

# 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:* **2024-07-15**



*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

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. TETRACIKLINSKI ANTIBIOTICI</b> .....	<b>2</b>
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
<b>2.2. ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA</b> .....	<b>11</b>
2.2.1. Molekularni mehanizmi antibiotske rezistencije.....	11
<b>2.3. ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA</b> .....	<b>14</b>
2.3.1. Rezidui tetraciklinskih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla.....	14
2.3.2. Metode za određivanje rezidua tetraciklina u hrani životinjskog podrijetla .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. KEMIKALIJE I OPREMA</b> .....	<b>19</b>
3.1.1. Standardi .....	19
3.1.2. Kemikalije.....	19
3.1.3. Oprema i materijali.....	19
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	<b>20</b>
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
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1. OPTIMIZACIJA LC-MS/MS i UHPLC/Q-TOF-MS SUSTAVA ZA ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2. KROMATOGRAMI REZIDUA TETRACIKLINA IZ UZORAKA JAJA</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3. ODREĐIVANJE UTJECAJA MATRIKSA NA ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA</b> .....	<b>48</b>



<b>4.4. PONOVLJIVOST PRIMIENJENIH METODA ODREĐIVANJA REZIDUA TETRACIKLINA .....</b>	<b>58</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>62</b>
<b>7. PRILOZI</b>	

# 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.

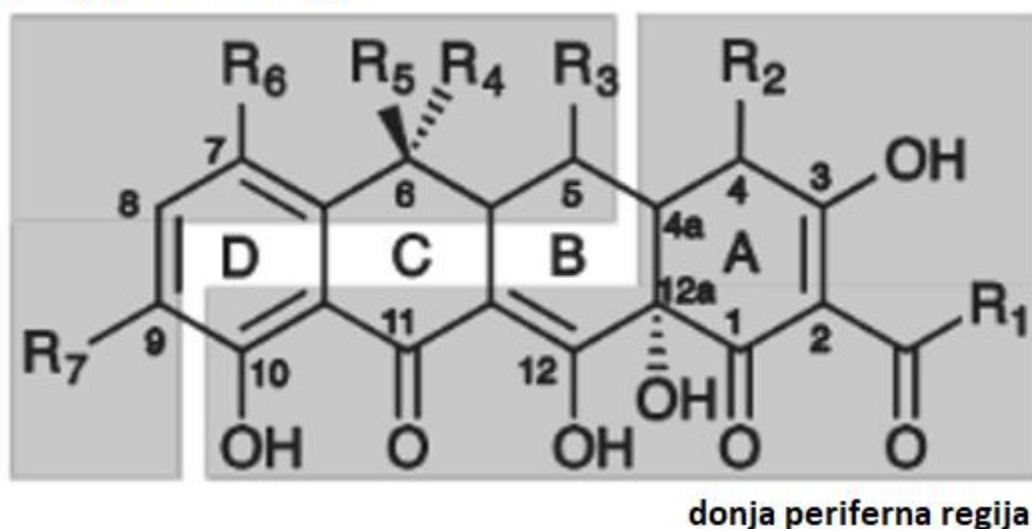
## 2. TEORIJSKI DIO

### 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



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

**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

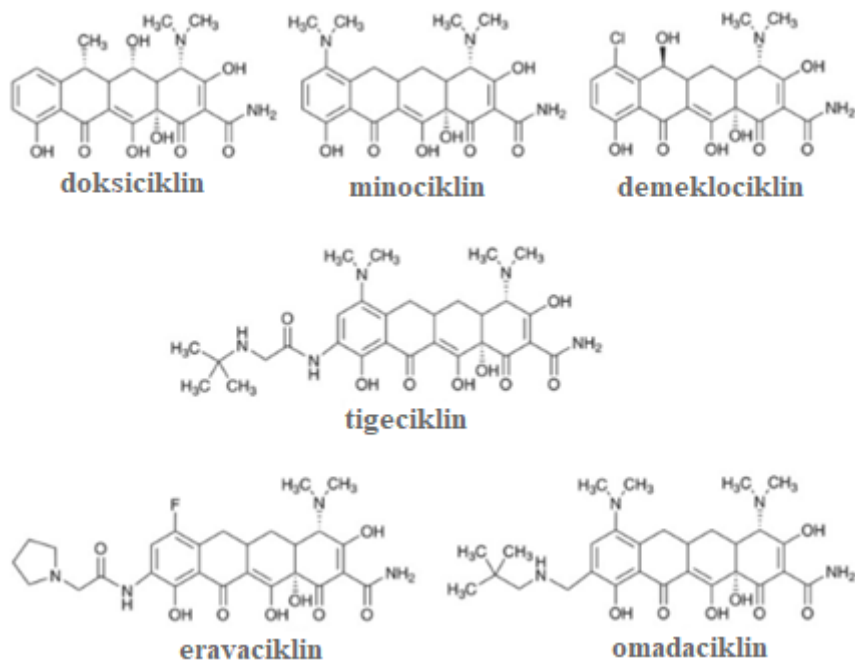
Klortetraciklin (CTC), kojeg je otkrio Benjamin Duggar 1948. godine u Lederle Laboratories (kasnije poznat kao American Cyanamid, Wayne, NJ, SAD), i oksitetraciklin (OTC), kojeg je otkrio Alexander Finlay u ranim 1950-im u Pfizeru (Groton, CT, SAD), bili su prvi članovi grupe tetraciklina (Nelson i Levy, 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).

