

Određivanje aminoglikozida u mlijeku LC-MS/MS metodom

Fejzuli, Liridone

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:964308>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2017.

Liridone Fejzuli

789/MB

**ODREĐIVANJE REZIDUA
AMINOGLIKOZIDA U MLIJEKU
LC-MS/MS METODOM**

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

Zahvaljujem se mentorici, profesorici dr. sc. Blaženki Kos na pomoći tijekom pisanja diplomskog rada, znanstvenoj savjetnici dr. sc. Nini Bilandžić koja mi je omogućila izradu diplomskog rada u Laboratoriju za određivanje rezidua na Odjelu za veterinarsko javno zdravstvo Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu te Božici Solomun, dipl.ing.preh.teh. na pomoći i strpljenju tokom eksperimentalnog dijela i same izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji (Latifu, Lulzime, Abdilhamitu) na strpljenju i velikoj podršci koju su mi pružili tijekom studiranja te prijateljima i kolegama na svoj dosadašnjoj pomoći..

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kulutra

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ODREĐIVANJE AMINOGLIKOZIDA U MLIJEKU LC-MS/MS METODOM

Liridone Fejzuli, 789/MB

Sažetak: Aminoglikozidni antibiotici se upotrebljavaju za kontrolu bolesti, kao aditivi za hranu, ili sintetski promotori rasta unutar različitih sektora industrije (stočarstvo, akvakultura i poljoprivreda) kako bi se poboljšalo iskorištenje hrane za životinje te poticao rast životinja. Veliki udio apliciranih veterinarskih antibiotika se izlučuje kroz urin, izmet, mlijeko i jaja kao nemetabolizirani ishodišni spojevi, ili se akumuliraju unutar različitih tkiva. To može predstavljati stvarnu prijetnju potrošaču, bilo kroz izloženost rezidualnim ostacima antibiotika, prijenos antibiotičke rezistencije ili povišene stope alergija koje su posljedica prisutnosti antibiotika u hrani. Negativni aspekti uporabe antibiotika u prehrani životinja potvrđuju važnost razvoja učinkovitih analitičkih tehnika za utvrđivanje njihove prisutnosti u proizvodima namijenjenim životinjama te stupnja bioakumulacije u tkivima. Stoga je cilj ovog rada determinacija i kvantifikacija aminoglikozida u uzorcima mlijeka. Ispitivani analiti su ekstrahirani kroz čvrstu fazu (SPE) te su određeni uz pomoć tekućinske kromatografije - tandem masene spektrometrije (LC-MS/MS). Metoda je validirana sukladno Odluci Komisije 2002/657/EZ Europske unije te je računalnim programom instrumenta *MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.07.00.*, primijenjena za analizu aminoglikozida u uzorcima mlijeka sakupljenih iz različitih dijelova Hrvatske.

Ključne riječi: *aminoglikozidi, LC-MS/MS, rezidui, kvantifikacija*

Rad sadrži: 66 stranica, 41 slika, 26 tablica, 91 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Blaženka Kos

Pomoć pri izradi: Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj.
dipl.ing. preh. teh. Božica Solomun

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
3. Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj.
4. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček (zamjena)

Datum obrane: 29. studenog 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

DETERMINATION OF AMINOGLYCOSIDES IN MILK BY LC-MS/MS

Liridone Fejzuli, 6555/BT

Abstract: Aminoglycosides are used for disease control, as feed additives, or as synthetic growth promoters within various sectors (livestock farming, aquaculture and agricultural activities) in order to improve feed utilization and animal production. A high proportion of antibiotics are excreted via urine, feces, milk and eggs as the non-metabolized parent compounds, or accumulate in a high concentration in various tissues. This may pose a real threat to the consumer, either through exposure to the residues, the transfer of antibiotic resistance or increased allergies resulting from antibiotic presence in foods. The negative aspects of the use of antibiotics in animal diets confirm the importance of the development of effective analytical techniques to determine the presence of antibiotics or growth promoters in animal products and the level of bioaccumulation in tissues and in food products. The aim of this study was the determination and quantification of aminoglycosides in samples of milk. For all samples the same procedure was used, so the questioned analytes were extracted through solid phase extraction (SPE) and were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method has been validated, in accordance with the EU Commission Decision 2002/657/EC and was, through the use of a software program of the instrument *MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.07.00*, applied to the analysis of aminoglycosides in samples of milk collected from different parts of Croatia.

Keywords: *aminoglycosides, LC-MS/MS, residues, quantification*

Thesis contains: 66 pages, 41 figures, 26 tables, 91 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Blaženka Kos, Full profesor

Technical support and assistance: PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor
mag. ing. techn. aliment. Božica Solomun

Reviewers:

1. PhD. Jagoda Šušković, Full profesor
2. PhD. Blaženka Kos, Full profesor
3. PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor
4. PhD. Višnja Gaurin-Srček, Full professor

Thesis defended: 29 November 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ANTIBIOTICI.....	3
2.1.1. Klasifikacija antibiotika	3
2.1.2. Antibiotička rezistencija.....	3
2.2. ZAKONSKA REGULATIVA	4
2.2.1. Determinacija rezidua	5
2.3. AMINOGLIKOZIDI	8
2.3.1. Struktura i osnovna svojstva	8
2.3.2. Mehanizam djelovanja	10
2.3.3. Mehanizmi rezistencije	10
2.3.4. Primjena aminoglikozida.....	12
2.4. NEGATIVNI UČINCI REZIDUA.....	15
2.5. EKSTRAKCIJA ANTIBIOTIKA IZ PROIZVODA ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA NA ČVRSTOJ FAZI (SPE, <i>eng. solid-phase extraction</i>)	17
2.6. PRINCIP RADA LC-MS/MS	19
2.6.1. Validacija metode.....	21
2.6.1.1. Parametri validacije.....	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. KEMIKALIJE	22
3.2. APARATURA I PRIBOR	22
3.3. METODA RADA.....	24
3.3.1. Priprema i čuvanje uzoraka do analize.....	24
3.3.1.1. Priprema uzoraka mlijeka	24
3.3.1.2. Priprema otopina.....	24
3.3.2. Priprema standardnih otopina.....	25

3.3.2.1.	Priprema standardne krivulje na otapalu.....	27
3.3.2.2.	Priprema uzoraka sa standardnim dodatkom-MATRIKS KALIBRACIJSKA KRIVULJA	28
3.3.3.	Postupci kontrole kvalitete	29
3.3.4.	Pročišćavanje uzoraka	30
3.3.4.1.	Priprema uzorka mlijeka za SPE pročišćavanje.....	30
3.3.4.2.	Pročišćavanje na SPE kolonama (Chromabond HR-X).....	30
3.3.5.	Analiza LC-MS/MS metodom	31
3.3.5.1.	Kromatografski uvjeti	32
3.3.5.2.	Uvjeti masene spektrometrije.....	32
3.3.6.	Kvalitativna procjena	33
3.3.7.	Kvantitativna procjena	35
4.	REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1.	OPTIMIZIRANJE UVJETA MASENE SPEKTROMETRIJE I TEKUĆINSKE KROMATOGRFIJE	37
4.2.	USPOREDBA SLIJEPIH I OBOGAĆENIH UZORAKA.....	42
4.3.	LINEARNOST NA MATRIKSU	43
4.4.	UTJECAJ PROCESA PROČIŠĆAVANJA NA ANALIT	48
4.5.	IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA AMINOGLIKOZIDA	53
4.5.1.	Određivanje granične koncentracije analita (CC α).....	54
4.6.	REZULTATI REDOVNE KONTROLE REZIDUALNIH OSTATAKA LIJEKOVA-EFSA.....	55
5.	ZAKLJUČCI.....	57
6.	LITERATURA.....	58
7.	PRILOZI.....	67
7.1.	KROMATOGRAMI I REZULTATI ANALIZE PROGRAMA <i>MassHunter</i> <i>Quantitative analysis for QQQ version B.07.00</i>	67

1. UVOD

Tijekom posljednjih desetljeća europski građani su postali sve više svjesni o važnosti sigurnosti hrane i procesa proizvodnje hrane zbog mnogobrojnih skandala te izjava nacionalne vlade. Europska komisija je stoga bila prisiljena stvoriti agencije za sigurnost hrane u mnogim državama članicama EU, formirati Upravu za zdravstvo i zaštitu potrošača te Europsku agenciju za sigurnost hrane (Vandenberge, 2012). U Sjedinjenim Američkim Državama, Uprava za hranu i lijekove (FDA, *engl. Food and Drug Administration*) je regulatorno tijelo koje određuje najveće dopuštene koncentracije za rezidualne ostatke veterinarskih lijekova, poznatih kao tolerancije. U Europskoj uniji, ekvivalentno regulatorno tijelo je Europska agencija za lijekove (EMA, *engl. European Medicines Agency*), koja objavljuje najveće dopuštene količine rezidualnih ostataka (MRL, *engl. Maximum residue limit*) određenih od strane Odbora za veterinarsko medicinske proizvode (CVMP, *engl. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*). Rezidualni ostaci antibiotika mogu imati negativne posljedice na zdravlje potrošača kada koncentracija rezidua u prehrambenim proizvodima prelazi granicu tolerancije ili MRL. Mogući štetni učinci na zdravlje mogu uključivati alergijske reakcije, krvne diskrazije, karcinogenost i kardiovaskularnu toksičnost.

Širok raspon veterinarskih antibiotika (VA, *engl. veterinary antibiotics*) koriste se za kontrolu bolesti, kao prehrambeni aditivi ili sintetski promotori rasta (SGP, *engl. synthetic growth promoters*) unutar različitih sektora industrije (stočarstvo, akvakultura i poljoprivreda) kako bi se poboljšala iskoristivost hrane te poticao rast životinja (Fisher i sur., 2011). Veliki udio apliciranih veterinarskih antibiotika se izlučuje kroz urin, izmet (Ostermanna i sur., 2013), mlijeko (Arikan i sur., 2009) i jaja (Idowu i sur., 2010) kao ne-metabolizirani ishodišni spojevi, ili se akumuliraju u visokim koncentracijama u različitim tkivima (Kwon i sur., 2011). To može predstavljati stvarnu prijetnju potrošaču, bilo kroz izloženost rezidualnim ostacima antibiotika, prijenos antibiotičke rezistencije (Butaye i sur., 2003) ili povišene stope alergija koje su posljedica prisutnosti antibiotika u hrani. Paralelno s porastom incidencije rezistentnih bakterija kod životinja na farmama, rezistentne bakterije također su sve češće prisutne u prehrambenim proizvodima životinjskog podrijetla (Johnson i sur., 2005; Aarestrup, 2008; Overdeest i sur., 2011; Tham i sur., 2012). Posljedice primjene antibiotika za rast životinja obuhvaća zamršeni sustav međusobno povezanih procesa: odabir rezistentnih bakterija i razvoj rezervoara otpornosti na farmama životinja, prijenos rezidualnih ostataka antibiotika, rezistentnih bakterija i gena za rezistenciju s prehrambenih proizvoda na potrošače (Levy, 2002; Acar i Moulin, 2006; Aminov, 2009; Chee-Sanford 2009).

Rezistencija na antibiotike postala je ozbiljna i sve veća prijetnja modernoj medicini te se pojavila kao jedan od vodećih zdravstvenih problema 21. stoljeća (WHO, 2014.). Procjenjuje se da će se do 2050. godine povećati razina antimikrobne otpornosti zbog čega će do 10 milijuna ljudi godišnje umirati, a ujedno će doći do smanjenja BDP-a za 2 do 3,5% (Pikkemaat i sur., 2016). Ograničavanje potrošnje antibiotika je najočitija strategija za smanjenje problema rezistencije na antibiotike. Zbog zabrinutosti oko razvoja antimikrobne otpornosti te prijenosa gena za rezistenciju na antibiotike sa životinja na humanu mikrobiotu, Europska komisija je (od prvog siječnja 2006.) odlučila odstraniti i eventualno zabraniti marketing i uporabu antibiotika kao promotora rasta u hrani namijenjenoj životinjama (Uredba EZ-a br. 1831/2003, EC, 2003). Treba napomenuti, međutim, da je u mnogim

dijelovima svijeta uporaba antibiotika kao promotora rasta još uvijek uobičajena praksa (Castanon, 2007). Navedena zabrinutost zbog uporabe VA i SGP u veterini potvrđuje važnost razvoja učinkovitih analitičkih tehnika za određivanje prisutnosti antibiotika ili promotora rasta u proizvodima za životinje te razinu bioakumulacije u tkivima i prehrambenim proizvodima. Stoga je cilj ovog rada bila determinacija i kvantifikacija aminoglikozida u uzorcima mlijeka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ANTIBIOTICI

Antibiotici predstavljaju raznoliku skupinu antimikrobnih supstanci koje su proizvod metabolizma mikroorganizama, ili su dobivene kemijskom sintezom, te imaju sposobnost inhibicije rasta, pa čak i uništenja bakterija i drugih vrsta mikroorganizama. Razlike u antimikrobnoj aktivnosti ovih lijekova mogu biti kvalitativne i kvantitativne. To je dovelo do razvoja koncepta spektra djelovanja antibiotika koji bilježi selektivno djelovanje određenog antibiotika na brojne reprezentativne bakterije i druge mikroorganizme.

2.1.1. Klasifikacija antibiotika

Antibiotici se mogu klasificirati na nekoliko načina: prema mikroorganizmu producentu, kemijskoj strukturi, načinu i spektru djelovanja, prekursoru te metaboličkom putu biosinteze. Najčešće se klasificiraju prema njihovoj kemijskoj strukturi, budući da će antibiotici koji dijele istu ili sličnu kemijsku strukturu općenito pokazati slične obrasce antibakterijskog djelovanja, učinkovitosti, toksičnosti te alergijskog potencijala.

2.1.2. Antibiotička rezistencija

Glavni problem s kojim se suočavamo je da nakon što se novi antibiotik uvede, otpornost prema njemu će se, prije ili kasnije, pojaviti. Stope smrtnosti zbog infekcija uzrokovanih od strane rezistentnih bakterija su izrazito visoke. Svake godine oko 25.000 pacijenata u EU i 63 000 pacijenata u SAD-u umre zbog bakterijskih infekcija (ECDC/EMA, 2009). Procijenjeni ekonomski troškovi za liječenje infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama u EU rezultiraju svake godine dodatnim zdravstvenim troškovima i gubitkom produktivnosti od najmanje 1,5 milijardi eura (ECDC/EMA, 2009.). Zaražene životinje također zahtijevaju antibiotičku terapiju. Antibiotici se također koriste za promoviranje rasta i profilaktičke svrhe kod životinja, kao i za šire te manje ciljane tretmane u akvakulturi i hortikulturi. Uz zabranu uporabe antibiotika za promoviranje rasta, od 2006. godine su i druge zemlje EU provele slične mjere kako bi se ograničila pojava i širenje otpornosti na antibiotike iz poljoprivrednih izvora. Dakle, to nije jedan veliki izazov, to je prilično složen problem koji zahtijeva zajedničke napore mikrobiologa, ekologa, stručnjaka za zdravstvenu skrb, pedagoga, kreatora politike, zakonodavnih tijela, poljoprivrednih i farmaceutskih djelatnika te javnosti za pronalazak adekvatnog rješenja (Aminov, 2010).

2.2. ZAKONSKA REGULATIVA

Tijekom posljednjih desetljeća europski građani su postali sve više svjesni o važnosti upravljanja sigurnošću hrane te procesa proizvodnje prehrambenih proizvoda zbog mnogobrojnih skandala i izjava nacionalne vlade. Europska komisija je stoga bila prisiljena stvoriti agencije za sigurnost hrane u mnogim državama članicama EU, formirati Upravu za zdravstvo i zaštitu potrošača te Europsku agenciju za sigurnost hrane (Vandenberge, 2012). Kontrole u uporabi veterinarskih lijekova, uključujući agense za promicanje rasta kod životinja, strogo su regulirane od strane Europske unije mnogobrojnim propisima i direktivama. Od 1998. godine EU je zabranila uporabu antibiotika u prehrambenim proizvodima (Stolker i sur., 2007). Zabrinutost oko razvoja antimikrobne otpornosti i prijenosa gena za rezistenciju sa životinja na humanu mikrobiotu prisilila je Europsku komisiju da od prvog siječnja 2006. godine odstrani i eventualno zabrani marketing te uporabu antibiotika kao promotora rasta u hrani namijenjenoj životinjama (Uredba EZ-a br. 1831/2003, EC, 2003). Treba napomenuti da je uporaba AGP-a (*engl. antibiotic growth promoters*) u mnogim dijelovima svijeta još uvijek uobičajena praksa (Castanon, 2007). Upotreba veterinarskih lijekova regulirana je Uredbom Komisije (EU) br. 37/2010 o farmakološki aktivnim supstancama i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua (MRL, *engl. maximum residue level*) u hrani životinjskog podrijetla. U tablici 1 navedene su najveće dopuštene količine aminoglikozidnih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla prema važećem Pravilniku (Pravilnik, 2011). Direktiva Vijeća 96/23/EZ sadrži smjernice za suzbijanje rezidualnih ostataka veterinarskih lijekova u životinjama i njihovim proizvodima s detaljno definiranim postupcima za države članice EU, koje su dužne usvojiti i provesti nacionalni plan praćenja rezidua za određene skupine lijekova (Stolker i sur. 2007; EFSA, 2011). Ova Direktiva utvrđuje razine i učestalost uzorkovanja za goveda, ovce, kozu, svinje, konjiće, perad, životinje akvakulture, mlijeko, jaja, meso kunića i divljači, med, kao i skupine tvari koja se prati za svaku vrstu hrane (Komisija Europskih zajednica 1996). Dodatna pravila za razine i učestalosti uzorkovanja mlijeka, jaja, meda, zečjeg mesa i divljači utvrđena su u Odluci Komisije 97/747/EZ (EFSA, 2011). Za bilo koju vrstu životinja ili prehrambenih proizvoda postoje dvije glavne skupine rezidua koje treba pratiti sukladno Direktivi Vijeća 96/23/EZ: skupina A, tvari koje imaju anabolički učinak i neovlaštene tvari (npr. steroidi, beta-antagonisti) te skupina B, veterinarski lijekovi i zagađivači. Grupa antibiotika (B1) uključuje spojeve poput beta-laktama, tetraciklina, makrolida, aminoglikozida, ali i sulfonamida te kinolona (Stolker i sur., 2007; EFSA, 2011).

Tablica 1. Najveće dopuštene količine (MRL, *engl. maximum residue levels*) aminoglikozidnih antibiotika u mlijeku (Pravilnik, 2011).

Farmakološki aktivna supstanca	MRL [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
Apramicin	Nije dopuštena uporaba
Dihidrostreptomycin	200
Kanamycin	150
Gentamicin (C1+C1a+C2+C2a)	100
Neomicin	1500
Paromomicin	Nije dopuštena uporaba
Spektinomycin	200
Streptomycin	200

2.2.1. Determinacija rezidua

Procjena rizika i regulacija ostataka veterinarskih lijekova u prehrambenim proizvodima životinjskog podrijetla, kao što su mišići, jetra, bubreg, masno tkivo, mlijeko i jaja, slijede slična načela diljem svijeta. U Sjedinjenim Američkim Državama, Uprava za hranu i lijekove (FDA) je regulatorno tijelo koje određuje najveće dopuštene koncentracije za rezidualne ostatke veterinarskih lijekova, definiranih kao tolerancije. U Europskoj uniji, ekvivalentno regulatorno tijelo je Europska agencija za lijekove (EMA), koja objavljuje maksimalne dozvoljene količine rezidua (MRL) koje je odredio Odbor za veterinarsko-medicinske proizvode (CVMP). Postoje i nezavisna tijela za procjenu rizika, kao što je Zajednička agencija za hranu i poljoprivredu/Stručni odbor za prehrambene aditive Svjetske zdravstvene organizacije (JECFA, *engl. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) koji također preporučuju MRL. Komisija *Codex Alimentarius* (CAC) određuje hoće li se uspostaviti međunarodni standardi za rezidue veterinarskih lijekova uz pomoć MRL-a. Rezidualni ostaci antibiotika mogu imati negativne posljedice na zdravlje potrošača

kada koncentracija rezidua u prehrambenim proizvodima prelazi granicu tolerancije ili MRL. Mogući štetni učinci na zdravlje mogu uključivati alergijske reakcije, krvne diskrazije, karcinogenost i kardiovaskularnu toksičnost. Proces procjene rizika se temelji na provođenju mnogobrojnih sigurnosnih studija te *in vitro* studija u kojim se utvrđuje prihvatljiv dnevni unos (ADI, *engl. Acceptable daily intake*). ADI se zatim prilagođava vrijednostima potrošnje hrane za različite vrste tkiva (300 g za mišiće, 100 g za jetru, 50 g za bubrege, 50 g za masnoću, 1500 g za mlijeko) kako bi se determinirale granice tolerancije (MRL) za svaku vrstu tkiva. Postoji mnogo odobrenih antimikrobnih supstanci koje se mogu klasificirati kao terapijski lijekovi za kontrolu i prevenciju bolesti te kao promotori rasta koji se često primjenjuju putem vode ili aditiva za hranu. Tablica 2 daje pregled metodoloških napredaka u analizi antibakterijskih rezidua i sintetskih promotora rasta u prehrambenim proizvodima kao rezultat provedbe Odluke Komisije 2002/657/EZ (Europska komisija, 2002), s ciljem povećanja održivosti okoliša.

Za tvari iz skupine B Direktive Vijeća 96/23/EZ naglašava se važnost njihove kvantitativne determinacije u jestivim matricama. Za tvari iz skupine A i B Direktive Vijeća 96/23/EZ, detekcija se često ne ograničava samo na osnovnu supstancu, već se analiziraju jedan ili više metabolita (De Brabander i sur., 2009). Metode za nadziranje veterinarsko-medicinskih proizvoda koje pripadaju B skupinama tvari, mogu se podijeliti na *screening*-metode i potvrdne metode. *Screening* metode se koriste za otkrivanje prisutnosti analita ili klase analita na razini od interesa, dok potvrdne metode pružaju potpune ili komplementarne informacije kako bi se analit nedvosmisleno identificirao. Potvrdne metode moraju se temeljiti na primjeni molekularne spektrometrije (npr. GC-MS, LC-MS) te moraju ispunjavati kriterije navedene u Odluci Komisije 2002/657/EZ. Metode analize antimikrobnih lijekova mogu se grupirati u različite kategorije: mikrobiološke, imunokemijske ili fizikalno-kemijske (De Brabander i sur., 2009). Mikrobiološke metode se oslanjaju na zajedničko svojstvo svih antibakterijskih spojeva, kao što je inhibicija rasta mikroorganizama. Imunokemijske metode uključuju imunoanalize i imunoafinitetnu kromatografiju. Fizikalno-kemijske metode temelje se na kromatografskom pročišćavanju/razdvajanju rezidua nakon čega slijedi spektroskopska kvantifikacija putem UV, fluorescentne ili MS detekcije (De Brabander i sur., 2009; EFSA, 2011).

Mliječne industrije svih zemalja svijeta vrlo su zabrinute zbog antimikrobnih rezidua, stoga koriste vrlo osjetljive *screening* testove kako bi se osiguralo da *bulk* tankeri sadrže cjelovito mlijeko u kojem su koncentracije analita ispod utvrđenih granica tolerancije (MRL)

za taj lijek u mlijeku. Prekršaji za antimikrobne lijekove u mlijeku smanjili su se u posljednja tri desetljeća u većini zapadnih zemalja. Konačno, vrlo malo se zna o raspodjeli tih antimikrobnih lijekova u različite frakcije mlijeka nakon prerade (npr. proteine sirutke, mast maslaca) i može li se kuhanjem utjecati na stabilnost tih antimikrobnih lijekova. Tablica 1 daje popis aminoglikozidnih antibiotika zajedno s njihovim najvećim dopuštenim količinama u mlijeku. Ti regulatorni standardi koriste se u menadžmentu antimikrobnim reziduima na farmama prije prerade hrane (Baynes i sur., 2016).

Tablica 2. Suvremene analitičke metode korištene u analizi rezidualnih ostataka antibiotika u hrani životinjskog podrijetla (Ronquillo i Hernandez, 2017)

Pojam	Analitička metoda	Spoj	Referenca
Antibiotici	GC-MS LC-MS	Tetraciklin, oksitetraciklin, klortetraciklin, sulfametazin, sulfametoksazol i sulfadimetoksin	Ahmed i sur., 2015 Le Bizec i sur., 2009 Baer i sur., 2010
	LC-MS	Ampicilin, penicilin G, tetraciklin, oksitetraciklin, klortetraciklin, bacitracin A, virginiamicin M1, kloramfenikol, eritromicin A, klaritromicin, tilozin A, monensin A i streptomycin.	De Alwis i Heller, 2010
	LC-MS/MS	50 antibakterijskih supstanci, aminokumarini, amfenikoli, betalaktati, linkosamidni, makrolidi, diaminopirimidini, kinoloni, sulfonamidi, streptogramini, pleuromutilini, polipeptidi kinoksalini, tetraciklini i benzimidazoli	Robert i sur., 2015
		14 veterinarskih lijekova	Cronly i sur., 2010

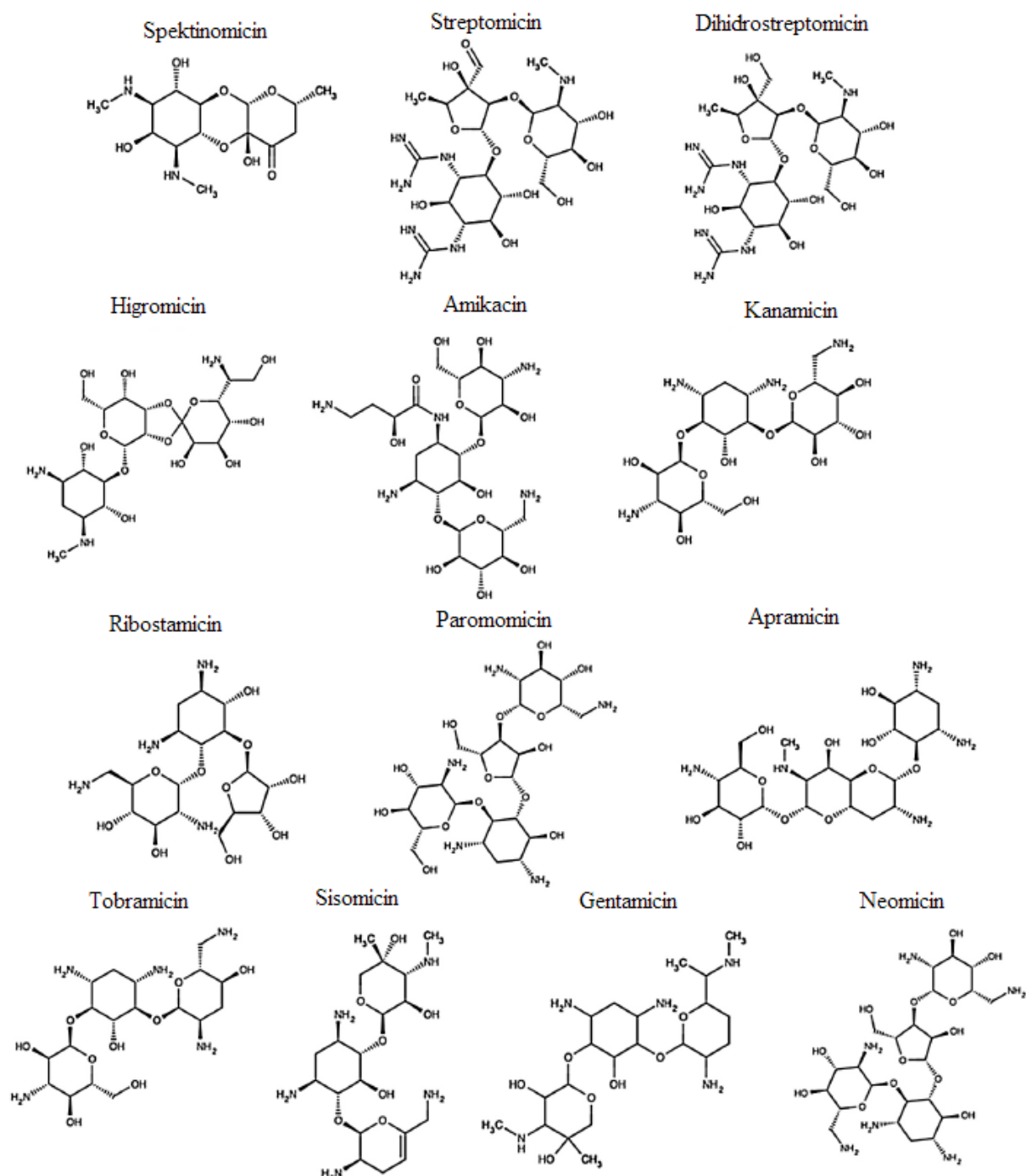
2.3. AMINOGLIKOZIDI

Aminoglikozidi (AG) su među najstarijim klasama antimikrobnih lijekova. Prvi otkriveni AG bio je streptomycin, kojeg proizvodi bakterijska vrsta *Streptomyces griseus* (Schatz i Waksman, 1944.). U sljedeća dva desetljeća, mnogi drugi aminoglikozidi su izolirani iz bakterija tla, uključujući iz vrsta *Streptomyces* i *Actinomycetes* (kanamicin, spektinomycin, tobramicin, neomicin, apramicin). Aminoglikozidi imaju vrlo širok antibakterijski spektar i pokazuju najveću korist u liječenju infekcija uzrokovanih od strane aerobnih i fakultativnih Gram-negativnih bakterija. Aminoglikozidi su općenito manje djelotvorni protiv Gram-pozitivnih bakterija, osobito streptokoka. Njihova aktivnost je neadekvatna kada se koriste kao monoterapija protiv streptokoka ili enterokoka. Stoga je klinička korisnost aminoglikozida u liječenju Gram-pozitivnih bakterijskih infekcija općenito ograničena na sinergističke kombinacije s drugim antimikrobnim sredstvima. Razvoj rezistencije prema aminoglikozidima kao i njihova relativna toksičnost potaknuli su razvoj poboljšanih derivata aminoglikozida (amikacin, netilmicin, isepamicin, dibekacin i arbekacin) i mimetika (Vakulenko i Mobashery, 2003; Hermann i Tor, 2005). Poznavanje mehanizma djelovanja i molekularne mete aminoglikozida dovelo je, od sredine 1990-ih, do uzbudljive nove primjene ovih lijekova za eksperimentalno liječenje genetskih poremećaja koji uzrokuju patogene *nonsense*-mutacije, uključujući cističnu fibrozu i Duchenneovu mišićnu distrofiju (Kellermayer, 2006, Zingman i sur., 2007).

