

Određivanje rezidua tetraciklina u jajima primjenom LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS metode

Čuljak, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:784752>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Nina Čuljak

1025/MB

**ODREĐIVANJE REZIDUA
TETRACIKLINA U JAJIMA
PRIMJENOM LC-MS/MS I
UHPLC/Q-TOF-MS METODE**

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

Posebna zahvala, prof. dr. sc. Jagodi Šušković, pročelnici Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, za dugogodišnji doprinos suradnji s Hrvatskim veterinarskim institutom, Odjelom za rezidue, gdje je napravljen eksperimentalni dio ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Blaženki Kos na stručnoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem i svim djelatnicima Laboratorija za određivanje rezidua na Hrvatskom veterinarskom institutu na nesebičnoj pomoći, a posebnu zahvalu dugujem znanstvenoj suradnici dr. sc. Ivani Varenini i znanstvenoj savjetnici u trajnom zvanju dr. sc. Nini Bilandžić koje su mi omogućile izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem prijateljima i kolegama koji su mi ovaj period učinili ljepšim.

Za kraj, najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju koje su mi pružili tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA U JAJIMA PRIMJENOM LC-MS/MS I UHPLC/Q-TOF-MS METODE

Nina Čuljak, 1025/MB

Sažetak: Upotreba antibiotika kao veterinarskih lijekova može dovesti do pojave njihovih rezidua u hrani životinjskog podrijetla kao što su meso goveda, svinja i peradi, mlijeko i mliječni proizvodi, jaja, ribe i med. Zahvaljujući širokom spektru djelovanja prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, rikecijama, mikoplazmama, klamidijama i jednostaničnim parazitima, tetraciklinski antibiotici su našli široku primjenu u veterinarskoj medicini. Rezidui antibiotika mogu imati nepovoljne učinke na zdravlje potrošača, a jedna od posljedica pretjerane uporabe antibiotika je i širenje antibiotske rezistencije. Stoga je nužno razviti učinkovite metode za određivanje rezidua tetraciklinskih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla kako bi se spriječilo daljnje širenje antibiotske rezistencije. U ovom je radu provedena optimizacija tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) i tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS), u svrhu postizanja maksimalne osjetljivosti i selektivnosti instrumenata za određivanje rezidua tetraciklina, epitetraciklina, oksitetraciklina, epioksitetraciklina, klortetraciklina, epiklortetraciklina, i doksiciklina, u obogaćenim uzorcima jaja, pri čemu je veća osjetljivost postignuta UHPLC/Q-TOF-MS metodom. Usporedbom rezultata određivanja rezidua tetraciklinskih antibiotika u uzorcima jaja pokazalo se da su obje primjenjene metode ekstrakcije analita, otapalom i Quechers ekstrakcijom, uspješno provedene, pri čemu je Quechers ekstrakcijom, primjenom LC-MS/MS metode, postignuta bolja ponovljivost, nego kod uzoraka dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom.

Ključne riječi: tetraciklinski antibiotici, antibiotska rezistencija, rezidui antibiotika, LC-MS/MS, UHPLC/Q-TOF-MS

Rad sadrži: 68 stranica, 44 slike, 34 tablice, 61 literaturni navod, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *prof. dr. sc. Blaženka Kos*

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. *Jagoda Šušković*
2. prof. dr. sc. *Blaženka Kos*
3. dr. sc. *Nina Bilandžić*, znan. savj. u trajnom zvanju
4. prof. dr. sc. *Ksenija Durgo* (zamjena)

Datum obrane: 10. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

DETERMINATION OF TETRACYCLINE RESIDUES IN EGGS USING LC-MS/MS AND UHPLC/Q-TOF-MS METHODS

Nina Čuljak, 1025/MB

Abstract: The usage of antibiotics as veterinary drugs can lead to appearance of residues in foods of animal origin, including meat from bovine and porcine animals and poultry, milk and dairy products, eggs, fish and honey. Due to broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, rickettsiae, mycoplasmas, chlamydiae and protozoan parasites, tetracyclines are widely used in veterinary medicine. Antibiotic residues can have negative effects on health of consumer who was in contact with contaminated food, and one consequence of excessive usage of antibiotics is antibiotic resistance. Therefore, it is necessary to develop effective methods for determination residues of tetracyclines in animal-derived foods, in order to prevent further spread of antibiotic resistance. In this paper optimization of liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/Q-TOF-MS) methods was carried out in order to achieve maximum instrument sensitivity and selectivity for determining residues of tetracycline, epitetracycline, oxytetracycline, epioxytetracycline, chlortetracycline, epichlortetracycline and doxycycline, in enriched egg samples, where UHPLC/Q-TOF-MS method had shown higher sensitivity. Both extraction methods, Quechers extraction and organic solvent extraction, were shown to be efficient. However, compared to samples obtained with organic solvent extraction, samples obtained with Quechers extraction, using LC-MS/MS method, achieved better repeatability.

Keywords: tetracyclines, antibiotic resistance, antibiotic residues, LC-MS/MS, UHPLC/Q-TOF-MS

Thesis contains: 68 pages, 44 figures, 34 tables, 61 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Blaženka Kos, Full Profesor*

Technical support and assistance: *PhD Ivana Varenina, Research associate, and PhD Nina Bilandžić, Scientific adviser having a tenure*

Reviewers:

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Nina Bilandžić*, Scientific adviser having a tenure
4. PhD. *Kesnija Durgo*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 10 July 2019

Sadržaj

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. TETRACIKLINSKI ANTIBIOTICI | 2 |
| 2.1.1. Kemijska struktura tetraciklinskih antibiotika | 2 |
| 2.1.2. Tetraciklini u kliničkoj uporabi | 3 |
| 2.1.3. Druga generacija polusintetskih tetraciklina | 4 |
| 2.1.4. Treća generacija polusintetskih tetraciklina | 5 |
| 2.1.5. Tetraciklini u procesu razvoja | 6 |
| 2.1.6. Atipični tetraciklini..... | 7 |
| 2.1.7. Biosintetski put tetraciklinskih antibiotika..... | 8 |
| 2.2. ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA | 11 |
| 2.2.1. Molekularni mehanizmi antibiotske rezistencije..... | 11 |
| 2.3. ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA | 14 |
| 2.3.1. Rezidui tetraciklinskih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla..... | 14 |
| 2.3.2. Metode za određivanje rezidua tetraciklina u hrani životinjskog podrijetla | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 19 |
| 3.1. KEMIKALIJE I OPREMA | 19 |
| 3.1.1. Standardi | 19 |
| 3.1.2. Kemikalije..... | 19 |
| 3.1.3. Oprema i materijali..... | 19 |
| 3.2. METODE RADA | 20 |
| 3.2.1. Čuvanje uzoraka | 20 |
| 3.2.2. Priprema otopina | 20 |
| 3.2.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova | 21 |
| 3.2.4. Priprema internog standarda | 22 |
| 3.2.5. Priprema uzoraka..... | 22 |
| 3.2.6. Pročišćavanje uzoraka | 24 |
| 3.2.7. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju..... | 27 |
| 3.2.8. Mjerenje na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju | 28 |
| 3.2.9. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata..... | 30 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 31 |
| 4.1. OPTIMIZACIJA LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS SUSTAVA ZA ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA | 32 |
| 4.2. KROMATOGRAMI REZIDUA TETRACIKLINA IZ UZORAKA JAJA | 34 |
| 4.3. ODREĐIVANJE UTJECAJA MATRIKSA NA ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA | 48 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4. PONOVLJIVOST PRIMIENJENIH METODA ODREĐIVANJA REZIDUA TETRACIKLINA | 58 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 61 |
| 6. LITERATURA..... | 62 |
| 7. PRILOZI | |

1. UVOD

Rezidui antibiotika mogu se pojaviti u hrani životinjskog podrijetla legalnom ili zabranjenom upotrebom veterinarskih lijekova, izravnom primjenom antibiotika u hrani životinjskog podrijetla ili putem okoliša. To za posljedicu može dovesti do zdravstvenih problema kod ljudi – mogu dovesti do pojave antibiotske rezistencije i alergijskih reakcija te malignih bolesti i poremećaja ravnoteže crijevne mikrobiote (Bedale, 2019).

Jedna od često korištenih skupina antibiotika u veterinarskoj medicini su tetraciklinski antibiotici. Tetraciklinski antibiotici su prirodni poliketidi koji uključuju brojne klinički važne antibiotike. Tetraciklini su bili prva velika skupina terapeutika koji se koriste kao antibiotici širokog spektra, a učinkoviti su prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim patogenim bakterijama, mikoplazmama, klamidijama, rikecijama i jednostaničnim parazitima. Osnovna struktura tetraciklina sadrži 4 linearno povezana šesteročlana ugljikova prstena, na koje su vezane različite funkcionalne skupine (Chopra i sur., 1992).

Metode koje su se koristile za određivanje rezidua tetraciklina u nepoznatim uzorcima jaja su tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) i tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS). Kod određivanja rezidua tetraciklinskih antibiotika LC-MS/MS metodom, ekstrakcija analita se provela na dva načina – Quechers ekstrakcijom i ekstrakcijom organskim otapalom. Kod određivanja rezidua UHPLC/Q-TOF-MS metodom, izolacija analita provela se Quechers ekstrakcijom (Manimekalai i sur. 2019).

Stoga je cilj ovog rada bio razviti preciznu metodu određivanja rezidua tetraciklinskih antibiotika (tetraciklin, epitetraciklin, oksitetraciklin, epioksiteciciklin, klortetraciklin, epiklortetraciklin, doksiciklin) u uzorcima jaja, primjenom različitih uređaja (LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS) i različitih metoda ekstrakcije analita iz uzoraka analiziranih na LC-MS/MS uređaju, kako bi se utvrdilo koja metoda je pogodnija za određivanje rezidua tetraciklina u jajima.

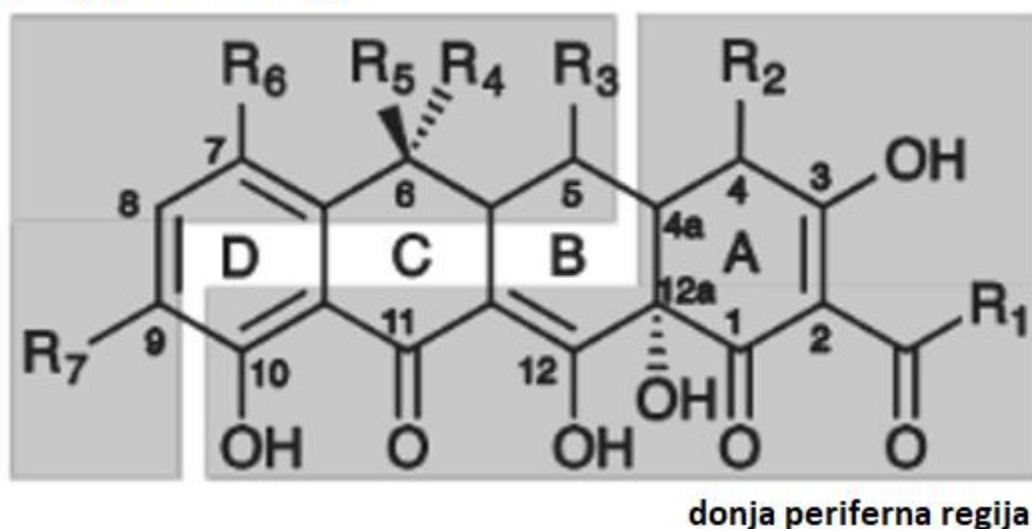
2. TEORIJSKI DIO

2.1. TETRACIKLINSKI ANTIBIOTICI

2.1.1. Kemijska struktura tetraciklinskih antibiotika

Tetraciklini su prirodni poliketidi koji uključuju brojne klinički važne antibiotike, kao što su oksitetraciklin (5-hidroksitetraciklin, OTC) i klortetraciklin (7-klortetraciklin, CTC). Tetraciklini su bili prva velika skupina terapeutika koji se od 1940-ih godina koriste kao antibiotici širokog spektra, a učinkoviti su prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim patogenim bakterijama, mikoplazmama, klamidijama, rikecijama i jednostaničnim parazitima (Šušković i sur., 2016). Osnovna struktura tetraciklina sadrži 4 linearno povezana šesteročlana ugljikova prstena, na koje su vezane različite funkcionalne skupine (slika 1). Tetracikline u kliničkoj upotrebi karakterizira jedinstvena C2 amidna funkcionalna skupina i jedan aromatski prsten (D prsten na slici 1), dok drugi prstenovi sadrže zasićene ugljikove centre (Chopra i sur., 1992). Periferija molekule tetraciklina može se podijeliti na dvije različite regije (slika 1) označene kao gornja i donja periferna regija, koje sadrže različite kemijske funkcionalne grupe i supstituente. Donja periferna regija, koja se proteže od C10 do C4a, uključena je u interakciju sa 30S podjedinicom ribosoma preko funkcionalnih grupa na ugljikovim atomima C10-C1 koje sadrže kisik te preko C2 amidne funkcionalne skupine (Nelson i Levy, 2011). Dokazano je da većina modifikacija uzduž donje periferne regije tetraciklina značajno smanjuje antimikrobnu aktivnost, dok je modificiranje derivata uzduž gornje periferne regije, osobito na pozicijama C7-C9, pokazalo povećanu aktivnost prema mnogim različitim ciljnim mjestima patogenih bakterija (Nelson i Levy, 2011).

gornja periferna regija



donja periferna regija

| SPOJ | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| TC | NH ₂ | N(CH ₃) ₂ ; 4 <i>S</i> oblik | H | CH ₃ | OH | H | H |
| OTC | NH ₂ | N(CH ₃) ₂ ; 4 <i>S</i> oblik | OH | CH ₃ | OH | H | H |
| CTC | NH ₂ | N(CH ₃) ₂ ; 4 <i>S</i> oblik | H | CH ₃ | OH | Cl | H |
| C6-demetil-C7-CTC | NH ₂ | N(CH ₃) ₂ ; 4 <i>S</i> oblik | H | H | OH | Cl | H |
| 2-acetil-2-dekarboksiamido-OTC | CH ₃ | N(CH ₃) ₂ ; 4 <i>S</i> oblik | OH | CH ₃ | OH | H | H |
| kelokardin | CH ₃ | NH ₂ ; 4 <i>R</i> oblik | H | CH ₃ | H | H | CH ₃ |

Slika 1. Prirodni tetraciklini koje proizvode različite vrste roda *Streptomyces*. Osjenčane su gornja i donja periferna regija tetraciklina. TC – tetraciklin, OTC – oksitetraciklin, CTC-klortetraciklin (Nelson i Levy, 2011)

2.1.2. Tetraciklini u kliničkoj uporabi

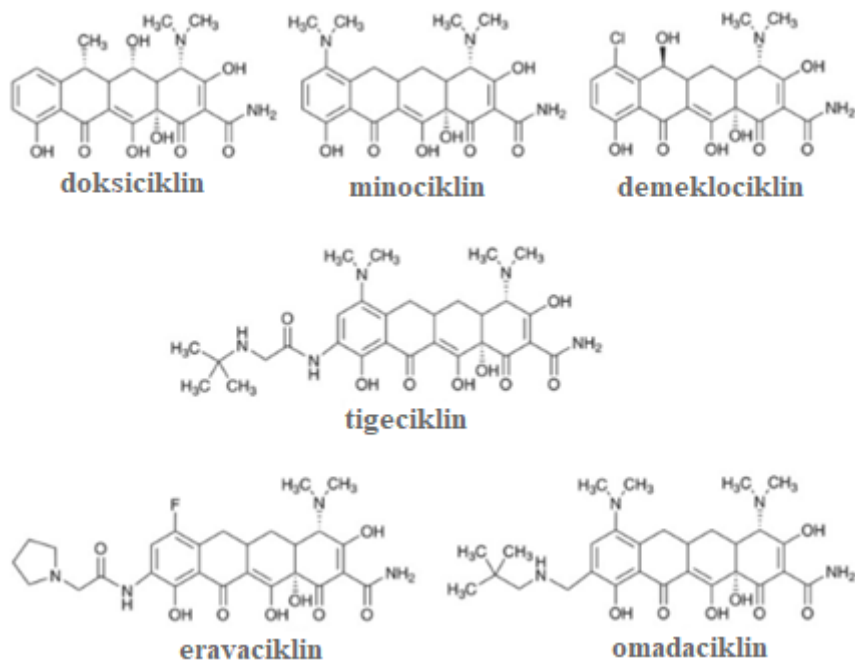
Klortetraciklin (CTC), kojeg je otkrio Benjamin Duggar 1948. godine u Lederle Laboratories (kasnije poznat kao American Cyanamid, Wayne, NJ, SAD), i oksitetraciklin (OTC), kojeg je otkrio Alexander Finlay u ranim 1950-im u Pfizeru (Groton, CT, SAD), bili su prvi članovi grupe tetraciklina (Nelson i Levy, 2011). CTC je izoliran iz *Streptomyces aureofaciens*, a ime aureomicin dobio je zbog zlatnog obojenja bakterijske kulture na agaroznim podlogama. S druge strane, OTC proizvodi *Streptomyces rimosus*, izoliran u Terre Haute, IN, SAD, zbog čega je dobio ime teramicin (Nelson i Levy, 2011). Drugi prirodno

dobiveni tetraciklini naknadno su identificirani, na primjer tetraciklini iz *S. aureofaciens*, *S. rimosus* i *S. viridofaciens* te važan intermedijer 6-demetil-7-klor-tetraciklin (demeklociklin, 6DM-CTC) kojeg sintetizira mutant soja *S. aureofaciens*. Danas je 6DM-CTC jedan od najvažnijih intermedijera koji se koristi u industrijskom mjerilu pri polusintetskim procesima u proizvodnji tetraciklina druge i treće generacije (Nguyen i sur., 2014). Tetraciklini su peti po redu antibiotici koji se najviše propisuju širom svijeta (Van Boeckel i sur., 2014). Unatoč njihovoj dostupnosti kao generičkih lijekova i široko rasprostranjenoj rezistenciji uzročnika bolesti, tetraciklini i dalje imaju relativno veliko tržište. Na primjer, polusintetski tetraciklin doksiciklin ima procijenjeno tržište na više od 250 milijuna dolara (Drugsite Trust, 2013).

2.1.3. Druga generacija polusintetskih tetraciklina

Mehanizam djelovanja tetraciklina sastoji se od njihovog vezanja na ribosome i inhibiranja translacije tako što sprječava vezanje aminoacilirane tRNA na A mjesto (Nguyen i sur., 2014). Strukturne značajke unutar tetraciklinske jezgre i primjena organskih sintetskih reakcija, koje su Lederle i Pfizer neovisno istraživali, dovele su do daljnje modifikacije skeleta tetraciklinske molekule, s ciljem dobivanja tetraciklinskih antibiotika s poboljšanim farmakokinetičkim svojstvima, povećanom antimikrobnom aktivnosti i smanjenom toksičnošću. Pfizerovi kemičari modificirali su C prsten oksitetraciklina (slika 1) kako bi proizveli 6-deoksitetraciklin (doksiciklin, slika 2), analoga sa značajnom aktivnošću, stabilnošću i farmakološkom učinkovitošću, kojeg je američka Agencija za hranu i lijekove (engl. US Food and Drug Administration – FDA) odobrila za upotrebu 1967. godine (Nelson i Levy, 2011; US FDA, 2019). Doksiciklin je još uvijek u širokoj primjeni ne samo za liječenje bakterijskih infekcija kao što su upala pluća, akne, infekcije klamidijom, rani stadij Lymeove bolesti, kolera i sifilis, nego i za kemoprofilaksu i liječenje malarije. S druge strane, Lederleovi znanstvenici su intenzivno proučavali biogenezu CTC u mutantu soja *Streptomyces aureofaciens* (Nelson i Levy, 2011). Izolirali su 6DM-CTC prekursor (demeklociklin, slika 2), tetraciklinski skelet koji posjeduje jedinstvene C6 i C7 funkcionalne grupe, zatim je daljnja kemijska redukcija demeklociklina rezultirala dobivanjem industrijski važnog tetraciklinskog intermedijera sanciklina (6-demetil-6-deoksitetraciklin). Modifikacijama aromatskog D prstena, koristeći polusintetski pristup, dobiveni su novi C7 i C9 derivati sanciklina. Daljnje polusintetske modifikacije sanciklina rezultirale su analogom koji posjeduje 7-dimetilamino skupinu nazvanim minociklin (slika 2), čije su se antibakterijske i farmakološke aktivnosti prema širokom spektru bakterijskih patogena značajno poboljšale, u usporedbi s prvom generacijom

tetraciklina i s doksiciklinom (Nelson i Levy, 2011; Nguyen i sur., 2014). Ovo poboljšanje može se objasniti činjenicom da minociklin ima puno veći afinitet za ribosom nego tetraciklin, pa zbog toga učinkovitije inhibira *in vitro* translaciju. Tako je minociklin postao jedan od najčešće korištenih tetraciklinskih antibiotika (Nelson i Levy, 2011; Nguyen i sur., 2014).



Slika 2. Druga i treća generacija tetraciklinskih antibiotika. Omadaciklin i eravaciklin su u kliničkoj fazi evaluacije (Petković i sur., 2017)

2.1.4. Treća generacija polusintetskih tetraciklina

Zbog povećane učestalosti bakterijske rezistencije na prvu i drugu generaciju tetraciklina, klinička upotreba tetraciklina značajno se smanjila u većini zemalja te u mnogim slučajevima više nisu lijekovi od izbora. U kasnim 1980-im povećana učestalost antibiotske rezistencije potaknula je farmaceutske kompanije, uključujući Wyeth (današnji Pfizer), da ponovno pokrenu ili prošire svoje programe istraživanja antibiotika. Wyeth je pokrenuo program za daljnje kemijske modifikacije minociklinskog skeleta, proizvodeći prvi klinički primjer tetraciklina koji je na C9 atomu D prstena (slika 2) imao amidnu funkcionalnu skupinu vezanu na glicinsku podjedinicu (Nelson i Levy, 2011; Nguyen i sur., 2014). Na ovaj način su proizveli seriju novih analoga za analizu i evaluaciju, navedeni kao glicilciklini. Mnogi od ovih spojeva su pokazali aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama te su

inhibirali i osjetljive i rezistentne bakterije. Ubrzo je glavni spoj tigeciklin (9-*t*-butilglicilamido-minociklin, Tygacyl, slika 2) ušao u kliničku evaluaciju te ga je FDA 2006. godine odobrila za upotrebu u bolnicama (Nelson i Levy, 2011). Tigeciklin pokazuje približno 5 puta veći afinitet za ribosome nego minociklin (Nelson i Levy, 2011; Nguyen i sur., 2014). Ovaj tetraciklin treće generacije bio je prvi koji je došao na tržište nakon 40 godina. Bio je specifično dizajniran u svrhu prevladavanja mehanizma rezistencije na tetraciklin, te je klinički aktivan unutar propisanih vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) prema Gram-pozitivnim patogenim bakterijama izoliranim na klinikama širom svijeta, uključujući i one rezistentne na druge antibiotike, kao što su MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*), vankomicin rezistentni enterokoki (VRE) i penicilin rezistentni *S. pneumoniae* (Nelson i Levy, 2011; Nguyen i sur., 2014). Zahvaljujući svojoj snažnoj aktivnosti prema nekim Gram-negativnim patogenim bakterijama, primjenjuje se kao krajnje rješenje u suzbijanju Gram-negativnih patogenih bakterija s višestrukom rezistencijom na antibiotike (Huttner i sur., 2012).

2.1.5. Tetraciklini u procesu razvoja

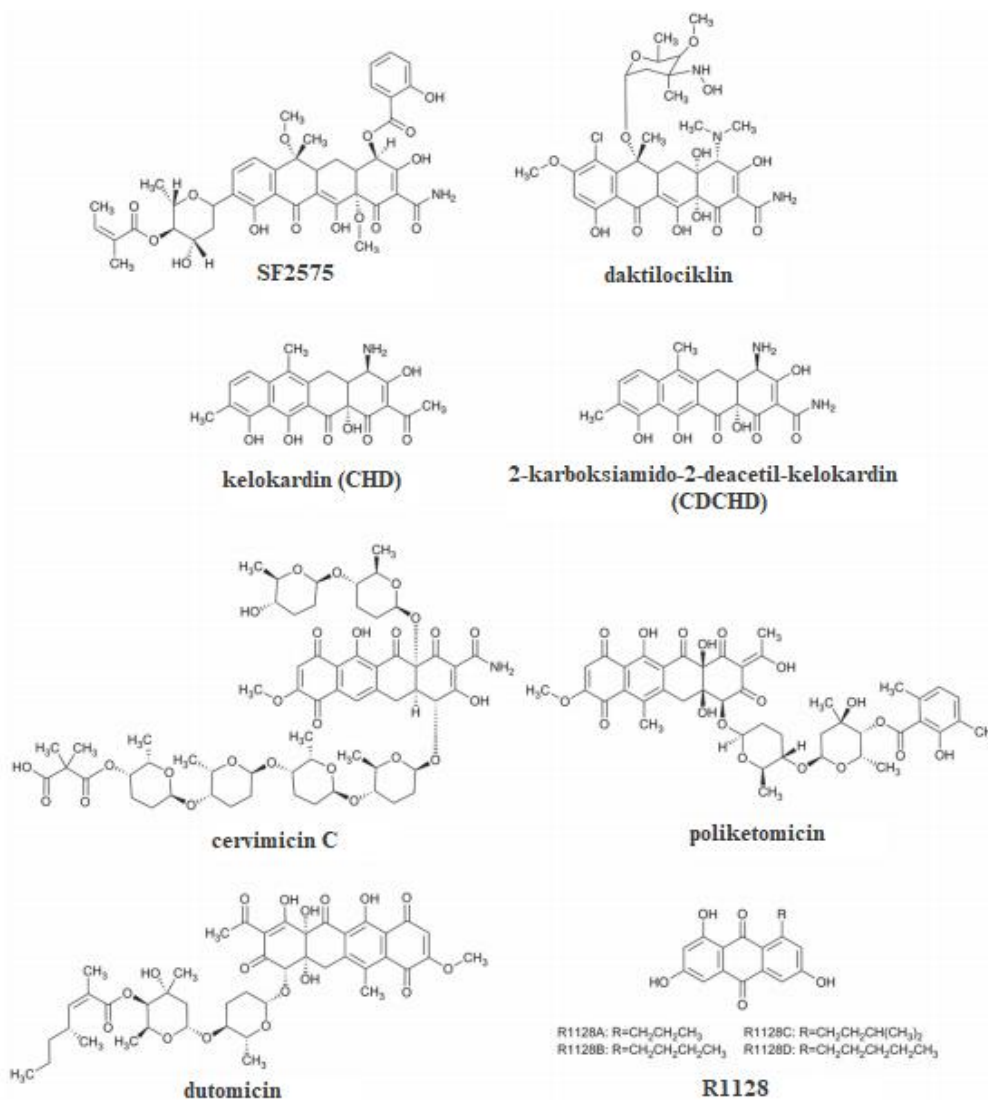
Primjenom polusintetske kemije temeljene na prijelaznim metalima za proizvodnju derivata tetraciklina, Paratek Pharmaceuticals (Boston, MA, SAD) je razvio 9-aminometilnu grupu aromatskog D prstena intermedijera minociklina koji se potom modificirao kako bi se proizveli analozi 9-alkilaminometil-minociklina s poboljšanom aktivnosti protiv širokog spektra bakterija osjetljivih i rezistentnih na tetraciklin (Draper i sur., 2014). Spoj nazvan omadaciklin (PTK 0796; slika 2) bio je izabran zbog svoje izrazite aktivnosti, niske toksičnosti i oralne biodostupnosti, te je u trećoj fazi kliničkih ispitivanja (Nelson i Levy, 2011; Nguyen i sur., 2014; Draper i sur., 2014).

S druge strane, tim kojeg vodi Myers na Sveučilištu Harvard razvio je proizvodnju brojnih novih tetraciklinskih antibiotika (Charest i sur., 2005). Ovaj jedinstveni sintetski pristup uključuje vezanje fragmenta BA prstena s prekursorom D prstena (C prsten se formira u ovom procesu), generirajući tako tetraciklinski skelet. Ovaj sustav za sintezu tetraciklina postavio je Tetrphase Pharmaceuticals (Watertown, MA, SAD), koji je doveo do nastajanja 7-fluorotetraciklin derivata pod šifrom TP-434 (eravaciklin, slika 2), a sadrži 7-fluoro i 9-pirolidinoacetoamido modifikacije D prstena (Clark i sur., 2012). Eravaciklin je pokazao da ima puno veći afinitet za ribosome nego tetraciklin - konstantno inhibira *in vitro* translaciju učinkovitije nego tetraciklin (Nelson i Levy, 2011; Nguyen i sur., 2014; Clark i sur., 2012).

Eravaciklin pokazuje sličan afinitet za vezanje na ribosom kao i tigeceklin. Eravaciklin, kojeg je razvio Tetrphase Pharmaceuticals, u trećoj je fazi kliničkih ispitivanja (Tetrphase Pharmaceuticals, 2015).

2.1.6. Atipični tetraciklini

Na temelju njihovog mehanizma djelovanja, odnosno, na temelju njihove sposobnosti inhibicije sinteze proteina, tetraciklini se mogu podijeliti u dvije grupe (Oliva i sur., 1992). Tipični tetraciklini, kao što su oksitetraciklin, minociklin, doksiciklin i tigeceklin, sastoje se od grupe učinkovitih inhibitora sinteze proteina koji se vežu na 30S podjedinicu ribosoma. S druge strane, postoji i druga skupina tetraciklina, kao što su kelokardin (CHD, slika 3) i anhidrotetraciklin, za koje se čini da nisu inhibitori sinteze proteina, bar ne oni učinkoviti, predstavljajući tako mogućnost za razvoj novih tetraciklina s drugačijim mehanizmom djelovanja (Oliva i sur., 1992). Tetraciklini prve skupine, takozvani tipični ili klasični tetraciklini, pokazuju reverzibilni bakteriostatski učinak, dok atipični tetraciklini druge skupine dovode do snažnog baktericidnog odgovora tako što narušavaju organizaciju bakterijske citoplazmatske membrane (Chopra i Roberts, 2001; Oliva i sur., 1992). Na primjer, CHD je prirodni poliketid kojeg proizvodi *Amycolatopsis sulphurea* (Oliver i Sinclair, 1964), dok su drugi atipični tetraciklini kemijski sintetizirani kao 6-tiatetraciklin (Rogalski i sur., 1977) ili nusprodukti u biosintezi OTC-a i CTC-a kao što su anhidrotetraciklin, anhidroklortetraciklin i 4-epianhidroklortetraciklin. Način djelovanja atipičnih tetraciklina još se mora razjasniti kako bi se omogućio razvoj ove skupine antibiotika. Zanimljivo, Abbott (Abbott Laboratories, Chicago, IL, SAD) je tijekom 1970-ih proveo drugu fazu kliničkih ispitivanja sa CHD u suradnji s bolnicom Sv. Duh (Zagreb, Hrvatska) za tretman infekcija urinarnog trakta (Molnar i sur., 1977). Međutim, unatoč snažnoj aktivnosti prema tetraciklin-rezistentnim patogenima, CHD nije dalje istraživao. Posljednjih je godina tim kojeg vodi prof. Petković sa Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ponovo pokrenuo biosintezu ovog atipičnog tetraciklinskog analoga kojeg proizvodi *A. sulphurea* (Lukežič i sur., 2013). Primjenom biosintetskog inženjerstva proizveli su CHD analoge, od kojih neki pokazuju snažnu aktivnost prema multirezistentnim patogenima, čak i prema Gram-negativnim patogenima koji danas predstavljaju veliku prijetnju u bolnicama, te su tako pokazali veliki potencijal atipičnih tetraciklina (Lešnik i sur., 2015).