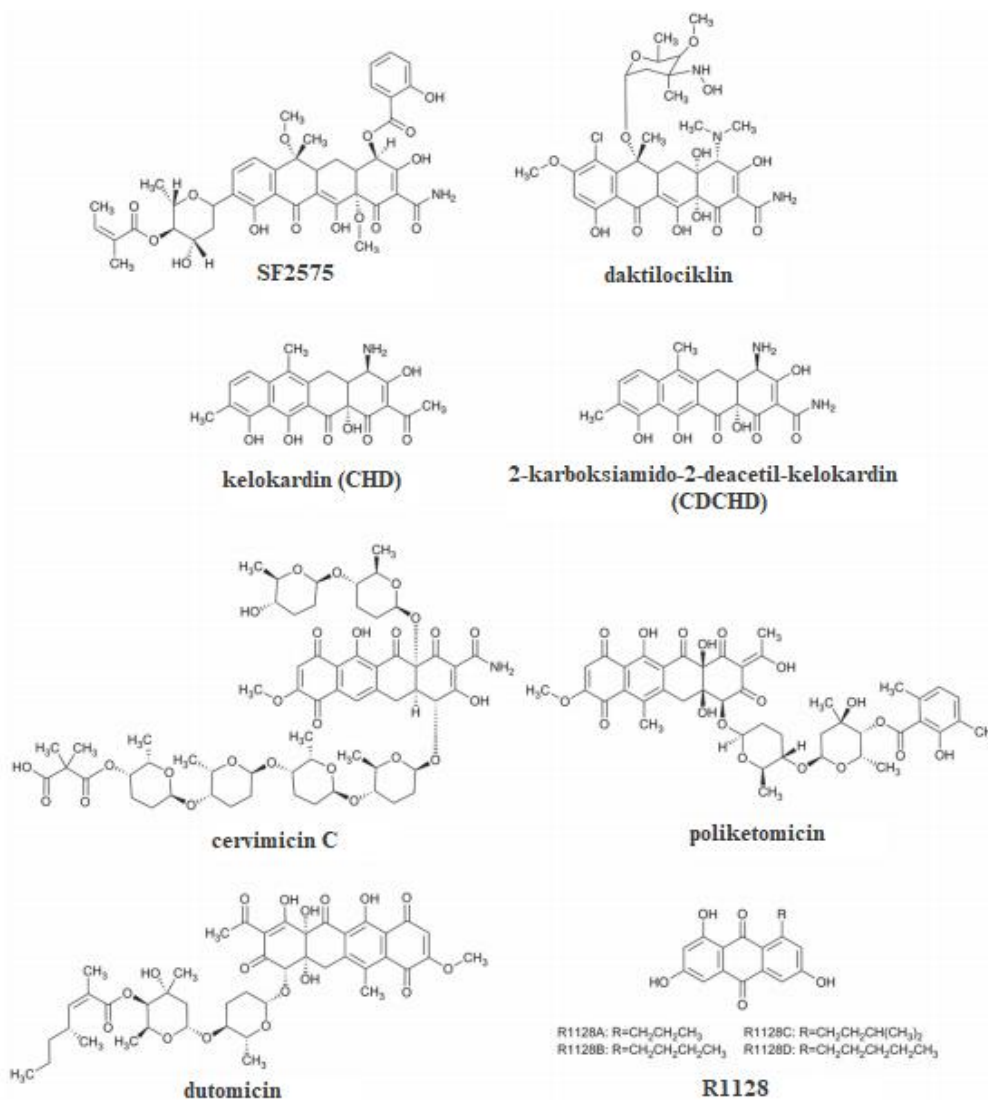
S druge strane, tim kojeg vodi Myers na Sveučilištu Harvard razvio je proizvodnju brojnih novih tetraciklinskih antibiotika (Charest i sur., 2005). Ovaj jedinstveni sintetski pristup uključuje vezanje fragmenta BA prstena s prekursorom D prstena (C prsten se formira u ovom procesu), generirajući tako 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