2.3.1. Struktura i osnovna svojstva

Aminoglikozidi (AG) su strukturalno blisko srodni ugljikohidrati čija se struktura okosnice sastoji od aminociklitolnog prstena zasićenog amino i hidroksilnim skupinama (Slika 1). Kod većine klinički korisnih aminoglikozida, ovaj aminociklitolni dio čini streptamin, točnije 2-deoksistreptamin. Streptomycin, koji posjeduje molekulu streptidina, je jedini izuzetak. Aminociklitolna jezgra povezana je glikozidnim vezama s različitim aminošećerima, a zbog tih aminošećera se pojedini aminoglikozidi mogu međusobno razlikovati (Ristuccia i Cuncha, 1982). Aminoglikozidi se mogu podijeliti u 4 skupine (EMA, 2014): derivati koji sadrže aminociklitolstreptidin (streptomycin, dihidrostreptomycin); derivati koji sadrže 4,6-disupstituirani deoksistreptaminski dio (gentamicin, kanamicin, amikacin, tobramicin), derivati koji sadrže 4,5-disupstituirani deoksistreptaminski dio (neomicin) i derivati koji sadrže 4,6-disupstituirani dio deoksistreptamina. Aminoglikozidi su bazični, jako polarni spojevi koji su pozitivno nabijeni. Oni su dobro topljivi u vodi, relativno netopljivi u lipidima i imaju pojačanu antimikrobnu aktivnost u alkalnim, ali ne i kiselim sredinama

(Spelman i sur., 1989). Kationska priroda aminoglikozida pridonosi njihovoj antimikrobnoj aktivnosti. Oni se mogu vezati na negativno nabijene lipopolisaharide te intracelularne i anionske molekule stanične membrane bakterija. Nažalost, njihov pozitivan naboj pri fiziološkom pH također pridonosi njihovom nefrotoksičnom i ototoksičnom djelovanju te može dovesti do pojave neuromuskularne blokade (Gilbert, 1995).



Slika 1. Kemijska struktura pojedinih aminoglikozidnih antibiotika (Diez i sur., 2015)

2.3.2. Mehanizam djelovanja

Osim selektivnosti na razini ciljnog prepoznavanja, terapijska upotreba aminoglikozida također proizlazi iz vrlo male propusnosti eukariotskih stanica za lijekove koji su pod fiziološkim uvjetima pozitivno nabijeni. Aminoglikozidi su bakteriocidni agensi koji inhibiraju sintezu proteina i ometaju integritet bakterijske stanične membrane. Oni to rade kroz složeni, višestupanjski proces. Prvo, ovi kationski spojevi se elektrostatski vežu na negativno nabijene ostatke u vanjskoj membrani Gram-negativnih bakterija u pasivnom, energetske neovisnom postupku. Zatim difundiraju kroz porine vanjske membrane i ulaze u periplazmatski prostor. Za njihov transport preko citoplazmatske (unutarnje) membrane potrebna je metabolička energija iz elektron-transportnog sustava koji je ovisan o prisutnosti kisika. Jednom kada uđu u stanicu, aminoglikozidi ometaju translaciju vezanjem za ribosomalno mjesto dekodiranja u unutarnjoj petlji 16S rRNA koje sadrži tri neobilježena adeninska ostatka. Aminoglikozidi odstranjuju fleksibilne adenine iz unutrašnjosti RNA i fiksiraju ih u "sklupčano" stanje koje nalikuje konformaciji koje nastaje tijekom dekodiranja mRNA molekule (Ogle i Ramakrishnan, 2005; Shandrick i sur., 2004). Pretpostavlja se da aminoglikozidi reorganiziraju mjesto dekodiranja namijenjeno za smještaj mRNA-tRNA hibrida tako što snižavaju energetske barijere između dviju konformacijskih stanja fleksibilnih adeninskih senzora (Ogle i sur., 2001). Kao posljedica toga, dolazi do ometanja procesa translacije što u konačnici dovodi do smrti bakterijske stanice.

2.3.3. Mehanizmi rezistencije

Otpornost na antibiotike postala je ozbiljna i sve veća prijetnja modernoj medicini te se pojavila kao jedna od vodećih zdravstvenih problema 21. stoljeća (WHO, 2014). Procjenjuje se da će se do 2050. godine povećati razina antimikrobne otpornosti (AMR, *engl. antimicrobial resistance*) zbog čega će do 10 milijuna ljudi godišnje umirati, a ujedno će doći do smanjenja BDP-a za 2 do 3,5% (Pikkemaat i sur., 2016). Upotreba antibiotika u uzgoju životinja znatno pridonosi razvoju i širenju antibiotičke otpornosti kod bakterija prisutnih u intestinalnom traktu životinja čiji se geni za antibiotičku rezistenciju mogu prenijeti preko hrane životinjskog podrijetla na ljude (EFSA, 2015). Široko rasprostranjena subterapeutska upotreba antibiotika kao promotora rasta kod životinja (AGP) je pogodovala odabiru, širenju i uspostavljanju stabilnih rezistentnih sojeva u okolišu (Van den Bogaard i Stobberingh, 1999; Levy, 2002) te stoga primjena antibiotika u neterapijske svrhe nije više prihvaćena unutar EU (EC, 2003). Otpornost na aminoglikozide može biti prirodna ili stečena. Budući da se aminoglikozidi transportiraju kroz staničnu membranu u energetske ovisnom procesu, koji

zahtijeva prisutnost kisika, anaerobne bakterije su prirodno otporne na aminoglikozide. Drugi organizmi poput streptokoka i enterokoka, čija stanična stijenka služi kao barijera, također su prirodno otporni na aminoglikozide. Mehanizmi rezistencije složeni su te se razlikuju između pojedinih molekula aminoglikozida i bakterijskih vrsta. Mnogi geni za rezistenciju nalaze se na pokretnim genetičkim elementima povećavajući vjerojatnost širenja otpornosti na aminoglikozide kao i ko-otpornosti na druge spojeve (Ramirez i Tolmasky, 2010). Otpornost bakterija na antibiotike posredovana je s tri različita mehanizma: smanjenje intracelularne koncentracije lijeka, modifikacije unutarstaničnih ciljnih mjesta i enzimske modifikacije lijeka.

Smanjene intracelularne koncentracije antibiotika može biti posljedica smanjenog unosa lijeka ili djelovanja aktivnih “efflux” mehanizama. Smanjeni unos može se pojaviti kod mutanata kojima nedostaju komponente elektronskog transportnog lanca kao što je slučaj kod pojedinih rezistentnih sojeva *Pseudomonas spp.*, *E. coli* te *S. aureus* (Taber i sur., 1987). Također je opisana rezistencija na gentamicin koja je uzrokovana inaktivacijom porina vanjske membrane (Poole, 2005). Energetski ovisan “efflux” sustav glavni je uzrok pojave antibiotske rezistencije kod *Pseudomonas spp.*, *Burkholderia spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *E. coli*, *Lactococcus lactis* i *Acinetobacter baumannii*.

Otpornost na aminoglikozide najčešće je rezultat aktivnosti enzima koji modificiraju antibiotike djelovanjem fosfotransferaza, acetiltransferaza ili adenililtransferaza. Ovi enzimi modificiraju hidroksilne ili amino skupine 2-deoksistreptaminske jezgre te njene šećerne komponente čime onemogućuju vezanje aminoglikozida za ciljano mjesto unutar stanice. Aminoglikozidne nukleotidil transferaze i fosfotransferaze regiospecifično modificiraju hidroksilne skupine u spojevima prijenosom AMP-a i γ -fosfata ATP-a. Acetil transferaze kataliziraju acetil-CoA ovisnu N-acetilaciju amino skupina (Vicens i Westhof, 2003). Ekspresija gena je konstitutivna, stoga do proizvodnje enzima dolazi bez obzira je li prisutan antibiotik ili ne (Gilbert, 1995; Van Landuyt i sur., 1986; Phillips i sur., 1986; Young i Hindler, 1986; Davies i Courvalin, 1977; Mayer, 1986). Dok je inhibicija enzima odgovornih za rezistenciju uspješan koncept za prevladavanje otpornosti u drugim skupinama antibiotika, mali je napredak postignut u razvoju klinički korisnih inhibitora enzima (koji modificiraju aminoglikozide), budući da im biokemijski mehanizam djelovanja nije u potpunosti poznat (Vakulenko i Mobashery, 2003).

Mjesno-specifična modifikacija prirodno se javlja u bakterijama koje proizvode aminoglikozide: bakterija se zaštićuje koristeći enzime koji dodaju metilnu skupinu na

specifične nukleotide u 16S rRNA koji su neophodni za vezanje aminoglikozida, čime se inhibira antibiotski učinak bez ometanja drugih ribosomalnih funkcija. U današnje vrijeme, metilacija ribosomalne mete je rastući mehanizam rezistencije za klinički relevantne Gram-negativne bakterije. Prvi gen koji je identificiran bio je 16S rRNA metilaza *armA* (Galimand i sur., 2003). Do sada je objavljeno 9 dodatnih gena koji kodiraju za metilaze: *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rtmD2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* i *npmA* (Potron i sur., 2015). Geni koji kodiraju za ove determinante obično se nalaze na pokretnim genetičkim elementima te su povezani s genima koji uzrokuju otpornost bakterija na druge skupine antibiotika. Geni *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rtmD2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* uzrokuju rezistenciju na gentamicin, tobramicin, kanamicin i amikacin, dok gen *npmA* uzrokuje rezistenciju na gentamicin, tobramicin, kanamicin, amikacin, neomicin i apramicin, ali ne i streptomycin (Garneau-Tsodikova i Labby, 2016; Wachino i Arakawa, 2012).

Formiranje bakterijskog biofilma je specifični mehanizam otpornosti koji se ispoljio kao glavna briga u tretmanu kroničnih infekcija (Rice, 2006), posebno onih uzrokovanih Gram-negativnim patogenima (Meyer, 2005). Nedavna studija pokazala je da podinhibitorne razine aminoglikozidnih antibiotika mogu inducirati formiranje biofilma u *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (Hoffman i sur., 2005).

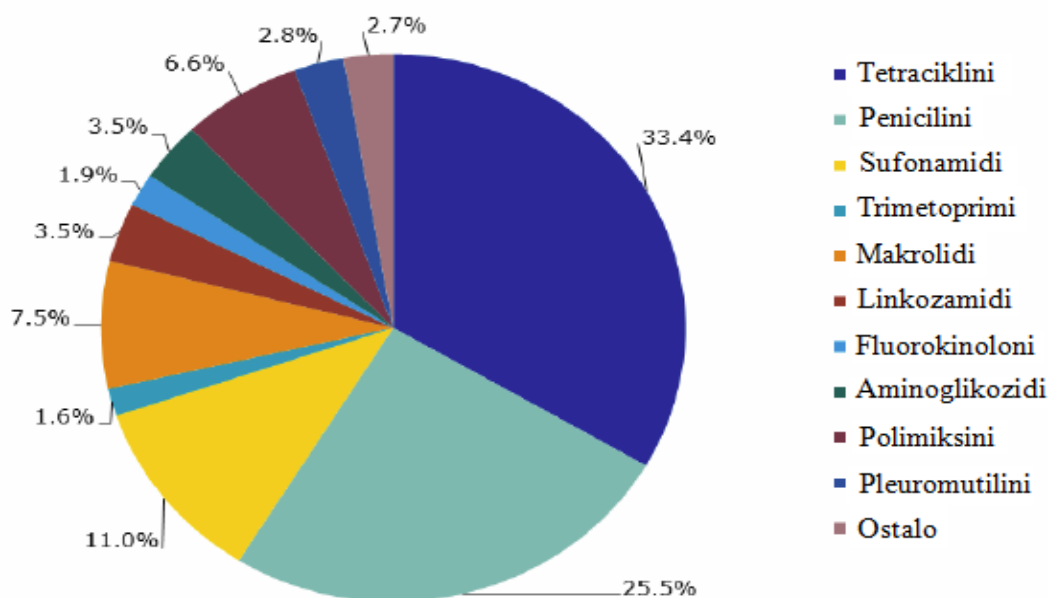
2.3.4. Primjena aminoglikozida

Antibiotici se kod životinja upotrebljavaju u tri glavne svrhe: terapijska upotreba protiv zaraznih bolesti, profilaktička upotreba za prevenciju zaraznih bolesti te kao prehrambeni aditivi kod uzgoja životinja (Fisher i sur., 2011). Terapijsko liječenje se oslanja na primjenu aktivne koncentracije antibiotika koja premašuje minimalnu inhibicijsku koncentraciju (MIC, *engl. minimum inhibitory concentration*) patogena kroz učinkovito vremensko razdoblje. Aditivi se definiraju kao tvari koje poboljšavaju svojstva hrane namijenjenim životinjama te potiču njihov rast. Prema Van Boeckelu i sur. (2015.) pet zemalja s najvećim udjelom globalne potrošnje antibiotika za proizvodnju proizvoda životinjskog podrijetla su: Kina (23%), Sjedinjene Države (13%), Brazil (13%), Indija (3%) i Njemačka (3%). Aminoglikozidi se upotrebljavaju u različitim životinjskim vrstama i u različite svrhe (Tablica 3).

Tablica 3. Uporaba aminoglikozida u veterinarstvu (EMA/ESVAC, 2016)

Supstanca	Korišteni volumen (ESVAC, 2014)	Vrijeme upotrebe	Vrsta Životinja	Bolest
Kanamycin	< 2 tone	3-4 dana	Stoka	Gram-negativni mastitis, <i>Septicaemia</i> Infekcije respiratornog i mokraćnog sustava
Gentamicin	12 tona	3-5 dana	Konji Telad Domaće životinje	Infekcije oka, respiratornog i probavnog sustava <i>Septicaemia</i> Metritis
Amikacin	< 1 tone	/	Konji	<i>Septicaemia</i> Metritis
Apramicin	21 tona	5-7 dana (voda) 28 dana (stočna hrana)	Perad Svinje Telad	Infekcije probavnog sustava <i>Enterobacteriaceae</i>
Streptomycin	7 tona	3 dana	Perad Stoka Svinje Ovce Konji Psi	Leptospiroza
Dihidrostreptomycin	129 tona	3-5 dana	Svinje Telad	Gram-negativni mastitis Infekcije probavnog i respiratornog sustava
Spektinomycin	70 tona	7 dana	Perad	Infekcije probavnog i respiratornog sustava
Paramomicin	18 tona	3-5 dana		Histomonijaza Infekcije probavnog sustava
Neomicin	155 tona	3-5 dana	Domaće životinje	Infekcije probavnog sustava, oka i uha (<i>Enterobacteriaceae</i>) <i>Septicaemia</i>

Prema prvome zajedničkom izvješću ECDC/EFSA/EMA o integriranoj analizi potrošnje antimikrobnih sredstava i pojavi antimikrobne otpornosti u humanim i životinjskim bakterijama JIACRA (ECDC/EFSA/EMA, 2015), prodaja aminoglikozida za animalnu upotrebu unutar 26 zemalja iznosila je 290,8 tona, a za ljudsku upotrebu 4,7 tona (5.2 mg / PCU životinja i 0.2 mg / PCU za ljude na temelju podataka iz JIACRA izvješća). Antibiotici koji su prijavljeni u sklopu ESVAC projekta kao prodani su: amikacin, apramicin, (dihidro) streptomycin, framacetin, gentamicin, kanamicin, neomicin, spektinomycin i paromomicin. Treba napomenuti da za amikacin nije utvrđen MRL te se stoga ne može koristiti kod životinja namijenjenih za proizvodnju hrane. Najčešća primjena aminoglikozida je kod liječenja septikemije, infekcija probavnog trakta, respiratornog trakta te mokraćnog sustava kod različitih vrsta životinja. Aminoglikozidi se često upotrebljavaju u kombinaciji s drugim antimikrobnim sredstvima (najčešće β -laktamima) kako bi se postigao sinergistički učinak ili proširio spektar antimikrobne aktivnosti. U 2014. godini postotak prodaje aminoglikozida unutar 29 zemalja EU iznosila je 3,5 % (Slika 2). Postoje značajne razlike u prodaji aminoglikozida između različitih zemalja EU, prilikom čega su najniže stope prodaje zabilježene u skandinavskim zemljama i najviše u Španjolskoj (Slika 3). Oni su šesta najčešće upotrijebljena antimikrobna skupina nakon tetraciklina, penicilina, sulfonamida, makrolida i polimiksina (EMA/ESVAC, 2016).



Slika 2. Postotak prodaje antimikrobnih sredstava za uzgoj životinja u 29 europskih zemalja za 2014. godinu (EMA/ESVAC, 2016)



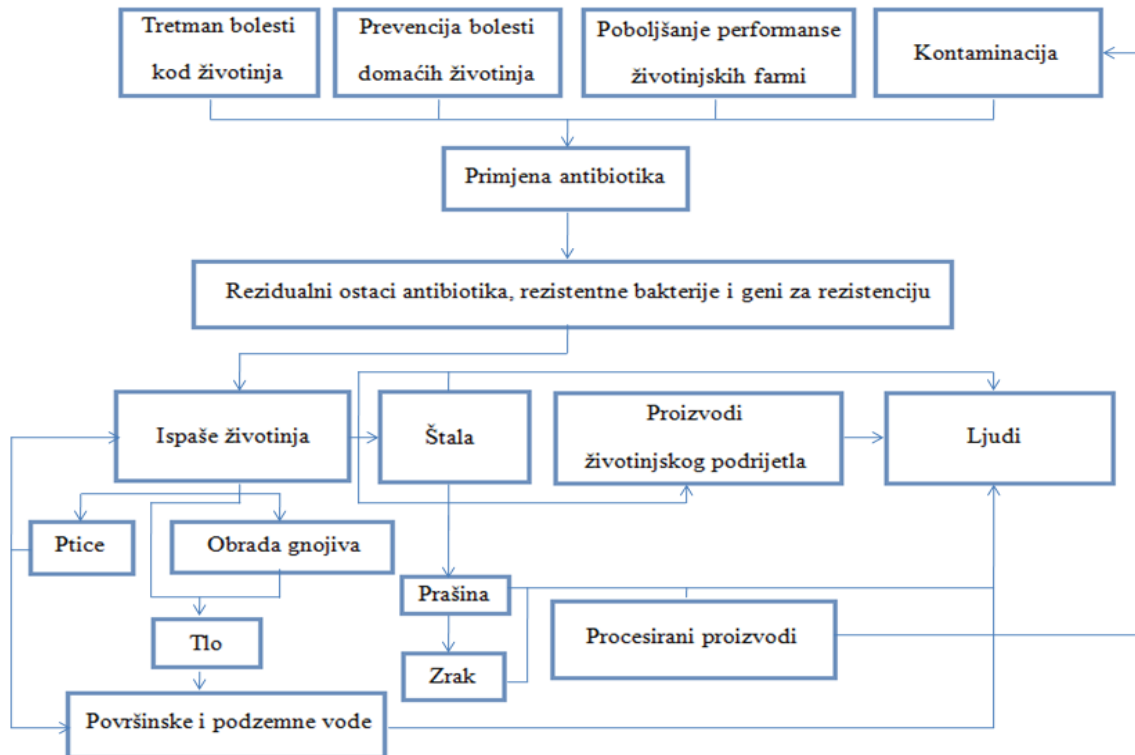
Slika 3. Prostorna distribucija veterinarske prodaje aminoglikozida (amikacin, apramicin, (dihidro) streptomycin, framycetin, gentamicin, kanamicin, neomicin) u 29 europskih zemalja za 2014. godinu (EMA/ESVAC, 2016)

2.4. NEGATIVNI UČINCI REZIDUA

Prekomjerna upotreba, zloupotreba ili nedostatak kontrole u primjeni antibiotika rezultira njihovom visokom razinom akumulacije u organizmu životinja (Ronquillo i Hernandez, 2017). Upotreba promotora rasta također dovodi do pojave potencijalno štetnih rezidua u mesu i ostalim prehrambenim proizvodima životinjskog podrijetla. Rezidualni ostaci antimikrobnih lijekova koji su iznad regulatorne koncentracije utvrđenim od strane FDA-a (tolerancije), EMA ili JECFA (MRL) mogu rezultirati razvojem alergijskih reakcija, poremećajima ravnoteže intestinalne mikroflore, karcinoma, i/ili razvojem antimikrobne rezistencije koji otežava liječenje ljudskih infekcija. Aminoglikozidi također mogu uzrokovati ototoksičnost i nefrotoksičnost, no to se obično događa samo s visokim ili učestalim doziranjem (Baynes i sur., 2016). Rice i sur. (1983) izvijestili su o toksikološkim učincima linkomicina prisutnog u mliječnim proizvodima, a zahvaćene krave su razvile anoreksiju, proljev i ketozu. Potrošnja mlijeka i mliječnih proizvoda varira ovisno o zemljopisnoj regiji, tržišnim i gospodarskim uvjetima te gastronomskoj tradiciji pojedinih zemalja. Treba također napomenuti da je razina konzumacije mlijeka znatno veća kod mlađih (posebno dojenčadi) negoli starijih osoba. Pereira i sur. (2014) procijenili su učinak uporabe antimikrobnih

supstanci na učestalost pojave rezistencije u fekalnoj *E. Coli* (izolirane iz teladi) te se ustvrdilo da uzorci od teladi tretiranih s enrofloksacinom su imale veću ($P < 0,0001$) vjerojatnost da budu rezistentne na fluorokinolone. Ovaj rezultat je osobito uznemirujuć jer su ti antibiotici ključni u humanoj medicini za liječenje bolesti uzrokovanih nekom od bakterija iz porodica *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* i *Shigella spp.* (Collignon i sur., 2009). Antibiotici koji se koriste u borbi protiv patogenih uzročnika mastitisa su najčešći antimikrobni agensi koji se koriste u mliječnoj industriji (Fisher i sur., 2011). LeBlanc i sur. (2001) proveli su istraživanje učestalosti pojave antimikrobne rezistencije kod odraslih krava te su zaključili da uporaba antibiotika u mliječnoj industriji za liječenje i prevenciju ovog stanja doprinosi pojavi antimikrobne rezistencije.

Posljedice korištenja antibiotika u ishrani životinja obuhvaća zamršeni sustav međusobno povezanih procesa: razvitak rezistentnih bakterija, prijenos rezidualnih ostataka antibiotika, rezistentnih bakterija i gena za rezistenciju s proizvoda životinjskog podrijetla na potrošače (Levy, 2002; Acar i Moulin, 2006; Aminov, 2009; Chee-Sanford, 2009). Prisutnost rezidualnih ostataka antibiotika u okolišu ne mijenja samo strukturu i raznolikost mikrobiološke zajednice tla, nego utječe i na sposobnost mikroorganizama da razgrađuju kontaminante te obavljaju druge funkcije poput metanogeneze, transformacija dušika i smanjenje razine sulfata u tlu i vodenom okolišu (Keen i Patrick, 2013). Slika 4 prikazuje moguće putanje u stočarstvu koje dovode do pojave širenja rezidualnih ostataka antibiotika i rezistentnih bakterija sa životinja na okoliš. Ograničavanje potrošnje antibiotika je najočitija strategija za suzbijanje problema pojave rezistencije. Povijesni primjeri podupiru pretpostavku da učestalost otpornosti na antibiotike opada kada se antibiotici više ne primjenjuju. Tako je danska vlada 1995. godine zabranila uporabu avoparcina, što je rezultiralo smanjenjem učestalosti pojave rezistentnih sojeva *E. faecium* s 72,7 % 1995. na 5,8 % 2000. godine (Aarestrup i sur., 2001).



Slika 4. Moguće putanje širenja rezidualnih ostataka antibiotika i rezistentih bakterija (adaptirano prema Pikkemaat i sur., 2016)

2.5. EKSTRAKCIJA ANTIBIOTIKA IZ PROIZVODA ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA NA ČVRSTOJ FAZI (SPE, *eng. solid-phase extraction*)

Glavni nedostatak kvantifikacije spojeva u biološkim uzorcima predstavlja učinak matriksa koji mogu pospješiti ili smanjiti ionizaciju analita te dovesti da nastajanja supresije ili pojačanja signala analita, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata identifikacije. Za smanjenje utjecaja matriksa na rezultate analize koristi se sljedeće: kalibracija na matriksu (*engl. matrix-matched calibration*), dodatak unutarnjeg standarda (najčešće izotopom obilježen analoga analita), povećanje intenziteta pročišćavanja ekstrakta, promjena uvjeta kromatografije i produljenje vremena analize (Stachniuk i Fornal, 2015).

Uobičajene tehnike za ekstrakciju i pročišćavanje antibiotika iz bioloških matriksa uključuju precipitaciju proteina, ekstrakciju tekuće-tekuće (LLE, *engl. liquid-liquid extraction*) i ekstrakciju čvrstom fazom (McGlinchey, 2010). Ekstrakcija na čvrstoj fazi je analitički postupak koji podrazumijeva ekstrakciju analita koji su otopljeni ili suspendirani u tekućoj smjesi s obzirom na njihova fizička i kemijska svojstva. U usporedbi s drugim tehnikama, SPE je efikasnija, selektivnija, koristi mnogo manje količine štetnih otapala

(ekološka održivost), postiže veće ukoncentriravanje analita te se smanjuje učinak matriksa kod složenih uzoraka (Mokh i sur., 2015). Ekstrakcijom s polarnim organskim otapalima (npr. acetonitril, aceton i metanol) mogu se izdvojiti spojevi širokog raspona polarnosti kao i veliki broj endogenih komponenata matriksa (Masiá i sur., 2016). Dostupan je široki izbor sorbenasa koji se oslanjaju na različite mehanizme ekstrakcije/zadržavanja analita. Ekstrakcijski postupak temelji se na nekoliko koraka. Prvo se kondicionira sorbens na čvrstoj fazi što podrazumijeva propuštanje organskog otapala kroz kolonu, čime se postiže bolja povezanost sorbensa i uzorka. Sljedeći korak je propuštanje uzorka kroz kolonu uz konstantan protok potpomognut vakuumom pri čemu dolazi do vezanja analita na površinu sorbensa. Nakon toga sorbens se ispiru odgovarajućim otapalom kako bi se uklonile interferencije, a analit u tom slučaju ostaje vezan za čvrstu fazu. Završni korak u ovom postupku je eluiranje analita odgovarajućim eluensom (Dean, 2009).



Slika 5. SPE kolone korištene za ekstrakciju aminoglikozida iz mlijeka (vlastita fotografija)

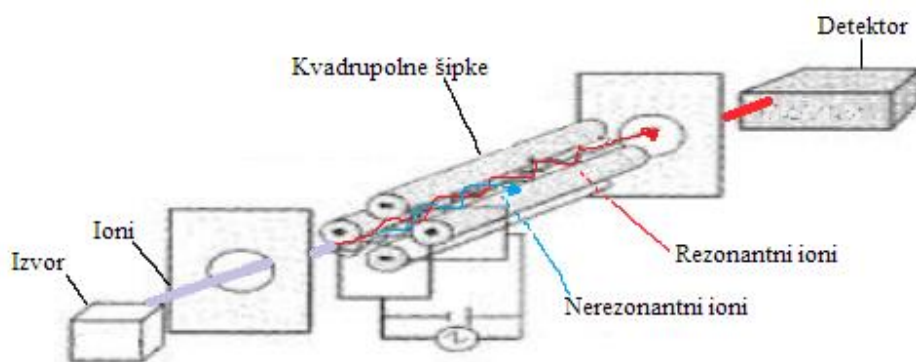
Jedno od pitanja koje se treba riješiti pri određivanju AG-a u uzorcima životinjskog podrijetla jest priprema samih uzoraka, što nije lagan zadatak zbog visoke polarnosti AG. Životinjska tkiva sadrže mnogo interferirajućih tvari kao što su proteini i masti koji se trebaju ukloniti ili smanjiti što je više moguće bez utjecaja na rezidualne ostatke od interesa. Drugi izazov, u pripremi uzoraka, je taj što antibiotici mogu biti prisutni u vrlo malim količinama. Budući da je koncentracija AG-a uobičajeno niska, potrebno je koncentrirati uzorke kako bi se postigla visoka osjetljivost. Mlijeko se općenito obrađuje pod uvjetima reverzne faze ili ionsko izmjenjivačke SPE. Uzorak se može razrijediti vodom, ili mješavinom vode i polarnog otapala kao što je metanol (do 50 %). Neki postupci mogu zahtijevati taloženje proteina obradom s kiselinom (tipično HCl, H₂SO₄ ili trikloroocetnom kiselinom), (McGlinchey, 2010).