Slika 3. Odabrani aromatski poliketidni metaboliti sa različitom biološkom aktivnošću. Njihovi odgovarajući klasteri gena predstavljaju bogat izvor biosintetskih enzima, koji se lako mogu koristiti u biosintetskom inženjerstvu za dobivanje novih derivata (Petković i sur., 2017)

2.1.7. Biosintetski put tetraciklinskih antibiotika

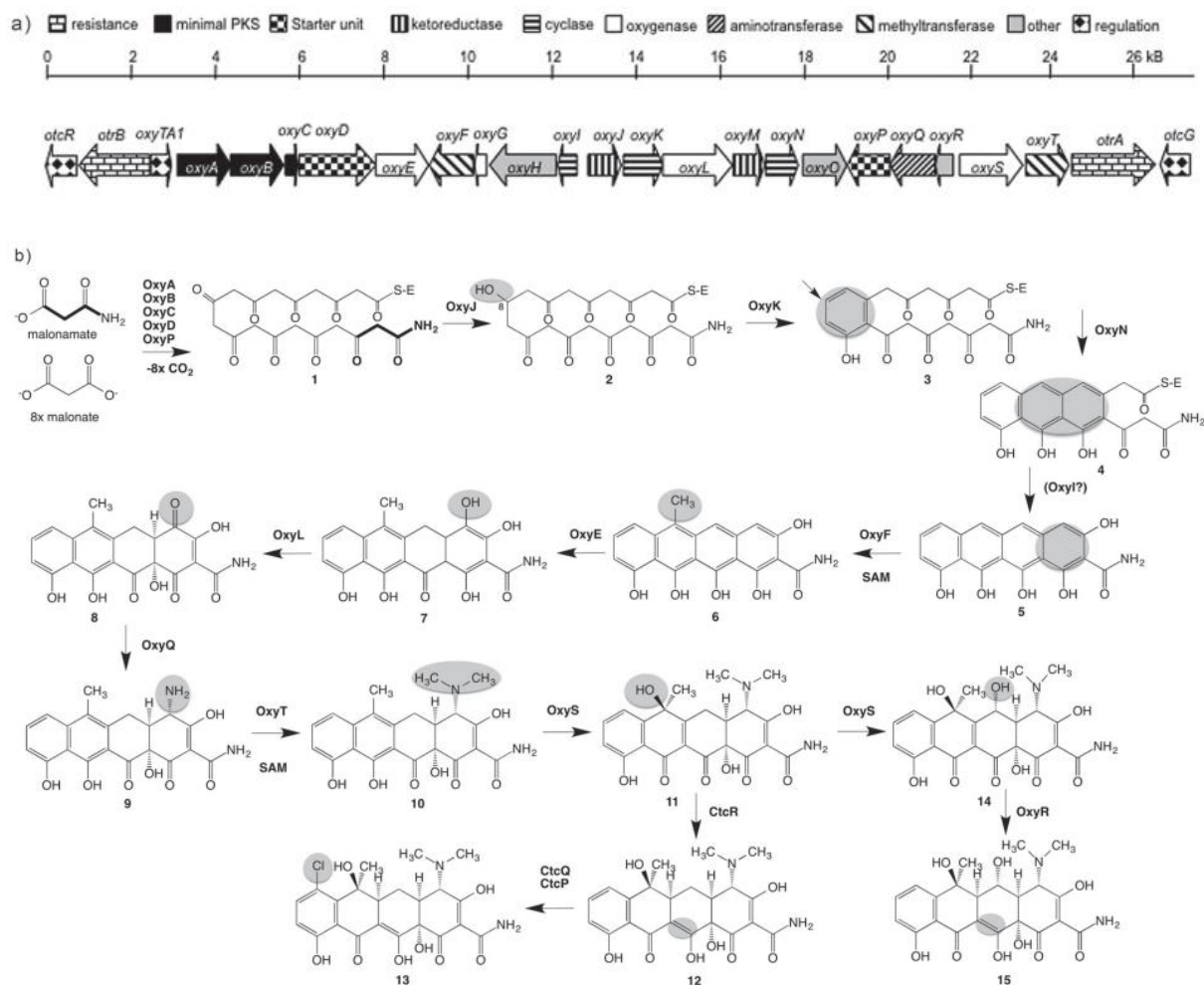
Tijekom 1960-ih godina u Lederli su proveli vrlo produktivna istraživanja o biosintezi CTC kojeg proizvodi *S. aureofaciens* (McCormick i Jensen, 1969). Proveli su eksperimente blokiranih mutanata dobivenih nasumičnom mutagenezom, što je rezultiralo proizvodnjom različitih intermedijera tetraciklina ili nusproizvoda (McCormick i Jensen, 1969). Cjelokupni biosintetski klasteri gena koji kodiraju za CTC i OTC (slika 4a) klonirani su 1996. i 1989. godine (Ryan i sur., 1996; Binnie i sur., 1989). Međutim, kompletna DNA sekvencija klastera gena koji kodira za biosintezu oksitetraciklina u divljem tipu soja *S. rimosus* objavljena je tek

2006. godine (Zhang i sur., 2006). Također su bili identificirani neki geni koji sudjeluju u regulaciji klastera gena OTC-a i CTC-a (Yin i sur., 2015). Važne informacije o biosintezi CTC-a, osobito povezane s korakom klorinacije u biosintezi CTC-a, doprinjeli su Dairi i sur. (1995), a Zhu i sur. (2013) su ih nedavno detaljnije opisali. Međutim, najopsežnija istraživanja povezana s biosintezom tetraciklina provedena su na biosintetskom putu OTC-a kojeg proizvodi *S. rimosus*.

Rane studije na biosintezi OTC-a i CTC-a provela je skupina istraživača iz Pfizer (Sandwich, VB), Lederle i Plive (Zagreb, Hrvatska), uglavnom između 1960-ih i 1980-ih godina. Akademske skupine bivše Čehoslovačke i hrvatski istraživači Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu proveli su koristan rad na genetici proizvodnih sojeva tetraciklina, kao i na biosintezi OTC-a i CTC-a (Vaněk i sur., 1973). Ruski znanstvenici iz All-Union Research Institute for Antibiotics u Moskvi su također doprinjeli području genetike proizvodnje OTC-a u *S. rimosus*, njihov rad je uglavnom bio objavljivan u ruskim časopisima (Mindlin i sur., 1961). Rane kružne kromosomske mape tri soja *S. rimosus* i *S. rimosus* mutanata, blokiranih u proizvodnji OTC-a, neovisno su konstruirale dvije istraživačke skupine, Friend and Hopwood u Velikoj Britaniji (Friend i Hopwood, 1971) te Alačević i sur. u Zagrebu (Alačević, 1973; Pigac i Alačević, 1979). Analiza mutanata koji ne proizvode oksitetraciklin početno su predložili poziciju nekih lokusa odgovornih za biosintezu oksitetraciklina u donjem dijelu mape. Zanimljivo, ove studije ističu dvije lokacije gena uključenih u biosintezu OTC-a na fizičkoj mapi kromosoma *S. rimosus* (Alačević, 1973; Pigac i Alačević, 1979). Početkom 1980-ih, Pfizerova grupa je objavila napredne genetičke i biokemijske studije temeljene na *S. rimosus* mutantima smanjene sposobnosti biosinteze OTC-a (Rhodes i sur., 1981).

Tijekom ranih 1980-ih, korištenjem molekularnog pristupa, a znajući da su geni uključeni u biosintezu sekundarnih metabolita najčešće grupirani na jednoj lokaciji, istraživači u Pfizeru uspjeli su klonirati cjelokupni klaster gena koji kodira za biosintezu oksitetraciklina (slika 4a) (Butler i sur., 1990). Potom su uspjeli heterologno eksprimirati cijeli klaster gena oksitetraciklina u *Streptomyces lividans* i *Streptomyces albus*, što je rezultiralo proizvodnjom oksitetraciklina u heterolognim domaćinima. Ovo je bio značajan uspjeh te je bilo potvrđeno da je cijeli biosintetski put oksitetraciklina, veličine otprilike 35 kb, lociran na jednom mjestu na kromosomu *S. rimosus* (Binnie i sur., 1989). Ova postignuća su kasnije pratila suradnička istraživanja između Hunterove grupe u Glasgou (Velika Britanija) (Petković i sur., 1999) i istraživačka grupa iz Zagreba (Hrvatska) koja je radila u farmaceutskoj kompaniji Plivi (Perić-

Concha i sur., 2005; Hranueli i sur., 1999). Međutim, tijekom zadnjeg desetljeća, najznačajniji uvid u biosintezu oksitetraciklina ostvarila je Tangova istraživačka skupina na Sveučilištu Kalifornija (Los Angeles, SAD) (Wang i sur., 2013).



Slika 4. Shematski prikaz: a) klastera gena koji kodiraju za biosintezu oksitetraciklina iz *S. rimosus*. Enzimska aktivnost svakog pojedinog navodnog gena označena je različitim simbolima prikazanim u legendi. Funkcija svakog genskog produkta u klasteru gena oksitetraciklina (pod a) odgovara predloženom biosintetskom putu oksitetraciklina (pod b); b) biosintetski put oksitetraciklina (OTC) i klortetraciklina (CTC), temeljeni na klasterima gena OTC-a i CTC-a iz *S. rimosus* i *S. aureofaciens*. Pozicija na tetraciklinskom skeletu svakog predloženog prekursora, koja je modificirana odgovarajućim enzimom iz OTC (CTC) enzimskog kompleksa, na pretpostavljenom koraku u biosintezi je osjenčana (Petković i sur., 2017)

2.2. ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA

Antibiotička rezistencija prijetnja je ljudskom zdravlju širom svijeta jer dovodi do pojave višestruke otpornosti bakterija na antibiotike koje su prije bile osjetljive na njih. Bakterije otporne na antibiotike glavni su razlog pojave zdravstvenih komplikacija koje dovode do povećane smrtnosti i neuspješnog liječenja. Neregulirana upotreba antibiotika prilikom uzgoja životinja jedan je od glavnih razloga širenja antibiotičke rezistencije. Genetički markeri koji su odgovorni za rezistenciju na lijekove proširili su se među različitim bakterijskim vrstama horizontalnim transferom gena. Zbog toga su regulacija upotrebe antibiotika tijekom uzgoja životinja i odgovarajuće mjere sigurnosti na farmama neophodni za kontrolu bakterija rezistentnih na antibiotike (Inbaraj i sur., 2019). Upotreba veterinarskih lijekova u životinjskoj hrani, kao što su antibiotici, promotori rasta, nesteroidni protuupalni lijekovi, sredstva za uspavlivanje itd., može dovesti do zdravstvenih problema kod ljudi. Ostaci takvih lijekova mogu biti prisutni u hrani životinjskog podrijetla, uključujući meso goveda, svinja i peradi, mlijeko i mliječne proizvode, jaja, ribu i plodove mora te med. Također, mogu dovesti do toksičnosti kao što su alergijske reakcije ili dugotrajnih zdravstvenih problema kao što su maligne bolesti i poremećaji ravnoteže crijevne mikrobiote. Upotreba antibiotika u hrani životinjskog podrijetla može uzrokovati razvoj antibiotičke rezistencije u bakterijama, što može dovesti do ozbiljnih, neizlječivih infekcija kod ljudi. Prisutnost rezidua antibiotika u hrani životinjskog podrijetla može se pojaviti legalnom i zabranjenom upotrebom veterinarskih lijekova te se može pojaviti izravnom primjenom antibiotika u hrani životinjskog podrijetla ili putem okoliša, sa različitim razinama rezidua ovisno o uzgajanim životinjama i metodama primjene antibiotika. Većina zemalja su odredile dozvoljene koncentracije rezidua antibiotika u hrani životinjskog podrijetla, koje prate rutinskim i ciljanim nadzorom. Iako se kršenje dozvoljenih koncentracija rezidua pojavljuje u manje od 1% većine uzoraka ispitanih u Europi i Americi, problem rezidua lijekova se javlja širom svijeta (Bedale, 2019).

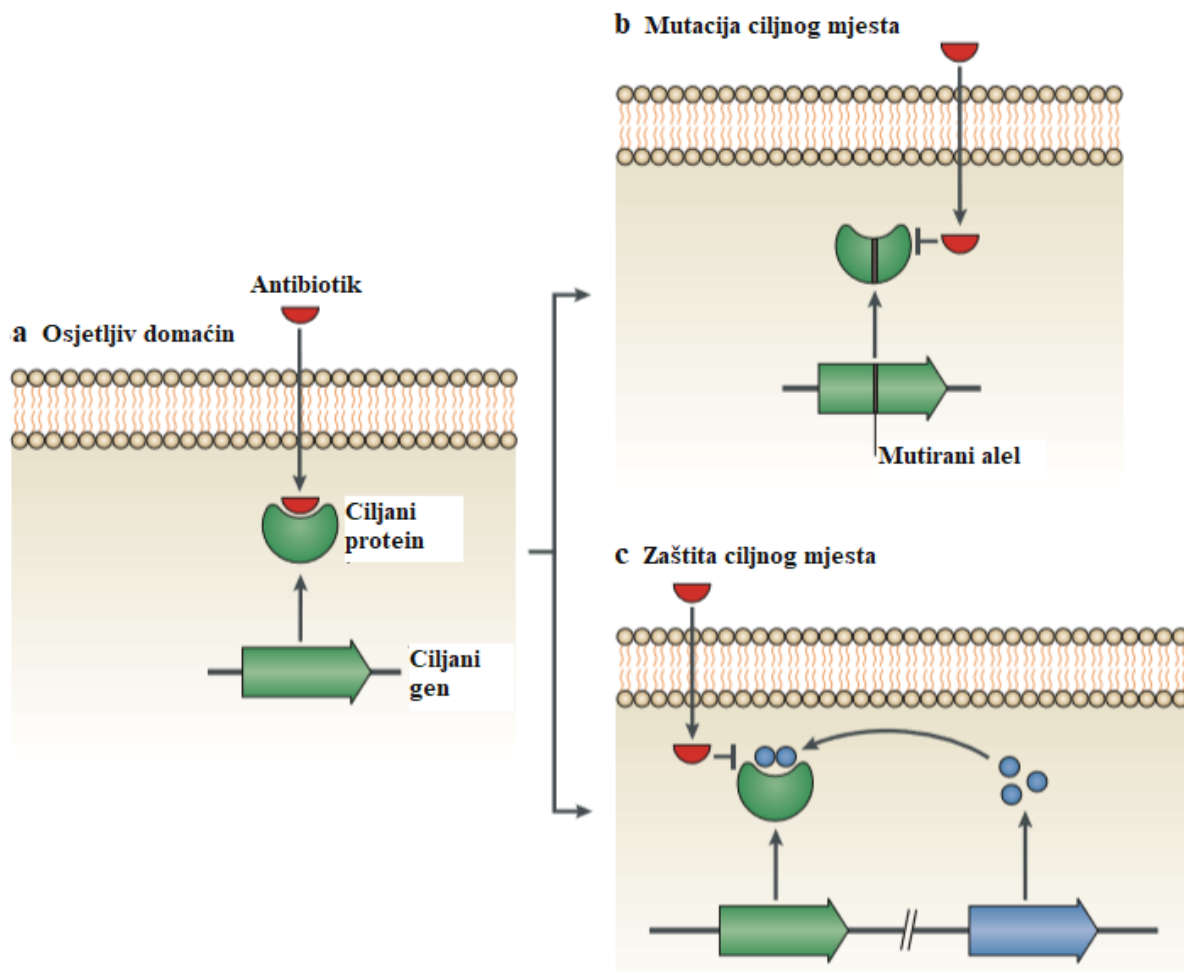
2.2.1. Molekularni mehanizmi antibiotičke rezistencije

Broj infekcija uzrokovanih patogenim bakterijama koje pokazuju višestruku rezistenciju na antibiotike (MDR, *multidrug-resistant*) povećava se širom svijeta, te je niz nelječivih infekcija postao stvarnost (Walker i Fowler, 2011; World Economic Forum, 2014). Osim povećanja rezistencije na postojeće lijekove, problem je i nedostatak novih antibiotika u razvoju.

Bakterije mogu imati urođenu rezistenciju na antibiotike ili ju mogu steći mutacijama u kromosomalnim genima i horizontalnim transferom gena. Urođena rezistencija bakterijskih vrsta na određene antibiotike je sposobnost bakterije da izbjegne djelovanje tog antibiotika kao posljedica urođenih strukturnih ili funkcionalnih karakteristika (Blair i sur., 2015). Stečena rezistencija na antibiotike može biti posljedica nekoliko mehanizama, koji se mogu podijeliti u tri glavne grupe: prva, mehanizmi koji smanjuju unutarstaničnu koncentraciju antibiotika kao posljedica slabog prodiranja antibiotika u bakteriju ili efluksa antibiotika, druga, mehanizmi koji su uključeni u modifikaciju ciljnih mjesta na koje djeluje antibiotik bilo genetičkim mutacijama ili posttranslacijskim modifikacijama, i treća, mehanizmi koji inaktiviraju antibiotik hidrolizom ili modifikacijama (Wright, 2011).

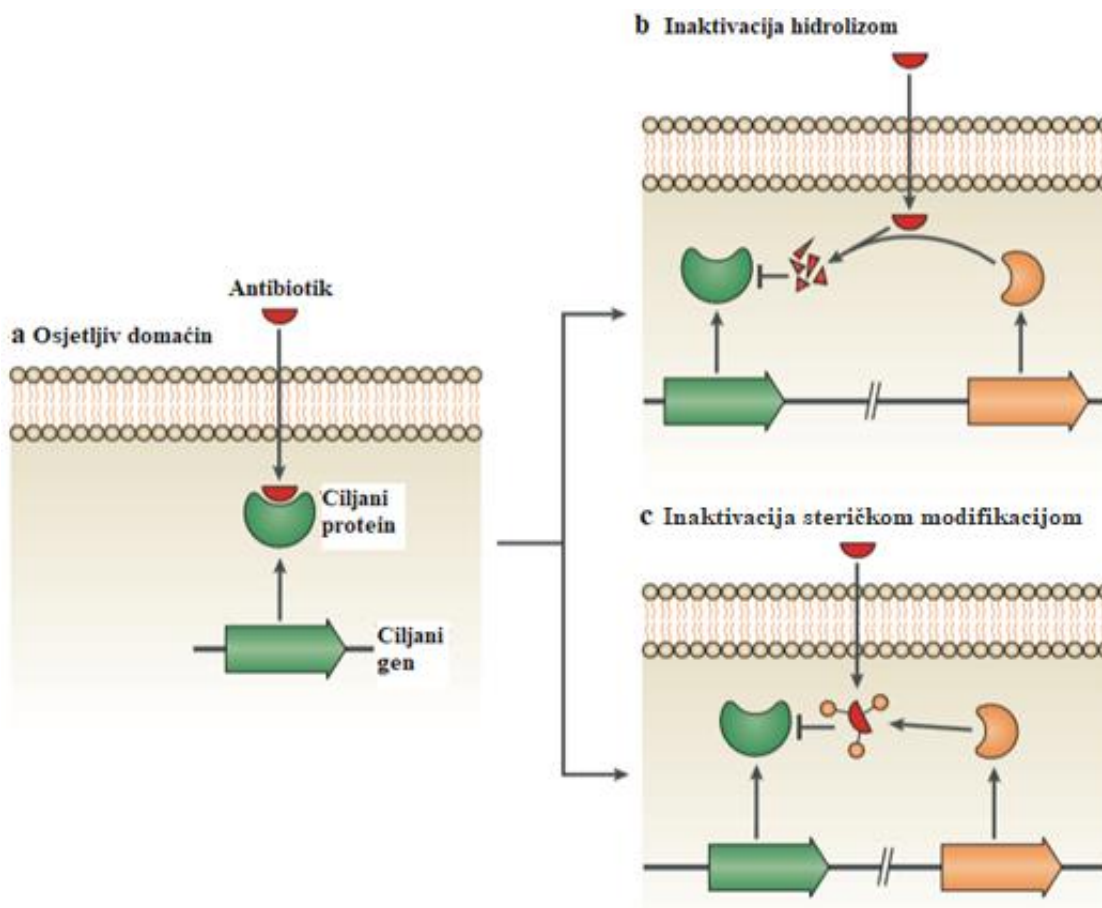
Smanjena permeabilnost i povećani efluks antibiotika mehanizmi su rezistencije kod bakterija kojima se sprječava pristup antibiotika mjestu djelovanja. Gram-negativne bakterije urođeno imaju manju propusnost za mnoge antibiotike zbog njihove vanjske membrane koja tvori nepropusnu barijeru (Kojima i Nikaido, 2013). Smanjenje permeabilnosti vanjske membrane i ograničavanje ulaska antibiotika u bakterijsku stanicu postiže se smanjenom ekspresijom porina ili zamjenom postojećih porina selektivnijim kanalima (Wozniak i Waldor, 2010). S druge strane, bakterijske efluks pumpe aktivno transportiraju mnoge antibiotike iz stanice čime značajno doprinose urođenoj rezistenciji Gram-negativnih bakterija na mnoge antibiotike. Povišena razina ekspresije gena koji kodiraju za efluks pumpe također doprinosi povećanoj rezistenciji na antibiotike koji su prethodno bili učinkoviti. Neke efluks pumpe imaju veliku specifičnost za supstrat (Tet pumpe kod tetraciklinskih antibiotika), ali mnoge pumpe transportiraju širok spektar strukturno različitih antibiotika (eng. *multidrug-resistance* (MDR) *efflux pumps*) (Kim i sur., 2013). Neke bakterije imaju gene za te efluks pumpe na plazmidima koji se mogu prenositi između bakterija (Dolejska i sur., 2013). Ova spoznaja je zabrinjavajuća zbog toga što pokazuje da je mehanizam rezistencije prenosiv te da se može ubrzano prenositi na druge klinički važne patogene (Blair i sur., 2015).

Većina antibiotika se specifično veže na ciljna mjesta s visokim afinitetom, čime sprječava njihovu uobičajenu aktivnost. Promjene u strukturi ciljnih mjesta za antibiotike koje sprječavaju učinkovito vezanje antibiotika, pri čemu ciljno mjesto zadržava svoju uobičajenu funkciju, mogu uzrokovati rezistenciju (slika 5) (Leclercq, 2002). Zaštita ciljnog mjesta modifikacijom također može predstavljati učinkovit mehanizam antibiotičke rezistencije koji ne zahtijeva mutacije u genima koji kodiraju za ciljane molekule (slika 5) (Kumar i sur., 2014).



Slika 5. Promjene ciljnog mjesta djelovanja antibiotika kao jedan od mehanizama antibiotičke rezistencije kod bakterija. a) Osjetljiv domaćin kod kojeg se antibiotik može specifično vezati na svoje ciljno mjesto i pokazati inhibitorni učinak. b) Mutacija ciljnog mjesta ili rekombinacija kojom se osigurava mozaični alel rezultira funkcionalnim ciljnim mjestom sa smanjenim afinitetom za antibiotik, koji se ne veže učinkovito zbog čega ima smanjen ili zanemariv učinak. c) Modifikacija ciljnog mjesta adicijom kemijske grupe također može spriječiti vezanje antibiotika bez promjene primarne proteinske strukture ciljnog mjesta, zbog čega zadržava svoju aktivnost (Blair i sur., 2014).

Osim sprječavanja antibiotika da uđu u stanicu i promjene njihovih ciljnih mjesta, bakterije mogu razgraditi ili modificirati antibiotike, sprječavajući tako njihovo djelovanje. Adicija kemijske grupe na molekulu antibiotika pomoću bakterijskih enzima uzrokuje antibiotičku rezistenciju tako što sprječava vezanje antibiotika na njegovo ciljno mjesto djelovanja kao posljedica steričkih modifikacija (slika 6) (Wright, 2005).



Slika 6. Izravna modifikacija molekule antibiotika kao jedan od mehanizama antibiotičke rezistencije kod bakterija. a) Osjetljiv domaćin kojeg antibiotik učinkovito inhibira. b) Sinteza enzima koji hidrolizira antibiotik, sprječava njegovo vezanje na ciljno mjesto i uzrokuje rezistenciju. c) Sinteza enzima koji modificira strukturu antibiotika, sprječava njegovo vezanje na ciljno mjesto i uzrokuje rezistenciju (Blair i sur., 2014).

Kao rezultat široke upotrebe antibiotika u humanoj medicini, liječenju životinja, hortikulturi, pčelarstvu i laboratorijima za genetičko inženjerstvo, veliki je evolucijski pritisak pojave antibiotičke rezistencije (Blair i sur., 2015).

2.3. ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA

2.3.1. Rezidui tetraciklinskih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla

Ostatci tetraciklinskih antibiotika mogu zaostati u hrani životinjskog podrijetla zbog pogrešnog liječenja određene životinjske vrste, prevelike količine unesenog lijeka u odnosu na dozvoljenu dozu ili zbog toga što je životinja konzumirala hranu kontaminiranu antibioticima

(Makovec i sur., 2014). U tablici 1 navedene su propisane NDK vrijednosti za tetraciklinske antibiotike u hrani životinjskog podrijetla.

Tablica 1. Najveće dopuštene količine (NDK) tetraciklinskih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla (Europska komisija, 2010)

| Farmakološki djelatna tvar | Marker rezidua | Vrsta životinje | Ciljno tkivo | NDK (µg/kg) | Napomene (u skladu s člankom 14 (7) Uredbe (EZ) br. 470/2009) | Terapeutska klasifikacija |
|----------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Doksiciklin | doksiciklin | goveđa | mišić | 100 | Ne primjenjuje se kod životinja čije se mlijeko koristi za hranu. | protuupalne tvari/antibiotici |
| | | | jetra | 300 | | |
| | | | bubreg | 600 | | |
| | | svinje, perad | mišić | 100 | Ne primjenjuje se kod životinja čija se jaja koriste za hranu. | |
| | | | koža i masno tkivo | 300 | | |
| | | | jetra | 300 | | |
| Klortetraciklin | zbroj izvornog spoja i njegovog 4-epimera | sve vrste životinja koje se koriste za proizvodnju hrane | mišić | 100 | Za ribe koštunjače NDK za mišić se odnosi na "mišić i kožu u prirodnom omjeru". NDK za jetru i bubreg ne odnosi se na ribe koštunjače. | protuupalne tvari/antibiotici |
| | | | jetra | 300 | | |
| | | | bubreg | 600 | | |
| | | | mlijeko | 100 | | |
| | | | jaja | 200 | | |
| Oksitetraciklin | zbroj izvornog spoja i njegovog 4-epimera | sve vrste životinja koje se koriste za proizvodnju hrane | mišić | 100 | Za ribe koštunjače NDK za mišić se odnosi na "mišić i kožu u prirodnom omjeru". NDK za jetru i bubreg ne odnosi se na ribe koštunjače. | protuupalne tvari/antibiotici |
| | | | jetra | 300 | | |
| | | | bubreg | 600 | | |
| | | | mlijeko | 100 | | |
| | | | jaja | 200 | | |
| Tetraciklin | zbroj izvornog spoja i njegovog 4-epimera | sve vrste životinja koje se koriste za proizvodnju hrane | mišić | 100 | Za ribe koštunjače NDK za mišić se odnosi na "mišić i kožu u prirodnom omjeru". NDK za jetru i bubreg ne odnosi se na ribe koštunjače. | protuupalne tvari/antibiotici |
| | | | jetra | 300 | | |
| | | | bubreg | 600 | | |
| | | | mlijeko | 100 | | |
| | | | jaja | 200 | | |

2.3.2. Metode za određivanje rezidua tetraciklina u hrani životinjskog podrijetla

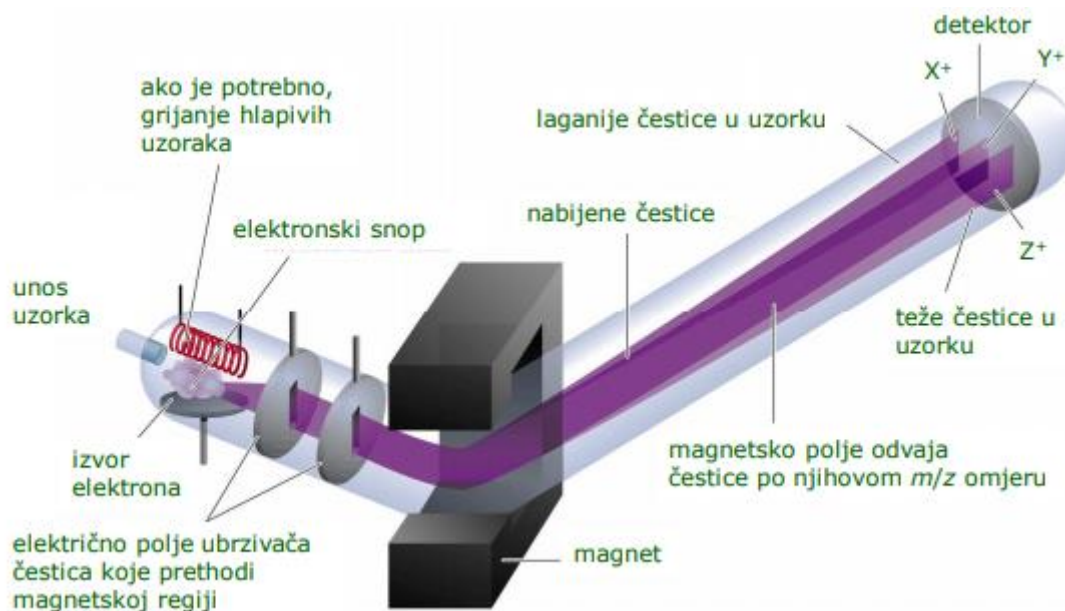
Odabir metode za određivanje rezidua antibiotika u hrani životinjskog podrijetla temelji se na određivanju koncentracije rezidua, te se u tu svrhu koriste:

- kvantitativne metode kojima se određuje je li koncentracija prisutnih antibiotika u uzorcima iznad ili ispod dozvoljene (npr. HPLC, GC)
- metode za potvrdu (engl. *confirmatory methods*) kojima se identitet rezidua i njegova koncentracija potvrđuju s najvećom mogućom preciznošću i točnošću (spektrometrija masa (MS): GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS/MS) (Makovec i sur., 2014).

Orijentacijske metode (engl. *screening methods*) omogućavaju obradu velikog broja uzoraka u što kraćem vremenu te detekciju svih potencijalno pozitivnih uzoraka. Pozitivni uzorci dalje se analiziraju kvantitativnom potvrdom metodom koja omogućuje jasnu identifikaciju i kvantifikaciju analita (Makovec i sur., 2014).

2.3.2.1. Maseni spektrometar (MS)

Maseni spektrometar (MS) je instrument koji generira ione u plinovitoj fazi te ih razdvaja prema omjeru njihove mase i naboja (m/z) pod djelovanjem električnog polja u vakuumu. Maseni spektrometar sastoji se od ionizatora, analizatora masa i detektora.



Slika 7. Shematski prikaz masenog spektrometra (Barišić, 2016)

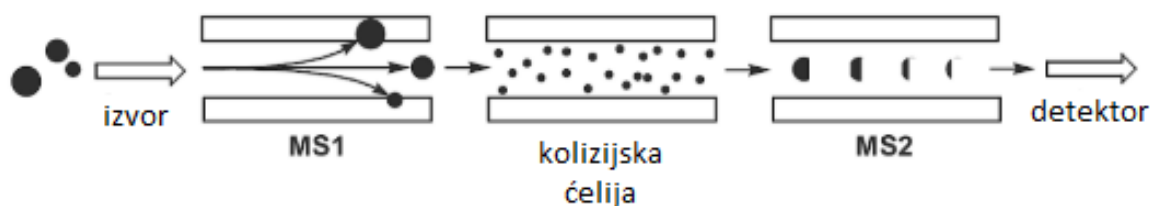
Princip rada masenog spektrometra: uzorak se podvrgava visokim energijama snopa elektrona, nabijene čestice se ubrzavaju u akceleratoru djelovanjem električnog polja, nastali ioni se provode kroz analizator masa koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu, razdvojeni ioni odlaze na detektor gdje proizvode električni signal koji se može detektirati na osciloskopu, pisaču, računaru ili na nekom drugom uređaju (slika 7) (Barišić, 2016).

Kromatografske tehnike vezane na spektrometriju masa pružaju veliku količinu informacija i omogućuju istodobno odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju rezidua različitih skupina antibiotika (Gentili i sur., 2005).

Tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS)

Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri paralelne metalne šipke s različitim nabojima (dvije nasuprotne šipke imaju primjenjiv pozitivan potencijal, a druge dvije šipke imaju negativni potencijal). Primjenjeni naponi utječu na putanju iona koji putuju niz putanju - samo ioni omjera mase i naboja (m/z) koji odgovara vrijednostima primjenjenog električnog

polja, prolaze kroz kvadrupolni filter, a svi drugi ioni su izbačeni sa svoje putanje (Barišić, 2016).

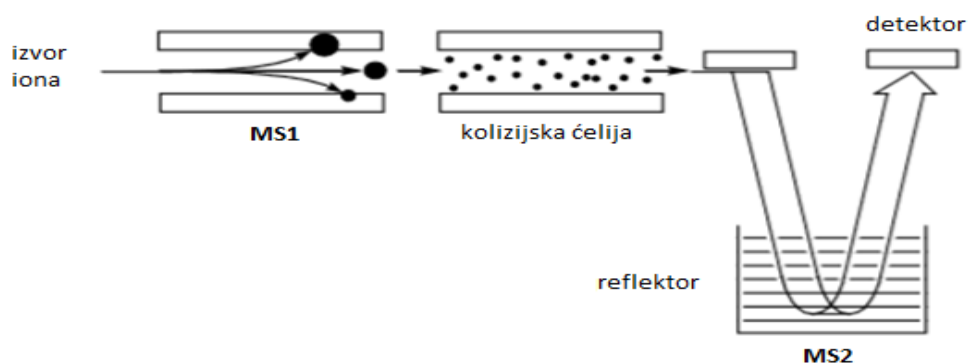


Slika 8. Shema MS/MS uređaja (Henderson i McIndoe, 2005)

Prvi kvadrupol (MS1) je postavljen tako da propušta ione određene m/z vrijednosti u kolizijsku ćeliju koja sadrži inertni plin kako bi se ioni dalje fragmentirali. Treći kvadrupol (MS2) skenira raspon masa od interesa i generira spektar produkt iona, koji su dobiveni od prekursor iona u prvom kvadrupolu (MS1) (slika 8). Prednosti ovakve izvedbe masenog spektrometra su jednostavnost, brzo skeniranje, ponovljivost, selektivnost i osjetljivost (Henderson i McIndoe, 2005).

Tekućinska koromatografija ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS)

Analizator vremena preleta (engl. *Time of flight*) jedan je od najjednostavnijih izvedbi masenog analizatora - svi ioni su istodobno ubrzani istim električnim pulsom te putuju kroz cijev bez utjecaja magnetskog polja. Ioni manjeg omjera m/z (manje molekulske mase) putuju brže od iona većeg omjera m/z (veće molekulske mase) što se prikazuje masenim spektrom (Barišić, 2016).



Slika 9. Shema Q-TOF-MS uređaja (Henderson i McIndoe, 2005)

Prvi maseni analizator (MS1) je kvadrupol koji propušta samo ione određenog omjera m/z u kolizijsku ćeliju, gdje se dalje fragmentiraju. Drugi maseni analizator (MS2) je analizator

vremena preleta koji se koristi za prikupljanje podataka produkt iona za izradu spektra (slika 9). Prednosti ovakve izvedbe masenog spektrometra su jednostavnost, velika brzina analize, selektivnost, osjetljivost te visoka rezolucija određivanja mase (Henderson i McIndoe, 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE I OPREMA

3.1.1. Standardi

- Klortetraciklin, Vetranal
- Epiklortetraciklin, Toronto Research Chemicals (TRC)
- Oksitetraciklin, Vetranal
- Epioksitetraciklin, Toronto Research Chemicals (TRC)
- Tetraciklin, Vetranal
- Epitetraciklin, Vetranal
- Doksiciklin, Vetranal
- Interni standard: Tetraciklin-d6, Toronto Research Chemicals (TRC)

3.1.2. Kemikalije

- Acetonitril, LC-MS čistoće
- Dimetilsulfoksid (DMSO)
- Metanol (MeOH), LC-MS čistoće
- Mravlja kiselina (HCOOH), LC-MS čistoće
- Ultračista voda
- Magnezijev sulfat (MgSO₄)
- Amonijev acetat (CH₃COONH₄)

3.1.3. Oprema i materijali

- Uobičajeni laboratorijski materijal
- Homogenizator tipa stator/rotor (Polytron ili ekvivalentno)
- Tehnička vaga (preciznost ± 0,001 g)
- Vortex homogenizator
- 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)
- Centrifuga do 4500 o/min
- Centrifuga do 15200 o/min
- Ultrazvučna kupelj
- Hladnjak +2 do +8°C

- Zamrzivač s najnižom temperaturom od -18°C
- Digestor
- Tamne plastične *viale* od 2 mL
- Tamne plastične *viale* s insertom od 300 µL
- PTFE čepovi sa silikonskom septom
- Sustav evaporacije tekućim dušikom sa kupelji
- Dušik 99,999%
- Kupka za degaziranje
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 um, 2,1x150 mm, Waters
- Predkolona: Acquity HSS T3 1.8 µM vanguardPre-Col, Waters
- LC-Q-TOF: HPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity s Analizatorom vremena preleta TOF (engl. *Time of flight*) Q-TOF G6550A
- LC-MS/MS: HPLC Agilent Tech. 1290 i Triple Quad LC/MS 6470 opremljen sa ESI sustavom za ionizaciju, sa uređajem za samouzorkovanje povezani sa računalom sa softverom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka (ili ekvivalent) - Agilent Technologies 6470 Triple Quad

3.2. METODE RADA

3.2.1. Čuvanje uzoraka

Prilikom zaprimanja uzoraka jaja radi se homogena mješavina žumanjka i bjelanjka od više od 6 cijelih jaja i raspoređuje u poduzorke u skladu sa postupkom uređenim unutar laboratorija.