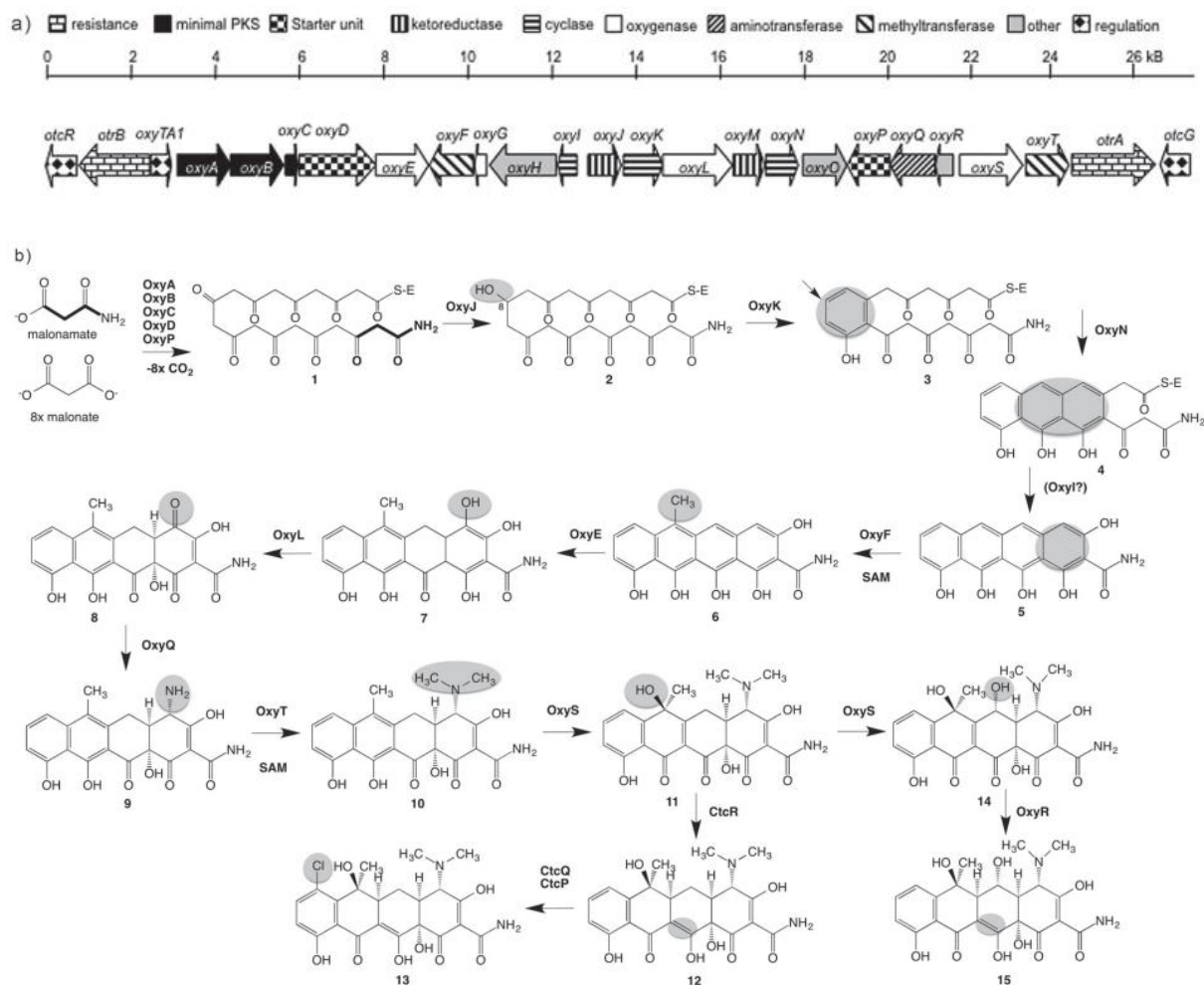
Tijekom 1960-ih godina u Lederli su proveli vrlo produktivna istraživanja o biosintezi CTC kojeg proizvodi *S. aureofaciens* (McCormick i Jensen, 1969). Proveli su eksperimente blokiranih mutanata dobivenih nasumičnom mutagenezom, što je rezultiralo proizvodnjom različitih intermedijera tetraciklina 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).