2.6. PRINCIP RADA LC-MS/MS

Kromatografija je fizikalna separacijska metoda u kojoj se komponente koje treba razdvojiti selektivno raspoređuju između pokretne i stacionarne faze što rezultira različitim koeficijentima raspodjele i retencijama pojedinih analita kroz kolonu te posljedično pojavom odvojenih pikova na kromatogramu. Mobilna faza je uobičajeno mješavina vode ili vodenog pufera s metanolom, acetonitrilom ili tetrahidrofuranom. Može se razlikovati nekoliko kromatografskih tehnika: plinska, tekućinska, tankoslojna, ionoizmjenjivačka kromatografija te kromatografija isključenjem (Vandenberge, 2012).

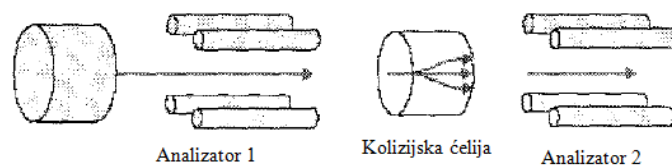
Masena spektrometrija je analitička metoda kojom se analiziraju molekule s obzirom na omjer mase i naboja (m/z) te predstavlja najbolju opciju za analizu aminoglikozida zbog odsutnosti kromofora i fluorofora unutar tih spojeva (McGlinchey, 2010). Uređaj, spektrometar masa, sastoji se od ionskog izvora gdje nastaju ioni, analizatora masa gdje se analizirani ioni razdvajaju na temelju omjera m/z te detektora i sustava za obradu podataka. Moguće ionizacijske tehnike su ionizacija elektronima (EI, *engl. Electron Ionization*), kemijska ionizacija (CI, *engl. Chemical Ionization*), ionizacija brzim atomima (FAB, *engl. Fast Atom Bombardment*), matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI, *engl. Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization*), te elektroraspršenje (ESI, *engl. Electrospray Ionization*), (Hoffmann i Stroobant, 2007). Dobiveni ioni mogu se razdvojiti prema omjeru m/z u prostoru ili vremenu uz pomoć različitih tipova analizatora: sektorskog masenog analizatora, kvadrupolnog masenog analizatora, analizatora mase iona, analizatora vremena leta i Fourier-transformiranog masenog analizatora (Vandenberge, 2012). Kod spojeva koji pripadaju skupini B, gdje se zahtijeva kvantitativna analiza za MRL, mogu se upotrijebiti kvadrupolni ili “ion-trap” instrumenti (McGlinchey, 2010). Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri cilindrične elektrode pri čemu dvije elektrode posjeduju pozitivni, a druge dvije negativni polaritet (Slika 6). Tijekom procesa analize preklapaju se izmjenični i istosmjerni napon, što uzrokuje pojavu električnog polja. Ioni koji se nalaze u analizatoru imaju različite vrijednosti m/z , koje određuju hoće li ioni neometano proći kroz analizator ili će dotaknuti elektrode i tako postati neutralne molekule. Dodatni parametri koji određuju karakteristike njihovog gibanja su napon, kutna frekvencija, masa čestice, radijus i dr. (Hoffmann i Stroobant, 2007). Detektor se koristi za pretvaranje iona koji dolaze iz analizatora u odgovarajući signal koji se snimi računalnim sustavom i prikazuje kao maseni spektar. Maseni spektar predstavlja (relativni) intenzitet proizvedenih iona kao funkciju omjera m/z . Izravno određivanje masenog spektra

aminoglikozida može biti teško zbog njihove termolabilnosti te se zbog toga kao temeljna metoda ionizacije za određivanje rezidua koristi ionizacija atmosferskim tlakom (API, *engl. atmospheric pressure ionization*). Ova tehnika, povezana s tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti i tandem masenom spektrometrijom (LC-MS / MS), najavila je novo doba u kvalitativnom te kvantitativnom određivanju rezidualnih ostataka veterinarskih lijekova (McGlinchey, 2010).



Slika 6. Shema kvadrupolnog masenog analizatora (Vandenberge, 2012)

Spajanje LC i MS u jedan sustav omogućuje analizu širokog spektra spojeva što uključuje termički nestabilne analite i analite s visokom molekulskom masom. Uspješnost rada sustava LC-MS uvelike ovisi o prethodnoj pripremi uzoraka budući da je uređaj vrlo osjetljiv te kontaminacije u uzorku mogu izazvati razne komplikacije prilikom analize. Vanjski uvjeti, npr. temperatura, također znatno utječu na rezultate analize sustavom LC-MS. Osnovni pristup tandem MS/MS je mjerenje m/z omjera iona prije i nakon inducirane fragmentacije unutar masenog spektrometra. Fragmentacijske reakcije inducirane su energetske sudaranjem iona s plinom (npr. argonom). Taj se proces naziva kolizijom inducirana disocijacija ili CID (*engl. collision-induced dissociation*). Tandem MS/MS sadrži trostruki kvadrupol u kojem su povezana tri kvadrupolna analizatora, od kojih središnji ima funkciju kolizijske ćelije u kojoj se odvija kontrolirana fragmentacija iona. LC-MS/MS instrument omogućava korisniku da, unutar granica osjetljivosti instrumenata, provede pet različitih vrsta eksperimenata: potpuno skeniranje (*engl. Full scan*), skeniranje ionskog produkta, skeniranje ionskog prekursora, skeniranje neutralnog gubitka i MRM (*engl. multiple reaction monitoring*). Oba masena analizatora su postavljeni na odabrani omjer m/z . Prvi analizator mase je postavljen da odašilje ion prekursora u kolizijsku ćeliju, drugi analizator mase prati njene ionske produkte (Slika 7). Više od 90 % LC-MS/MS postupaka u kliničkoj uporabi koriste MRM način rada (Grebe i Singh 2011).



Slika 7. Shematski prikaz MRM metode (Mortier, 2005)

2.6.1. Validacija metode

Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentira da je određena analitička metoda prikladna za namijenjenu svrhu. Kriteriji izvedbe za analitičke metode opisani su u Odluci Komisije 2002/657/EZ implementirajući Direktivu 96/23 / EZ o provedbi analitičkih metoda i tumačenju rezultata.

2.6.1.1. Parametri validacije

Selektivnost/specifičnost: Specifičnost/selektivnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matriksu uzorka.

Linearnost: Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku te se ona određuje na krivuljama kalibracije prilagođene matricama (određuje se koeficijent korelacije).

Točnost: Točnost predstavlja stupanj podudarnosti između stvarne (referentne) vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primjenom metode te se ona određuje istinitošću i preciznošću.

Granična koncentracija analita ($CC\alpha$): Granična koncentracija analita ($CC\alpha$) označava granicu na kojoj i iznad koje se može zaključiti vjerojatnost pogreške α da uzorak ne udovoljava. Za zabranjene tvari nesmije prelaziti 1 %.

Sposobnost detekcije ($CC\beta$): Sposobnost detekcije ($CC\beta$) znači najmanji sadržaj tvari koji se može otkriti, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku uz vjerojatnost pogreške β . β pogreška je vjerojatnost lažno negativne odluke, te je ograničena na 5 %.

Granica kvantifikacije (LOQ): Granica kvantifikacije je najmanja koncentracija u uzorku koja se može kvantificirati određuje sa istinitošću i preciznošću koja pripada unutar određenih raspona.

Granica detekcije (LOD): Granica detekcije predstavlja najmanju količinu analita koja se može detektirati.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

- Ultračista voda
- Metanol (MeOH) za HPLC, *J. T. Baker*, Deventer, Nizozemska
- Acetonitril (LC-MS čistoće)
- Amonijev acetat (HPLC čistoće)
- Mravlja kiselina (HCOOH), , *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Trikloroctena kiselina
- Titriplex III (Na₂EDTA x 2 H₂O)

Standardi:

- Spektinomicin dihidroklorid pentahidrat, *Fluka*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Neomicin trisulfat hidrat, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Paromomicin sulfat, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Tobramicin, *Fluka*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Gentamicin sulfat, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Dihidrostreptomicin seskvisulfat, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Apramicin sulfat, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Kanamicin A disulfat hidrat , *Fluka*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Higromicin B , *Dr. Ehrenstorfer GmbH*
- Streptomicin seskvisulfat monohidrat

3.2. APARATURA I PRIBOR

- Aparat za usitnjavanje uzoraka (laboratorijski blender)
- Analitička vaga (preciznost ± 0,0001 g), *OHAUS*, Parsippany, SAD
- Tehnička vaga (preciznost ± 0,001 g), *OHAUS*, Parsippany, SAD
- Vortex mješalica
- mješalica neoLab Vortexer
- Laboratorijsko posuđe (PP čašice visoke čistoće, i ostalo stakleno posuđe)
- Automatske pipete (5-50 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL), *Eppendorf*, Wesseling, Njemačka
- Centrifuga do 4000 rpm s termostatom, Rotanta 460R, *Hettich Zentrifugen*, Tuttlingen, Njemačka

- Centrifuga Thermo Scientific SL16R do 15200 rpm
- Ultrazvučna kupelj, *Iskra*, Šentjernej, Slovenija
- Hladnjak +2 do +8 °C
- Zamrzivač sa najnižom temperaturom od -18 °C
- Digestor
- Plastične PP mikroeprovete za centrifugiranje od 2.0 ml (Eppendorf Safe-Lock)
- Plastične tamne bočice od 30 mL HDPE za čuvanje standardnih otopina
- Tamne plastične PP viala 2 mL
- Tamne plastične PP viala s insertom 300 µL
- 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, *Organomotions Associates Inc.*, Berlin, Njemačka
- Dušik 99,999%
- Kupka za degaziranje
- Kromatografska kolona: Sequant ZIC-HILIC - 5µm, 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)
- Aparati UHPLC-MS/MS: UHPLC Agilent Tech. 1290 Infinity (s pripadajućom kvaternarnom pumpom: Quat Pump G4204A, termostatom: Termostat G1330B, uređajem za samouzorkovanje: Sampler G4226A, odjeljkom za kolonu: TCC G1313C) i Triple Quad LC/MS 6460 opremljenim s Jet Stream ESI sustavom za ionizaciju, povezani s računalom sa softverom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka (*MassHunter Acquisition version B.07.00*)

3.3. METODA RADA

Metoda određivanja aminoglikozida u pojedinim uzorcima mlijeka temelji se na ekstrakciji uzoraka na čvrstoj fazi, te analizi ekstrakta sustavom LC-MS/MS praćenjem iona specifičnih omjera m/z .

3.3.1. Priprema i čuvanje uzoraka do analize

U svrhu izbjegavanja kontaminacije, a prije pripreme uzorka, pažljivo oprati noževe homogenizatora ili miksera sredstvom za čišćenje, toplom vodom i redestiliranom vodom.

3.3.1.1. Priprema uzoraka mlijeka

Mlijeko, koje je doneseno u laboratorij, pohranjuje se u hladnjak na temperaturi 2 – 8 °C kroz 24 sata ili na tri mjeseca pri temperaturi od -18 °C. Prije analize mlijeku se odstranjuje mast centrifugiranjem 5 minuta na 3800 okretaja/min pri temperaturi + 5 °C.

3.3.1.2. Priprema otopina

Mobilna faza A: U tikvicu od 1 L dodati 200 mM amonijevog acetata (15.4 g) i 1%-tne otopine mravlje kiseline (10 mL) te 990 mL mješavine H₂O/ACN (95/5, v/v).

Mobilna faza B: Acetonitril (ACN)

Prije stavljanja na uređaj, mobilne faze je potrebno degazirati 2-3 min u ultrazvučnoj kupelji.

Otopina za ekstrakciju (2% trikloroctena kiseline + 0.1% Na₂EDTA x 2 H₂O):

Izvagati 20 g trikloroctene kiseline i 1 g Na₂EDTA u staklenim čašama te obje soli treba zasebno otopiti u malim količinama destilirane vode. U tikvicu od 1 L dodati otopinu EDTA, promiješati te onda dodavati otopinu TCA kako bi se spriječilo stvaranje taloga. Tikvicu nadopuniti do oznake destiliranom vodom.

Mješavina H₂O/ACN 95/5, v/v:

U tikvicu od 1 L pomiješati 950 mL vode sa 50 mL ACN.

*Skrraćeni nazivi analita korišteni u daljnjem tekstu: STR-streptomycin, GEN- gentamicin, NEO-neomicin, KAN-kanamicin, PAR-paramomicin, APR-apramicin, DSTR-dihidrostreptomycin, SPEC-spektinomycin hidrat,

3.3.2. 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 (Tablica 4). Standardne kalibracije pripremane su u svrhu testiranja linearnosti instrumentalnog sustava dok za kvantitativnu procjenu služi isključivo matriks kalibracija. Izrada standardne i matriks kalibracije bazirana je na izradi ukupne mješavine standardne otopine koja sadrži svaki pojedini analit u različitim koncentracijama.

Tablica 4. Postupak pripreme standardne otopine mješavine aminoglikozida za mlijeko (RS-AMG-MIX-MLIJEKO-RS_x)

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-ML
RS1	STR	100 000	1	4000	25	RS2
	DSTR		1	4000		
	NEO		7.5	30 000		
	PAR		0.5	2000		
	SPEC		2	8000		
	GEN		1	4000		
	APR		0.5	2000		
	KAN		0.75	3000		

U ovom radu za obogaćivanje se koristi bazna otopina mješavine svih aminoglikozida. Postupak pripreme standardne mix otopine internih standarda navedena je u tablici 5.

Tablica 5. Postupak pripreme standardne mix otopine internih standarda (RS-AMG-MIX-IS_x)

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
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 IS MIX-
IS1	HIG	100 000	1.25	5000	25	IS2
	TOB		1.25	5000		

Otopine se pripremaju u zatamnjenom plastičnom odmjernom posuđu kvalitete A serije. Bazne otopine MS su stabilne 1 godinu skladištene u zamrzivaču na -20 °C. Radne otopine RS1 i IS1 su stabilne kroz 6 mjeseci ako su pohranjene u zamrzivaču pri -20 °C, dok su otopine RS2 i IS2 stabilne 3 mjeseca ako su pohranjene 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. Radne otopine se pripremaju u vodi. Čistoća standarda među šaržama može varirati pa se proračun odvage prilikom pripreme bazne otopine treba uraditi prilikom svake pripreme uračunavajući postotak čistoće standarda i čistoću oblika u kojem je prisutan.

3.3.2.1. Priprema standardne krivulje na otapalu

Standardna krivulja na otapalu se priprema iz standardne mješavine za matriks mlijeka (Tablica 6).

Tablica 6. Standardna krivulja i koncentracijska područja po grupi analita

Analit	Razina L				
	1	2	3	4	5
STR, DSTR, GENT* [$\mu\text{g } \mu^{-1}$]	40	80	200	300	400
SPEC [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	80	160	400	600	800
NEO [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	300	600	1500	2250	3000
APR, PAR [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	20	40	100	150	200
KAN [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	30	60	150	225	300
HIG, TOB [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	250				
Volumen RS-AMG-MIX-ML [μL]	20 RS2	40 RS2	100 RS2	150 RS2	200 RS2
Volumen RS-AMG-MIX-IS μL	100 IS2				
Volumen H₂O [μL]	380	360	300	250	200

Standard razine L3 se priprema u svakoj analizi kao kontrola stabilnosti metode i sustava LC-MS/MS-a. Koncentracija internog standarda dodana na svaku razinu iznosila je $250 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.3.2.2. Priprema uzoraka sa standardnim dodatkom-MATRIKS KALIBRACIJSKA KRIVULJA

Standardna krivulja na matriksu mlijeka priprema se iz standardne mješavine aminoglikozida za matriks mlijeka prethodno navedene u tablici 6. Obogaćenje uzorka se provodi na 5 razina navedenih u Tablici 7.

Tablica 7. Matriks krivulja za mlijeko

Analit	Razina M				
	1	2	3	4	5
STR, DSTR, GENT* [µg kg ⁻¹]	30	50	100	200	300
SPEC [µg kg ⁻¹]	60	100	200	400	600
NEO [µg kg ⁻¹]	225	375	750	1500	2250
APR, PAR [µg kg ⁻¹]	15	25	50	100	150
KAN [µg kg ⁻¹]	22,5	37,5	75	150	225
HIG, TOB [µg kg ⁻¹]	250				
Volumen RS-AMG-MIX-ML [µL]	15 RS2	25 RS2	50 RS2	100 RS2	150 RS2
Volumen RS-AMG-MIX-IS [µL]	100 IS2				

*Napomena:

Standard gentamicina se sastoji od 3 oblika gentamicina (C1a, C1 i C2+C2a). Postotak svakog pojedinog oblika je naveden u certifikatu analize za svaku šaržu proizvoda. Stoga je stvarna koncentracija na svakoj razini kalibracijske krivulje ovisna o postotku navedenom u certifikatu (npr. obogaćenje gentamicinom od 50 ppb za standard koji sadrži 30,1% gent C1, gent C1a 28,3% i gent C2/2a 41,6% odgovara 15,1 ppb gent C1, 14,1 gent C1a i 20,8 gent C2/2a). U slučaju nižih ili viših koncentracija potrebno je prilagoditi kalibracijsko područje očekivanoj koncentraciji u uzorku kako bi rezultat bio unutar krivulje. Dodavanje standarda vrši se izravno na odvaganoj količini 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.

3.3.3. Postupci kontrole kvalitete

Za kvantitativnu orijentacijsku analizu uzorak je dovoljno pripremiti u 1 probi. Ukoliko iskorištenje internog standarda ne odgovara za određeni uzorak tada se mora ponoviti u slijedećoj analizi. Za kvantitativnu potvrdnu analizu uzorak je potrebno pripremiti u minimalno 2 probe. Svaka serija mjerenja mora uključivati 6 uzoraka kontrole kvalitete. Svaki početak analize podrazumijeva da je instrument ispran mobilnom fazom (pročišćena kolona i izvor iona MS-a). Interni standard se dodaje u uzorke za matriks kalibraciju, u uzorke za analizu i negativni kontrolni uzorak.

Slijepi kontrolni uzorak

Uzorak kojeg predstavlja otopina vode i acetonitrila u omjeru 1:1.

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

3.3.4. Pročišćavanje uzoraka

3.3.4.1. Priprema uzorka mlijeka za SPE pročišćavanje

Odvagano je po 2 g uzorka mlijeka u plastičnim epruvetama od 50 mL na analitičkoj vagi osjetljivosti $\pm 0,0001$ g. Nakon toga su dodani interni standardi i standardi analita te su uzorci ostavljeni 10 min. Nadalje, u uzorke je dodano 10 mL otapala za ekstrakciju (2% trikloroctena kiselina + 0.1% Na₂EDTA x 2 H₂O), te su radi homogenizacije vorteksirani 1 min, miješani 20 min na rotacionoj mješalici (F1, rpm 50) i postavljeni u ultrazvučnu kupelj na 5 min. Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 4000 rpm pri 5°C, a supernatanti su prebačeni u PE viala od 15 mL.

3.3.4.2. Pročišćavanje na SPE kolonama (Chromabond HR-X)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) provedena je na uređaju proizvođača *Supelco Sigma, Aldrich Chemie GmbH*. SPE kolone (*Chromabond HR-X Macherey Nagel* - 6 mL/200 mg) za ekstrakciju kondicionirane su propuštanjem 5 mL metanola, 5 mL H₂O te 5 mL otapala za ekstrakciju (2% trikloroctena kiselina + 0.1% Na₂EDTA x 2 H₂O). Nakon toga su kvantitativno preneseni uzorci iz epruvete na kolone, kolone su isprane s 1 mL H₂O, te su se ostavile sušiti u struji zraka pod vakuumom oko 30 minuta. Nakon što su se kolone dobro osušile, uslijedilo je eluiranje analita metanolom (dva puta po 3 mL metanola). Eluat je skupljan u epruvete i uparen u struji dušika na uparivaču pri 40 °C \pm 5 °C. Da bi uzorci bili spremni za daljnju analizu, suhi ostaci su otopljeni u 0,5 mL H₂O u ultrazvučnoj kupelji na 5 min. Uzorci su prebačeni u plastične mikroeprevete (Eppendorf), centrifugirani na najvećoj brzini (13000 rpm, 5 min pri 5°C) i prebačeni u PE viala. Uzorci su se mogli odmah injektirati ili čuvati 1 dan na -20°C.

konc. 1 ng/g 2g (2 ng) \rightarrow 10 mL (2 ng)

↓

0.5 mL (2 ng) \rightarrow 2 ng/0,5 mL = 4 ng/mL $f = 1/4 = 0,25$

3.3.5. Analiza LC-MS/MS metodom

Za kvantificiranje aminoglikozida u mlijeku korišten je LC-MS/MS postupak (*engl. liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) jer sa LC sustavom je omogućeno razdvajanje ispitivanog analita (AG) od ostalih komponenti složenih smjesa (mlijeka), a MS/MS detekcijom se postiže vrlo velika selektivnost, često puta i bolja osjetljivost u odnosu na UV detektor.

Instrumentalna analiza se obavlja na instrumentu oznake *MassHunter Acquisition software* prema metodi:

- AMG-UPLC-AM06.m

Injektiranje uzoraka treba biti prema slijedećem rasporedu:

- Blank
- Kontrolni uzoraka stanja instrumenta L3
- Negativni kontrolni uzorak otapala (Blank reagens)
- Matriks blank 1
- Blank
- Uzorci (svakih 10 injektiranja testirati s kontrolnim uzorkom stanja instrumenta, nakon cega prije daljnjeg injektiranja uzoraka treba injektirati matriks blank)
- Blank
- Matriks blank 2
- Matriks kalibracijska krivulja
- Blank
- Matriks blank
- Kontrolni uzorak stanja instrumenta L3
- Blank

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

3.3.5.1. Kromatografski uvjeti

Odvajanje se izvodi na koloni Sequant ZIC-HILIC - 5 μ m, 200A, 100 x 2.1 mm

Početni kromatografski uvjeti su: otopina (A): 25 % NH₄CH₃CO₂ 200mM

otopina (B): 75 % ACN

Analiza tekućinske kromatografije provodi se gradijentnom eluacijom te je prikazana u tablici 8:

Tablica 8. Protok mobilne faze u različitim vremenskim intervalima

Vrijeme (min)	A [%]	B [%]
0	25	75
2	70	30
4	70	30
5	100	0
10	100	0
10,01	25	75
16	25	75

Protok mobilne faze je 0.4 mL/min. Jedno kromatografsko snimanje traje 16 minuta. Kolona treba biti termostatirana na 40 °C. Volumen injektiranja je 15 μ L, te se provodi uz ispiranje igle u poziciji za pranje (*FlushPort*) kroz 20 sekundi s otopinom ACN: H₂O (1:1, v/v).

3.3.5.2. Uvjeti masene spektrometrije

Prvi korak u razvoju LC-MS/MS metode predstavlja određivanje molekuskog iona te odabiri odgovarajućih frgmentacijskih iona. Snimanje ionskih tranzicija se vrši u 4 segmenta pri čemu se u 1. i 4. segmentu HPLC tok preusmjerava u otpad kako bi se izbjegla nepotrebna kontaminacija masenog spektrometra (Div Valve \rightarrow to waste). Prilikom MS/MS analize uzorka primijenjeno je praćenje višestrukih reakcija (MRM, *engl. Multiple reaction monitoring*) snimanje jednog prekursora sa dvije tranzicije u produkt ione (Tablica 11, rezultati i Slike 8-10., rezultati).

Snimanje u svih 4 segmenata se provodi pod uvjetima navedenim u tablici 9.

Tablica 9. Parametri izvora

Parametar	1.- 4.segment
Temperatura plina	350
Protok plina	12
<i>Nebulizer (psi)</i>	50
<i>Sheath Gas Temp</i>	400
<i>Sheath Gas Flow</i>	11
<i>Capillary</i>	4000
<i>Nozzle voltage</i>	300

Ionizacija se odvija u ESI izvoru u pozitivnom načinu rada. Delta EMV iznosi 400. Parametri instrumentalne optimizacije koji se tiču instrumenta, prikazani su u Tune File-u računala ID:\MassHunter\Tune. Injektirati kontrolni uzorak stanja instrumenta L3 te usporediti osjetljivost s odzivom u prethodnim analizama.

3.3.6. 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 (RT) pikova eventualno prisutnih u otopini uzorka. 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 usporedivi sa 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 RT-a, 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:

$$[1] R = \frac{A_n^2}{A_n^1} * 100$$

Gdje je:

A_n^1 - površina ionske tranzicije intenzivnijeg iona u otopini uzorka;

A_n^2 - 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 slijedećom formulom:

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

Gdje je:

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

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

Odnos izmjerenih intenziteta iona produkata mora odgovarati uvjetima navedenim u tablici 10.

Tablica 10. Maksimalna dozvoljena odstupanja relativnih intenziteta

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

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

3.3.7. Kvantitativna procjena

Za kvantitativnu procjenu potrebno je rezultate proračunati sa matriks kalibracijske krivulje, čija upotreba isključuje potrebu izražavanja rezultata uz korekciju iskorištenja. Mjerna nesigurnost je već uračunata u $CC\alpha$ vrijednost te ju je potrebno izražavati samo ukoliko je to izrazito traženo od strane vanjske osobe, a navedena je u prilogu (Tablica 26).

Rezultat analize se smatra pozitivan ukoliko je koncentracija premašila graničnu koncentraciju analita $CC\alpha$ (*decision limit*).

Rezultat analize se smatra negativan ukoliko koncentracija nije premašila graničnu koncentraciju analita $CC\alpha$ (*decision limit*).

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_n) za svaki od analita u odnosu na interni standard za uzorke matriks kalibracije i ispitne uzorke, u skladu sa slijedećom formulom:

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

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 (%):

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

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:

$$[5] \quad C_n = \frac{A_n^1 * C_{\text{istd}}}{A_{\text{istd}}^1 * \overline{RF}_n}$$

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:

$$f = 0,25$$

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

Gdje je:

$V_{\text{ekstrakta}}$ – volume konačnog ekstrakta

F – faktor razrijeđenja 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 koncentracije manje od $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ unijeti dvije značajne decimale). Za pozitivne uzorke na analit, potrebno je izvesti najmanje dvije analize, prikazujući konačan rezultat kao srednju vrijednost pojedinih rezultata..