3.2.2. Priprema otopina

- **Mobilna faza A:** 0,1% mravlja kiselina (u tikvicu od 1000 mL dodati 1 mL mravlje kiseline, nadopuniti do oznake ultračistom vodom), valjanost mobilne faze A je 4 dana čuvana na sobnoj temperaturi u zatamnjenom posuđu
- **Mobilna faza B:** MeOH (LC-MS čistoće)
- **0,5% mravlje kiseline u acetonitrilu:** pipetirati 2,5 ml mravlje kiseline u tikvicu od 500 mL, nadopuniti do oznake acetonitrirom
- **5M amonijev acetat:** 38,5 g amonijevog acetata otopiti u 100 mL ultračiste vode
- **5 mM amonijevog acetata:** pipetirati 200 µL 5M amonijevog acetata u tikvicu od 200 mL, nadopuniti do oznake ultračistom vodom

3.2.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova

Bazne otopine standarda pripremaju se zasebno nakon čega se pripremaju mješavine zasebnih grupa analita. Radne otopine veterinarskih lijekova služe za obogaćivanje kontrolnih uzoraka, odnosno za pripremu matriks kalibracijske krivulje i za izradu standardne krivulje. Bazne otopine svih tetraciklina pripremljene su u koncentraciji 1 mg mL⁻¹. One služe za pripremu radne otopine mješavine tetraciklina koja se onda koristi za pripremu kalibracijske krivulje. Standardne radne otopine pripremaju se ovisno o njihovim NDK vrijednostima (najvećim dozvoljenim količinama) koje su propisane Uredbom komisije (EZ) br. 37/2010. Najveća dozvoljena količina tetraciklina u jajima iznosi 100 µg kg⁻¹ za klortetraciklin, epiklortetraciklin, oksitetraciklin, epioksitetraciklin, tetraciklin i epitetraciklin, odnosno zbroj NDK izvornog spoja i njegovog 4-epimera iznosi 200 µg kg⁻¹, dok je prisutnost doksiciklina u jajima zabranjena. Priprema standardne radne otopine veterinarskih lijekova opisana je u tablici 2.

Tablica 2. Priprema standardnih radnih otopina veterinarskih lijekova (Hrvatski veterinarski institut, 2018)

| ANALIT | POLAZNA OTOPINA (ng mL ⁻¹) | Polazni volumen V ₁ (mL) | Ciljana koncentracija c ₂ (ng mL ⁻¹) | Ciljani volumen V ₂ (mL) - tikvica | Oznaka standardne mješavine MIX S1-TTC |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Klortetraciklin, Epiklortetraciklin, Oksitetraciklin, Epioksitetraciklin, Tetraciklin, Epitetraciklin | 1000000 | 0,5 | 20000 | 25 | S1 |
| Doksiciklin | | 0,1 | 4000 | | |
| Oznaka polaznog standarda MIX S1-TTC | POLAZNA OTOPINA (ng mL ⁻¹) | Polazni volumen V ₁ (mL) | Ciljana koncentracija c ₂ (ng mL ⁻¹) | Ciljani volumen V ₂ (mL) - tikvica | Oznaka standardne mješavine MIX S2-JAJA |
| Klortetraciklin, Epiklortetraciklin, Oksitetraciklin, Epioksitetraciklin, Tetraciklin, Epitetraciklin | 20000 | 1 | 2000 | 10 | S2 |
| Doksiciklin | 4000 | 1 | 400 | | |

3.2.4. Priprema internog standarda

U uzorke za kalibraciju te u ispitne uzorke dodaje se otopina internog standarda MIX-Q-TOF-IS2 pri koncentraciji koja je približno jednaka MRL (engl. *maximum residue level*) koncentraciji odgovarajućeg analita. Tetraciklin-d6 koristio se kao interni standard za određivanje tetraciklinskih antibiotika. U tablici 3 prikazan je postupak pripreme otopine internog standarda.

Tablica 3. Priprema otopine internog standarda za tetraciklinske antibiotike (Hrvatski veterinarski institut, 2018)

| ANALIT | POLAZNA OTOPINA (ng mL ⁻¹) | Polazni volumen V ₁ (mL) | Ciljana koncentracija c ₂ (ng mL ⁻¹) | Ciljani volumen V ₂ (mL) - tikvica | Oznaka standardne mješavine MIX-Q-TOF-IS1 |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Tetraciklin-d6 | 1000000 | 0,5 | 20000 | 10 | IS1 |
| Oznaka polaznog standarda MIX-Q-TOF-IS1 | POLAZNA OTOPINA (ng mL ⁻¹) | Polazni volumen V ₁ (mL) | Ciljana koncentracija c ₂ (ng mL ⁻¹) | Ciljani volumen V ₂ (mL) - tikvica | Oznaka standardne mješavine MIX-Q-TOF-IS2 |
| IS1 | 20000 | 5 | 4000 | 25 | IS2 |

Bazne otopine standarda i internih standarda su stabilne 6 mjeseci skladištene u zamrzivaču na -20°C. Radne otopine S1 i IS1 stabilne su 6 mjeseci pohranjene u zamrzivaču na -20°C. Radne otopine S2 te IS2 stabilne su 2 mjeseca pohranjene u hladnjaku na +2 do +8°C.

3.2.5. Priprema uzoraka

Kontrolni uzorak stanja instrumenta je standard pripremljen pri koncentraciji koji odgovara L3 koncentracijskoj razini.

Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*) predstavlja mješavinu acetonitrila i vode (200 µL + 800 µL).

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

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

Obogaćeni kontrolni uzorak – matriks kalibracijska krivulja

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

Priprema standardne krivulje na otapalu

Za kontrolu linearnosti odziva instrumenta te stabilnosti standardnih otopina priprema se kalibracijska krivulja na otapalu. Postupak pripreme standardne krivulje na otapalu za jaja opisan je u tablici 4.

Tablica 4. Standardna krivulja na otapalu za jaja (Hrvatski veterinarski institut, 2018)

| | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | Slijepa proba |
|-------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | (μL) | (μL) | (μL) | (μL) | (μL) | (μL) |
| H₂O | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| MeOH | 140 | 125 | 100 | 75 | 50 | 200 |
| MIX S2-JAJA | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 | - |
| MIX-Q-TOF-IS2 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | - |
| Koncentracijska razina koja odgovara koncentraciji u uzorku | | | | | L3= MRL | |



Slika 10. Viale s otopinama za pripremu standardne krivulje na otapalu (vlastita fotografija)

Priprema matriks kalibracijske krivulje

U svakoj analizi priprema se matriks kalibracijska krivulja na način da se određeni matriks, u ovom slučaju jaja, obogati na 5 koncentracijskih razina ovisno o postavljenom MRL-u ili najnižoj koncentraciji ispitanoj u validacijskom postupku. U uzorke jaja dodaje se

standardna radna otopina tetraciklina MIX S2-JAJA i otopina internog standarda MIX-Q-TOF-IS2 prema tablici 5.

Tablica 5. Matriks kalibracijska krivulja na jajima (Hrvatski veterinarski institut, 2018)

| MATRIKS | | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | Slijepa proba |
|----------|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------|
| | | (μ L) | (μ L) | (μ L) | (μ L) | (μ L) | (μ L) |
| jaja 2 g | MIX S2-JAJA | 20 | 50 | 100 | 150 | 200 | - |
| | MIX-Q-TOF-IS2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | - |
| jaja 5 g | MIX S2-JAJA | 50 | 125 | 250 | 375 | 500 | - |
| | MIX-Q-TOF-IS2 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | - |

Redoslijed injektiranja uzoraka na LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS uređaje:

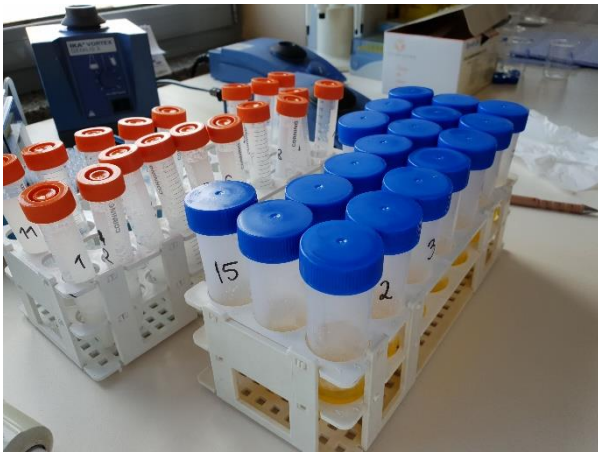
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)
- Uzorci (razine L1-L5) za pripremu standardne kalibracijske krivulje na otapalu
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)
- Negativni kontrolni uzorak matriksa (engl. *Matrix blank*)
- Uzorci (razine M1-M5) za pripremu matriks kalibracijske krivulje
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)
- Kontrolni uzorak stanja instrumenta (L3 koncentracijska razina)
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)

3.2.6. Pročišćavanje uzoraka

3.2.6.1. *QuEChERS* (engl. *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) ekstrakcija

- odvagati $5 \pm 0,05$ g homogeniziranog jajeta u epruvetu od 50 mL s čepom
- obogatiti uzorke dodatkom internog standarda 250 μ L MIX-Q-TOF-IS2 te uzorke za kalibraciju mješavinom standarda MIX S2-JAJA kako je opisano u tablici 5
- dodati 10 mL 0,5% mravlje kiseline u acetonitrilu, nakon dodatka odmah vorteksirati
- miješati na mehaničkoj mješalici/vorteksu kroz 10 minuta (2000 o/min)
- centrifugirati 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4°C
- EMR aktivacija praška: dodati 3 mL 5 mM amonijevog acetata u epruvetu s EMR praškom te odmah vorteksirati kroz 20 sekundi, dodavati pufer dok je epruveta s praškom na vorteksu, pazeći da se stvorila jednolika emulzija

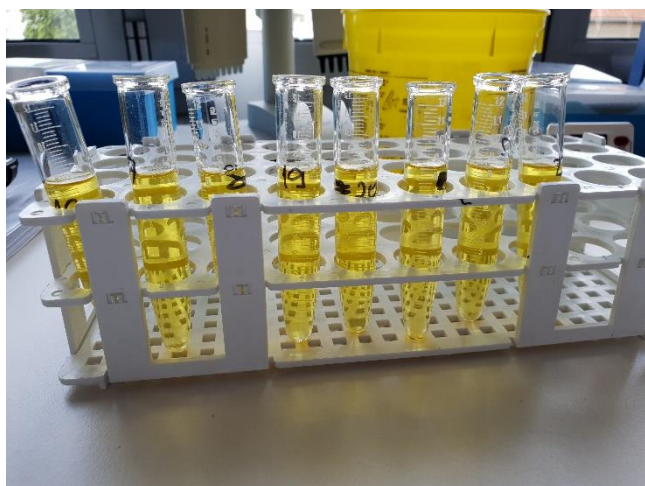
- prebaciti 7 mL supernatanta od uzorka jaja (0,5% mravlja u ACN) u aktiviranu emulziju s praškom
- odmah vorteksirati tijekom 5 minuta
- centrifugirati 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4°C
- supernatant dekantirati u novu epruvetu od 50 mL s čepom
- dodati sadržaj soli MgSO₄ iz vrećice i snažno mućkati dok se ne razbiju stvrdnuti komadi soli, zatim odmah vorteksirati ručno
- dodatno vorteksirati na mehaničkoj mješalici kroz 2 minute
- centrifugirati 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4°C
- prebaciti 2 mL supernatanta u staklenu epruvetu od 12-15 mL
- dodati 50 µL DMSO
- odpariti u struji dušika pri 40°C dok ne zaostane volumen od ~50 µL
- otopiti uzorke dodatkom 100 µL MeOH, vorteksirati i zatim dodati 850 µL H₂O
- otopiti kroz 5 minuta u ultrazvučnoj kupelji
- prebaciti otopinu u epruvetu od 2 mL za ultracentrifugu te centrifugirati pri 15000 okretaja/min, kroz 5 minuta pri 4°C
- bistru otopinu uzorka (400 µL) prebaciti u vialu s insertom
- *napomena: faktor razrijeđenja 1*



Slika 11. Priprema uzoraka (vlastita fotografija)

3.2.6.2. Ekstrakcija organskim otapalom

- odvagati $2 \pm 0,02$ g uzorka jaja u plastičnu epruvetu od 50 mL
- u uzorke dodati 100 μ L mješavine internog standarda MIX-Q-TOF-IS2
- u uzorke za matriks kalibracijsku krivulju dodati otopinu mješavine standarda MIX S2-JAJA kako je opisano u tablici 5
- dodati 8 mL 0,5% mravlje kiseline u acetonitrilu (hladnog, čuvanog na temp 2-8°C) te vorteksirati kratko pojedinačno
- 10 minuta vorteksirati na vrtložnoj mješalici
- centrifugirati na 4600 o/min na 4°C
- prebaciti supernatant u epruvetu od 15 mL
- dodati 50 μ L DMSO u svaku epruvetu sa supernatantom
- upariti do približno 50 μ L pri 40°C pomoću dušika
- otopiti uzorak na način da se doda 150 μ L vode, vorteksira i 5 minuta otapa u ultrazvučnoj kupelji
- prebaciti uzorke u pasteurove epruvetice od 2 mL i centrifugirati na 15000 o/min pri 4°C, 5 minuta
- prebaciti bistri supernatant u viala (ne filtrirati)
- *napomena: faktor razrijeđenja $f = 1/8$*



Slika 12. Priprema uzoraka (vlastita fotografija)

3.2.7. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju



Slika 13. Uređaj HPLC Agilent Technologies 1290 i Triple Quad LC/MS 6470 (vlastita fotografija)

Instrumentalna analiza obavlja se na instrumentu LC-MS/MS: HPLC Agilent Tech. 1290 i Triple Quad LC/MS 6470. Odvajanje se izvodi na kromatografskoj koloni: Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1x150 mm, Waters s predkolonom: Acquity HSS T3 1,8 μm VanguardPre-Col, Waters. Kromatografski uvjeti prikazani su u tablicama 6 i 7. Instrumentalni parametri dani u tablici 8 pokazali su se optimalnim za provođenje analize te su prikazane i ionske tranzicije za svaki od analita pri različitim kolizijskim energijama.

Tablica 6. Kromatografski uvjeti

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kromatografska kolona | Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1x150 mm |
| Predkolona | Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1x5 mm VanGuard Pre-Column |
| Protok | 0,4 mL min ⁻¹ |
| Temperatura odjeljka kolone | 40°C |
| Sustav za uzorkovanje | Volumen injektiranja 10 μL Temperatura 10°C Injektiranje s ispiranjem igle 15 s (MeOH/ACN/PropOH 5 : 2,5 : 2,5) |
| Mobilna faza | Otopina A: 0,1 % mravlja kiselina Otopina B: MeOH LC-MS čistoće |

Tablica 7. Gradijentna kromatografija

| | Vrijeme | Otopina A | Otopina B | Protok | Tlak |
|----------|----------|-----------|-----------|----------------------------|----------|
| 1 | 3 min | 100% | 0% | 0,400 mL min ⁻¹ | 1000 bar |
| 2 | 10 min | 5% | 95% | 0,400 mL min ⁻¹ | 1000 bar |
| 3 | 13 min | 5% | 95% | 0,400 mL min ⁻¹ | 1000 bar |
| 4 | 13,5 min | 100% | 0% | 0,400 mL min ⁻¹ | 1000 bar |
| 5 | 17 min | 100% | 0% | 0,400 mL min ⁻¹ | 1000 bar |

Uvjeti MS/MS spektrometra:

Parametri instrumenta:

Temperatura plina 150°C

Protok plina 13 L min⁻¹

Nebulizacija 35 psig

Temperatura plina (*sheath*) 300°C

Protok plina (*sheath*) 11 L min⁻¹

Napon kapilare 4000V

Volumen injektiranja je 10 µL te se injektiranje provodi uz ispiranje igle u položaju za pranje (engl. *Flush Port*) kroz 10 sekundi, otopinom 25% ACN, 25% MeOH, 50% ultračiste vode i 0,01% mravlje kiseline.

3.2.8. Mjerenje na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



Slika 14. HPLC uređaj 1290 Infinity udružen s masenim analizatorom s vremenom preleta (MS Q-TOF) Agilent 6550 Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer (vlastita fotografija)

Za provođenje analize koristi se HPLC uređaj *1290 Infinity* udružen s masenim analizatorom s vremenom preleta (MS Q-TOF) *Agilent 6550 Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer G6550A* s *Dual AJS ESI* sustavom za elektrosprej ionizaciju. Kromatografski uvjeti isti su kao i kod LC-MS/MS uređaja te su prikazani u tablicama 6 i 7. Instrumentalni parametri dani u tablici 9 pokazali su se optimalnim za provođenje analize te su prikazane i ionske tranzicije za svaki od analita pri četiri različite kolizijske energije (0, 10, 20, 40 eV). Analiti se ioniziraju u pozitivnom načinu rada. Vrijednosti m/z iona prekursora i iona produkata navedeni su u tablici 9.

Uvjeti Q-TOF spektrometra:

| | | | |
|----------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Način rada snimanja: | <i>Acquisition Mode MS1</i> u rasponu od m/z 50-1500 | | |
| Stupanj skeniranja: | 4 spektra sec ⁻¹ | | |
| Parametri instrumenta: | Temperatura plina 150 °C | | |
| | Protok plina 18 L min ⁻¹ | | |
| | Nebulizacija 30 psig | | |
| | Temperatura plina (<i>sheath</i>) 400°C | | |
| | Protok plina (<i>sheath</i>) 12 L min ⁻¹ | | |
| | Funnel Exit DC 50 | | |
| | Funnel RF HP 150 | | |
| | Funnel RF LP 60 | | |
| | Segmenti skeniranja: | Kolizijske energije 0; 10; 20; 40 eV | |
| | Parametri po segmentima: | Napon kapilare Vcap 3500 V | |
| <i>Nozzle</i> 0 V | | | |
| Fragmentor 350 | | | |
| <i>Skimmer1</i> 45 | | | |
| <i>Octopole RFPeak</i> 750 | | | |
| Referentne mase (m/z): | Pozitivni | Negativni | |
| | 121,05087 | 112,98558 | |
| | 922,00979 | 1033,98811 | |

3.2.9. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata

Rezultati analize prikazuju se pomoću Mass Hunter Qualitative i Quantitative Analysis računalnih programa.

Potvrдна analiza supstancija provodi se u MS načinu rada Q-TOF masenog spektrometra, *All Ion* skeniranjem analita, te MRM detekcijom (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) MS/MS spektrometra. Potvrda analita prilikom potvrđne metode zasniva se na nekoliko uvjeta:

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

Kvantitativna procjena provodi se na osnovu kalibracijske krivulje pripremljene na matriksu izradom grafikona s površinom pika prekursora u ovisnosti o teoretskoj koncentraciji analita.

Izražavanje rezultata i korekcija iskorištenja

Koncentracija analita izražava se u ng g^{-1} ili $\mu\text{g kg}^{-1}$ koristeći 3 značajne decimale. Korekcija iskorištenja uračunata je u rezultat jer se kvantitativno određivanje vrši pomoću matriks kalibracijske krivulje te se koristi interni standard. Iskorištenja moraju odgovarati propisanim limitima određenim u Odluci komisije 2002/657/EC (Pravilnik, 2005). Vrijednosti trebaju odgovarati onim utvrđenim u validacijskom postupku te su dio kontrole kvalitete u obliku kontrolne karte iskorištenja.

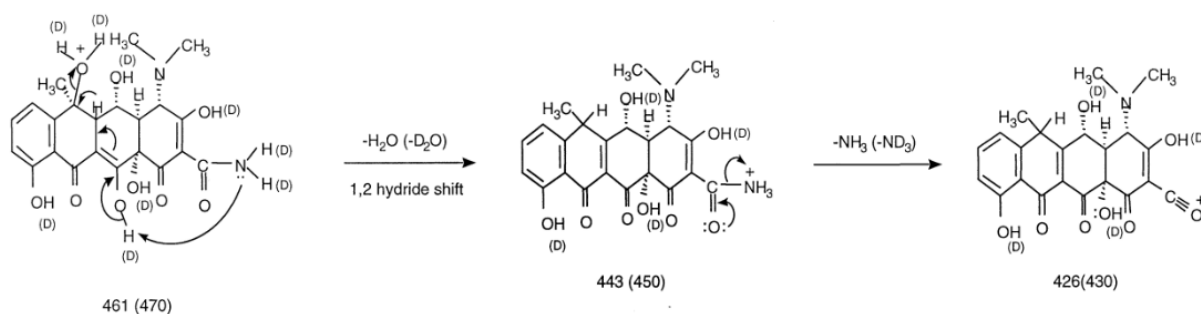
4. REZULTATI I RASPRAVA

Tehnike analitičke detekcije rezidua antibiotika uključuju imunološke metode kao što su ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), radioimuno ispitivanje (engl. *radioimmunoassay*) i biosenzori, dok najrašireniju primjenu imaju kromatografske metode kao što su plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija (LC) ili tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (HPTLC - *high-pressure thinlayer chromatography*), zajedno s različitim sustavima detekcije. Od svih navedenih metoda, tekućinska kromatografija se koristi u više od 80% objavljenih rezultata određivanja rezidua veterinarskih lijekova u uzorcima hrane. Prednosti primjene tekućinske kromatografije su velika osjetljivost i selektivnost čak i u uzorcima koji sadrže složeni matriks. Najčešće se tekućinska kromatografija primjenjuje sa spektrometrijom masa, pri čemu se koriste različiti ionizatori kao što su npr. MALDI (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija) i ESI (engl. *ElectroSpray Ionization*), te se primjenjuju različiti analizatori mase kao što je kvadrupolni analizator mase i analizator vremena preleta (engl. *Time of Flight*). Tri glavna područja na koja se treba usredotočiti kako bi se postigla maksimalna učinkovitost analitičke metode su razvoj, optimizacija i validacija metoda s ciljem poboljšanja učinkovitosti analitičke metode pri čemu je važan i odabir tehnika ekstrakcije i pročišćavanja uzoraka (Manimekalai i sur. 2019).

4.1. OPTIMIZACIJA LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS SUSTAVA ZA ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA

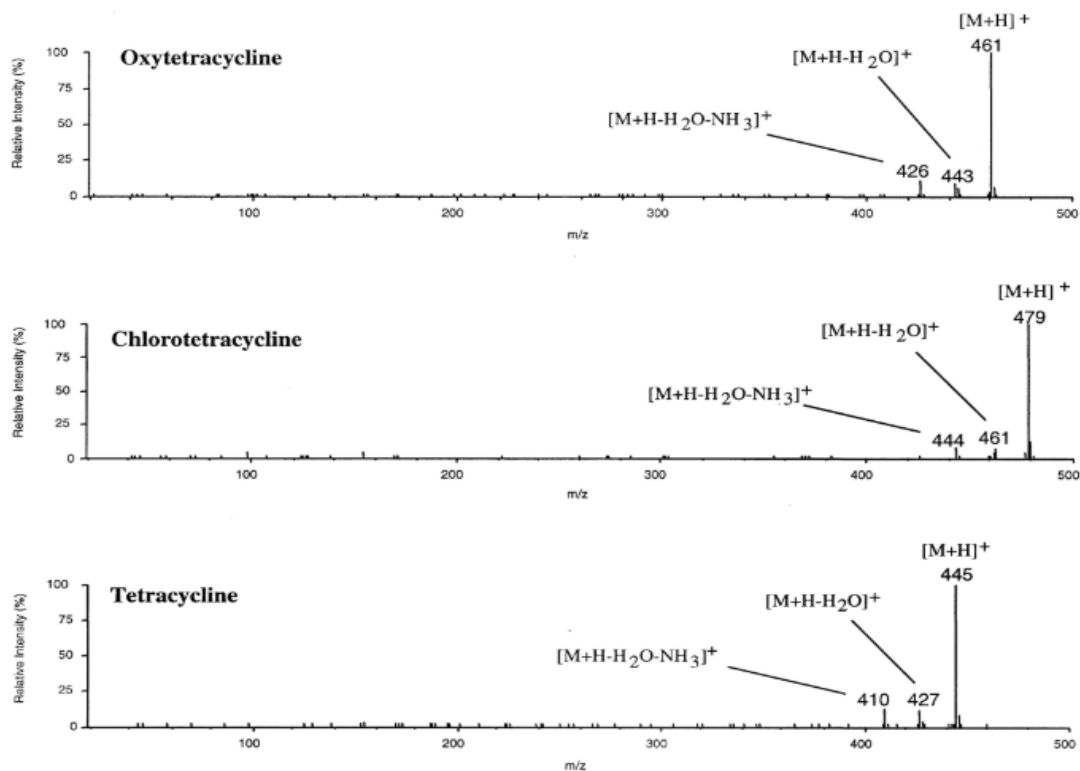
Kako bi se postigla maksimalna osjetljivost i selektivnost instrumenta, potrebno je provesti optimizaciju instrumentalnih parametara što uključuje definiranje ionskih oblika tetraciklinskih antibiotika. Fragmentacija tetraciklina potaknuta je kolizijom s inertnim plinom dušikom. Kako bi se postigao najbolji prinos produkt iona ispitivani su različiti naponi fragmentora. Zatim su se ispitivale različite kolizijske energije te su se za kvantifikaciju (prvi produkt ion) i kvalitativno određivanje (drugi produkt ion) odabrale one s najjačim intenzitetom. Optimalni napon fragmentora određen je korištenjem različitih napona fragmentora u SIM (engl. *Selected Ion Monitoring*) načinu rada, a optimalne kolizijske energije određene su u MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) načinu rada. Tablica 8 prikazuje ionske tranzicije dobivene optimizacijom LC-MS/MS sustava, a tablica 9 prikazuje ionske tranzicije dobivene optimizacijom UHPLC/Q-TOF-MS sustava.

Prilikom optimizacije masenih tranzicija pretpostavljeno je da dolazi do gubitka H₂O praćeno gubitkom NH₃ (slika 15). Mehanizam nastajanja produkata potvrđen je sa znanstvenim radom Kamel i sur. (2002).



Slika 15. Predložene reakcije i mehanizmi CID (engl. *collisionally induced decompositions*) fragmentacije protoniranog oksitetraciklina i njegovih produkt iona (Kamel i sur., 2002)

CID spektar protoniranih tetraciklinskih antibiotika dobiven pri višim kolizijskim energijama (25 eV) sadrži brojne produkt ione koji se mogu upotrijebiti za potvrdu strukture. Međutim, spektar je mnogo jednostavniji pri nižim kolizijskim energijama. Slika 16 prikazuje CID maseni spektar oksitetraciklina, klortetraciklina i tetraciklina pri niskoj kolizijskoj energiji od 5 eV iz koje se vidi da su njihovi spektri slični te da sadrže $[M + H - H_2O]^+$, $[M + H - NH_3]^+$ i $[M + H - H_2O - NH_3]^+$ ione (Kamel i sur., 2002).



Slika 16. Spektri CID (engl. *collisionally induced decompositions*) produkata iona protoniranih oksitetraciklina, klortetraciklina i tetraciklina pri kolizijskim energijama od 5 eV (Kamel i sur., 2002)

Tablica 8. Ionske tranzicije dobivene optimizacijom LC-MS/MS sustava za određivanje rezidua tetraciklina

| Tetraciklini | Retencijsko vrijeme (min) | Prekursor ion | Produkt ion | Fragmentor (V) | Kolizijska energija (eV) | Ionizacija |
|--------------------|---------------------------|---------------|-------------|----------------|--------------------------|------------|
| Klortetraciklin | 8,17 | 479,1 | 462 | 140 | 20 | Pozitivna |
| | | | 444 | | 20 | |
| | | | 154,1 | | 40 | |
| Doksiciklin | 8,69 | 445,2 | 428,1 | 135 | 16 | Pozitivna |
| | | | 410 | | 24 | |
| | | | 321,1 | | 28 | |
| Epiklortetraciklin | 7,8 | 479,1 | 462,1 | 120 | 10 | Pozitivna |
| | | | 444,1 | | 10 | |
| Epioksitetraciklin | 7,27 | 461,2 | 444,1 | 135 | 6 | Pozitivna |
| | | | 426,1 | | 14 | |
| | | | 381,1 | | 20 | |
| Epitetraciklin | 7,04 | 445,1 | 427,1 | 135 | 10 | Pozitivna |
| | | | 410,1 | | 20 | |
| | | | 154 | | 40 | |
| Oksitetraciklin | 7,46 | 461,2 | 443,1 | 135 | 6 | Pozitivna |
| | | | 426,1 | | 14 | |
| | | | 201,1 | | 48 | |
| Tetraciklin | 7,38 | 445,2 | 427,1 | 135 | 10 | Pozitivna |
| | | | 410,1 | | 20 | |
| | | | 154 | | 40 | |

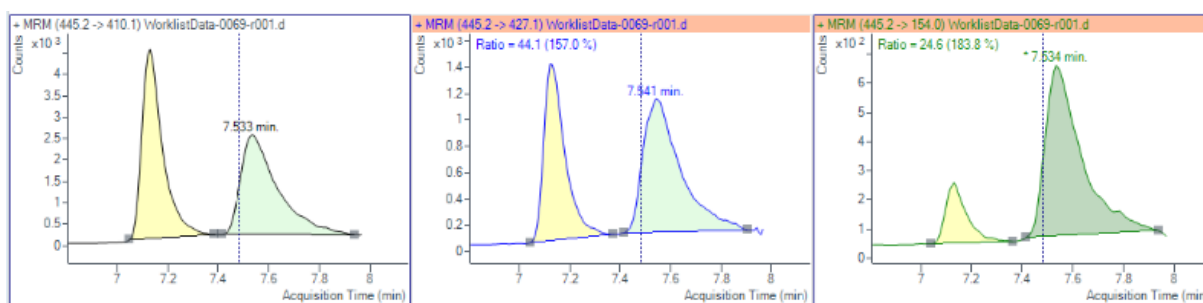
Tablica 9. Ionske tranzicije dobivene optimizacijom UHPLC/Q-TOF-MS sustava za određivanje rezidua tetraciklina

| Tetraciklini | Retencijsko vrijeme (min) | Prekursor ion | Produkt ion | Formula | Ionizacija |
|--------------------|---------------------------|---------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|------------|
| Klortetraciklin | 7,9 | 479,1264 | 462,095 | C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈ | Pozitivna |
| | | | 444,0841 | | |
| | | | 461,111 | | |
| Doksiciklin | 8,7 | 445,1606 | 428,134 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | Pozitivna |
| | | | 410,1234 | | |
| Epiklortetraciklin | 7,6 | 479,1264 | 462,095 | C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈ | Pozitivna |
| | | | 444,0841 | | |
| | | | 461,111 | | |
| Epioksitetraciklin | 7,3 | 461,1555 | 426,1183 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ | Pozitivna |
| | | | 444,1289 | | |
| | | | 381,0605 | | |
| Epitetraciklin | 7,1 | 445,1606 | 427,15 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | Pozitivna |
| | | | 410,1234 | | |
| | | | 154,0499 | | |
| Oksitetraciklin | 7,5 | 461,1594 | 443,1449 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ | Pozitivna |
| | | | 426,1183 | | |
| | | | 408,1078 | | |
| Tetraciklin | 7,4 | 445,1606 | 427,15 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | Pozitivna |
| | | | 410,1234 | | |
| | | | 428,134 | | |

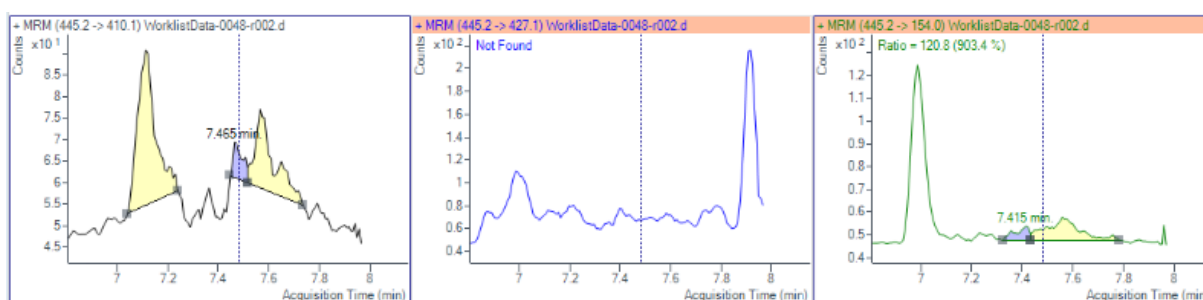
4.2. KROMATOGRAMI REZIDUA TETRACIKLINA IZ UZORAKA JAJA

Negativni uzorci matriksa provedeni su kroz LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS uređaje kako bi se potvrdilo da su negativni (ne sadrže ispitivane tetracikline) i da su pogodni za testiranje metode. Na slikama 17 – 23 su prikazani kromatogrami uzoraka jaja analiziranih na LC-MS/MS uređaju za svaki analit – prikazani su kromatogrami standardnih uzoraka koncentracijske razine L3 (a), negativnih kontrolnih uzoraka matriksa (b), uzoraka jaja obogaćenih na M3 razinu dobivenih Quechers ekstrakcijom (c) i uzoraka jaja obogaćenih na M3 razinu dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom (d).