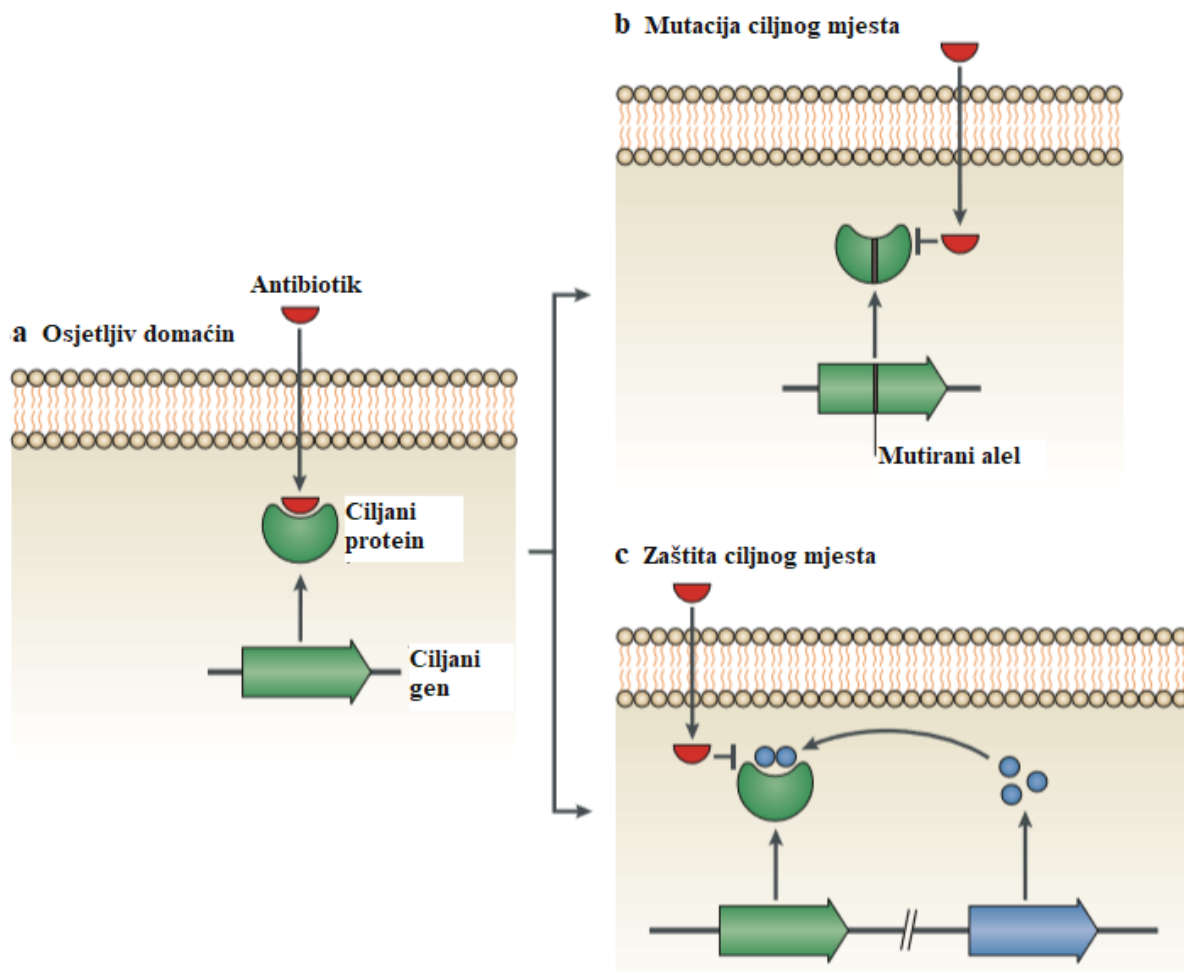
### 2.2.1. Molekularni mehanizmi antibiotičke rezistencije

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).

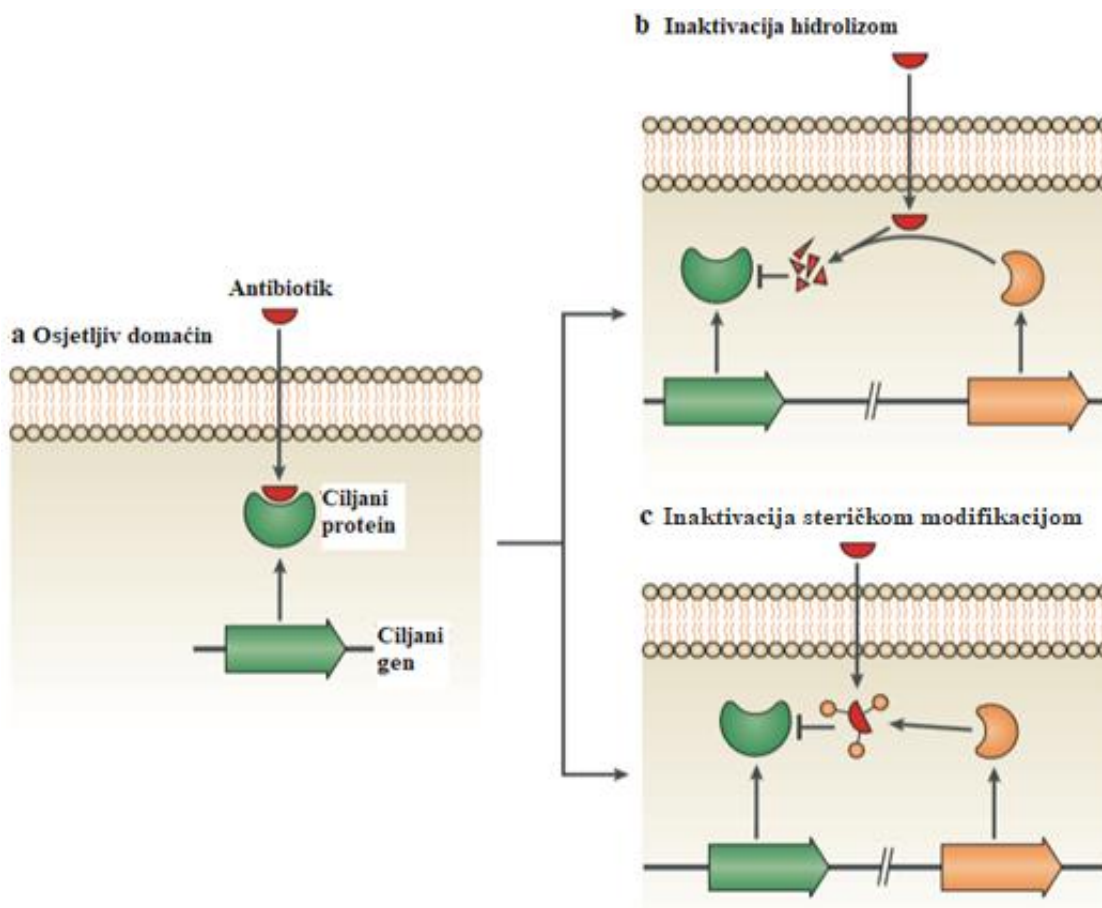
Smanjena permeabilnost i povećani efluks antibiotika mehanizmi su rezistencije kod bakterija kojima se sprječava pristup antibiotika mjestu djelovanja. Gram-negativne bakterije urođeno imaju manju propusnost za mnoge antibiotike zbog njihove vanjske membrane koja tvori nepropusnu barijeru (Kojima i Nikaido, 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:

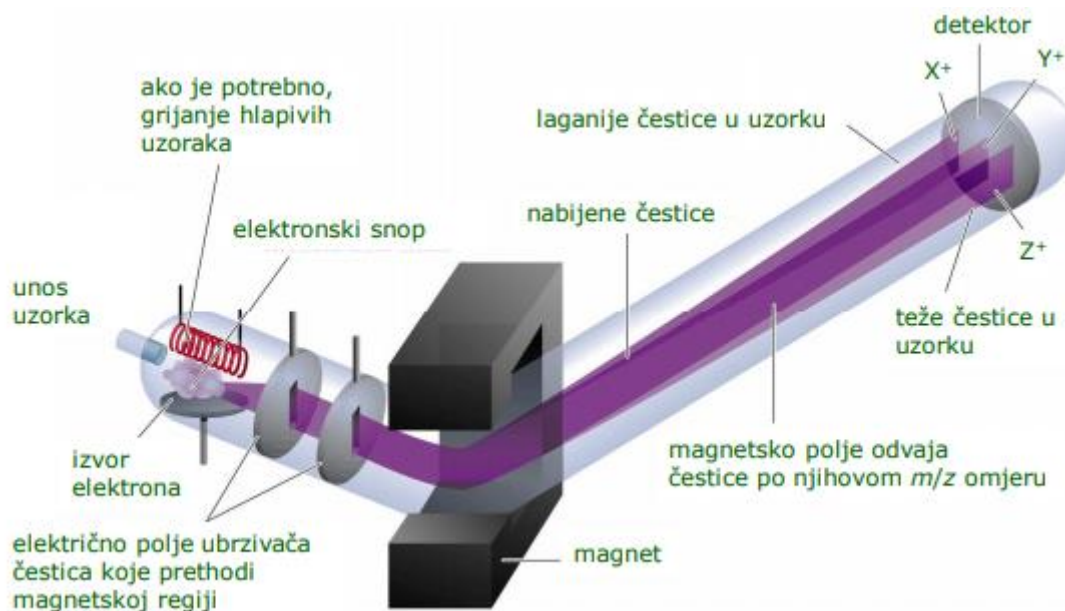
- kvantitativne metode kojima se određuje je li koncentracija prisutnih antibiotika u uzorcima iznad ili ispod dozvoljene (npr. HPLC, GC)
- metode za potvrdu (engl. *confirmatory methods*) kojima se identitet rezidua i njegova koncentracija potvrđuju s najvećom mogućom preciznošću i točnošću (spektrometrija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

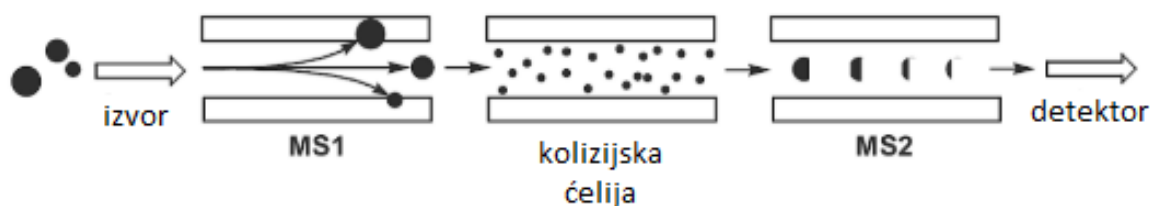
Princip rada masenog spektrometra: uzorak se podvrgava visokim energijama snopa elektrona, nabijene čestice se ubrzavaju u akceleratoru djelovanjem električnog polja, nastali ioni se provode kroz analizator masa koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu, razdvojeni ioni odlaze na detektor gdje proizvode 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).

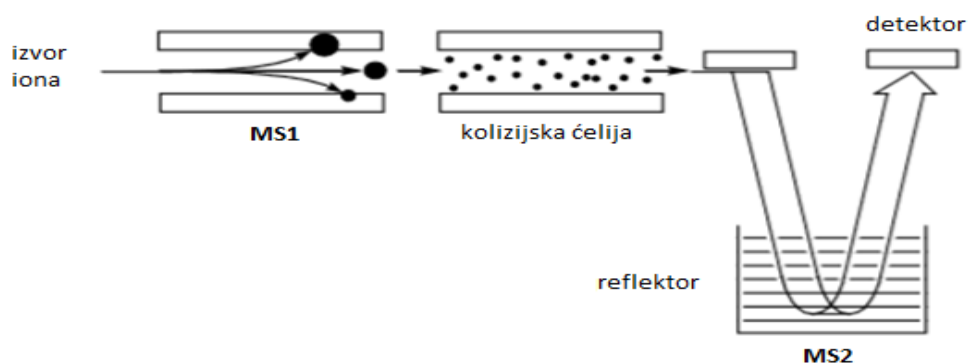


**Slika 8.** Shema MS/MS uređaja (Henderson i McIndoe, 2005)

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 (MgSO<sub>4</sub>)
- Amonijev acetat (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>)