4. REZULTATI I RASPRAVA

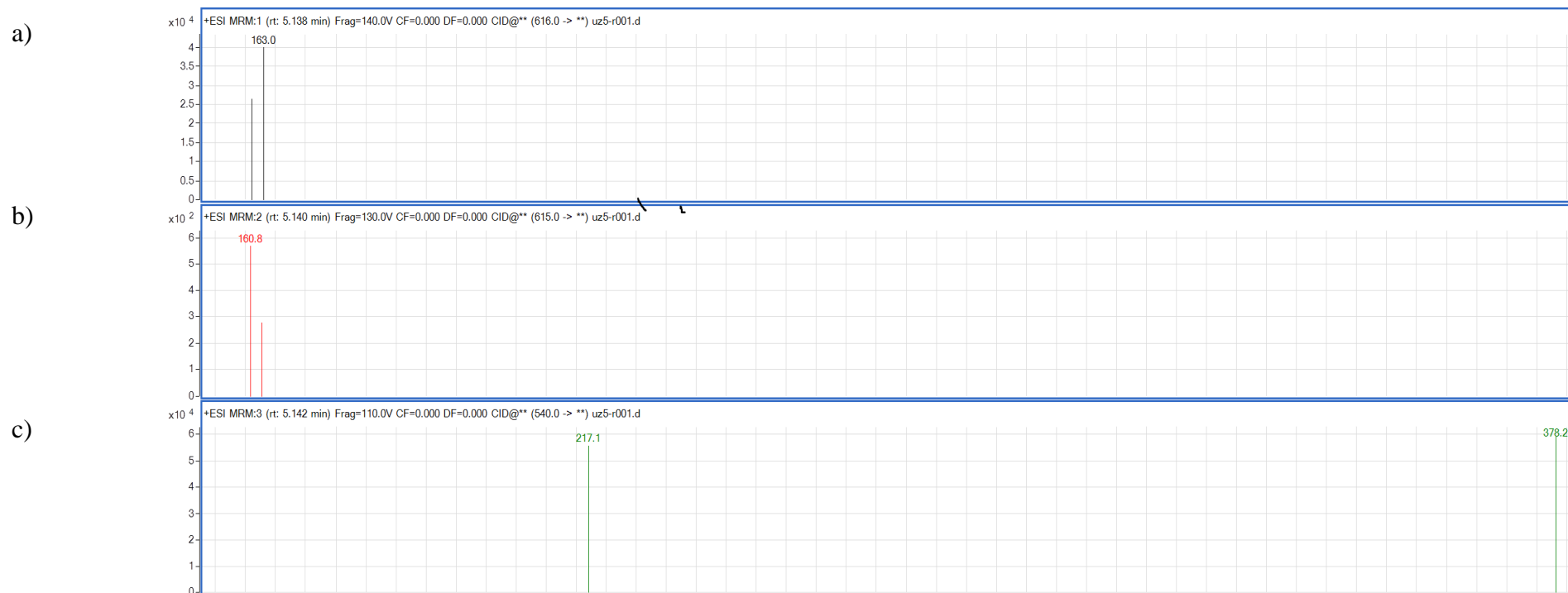
4.1. OPTIMIZIRANJE UVJETA MASENE SPEKTROMETRIJE I TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE

Molekulski ioni aminoglikozida određeni su izravnim injiciranjem otopine standarda u maseni detektor uz ionizaciju elektroraspršenjem, ESI (*engl. Electron Spray Ionisation*) te je dobiven MS spektar aminoglikozida (Slika 8-10.). Fragmentacija aminoglikozida inducirana je kolizijom antibiotika s atomima inertnog plina dušika. Kako bi se postigao najbolji prinos na molekulskom ionu u masenom spektru za svaki pojedini molekulski ion, ispitani su različiti naponi fragmentora. Nadalje, za svaki odabrani fragmentacijski ion ispitivane su različite energije sudara radi postizanja najboljeg prinosa na fragmentacijskom ionu. Optimalni napon fragmentora utvrđen je korištenjem različitih napona fragmentora u SIM eksperimentu (*engl. Selected Ion Monitoring*), dok su optimalne energije sudara za svaki pojedini ion određene mijenjanjem energija sudara u MRM eksperimentu (*engl. Multiple Reaction Monitoring*) te su rezultati za svaki analit prikazani u tablici 11. Snimanje ionskih tranzicija se vrši u 4 segmenta, a u svakom segmentu maseni spektrometar pretražuje određene masene tranzicije aminoglikozida (najzastupljenija tranzicija je podcrtana u tablici 11.). Kada bi imali jedan segment, tada bi spektrometar morao cijelo vrijeme provjeravati sve analite, te bi se smanjila osjetljivost, signali bi bili nespecifični. Stoga, treba rasporediti segmente prema poznatom retencijskom vremenu svakog analita, pri čemu svaki analit podijelimo u određeni segment i u tom segmentu maseni spektrometar provjerava samo prethodno definirani analit.

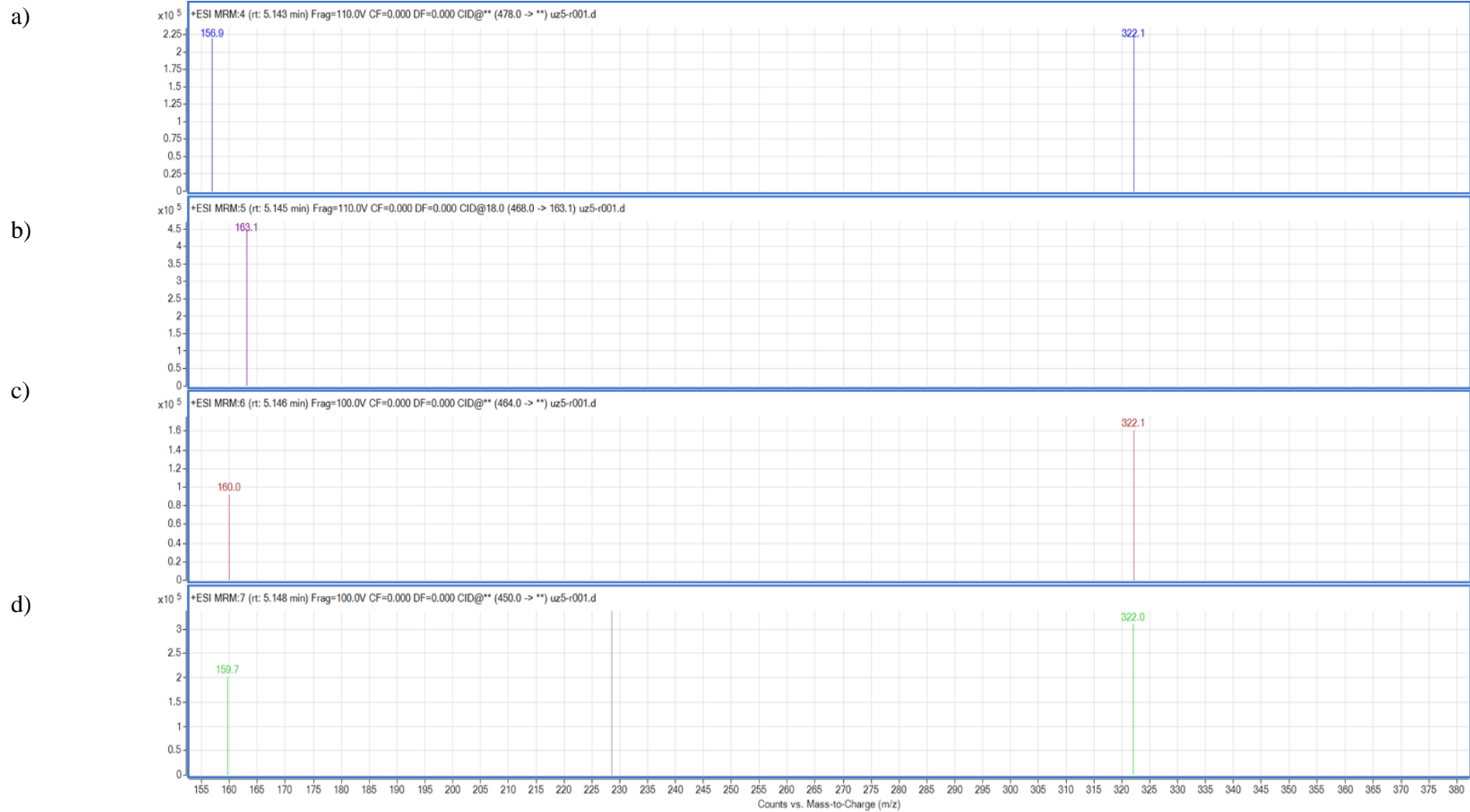
Tablica 11. Ionske tranzicije dobivene optimizacijom LC-MS/MS sustava za određivanje aminoglikozida

Tvar	Seg	ISTD	IONIZACIJA	RT (min)	Ion precursor	Ion product	Fragmentor (V)	Collision energy (V)	CAV
STR	2	HIG	+	3,91	582	<u>263,1</u>	190	32	1
						246		39	1
DSTR	2	HIG	+	3,84	584	<u>263</u>	140	29	1
						246,1		38	1
SPEC	2	HIG	+	2,88	351	<u>333</u>	100	16	1
						98		30	1
GEN C1	2	TOB	+	5,23	478	<u>322</u>	110	8	5
						157		16	1
GEN C1a	2	TOB	+	5,28	450	<u>322</u>	100	6	3
						160		19	1
GEN C2/2a	2	TOB	+	5,16	464	<u>322</u>	100	7	5
						160		19	4
APR	3	TOB	+	5,16	540	<u>217</u>	110	20	7
						378		11	3
PAR	3	TOB	+	5,11	616	<u>161</u>	140	30	1
						163		32	1
KAN	2	TOB	+	4,49	485	<u>163</u>	120	25	1
						324		12	1
NEO	3	TOB	+	6,22	615	<u>163</u>	130	25	1
						161		31	1
TOB	3	-	+	5,27	468	<u>163</u>	110	18	6
HIG	2	-	+	3,85	528	<u>177</u>	140	27	3

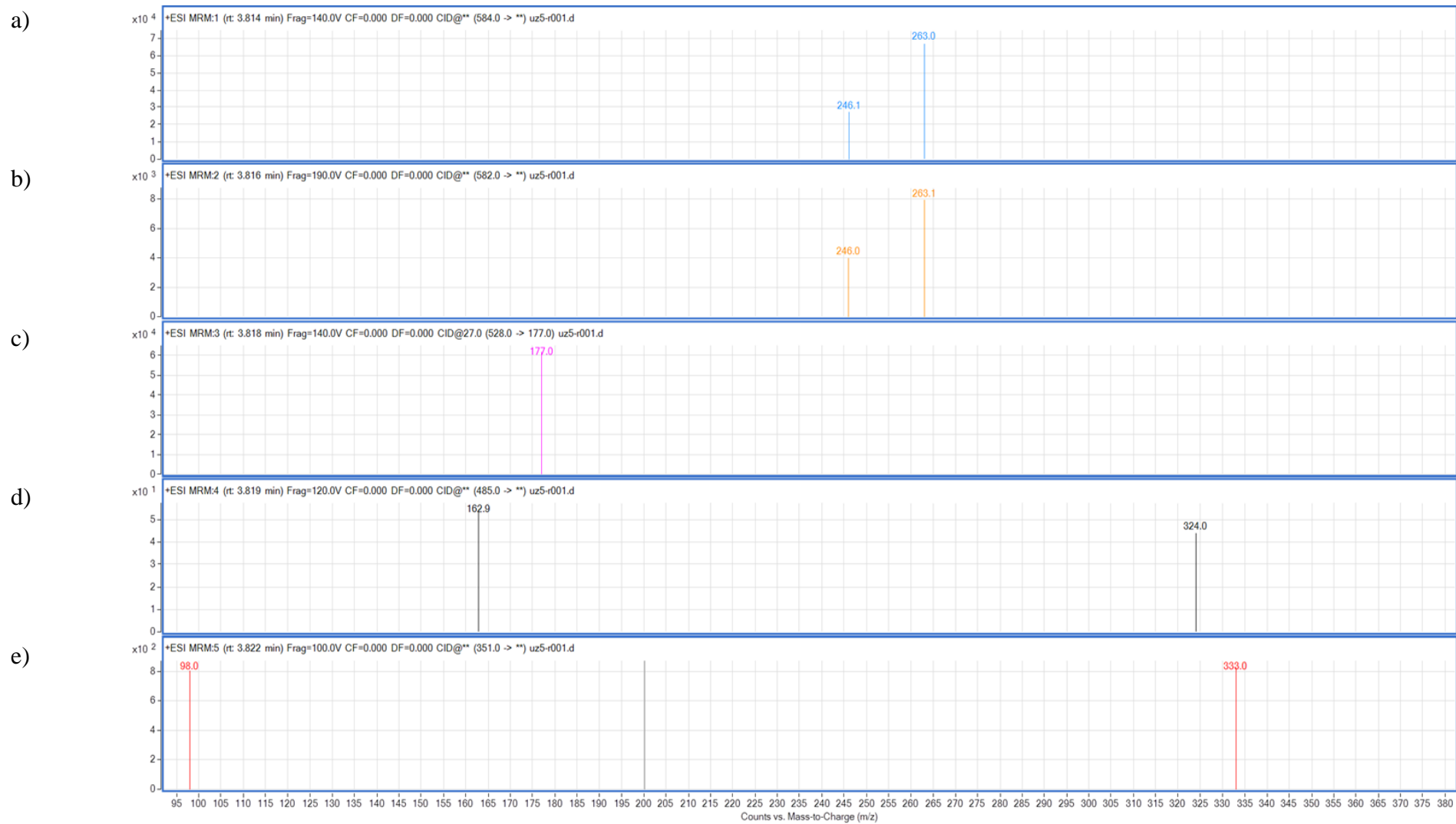
Optimalni naponi fragmentora i optimalne energije sudara za svaki pojedini ion ispitivanih analita prikazani su u tablici 11. Tako primjerice vidimo da je za molekularni ion STR (m/z 582) optimalni napon fragmentora 190 V, dok su optimalne energije sudara fragmentacijskih iona (m/z 263 i m/z 246) 32 V te 39 V. Fragmentacijski ioni predstavljaju karakteristične fragmente svakog pojedinog analita i svi se u pravilu mogu koristiti u daljnjim analizama, međutim, poželjno je gledati čim manji broj prijelaza kako bi se postigla veća osjetljivost instrumenta pri masenoj analizi.



Slika 8. Maseni spektri obogaćenog uzorka M5: a) Paromomicin b) Neomicin c) Apramicin



Slika 9. Maseni spektri obogaćenog uzorka M5: a) Gentamicin C1 b) Tobramicin c) Gentamicin C2/2a d) Gentamicin C1a

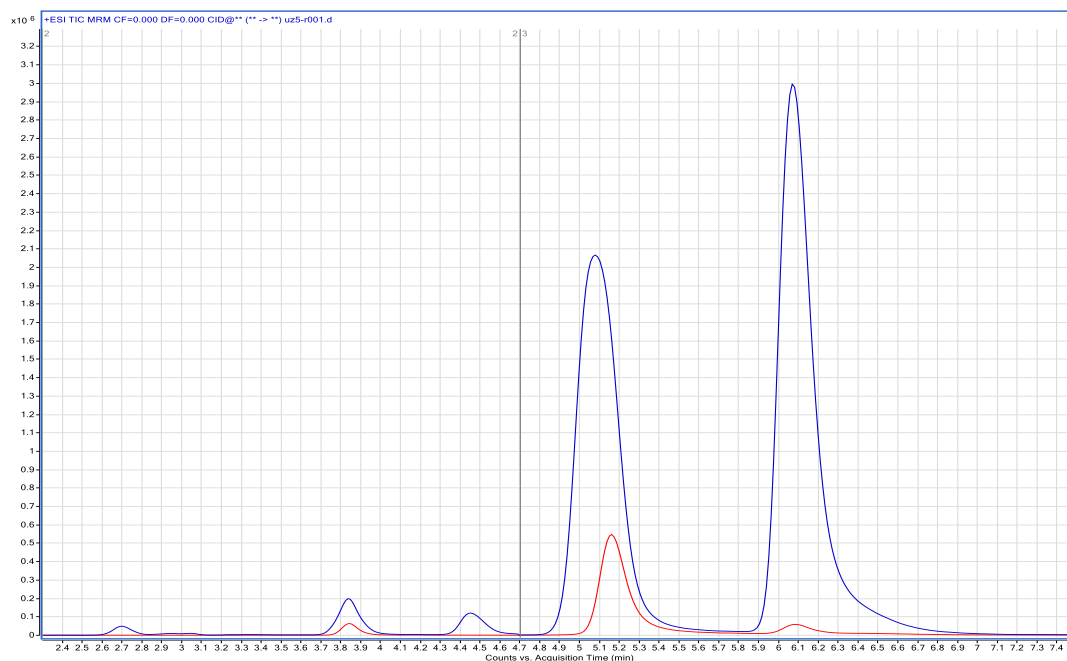


Slika 10. Maseni spektri obogaćenog uzorka M5: a) Dihidrostreptomycin b) Streptomycin c) Higromicin d) Kanamicin e) Spektinomicin hidrat

Kao što je vidljivo iz tablice 11. i slika 8-10., za svaki aminoglikozid se bilježe dva MRM-a (najzastupljenija tranzicija je podcrtana u tablici 11), pri čemu jedan služi za kvantifikaciju, a drugi koji je uglavnom manje osjetljivosti kao dodatna kontrola kvalitete kojom se dokazuje identitet analita. Možemo vidjeti da kod masenog spektra STR (Slika 10) fragmentacijski ion m/z 263,1 ima veću površinu u odnosu na fragmentacijski ion m/z 246, stoga smo ga odlučili koristiti kao identifikacijskog iona za sve daljnje eksperimente (kvantifikaciju).

4.2. USPOREDBA SLIJEPIH I OBOGAĆENIH UZORAKA

Karakteristika kromatograma je izdvajanje iona u obliku pika, a površina ispod pika proporcionalna je koncentraciji određenog spoja. Slijepa proba slijedi sve korake analize, ali u odsutnosti uzorka, te se koristi za detekciju i kompenzaciju sustavnih pogrešaka u analizi. U slijepoj probi kao i ispitivanim uzorcima je dodan interni standard. Interni standard predstavlja tvar koja nije prirodno prisutna u uzorku, ali čija su fizikalno-kemijska svojstva što je moguće sličnija svojstvima analita koji se treba identificirati (AG).

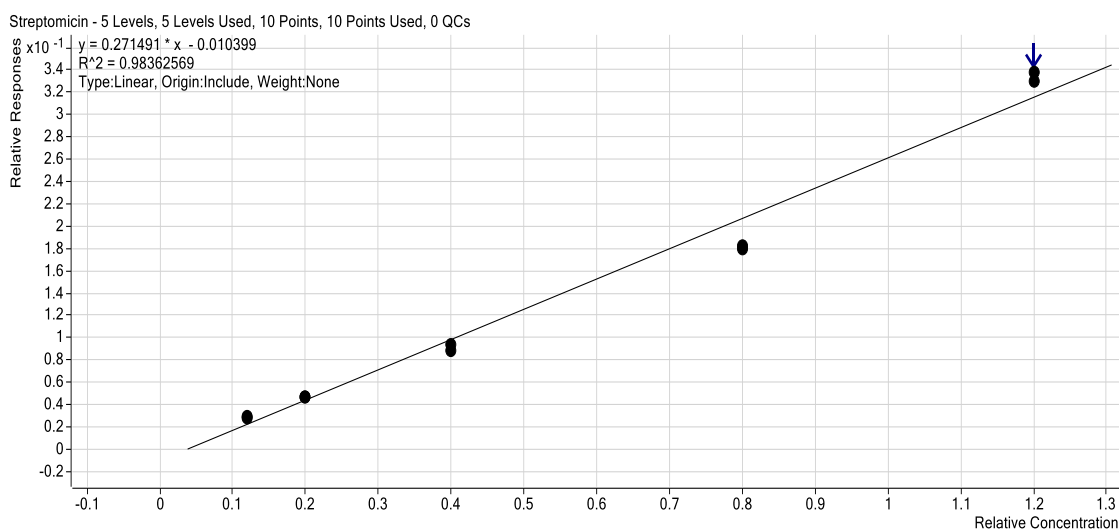


Slika 11. TIC kromatogrami obogaćenog uzorka (plavo) i slijepa probe (crveno, s internim standardom)

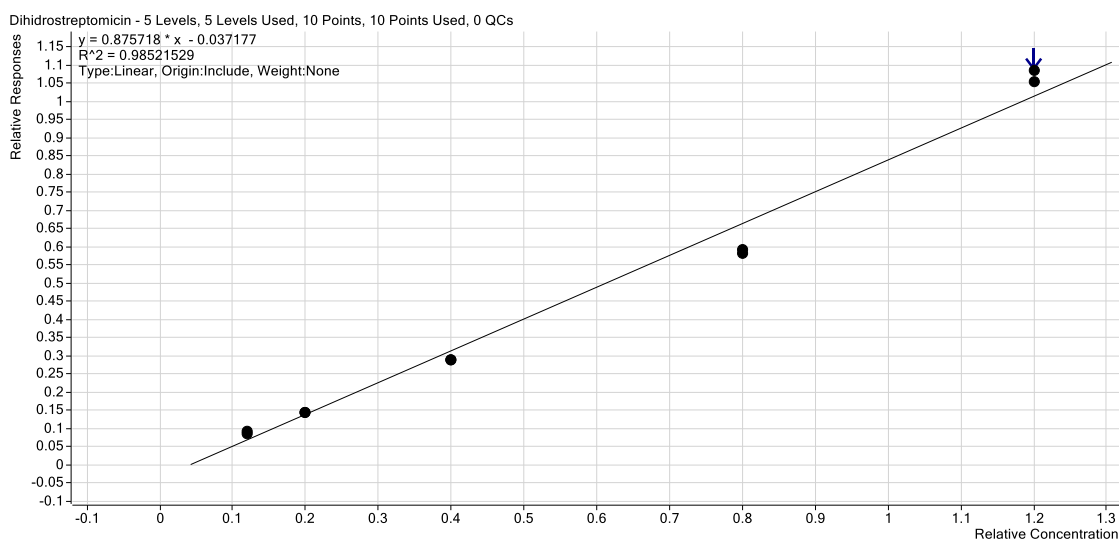
Kao što je i očekivano, pikovi analita (Slika 11) u obogaćenom uzorku su viši u odnosu na slijepu probu (veća koncentracija analita). U slijepim uzorcima nisu nađeni nikakvi ineterferirajući signali aminoglikozida, kao ni spojeva poteklih od matriksa, a koji bi mogli ometati snimanje analita pri ciljanim koncentracijama, odnosno koeluiranja na retenciji analita uzimajući u obzir interval $\pm 2,5$ %.

4.3. LINEARNOST NA MATRIKSU

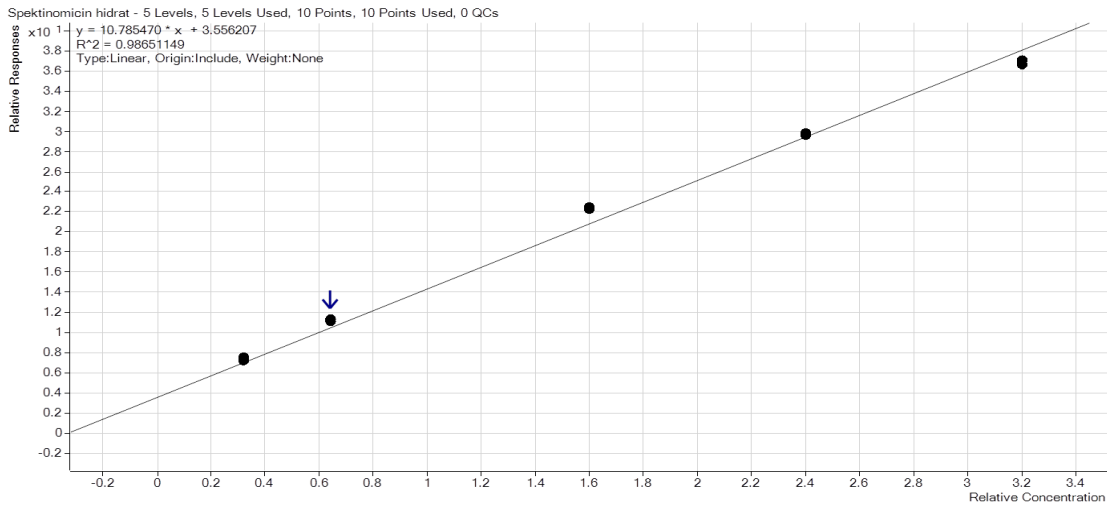
Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku, a definirana je upotrebom kalibracijskih krivulja. Kalibracijska krivulja, prema tome, predstavlja odnos analitičkog signala i koncentracije standarda. Ove krivulje su pripremljene u 5 različitih koncentracijskih razina, a koeficijent korelacije (r) je izračunat linearnom regresijom. Linearnost kalibracijske krivulje testirane u različitim područjima za svaki pojedini analit prikazane su na slikama 12-21, a vrijednosti linearnosti navedene su u tablici 12. Uzorci mlijeka su obogaćeni na različitim razinama kako bi se ustvrdila specifičnost metode prema matriksu uz prisutnost analita (Tablica 7). Tokom analize se pratio utjecaj matriksa na analizu pojedinih aminoglikozida.



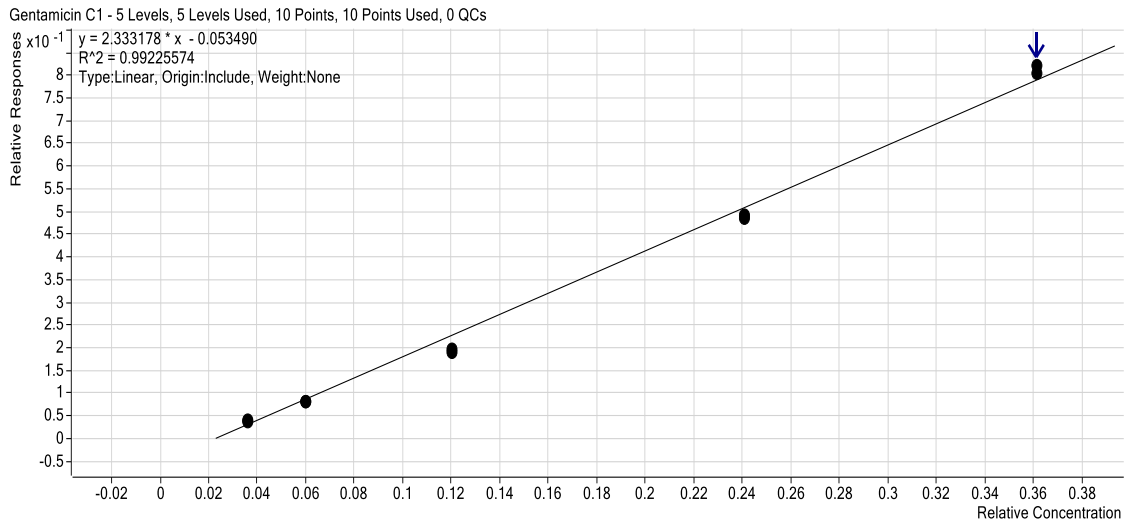
Slika 12. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za streptomycin



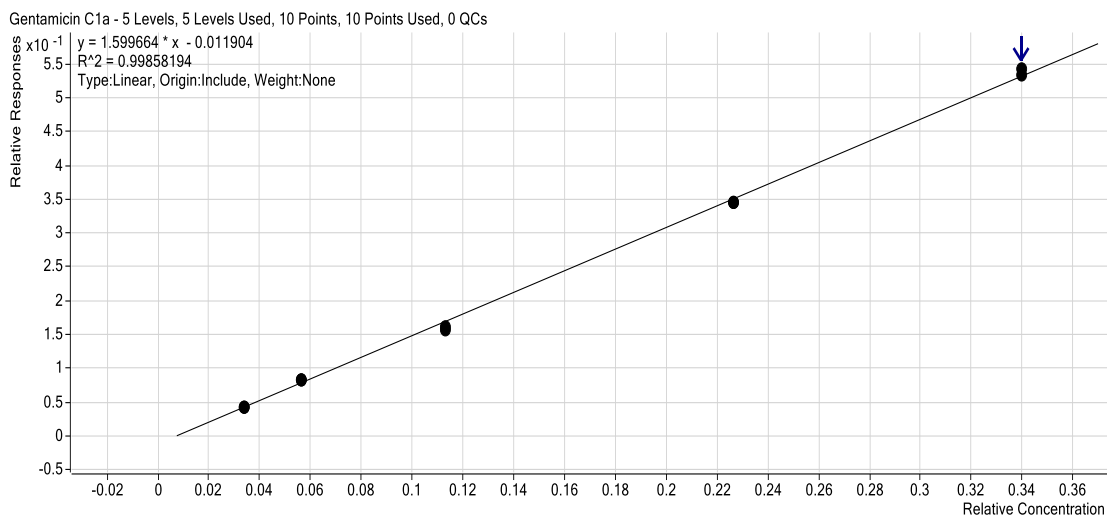
Slika 13. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za dihidrostreptomycin



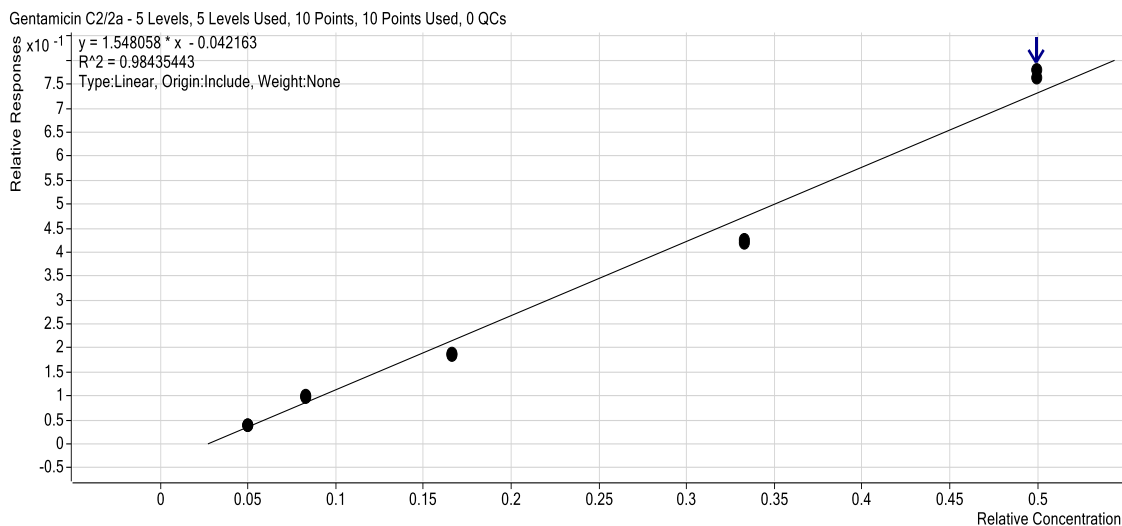
Slika 14. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za spektinomycin hidrat