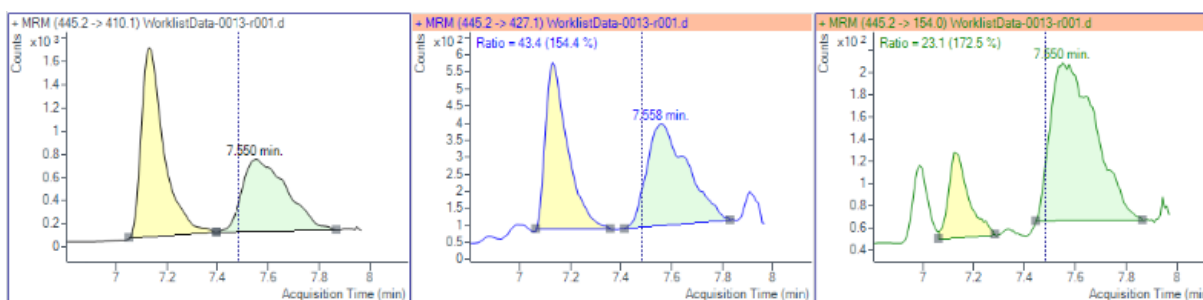
a)



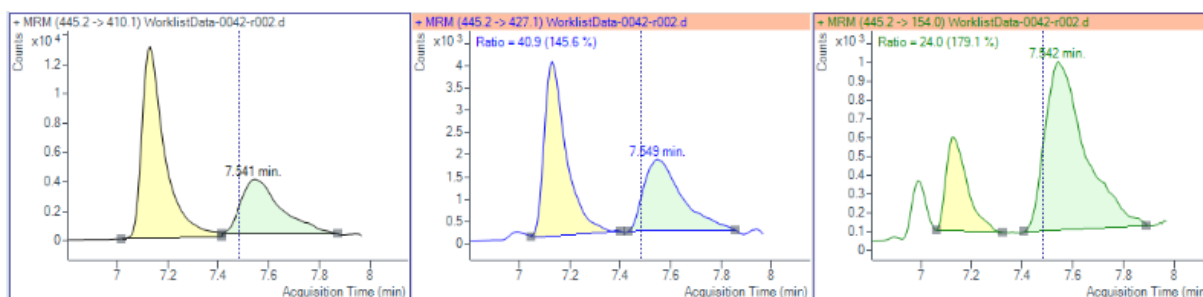
b)



c)

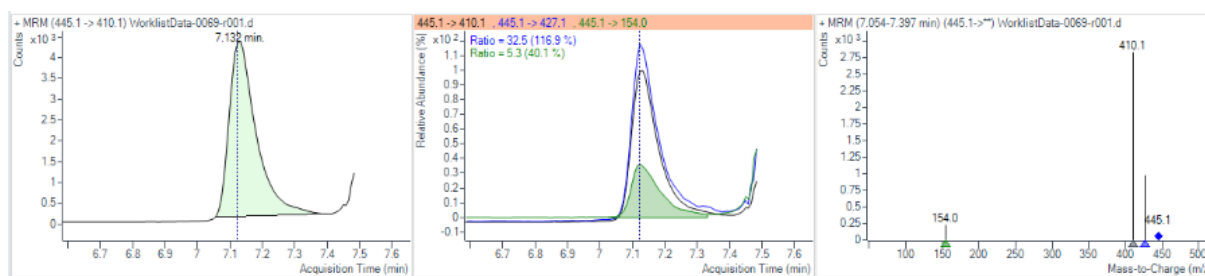


d)

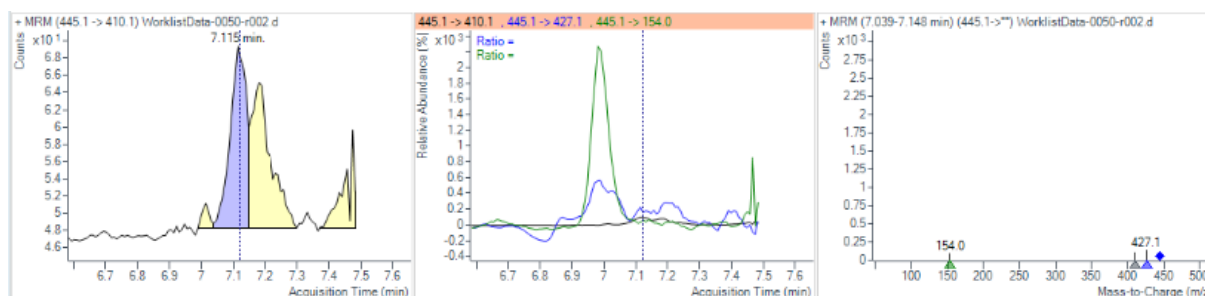


Slika 17. Kromatogrami produkata iona tetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – ekstrakcija organskim otapalom

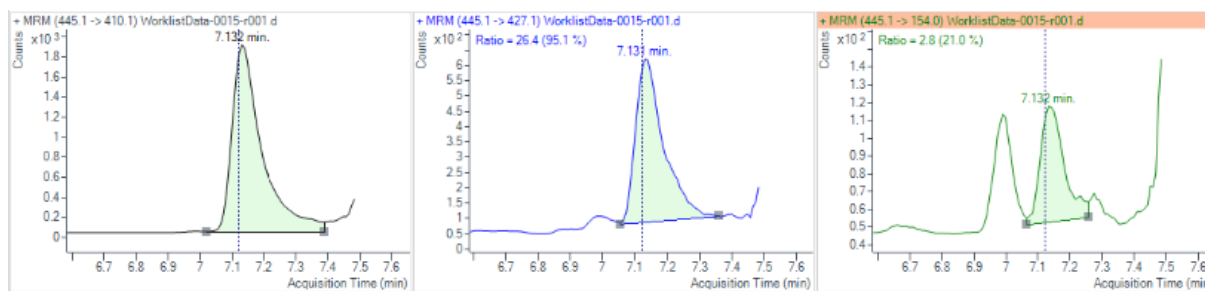
a)



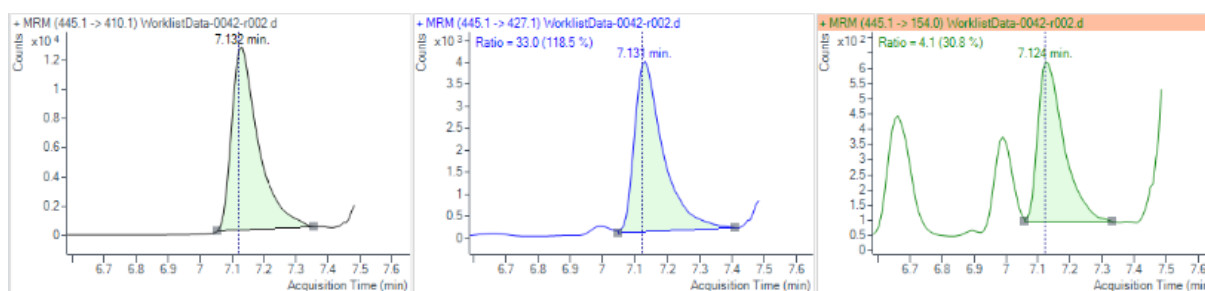
b)



c)

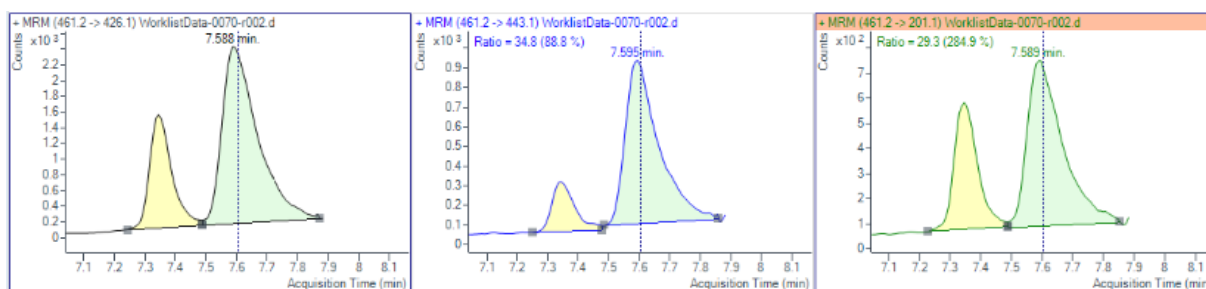


d)



Slika 18. Kromatogrami produkata iona epitetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – ekstrakcija organskim otapalom

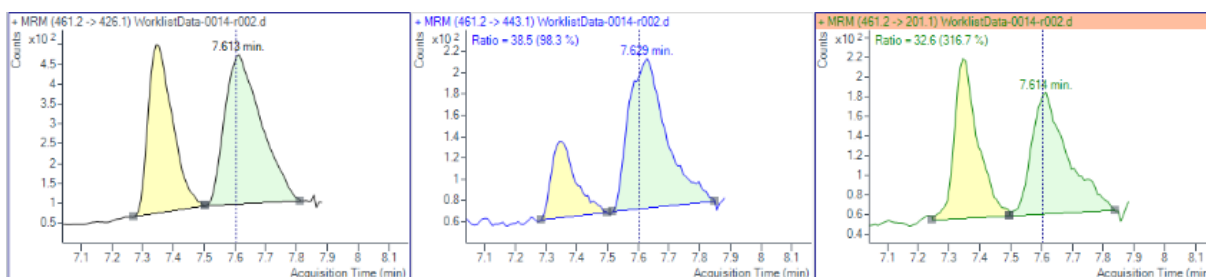
a)



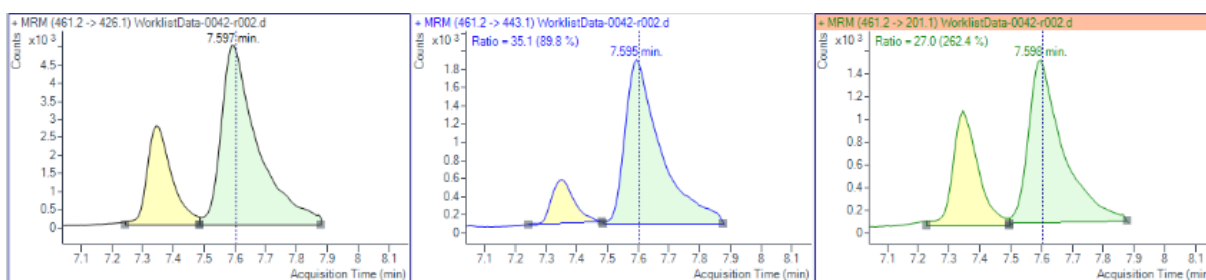
b)



c)

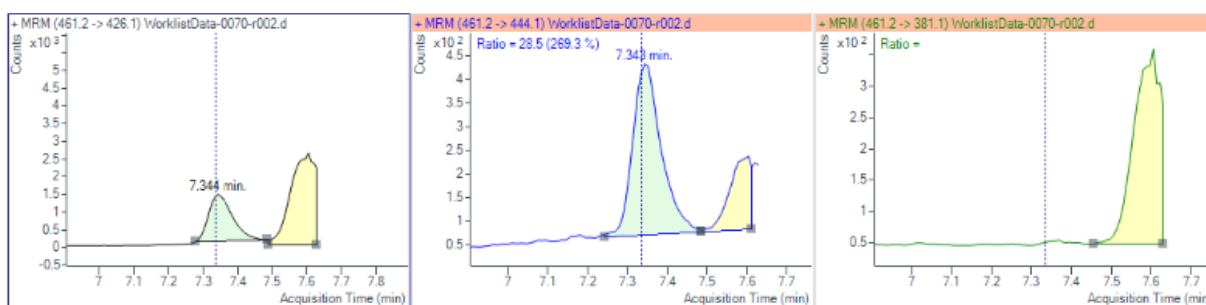


d)

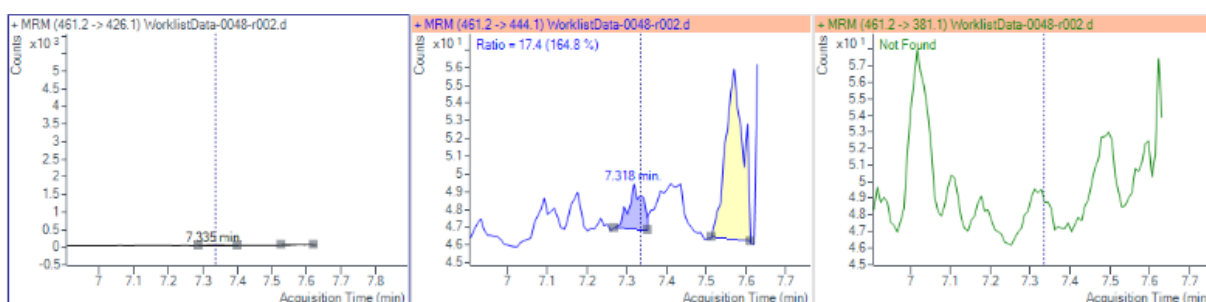


Slika 19. Kromatogrami produkata iona oksitetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – ekstrakcija organskim otapalom

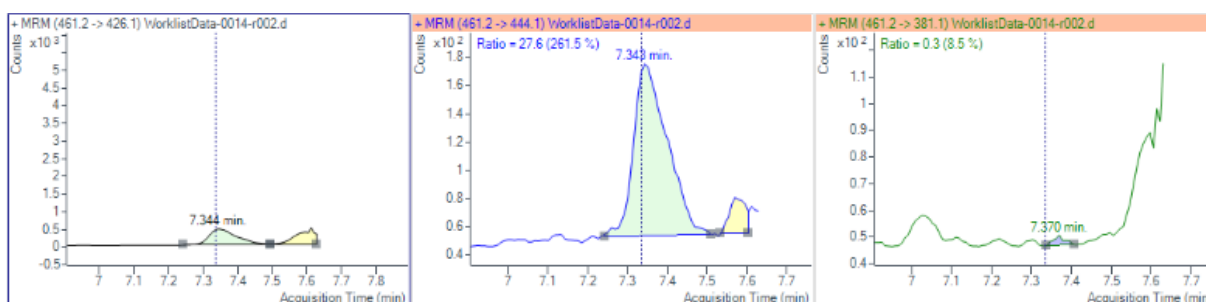
a)



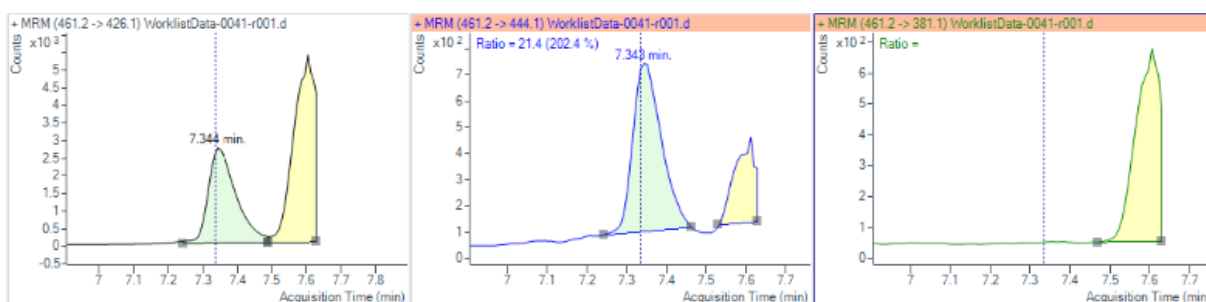
b)



c)

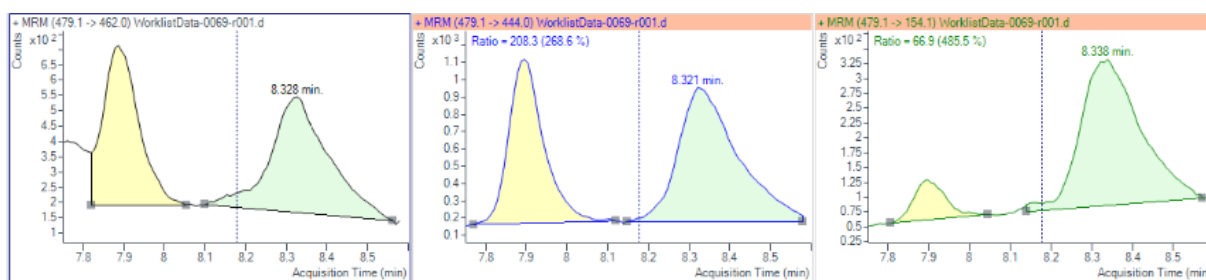


d)



Slika 20. Kromatogrami produkata iona epioksitetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – ekstrakcija organskim otapalom

a)



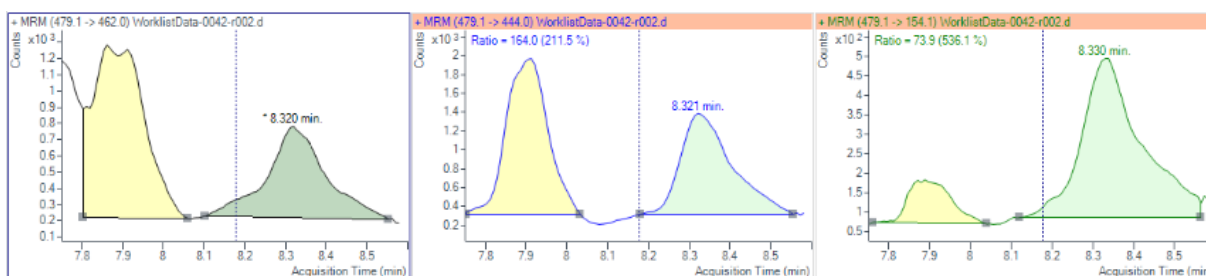
b)



c)

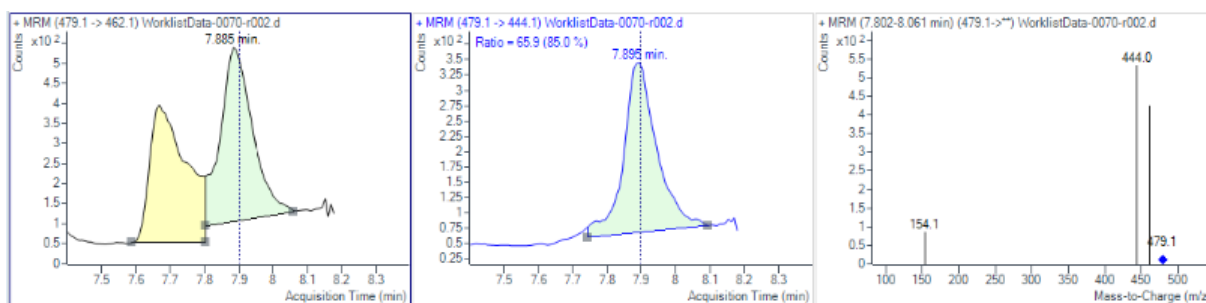


d)

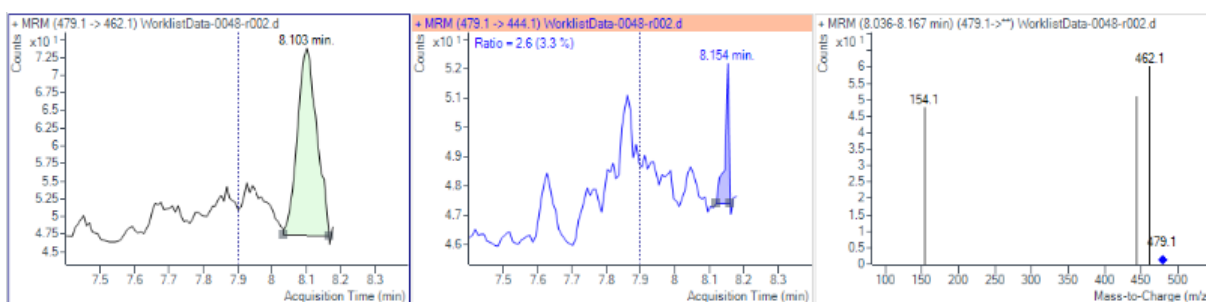


Slika 21. Kromatogrami produkata iona klortetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – ekstrakcija organskim otapalom

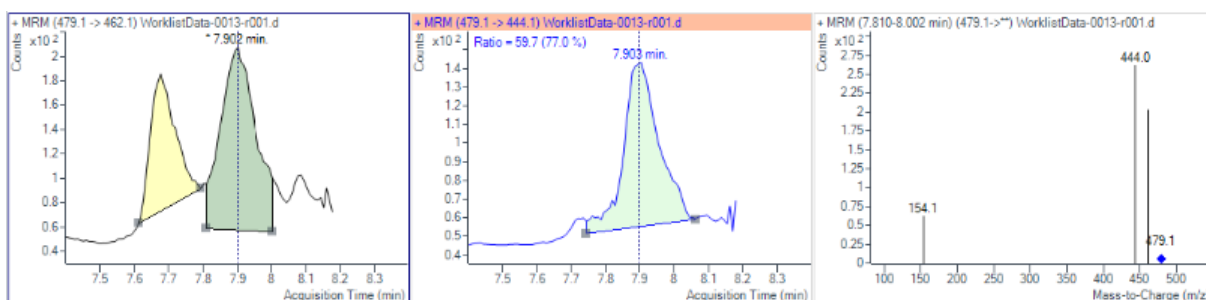
a)



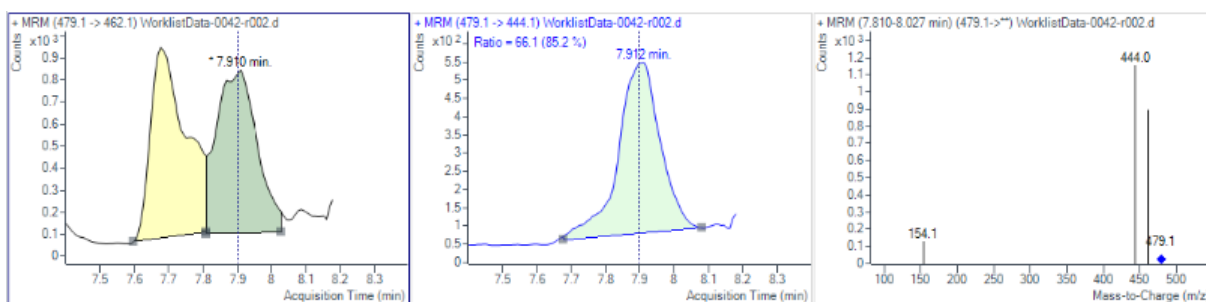
b)



c)

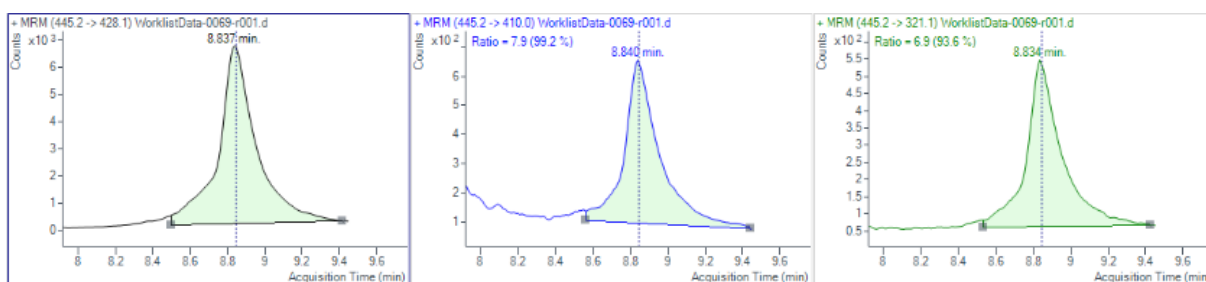


d)



Slika 22. Kromatogrami produkata iona epiklortetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – ekstrakcija organskim otapalom

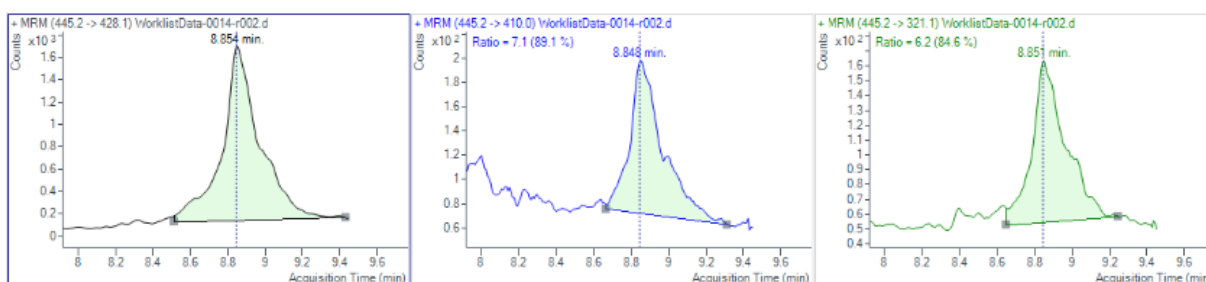
a)



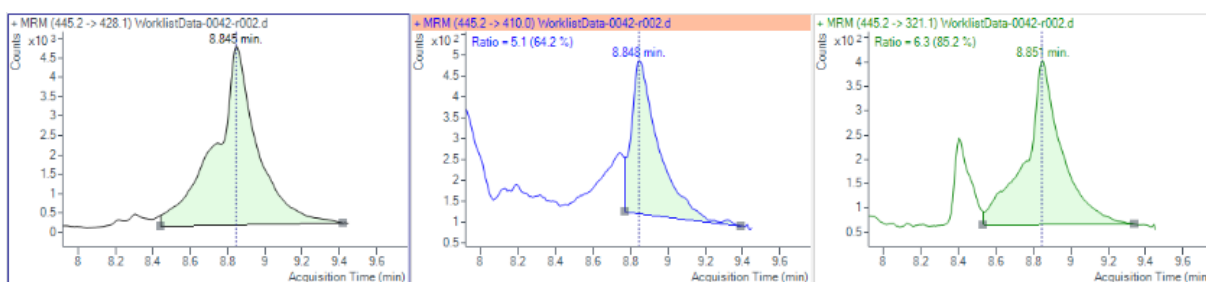
b)



c)



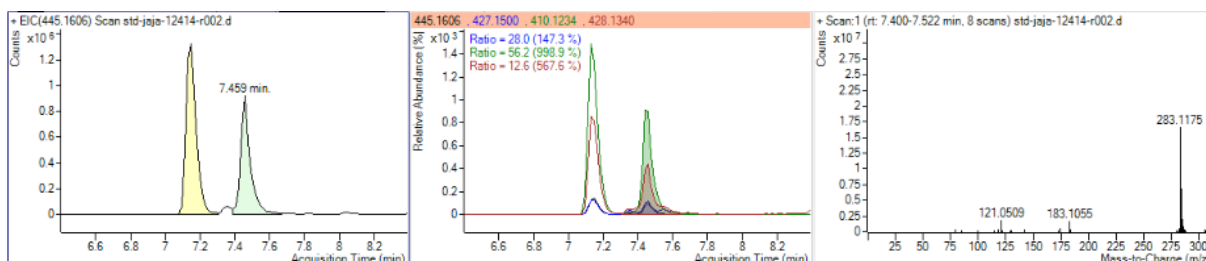
d)



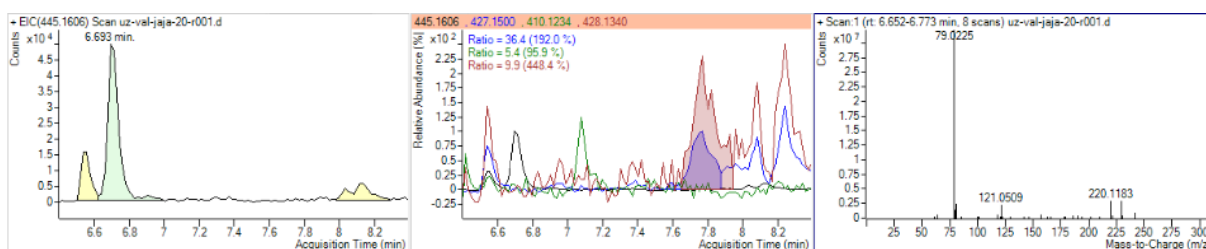
Slika 23. Kromatogrami produkata iona doksiciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – ekstrakcija organskim otapalom

Na slikama 24 – 30 su prikazani kromatogrami uzoraka jaja analiziranih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju za svaki analit – prikazani su kromatogrami standardnih uzoraka koncentracijske razine L3 (a), negativnih kontrolnih uzoraka matriksa (b) te uzoraka jaja obogaćenih na M3 razinu dobivenih Quechers ekstrakcijom.

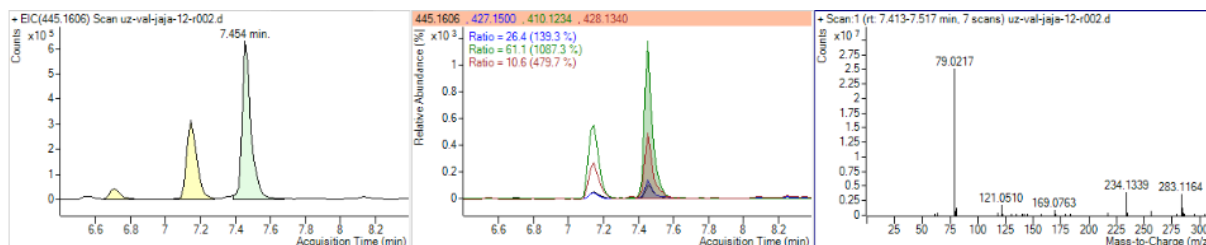
a)



b)

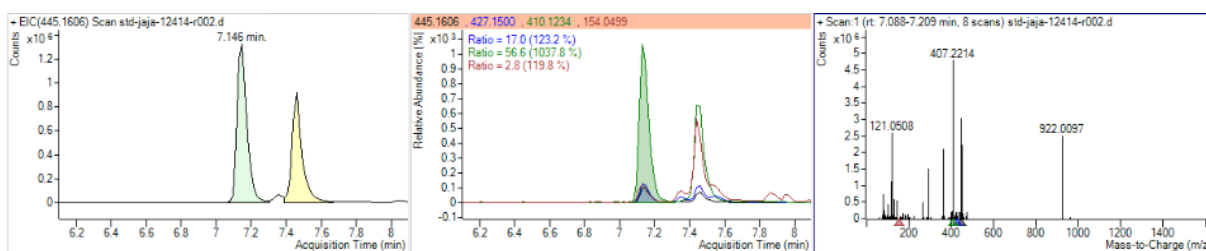


c)

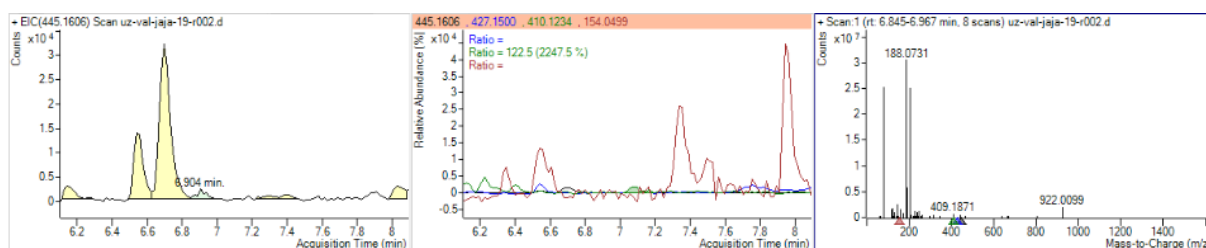


Slika 24. Kromatogrami produkata iona tetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

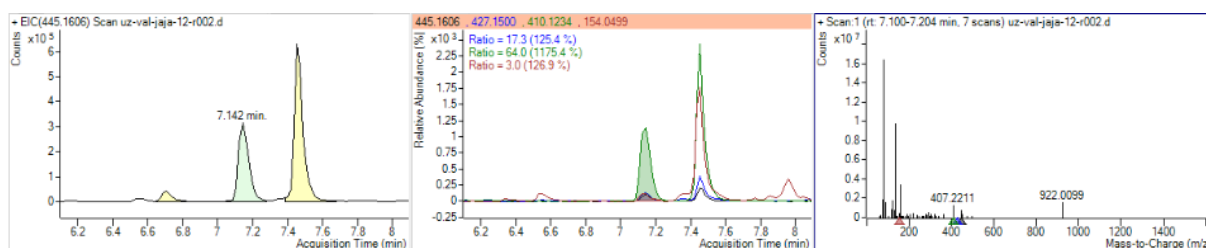
a)



b)

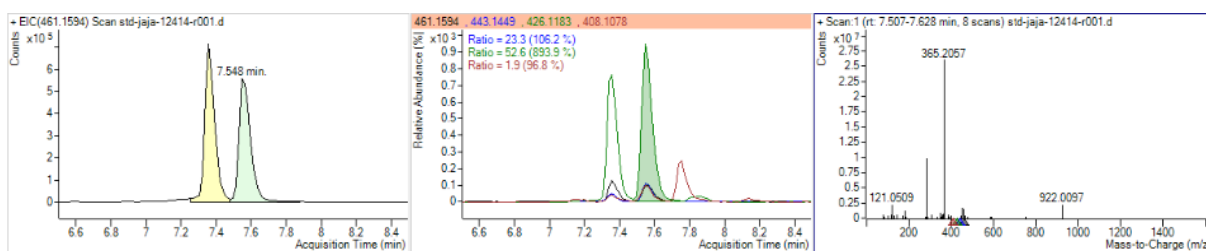


c)

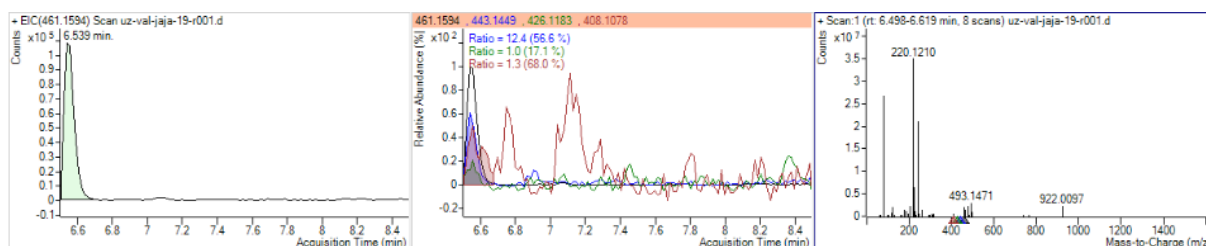


Slika 25. Kromatogrami produkata iona epitetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