#### 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  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . 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  $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  za klortetraciklin, epiklortetraciklin, oksitetraciklin, epioksitetraciklin, tetraciklin i epitetraciklin, odnosno zbroj NDK izvornog spoja i njegovog 4-epimera iznosi  $200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , 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 ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Polazni volumen $V_1$ (mL)	Ciljana koncentracija $c_2$ ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Ciljani volumen $V_2$ (mL) - tikvica	Oznaka standardne mješavine <b>MIX S1-TTC</b>
<b>Klortetraciklin, Epiklortetraciklin, Oksitetraciklin, Epioksitetraciklin, Tetraciklin, Epitetraciklin</b>	<b>1000000</b>	<b>0,5</b>	<b>20000</b>	<b>25</b>	<b>S1</b>
<b>Doksiciklin</b>		<b>0,1</b>	<b>4000</b>		
Oznaka polaznog standarda <b>MIX S1-TTC</b>	POLAZNA OTOPINA ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Polazni volumen $V_1$ (mL)	Ciljana koncentracija $c_2$ ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Ciljani volumen $V_2$ (mL) - tikvica	Oznaka standardne mješavine <b>MIX S2-JAJA</b>
<b>Klortetraciklin, Epiklortetraciklin, Oksitetraciklin, Epioksitetraciklin, Tetraciklin, Epitetraciklin</b>	<b>20000</b>	<b>1</b>	<b>2000</b>	<b>10</b>	<b>S2</b>
<b>Doksiciklin</b>	<b>4000</b>	<b>1</b>	<b>400</b>		

### 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 <sup>-1</sup> )	Polazni volumen V <sub>1</sub> (mL)	Ciljana koncentracija c <sub>2</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )	Ciljani volumen V <sub>2</sub> (mL) - tikvica	Oznaka standardne mješavine <b>MIX-Q-TOF-IS1</b>
<b>Tetraciklin-d6</b>	<b>1000000</b>	<b>0,5</b>	<b>20000</b>	<b>10</b>	<b>IS1</b>
Oznaka polaznog standarda <b>MIX-Q-TOF-IS1</b>	POLAZNA OTOPINA (ng mL <sup>-1</sup> )	Polazni volumen V <sub>1</sub> (mL)	Ciljana koncentracija c <sub>2</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )	Ciljani volumen V <sub>2</sub> (mL) - tikvica	Oznaka standardne mješavine <b>MIX-Q-TOF-IS2</b>
<b>IS1</b>	<b>20000</b>	<b>5</b>	<b>4000</b>	<b>25</b>	<b>IS2</b>

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
	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	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
		( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ 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:

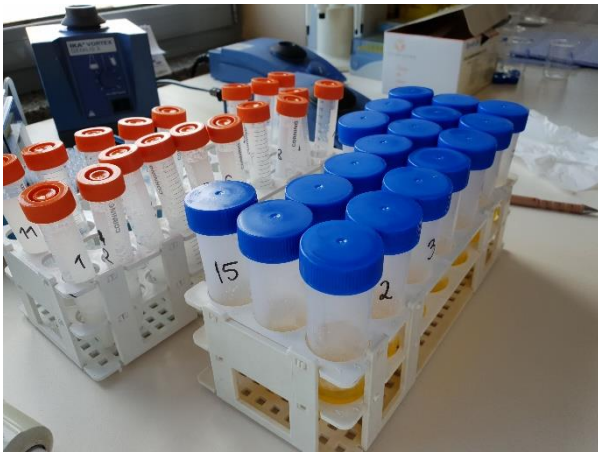
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)
- Uzorci (razine L1-L5) za pripremu standardne kalibracijske krivulje na otapalu
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)
- Negativni kontrolni uzorak matriksa (engl. *Matrix blank*)
- Uzorci (razine M1-M5) za pripremu matriks kalibracijske krivulje
- Slijepi 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  $\mu$ 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

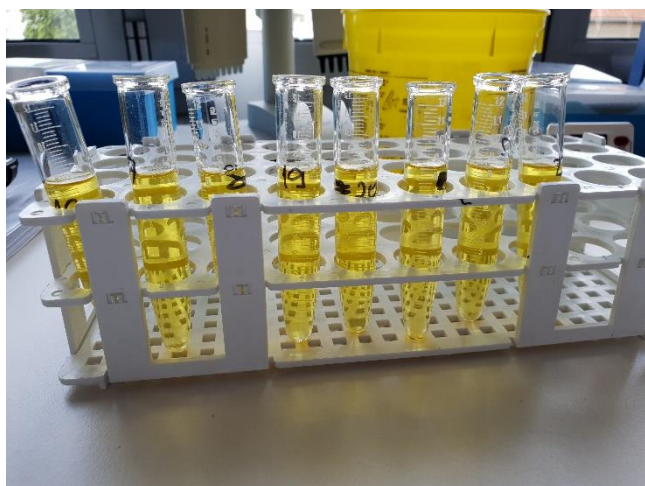
- prebaciti 7 mL supernatanta od uzorka jaja (0,5% mravlja u ACN) u aktiviranu emulziju s praškom
- odmah vorteksirati tijekom 5 minuta
- centrifugirati 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4°C
- supernatant dekantirati u novu epruvetu od 50 mL s čepom
- dodati sadržaj soli MgSO<sub>4</sub> iz vrećice 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 H<sub>2</sub>O
- 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  $\mu$ 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  $\mu$ L DMSO u svaku epruvetu sa supernatantom
- upariti do približno 50  $\mu$ L pri 40°C pomoću dušika
- otopiti uzorak na način da se doda 150  $\mu$ 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  $\mu\text{m}$ , 2,1x150 mm, Waters s predkolonom: Acquity HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$  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