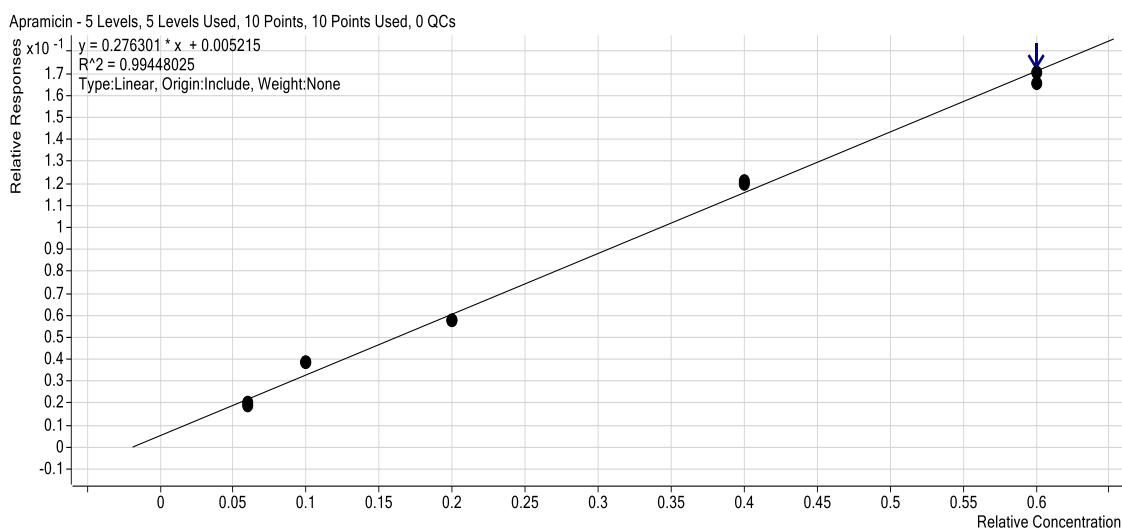
Slika 15. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za gentamicin C1



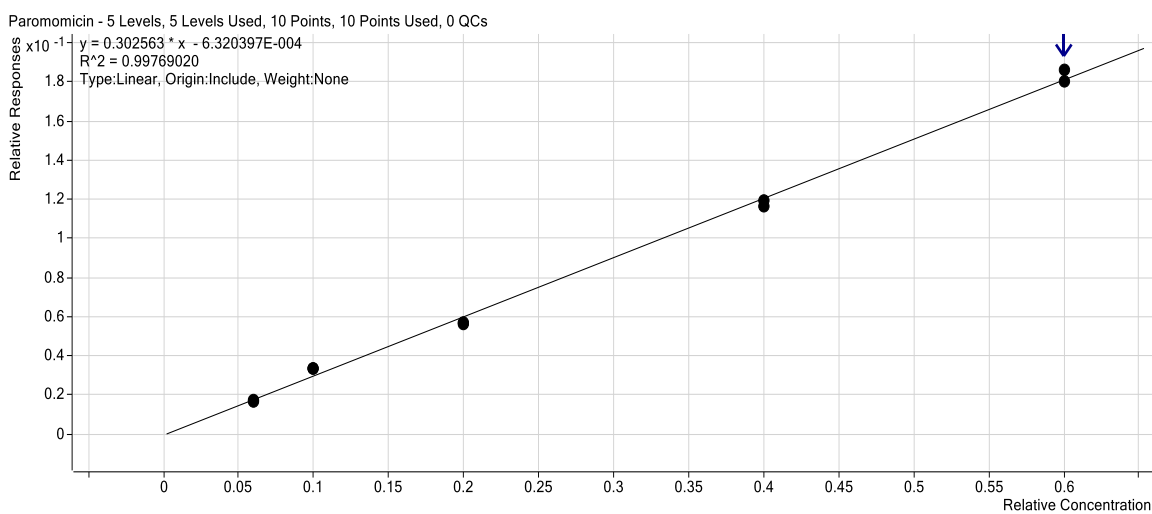
Slika 16. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za gentamicin C1a



Slika 17. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za gentamicin C2/2a

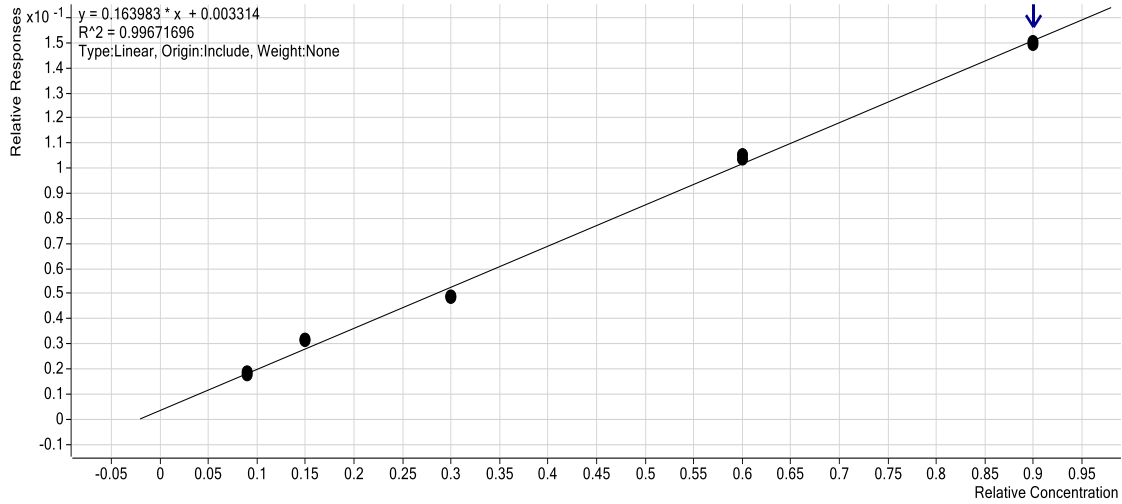


Slika 18. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za apramicin



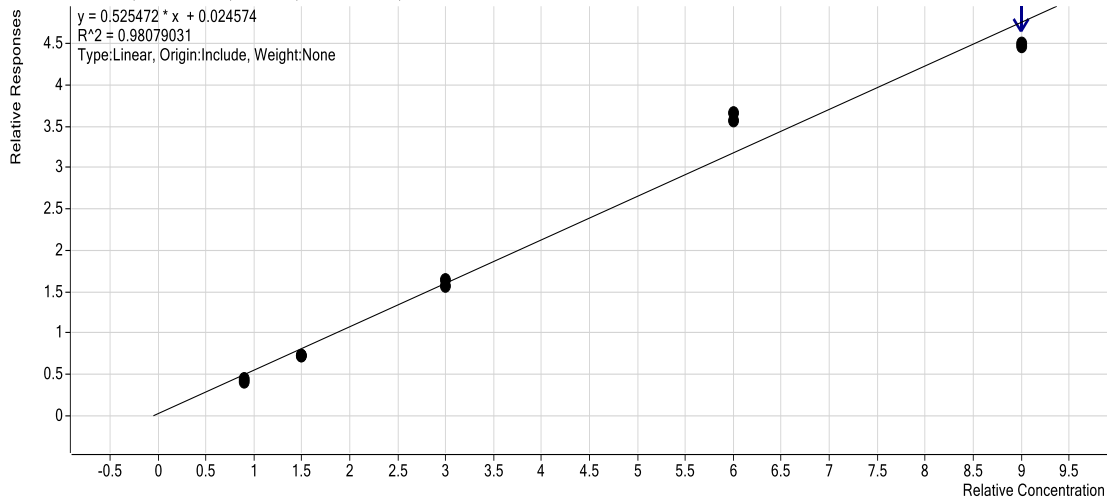
Slika 19. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za paromomicin

Kanamycin - 5 Levels, 5 Levels Used, 10 Points, 10 Points Used, 0 QCs



Slika 20. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za kanamicin

Neomicin - 5 Levels, 5 Levels Used, 10 Points, 10 Points Used, 0 QCs



Slika 21. Linearnost matriks kalibracijske krivulje za neomicin

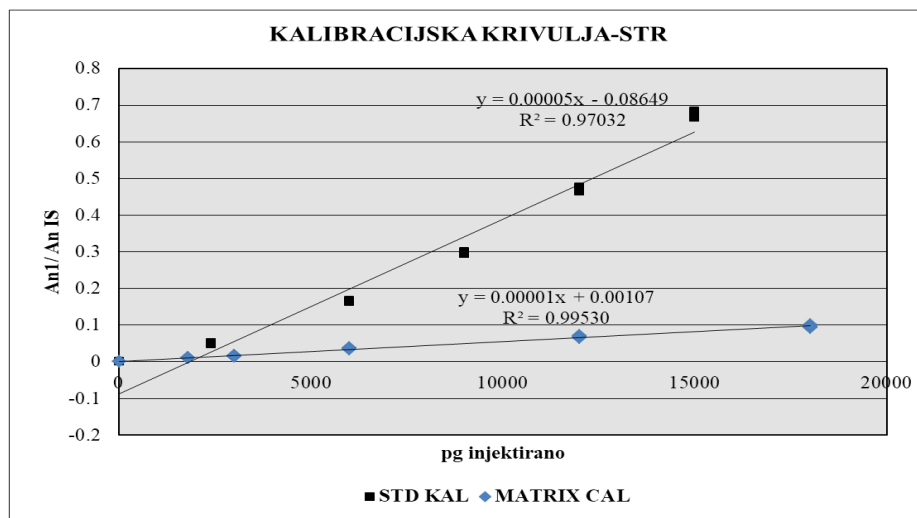
Tablica 12. Linearnost kalibracijskih krivulja za aminoglikozide opisana pomoću jednadžbi pravca za ispitivane aminoglikozide

Analit	Jednadžba pravca	Odsječak na y-osi (b)	Nagib pravce (a)	Koeficijent pravca regresije (R²)	Koeficijent korelacije (r)
SPEC	$y=10,7855x+3,5562$	+3,5562	10,7855	0,9865	0,9932
DSTR	$y=0,8757x-0,0372$	-0,0372	0,8757	0,9852	0,9926
STR	$y=0,2715x-0,0104$	-0,0104	0,2715	0,9836	0,9918
KAN	$y=0,1640x+0,0033$	+0,0033	0,1640	0,9967	0,9983
GENT C2/2a	$y=1,5481x-0,0422$	-0,0422	1,5481	0,9844	0,9922
GENT C1	$y=2,3332x-0,0535$	-0,0535	2,3332	0,9923	0,9961
APR	$y=0,2763x+0,0052$	+0,0052	0,2763	0,9945	0,9972
GENT C1a	$y=1,5997x-0,0119$	-0,0119	1,5997	0,9986	0,9993
PAR	$y=0,3026x-0,0006$	-0,0006	0,3026	0,9977	0,9989
NEO	$y=0,5255x+0,0246$	+0,0246	0,5255	0,9808	0,9904

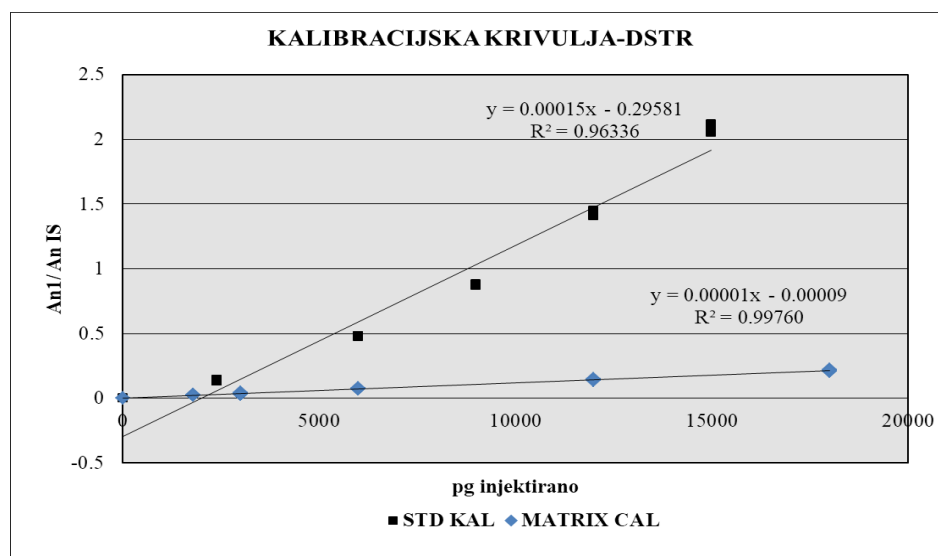
Dobiveni rezultati dokazuju kako je odnos dodane koncentracije aminoglikozida i odziva linearan u definiranom području metode. Ispitivana je i linearnost upotrebom standardnih otopina (Slike 22-31, iduće poglavlje). Ispitivani raspon linearnosti obuhvaća koncentraciju koja odgovara koncentraciji analita u obogaćenom uzorku. Nagib pravca (a) parametar je koji izravno ukazuje na osjetljivost metode. Odsječak pravca (b) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za svaki analit, kalibracijska krivulja je linearna sa koeficijenta pravca regresije (R²) većim od 0,9808 te koeficijentom korelacije (r) većim od 0,9904. Kvantifikacija pojedinog analita se temelji na proračunu primjenom programa *MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.07.00* koji na temelju dobivenih matriks kalibracijskih krivulja determinira koncentraciju pojedinih aminoglikozida u uzrocima mlijeka (Tablica 16.-25., prilog).

4.4. UTJECAJ PROCESA PROČIŠĆAVANJA NA ANALIT

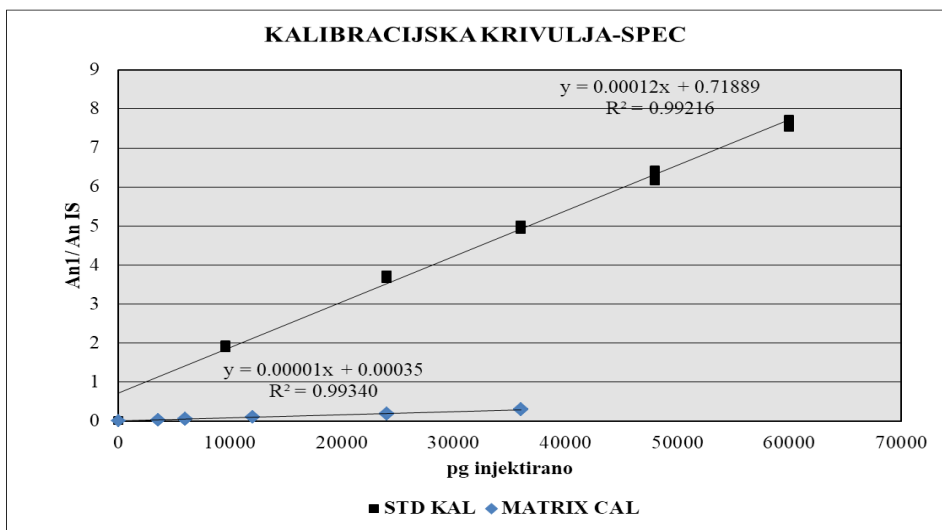
Praćenje utjecaja matriksa provodi se usporedbom nagiba standardne kalibracijske krivulje (STD KAL) i nagiba matriks kalibracijske krivulje (MATRIX KAL) te prikaz utjecaja matriksa na rezultate prikazani su grafički na slikama 22-31.



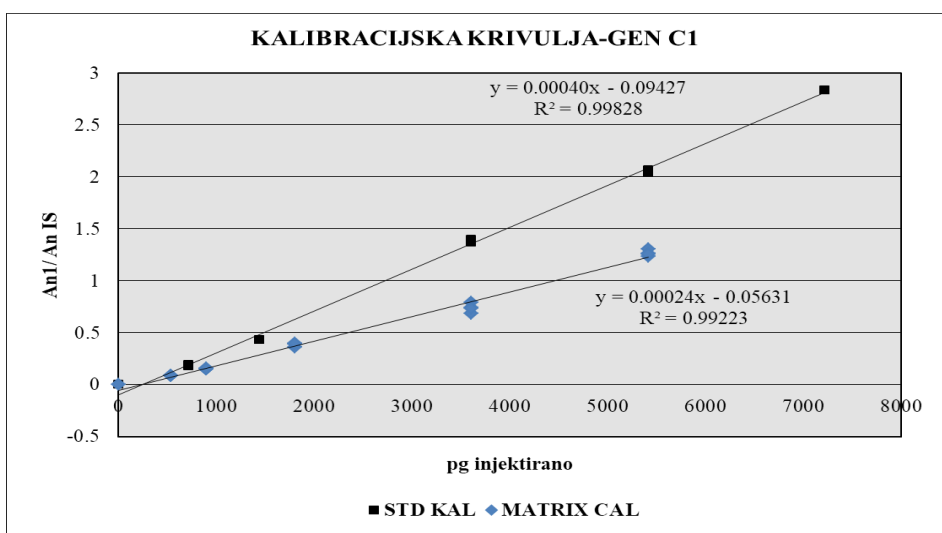
Slika 22. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za streptomycin



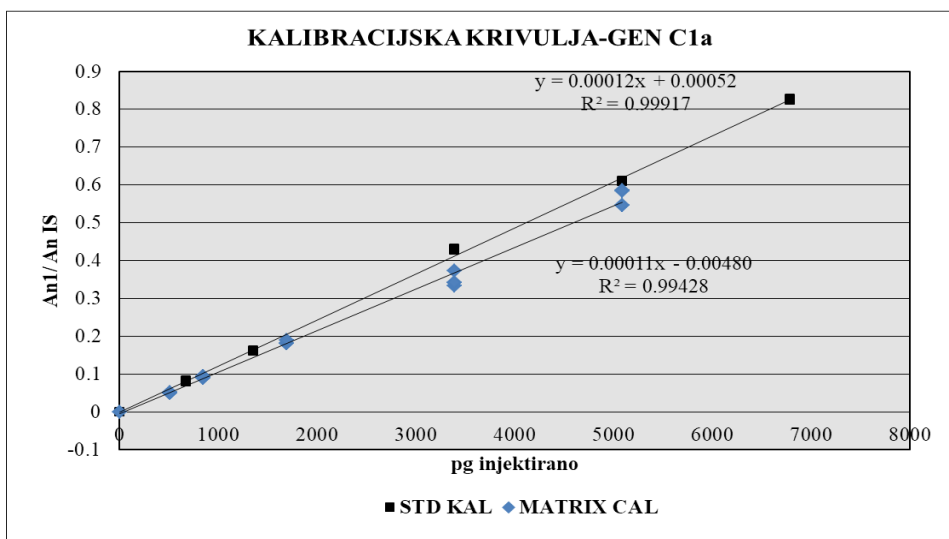
Slika 23. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za dihidrostreptomycin



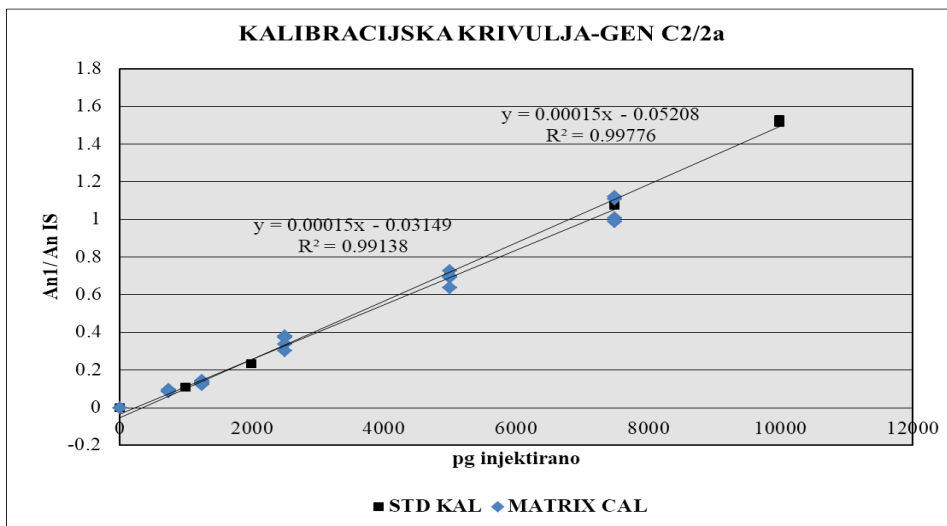
Slika 24. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za spektinomycin hidrat



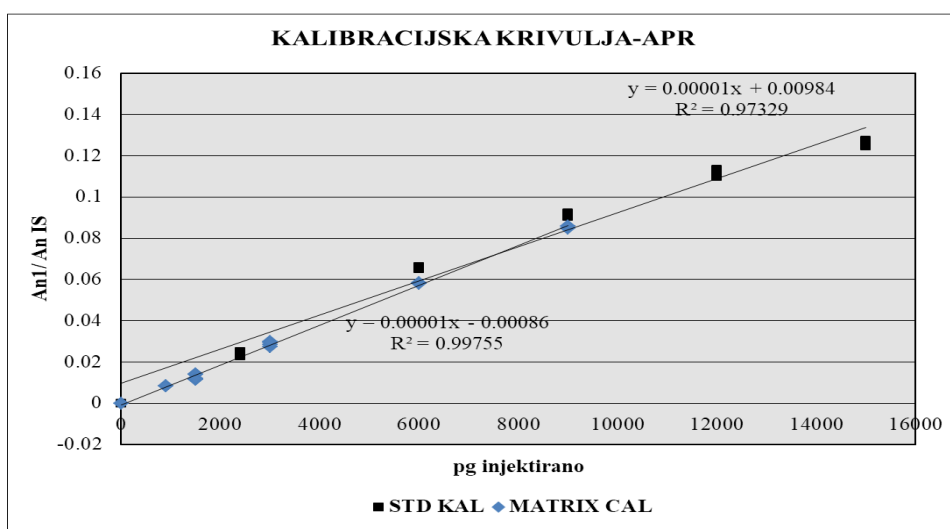
Slika 25. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za gentamicin C1



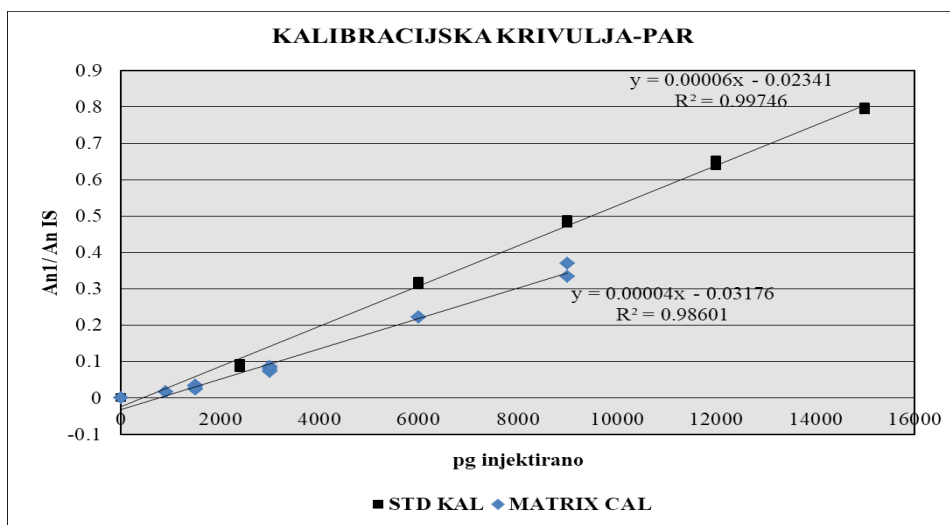
Slika 26. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za gentamicin C1a



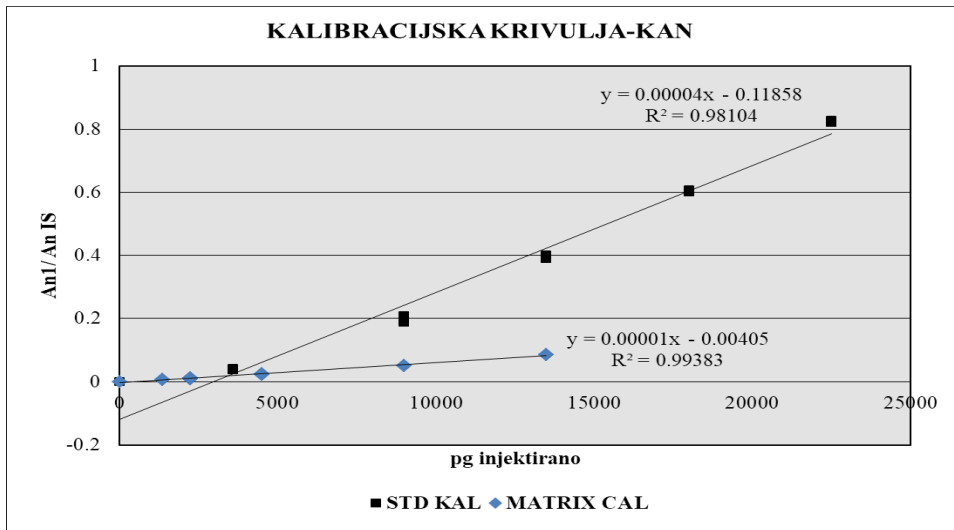
Slika 27. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za gentamicin C2/2a



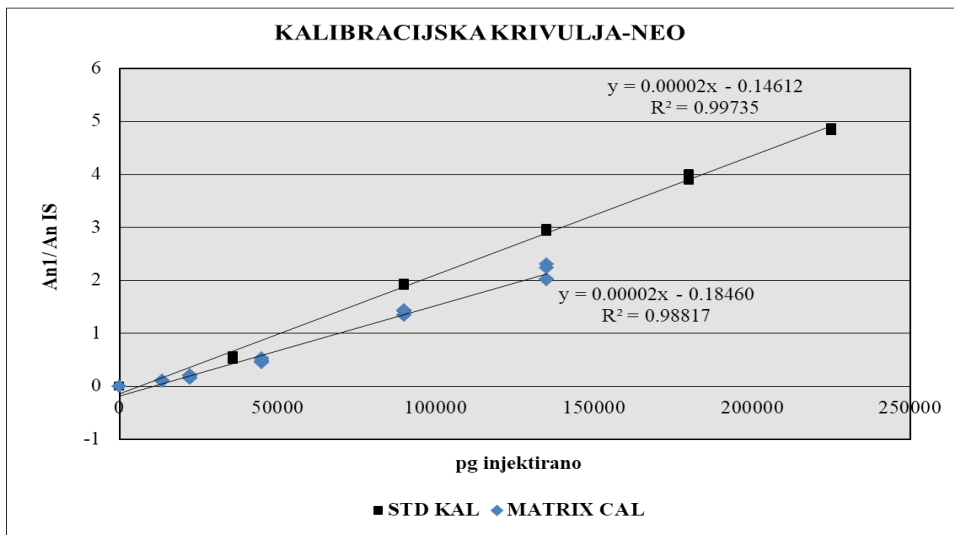
Slika 28. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za apramicin



Slika 29. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za paromomicin



Slika 30. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za kanamicin



Slika 31. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za neomicin

U svrhu procjene matriks efekta izračunat je omjer nagiba pravca na otapalu (s) i nagiba pravca na matriksu (m), (Tablica 13).

Tablica 13. Vrijednosti nagiba i omjera nagiba kalibracije na otapalu i matriksu za različite aminoglikozide: streptomycin (STR), dihidrostreptomycin (DSTR), spektinomycin hidrat (SPEC), gentamicin (GEN), apramicin (APR), parmomicin (PAR), kanamicin (KAN), neomicin (NEO)

ANALIT	Nagib (a)		s/m
	Kal. matriks (m)	Kal. otapalo (s)	
STR	0.00005	0.00001	5
DSTR	0.00015	0.00001	15
SPEC	0.00012	0.00001	12
GEN C1	0.00040	0.00024	1.666667
GEN C1a	0.00012	0.00011	1.090909
GEN C2/2a	0.00015	0.00015	1
APR	0.00001	0.00001	1
PAR	0.00006	0.00004	1.5
KAN	0.00004	0.00001	4
NEO	0.00002	0.00002	1

Eksperimenti utjecaja matriksa na analit pokazuju potrebu za korištenjem matriks kalibracijske krivulje jer proces ionizacije analita značajno ovisi o samom analitu te matriksu. Analizom DSTR uočeno je najveće odstupanje matriks krivulje i do 15 puta više nego kod standardne kalibracijske krivulje, i to supresijom analita. Najmanja odstupanja matriks krivulje u odnosu na standardnu uočena su za GEN C2/2a, APR i NEO, budući da je najmanji utjecaj matriksa na analit.