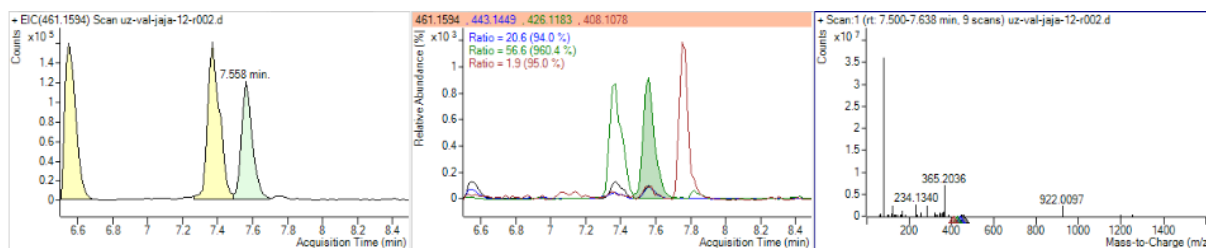
a)



b)

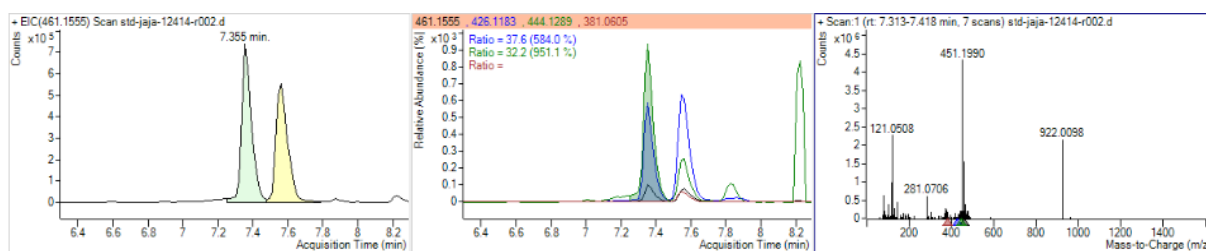


c)

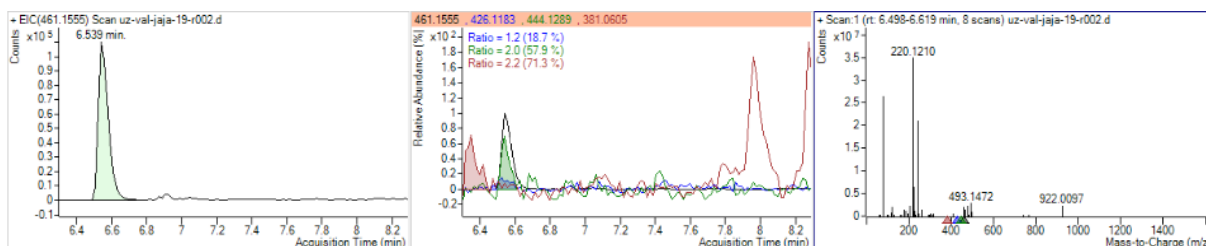


Slika 26. Kromatogrami produkata iona oksitetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

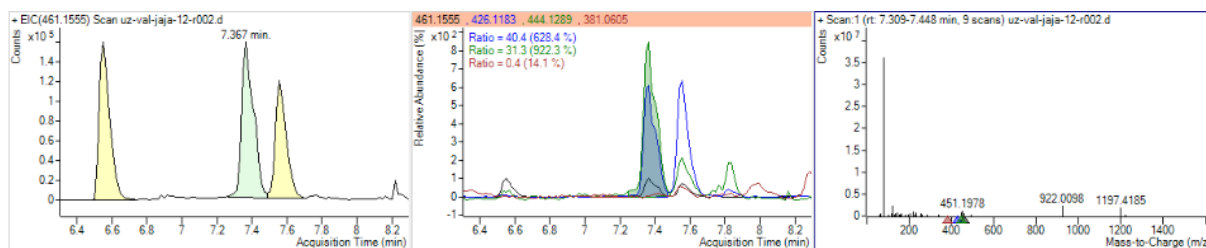
a)



b)

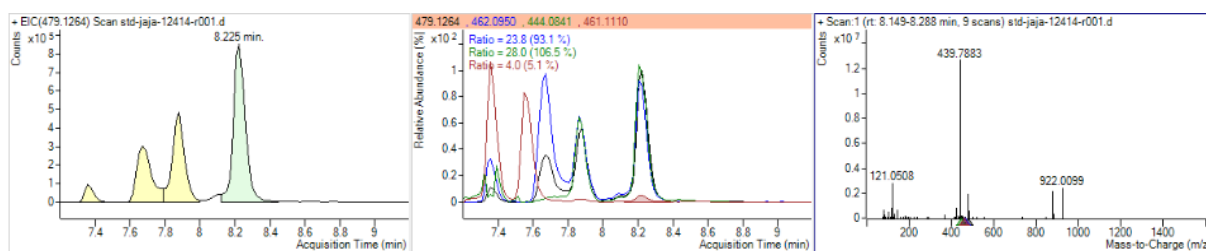


c)

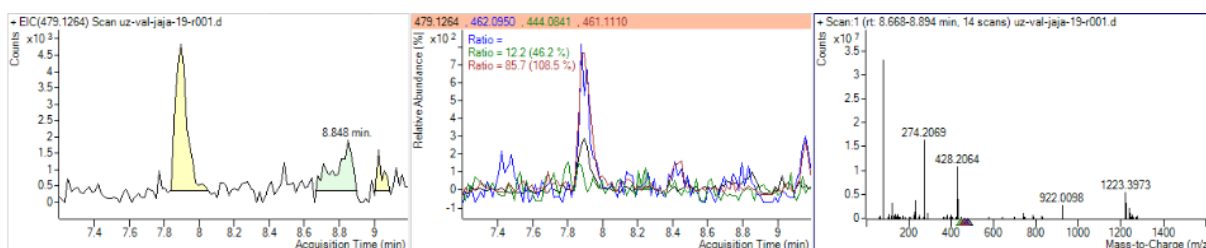


Slika 27. Kromatogrami produkata iona epiksitetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

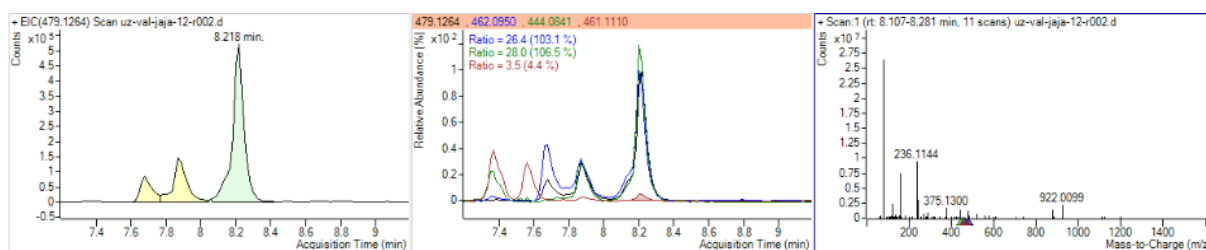
a)



b)

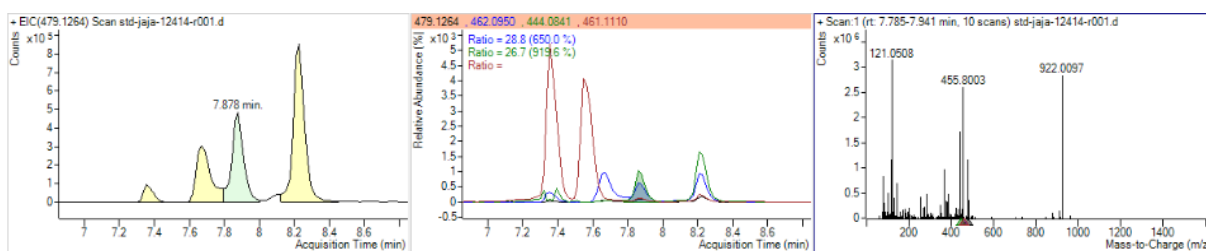


c)

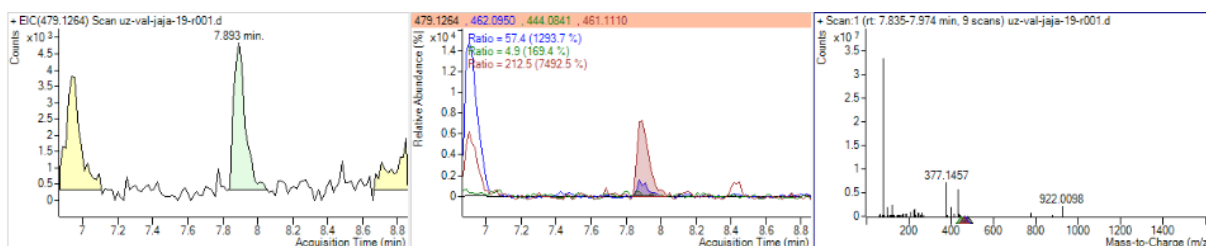


Slika 28. Kromatogrami produkata iona klortetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

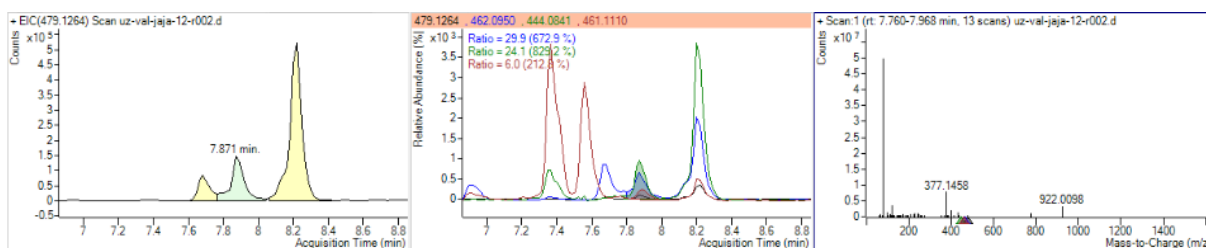
a)



b)

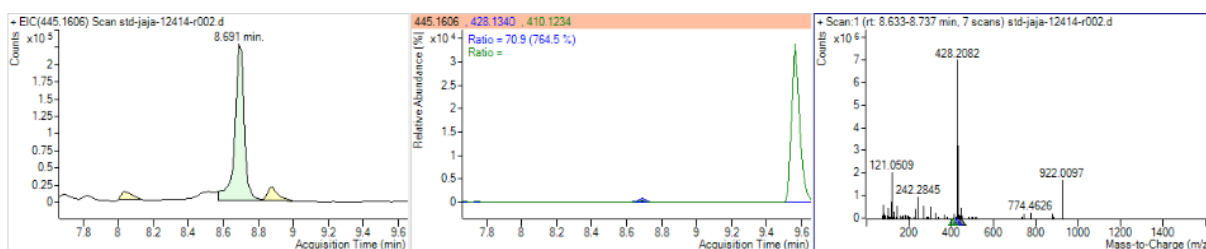


c)

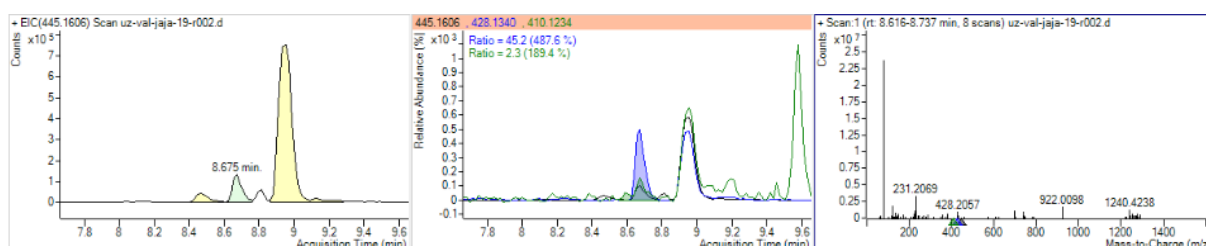


Slika 29. Kromatogrami produkata iona epiklortetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

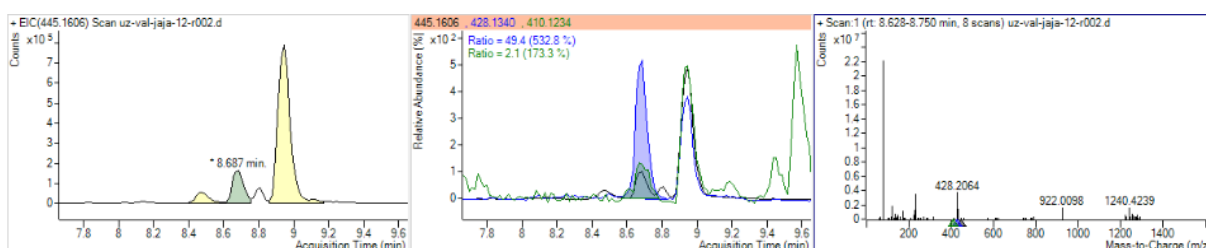
a)



b)



c)



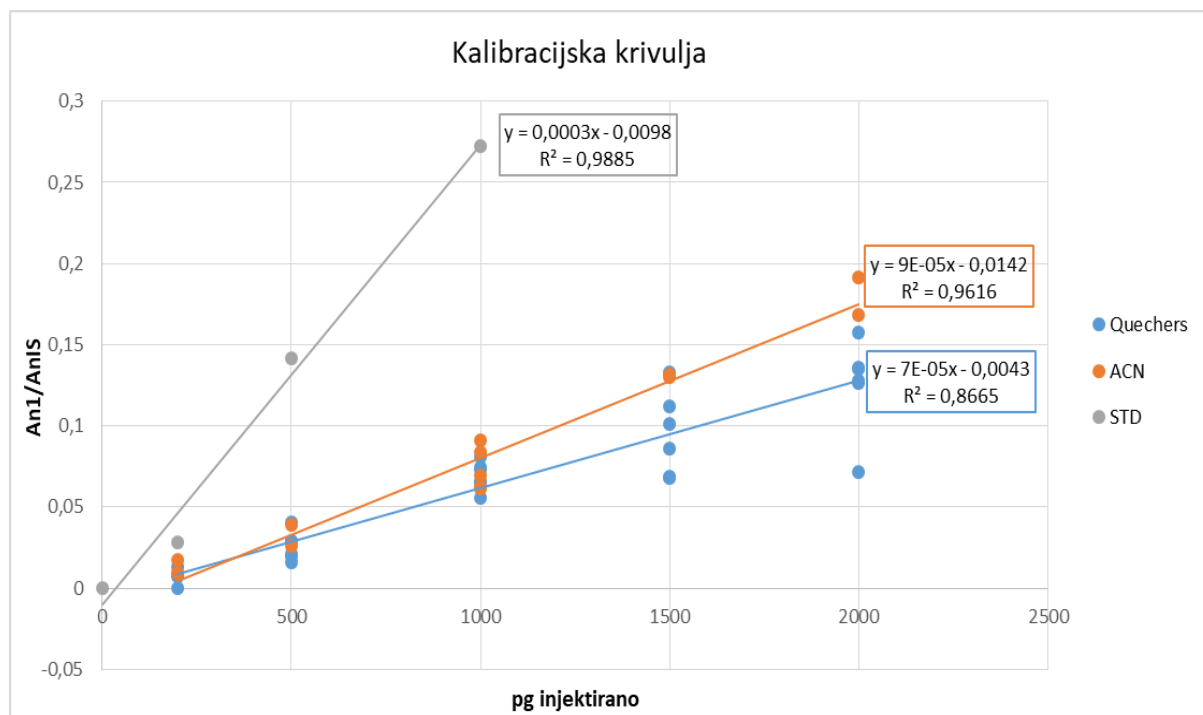
Slika 30. Kromatogrami produkata iona doksiciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

Usporedbom kromatograma negativnog uzorka (engl. *Matrix blank*) i uzoraka tetraciklina u jajima na slikama 17 – 30 može se vidjeti da u slijepom uzorku jaja na retencijskom vremenu gdje se pojavljuju tetraciklinski antibiotici nema nikakvih odziva od matriksa koji bi mogli interferirati sa pikom. Iz toga se može zaključiti da su obje metode, LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS, specifične zato što u negativnom uzorku nema pikova koji mogu interferirati s analitom.

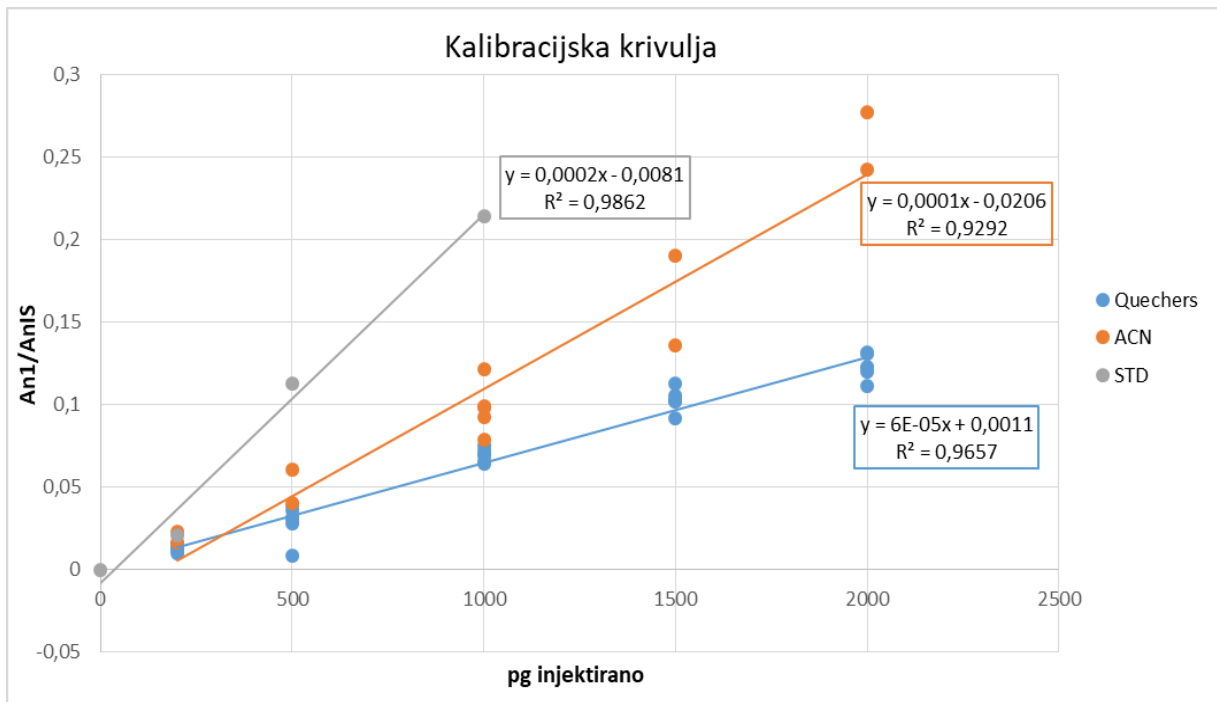
4.3. ODREĐIVANJE UTJECAJA MATRIKSA NA ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA

Određivanje utjecaja matriksa (engl. *matrix effect*) provodi se usporedbom nagiba standardne kalibracijske krivulje (STD) i nagiba matriks kalibracijske krivulje uzoraka. Uzorci

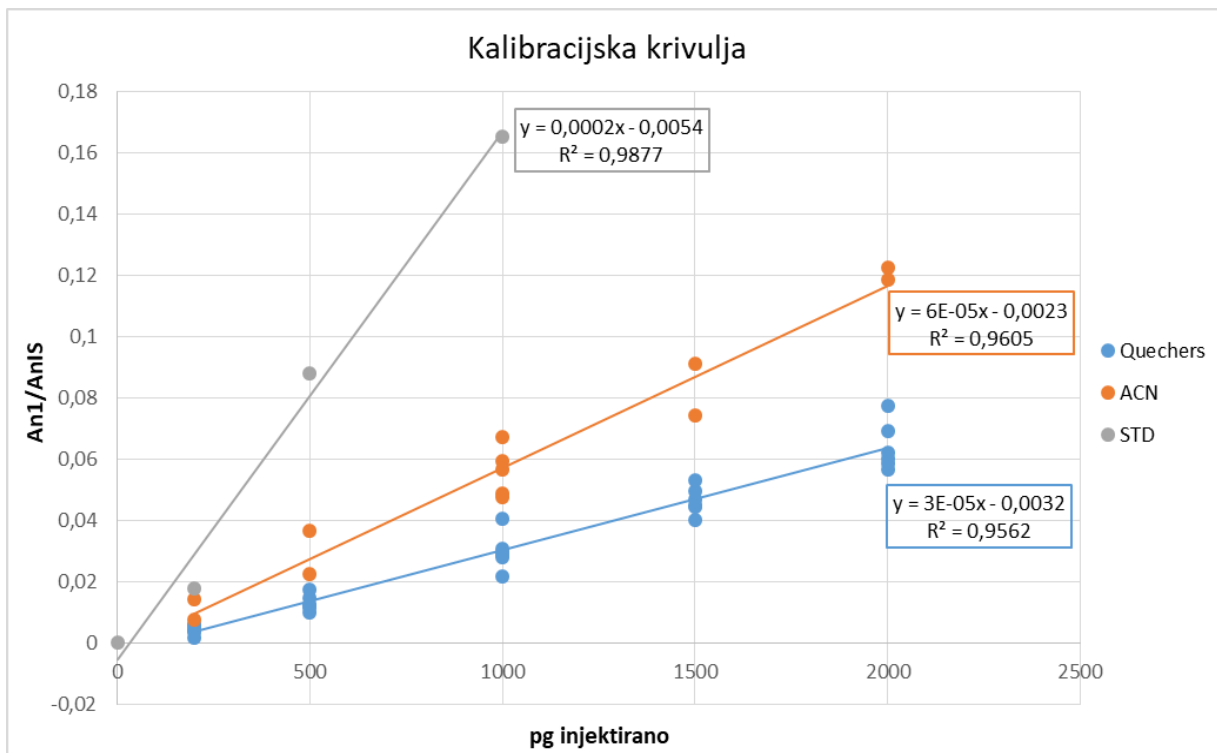
analizirani na LC-MS/MS uređaju dobiveni su Quechers ekstrakcijom (Quechers) i ekstrakcijom organskim otapalom (acetonitril, ACN), pa su dobivene dvije matriks kalibracijske krivulje. Slike 31 – 37 grafički prikazuju utjecaj matriksa na uzorke analizirane na LC-MS/MS uređaju – prikaz ovisnosti količine standarda (pg injektirano) o omjeru površine analita i površine internog standarda (An/AnIS).



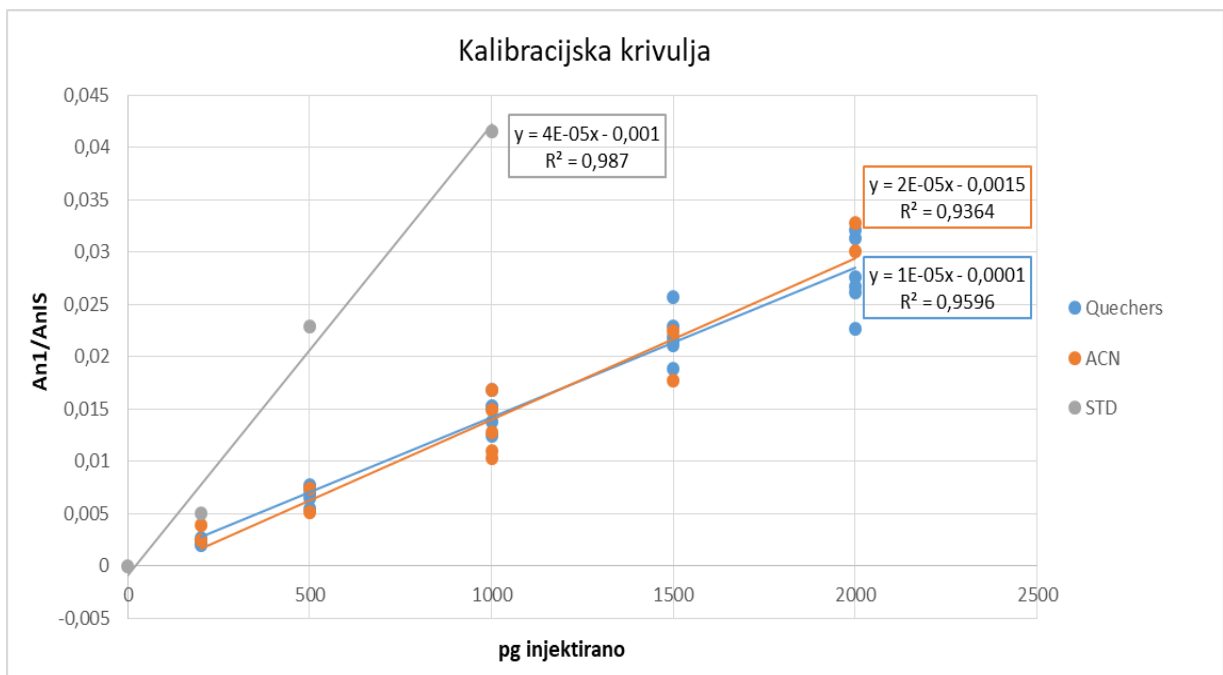
Slika 31. Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za tetraciklin na LC-MS/MS uređaju



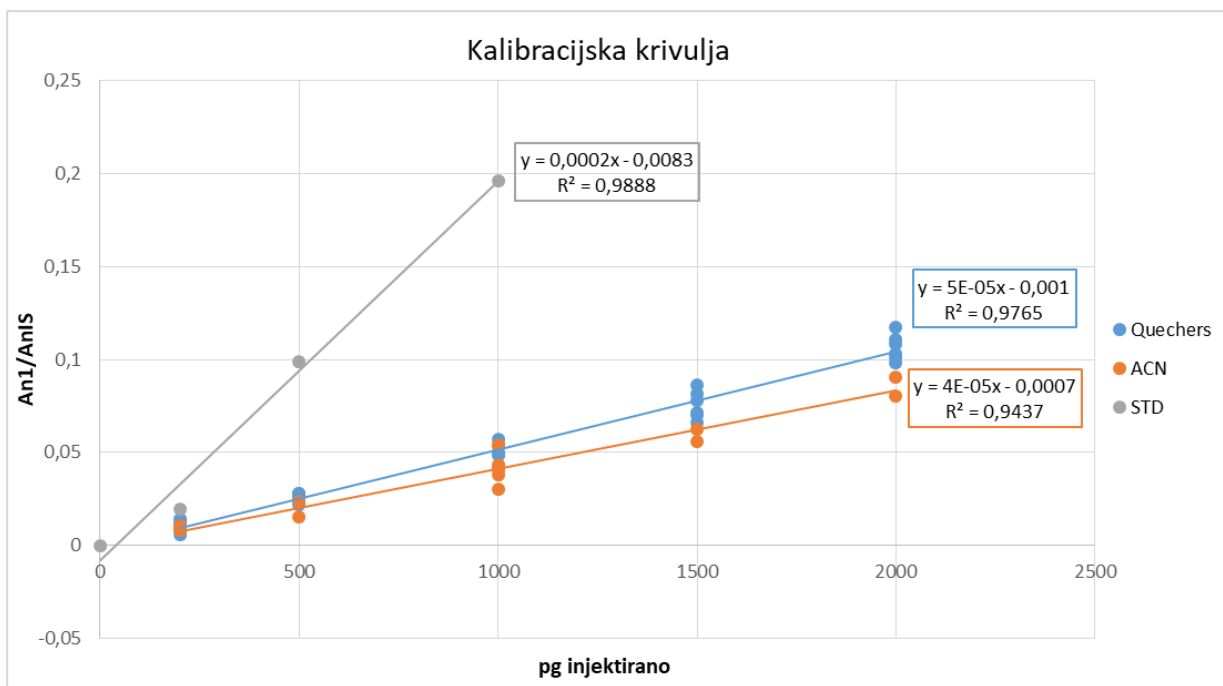
Slika 32. Usporedba standardne (STD) i matrigs (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za epitetraciklin na LC-MS/MS uređaju



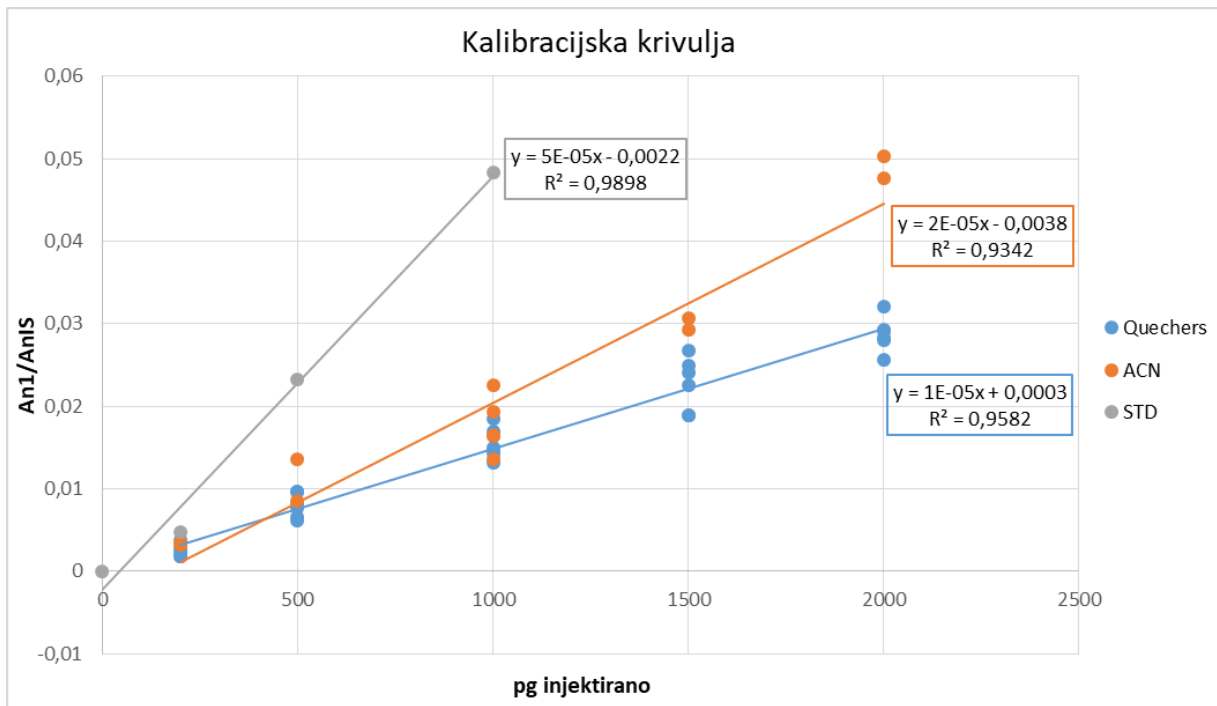
Slika 33. Usporedba standardne (STD) i matrigs (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za oksitetraciklin na LC-MS/MS uređaju



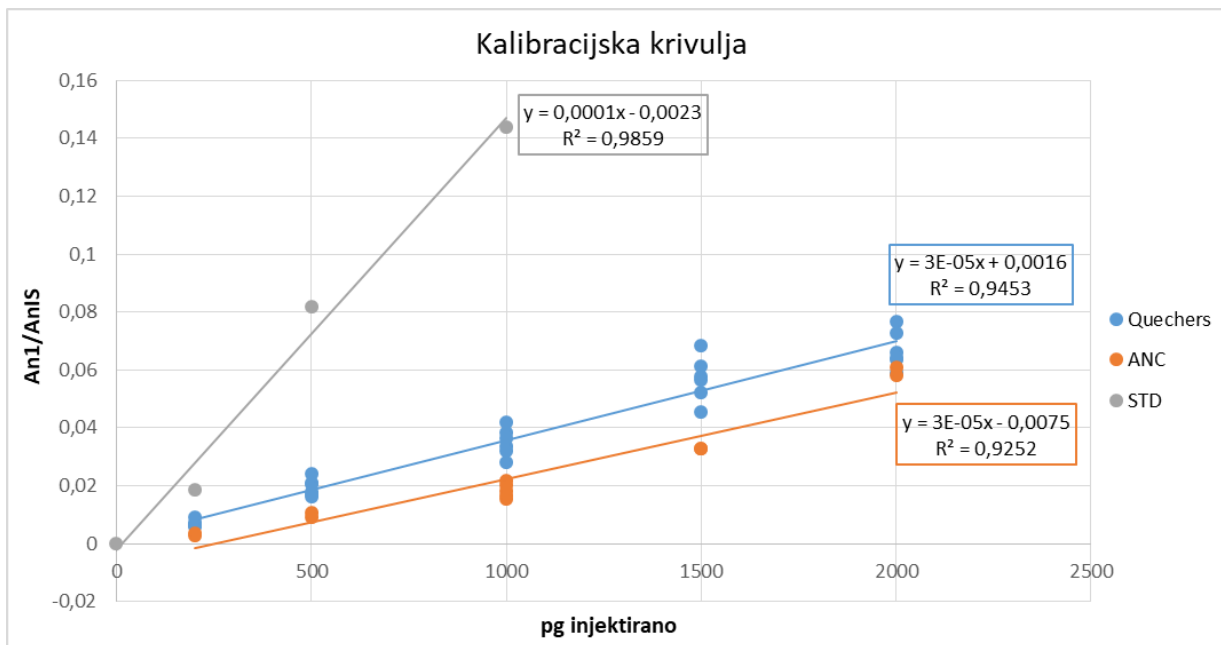
Slika 34. Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za epioksitetraciklin na LC-MS/MS uređaju



Slika 35. Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za klortetraciklin na LC-MS/MS uređaju

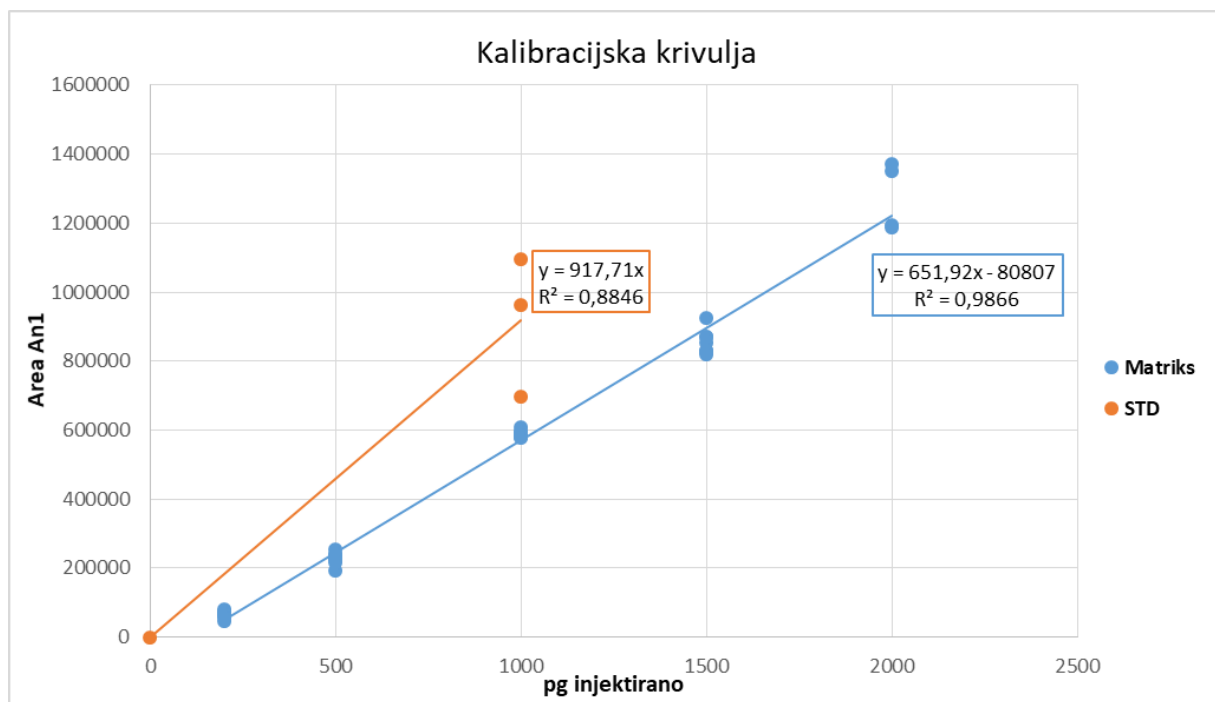


Slika 36. Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za epiklortetraciklin na LC-MS/MS uređaju



Slika 37. Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za doksiciklin na LC-MS/MS uređaju

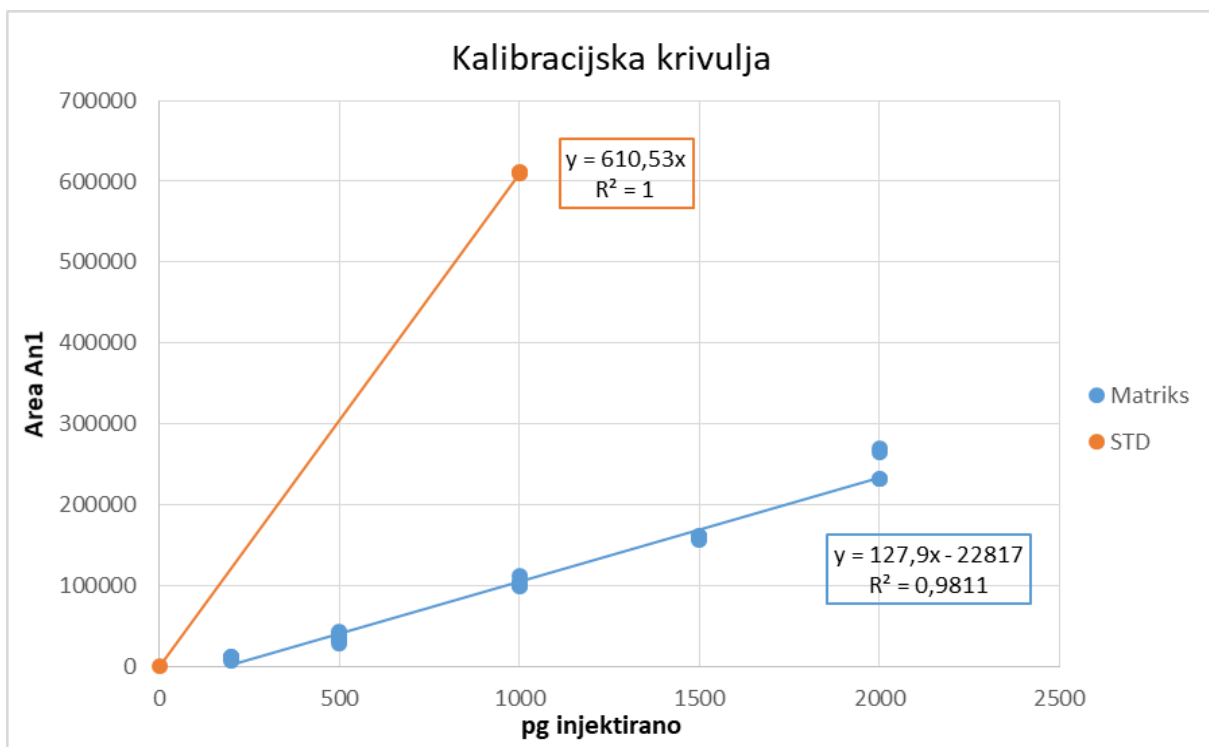
Uzorci analizirani na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju dobiveni su Quechers ekstrakcijom, te su rezultati prikazani grafički na slikama 38 – 44, grafovi prikazuju ovisnosti količine standarda (pg injektirano) o površini analita (Area An1).