<b>Kromatografska kolona</b>	Acquity UPLC HSS T3 1,8 $\mu\text{m}$ , 2,1x150 mm
<b>Predkolona</b>	Acquity UPLC HSS T3 1,8 $\mu\text{m}$ , 2,1x5 mm VanGuard Pre-Column
<b>Protok</b>	0,4 mL min <sup>-1</sup>
<b>Temperatura odjeljka kolone</b>	40°C
<b>Sustav za uzorkovanje</b>	Volumen injektiranja 10 $\mu\text{L}$ Temperatura 10°C Injektiranje s ispiranjem igle 15 s (MeOH/ACN/PropOH 5 : 2,5 : 2,5)
<b>Mobilna faza</b>	Otopina A: 0,1 % mravlja kiselina Otopina B: MeOH LC-MS čistoće

**Tablica 7.** Gradijentna kromatografija

	Vrijeme	Otopina A	Otopina B	Protok	Tlak
<b>1</b>	3 min	100%	0%	0,400 mL min <sup>-1</sup>	1000 bar
<b>2</b>	10 min	5%	95%	0,400 mL min <sup>-1</sup>	1000 bar
<b>3</b>	13 min	5%	95%	0,400 mL min <sup>-1</sup>	1000 bar
<b>4</b>	13,5 min	100%	0%	0,400 mL min <sup>-1</sup>	1000 bar
<b>5</b>	17 min	100%	0%	0,400 mL min <sup>-1</sup>	1000 bar

Uvjeti MS/MS spektrometra:

Parametri instrumenta:

Temperatura plina 150°C

Protok plina 13 L min<sup>-1</sup>

Nebulizacija 35 psig

Temperatura plina (*sheath*) 300°C

Protok plina (*sheath*) 11 L min<sup>-1</sup>

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 $\text{sec}^{-1}$		
Parametri instrumenta:	Temperatura plina 150 °C		
	Protok plina 18 L $\text{min}^{-1}$		
	Nebulizacija 30 psig		
	Temperatura plina ( <i>sheath</i> ) 400°C		
	Protok plina ( <i>sheath</i> ) 12 L $\text{min}^{-1}$		
	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  $\leq 5$  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  $\text{ng g}^{-1}$  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

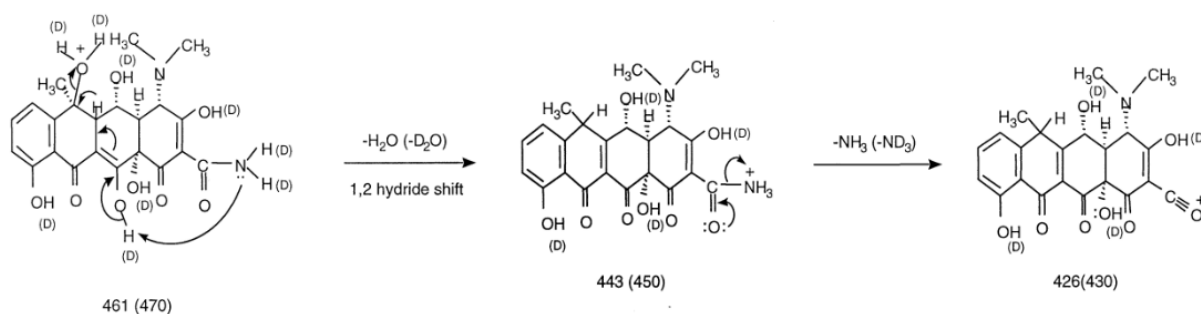
Tehnike analitičke detekcije rezidua antibiotika uključuju imunološke metode kao što su ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), radioimuno ispitivanje (engl. *radioimmunoassay*) i biosenzori, dok najrašireniju primjenu imaju kromatografske metode kao što su plinska kromatografija (GC), tekućinska 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