4.5. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA AMINOGLIKOZIDA

Proračun rezultata se izvodi pomoću računalnog programa instrumenta *MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.07.00*. Identifikacija aminoglikozida određena je na temelju vremena zadržavanja (RT, *engl. retention time*) sastojaka na kromatografskoj koloni i odgovarajućih podataka MS/MS analize. Za pozitivnu identifikaciju analita vrijeme zadržavanja analita na kromatogramu uzorka ne smije odstupati više od 5 % od vremena zadržavanja analita na kromatogramu standardnih otopina uz odgovarajući omjer dvaju tranzicija (RSD < 20 %). U tablicama 16-25 (prilog) prikazana su vremena zadržavanja ispitivanih AG-a te su vidljiva vrlo dobra preklapanja vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja standardnih otopina. Također su u tablicama 16-25 prikazane vrijednosti koncentracija ispitivanih analita. Koncentracije pojedinih aminoglikozida u uzorcima mlijeka su determinirane na temelju dobivenih matriks kalibracijskih krivulja primjenom navedenog računalnog programa. U prilogu se nalaze i kromatogrami fragmentacijskih iona za svaki ispitivani analit, u različitim uzorcima mlijeka, te kromatogram obogaćenog uzorka M5 (Slika 32-41). Kao što vidimo iz priloženih rezultata svi analizirani uzorci mlijeka su zdravstveno ispravni.

4.5.1. Određivanje granične koncentracije analita (CC α)

Metoda za određivanje granica kvantifikacije zahtjeva odgovarajuću preciznost pod uvjetima ponovljivosti i točnosti. U tablici 14 prikazane su MRL vrijednosti i parametri određeni u validaciji za svaki pojedinačni analit za matriks mlijeka. Ostali parametri bitni za validaciju nalaze se u prilogu (Tablica 26)

Tablica 14. MRL vrijednosti i parametri određenih u validaciji za mlijeko

PARAMETAR [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	MRL [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	CC α MRL [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	CC α C0 [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Mjerna nesigurnost [%]
ANALIT				
STR	200 kod svih preživača	219,5	49,5	5,1
DSTR	200 kod svih preživača	218,4	48,4	4,9
NEO	1500 kod svih vrsta	1591,8	316,7	3,3
PAR	Nije određen MRL		24,3	4,9
SPEC	200 kod svih vrsta	223,2	83,3	19,9
GEN C1		105,1	11,5	13,3
GENT C1a	Σ GENT 100 kod svih sisavaca	105,1	9,4	4,0
GENT C2/2a		105,1	16,6	9,4
APR	Nije određen MRL		21,4	3,4
KAN	150 kod svih vrsta	158,8	31,3	3,1

Granica kvantifikacije pojedinih aminoglikozida u mlijeku određena je kao najniži maseni udio traženog analita uz određenu točnost i preciznost. Usporedbom koncentracija pojedinih aminoglikozida u tablicama 16-25 s proračunatim vrijednostima CC α možemo zaključiti da su svi analizirani uzorci mlijeka negativni.

4.6. REZULTATI REDOVNE KONTROLE REZIDUALNIH OSTATAKA LIJEKOVA-EFSA

Odlukom Komisije 97/747/EZ propisano je da godišnji broj uzoraka treba biti jedan od 15.000 tona godišnje proizvedenog mlijeka, s najmanje 300 uzoraka. U 2014. godini sve države članice EU ispunile su minimalne zahtjeve za broj uzoraka (EFSA, 2016). Količina proizvodnje i broj uzoraka analiziranih u svakoj državi članici dani su u tablici 15.

Tablica 15. Količina proizvodnje i broj ciljanih uzoraka prikupljenih za mlijeko

Država	Količina proizvodnje [t]	Broj uzoraka (2014. g.)	Broj testiranih uzoraka /15000 t
Austrija	3 413 021	347	1,5
Belgija	3 222 409	861	4,0
Bugarska	442 508	298	10,1
Hrvatska	803 652	1 084	20,2
Cipar	153 913	3 604	351,2
Češka	2 740 700	312	1,7
Danska	4 500 000	928	3,1
Estonija	721 246	653	13,6
Finska	2 220 198	309	2,1
Francuska	24 702 693	1781	1,1
Njemačka	29 782 354	2 019	1,0
Grčka	1 817 129	632	5,2
Mađarska	814 813	313	5,8
Irska	5 515 614	1 194	3,2
Italija	10 597 572	2 323	3,3
Letonija	874 000	728	12,5
Litva	1 394 558	303	3,3
Luxemburg	287 000	300	15,7
Malta	43 566	277	95,4
Nizozemska	11 852 000	2 035	2,6
Poljska	12 237 315	2 608	3,2
Portugal	1 861 404	643	5,2
Rumunjska	1 518 927	330	3,3
Slovačka	1 281 915	543	6,4
Slovenija	529 000	325	9,2
Španjolska	6 890 100	1 137	2,5
Švedska	2 870 000	312	1,6
Ujedinjeno Kraljevstvo	13 359 204	3 334	3,7
Ukupno (EU 28)	146 446 811	29 533	3,0

Od ukupno 29 533 analiziranih uzoraka mlijeka, bilo je 35 uzoraka koji nisu u skladu s datim kriterijima (0,12%). Za B1 skupinu spojeva šest država članica prijavilo je ukupno 20 uzoraka koji nisu sukladni pravilniku o rezidualnim ostacima antibiotika u prehrambenim proizvodima. Usporedbom rezultata analize uzoraka mlijeka država članica EU s rezultatima ovog rada možemo vidjeti da je učestalost pojave rezidualnih ostataka aminoglikozida (skupina antibiotika) u uzorcima mlijeka izrazito mala. U ovom radu su koncentracije aminoglikozida bile ispod MRL vrijednosti objavljenih od strane Europske agencije za lijekove.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Optimizirana je LC-MS/MS metoda za određivanje spojeva (aminoglikozida) iz skupine antibiotika.
2. Utjecaj matriksa na metodu kompenzira se primjenom matriks kalibracijskih krivulja i dodatkom internog standarda.
3. Iz uzoraka mlijeka uspješno je determinirana prisutnost streptomicina, dihidrostreptomicina, spektinomycin hidrata, apramicina, kanamicina, neomicina, paromomicina, gentamicina C1, C1a i C2/2a praćenjem produkata višestrukih prijelaznih reakcija molekuskog iona (MRM).
4. Nakon što su provjereni validacijski parametri, metoda je primjenjena na 55 uzoraka mlijeka različitih prema podrijetlu i vrsti te je s obzirom na rezultate proračuna zaključeno da su ispitivani uzorci mlijeka zdravstveno valjani.
5. LC-MS/MS je potvrdna metoda za analizu rezidua antibiotika koja je točna, selektivna, osjetljiva, precizna te automatizirana i primjenjiva na širok raspon analita i vrsta uzoraka.

6. LITERATURA

Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., Emborg, H. D., Pedersen, K., Hendriksen, R. S., Bager, F. (2001) Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Ch.* **45**, 2054-2059.

Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., Collignon, P. (2008) Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti-Infe.* **6**, 733-750. doi: 10.1586/14787210.6.5.733

Acar, J.F., Moulin, G. (2006) Antimicrobial resistance at farm level. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* **25** (2), 775-792.

Ahmed, M. B. M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Vu, N. T., Kim, I. S., Kang, H. M., Lee, S. S., Ok, Y. S. (2015) Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce. *J. Agr. Food Chem.* **63**, 398-405. doi: 10.1021/jf5034637

Aminov R. I. (2010) A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **1**(134), 1-7. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134

Aminov, R. I. (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* **11**(12), 2970–2988. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01972

Arikan, O. A., Mulbry, W., Rice, C. (2009) Management of antibiotic residues from agricultural sources: use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *J. Hazard. Mater.* **164**, 483-489.

Baer, I., De la Calle, B., Taylor, P. (2010) 3 MCPD in food other than soy sauce or hydrolyzed vegetable protein (HVP). *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 443-456. doi: 10.1007/s00216-009-3177-y

Baynes, R. E., Dedonder, K., Kissel, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Tell, L., Gehring, R., Davis, J., Riviere, J. E. (2016) Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food Chem. Toxicol.* **88**, 112-122.

Butaye, P., Devriese, L. A., Haesebrouck, F. (2003) Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 175-188. doi: 10.1128/CMR.16.2.175-188.2003

Castanon, J. I. R. (2007) History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult. Sci.* **86**, 2466-2471. doi:10.3382/ps.2007-00249

Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin. Y. F., Yannarell, A. C., Maxwell, S., Aminov, R. I. (2009) Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J. Environ. Qual.* **38**(3), 1086-108.

Collignon, P., Powers, J. H., Chiller, T. M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F. M. (2009) World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin. Infect. Diseases.* **49**(1), 132-141. doi: 10.1086/599374

Cronly, M., Behan, P., Foley, B., Malone, E., Earley, S., Gallagher, M., Shearan, P., Regan, L. (2010) Development and validation of a rapid multi-class method for the confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* **153**, 929-938. doi: 10.1016/j.jpba.2010.06.027

Davies, J., Courvalin, P. (1977) Mechanisms of resistance to aminoglycosides. *Am. J. Med.* **62**, 25-29.

De Alwis, H., Heller, D. N. (2010) Multiclass, multiresidue method for the detection of antibiotic residues in distillers grains by liquid chromatography and ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3076-3084. doi: 10.1016/j.chroma.2010.02.081.x

De Brabander, H. F., Noppe, H., Verheyden, K., Bussche, J. V., Wille, K., Okerman, L., Vanhaecke, L., Reybroeck, W., Ooghe, S., Croubels, S. (2009) Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7964-7976.

Dean, J. R. (2009) Extraction Techniques in Analytical Sciences, WILEY 49-53.

Diez, C., Guillarme, D., Spörri, A. S., Cognard, E., Ortelli, 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.

EC (1996) COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official J. EU* **125**(10).

EC (2003) REGULATION No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official J. EU* **268**(29).

ECDC/EFSA/EMA (2015) First joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals (JIACRA). *EFSA Journal* **13**(1). <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.4006/epdf>>. Pristupljeno 7. kolovoza 2017.

EMA/ESVAC (2016) Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 EU/EEA countries in 2014. <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2016/10/WC500214217.pdf>, Pristupljeno 27. srpnja 2017.

ECDC/EMEA (2009) The Bacterial Challenge: Time to React. <www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_time_to_React.pdf>, Pristupljeno 10.8.2017.

EC (2002) European union, commission decision 2002/657/EC implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Official J. EU* **239**(66). <<http://europe.eu.int>>, Pristupljeno 17. kolovoza 2017.

EC (2010) Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official J. EU* **15**(1). <https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/mrl/mrl_20101212_consol.pdf>, Pristupljeno 5. kolovoza 2017.

EFSA (2011) Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Journal* **158**, 1-70. < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2011.EN-158/epdf>>. Pristupljeno 9. kolovoza 2017.

EFSA (2015) Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* **13(2)**. < <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-zoonotic-bacteria-humans-animals-food-EU-summary-report-2013.pdf>>.

Pristupljeno 15. kolovoza 2017.

EFSA (2016) Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-923/epdf>>, Pristupljeno 23. studenog 2017.

EMA (2014) European surveillance of veterinary antimicrobial consumption, sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/10/WC500175671.pdf >, Pristupljeno 21. srpnja 2017.

Fisher, W. J., Schilter, B., Tritscher, A. M., Stadler, R. H. (2011) Environmental contaminants. U: Encyclopedia of dairy science, 2.izd. [online] (Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., ured.), Elsevier, London/New York, str. 898-905.

Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T. (2003) Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Ch.* **47(8)**, 2565-2571. doi: 10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003

Garneau-Tsodikova, S., Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med. Chem. Comm.* **7(1)**, 11-27. doi:10.1039/C5MD00344J

Gilbert, D. N. (1995) Aminoglycosides. U: Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., ured.), Churchill Livingstone, New York, str. 279–306.

Grebe, S. K. G., Singh, R. J. (2011) LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here?. *Clin. Biochem. Rev.* **32**, 5-31.

Hermann, T., Tor, Y. (2005) RNA as a target for smallmolecule therapeutics. *Expert Opin. Ther. Patents* **15**, 49 – 62.

Hoffman, L. R., Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., Miller, S. I. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**(25), 1171 – 1175.

Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007) Mass spectrometry, Principles and Applications, 3. izd., WILEY, Brussel

Idowu, F., Junaid, K., Paul, A., Gabriel, O., Paul, A., Sati, N., Maryam, M., Jarlath, U. (2010) Antimicrobial screening of commercial eggs and determination of tetracycline residue using two microbiological methods. *Int. J. Poult. Sci.* **9**(10), 959-962.

Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Smith, K., O'Bryan, T. T., Tatini, S. (2005) Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J. Infect. Dis.* **191**, 1040-1049.

Keen, P.L., Patrick, D. M. (2013) Tracking change: A look at the ecological footprint of antibiotics and antimicrobial resistance. *Antibiotics* [online] **2**(2), 191-205, <<http://www.mdpi.com/2079-6382/2/2/191>>. Pristupljeno 14. kolovoza 2017.

Kellermayer, R. (2006) Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations. *Eur. J. Med. Genet.* **49**, 445 – 450. doi: 10.1016/j.ejmg.2006.04.003

Kwon, S. I., Owens, G., Ok, Y. S., Lee, D. B., Jeon, W. T., Kim, J. G., Kim, K. R. (2011) Applicability of the Charm II system for monitoring antibiotic residues in manure-based composts. *Waste manage.* **31**(1), 39-44.

Le Bizec, B., Pinel, G., Antinag, J. P. (2009) Options of veterinary drug analysis using mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 1021-1036. doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.007

LeBlanc, J. S., Osawa, T., Dubuc, J. (2001) Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology* **76**(9), 1610-1618.

Levy, S. B. (2002) The antibiotic paradox. How the misuse of antibiotics destroys their curative powers, 2. izd., Perseus Publishing, Cambridge, str. 155-156.

Masiá, A., Suarez-Varela, M. M., Llopis-Gonzalez, A., Picó, Y. (2016) Determination of pesticides and veterinary drug residues determination in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal. Chim. Acta* **936**, 40-61. doi: 10.1016/j.aca.2016.07.023

Mayer, K. H. (1986) Review of epidemic aminoglycoside resistance worldwide. *Am. J. Med.* **80**(6), 56–64.

McGlinchey, T. (2010) The determination of Veterinary Antibiotics in live animals and animal products. PhD Thesis. Dublin City University

Meyer, A. L. (2005) Prospects and challenges of developing new agents for tough Gram-negatives. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 490 – 494. doi: 10.1016/j.coph.2005.04.012

Mokh, S., El Hawari, K., Nassar, R., Budzinski, H., Al Iskandarani, M. (2015) Optimization of a Solid Phase Extraction Method for the Determination of 12 Aminoglycosides in Water Samples Using LC–ESI–MS/MS. *Chromatographia* **78**, 631-640.

Mortier, L. (2005) Detection of anticoccidials in eggs, poultry tissues and feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, PhD Thesis.

Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M. Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897 – 902.

Ogle, J. M., Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 129 – 177.

Ostermanna, A., Siemensa, J., Welpa, G., Xueb, Q., Linb, X., Liuc, X., et al. (2013). Leaching of veterinary antibiotics in calcareous Chinese croplands. *Chemosphere* **91**(7), 928-934.

Overdeest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., Van der Zwaluw, K., Huijsdens, X., Kluytmans, J. (2011) Extended spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans. *Emerg. Infect. Dis.* **17**(7), 1216-22. doi: 10.3201/eid1707.110209

Pereira, R. V., Siler, J. D., Ng, J. C., Davis, M. A., Grohn, Y. T., Warnick, L. D. (2014) Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves. *J. Dairy Sci.* **97**(12), 7644-7654. doi:10.3168/jds.2014-8521

Phillips, I., King, A., Shannon, K. (1986) Prevalence and mechanisms of aminoglycoside resistance. *Am. J. Med.* **80**(6), 48–55.

Pikkemaat, M.G., Yassin, H., Van der Fels-Klerx, H. J., Berendsen, B. J. A. (2016) Antibiotic Residues and Resistance in the Environment [online]. RIKILT Wageningen University & Research centre. Dostupno na: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/510717> [9. Kolovoza 2017.]

Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 20 – 51. doi:10.1093/jac/dki171

Potron, A., Poirel, L., Nordmann, P. (2015) Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **45**(6), 568-585.

Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (2011) *Narodne novine* **21**, Zagreb.

Ramirez, M. S., Tolmasky, M. E. (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* **13**(6), 151-171. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003

Rice, D. A., McMurray, C. H., Davidson, J. F. (1983) Ketosis in dairy cows caused by low levels of lincomycin in concentrate feed. *Vet. Rec.* **113**, 495-496.

Rice, L. B. (2006) Unmet medical needs in antibacterial therapy. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 991 – 995. doi: 10.1016/j.bcp.2005.09.018

Ristuccia, A. M., Cunha, B. A. (1982) The aminoglycosides. *Med. Clin. N. Am.* **66**, 303–12.

Robert, C., Gillard, N., Brasseur, P. Y., Ralet, N., Dubois, M., & Delahaut, P. (2015) Rapid multiresidue and multi-class screening for antibiotics and benzimidazoles in feed by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control* **50**, 509-515.

Ronquillo, M. G., Hernandez, J. C. A. (2017) Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control* **72**, 255-267.

Shandrick, S., Zhao, Q., Han, Q., Ayida, B. K., Takahashi, M., Winters, G. C., Simonsen, K. B., Vourloumis, D., Hermann, T. (2004) Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site. *Angew. Chem. Int. Edit.* **43**, 3177 – 3182.

Sigma-Aldrich, <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>. Pristupljeno 2. kolovoza 2017.

Spelman, D. W., McDonald, M., Spicer, W. J. (1989) Aminoglycoside antibiotic agents: A review. *Med. J. Australia* **151**, 346–349.

Stachniuk, A. i Fornal E. (2016) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal. Methods* **9**, 1654–1665. doi: 10.1007 / s12161-015-0342-0

Stolker A. A. M., Zuidema T., Nielen M. W. F. (2007) Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **26**, 967-979.

Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F., Arrow, A. S. (1987) Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* **51**(4), 439-547.

Tham, J., Walder, M., Melander, E., Odenholt, I. (2012) Prevalence of extended-spectrum betalactamase- producing bacteria in food. *Infect. Drug Resist.* **5**, 143-7.

Vakulenko, S. B., Mobashery, S. (2003) Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 430 – 450. doi: 10.1128/CMR.16.3.430–450.2003.x

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., Laxminarayan, R. (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **112**(18), 5649-5654.

Van den Bogaard, A. E., Stobberingh, E. E. (1999) Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* **58**, 589-607.

Van Landuyt, H. W., Boelaert, J., Glibert, B., Gordts, B., Verbruggen, A. (1986) Surveillance of aminoglycoside resistance. *Am. J. Med.* **80**, 76–81.

Vandenberge, V. (2012) Transfer of cross-contamination levels of coccidiostats, antibiotics and anthelmintics from feed to poultry matrices, PhD Thesis. Ghent University.

Vicens, Q., Westhof, E. (2003) Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of x-ray crystal structures. *Biopolymers* **70**, 42-57.

Wachino, J. I., Arakawa, Y. (2012) Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist. Updat.* **15**, 133-148. doi: 10.1016/j.drup.2012.05.001

WHO (2014) Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. <<http://www.who.int/drugresistance>> Pristupljeno 30. kolovoza 2017.

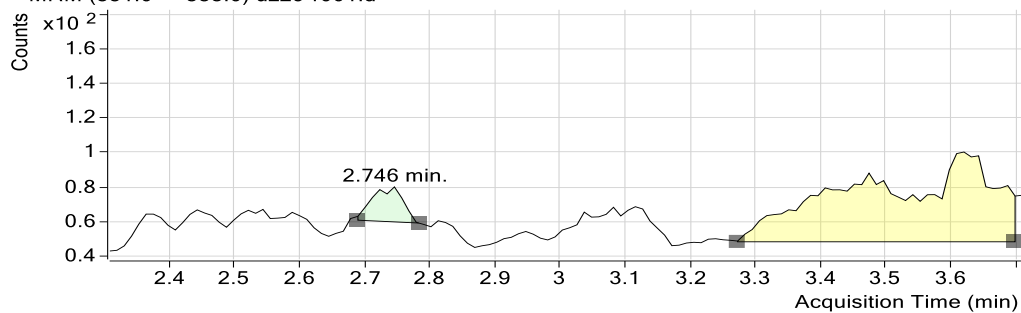
Young, L. S., Hindler, J. (1986) Aminoglycoside resistance: A worldwide perspective. *Am. J. Med.* **80**, 15–21.

Zingman, L. V., Park, S., Olson, T. M., Alekseev, A. E., Terzic, A. (2007) Aminoglycoside-induced translational readthrough in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**, 99 – 103. doi: 10.1007/s10337-015-2877-z

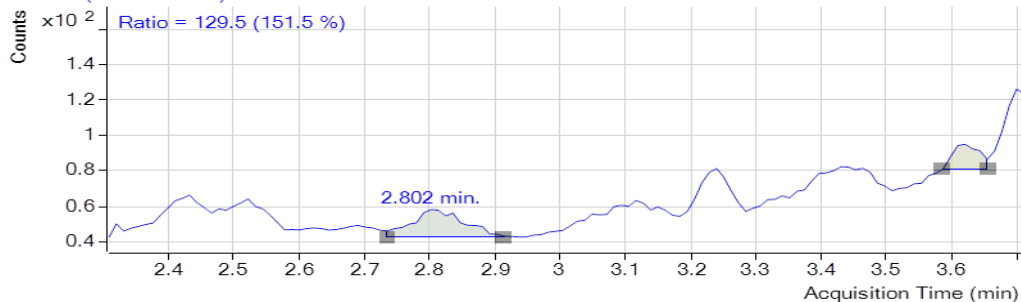
7. PRILOZI

7.1. KROMATOGRAMI I REZULTATI ANALIZE PROGRAMA *MassHunter* *Quantitative analysis for QQQ version B.07.00*

+ MRM (351.0 -> 333.0) uz29-r001.d

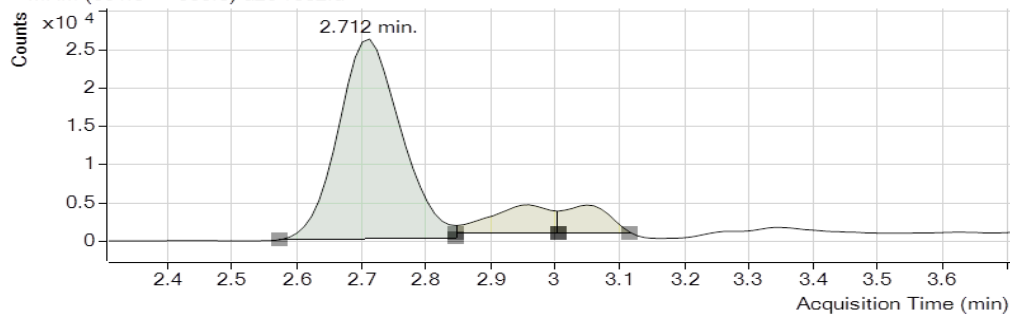


+ MRM (351.0 -> 98.0) uz29-r001.d

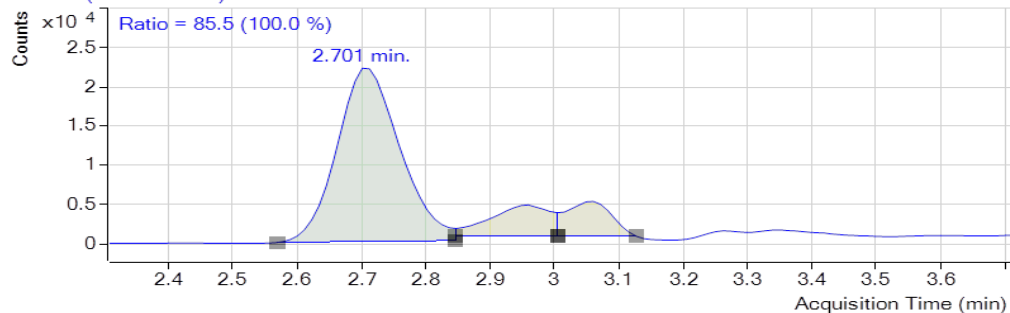


a) uzorak 1242

+ MRM (351.0 -> 333.0) uz5-r002.d

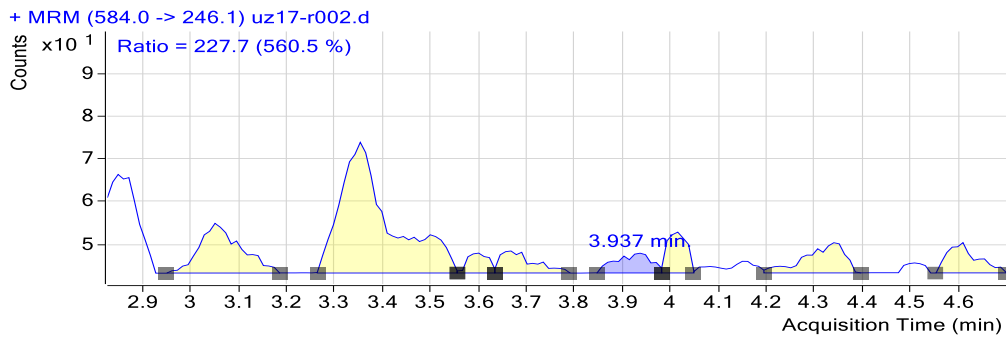
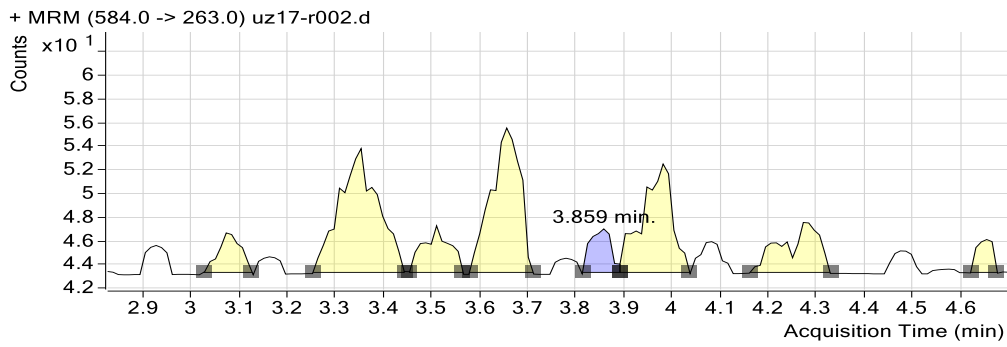


+ MRM (351.0 -> 98.0) uz5-r002.d

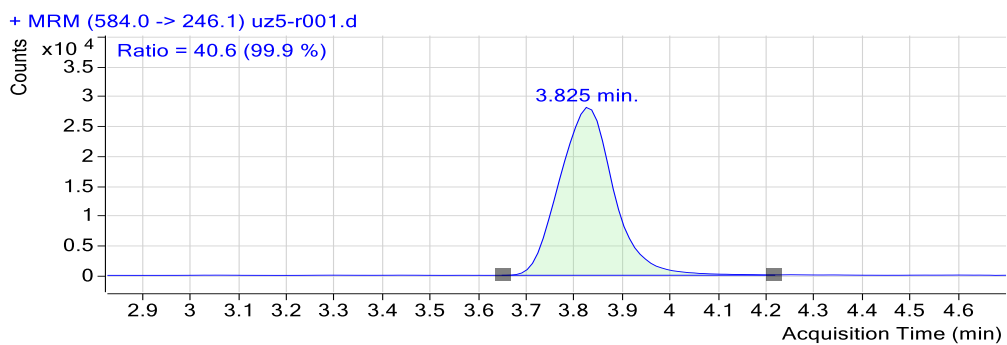
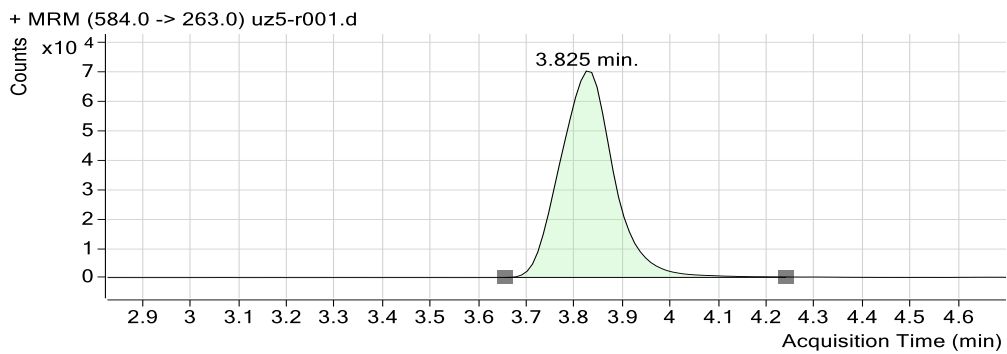


b) obogaćenog uzorka M5

Slika 32. Kromatogrami fragmentacijskih iona za SPEC: a) uzorka 1242, b) obogaćenog uzorka M5