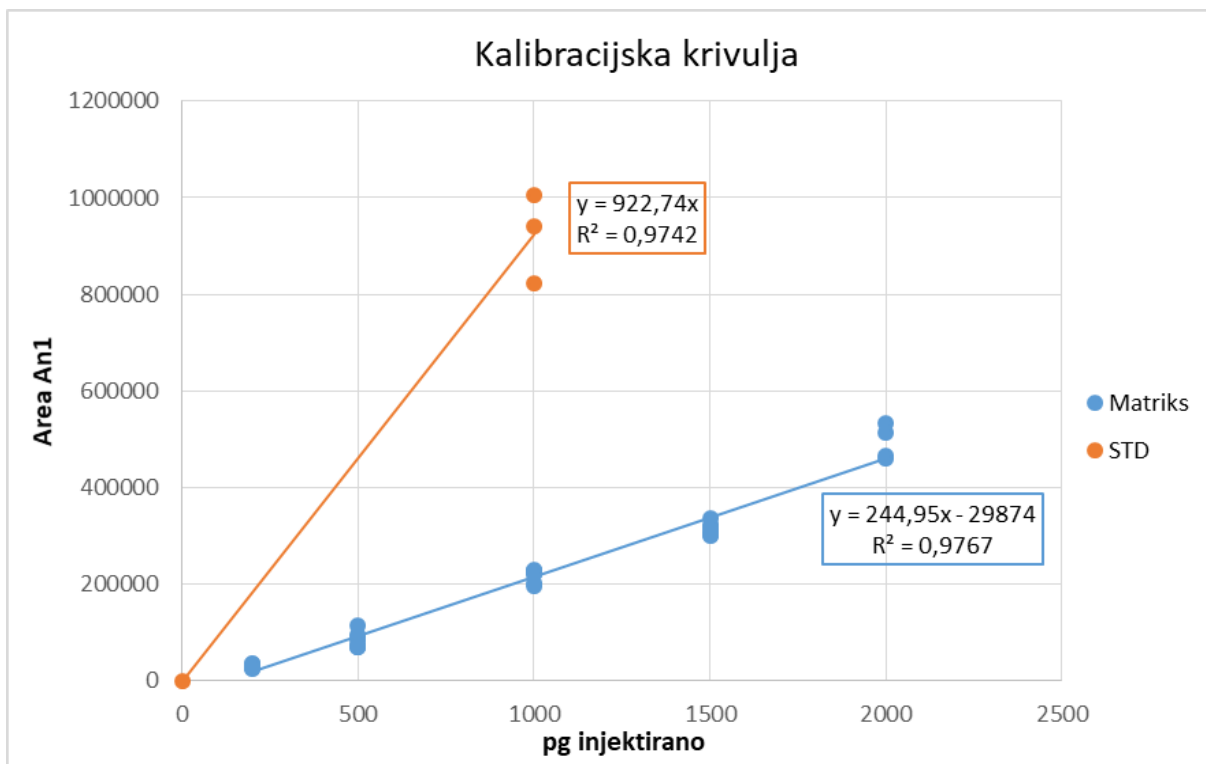
Slika 38. Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za tetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



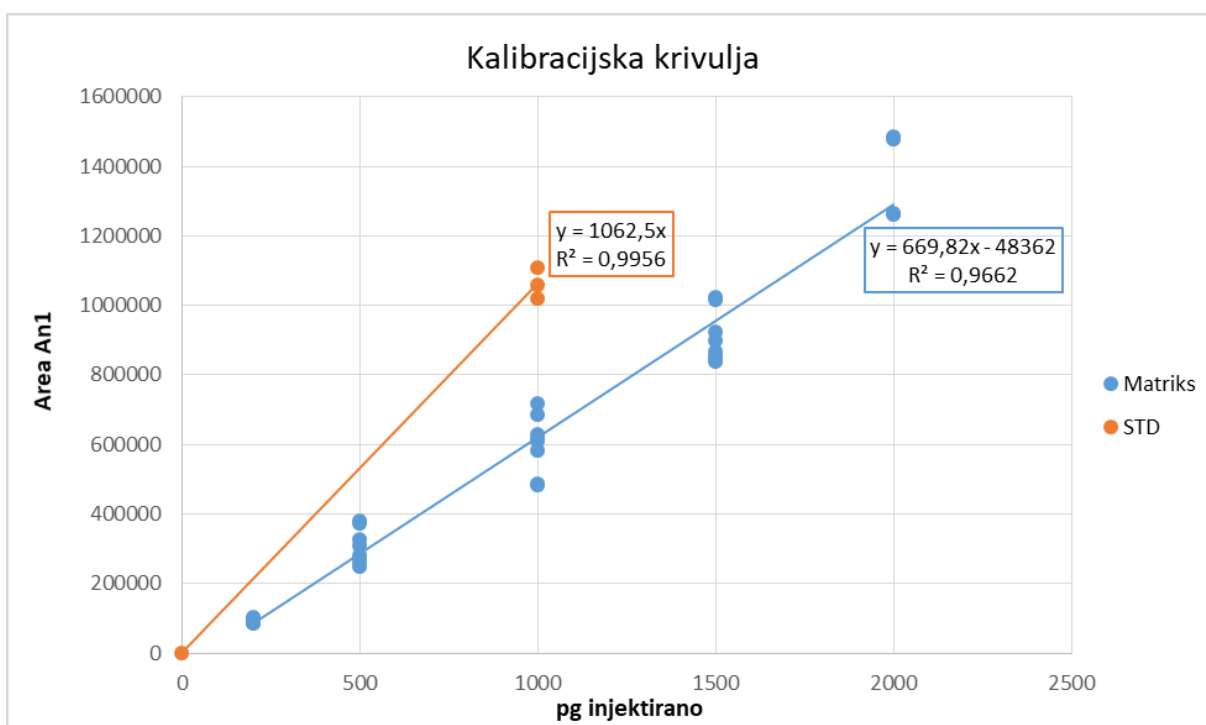
Slika 39. Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za epitetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



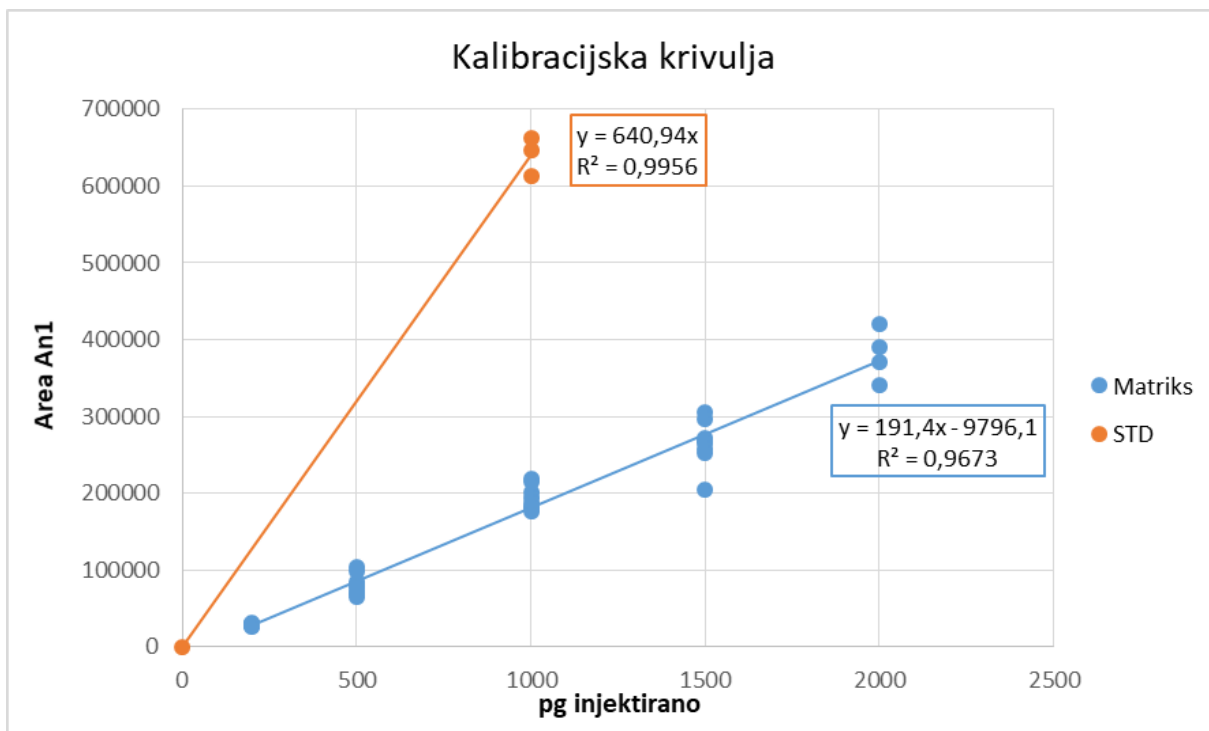
Slika 40. Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za oksitetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



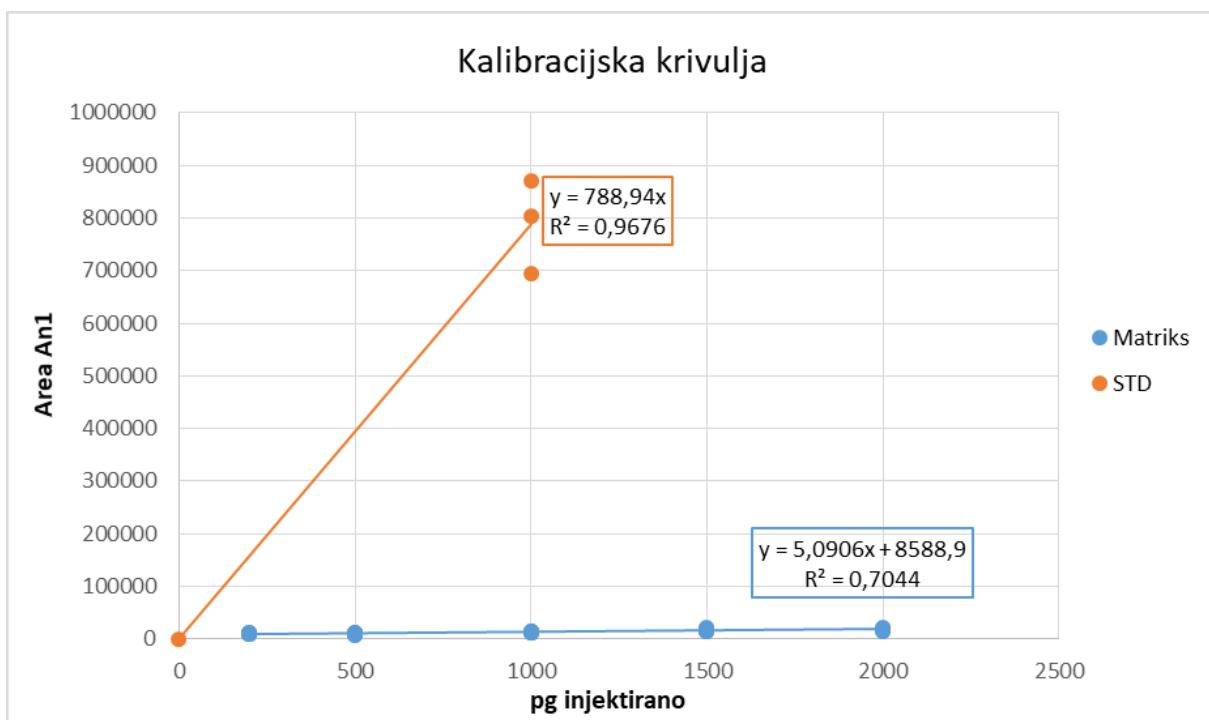
Slika 41. Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za epioksitetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



Slika 42. Usporedba standardne (STD) i matriks kalibracijske (Matriks) krivulje za klortetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



Slika 43. Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za epiklortetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



Slika 44. Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za doksiciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju

S ciljem određivanja matriks efekta na analite kod LC-MS/MS uređaja izračunat je omjer nagiba pravca na matriksu (mQ – za uzorke dobivene Quechers ekstrakcijom) i nagiba pravca na otapalu (s) te omjer nagiba pravca na matriksu (mACN – za uzorke dobivene ekstrakcijom s ACN) i nagiba pravca na otapalu (s). U tablici 10 prikazane su brojčane vrijednosti nagiba pravca kalibracijskih krivulja (STD, Quechers, ACN) te omjeri mQ/s i mACN/s.

Tablica 10. Vrijednosti nagiba kalibracije na otapalu (s) i na matriksu (mQ i mACN) te njihovi omjeri za različite ispitivane tetraciklinske antibiotike primjenom LC-MS/MS uređaja

| ANALIT | Nagib pravca | | | mQ/s (%) | mACN/s (%) |
|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------|---------------|
| | s | mQ | mACN | | |
| Tetraciklin | 0,0003 | $6,6279 \cdot 10^{-5}$ | $9,4451 \cdot 10^{-5}$ | 23,41 | 33,36 |
| Epitetraciklin | 0,0002 | $6,3725 \cdot 10^{-5}$ | 0,0001 | 28,53 | 58,21 |
| Oksitetraciklin | 0,0002 | $3,3371 \cdot 10^{-5}$ | $5,9525 \cdot 10^{-5}$ | 19,37 | 34,55 |
| Epioksitetraciklin | $4,3188 \cdot 10^{-5}$ | $1,4303 \cdot 10^{-5}$ | $1,5419 \cdot 10^{-5}$ | 33,12 | 35,7 |
| Klortetraciklin | 0,0002 | $5,2619 \cdot 10^{-5}$ | $4,1882 \cdot 10^{-5}$ | 25,74 | 20,49 |
| Epiklortetracilin | $5,0193 \cdot 10^{-5}$ | $1,4545 \cdot 10^{-5}$ | $2,4158 \cdot 10^{-5}$ | 28,98 | 48,13 |
| Doksiciklin | 0,0001 | $3,4119 \cdot 10^{-5}$ | $2,9865 \cdot 10^{-5}$ | 22,86 | 20,01 |

Iz omjera mQ/s i mACN/s prikazanih u tablici 10 vidljivo je da je manji utjecaj matriksa na analite kod uzoraka dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom – veći je postotak omjera mACN/s za tetraciklin, epitetraciklin, oskitetraciklin, epioksitetraciklin i epiklortetraciklin.

Također, kako bi se odredio matriks efekt na analite za uzorke ispitivane na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju prikazane su vrijednosti nagiba pravca kalibracijske krivulje na otapalu (s) i i matriksu (m) te je izračunat omjer m/s (tablica 11).

Tablica 11. Vrijednosti nagiba kalibracije na otapalu (s) i na matriksu (m) te njihovi omjeri za različite ispitivane tetraciklinske antibiotike primjenom UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| ANALIT | Nagib pravca | | m/s (%) |
|--------------------|--------------|----------|---------|
| | s | m | |
| Tetraciklin | 917,7147 | 651,9175 | 71,04 |
| Epitetraciklin | 909,155 | 201,3901 | 22,15 |
| Oksitetraciklin | 610,534 | 127,8978 | 20,95 |
| Epioksitetraciklin | 922,7367 | 244,9485 | 26,55 |
| Klortetraciklin | 1062,515 | 669,8238 | 63,04 |
| Epiklortetracilin | 640,934 | 191,4008 | 29,86 |
| Doksiciklin | 788,9447 | 5,0906 | 0,64 |

Iz omjera m/s prikazanih u tablici 11 može se zaključiti da matriks ima najveći utjecaj na doksiciklin (0,64%), a najmanji na tetraciklin (71,04%) i klortetraciklin (63,04%).

Usporedbom uzoraka dobivenih Quechers ekstrakcijom analiziranih na LC-MS/MS uređaju (mQ/s vrijednosti u tablici 10) i na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju (m/s vrijednosti u tablici 11) može se zaključiti da je matriks efekt na tetraciklin i klortetraciklin puno manji kod analize na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju, dok je za doksiciklin manji matriks efekt na uređaju LC-MS/MS. Kod ostalih analita (epitetraciklin, oksitetraciklin, epioksitetraciklin, epiklortetraciklin) vrijednosti su približne.

4.4. PONOVLJIVOST PRIMIJENJENIH METODA ODREĐIVANJA REZIDUA TETRACIKLINA

Ponovljivost označava sposobnost da isti analitičar, koristeći se istom opremom u istom laboratoriju, dobije neovisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim jedinicama (Pravilnik, 2005). Postotak koeficijenta varijacije (CV) predstavlja omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija analita u uzorku.

$$CV (\%) = \frac{STDEV}{AVERAGE} * 100$$

Tablice 12 i 13 prikazuju izračunate vrijednosti standardne devijacije (STDEV) i koeficijent varijacije (CV) za svaku koncentracijsku razinu za uzorke analizirane LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS uređajem.

Tablica 12. Proračun standardne devijacije (STDEV) i koeficijenta varijacije (CV) za svaku koncentracijsku razinu (M1-M5) kod uzoraka dobivenih Quechers ekstrakcijom (Q) i ekstrakcijom s acetonitrilom (ACN), koji su bili analizirani na LC-MS/MS uređaju

| ANALIT | | M1 | | M2 | | M3 | | M4 | | M5 | |
|--------------------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | Q | ACN | Q | ACN | Q | ACN | Q | ACN | Q | ACN |
| Tetraciklin | STDEV | 1,844 | 2,482 | 3,424 | 1,408 | 7,22 | 15,986 | 7,632 | 21,717 | 30,251 | 58,309 |
| | CV (%) | 9,04 | 10,86 | 6,78 | 3,49 | 7,15 | 15,46 | 5,33 | 13,44 | 14,79 | 19,32 |
| Epitetraciklin | STDEV | 1,152 | 8,306 | 14,425 | 27,389 | 10,889 | 27,838 | 14,881 | 27,409 | 20,587 | 27,8 |
| | CV (%) | 6,85 | 31,23 | 32,52 | 35,52 | 9,74 | 17,1 | 9,47 | 10,45 | 10,81 | 6,83 |
| Oksitetraciklin | STDEV | 2,181 | 5,428 | 8,362 | 34,93 | 11,397 | 12,794 | 22,597 | 27,548 | 11,37 | 33,877 |
| | CV (%) | 12,14 | 14,11 | 16,11 | 36,97 | 11,65 | 6,04 | 14,45 | 9,45 | 5,8 | 7,59 |
| Epioksitetraciklin | STDEV | 1,744 | 2,185 | 4,965 | 10,306 | 11,951 | 13,678 | 14,143 | 40,881 | 14,878 | 8,397 |
| | CV (%) | 8,98 | 9,8 | 10,44 | 21,42 | 12,11 | 11,89 | 8,78 | 28,81 | 7,71 | 3,86 |
| Klortetraciklin | STDEV | 1,673 | 9,338 | 7,687 | 8,986 | 7,172 | 1,786 | 5,403 | 7,132 | 12,236 | 4,119 |
| | CV (%) | 8,05 | 64,73 | 14,35 | 23,61 | 7,62 | 2,09 | 3,67 | 5,67 | 6,08 | 2,13 |
| Epiklortetraciklin | STDEV | 3,688 | 1,612 | 6,993 | 3,115 | 6,778 | 0,893 | 4,966 | 18,531 | 4,217 | 4,941 |
| | CV (%) | 18,29 | 6,18 | 14,43 | 5,3 | 6,8 | 0,87 | 3,32 | 11,47 | 2,1 | 2,62 |
| Doksiciklin | STDEV | 0,367 | 0,132 | 1,281 | 1,397 | 2,57 | 1,182 | 3,567 | 0,964 | 3,238 | 5,156 |
| | CV (%) | 12,39 | 8,87 | 12,49 | 21,95 | 12,34 | 9,78 | 11,14 | 4,25 | 8,49 | 14,38 |

Prema Pravilniku (2005) koeficijent varijacije (CV) obnovljivosti za kvantitativne metode određivanje tetraciklina u jajima ne bi smio biti veći od 23%. Iz rezultata prikazanih u tablici 12 možemo zaključiti da je ponovljivost metode određivanja tetraciklinskih antibiotika u jajima dobivenih Quechers ekstrakcijom, primjenom LC-MS/MS uređaja, zadovoljavajuća – sve vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) ispod su dozvoljene razine, osim kod uzorka obogaćenog na M2 koncentracijsku razinu kod kojeg se određivala prisutnost epitetraciklina. Usporedbom različitih metoda ekstrakcije uzoraka analiziranih na LC-MS/MS uređaju može se vidjeti da su bolji rezultati dobiveni Quechers ekstrakcijom, osim u slučajevima koncentracijskih razina M2 za tetraciklin, M5 za epitetraciklin, M3 i M4 za oksitetraciklin, M3 i M5 za epioksitetraciklin, M3 i M5 za klortetraciklin, M1-M3 za epiklortetraciklin te M1, M3 i M4 za doksiciklin kada su bolji rezultati dobiveni ekstrakcijom organskim otapalom.

Tablica 13. Proračun standardne devijacije (STDEV) i koeficijenta varijacije (CV) za svaku koncentracijsku razinu (M1-M5) kod uzoraka koji su bili analizirani na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju

| ANALIT | | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|---------------------------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Tetraciklin | STDEV | 0,99 | 2,926 | 3,837 | 5,782 | 9,358 |
| | CV (%) | 4,99 | 6,12 | 3,72 | 3,78 | 4,78 |
| Epitetraciklin | STDEV | 1,03 | 1,819 | 8,155 | 11,356 | 4,908 |
| | CV (%) | 5,39 | 4,02 | 7,57 | 7,58 | 2,514 |
| Oksitetraciklin | STDEV | 1,081 | 1,658 | 5,143 | 4,989 | 9,247 |
| | CV (%) | 4,83 | 3,79 | 5,1 | 3,32 | 4,6 |
| Epioksitetraciklin | STDEV | 0,402 | 1,132 | 6,039 | 6,766 | 8,107 |
| | CV (%) | 1,83 | 2,54 | 5,95 | 4,49 | 4,06 |
| Klortetraciklin | STDEV | 0,631 | 2,42 | 8,867 | 12,849 | 12,091 |
| | CV (%) | 3,38 | 4,5 | 9,26 | 8,49 | 6,03 |
| Epiklortetraciklin | STDEV | 1,396 | 2,282 | 7,841 | 25,07 | 17,8 |
| | CV (%) | 8,43 | 4,74 | 7,11 | 16,8 | 9,25 |
| Doksiciklin | STDEV | 1,054 | 1,545 | 3,834 | 0,708 | 1,522 |
| | CV (%) | 19,59 | 25,92 | 30,28 | 5,48 | 7,61 |

Uvjet da koeficijent varijacije (CV) obnovljivosti za kvantitativne metode određivanja tetraciklina u jajima ne bude veći od 23% nije bio zadovoljen samo kod koncentracijskih razina M2 i M3 doksiciklina u uzorcima jaja analiziranih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju. Međutim, ponovljivost je prihvatljiva, budući da je koncentracija doksiciklina, pri kojoj je određivana ponovljivost, niska.

Usporedbom rezultata ponovljivosti analiziranih uzoraka jaja dobivenih Quechers ekstrakcijom, ali ispitivanih na različitim uređajima, vidljivo je da su se bolji rezultati dobili na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju – većina CV vrijednosti niže su nego kod LC-MS/MS uređaja (osim za koncentracijske razine M3-M5 za epiklortetraciklin, M3 i M4 za klortetraciklin te M1-M3 za doksiciklin).

5. ZAKLJUČCI

1. U ovom radu razvijene su metode za određivanje rezidua tetraciklinskih antibiotika u uzorcima jaja primjenom tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) i tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (UHPLC/Q-TOF-MS).
2. U kontrolnim uzorcima jaja nije bilo rezidua tetraciklinskih antibiotika što je ustanovljeno primjenom LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS metoda.
3. Provedena je optimizacija LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS metoda u svrhu postizanja maksimalne osjetljivosti i selektivnosti instrumenata za određivanje rezidua tetraciklinskih antibiotika u obogaćenim uzorcima jaja, pri čemu je veća osjetljivost UHPLC/Q-TOF-MS metode.
4. Usporedbom rezultata određivanja rezidua tetraciklinskih antibiotika u uzorcima jaja obogaćenih tetraciklinskim antibioticima, pokazalo se da su obje metode ekstrakcije analita, otapalom i Quechers ekstrakcijom, uspješno primjenjene.
5. U uzorcima dobivenim Quechers ekstrakcijom, postignuta je bolja ponovljivost LC-MS/MS metode, nego u uzorcima dobivenim ekstrakcijom organskim otapalom.

6. LITERATURA

- Alačević, M., Strašek-Vešligaj, M., Sermonti, G. (1973) The Circular Linkage Map of *Streptomyces rimosus*. *Microbiology* **77**, 173-185. doi: 10.1099/00221287-77-1-173
- Barišić, L. (2016): predavanje „Masena spektrometrija“ iz modula „Instrumentalna analitika“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <https://moodle.srce.hr/2015-2016/pluginfile.php/703293/mod_label/intro/ms.pdf>. Pristupljeno: 20. lipnja 2019.
- Bedale, W.A. (2019) Veterinary drug residues in foods of animal origin. U: *Chemical hazards in foods of animal origin*, (F.J.M. Smulders, I.M.C.M. Rietjens, M. Rose, ured.), Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, str. 51-79.
- Binnie, C., Warren, M., Butler, M.J. (1989) Cloning and Heterologous Expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* Genes Involved in Oxytetracycline Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **171**, 887-895. doi: 10.1128/jb.171.2.887-895.1989
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- Butler, M.J., Binnie, C., Hunter, I.S., Sugden, D.A., Warren, M. (1990) Genetic manipulation of the oxytetracycline biosynthetic pathway genes. *Dev. Ind. Microbiol.* **31**, 41-50.
- Charest, M.G., Lerner, C.D., Brubaker, J.D., Siegel, D.R., Myers, A.G. (2005) A Convergent Enantioselective Route to Structurally Diverse 6-Deoxytetracycline Antibiotics. *Science* **308**, 395-398. doi: 10.1126/science.1109755
- Chopra, I., Hawkey, P.M., Hinton, M. (1992) Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemoth.* **29**, 245-277. doi: 10.1093/jac/29.3.245
- Clark, R.B., Hunt, D.K., He, M., Achorn, C., Chen, C.L., Deng, Y., Fyfe, C., Grossman, T.H., Hogan, P.C., O'Brien, W.J., Plamondon, L., Rönn, M., Sutcliffe, J.A., Zhu, Z., Xiao, X.-Y. (2012) Fluorocyclines. 2. Optimization of the C-9 Side-Chain for Antibacterial Activity and Oral Efficacy. *J. Med. Chem.* **55**, 606-622. doi: 10.1021/jm201467r
- Dairi, T., Nakano, T., Aisaka, K., Katsumata, R., Hasegawa, M. (1995) Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Responsible for Chlorination of Tetracycline. *Biosci Biotech. Bioch.* **59**, 1099-1106. doi: 10.1271/bbb.59.1099

- Dolejska, M., Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carattoli, A. (2013) Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance nodulation cell division/multidrug efflux pump. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 34-39. doi: 10.1093/jac/dks357
- Draper, M.P., Weir, S., Maccone, A., Donatelli, J., Trieber, C.A., Tanaka, S.K., Levy, S.B. (2014) Mechanism of Action of the Novel Aminomethylcycline Antibiotic Omadacycline. *Antimicrob. Agents Ch.* **58**, 1279-1283. doi: 10.1128/AAC.01066-13
- Friend, E.J., Hopwood, D.A. (1971) The Linkage Map of *Streptomyces rimosus*. *J. Gen. Microbiol.* **68**, 187-197. doi: 10.1099/00221287-68-2-187
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S. (2005) Liquid chromatography tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends Anal. Chem.* **24**, 704-733. doi: /10.1016/j.trac.2005.02.007
- Henderson, W., McIndoe, J.S. (2005) *Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds*, 1. izd., John Wiley & Sons, New Jersey. doi: 10.1002/0470014318
- Hranueli, D., Perić, N., Petković, H., Biuković, G., Toman, Z., Pigac, J., Borovička, B., Bago, A., Crnolatac, I., Maršić, T., Zhou, L., Matošić, S., Waterman, P.G., Cullum, J., Hunter, I.S. (1999) Novel Hybrid Polyketide Compounds Produced by Genetic Engineering of the Oxytetracycline Biosynthetic Pathway. *Food Technol. Biotech.* **37**, 117-125.
- Huttner, B., Jones, M., Rubin, M.A., Neuhauser, M.M., Gundlapalli, A., Samore, M. (2012) Drugs of Last Resort? The Use of Polymyxins and Tigecycline at US Veterans Affairs Medical Centers, 2005 - 2010. *PLoS ONE* **7**, e36649. doi: 10.1371/journal.pone.0036649
- Inbaraj, S., Sriram, V.K., Thomas, P., Verma, A., Chaudhuri, P. (2019) Antibiotic Resistance in the Veterinary Perspective: A Major Challenge in Achieving One Health. U: *Global Applications of One Health Practice and Care*, (S. Yasobant, D. Saxena, ured.), IGI Global, str. 142-157.
- Hrvatski veterinarski institut (2018) Interna metoda Laboratorija za određivanje rezidua, SOP Z-I-2-AM02, Zagreb.

