je njihov doprinos ukupnoj mjernoj nesigurnosti manji od 10%.

Može se zaključiti da je metoda robusna na promjene uvjeta ispitivanja te da promjenom parametara u okviru raspona ispitanih testiranjem robusnosti metoda mora davati točne i reproducibilne rezultate.

4.7. MJERNA NESIGURNOST

Mjerna nesigurnost računana je pomoću komercijalnog programa za validaciju InterVal unutar validiranog kalibracijskog područja. Ukupna mjerna nesigurnost prikazana u Tablici 21 uračunava standardnu devijaciju unutra-laboratorijske reproducibilnosti i nesigurnost korekcije iskorištenjem.

Tablica 21. Mjerna nesigurnost za MRL/c₀ za MED

Analit	Ukupna nesigurnost [%]
STR	34,6
DSTR	29,1

Metoda je prikladna za provođenje orijentacijskih i potvrdnih metoda određivanja aminoglikozida u uzorcima meda jer utvrđene karakteristike udovoljavaju zahtjevima postavljenim Odlukom 2002/657/EZ u smislu osjetljivosti, točnosti i preciznosti metode.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je validacija UHPLC-MS/MS metode za određivanje aminoglikozida streptomicina i dihidrostreptomicina u medu.

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Kao ključni parametri validacije utvrđeni su specifičnost, linearnost, preciznost i granične koncentracije.
2. Postupcima pročišćavanja dobiveni su čisti ekstrakti bez interferirajućih endogenih tvari i na taj način je osigurano visoko i reproducibilno iskorištenje metode.
3. Ponavljanjem analize uzoraka pokazalo se da nema utjecaja na rezultate, to jest oni su ponovljivi, s koeficijentom varijacije manjim od 23 %.
4. Iskorištenja su u prihvatljivim rasponima prema Odluci Europske Komisije
5. Ova je metoda prikladna za analizu velikog broja uzoraka, a njena je provedba jednostavnija od drugih metoda.
6. Metoda je prikladna za korištenje pri određivanju aminoglikozida streptomicina i dihidrostreptomicina u medu, jer su svi ključni parametri u skladu s kriterijima propisanim zakonskom regulativom.

6. LITERATURA

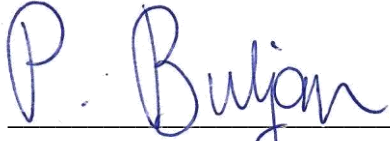
- Ashraf, S. A. i Azad, Z. A. A. (2017) Development and validation of an UPLC-ESI-MS/MS analytical method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in honey. *Biomed. Pharmacol. J.* **10**, 1983-1992.
- Bedenić, B. (2009) Antibakterijski lijekovi. U: Medicinska mikrobiologija, (Uzunović-Kamberović S., ured.) Štamparija Fojnica, Zenica, str. 221-251.
- Bohm, D.A., Stachel, C.S. i Gowik, P. (2012) Confirmatory method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A* **29**, 189-196.
- Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, **8**, 90-101.
- Cuevas-Glory, L. F., Pino, J.A., Santiago, L. S., Sauri-Duch, E. (2007) A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem.* **103**, 1032-1043.
- Díez, C., Guillarme, D., Spörri, A. S., Cognard, E., Orтели, D., Edder, P., Rudaz, S. (2015) Aminoglycoside analysis in food of animal origin with a zwitterionic stationary phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **882**, 127-139.
- Dong, M. W. i Zhang, K. (2014) Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *Trend Anal Chem.* **63**, 21-30
- Dubreil, E., Gautier, S., Fourmond, M.P., Bessiral, M., Gaugain, M., Verdon, E., Pessel, D. (2017) Validation approach for a fast and simple targeted screening method for 75 antibiotics in meat and aquaculture products using LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A* **34**, 453-468.
- Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol. Biotech.* **46**, 11-21.
- Europska komisija (2002) Odluka Komisije 2002/657/EZ od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata.
- Gallina, A., Benetti, C., Biancotto, G., Baggio, A., Manzinello, C., Dainese, N., Mutinelli, F. (2005) Antibiotics residues in honey: validation procedure. *Apiacta* **40**, 45-49

- Gaudin, V., Cadieu, N., Sanders, P. (2005) Results of a European proficiency test for the detection of streptomycin/dihydrostreptomycin, gentamicin and neomycin in milk by ELISA and biosensor methods. *Anal. Chim. Acta* **529**, 273-283.
- Gaudin, V., Hdou, C., Sanders, P. (2007) Validation of a Biacore method for screening eight sulfonamides in milk and porcine muscle tissues according to European decision 2002/657/EC. *J. AOAC Int.* **90**, 1706-1715.
- Giraldo, J., Althaus, R. L., Beltrán, M. C., Molina, M. P. (2017) Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat milk. *Int. Dairy J* **69**, 40-44.
- Guillén, I., Guardiola, L., Almela, L., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J. A. (2017) Simultaneous determination of nine sulphonamides by LC-MS for routine control of raw honey samples. *Food Anal. Method* **10**, 1430-1441.
- HVI (2018) Analitička metoda Laboratorija za određivanje rezidua: Određivanje aminoglikozida primjenom UHPLC-MS/MS, Hrvatski veterinarski institut.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., Widmer, M. (2011) Quantitative and confirmative performance of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry compared to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Sp* **25**, 979-992
- Khan, F. R., Abadin, Z. U., Rauf, N. (2007) Honey: nutritional and medicinal value. *Int. J Clin. Prac.* **61**, 1705-1707
- Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda—osnovna načela. *Svijet po mjeri* **1**, 61-64.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., Tulkens, P. M. (1999) Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents. Ch.* **43**, 727-737.
- NCBI (2018a) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, CID =19649, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19649>>. Pristupljeno 20.06.2018.
- NCBI (2018b) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, CID = 439369, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439369>>. Pristupljeno 20.06.2018.
- Pravilnik o najvišim dopuštenim količinama ostataka veterinarskih lijekova u hrani (2005a) *Narodne Novine* **29**, Zagreb

- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2005b) *Narodne novine* **2**, Zagreb.
- Pravilnik o medu (2015) *Narodne Novine* **30**, Zagreb
- Robert, C., Gillard, N., Brasseur, P. Y., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., Delahaut, P. (2013) Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A* **30**, 443-457.
- Roca, M., Castillo, M., Marti, P., Althaus, R. L., Molina, M. P. (2010) Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *J Agr. Food Chem* **58**, 5427-5431.
- Singh, S., Shukla, S., Tandia, N., Kumar, N., Paliwal, R. (2014) Antibiotic Residues: A Global Challenge. *Pharma Sci. Monit.* **5**, 184-197
- Staub Spörri, A., Jan, P., Cognard, E., Ortelli, D., Edder, P. (2014) Comprehensive screening of veterinary drugs in honey by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Addit. Contam. A* **31**, 806-816

IZJAVA O IZVORNOSTI

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


Petra Buljan