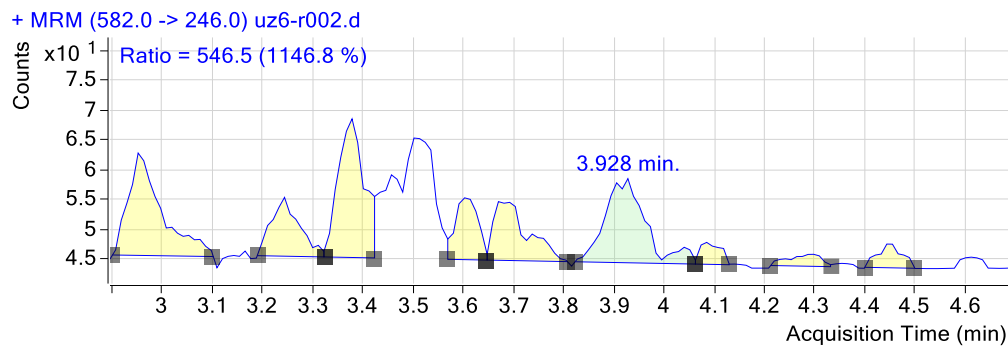
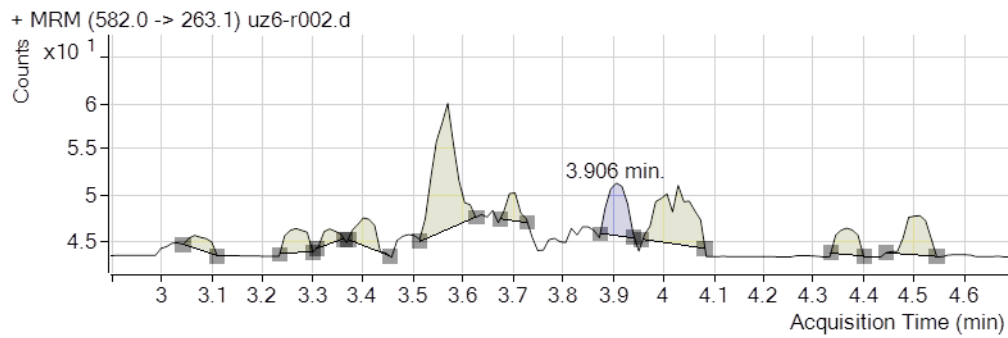


a) uzorak 1144

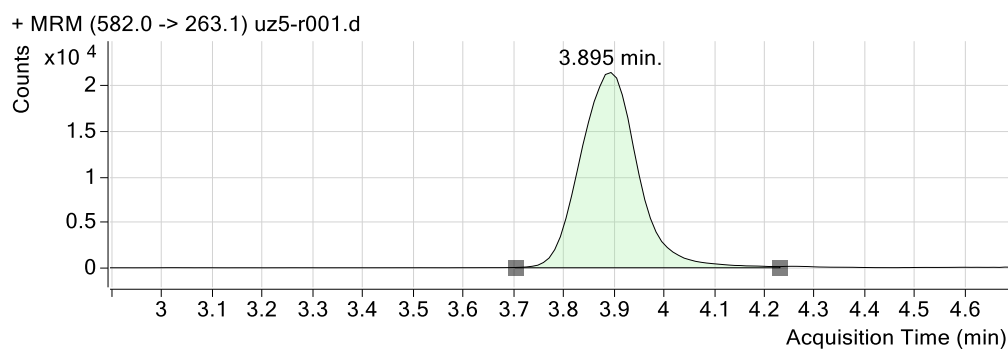
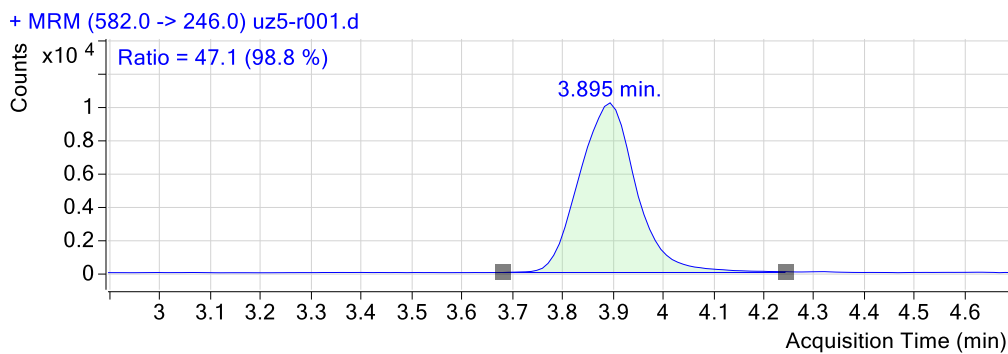


b) obogaćenog uzorka M5

Slika 33. Kromatogrami fragmentacijskih iona za DSTR: a) uzorka 1144, b) obogaćenog uzorka M5

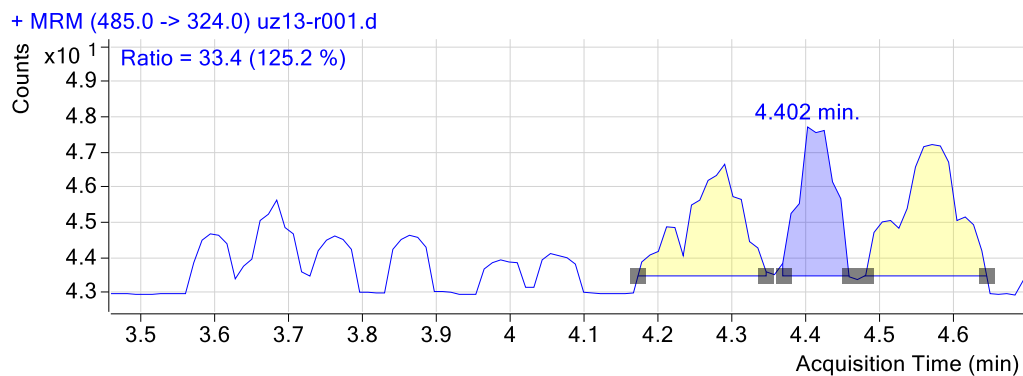
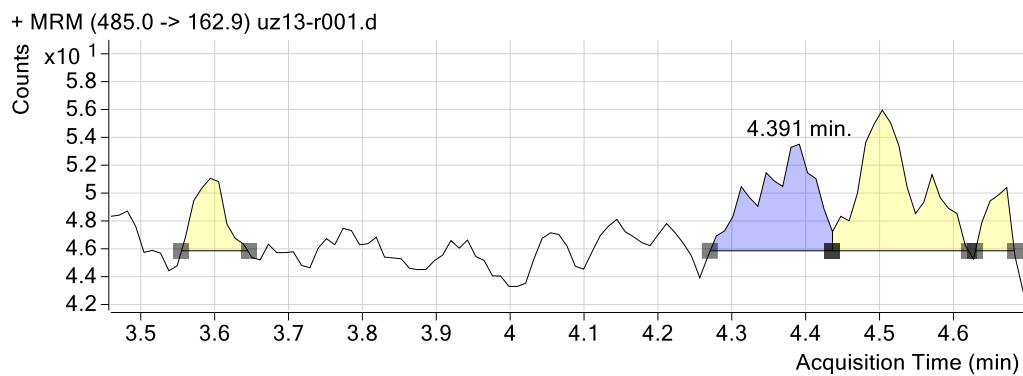


a) uzorak slijepe probe mlijeka

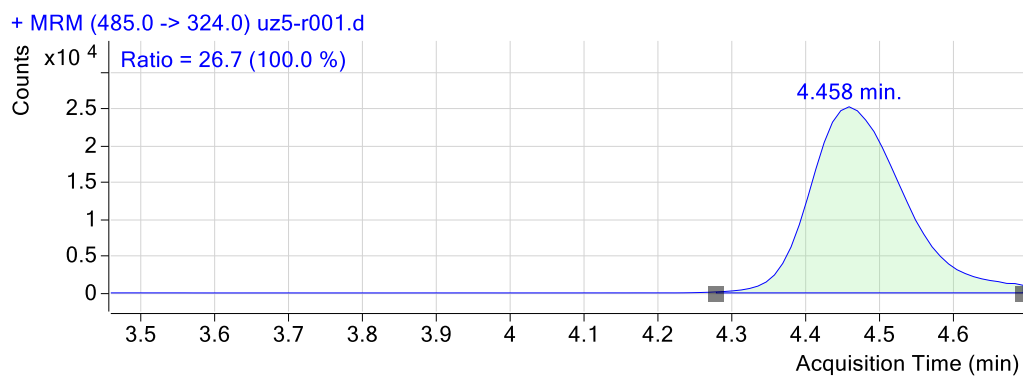
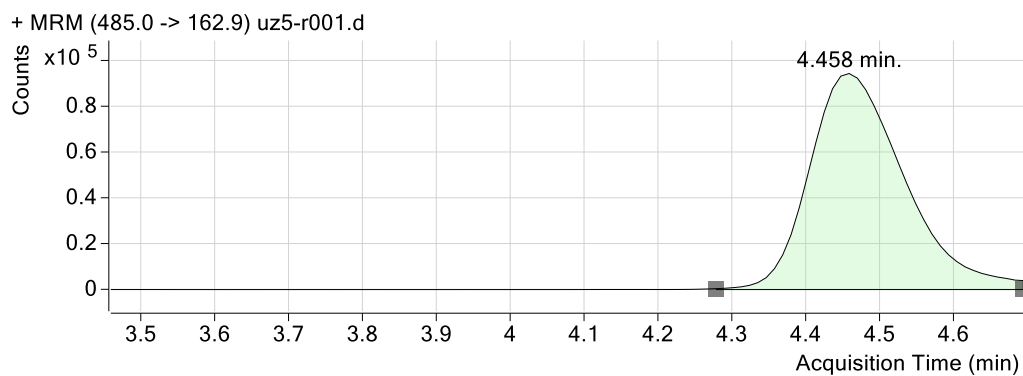


b) obogaćenog uzorka M5

Slika 34. Kromatogrami fragmentacijskih iona za STR: a) slijepe probe mlijeka, b) obogaćenog uzorka M5



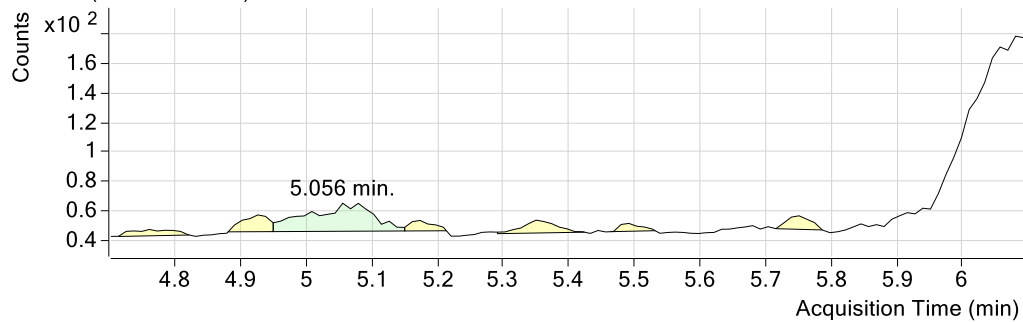
a) uzorak 1127



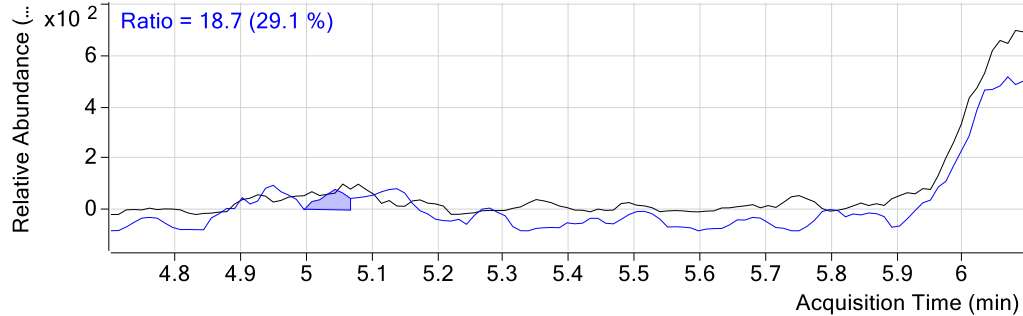
b) obogaćenog uzorka M5

Slika 35. Kromatogrami fragmentacijskih iona za KAN: a) uzorak 1127, b) obogaćenog uzorka M5

+ MRM (616.0 -> 161.0) uz30-r001.d

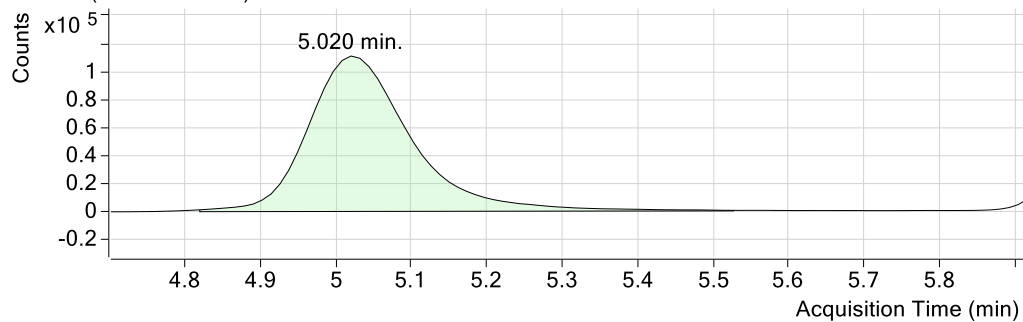


616.0 -> 161.0 , 616.0 -> 163.0
Ratio = 18.7 (29.1 %)

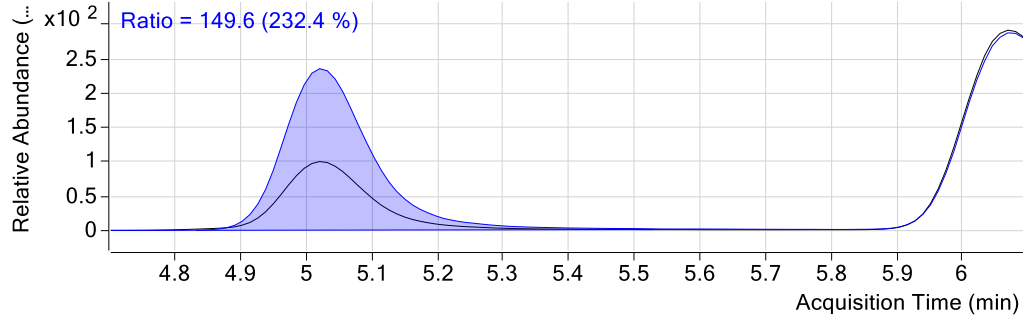


a) uzorak 1248

+ MRM (616.0 -> 161.0) uz5-r002.d

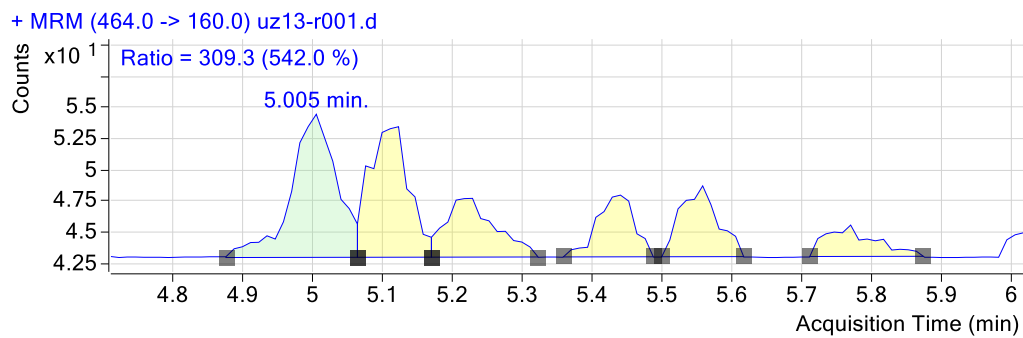
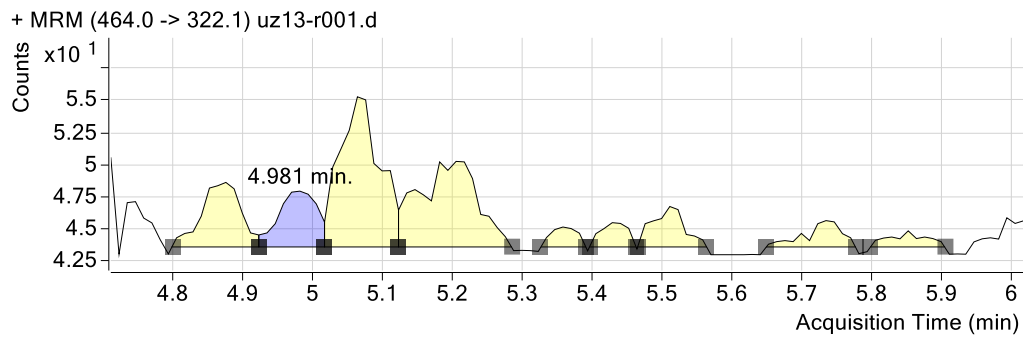


616.0 -> 161.0 , 616.0 -> 163.0
Ratio = 149.6 (232.4 %)

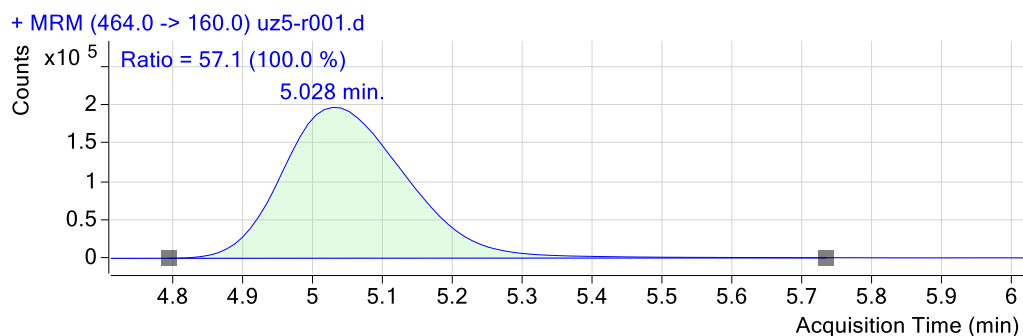
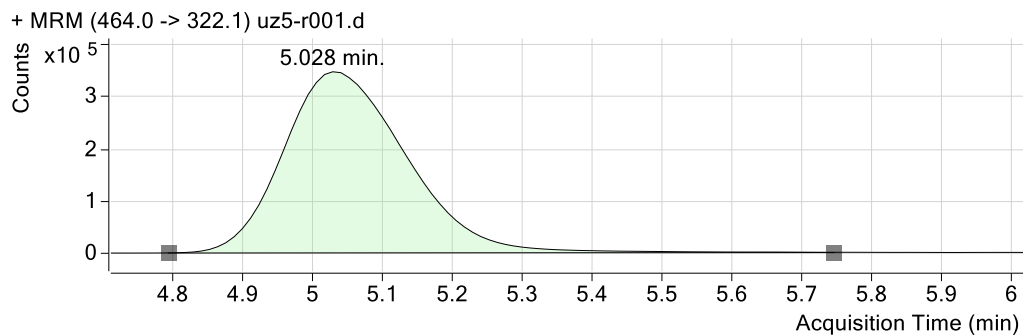


b) obogaćenog uzorka M5

Slika 36. Kromatogrami fragmentacijskih iona za PAR: a) uzorak 1248, b) obogaćenog uzorka M5



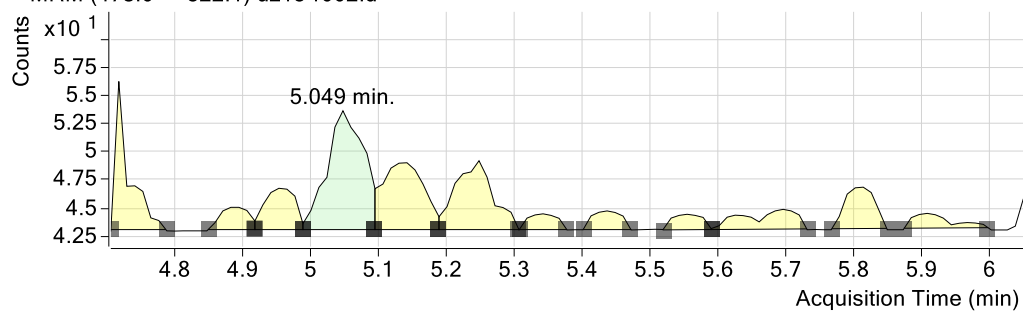
a) uzorak 1127



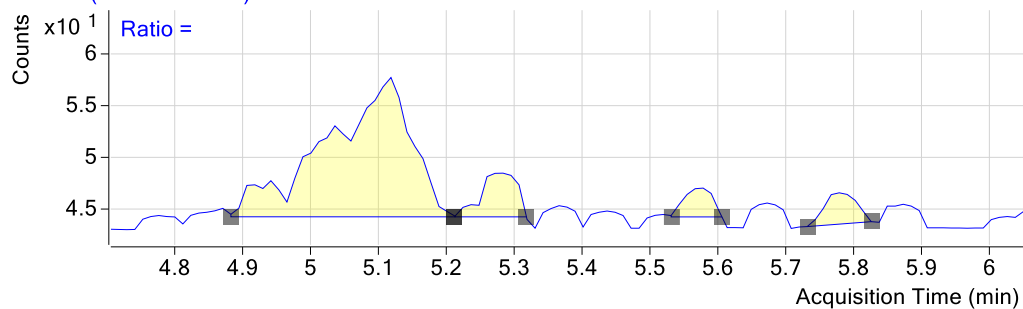
b) obogaćenog uzorka M5

Slika 37. Kromatogrami fragmentacijskih iona za GEN C2/2a: a) uzorak 1127, b) obogaćenog uzorka M5

+ MRM (478.0 -> 322.1) uz13-r002.d

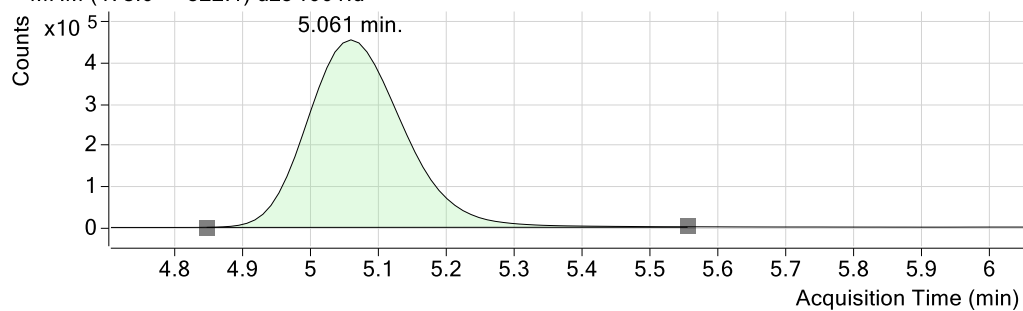


+ MRM (478.0 -> 156.9) uz13-r002.d

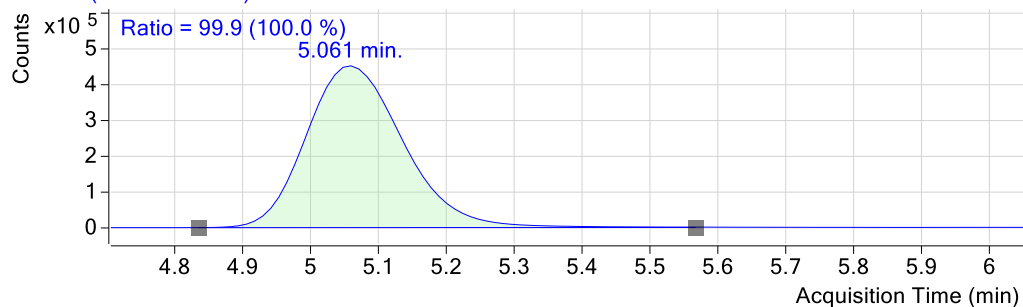


a) uzorak 1127

+ MRM (478.0 -> 322.1) uz5-r001.d



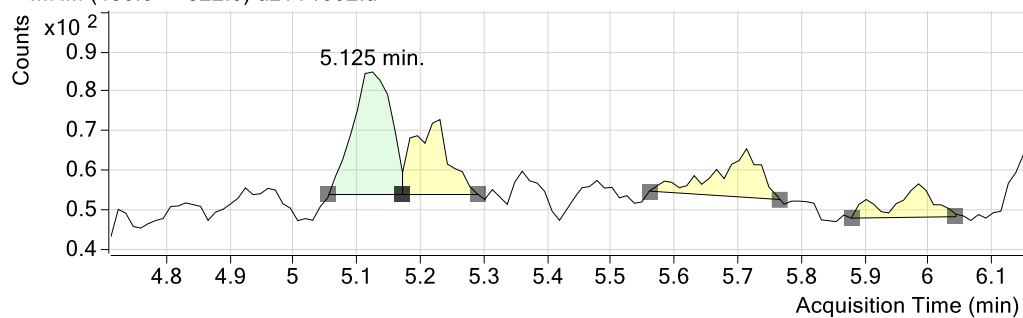
+ MRM (478.0 -> 156.9) uz5-r001.d



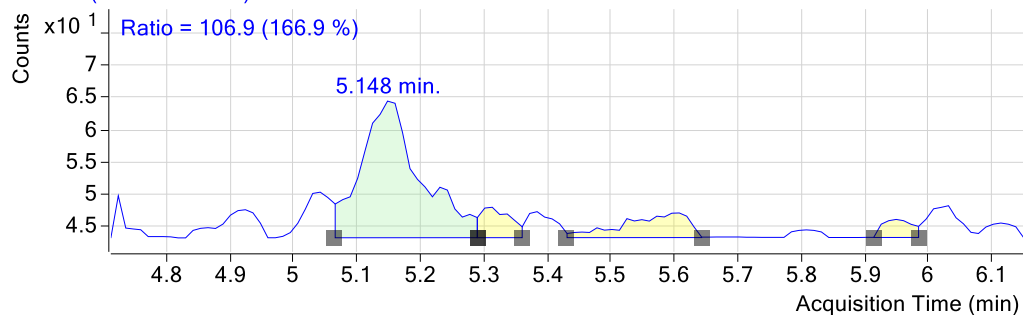
b) obogaćenog uzorka M5

Slika 38. Kromatogrami fragmentacijskih iona za GEN C1: a) uzorak 1127, b) obogaćenog uzorka M5

+ MRM (450.0 -> 322.0) uz14-r002.d

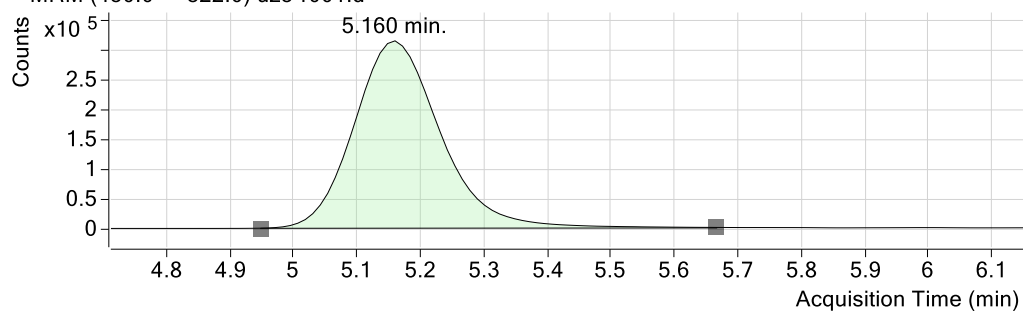


+ MRM (450.0 -> 159.7) uz14-r002.d

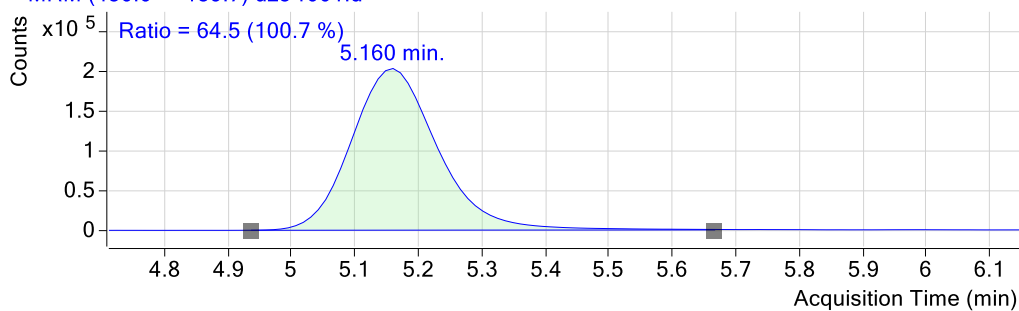


a) uzorak 1138

+ MRM (450.0 -> 322.0) uz5-r001.d

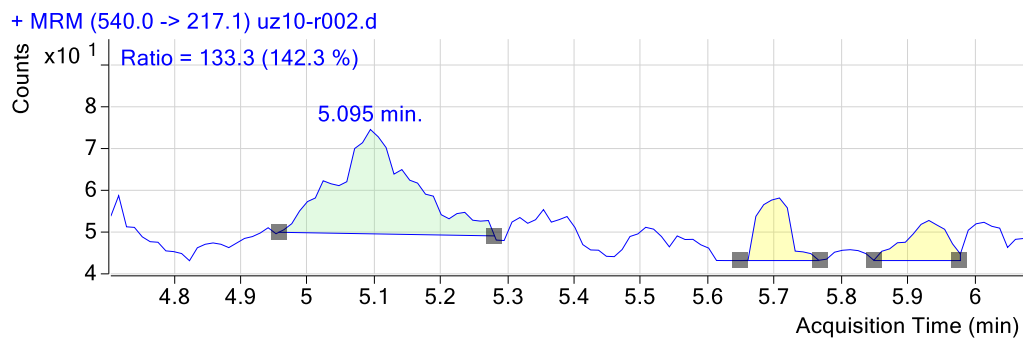
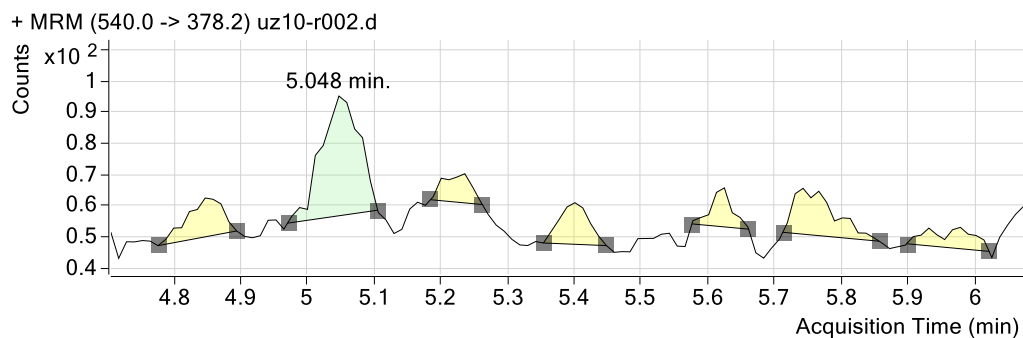