- Kamel, A.M., Fouda, H.G., Brown, P.R., Munson, B. (2002) Mass Spectral Characterization of Tetracyclines by Electrospray Ionization, H/D Exchange, and Multiple Stage Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **13**, 543-557.
- Kim, C., Mwangi, M., Chung, M., Milheiriço, C., de Lencastre, H., Tomasz, A. (2013) The Mechanism of Heterogeneous Beta-Lactam Resistance in MRSA: Key Role of the Stringent Stress Response. *PLoS ONE* **8**, e82814. doi: 10.1371/journal.pone.0082814
- Kojima, S., Nikaido, H. (2013) Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E2629-E2634. doi: 10.1073/pnas.1310333110
- Kumar, N., Radhakrishnan, A., Wright, C.C., Chou, T.-H., Lei, H.-T., Bolla, J.R., Tringides, M.L., Rajashankar, K.R., Su, C.-C., Purdy, G.E., Yu, E.W. (2014) Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci.* **23**, 423-432. doi: 10.1002/pro.2424
- Leclercq, R. (2002) Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 482-492. doi: 10.1086/324626
- Lešnik, U., Lukežič, T., Podgoršek, A., Horvat, J., Polak, T., Šala, M., Jenko, B., Harmrolfs, K., Ocampo-Sosa, A., Martínez-Martínez, L., Herron, P.R., Fujs, Š., Kosec, G., Hunter, I.S., Müller, R., Petković, H. (2015) Construction of a New Class of Tetracycline Lead Structures with Potent Antibacterial Activity Through Biosynthetic Engineering. *Angew. Chem. Int. Edit.* **54**, 3937-3940. doi: 10.1002/anie.201411028
- Lukežič, T., Lešnik, U., Podgoršek, A., Horvat, J., Polak, T., Šala, M., Jenko, B., Raspor, P., Herron, P.R., Hunter, I.S., Petković, H. (2013) Identification of the chelocardin biosynthetic gene cluster from *Amycolatopsis sulphurea*: a platform for producing novel tetracycline antibiotics. *Microbiology* **159**, 2524-2532. doi: 10.1099/mic.0.070995-0
- Makovec, S., Kos, B., Šušković, J., Bilandžić, N. (2014) Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **9**, 7-16.
- Manimekalai, M., Rawson, A., Singh Sengar, A., Kalakandan, S. (2019) Development, Optimization, and Validation of Methods for Quantification of Veterinary Drug Residues in

Complex Food Matrices Using Liquid-Chromatography - A Review. *Food Anal. Method.* **12**, 1823-1837. doi: 10.1007/s12161-019-01512-9

McCormick, J.R.D., Jensen, E.R. (1969) Biosynthesis of the tetracyclines. XII. Anhydrodemethylchlortetracycline from a mutant of *Streptomyces aureofaciens*. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 206. doi: 10.1021/ja01029a046

McDowall, K.J., Doyle, D., Butler, M.J., Binnie, C., Warren, M., Hunter, I.S. (1990) Molecular Genetics of Oxytetracycline Production by *Streptomyces rimosus*. U: *Proceedings of the International Symposium on the Genetics and Product Formation in Streptomyces*, (Baumberg, S., Krügel, H., Noock, D., ured.). Springer, Boston, MA, str. 105-116.

Mindlin, S.Z., Alikhanian, S.I., Vladimirov, A.V., Mikhailova, G.R. (1961) A new hybrid strain of an oxytetracycline-producing organism, *Streptomyces rimosus*. *Appl. Microbiol.* **9**, 349-353.

Molnar, V., Matković, Z., Tambić, T., Kozma, C. (1977) Clinico-pharmacological investigation of chelocardine in patients suffering from urinary tract infection. *Liječ. Vjesn.* **99**, 560-562. (in Croatian).

Nelson, M.L., Levy, S.B. (2011) The history of the tetracyclines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1241**, 17-32. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x

Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D.N. (2014) Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.* **395**, 559-575. doi: 10.1515/hsz-2013-0292

Oliva, B., Gordon, G., McNicholas, P., Ellestad, G., Chopra, I. (1992) Evidence that Tetracycline Analogs Whose Primary Target Is Not the Bacterial Ribosome Cause Lysis of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Ch.* **36**, 913-919. doi: 10.1128/aac.36.5.913

Oliver, T.J., Sinclair, A.C. (1964) Antibiotic M-319. US patent 3,155,582.

Perić-Concha, N., Borovička, B., Long, P.F., Hranueli, D., Waterman, P.G., Hunter, I.S. (2005) Ablation of the *otcC* Gene Encoding a Post-polyketide Hydroxylase from the Oxytetracycline Biosynthetic Pathway in *Streptomyces rimosus* Results in Novel Polyketides with Altered Chain Length. *J. Biol. Chem.* **280**, 37455-37460. doi: 10.1074/jbc.M503191200

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

Petković, H., Thamchaipenet, A., Zhou, L.H., Hranueli, D., Raspor, P., Waterman, P.G., Hunter, I.S. (1999) Disruption of an Aromatase/Cyclase from the Oxytetracycline Gene Cluster of *Streptomyces rimosus* Results in Production of Novel Polyketides with Shorter Chain Lengths. *J. Biol. Chem.* **274**, 32829-32834.

Pigac, J., Alačević, M. (1979) Mapping of oxytetracycline genes in *Streptomyces rimosus*. *Period. Biol.* **81**, 575-582.

Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2005) *Narodne novine* **2**, Zagreb.

Rhodes, P.M., Winskill, N., Friend, E.J., Warren, M. (1981) Biochemical and Genetic Characterization of *Streptomyces rimosus* Mutants Impaired in Oxytetracycline Biosynthesis. *Microbiology* **124**, 329-338. doi: 10.1099/00221287-124-2-329

Rogalski, W., Kirchlechner, R., Seubert, J., Gottschlich, R., Steinigeweg, R., Bergmann, R., Wahlig, H., Gante, J. (1977) Tetracyclic compounds. US patent 4,024,272.

Ryan, M.J., Lotvin, J.A., Strathy, N., Fantini, S.E. (1996) Cloning of the biosynthetic pathway for chlortetracycline and tetracycline formation and cosmids useful therein. US patent 5,589,385.

Šušković, J., Kos, B., Novak, J. (2016): predavanje iz modula „Tehnologija antibiotika“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <https://moodle.srce.hr/2016-2017/pluginfile.php/1115908/mod_resource/content/1/antibiotici%207_2017.pdf>.

Pristupljeno: 15. svibnja 2019.

Tetraphase Pharmaceuticals (2015) Tetraphase announces top-line results from IGNITE2 phase 3 clinical trial of eravacycline in cUTI, <<https://ir.tphase.com/news-releases/news-release-details/tetraphase-announces-top-line-results-ignite2-phase-3-clinical>>. Pristupljeno: 28. svibnja 2019.

Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G.D. (2010) The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 419-431. doi: 10.1007/s00018-009-0172-6

Drugsite Trust (2014) Top 100 drugs for Q4 2013 by sales, , Auckland, New Zealand; <<https://www.drugs.com/stats/top100/sales>>. Pristupljeno: 24. svibnja 2019.

Uredba komisije (EZ) (2010) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (SL L 15, 20.1.2010., sa svim izmjenama i dopunama)

US FDA (Food and Drug Administration), Novel Drug Approvals for 2018, <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm592464.htm>
Pristupljeno: 24. svibnja 2019.

Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R. (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 742-750. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7

Vaněk, Z., Hošťálek, Z., Blumauerová, M., Mikulík, K., Podojil, M., Běhal, V., Jechová, V. (1973) The biosynthesis of tetracycline. *Pure Appl. Chem.* **34**, 463-486. doi: 10.1351/pac197334030463

Walker, D., Fowler, T. (2011) Chief Medical Officer annual report 2011: antimicrobial resistance, Department of Health. <<https://www.gov.uk/government/publications/chief-medical-officer-annual-report-volume-2>>. Pristupljeno: 18. svibnja 2019.

Wang, P., Bashiri, G., Gao, X., Sawaya, M.R., Tang, Y. (2013) Uncovering the Enzymes that Catalyze the Final Steps in Oxytetracycline Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7138-7141. doi: 10.1021/ja403516un

World Economic Forum (2014) Global Risks 2014 Report <<http://www.weforum.org/reports/global-risks-2014report>>. Pristupljeno: 18. svibnja 2019.

Wozniak, R.A., Waldor, M.K. (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 552-563. doi: 10.1038/nrmicro2382

Wright, G.D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Delivery Rev.* **57**, 1451-1470. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002

Wright, G.D. (2011) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem. Commun.* **47**, 4055-4061. doi: 10.1039/c0cc05111j

Yin, S., Wang, W., Wang, X., Zhu, Y., Jia, X., Li, S., Yuan, F., Zhang, Y., Yang, K. (2015) Identification of a cluster-situated activator of oxytetracycline biosynthesis and manipulation

of its expression for improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 46. doi: 10.1186/s12934-015-0231-7

Zhang, W., Ames, B.D., Tsai, S.C., Tang, Y. (2006) Engineered Biosynthesis of a Novel Amidated Polyketide, Using the Malonamyl-Specific Initiation Module from the Oxytetracycline Polyketide Synthase. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 2573-2580. doi: 10.1128/AEM.72.4.2573-2580.2006

Zhu, T., Cheng, X., Liu, Y., Deng, Z., You, D. (2013) Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial *Streptomyces aureofaciens*. *Metab. Eng.* **19**, 69-78. doi: 10.1016/j.ymben.2013.06.003

7. PRILOZI

U tablicama 14 - 20 prikazani su podaci LC-MS/MS mjerenja dobiveni Mass Hunter računalnim programom, ispitivani uzorci dobiveni su Quechers ekstrakcijom.

Tablica 14. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih Quechers ekstrakcijom, za tetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (AnI) | Površina standarda (AnIS) | AnI/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 0 | 48927 | 0 | 200 | 7,575 | 21,550 |
| 1b | M1 | 379 | 46800 | 0,008 | 200 | 7,566 | 22,966 |
| 2a | M1 | 674 | 51986 | 0,013 | 200 | 7,541 | 20,563 |
| 2b | M1 | 435 | 53484 | 0,008 | 200 | 7,55 | 20,110 |
| 3a | M1 | 341 | 47650 | 0,007 | 200 | 7,558 | 17,507 |
| 3b | M1 | 411 | 47800 | 0,009 | 200 | 7,533 | 19,620 |
| 4a | M2 | 1418 | 48987 | 0,029 | 500 | 7,541 | 45,631 |
| 4b | M2 | 1335 | 46343 | 0,029 | 500 | 7,558 | 47,267 |
| 5a | M2 | 967 | 46239 | 0,021 | 500 | 7,566 | 51,468 |
| 5b | M2 | 1828 | 45198 | 0,040 | 500 | 7,566 | 53,625 |
| 6a | M2 | 632 | 38720 | 0,016 | 500 | 7,558 | 54,197 |
| 6b | M2 | 781 | 39659 | 0,020 | 500 | 7,558 | 50,815 |
| 7a | M3 | 3345 | 44830 | 0,075 | 1000 | 7,55 | 102,267 |
| 7b | M3 | 2814 | 42844 | 0,066 | 1000 | 7,566 | 105,212 |
| 8a | M3 | 2817 | 50868 | 0,055 | 1000 | 7,558 | 91,707 |
| 8b | M3 | 3258 | 50305 | 0,065 | 1000 | 7,55 | 92,248 |
| 9a | M3 | 3899 | 47999 | 0,081 | 1000 | 7,566 | 107,222 |
| 9b | M3 | 3191 | 43828 | 0,073 | 1000 | 7,558 | 107,293 |
| 10a | M4 | 4352 | 43135 | 0,101 | 1500 | 7,558 | 154,248 |
| 10b | M4 | 5694 | 42884 | 0,133 | 1500 | 7,558 | 150,151 |
| 11a | M4 | 3590 | 41687 | 0,086 | 1500 | 7,566 | 134,031 |
| 11b | M4 | 4204 | 37413 | 0,112 | 1500 | 7,558 | 140,559 |
| 12a | M4 | 2223 | 32202 | 0,069 | 1500 | 7,566 | 142,047 |
| 12b | M4 | 2223 | 32693 | 0,068 | 1500 | 7,558 | 137,863 |
| 13a | M5 | 6136 | 45095 | 0,136 | 2000 | 7,566 | 217,428 |
| 13b | M5 | 6823 | 43306 | 0,158 | 2000 | 7,558 | 208,543 |
| 14a | M5 | 6973 | 51708 | 0,135 | 2000 | 7,558 | 179,736 |
| 14b | M5 | 6698 | 52390 | 0,128 | 2000 | 7,583 | 179,689 |
| 15a | M5 | 3532 | 49204 | 0,072 | 2000 | 7,566 | 257,041 |
| 15b | M5 | 6370 | 50481 | 0,126 | 2000 | 7,566 | 184,435 |

Tablica 15. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih Quechers ekstrakcijom, za epitetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 712 | 48927 | 0,015 | 200 | 7,115 | 18,171 |
| 1b | M1 | 699 | 46800 | 0,015 | 200 | 7,123 | 18,321 |
| 2a | M1 | 818 | 51986 | 0,016 | 200 | 7,123 | 15,888 |
| 2b | M1 | 533 | 53484 | 0,010 | 200 | 7,132 | 16,710 |
| 3a | M1 | 561 | 47650 | 0,012 | 200 | 7,132 | 15,720 |
| 3b | M1 | 543 | 47800 | 0,011 | 200 | 7,132 | 16,138 |
| 4a | M2 | 1564 | 48987 | 0,032 | 500 | 7,132 | 44,965 |
| 4b | M2 | 1670 | 46343 | 0,036 | 500 | 7,132 | 51,129 |
| 5a | M2 | 1436 | 46239 | 0,031 | 500 | 7,132 | 59,976 |
| 5b | M2 | 1760 | 45198 | 0,039 | 500 | 7,132 | 56,261 |
| 6a | M2 | 1073 | 38720 | 0,028 | 500 | 7,123 | 26,903 |
| 6b | M2 | 329 | 39659 | 0,008 | 500 | 7,123 | 26,927 |
| 7a | M3 | 3244 | 44830 | 0,072 | 1000 | 7,132 | 106,942 |
| 7b | M3 | 2961 | 42844 | 0,069 | 1000 | 7,132 | 120,654 |
| 8a | M3 | 3247 | 50868 | 0,064 | 1000 | 7,132 | 109,591 |
| 8b | M3 | 3286 | 50305 | 0,065 | 1000 | 7,132 | 94,566 |
| 9a | M3 | 3364 | 47999 | 0,070 | 1000 | 7,132 | 113,922 |
| 9b | M3 | 3296 | 43828 | 0,075 | 1000 | 7,132 | 125,382 |
| 10a | M4 | 3954 | 43135 | 0,092 | 1500 | 7,132 | 169,830 |
| 10b | M4 | 4394 | 42884 | 0,102 | 1500 | 7,132 | 173,243 |
| 11a | M4 | 4707 | 41687 | 0,113 | 1500 | 7,132 | 144,731 |
| 11b | M4 | 3831 | 37413 | 0,102 | 1500 | 7,132 | 168,805 |
| 12a | M4 | 3388 | 32202 | 0,105 | 1500 | 7,132 | 145,539 |
| 12b | M4 | 3323 | 32693 | 0,102 | 1500 | 7,132 | 140,946 |
| 13a | M5 | 5915 | 45095 | 0,131 | 2000 | 7,132 | 225,877 |
| 13b | M5 | 5651 | 43306 | 0,130 | 2000 | 7,132 | 204,938 |
| 14a | M5 | 6319 | 51708 | 0,122 | 2000 | 7,132 | 179,955 |
| 14b | M5 | 6418 | 52390 | 0,123 | 2000 | 7,132 | 180,691 |
| 15a | M5 | 5912 | 49204 | 0,120 | 2000 | 7,132 | 174,202 |
| 15b | M5 | 5605 | 50481 | 0,111 | 2000 | 7,132 | 176,856 |

Tablica 16. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih Quechers ekstrakcijom, za oksitetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 88 | 48927 | 0,002 | 200 | 7,613 | 15,075 |
| 1b | M1 | 254 | 46800 | 0,005 | 200 | 7,613 | 19,368 |
| 2a | M1 | 202 | 51986 | 0,004 | 200 | 7,588 | 20,107 |
| 2b | M1 | 318 | 53484 | 0,006 | 200 | 7,588 | 19,835 |
| 3a | M1 | 217 | 47650 | 0,005 | 200 | 7,613 | 15,657 |
| 3b | M1 | 167 | 47800 | 0,003 | 200 | 7,605 | 17,757 |
| 4a | M2 | 484 | 48987 | 0,010 | 500 | 7,597 | 45,002 |
| 4b | M2 | 564 | 46343 | 0,012 | 500 | 7,605 | 43,310 |
| 5a | M2 | 678 | 46239 | 0,015 | 500 | 7,597 | 45,122 |
| 5b | M2 | 518 | 45198 | 0,011 | 500 | 7,613 | 62,682 |
| 6a | M2 | 476 | 38720 | 0,012 | 500 | 7,597 | 58,023 |
| 6b | M2 | 687 | 39659 | 0,017 | 500 | 7,605 | 57,242 |
| 7a | M3 | 967 | 44830 | 0,022 | 1000 | 7,597 | 91,647 |
| 7b | M3 | 1196 | 42844 | 0,028 | 1000 | 7,613 | 94,241 |
| 8a | M3 | 1499 | 50868 | 0,029 | 1000 | 7,622 | 92,323 |
| 8b | M3 | 1552 | 50305 | 0,031 | 1000 | 7,597 | 84,953 |
| 9a | M3 | 1386 | 47999 | 0,029 | 1000 | 7,605 | 113,261 |
| 9b | M3 | 1772 | 43828 | 0,040 | 1000 | 7,605 | 110,637 |
| 10a | M4 | 1939 | 43135 | 0,045 | 1500 | 7,622 | 164,760 |
| 10b | M4 | 1910 | 42884 | 0,045 | 1500 | 7,597 | 142,621 |
| 11a | M4 | 1677 | 41687 | 0,040 | 1500 | 7,613 | 125,254 |
| 11b | M4 | 1853 | 37413 | 0,050 | 1500 | 7,605 | 144,631 |
| 12a | M4 | 1512 | 32202 | 0,047 | 1500 | 7,63 | 175,575 |
| 12b | M4 | 1733 | 32693 | 0,053 | 1500 | 7,622 | 184,917 |
| 13a | M5 | 3496 | 45095 | 0,078 | 2000 | 7,638 | 200,439 |
| 13b | M5 | 2693 | 43306 | 0,062 | 2000 | 7,638 | 216,373 |
| 14a | M5 | 2917 | 51708 | 0,056 | 2000 | 7,638 | 190,472 |
| 14b | M5 | 3625 | 52390 | 0,069 | 2000 | 7,638 | 193,593 |
| 15a | M5 | 2875 | 49204 | 0,058 | 2000 | 7,63 | 192,386 |
| 15b | M5 | 3045 | 50481 | 0,060 | 2000 | 7,646 | 183,264 |

Tablica 17. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih Quechers ekstrakcijom, za epioksitetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 104 | 48927 | 0,002 | 200 | 7,335 | 22,127 |
| 1b | M1 | 106 | 46800 | 0,002 | 200 | 7,344 | 20,213 |
| 2a | M1 | 122 | 51986 | 0,002 | 200 | 7,344 | 17,601 |
| 2b | M1 | 123 | 53484 | 0,002 | 200 | 7,344 | 17,679 |
| 3a | M1 | 125 | 47650 | 0,003 | 200 | 7,344 | 18,760 |
| 3b | M1 | 96 | 47800 | 0,002 | 200 | 7,344 | 20,109 |
| 4a | M2 | 343 | 48987 | 0,007 | 500 | 7,344 | 51,468 |
| 4b | M2 | 254 | 46343 | 0,005 | 500 | 7,344 | 41,049 |
| 5a | M2 | 345 | 46239 | 0,007 | 500 | 7,344 | 47,966 |
| 5b | M2 | 341 | 45198 | 0,008 | 500 | 7,344 | 54,309 |
| 6a | M2 | 301 | 38720 | 0,008 | 500 | 7,344 | 47,479 |
| 6b | M2 | 259 | 39659 | 0,007 | 500 | 7,336 | 43,105 |
| 7a | M3 | 560 | 44830 | 0,012 | 1000 | 7,344 | 86,637 |
| 7b | M3 | 720 | 42844 | 0,017 | 1000 | 7,344 | 103,868 |
| 8a | M3 | 778 | 50868 | 0,015 | 1000 | 7,352 | 91,779 |
| 8b | M3 | 759 | 50305 | 0,015 | 1000 | 7,352 | 91,403 |
| 9a | M3 | 661 | 47999 | 0,014 | 1000 | 7,344 | 98,852 |
| 9b | M3 | 669 | 43828 | 0,015 | 1000 | 7,352 | 119,695 |
| 10a | M4 | 987 | 43135 | 0,023 | 1500 | 7,352 | 167,228 |
| 10b | M4 | 906 | 42884 | 0,021 | 1500 | 7,352 | 164,133 |
| 11a | M4 | 788 | 41687 | 0,019 | 1500 | 7,352 | 148,288 |
| 11b | M4 | 818 | 37413 | 0,022 | 1500 | 7,352 | 139,984 |
| 12a | M4 | 828 | 32202 | 0,026 | 1500 | 7,344 | 169,792 |
| 12b | M4 | 700 | 32693 | 0,021 | 1500 | 7,352 | 177,466 |
| 13a | M5 | 1412 | 45095 | 0,031 | 2000 | 7,352 | 211,597 |
| 13b | M5 | 1389 | 43306 | 0,032 | 2000 | 7,352 | 198,175 |
| 14a | M5 | 1383 | 51708 | 0,027 | 2000 | 7,344 | 189,145 |
| 14b | M5 | 1187 | 52390 | 0,023 | 2000 | 7,352 | 179,640 |
| 15a | M5 | 1358 | 49204 | 0,028 | 2000 | 7,352 | 205,670 |
| 15b | M5 | 1321 | 50481 | 0,026 | 2000 | 7,352 | 173,499 |

Tablica 18. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih Quechers ekstrakcijom, za klortetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 580 | 48927 | 0,012 | 20 | 8,311 | 23,083 |
| 1b | M1 | 648 | 46800 | 0,014 | 20 | 8,320 | 21,698 |
| 2a | M1 | 452 | 51986 | 0,009 | 20 | 8,311 | 18,339 |
| 2b | M1 | 301 | 53484 | 0,006 | 20 | 8,328 | 19,783 |
| 3a | M1 | 487 | 47650 | 0,010 | 20 | 8,328 | 20,204 |
| 3b | M1 | 644 | 47800 | 0,013 | 20 | 8,361 | 21,529 |
| 4a | M2 | 1063 | 48987 | 0,022 | 50 | 8,303 | 47,900 |
| 4b | M2 | 1299 | 46343 | 0,028 | 50 | 8,336 | 62,739 |
| 5a | M2 | 1146 | 46239 | 0,025 | 50 | 8,311 | 50,431 |
| 5b | M2 | 1146 | 45198 | 0,025 | 50 | 8,345 | 58,827 |
| 6a | M2 | 1071 | 38720 | 0,028 | 50 | 8,336 | 42,853 |
| 6b | M2 | 1110 | 39659 | 0,028 | 50 | 8,311 | 58,753 |
| 7a | M3 | 1876 | 44830 | 0,042 | 100 | 8,320 | 94,062 |
| 7b | M3 | 2098 | 42844 | 0,049 | 100 | 8,336 | 84,246 |
| 8a | M3 | 2471 | 50868 | 0,049 | 100 | 8,311 | 86,692 |
| 8b | M3 | 2500 | 50305 | 0,050 | 100 | 8,320 | 101,052 |
| 9a | M3 | 2736 | 47999 | 0,057 | 100 | 8,345 | 98,446 |
| 9b | M3 | 2338 | 43828 | 0,053 | 100 | 8,328 | 100,266 |
| 10a | M4 | 3075 | 43135 | 0,071 | 150 | 8,328 | 141,239 |
| 10b | M4 | 2834 | 42884 | 0,066 | 150 | 8,328 | 145,399 |
| 11a | M4 | 3261 | 41687 | 0,078 | 150 | 8,328 | 144,660 |
| 11b | M4 | 3045 | 37413 | 0,081 | 150 | 8,336 | 144,892 |
| 12a | M4 | 2784 | 32202 | 0,086 | 150 | 8,336 | 149,359 |
| 12b | M4 | 2285 | 32693 | 0,070 | 150 | 8,361 | 156,733 |
| 13a | M5 | 4885 | 45095 | 0,108 | 200 | 8,345 | 216,111 |
| 13b | M5 | 5093 | 43306 | 0,118 | 200 | 8,320 | 193,345 |
| 14a | M5 | 5089 | 51708 | 0,098 | 200 | 8,345 | 189,248 |
| 14b | M5 | 5405 | 52390 | 0,103 | 200 | 8,345 | 189,248 |
| 15a | M5 | 5453 | 49204 | 0,111 | 200 | 8,345 | 205,077 |
| 15b | M5 | 5113 | 50481 | 0,101 | 200 | 8,336 | 214,001 |

Tablica 19. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih Quechers ekstrakcijom, za epiklortetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 181 | 48927 | 0,004 | 200 | 7,885 | 17,584 |
| 1b | M1 | 125 | 46800 | 0,003 | 200 | 7,91 | 25,922 |
| 2a | M1 | 108 | 51986 | 0,002 | 200 | 7,885 | 21,201 |
| 2b | M1 | 94 | 53484 | 0,002 | 200 | 7,877 | 19,388 |
| 3a | M1 | 125 | 47650 | 0,003 | 200 | 7,894 | 21,629 |
| 3b | M1 | 87 | 47800 | 0,002 | 200 | 7,885 | 15,228 |
| 4a | M2 | 322 | 48987 | 0,007 | 500 | 7,91 | 55,924 |
| 4b | M2 | 358 | 46343 | 0,008 | 500 | 7,885 | 46,147 |
| 5a | M2 | 445 | 46239 | 0,010 | 500 | 7,885 | 43,418 |
| 5b | M2 | 438 | 45198 | 0,010 | 500 | 7,894 | 58,224 |
| 6a | M2 | 237 | 38720 | 0,006 | 500 | 7,894 | 46,170 |
| 6b | M2 | 321 | 39659 | 0,008 | 500 | 7,86 | 40,880 |
| 7a | M3 | 640 | 44830 | 0,014 | 1000 | 7,902 | 95,018 |
| 7b | M3 | 629 | 42844 | 0,015 | 1000 | 7,894 | 101,970 |
| 8a | M3 | 672 | 50868 | 0,013 | 1000 | 7,894 | 104,623 |
| 8b | M3 | 756 | 50305 | 0,015 | 1000 | 7,902 | 90,274 |
| 9a | M3 | 813 | 47999 | 0,017 | 1000 | 7,902 | 97,273 |
| 9b | M3 | 812 | 43828 | 0,019 | 1000 | 7,902 | 108,846 |
| 10a | M4 | 817 | 43135 | 0,019 | 1500 | 7,902 | 143,551 |
| 10b | M4 | 969 | 42884 | 0,023 | 1500 | 7,894 | 147,982 |
| 11a | M4 | 786 | 41687 | 0,019 | 1500 | 7,894 | 147,486 |
| 11b | M4 | 900 | 37413 | 0,024 | 1500 | 7,902 | 152,410 |
| 12a | M4 | 804 | 32202 | 0,025 | 1500 | 7,902 | 158,022 |
| 12b | M4 | 873 | 32693 | 0,027 | 1500 | 7,894 | 148,673 |
| 13a | M5 | 1260 | 45095 | 0,028 | 2000 | 7,902 | 204,354 |
| 13b | M5 | 1260 | 43306 | 0,029 | 2000 | 7,894 | 203,772 |
| 14a | M5 | 1658 | 51708 | 0,032 | 2000 | 7,902 | 194,780 |
| 14b | M5 | 1530 | 52390 | 0,029 | 2000 | 7,902 | 204,969 |
| 15a | M5 | 1391 | 49204 | 0,028 | 2000 | 7,91 | 197,589 |
| 15b | M5 | 1292 | 50481 | 0,026 | 2000 | 7,902 | 198,916 |

Tablica 20. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih Quechers ekstrakcijom, za doksiciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 306 | 48927 | 0,006 | 200 | 8,845 | 2,942 |
| 1b | M1 | 275 | 46800 | 0,006 | 200 | 8,845 | 3,442 |
| 2a | M1 | 368 | 51986 | 0,007 | 200 | 8,845 | 3,166 |
| 2b | M1 | 371 | 53484 | 0,007 | 200 | 8,837 | 3,111 |
| 3a | M1 | 435 | 47650 | 0,009 | 200 | 8,845 | 2,673 |
| 3b | M1 | 311 | 47800 | 0,007 | 200 | 8,845 | 2,420 |
| 4a | M2 | 799 | 48987 | 0,016 | 500 | 8,845 | 8,524 |
| 4b | M2 | 791 | 46343 | 0,017 | 500 | 8,845 | 9,617 |
| 5a | M2 | 820 | 46239 | 0,018 | 500 | 8,845 | 9,922 |
| 5b | M2 | 950 | 45198 | 0,021 | 500 | 8,845 | 9,938 |
| 6a | M2 | 796 | 38720 | 0,021 | 500 | 8,845 | 11,977 |
| 6b | M2 | 957 | 39659 | 0,024 | 500 | 8,845 | 11,527 |
| 7a | M3 | 1258 | 44830 | 0,028 | 1000 | 8,845 | 17,774 |
| 7b | M3 | 1563 | 42844 | 0,036 | 1000 | 8,854 | 20,189 |
| 8a | M3 | 1626 | 50868 | 0,032 | 1000 | 8,845 | 18,364 |
| 8b | M3 | 1688 | 50305 | 0,034 | 1000 | 8,845 | 21,762 |
| 9a | M3 | 1838 | 47999 | 0,038 | 1000 | 8,845 | 22,246 |
| 9b | M3 | 1830 | 43828 | 0,042 | 1000 | 8,854 | 24,614 |
| 10a | M4 | 2251 | 43135 | 0,052 | 1500 | 8,854 | 29,917 |
| 10b | M4 | 2474 | 42884 | 0,058 | 1500 | 8,854 | 31,663 |
| 11a | M4 | 1905 | 41687 | 0,046 | 1500 | 8,854 | 26,984 |
| 11b | M4 | 2122 | 37413 | 0,057 | 1500 | 8,854 | 31,327 |
| 12a | M4 | 2207 | 32202 | 0,069 | 1500 | 8,854 | 35,716 |
| 12b | M4 | 2000 | 32693 | 0,061 | 1500 | 8,854 | 36,443 |
| 13a | M5 | 2888 | 45095 | 0,064 | 2000 | 8,854 | 38,747 |
| 13b | M5 | 3320 | 43306 | 0,077 | 2000 | 8,854 | 43,460 |
| 14a | M5 | 3287 | 51708 | 0,064 | 2000 | 8,854 | 35,016 |
| 14b | M5 | 3079 | 52390 | 0,059 | 2000 | 8,854 | 34,463 |
| 15a | M5 | 3576 | 49204 | 0,073 | 2000 | 8,854 | 38,218 |
| 15b | M5 | 3335 | 50481 | 0,066 | 2000 | 8,854 | 38,831 |

U tablicama 21 - 27 prikazani su podaci LC-MS/MS mjerenja dobiveni Mass Hunter računalnim programom, ispitivani uzorci dobiveni su ekstrakcijom s organskim otapalom acetonitrilom.