+ MRM (450.0 -> 159.7) uz5-r001.d

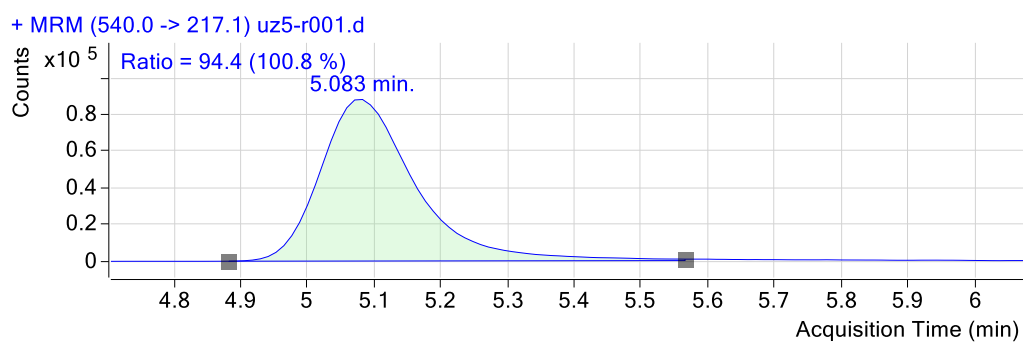
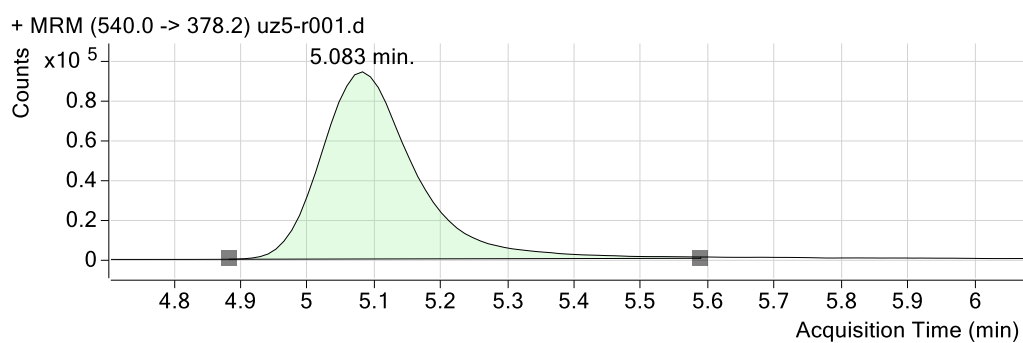


b) obogaćenog uzorka M5

Slika 39. Kromatogrami fragmentacijskih iona za GEN C1a: a) uzorak 1138, b) obogaćenog uzorka M5

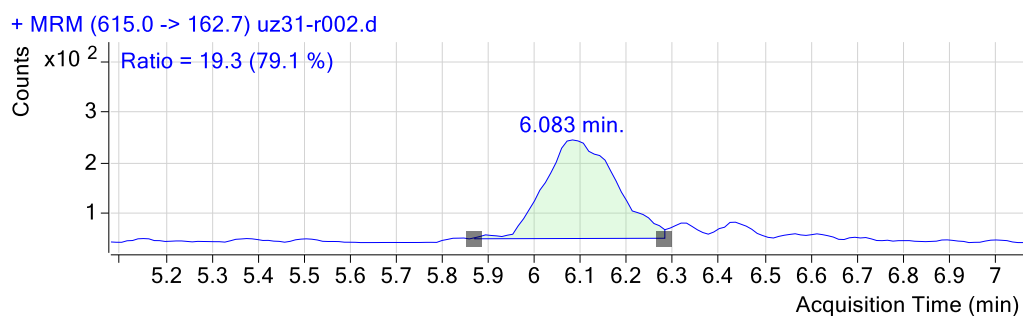
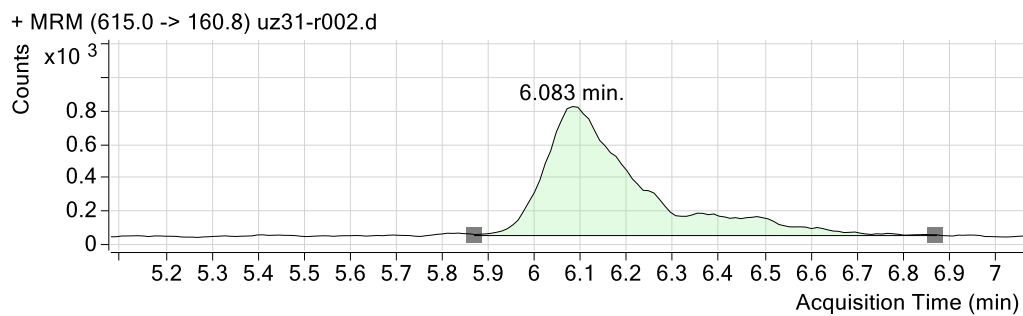


a) uzorak 1109

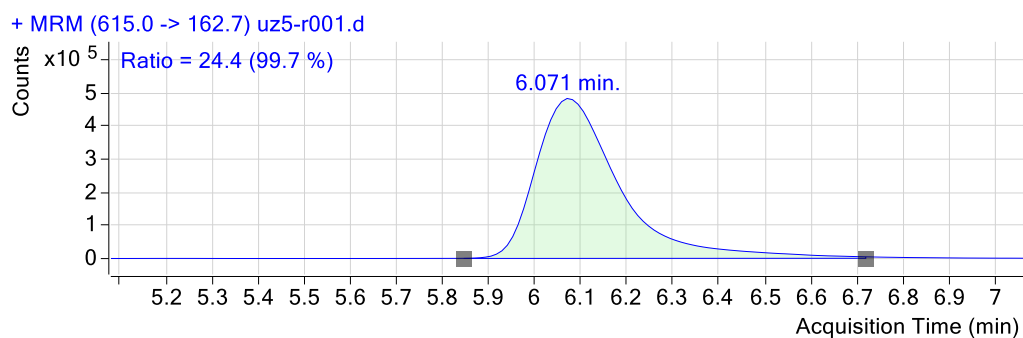
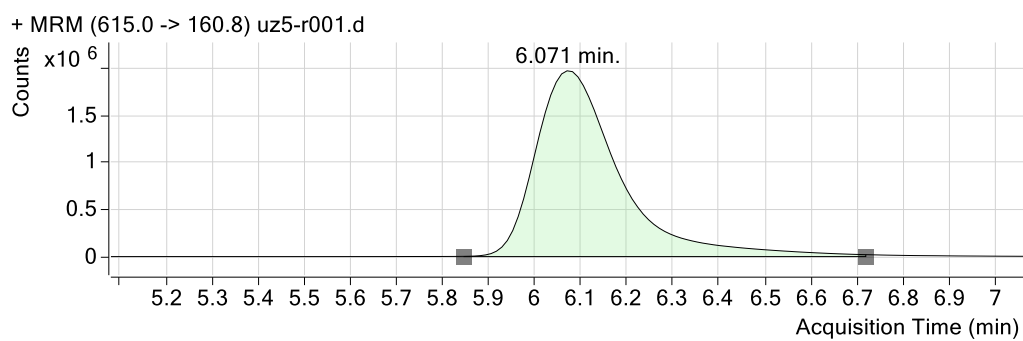


b) obogaćenog uzorka M5

Slika 40. Kromatogrami fragmentacijskih iona za APR: a) uzorak 1109, b) obogaćenog uzorka M5



a) uzorak 1250



b) obogaćenog uzorka M5

Slika 41. Kromatogrami fragmentacijskih iona za NEO: a) uzorak 1250, b) obogaćenog uzorka M5

Tablica 16. Eksperimentalno dobiveni rezultati za spektinomicin hidrat

Uzorci	Spektinomicin hidrat							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	2.73	35.48	1226	2.75	0	M1	2.73	60.86
M2	2.77	309.33	1227	2.58	0	M2	2.74	96.91
M3	2.75	262.52	1236	2.77	0	M3	2.74	222.17
M4	2.74	435.39	1242	2.75	0	M4	2.74	414.95
M5	2.71	558.02	1248	2.61	0	M5	2.75	979.50
1101	2.62	0	1250	2.82	0	701	2.72	32.98
1102	2.74	0	M1	2.74	70.70	753	2.76	33.50
1104	2.77	0	M2	2.72	74.18	756	2.81	32.30
1109	2.76	0	M3	2.74	171.15	773	2.79	33.52
1110	2.74	0	M4	2.75	323.81	774	2.70	32.26
1126	2.72	0	M5	2.73	596.14	778	2.81	32.72
1127	2.76	0	952	2.74	45.77	780	2.79	32.40
1138	2.74	0	957	2.61	45.79	784	2.62	32.22
1139	2.80	0	963	2.85	47.37	785	2.71	36.04
1143	2.74	0	989	2.72	45.87	786	2.71	37.37
1144	2.77	0	990	2.73	46.03	804	2.68	32.91
1145	2.76	0	995	2.67	45.83	807	2.75	32.72
1159	2.84	0	996	2.91	46.04	808	2.68	32.14
1166	2.79	0	1019	2.76	46.33	813	2.77	32.58
1167	3,11	0	1020	2.78	45.61	838	2.70	33.80
1168	2.75	0	1021	2.80	45.90	851	2.77	33.87
1187	2.70	0	1029	2.80	45.76	863	3.08	33.41
1188	2.72	0	1034	2.76	45.93			
1221	2.76	0	1081	3.19	45.74			

Tablica 17. Eksperimentalno dobiveni rezultati za dihidrostreptomycin

Uzorci	Dihidrostreptomycin							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	3.83	35.53	1226	3.88	10.63	M1	3.83	35.54
M2	3.83	51.85	1227	3.82	10.65	M2	3.84	53.09
M3	3.83	93.20	1236	3.86	10.63	M3	3.84	95.10
M4	3.83	178.14	1242	3.83	10.63	M4	3.84	176.70
M5	3.83	315.98	1248	3.83	10.63	M5	3.84	319.29
1101	3.85	10.63	1250	3.82	10.63	701	3.81	19.95
1102	3.83	11.42	M1	3.83	41.54	753	3.65	19.81
1104	3.80	10.64	M2	3.82	51.94	756	3.80	19.78
1109	3.79	10.63	M3	3.82	84.76	773	3.84	19.79
1110	3.84	10.62	M4	3.83	147.98	774	3.81	20.58
1126	3.88	10.62	M5	3.81	338.28	778	3.86	19.76
1127	3.85	10.63	952	3.81	30.99	780	3.86	20.01
1138	3.82	10.63	957	3.82	30.99	784	3.82	19.86
1139	3.82	10.63	963	3.85	31.02	785	3.83	20.09
1143	3.90	10.64	989	3.89	31,00	786	3.83	32.92
1144	3.83	10.64	990	3.81	31.01	804	3.84	21.49
1145	3.80	10.63	995	3.78	31,01	807	3.83	20.71
1159	3.85	10.62	996	3.82	31,00	808	3.84	20.38
1166	3.83	10.74	1019	3.77	31.08	813	3.80	20.32
1167	3.82	12.16	1020	3.85	30.99	838	3.84	20.93
1168	3.95	10.64	1021	3.79	31,00	851	3.81	21.10
1187	3.87	10.62	1029	3.84	31,00	863	3.83	20.50
1188	3.93	10.62	1034	3.83	31.04			
1221	3.85	10.63	1081	3.83	30.99			

Tablica 18. Eksperimentalno dobiveni rezultati za streptomycin

Uzorci	Streptomycin							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	3.89	35,77	1226	3.95	9.71	M1	3.90	32,68
M2	3.90	52,65	1227	4.05	9.64	M2	3.89	53,80
M3	3.89	93,48	1236	3.90	9.66	M3	3.90	101,21
M4	3.89	176,46	1242	3.91	9.74	M4	3.90	180,48
M5	3.90	316,85	1248	3.89	9.85	M5	3.90	314,48
1101	3.92	9.64	1250	3.95	9.62	701	3.92	11.48
1102	3.97	10.39	M1	3.88	39.14	753	3.87	11.34
1104	3.91	9.79	M2	3.88	51.97	756	3.94	11.46
1109	3.89	9.74	M3	3.88	88.73	773	3.88	11.34
1110	3.92	9.80	M4	3.88	153.79	774	3.95	11.36
1126	3.86	9.60	M5	3.88	333.32	778	3.95	11.71
1127	3.87	9.61	952	3.92	26.14	780	3.92	11.82
1138	3.86	9.61	957	3.93	26.14	784	3.96	11.56
1139	3.95	9.63	963	3.92	26.19	785	3.83	11.81
1143	3.95	9.63	989	3.90	26.23	786	3.90	11.61
1144	3.89	9.67	990	3.87	26.24	804	3.87	11.41
1145	3.87	9.67	995	3.88	26.15	807	3.88	11.36
1159	3.92	9.61	996	3.84	26.22	808	4,00	11.37
1166	3.81	13.36	1019	3.91	26.22	813	3.94	11.39
1167	3.88	9.81	1020	3.87	26.14	838	3.99	11.55
1168	3.87	9.75	1021	3.91	26.15	851	3.88	11.39
1187	3.98	9.64	1029	3.91	26.14	863	3.87	11.33
1188	3.92	9.64	1034	3.90	26.73			
1221	3.85	9.61	1081	3.90	26.18			

Tablica 19. Eksperimentalno dobiveni rezultati za kanamicin

Uzorci	Kanamicin							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	4.45	22,68	1226	4.43	0	M1	4.47	18,81
M2	4.46	43,34	1227	4.46	0	M2	4.47	38,64
M3	4.45	69,07	1236	4.49	0	M3	4.47	81,84
M4	4.45	154,35	1242	4.39	0	M4	4.47	163,57
M5	4.46	223,09	1248	4.50	0	M5	4.47	215,33
1101	4.45	0	1250	4.48	0	701	4.47	0
1102	4.48	0	M1	4.44	28.08	753	4.50	0
1104	4.49	0	M2	4.44	39.30	756	4.44	0
1109	4.48	0	M3	4.44	69.02	773	4.43	0
1110	4.41	0	M4	4.44	142.18	774	4.46	0
1126	4.48	0	M5	4.44	231.35	778	4.53	0
1127	4.41	0	952	4.45	0.25	780	4.33	0
1138	4.45	0	957	4.45	0.26	784	4.50	0
1139	4.46	0	963	4.46	0.26	785	4.50	0
1143	4.41	0	989	4.43	0.16	786	4.45	0
1144	4.43	0	990	4.44	0.21	804	4.45	0
1145	4.45	0	995	4.46	0.17	807	4.48	0
1159	4.46	0	996	4.43	0.18	808	4.47	0
1166	4.47	0	1019	4.40	0.58	813	4.56	0
1167	4.44	0	1020	4.44	0.33	838	4.43	0
1168	4.41	0	1021	4.45	0.17	851	4.49	0
1187	4.53	0	1029	4.46	0.21	863	4.50	0
1188	4.42	0	1034	4.45	0.20			
1221	4.46	0	1081	4.41	0.20			

Tablica 20. Eksperimentalno dobiveni rezultati za gentamicin C2/2a

Uzorci	Gentamicin C2/2a							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	5.11	13.14	1226	5.06	6.83	M1	5.12	14.61
M2	5.07	22.98	1227	5.01	6.81	M2	5.10	20.92
M3	5.06	37.00	1236	5.04	6.81	M3	5.11	39.10
M4	5.05	74.96	1242	5.06	6.81	M4	5.12	78.81
M5	5.03	131.40	1248	5.00	6.81	M5	5.11	128.79
1101	5.10	6.83	1250	5.02	6.81	701	5.12	4.11
1102	5.05	6.84	M1	5.12	14.89	753	5.14	4.08
1104	5.04	6.82	M2	5.11	18.23	756	5.07	4.09
1109	4.98	6.82	M3	5.07	39.01	773	5.06	4.07
1110	4.99	6.81	M4	5.05	77.75	774	5.08	4.07
1126	5.01	6.81	M5	5.02	129.49	778	5.09	4.07
1127	4.98	6.81	952	5.03	7.05	780	5.10	4.07
1138	4.98	6.81	957	4.96	7.04	784	5.09	4.07
1139	5.02	6.82	963	5.01	7.05	785	5.13	4.07
1143	5.01	6.81	989	4.98	7.04	786	5.14	4.42
1144	5.11	6.87	990	5.09	7.05	804	5.10	4.11
1145	5.06	6.82	995	5.03	7.04	807	5.10	4.09
1159	5.09	6.82	996	5.03	7.04	808	5.15	4.08
1166	5.04	6.82	1019	4.99	7.23	813	5.10	4.06
1167	5.09	6.81	1020	5.02	7.06	838	5.16	4.08
1168	5.11	6.82	1021	4.99	7.06	851	5.13	4.07
1187	5.04	6.81	1029	5.01	7.04	863	5.11	4.07
1188	4.98	6.81	1034	5.08	7.06			
1221	5.01	6.95	1081	5.10	7.11			

Tablica 21. Eksperimentalno dobiveni rezultati za gentamicin C1

Uzorci	Gentamicin C1							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	5.11	9.75	1226	5.09	5.74	M1	5.14	12.39
M2	5.10	14.52	1227	5.10	5.74	M2	5.15	15.82
M3	5.08	26.54	1236	5.01	5.73	M3	5.14	26.34
M4	5.07	58.11	1242	5.03	5.73	M4	5.14	51.25
M5	5.06	92.90	1248	5.13	5.73	M5	5.14	97.97
1101	5.08	5.74	1250	5.04	5.73	701	5.12	7.33
1102	5.10	5.74	M1	5.11	9.50	753	5.11	7.32
1104	5.03	5.74	M2	5.11	12.50	756	5.18	7.32
1109	5.06	5.73	M3	5.08	28.92	773	5.16	7.32
1110	5.11	5.73	M4	5.07	62.89	774	5.19	7.31
1126	5.06	5.73	M5	5.06	89.28	778	5.16	7.31
1127	5.07	5.73	952	5.10	3.18	780	5.10	7.31
1138	5.06	5.73	957	5.01	3.18	784	5.16	7.31
1139	5.03	5.74	963	5.03	3.18	785	5.11	7.32
1143	5.08	5.73	989	5.07	3.18	786	5.14	7.48
1144	5.07	5.76	990	5.10	3.18	804	5.11	7.32
1145	5.10	5.74	995	5.08	3.18	807	5.17	7.31
1159	5.06	5.74	996	5.06	3.18	808	5.11	7.31
1166	5.10	5.74	1019	5.01	3.25	813	5.11	7.31
1167	5.08	5.74	1020	5.07	3.18	838	5.14	7.32
1168	5.14	5.74	1021	5.08	3.18	851	5.11	7.32
1187	5.17	5.73	1029	5.09	3.18	863	5.15	7.31
1188	5.06	5.73	1034	5.10	3.19			
1221	5.06	5.79	1081	5.08	3.21			

Tablica 22. Eksperimentalno dobiveni rezultati za apramicin

Uzorci	Apramicin							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	5.10	12.82	1226	5.09	0	M1	5.15	15.98
M2	5.09	30.45	1227	5.08	0	M2	5.15	24.86
M3	5.08	47.55	1236	5.04	0	M3	5.15	50.61
M4	5.08	104.24	1242	5.05	0	M4	5.15	100.53
M5	5.08	147.30	1248	5.05	0	M5	5.15	150.11
1101	5.09	0	1250	5.10	0	701	5.18	0.40
1102	5.07	0	M1	5.10	15.33	753	5.14	0.40
1104	5.06	0	M2	5.08	23.89	756	5.14	0.29
1109	5.05	0	M3	5.08	53.12	773	5.24	0.30
1110	5.11	0	M4	5.08	103.44	774	5.14	0.27
1126	5.10	0	M5	5.07	146.82	778	5.29	0.29
1127	5.11	0	952	5.09	0	780	5.21	0.27
1138	5.09	0	957	5.07	0	784	5.15	0.28
1139	5.07	0	963	5.07	0	785	5.18	0.34
1143	5.07	0	989	5.08	0	786	5.16	1.55
1144	5.08	0	990	5.04	0	804	5.12	0.33
1145	5.07	0	995	5.08	0	807	5.12	0.28
1159	5.07	0	996	5.03	0	808	5.18	0.27
1166	5.08	0	1019	5.05	0	813	5.17	0.28
1167	5.10	0	1020	5.08	0	838	5.16	0.28
1168	5.07	0	1021	5.05	0	851	5.15	0.34
1187	5.11	0	1029	5.10	0	863	5.19	0.27
1188	5.03	0	1034	5.09	0			
1221	5.07	0	1081	5.08	0			

Tablica 23. Eksperimentalno dobiveni rezultati za paramomicin

Uzorci	Paramomicin							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	5,04	12.62	1226	5,08	0	M1	5.07	16.28
M2	5,03	22.07	1227	5,05	0	M2	5.08	25.71
M3	5,03	49.96	1236	5,12	0	M3	5.08	48.43
M4	5,02	114.75	1242	5,04	0	M4	5.08	97.46
M5	5,08	140.91	1248	5,13	0	M5	5.09	152.86
1101	5,21	0	1250	5,10	0	701	5.10	3.97
1102	5,05	0.03	M1	5.12	14.44	753	5.04	3.92
1104	5,04	0	M2	5.11	22.72	756	5.14	3.92
1109	5,06	0	M3	5.07	55.05	773	5.13	3.87
1110	5,02	0	M4	5.05	111.66	774	5.18	3.87
1126	5,00	0	M5	5.02	140.98	778	5.14	3.90
1127	5,05	0	952	5.03	0	780	5.05	3.88
1138	5,05	0	957	4.96	0	784	5.14	3.87
1139	4,98	0	963	5.01	0	785	5.10	3.97
1143	5,01	0	989	4.98	0	786	5.10	5.10
1144	5,11	0.45	990	5.09	0	804	5.07	3.97
1145	5,07	0	995	5.03	0	807	5.08	4.03
1159	5,04	0	996	5.03	0	808	5.09	3.87
1166	5,05	0	1019	4.99	0	813	5.04	3.90
1167	5,11	0	1020	5.02	0	838	5.10	3.89
1168	5,11	0	1021	4.99	0	851	5.14	3.93
1187	5,04	0	1029	5.01	0	863	5.14	3.87
1188	5,00	0	1034	5.08	0			
1221	5,08	0.24	1081	5.10	0			

Tablica 24. Eksperimentalno dobiveni rezultati za gentamicin C1a

Uzorci	Gentamicin C1a							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	5.16	8.45	1226	5.15	1.89	M1	5,23	9,94
M2	5.16	14.67	1227	5.14	1.87	M2	5,23	14,19
M3	5.16	26.69	1236	5.13	1.87	M3	5,22	27,21
M4	5.16	55.82	1242	5.13	1.86	M4	5,22	54,21
M5	5.16	85.87	1248	5.13	1.86	M5	5,23	87,11
1101	5.15	1,90	1250	5.14	1.87	701	5,22	2,05
1102	5.14	1.89	M1	5.16	9.11	753	5,17	2,06
1104	5.14	1.88	M2	5.16	12.39	756	5,21	2,05
1109	5.16	1.87	M3	5.16	29.17	773	5,17	2,00
1110	5.16	1.87	M4	5.16	57.64	774	5,29	2,05
1126	5.14	1.86	M5	5.17	84.15	778	5,09	2,08
1127	5.15	1.87	952	5.14	0	780	5,26	2,05
1138	5.15	1.87	957	5.14	0	784	5,21	2,01
1139	5.14	1.87	963	5.14	0	785	5,20	2,01
1143	5.17	1.86	989	5.14	0	786	5,22	2,72
1144	5.14	1.96	990	5.15	0	804	5,22	2,09
1145	5.13	1.88	995	5.17	0	807	5,18	2,06
1159	5.14	1.87	996	5.12	0	808	5,28	2,04
1166	5.17	1.88	1019	5.11	0.16	813	5,27	2,01
1167	5.13	1.87	1020	5.14	0.01	838	5,24	2,06
1168	5.17	1.87	1021	5.12	0	851	5,19	2,05
1187	5.15	1.86	1029	5.18	0	863	5,22	2,02
1188	5.13	1.86	1034	5.13	0			
1221	5.12	2,00	1081	5.15	0.01			

Tablica 25. Eksperimentalno dobiveni rezultati za neomicin

Uzorci	Neomicin							
	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Uzorci	RT	Konc. [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
M1	6.08	191.87	1226	6.08	0	M1	6.32	304.37
M2	6.08	333.74	1227	6.09	0	M2	6.32	362.38
M3	6.08	749.50	1236	6.08	0	M3	6.30	654.92
M4	6.08	1711.12	1242	6.08	0	M4	6.28	1303.16
M5	6.07	2119.61	1248	6.09	0	M5	6.23	2418.38
1101	6.09	0	1250	6.08	0	701	6.31	188.51
1102	6.09	0	M1	6.11	215.24	753	6.32	190.75
1104	6.09	0	M2	6.11	342.35	756	6.29	185.31
1109	6.08	0	M3	6.09	826.81	773	6.30	181.98
1110	6.09	0	M4	6.09	1681.50	774	6.25	181.65
1126	6.09	0	M5	6.09	2109.82	778	6.32	182.08
1127	6.09	0	952	6.12	0	780	6.31	181.85
1138	6.09	0	957	6.12	0	784	6.26	181.51
1139	6.11	0	963	6.12	0	785	6.29	181.80
1143	6.09	0	989	6.13	0	786	6.29	245.37
1144	6.08	6.16	990	6.12	0	804	6.25	187.45
1145	6.09	0	995	6.12	0	807	6.33	182.37
1159	6.09	0	996	6.11	0	808	6.28	182.07
1166	6.09	0	1019	6.11	0	813	6.30	181.96
1167	6.10	0	1020	6.12	0	838	6.25	181.56
1168	6.08	0	1021	6.11	0	851	6.31	181.88
1187	6.09	0	1029	6.11	0	863	6.34	181.62
1188	6.09	0	1034	6.11	0			
1221	6.09	3.19	1081	6.10	0			

Tablica 26. Validacijska kartica za aminoglikozide u uzorcima mlijeka

ANALIT	PARAMETAR											
	C ₀ [μg kg ⁻¹]				C _{MRL} [μg kg ⁻¹]				LOD [μg kg ⁻¹]	LOQ [μg kg ⁻¹]	Mjerna nesigurnost [%]	Iskorištenje [%]
	CC _α	CC _α Σ	CC _β	CC _β Σ	CC _α	CC _α Σ	CC _β	CC _β Σ				
Apramicin	21,4		31,9						3,47	14,13	3,4	100,0
Streptomycin	49,5		81,7		219,5		252,5		6,45	26,08	5,1	100,3
Dihidrostreptomycin	48,4		78,9		218,4		249,4		4,38	17,81	4,9	100,6
Paromomicin	24,3		39,6						4,87	19,71	4,9	100,2
Neomicin	316,7		468,2		1591,8		1748,8		86,62	351,84	3,3	99,8
Kanamycin	31,3		45,9		158,8		173,8		6,59	26,87	3,1	100,0
Spektinomycin	83,3		122,1		223,2		262,3		19,24	77,81	19,9	102,5
Gentamicin C1	11,5	33,0	13,8	35,1	124,8	105,1	166,1	110,2	0,81	3,11	13,3	99,0
Gentamicin C1a	9,37	33,0	10,3	35,1	107,6	105,1	120,1	110,2	0,57	2,18	4,0	99,9
Gentamicin C2/2a	16,6	33,0	20,5	35,1	117,5	105,1	146,7	110,2	2,00	7,68	9,4	99,7