Tablica 21. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom, za tetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (AnI) | Površina standarda (AnIS) | AnI/AnIS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 16a | M1 | 2725 | 296358 | 0,009 | 200 | 7,575 | 21,102 |
| 16b | M1 | 3904 | 228728 | 0,017 | 200 | 7,558 | 24,613 |
| 17a | M2 | 1620 | 61932 | 0,026 | 500 | 7,566 | 41,371 |
| 17b | M2 | 2745 | 69820 | 0,039 | 500 | 7,575 | 39,379 |
| 18a | M3 | 18459 | 219333 | 0,084 | 1000 | 7,558 | 114,739 |
| 18b | M3 | 25084 | 274650 | 0,091 | 1000 | 7,55 | 92,132 |
| 19a | M4 | 4837 | 37115 | 0,130 | 1500 | 7,55 | 146,265 |
| 19b | M4 | 3800 | 28934 | 0,131 | 1500 | 7,558 | 176,978 |
| 20a | M5 | 5907 | 35130 | 0,168 | 2000 | 7,558 | 260,610 |
| 20b | M5 | 5954 | 31150 | 0,191 | 2000 | 7,558 | 343,071 |
| 21a | M3 | 18398 | 294350 | 0,063 | 1000 | 7,558 | 86,176 |
| 21b | M3 | 17043 | 245412 | 0,069 | 1000 | 7,541 | 100,979 |
| 22a | M3 | 2878 | 46832 | 0,061 | 1000 | 7,55 | 93,956 |

Tablica 22. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom, za epitetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (AnI) | Površina standarda (AnIS) | AnI/AnIS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 16a | M1 | 4795 | 296358 | 0,016 | 200 | 7,132 | 20,723 |
| 16b | M1 | 5164 | 228728 | 0,023 | 200 | 7,132 | 32,470 |
| 17a | M2 | 2497 | 61932 | 0,040 | 500 | 7,14 | 57,751 |
| 17b | M2 | 4239 | 69820 | 0,061 | 500 | 7,132 | 96,484 |
| 18a | M3 | 26677 | 219333 | 0,122 | 1000 | 7,132 | 182,508 |
| 18b | M3 | 27092 | 274650 | 0,099 | 1000 | 7,132 | 143,139 |
| 19a | M4 | 5027 | 37115 | 0,135 | 1500 | 7,132 | 242,968 |
| 19b | M4 | 5507 | 28934 | 0,190 | 1500 | 7,14 | 281,730 |
| 20a | M5 | 8497 | 35130 | 0,242 | 2000 | 7,132 | 387,233 |
| 20b | M5 | 8624 | 31150 | 0,277 | 2000 | 7,132 | 426,548 |
| 21a | M3 | 23138 | 294350 | 0,079 | 1000 | 7,132 | 128,169 |
| 21b | M3 | 24146 | 245412 | 0,098 | 1000 | 7,132 | 136,333 |
| 22a | M3 | 4335 | 46832 | 0,093 | 1000 | 7,132 | 128,275 |

Tablica 23. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom, za oksitetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/AnIS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 16a | M1 | 2170 | 296358 | 0,007 | 200 | 7,605 | 34,645 |
| 16b | M1 | 3223 | 228728 | 0,014 | 200 | 7,605 | 42,322 |
| 17a | M2 | 1400 | 61932 | 0,023 | 500 | 7,605 | 69,778 |
| 17b | M2 | 2545 | 69820 | 0,036 | 500 | 7,613 | 119,177 |
| 18a | M3 | 14767 | 219333 | 0,067 | 1000 | 7,597 | 220,925 |
| 18b | M3 | 15594 | 274650 | 0,057 | 1000 | 7,597 | 202,832 |
| 19a | M4 | 2763 | 37115 | 0,074 | 1500 | 7,597 | 272,120 |
| 19b | M4 | 2642 | 28934 | 0,091 | 1500 | 7,605 | 311,078 |
| 20a | M5 | 4172 | 35130 | 0,119 | 2000 | 7,605 | 422,277 |
| 20b | M5 | 3821 | 31150 | 0,123 | 2000 | 7,597 | 470,186 |
| 21a | M3 | 13985 | 294350 | 0,048 | 1000 | 7,597 | 157,731 |
| 21b | M3 | 14579 | 245412 | 0,059 | 1000 | 7,597 | 220,195 |
| 22a | M3 | 2274 | 46832 | 0,049 | 1000 | 7,588 | 154,334 |

Tablica 24. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom, za epiokitetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/AnIS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 16a | M1 | 733 | 296358 | 0,002 | 200 | 7,352 | 20,758 |
| 16b | M1 | 885 | 228728 | 0,004 | 200 | 7,352 | 23,848 |
| 17a | M2 | 321 | 61932 | 0,005 | 500 | 7,352 | 40,833 |
| 17b | M2 | 518 | 69820 | 0,007 | 500 | 7,352 | 55,408 |
| 18a | M3 | 3681 | 219333 | 0,017 | 1000 | 7,344 | 124,728 |
| 18b | M3 | 3506 | 274650 | 0,013 | 1000 | 7,344 | 105,385 |
| 19a | M4 | 659 | 37115 | 0,018 | 1500 | 7,352 | 112,978 |
| 19b | M4 | 649 | 28934 | 0,022 | 1500 | 7,352 | 170,793 |
| 20a | M5 | 1058 | 35130 | 0,030 | 2000 | 7,352 | 223,434 |
| 20b | M5 | 1020 | 31150 | 0,033 | 2000 | 7,344 | 211,558 |
| 21a | M3 | 3227 | 294350 | 0,011 | 1000 | 7,344 | 87,736 |
| 21b | M3 | 3664 | 245412 | 0,015 | 1000 | 7,344 | 109,305 |
| 22a | M3 | 481 | 46832 | 0,010 | 1000 | 7,352 | 73,384 |

Tablica 25. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom, za klortetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/AnIS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 16a | M1 | 2353 | 296358 | 0,008 | 200 | 8,328 | 7,823 |
| 16b | M1 | 2385 | 228728 | 0,010 | 200 | 8,328 | 21,028 |
| 17a | M2 | 961 | 61932 | 0,016 | 500 | 8,336 | 44,412 |
| 17b | M2 | 1639 | 69820 | 0,023 | 500 | 8,336 | 31,704 |
| 18a | M3 | 11896 | 219333 | 0,054 | 1000 | 8,328 | 86,871 |
| 18b | M3 | 11844 | 274650 | 0,043 | 1000 | 8,328 | 84,345 |
| 19a | M4 | 2066 | 37115 | 0,056 | 1500 | 8,336 | 130,900 |
| 19b | M4 | 1805 | 28934 | 0,062 | 1500 | 8,336 | 120,814 |
| 20a | M5 | 2825 | 35130 | 0,080 | 2000 | 8,336 | 190,479 |
| 20b | M5 | 2819 | 31150 | 0,090 | 2000 | 8,320 | 196,304 |
| 21a | M3 | 8939 | 294350 | 0,030 | 1000 | 8,311 | 77,045 |
| 21b | M3 | 9316 | 245412 | 0,038 | 1000 | 8,320 | 95,446 |
| 22a | M3 | 1905 | 46832 | 0,041 | 1000 | 8,328 | 98,132 |

Tablica 26. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom, za epiklortetraciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/AnIS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 16a | M1 | 1012 | 296358 | 0,003 | 200 | 7,927 | 24,969 |
| 16b | M1 | 729 | 228728 | 0,003 | 200 | 7,919 | 27,249 |
| 17a | M2 | 529 | 61932 | 0,009 | 500 | 7,894 | 56,605 |
| 17b | M2 | 943 | 69820 | 0,014 | 500 | 7,902 | 61,010 |
| 18a | M3 | 4959 | 219333 | 0,023 | 1000 | 7,919 | 102,999 |
| 18b | M3 | 5310 | 274650 | 0,019 | 1000 | 7,91 | 101,736 |
| 19a | M4 | 1088 | 37115 | 0,029 | 1500 | 7,894 | 148,519 |
| 19b | M4 | 887 | 28934 | 0,031 | 1500 | 7,902 | 174,726 |
| 20a | M5 | 1766 | 35130 | 0,050 | 2000 | 7,894 | 214,901 |
| 20b | M5 | 1483 | 31150 | 0,048 | 2000 | 7,894 | 221,889 |
| 21a | M3 | 4002 | 294350 | 0,014 | 1000 | 7,869 | 99,262 |
| 21b | M3 | 4033 | 245412 | 0,016 | 1000 | 7,91 | 98,707 |
| 22a | M3 | 772 | 46832 | 0,016 | 1000 | 7,894 | 107,783 |

Tablica 27. Rezultati analize uzoraka jaja, dobivenih ekstrakcijom organskim otapalom, za doksiciklin pomoću LC-MS/MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/AnIS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 16a | M1 | 1028 | 296358 | 0,003 | 200 | 8,854 | 1,396 |
| 16b | M1 | 627 | 228728 | 0,003 | 200 | 8,862 | 1,582 |
| 17a | M2 | 659 | 61932 | 0,011 | 500 | 8,845 | 5,309 |
| 17b | M2 | 647 | 69820 | 0,009 | 500 | 8,854 | 7,259 |
| 18a | M3 | 3649 | 219333 | 0,017 | 1000 | 8,854 | 12,922 |
| 18b | M3 | 5594 | 274650 | 0,020 | 1000 | 8,845 | 11,250 |
| 19a | M4 | 1213 | 37115 | 0,033 | 1500 | 8,845 | 23,376 |
| 19b | M4 | 955 | 28934 | 0,033 | 1500 | 8,845 | 22,013 |
| 20a | M5 | 2037 | 35130 | 0,058 | 2000 | 8,845 | 32,205 |
| 20b | M5 | 1896 | 31150 | 0,061 | 2000 | 8,854 | 39,496 |
| 21a | M3 | 5337 | 294350 | 0,018 | 1000 | 8,845 | 9,158 |
| 21b | M3 | 3786 | 245412 | 0,015 | 1000 | 8,845 | 11,448 |
| 22a | M3 | 1015 | 46832 | 0,022 | 1000 | 8,845 | 14,716 |

U tablicama 28 - 34 prikazani su podaci UHPLC/Q-TOF-MS mjerenja dobiveni Mass Hunter računalnim programom, ispitivani uzorci dobiveni su Quechers ekstrakcijom.

Tablica 28. Rezultati analize uzoraka jaja za tetraciklin pomoću UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (AnI) | Površina standarda (AnIS) | AnI/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 55971 | 2071510 | 0,027 | 200 | 7,46 | 20,409 |
| 1b | M1 | 74875 | 2066993 | 0,036 | 200 | 7,457 | 20,220 |
| 2a | M1 | 62375 | 2306818 | 0,027 | 200 | 7,459 | 19,698 |
| 2b | M1 | 65785 | 2312195 | 0,028 | 200 | 7,46 | 20,639 |
| 3a | M1 | 81309 | 2138623 | 0,038 | 200 | 7,453 | 18,270 |
| 3b | M1 | 47951 | 2126631 | 0,023 | 200 | 7,455 | 18,289 |
| 4a | M1 | 70508 | 2462760 | 0,029 | 200 | 7,452 | 20,419 |
| 4b | M1 | 65791 | 2451763 | 0,027 | 200 | 7,451 | 20,569 |
| 5a | M2 | 232666 | 2291318 | 0,102 | 500 | 7,454 | 49,727 |
| 5b | M2 | 217917 | 2323535 | 0,094 | 500 | 7,455 | 48,990 |
| 6a | M2 | 191470 | 2158116 | 0,089 | 500 | 7,451 | 50,201 |
| 6b | M2 | 231314 | 2190599 | 0,106 | 500 | 7,464 | 50,978 |
| 7a | M2 | 223378 | 2654987 | 0,084 | 500 | 7,449 | 47,320 |
| 7b | M2 | 239451 | 2632772 | 0,091 | 500 | 7,463 | 48,454 |
| 8a | M2 | 235731 | 2728800 | 0,086 | 500 | 7,447 | 43,602 |
| 8b | M2 | 253378 | 2753919 | 0,092 | 500 | 7,465 | 43,254 |
| 9a | M3 | 595541 | 2476690 | 0,240 | 1000 | 7,467 | 103,618 |
| 9b | M3 | 590956 | 2534277 | 0,233 | 1000 | 7,454 | 102,618 |
| 10a | M3 | 580995 | 2626739 | 0,221 | 1000 | 7,46 | 102,280 |
| 10b | M3 | 609511 | 2630327 | 0,232 | 1000 | 7,461 | 103,103 |
| 11a | M3 | 577990 | 2667949 | 0,217 | 1000 | 7,455 | 104,101 |
| 11b | M3 | 595717 | 2668662 | 0,223 | 1000 | 7,454 | 103,769 |
| 12a | M3 | 581880 | 2800934 | 0,208 | 1000 | 7,455 | 95,490 |
| 12b | M3 | 586193 | 2827564 | 0,207 | 1000 | 7,454 | 94,657 |
| 13a | M4 | 853482 | 2630700 | 0,324 | 1500 | 7,455 | 148,259 |
| 13b | M4 | 869421 | 2659395 | 0,327 | 1500 | 7,45 | 147,181 |
| 14a | M4 | 826214 | 2365859 | 0,349 | 1500 | 7,452 | 160,210 |
| 14b | M4 | 831273 | 2352740 | 0,353 | 1500 | 7,452 | 162,343 |
| 15a | M4 | 820720 | 2513649 | 0,327 | 1500 | 7,461 | 148,699 |
| 15b | M4 | 829322 | 2526032 | 0,328 | 1500 | 7,447 | 149,284 |
| 16a | M4 | 869364 | 2563081 | 0,339 | 1500 | 7,465 | 154,923 |
| 16b | M4 | 924035 | 2614568 | 0,353 | 1500 | 7,449 | 151,339 |
| 17a | M5 | 1186300 | 2776824 | 0,427 | 2000 | 7,453 | 186,273 |
| 17b | M5 | 1195885 | 2763185 | 0,433 | 2000 | 7,463 | 189,237 |
| 18a | M5 | 1350868 | 2928223 | 0,461 | 2000 | 7,452 | 202,702 |
| 18b | M5 | 1369829 | 2956732 | 0,463 | 2000 | 7,445 | 204,814 |

Tablica 29. Rezultati analize uzoraka jaja za epitetraciklin pomoću UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (AnI) | Površina standarda (AnIS) | AnI/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 22609 | 2071510 | 0,011 | 200 | 7,130 | 20,729 |
| 1b | M1 | 20304 | 2066993 | 0,010 | 200 | 7,144 | 20,406 |
| 2a | M1 | 26764 | 2306818 | 0,012 | 200 | 7,147 | 18,907 |
| 2b | M1 | 19939 | 2312195 | 0,009 | 200 | 7,130 | 19,514 |
| 3a | M1 | 25684 | 2138623 | 0,012 | 200 | 7,140 | 18,901 |
| 3b | M1 | 25327 | 2126631 | 0,012 | 200 | 7,143 | 17,806 |
| 4a | M1 | 28637 | 2462760 | 0,012 | 200 | 7,139 | 18,149 |
| 4b | M1 | 22486 | 2451763 | 0,009 | 200 | 7,139 | 18,606 |
| 5a | M2 | 67978 | 2291318 | 0,030 | 500 | 7,141 | 46,980 |
| 5b | M2 | 75409 | 2323535 | 0,032 | 500 | 7,142 | 45,101 |
| 6a | M2 | 54160 | 2158116 | 0,025 | 500 | 7,138 | 47,636 |
| 6b | M2 | 68302 | 2190599 | 0,031 | 500 | 7,134 | 44,763 |
| 7a | M2 | 79960 | 2654987 | 0,030 | 500 | 7,136 | 45,546 |
| 7b | M2 | 72082 | 2632772 | 0,027 | 500 | 7,151 | 46,305 |
| 8a | M2 | 68366 | 2728800 | 0,025 | 500 | 7,135 | 42,926 |
| 8b | M2 | 73067 | 2753919 | 0,027 | 500 | 7,135 | 42,491 |
| 9a | M3 | 217812 | 2476690 | 0,088 | 1000 | 7,137 | 122,390 |
| 9b | M3 | 210154 | 2534277 | 0,083 | 1000 | 7,142 | 117,735 |
| 10a | M3 | 180710 | 2626739 | 0,069 | 1000 | 7,130 | 98,963 |
| 10b | M3 | 183094 | 2630327 | 0,070 | 1000 | 7,131 | 100,282 |
| 11a | M3 | 194045 | 2667949 | 0,073 | 1000 | 7,143 | 105,186 |
| 11b | M3 | 187108 | 2668662 | 0,070 | 1000 | 7,142 | 106,693 |
| 12a | M3 | 197714 | 2800934 | 0,071 | 1000 | 7,142 | 105,446 |
| 12b | M3 | 212956 | 2827564 | 0,075 | 1000 | 7,142 | 105,402 |
| 13a | M4 | 269408 | 2630700 | 0,102 | 1500 | 7,142 | 146,162 |
| 13b | M4 | 281039 | 2659395 | 0,106 | 1500 | 7,138 | 147,932 |
| 14a | M4 | 267927 | 2365859 | 0,113 | 1500 | 7,139 | 162,822 |
| 14b | M4 | 265287 | 2352740 | 0,113 | 1500 | 7,140 | 164,314 |
| 15a | M4 | 216925 | 2513649 | 0,086 | 1500 | 7,131 | 134,763 |
| 15b | M4 | 239481 | 2526032 | 0,095 | 1500 | 7,134 | 134,535 |
| 16a | M4 | 282990 | 2563081 | 0,110 | 1500 | 7,135 | 156,556 |
| 16b | M4 | 275105 | 2614568 | 0,105 | 1500 | 7,137 | 150,777 |
| 17a | M5 | 396758 | 2776824 | 0,143 | 2000 | 7,140 | 190,030 |
| 17b | M5 | 371492 | 2763185 | 0,134 | 2000 | 7,150 | 192,094 |
| 18a | M5 | 415764 | 2928223 | 0,142 | 2000 | 7,139 | 198,490 |
| 18b | M5 | 408306 | 2956732 | 0,138 | 2000 | 7,132 | 200,207 |

Tablica 30. Rezultati analize uzoraka jaja za oksitetraciklin pomoću UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 7601 | 2071510 | 0,004 | 200 | 7,547 | 23,148 |
| 1b | M1 | 9940 | 2066993 | 0,005 | 200 | 7,561 | 22,377 |
| 2a | M1 | 11951 | 2306818 | 0,005 | 200 | 7,563 | 23,186 |
| 2b | M1 | 10591 | 2312195 | 0,005 | 200 | 7,564 | 23,745 |
| 3a | M1 | 10591 | 2138623 | 0,005 | 200 | 7,557 | 20,207 |
| 3b | M1 | 10591 | 2126631 | 0,005 | 200 | 7,559 | 21,779 |
| 4a | M1 | 11378 | 2462760 | 0,005 | 200 | 7,556 | 22,386 |
| 4b | M1 | 11813 | 2451763 | 0,005 | 200 | 7,555 | 22,411 |
| 5a | M2 | 32827 | 2291318 | 0,014 | 500 | 7,558 | 43,655 |
| 5b | M2 | 33228 | 2323535 | 0,014 | 500 | 7,559 | 44,543 |
| 6a | M2 | 29326 | 2158116 | 0,014 | 500 | 7,555 | 46,155 |
| 6b | M2 | 34312 | 2190599 | 0,016 | 500 | 7,551 | 45,760 |
| 7a | M2 | 40195 | 2654987 | 0,015 | 500 | 7,553 | 44,732 |
| 7b | M2 | 42745 | 2632772 | 0,016 | 500 | 7,550 | 46,186 |
| 8a | M2 | 41556 | 2728800 | 0,015 | 500 | 7,551 | 43,011 |
| 8b | M2 | 36466 | 2753919 | 0,013 | 500 | 7,551 | 41,374 |
| 9a | M3 | 99807 | 2476690 | 0,040 | 1000 | 7,553 | 100,712 |
| 9b | M3 | 102080 | 2534277 | 0,040 | 1000 | 7,559 | 105,395 |
| 10a | M3 | 100069 | 2626739 | 0,038 | 1000 | 7,547 | 104,686 |
| 10b | M3 | 101608 | 2630327 | 0,039 | 1000 | 7,548 | 103,644 |
| 11a | M3 | 100824 | 2667949 | 0,038 | 1000 | 7,559 | 99,603 |
| 11b | M3 | 111684 | 2668662 | 0,042 | 1000 | 7,558 | 105,531 |
| 12a | M3 | 101048 | 2800934 | 0,036 | 1000 | 7,559 | 92,228 |
| 12b | M3 | 105954 | 2827564 | 0,037 | 1000 | 7,558 | 94,199 |
| 13a | M4 | 160267 | 2630700 | 0,061 | 1500 | 7,559 | 146,535 |
| 13b | M4 | 160598 | 2659395 | 0,060 | 1500 | 7,555 | 146,121 |
| 14a | M4 | 157889 | 2365859 | 0,067 | 1500 | 7,556 | 155,624 |
| 14b | M4 | 156443 | 2352740 | 0,066 | 1500 | 7,557 | 158,133 |
| 15a | M4 | 160920 | 2513649 | 0,064 | 1500 | 7,565 | 145,962 |
| 15b | M4 | 160192 | 2526032 | 0,063 | 1500 | 7,551 | 151,421 |
| 16a | M4 | 159821 | 2563081 | 0,062 | 1500 | 7,551 | 152,871 |
| 16b | M4 | 161974 | 2614568 | 0,062 | 1500 | 7,553 | 145,175 |
| 17a | M5 | 232901 | 2776824 | 0,084 | 2000 | 7,557 | 192,294 |
| 17b | M5 | 231860 | 2763185 | 0,084 | 2000 | 7,549 | 194,289 |
| 18a | M5 | 269355 | 2928223 | 0,092 | 2000 | 7,556 | 207,786 |
| 18b | M5 | 265550 | 2956732 | 0,090 | 2000 | 7,549 | 210,477 |

Tablica 31. Rezultati analize uzoraka jaja za epioksitetraciklin pomoću UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 26668 | 2071510 | 0,013 | 200 | 7,356 | 22,009 |
| 1b | M1 | 27031 | 2066993 | 0,013 | 200 | 7,370 | 21,864 |
| 2a | M1 | 36172 | 2306818 | 0,016 | 200 | 7,355 | 22,254 |
| 2b | M1 | 28565 | 2312195 | 0,012 | 200 | 7,356 | 22,686 |
| 3a | M1 | 27193 | 2138623 | 0,013 | 200 | 7,366 | 21,755 |
| 3b | M1 | 25519 | 2126631 | 0,012 | 200 | 7,368 | 21,646 |
| 4a | M1 | 31685 | 2462760 | 0,013 | 200 | 7,348 | 21,417 |
| 4b | M1 | 37525 | 2451763 | 0,015 | 200 | 7,364 | 21,664 |
| 5a | M2 | 70526 | 2291318 | 0,031 | 500 | 7,367 | 44,083 |
| 5b | M2 | 73662 | 2323535 | 0,032 | 500 | 7,368 | 43,744 |
| 6a | M2 | 73124 | 2158116 | 0,034 | 500 | 7,364 | 45,842 |
| 6b | M2 | 70585 | 2190599 | 0,032 | 500 | 7,360 | 44,323 |
| 7a | M2 | 93629 | 2654987 | 0,035 | 500 | 7,362 | 44,769 |
| 7b | M2 | 95342 | 2632772 | 0,036 | 500 | 7,359 | 46,823 |
| 8a | M2 | 83729 | 2728800 | 0,031 | 500 | 7,360 | 44,204 |
| 8b | M2 | 114301 | 2753919 | 0,042 | 500 | 7,360 | 43,478 |
| 9a | M3 | 228442 | 2476690 | 0,092 | 1000 | 7,363 | 111,460 |
| 9b | M3 | 229980 | 2534277 | 0,091 | 1000 | 7,368 | 110,220 |
| 10a | M3 | 197693 | 2626739 | 0,075 | 1000 | 7,356 | 96,294 |
| 10b | M3 | 203415 | 2630327 | 0,077 | 1000 | 7,357 | 96,372 |
| 11a | M3 | 220741 | 2667949 | 0,083 | 1000 | 7,351 | 101,423 |
| 11b | M3 | 221662 | 2668662 | 0,083 | 1000 | 7,367 | 99,775 |
| 12a | M3 | 227680 | 2800934 | 0,081 | 1000 | 7,368 | 98,559 |
| 12b | M3 | 227543 | 2827564 | 0,080 | 1000 | 7,367 | 97,621 |
| 13a | M4 | 309997 | 2630700 | 0,118 | 1500 | 7,351 | 147,868 |
| 13b | M4 | 337619 | 2659395 | 0,127 | 1500 | 7,364 | 151,373 |
| 14a | M4 | 299459 | 2365859 | 0,127 | 1500 | 7,365 | 159,058 |
| 14b | M4 | 301846 | 2352740 | 0,128 | 1500 | 7,366 | 163,102 |
| 15a | M4 | 302024 | 2513649 | 0,120 | 1500 | 7,357 | 144,976 |
| 15b | M4 | 320516 | 2526032 | 0,127 | 1500 | 7,360 | 147,089 |
| 16a | M4 | 315535 | 2563081 | 0,123 | 1500 | 7,361 | 146,492 |
| 16b | M4 | 323193 | 2614568 | 0,124 | 1500 | 7,362 | 145,718 |
| 17a | M5 | 464892 | 2776824 | 0,167 | 2000 | 7,366 | 191,681 |
| 17b | M5 | 460974 | 2763185 | 0,167 | 2000 | 7,358 | 194,403 |
| 18a | M5 | 533737 | 2928223 | 0,182 | 2000 | 7,365 | 209,021 |
| 18b | M5 | 512585 | 2956732 | 0,173 | 2000 | 7,358 | 203,936 |

Tablica 32. Rezultati analize uzoraka jaja za klortetraciklin pomoću UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (AnI) | Površina standarda (AnIS) | AnI/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 89954 | 2071510 | 0,043 | 200 | 8,207 | 19,457 |
| 1b | M1 | 86456 | 2066993 | 0,042 | 200 | 8,203 | 19,204 |
| 2a | M1 | 90120 | 2306818 | 0,039 | 200 | 8,206 | 18,255 |
| 2b | M1 | 96274 | 2312195 | 0,042 | 200 | 8,207 | 18,198 |
| 3a | M1 | 90263 | 2138623 | 0,042 | 200 | 8,216 | 19,162 |
| 3b | M1 | 93218 | 2126631 | 0,044 | 200 | 8,202 | 18,996 |
| 4a | M1 | 100681 | 2462760 | 0,041 | 200 | 8,216 | 18,054 |
| 4b | M1 | 101759 | 2451763 | 0,042 | 200 | 8,215 | 17,795 |
| 5a | M2 | 274554 | 2291318 | 0,120 | 500 | 8,218 | 51,645 |
| 5b | M2 | 280114 | 2323535 | 0,121 | 500 | 8,219 | 51,202 |
| 6a | M2 | 249676 | 2158116 | 0,116 | 500 | 8,215 | 53,823 |
| 6b | M2 | 259396 | 2190599 | 0,118 | 500 | 8,211 | 51,767 |
| 7a | M2 | 326181 | 2654987 | 0,123 | 500 | 8,212 | 53,894 |
| 7b | M2 | 310968 | 2632772 | 0,118 | 500 | 8,210 | 54,239 |
| 8a | M2 | 379808 | 2728800 | 0,139 | 500 | 8,211 | 58,468 |
| 8b | M2 | 372227 | 2753919 | 0,135 | 500 | 8,211 | 55,669 |
| 9a | M3 | 484435 | 2476690 | 0,196 | 1000 | 8,213 | 82,920 |
| 9b | M3 | 488424 | 2534277 | 0,193 | 1000 | 8,218 | 82,104 |
| 10a | M3 | 628916 | 2626739 | 0,239 | 1000 | 8,206 | 99,912 |
| 10b | M3 | 610881 | 2630327 | 0,232 | 1000 | 8,208 | 99,202 |
| 11a | M3 | 582052 | 2667949 | 0,218 | 1000 | 8,202 | 96,828 |
| 11b | M3 | 613592 | 2668662 | 0,230 | 1000 | 8,218 | 95,887 |
| 12a | M3 | 716146 | 2800934 | 0,256 | 1000 | 8,201 | 106,798 |
| 12b | M3 | 684787 | 2827564 | 0,242 | 1000 | 8,218 | 102,610 |
| 13a | M4 | 867616 | 2630700 | 0,330 | 1500 | 8,201 | 145,072 |
| 13b | M4 | 924416 | 2659395 | 0,348 | 1500 | 8,214 | 144,352 |
| 14a | M4 | 838479 | 2365859 | 0,354 | 1500 | 8,216 | 153,406 |
| 14b | M4 | 897499 | 2352740 | 0,381 | 1500 | 8,216 | 158,804 |
| 15a | M4 | 1016060 | 2513649 | 0,404 | 1500 | 8,208 | 168,655 |
| 15b | M4 | 1021841 | 2526032 | 0,405 | 1500 | 8,211 | 167,837 |
| 16a | M4 | 853155 | 2563081 | 0,333 | 1500 | 8,211 | 137,577 |
| 16b | M4 | 845222 | 2614568 | 0,323 | 1500 | 8,213 | 135,646 |
| 17a | M5 | 1260971 | 2776824 | 0,454 | 2000 | 8,217 | 189,300 |
| 17b | M5 | 1266497 | 2763185 | 0,458 | 2000 | 8,209 | 191,049 |
| 18a | M5 | 1483739 | 2928223 | 0,507 | 2000 | 8,198 | 213,473 |
| 18b | M5 | 1478671 | 2956732 | 0,500 | 2000 | 8,209 | 207,951 |

Tablica 33. Rezultati analize uzoraka jaja za epiklortetraciklin pomoću UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (An1) | Površina standarda (AnIS) | An1/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 27754 | 2071510 | 0,013 | 200 | 7,877 | 19,250 |
| 1b | M1 | 29008 | 2066993 | 0,014 | 200 | 7,873 | 15,472 |
| 2a | M1 | 27537 | 2306818 | 0,012 | 200 | 7,876 | 17,493 |
| 2b | M1 | 30317 | 2312195 | 0,013 | 200 | 7,877 | 15,584 |
| 3a | M1 | 26182 | 2138623 | 0,012 | 200 | 7,887 | 15,398 |
| 3b | M1 | 30421 | 2126631 | 0,014 | 200 | 7,872 | 17,259 |
| 4a | M1 | 28040 | 2462760 | 0,011 | 200 | 7,869 | 16,731 |
| 4b | M1 | 29319 | 2451763 | 0,012 | 200 | 7,885 | 15,320 |
| 5a | M2 | 65543 | 2291318 | 0,029 | 500 | 7,871 | 46,524 |
| 5b | M2 | 72359 | 2323535 | 0,031 | 500 | 7,889 | 46,476 |
| 6a | M2 | 77609 | 2158116 | 0,036 | 500 | 7,868 | 48,331 |
| 6b | M2 | 68458 | 2190599 | 0,031 | 500 | 7,881 | 48,695 |
| 7a | M2 | 84308 | 2654987 | 0,032 | 500 | 7,865 | 46,987 |
| 7b | M2 | 81104 | 2632772 | 0,031 | 500 | 7,880 | 45,868 |
| 8a | M2 | 98834 | 2728800 | 0,036 | 500 | 7,864 | 52,815 |
| 8b | M2 | 102991 | 2753919 | 0,037 | 500 | 7,881 | 49,684 |
| 9a | M3 | 218583 | 2476690 | 0,088 | 1000 | 7,866 | 124,980 |
| 9b | M3 | 201276 | 2534277 | 0,079 | 1000 | 7,871 | 120,059 |
| 10a | M3 | 176424 | 2626739 | 0,067 | 1000 | 7,876 | 104,962 |
| 10b | M3 | 181793 | 2630327 | 0,069 | 1000 | 7,878 | 105,723 |
| 11a | M3 | 194068 | 2667949 | 0,073 | 1000 | 7,872 | 109,700 |
| 11b | M3 | 181271 | 2668662 | 0,068 | 1000 | 7,871 | 106,823 |
| 12a | M3 | 214844 | 2800934 | 0,077 | 1000 | 7,871 | 104,496 |
| 12b | M3 | 187355 | 2827564 | 0,066 | 1000 | 7,871 | 105,390 |
| 13a | M4 | 204132 | 2630700 | 0,078 | 1500 | 7,872 | 160,286 |
| 13b | M4 | 304656 | 2659395 | 0,115 | 1500 | 7,867 | 153,108 |
| 14a | M4 | 266324 | 2365859 | 0,113 | 1500 | 7,869 | 176,113 |
| 14b | M4 | 266324 | 2352740 | 0,113 | 1500 | 7,661 | 91,427 |
| 15a | M4 | 252170 | 2513649 | 0,100 | 1500 | 7,878 | 157,878 |
| 15b | M4 | 271139 | 2526032 | 0,107 | 1500 | 7,881 | 159,877 |
| 16a | M4 | 296513 | 2563081 | 0,116 | 1500 | 7,864 | 146,023 |
| 16b | M4 | 257180 | 2614568 | 0,098 | 1500 | 7,866 | 149,464 |
| 17a | M5 | 340696 | 2776824 | 0,123 | 2000 | 7,869 | 182,712 |
| 17b | M5 | 371522 | 2763185 | 0,134 | 2000 | 7,879 | 172,518 |
| 18a | M5 | 421245 | 2928223 | 0,144 | 2000 | 7,868 | 210,469 |
| 18b | M5 | 391111 | 2956732 | 0,132 | 2000 | 7,861 | 204,012 |

Tablica 34. Rezultati analize uzoraka jaja za doksiciklin pomoću UHPLC/Q-TOF-MS uređaja

| UZORAK | Razina | Površina analita (AnI) | Površina standarda (AnIS) | AnI/An IS | pg injektirano | RT (min) | Konačna koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--------|--------|------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------|
| 1a | M1 | 10589 | 2071510 | 0,005 | 200 | 8,658 | 6,903 |
| 1b | M1 | 8606 | 2066993 | 0,004 | 200 | 8,672 | 6,612 |
| 2a | M1 | 12515 | 2306818 | 0,005 | 200 | 8,657 | 5,842 |
| 2b | M1 | 11894 | 2312195 | 0,005 | 200 | 8,676 | 5,646 |
| 3a | M1 | 9413 | 2138623 | 0,004 | 200 | 8,668 | 4,167 |
| 3b | M1 | 8647 | 2126631 | 0,004 | 200 | 8,671 | 4,510 |
| 4a | M1 | 8209 | 2462760 | 0,003 | 200 | 8,667 | 4,198 |
| 4b | M1 | 11058 | 2451763 | 0,005 | 200 | 8,684 | 5,186 |
| 5a | M2 | 12535 | 2291318 | 0,005 | 500 | 8,669 | 7,015 |
| 5b | M2 | 11857 | 2323535 | 0,005 | 500 | 8,670 | 6,733 |
| 6a | M2 | 10134 | 2158116 | 0,005 | 500 | 8,666 | 8,109 |
| 6b | M2 | 8140 | 2190599 | 0,004 | 500 | 8,662 | 7,396 |
| 7a | M2 | 10781 | 2654987 | 0,004 | 500 | 8,664 | 5,235 |
| 7b | M2 | 9099 | 2632772 | 0,003 | 500 | 8,661 | 4,851 |
| 8a | M2 | 9929 | 2728800 | 0,004 | 500 | 8,662 | 4,484 |
| 8b | M2 | 11246 | 2753919 | 0,004 | 500 | 8,663 | 3,865 |
| 9a | M3 | 12021 | 2476690 | 0,005 | 1000 | 8,682 | 16,692 |
| 9b | M3 | 11378 | 2534277 | 0,004 | 1000 | 8,670 | 9,932 |
| 10a | M3 | 12600 | 2626739 | 0,005 | 1000 | 8,675 | 18,755 |
| 10b | M3 | 10822 | 2630327 | 0,004 | 1000 | 8,677 | 11,451 |
| 11a | M3 | 15384 | 2667949 | 0,006 | 1000 | 8,670 | 10,608 |
| 11b | M3 | 14711 | 2668662 | 0,006 | 1000 | 8,669 | 10,432 |
| 12a | M3 | 14477 | 2800934 | 0,005 | 1000 | 8,670 | 15,566 |
| 12b | M3 | 15513 | 2827564 | 0,005 | 1000 | 8,687 | 7,865 |
| 13a | M4 | 13224 | 2630700 | 0,005 | 1500 | 8,687 | 12,378 |
| 13b | M4 | 15546 | 2659395 | 0,006 | 1500 | 8,666 | 12,215 |
| 14a | M4 | 16498 | 2365859 | 0,007 | 1500 | 8,685 | 14,492 |
| 14b | M4 | 18186 | 2352740 | 0,008 | 1500 | 8,685 | 13,213 |
| 15a | M4 | 18054 | 2513649 | 0,007 | 1500 | 8,694 | 12,644 |
| 15b | M4 | 15738 | 2526032 | 0,006 | 1500 | 8,680 | 12,789 |
| 16a | M4 | 16833 | 2563081 | 0,007 | 1500 | 8,663 | 12,871 |
| 16b | M4 | 22166 | 2614568 | 0,008 | 1500 | 8,682 | 12,669 |
| 17a | M5 | 21842 | 2776824 | 0,008 | 2000 | 8,685 | 21,100 |
| 17b | M5 | 18334 | 2763185 | 0,007 | 2000 | 8,678 | 21,508 |
| 18a | M5 | 16655 | 2928223 | 0,006 | 2000 | 8,667 | 18,667 |
| 18b | M5 | 15610 | 2956732 | 0,005 | 2000 | 8,677 | 18,700 |

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Nina Čuljak

Ime i prezime studenta