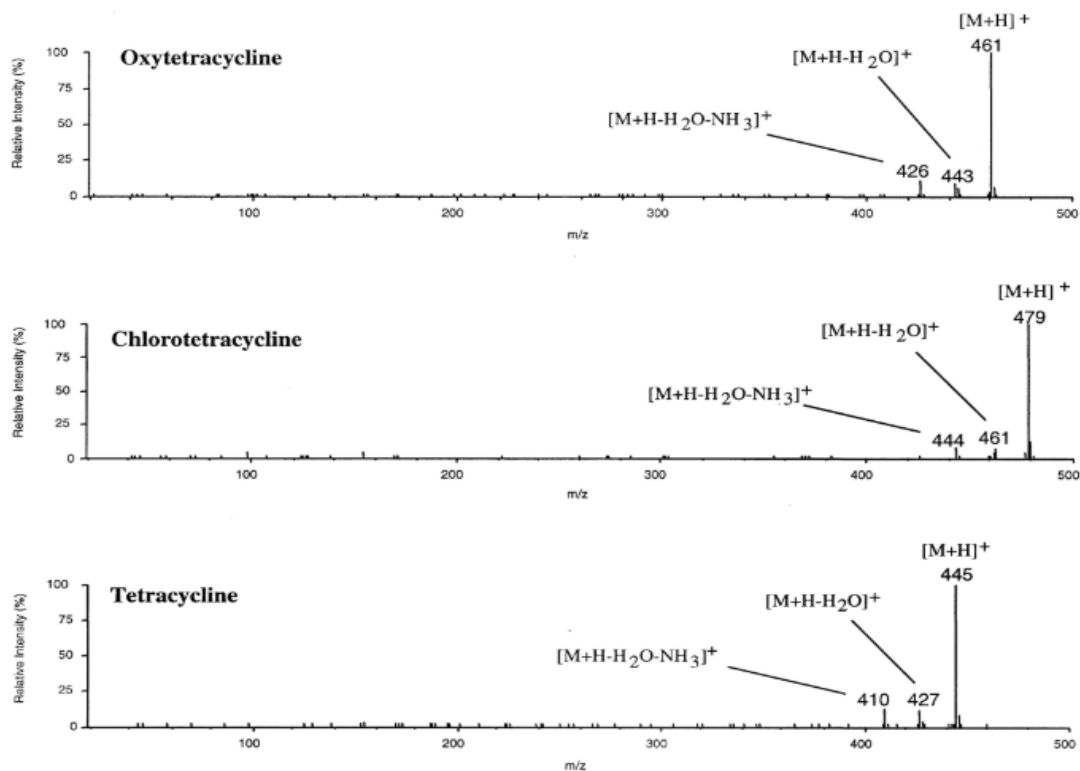
Kako bi se postigla maksimalna osjetljivost i selektivnost instrumenta, potrebno je provesti optimizaciju instrumentalnih parametara što uključuje definiranje ionskih oblika tetraciklinskih antibiotika. Fragmentacija tetraciklina potaknuta je kolizijom s inernim plinom dušikom. Kako bi se postigao najbolji 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 H<sub>2</sub>O praćeno gubitkom NH<sub>3</sub> (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	

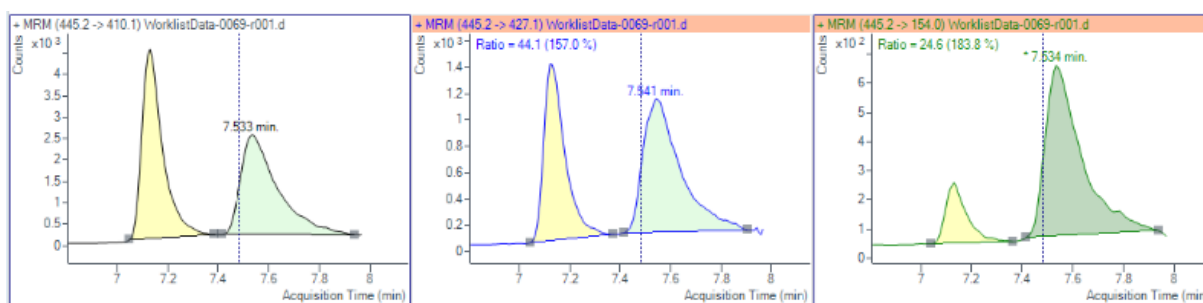
**Tablica 9.** Ionske tranzicije dobivene optimizacijom UHPLC/Q-TOF-MS sustava za određivanje rezidua tetraciklina

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

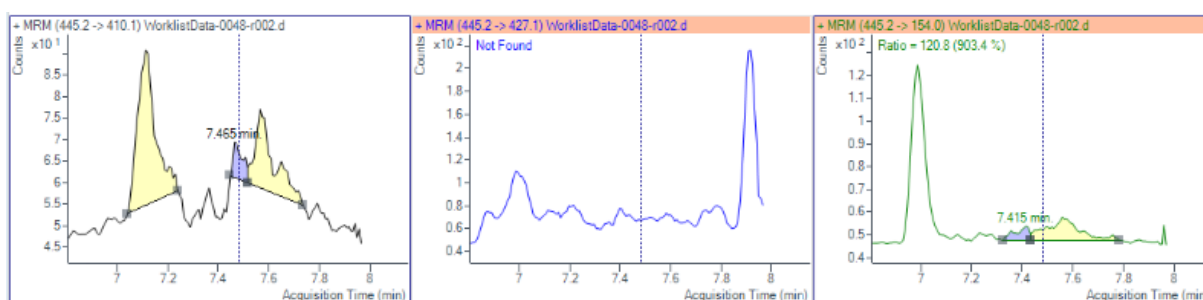
#### 4.2. KROMATOGRAMI REZIDUA TETRACIKLINA IZ UZORAKA JAJA

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).

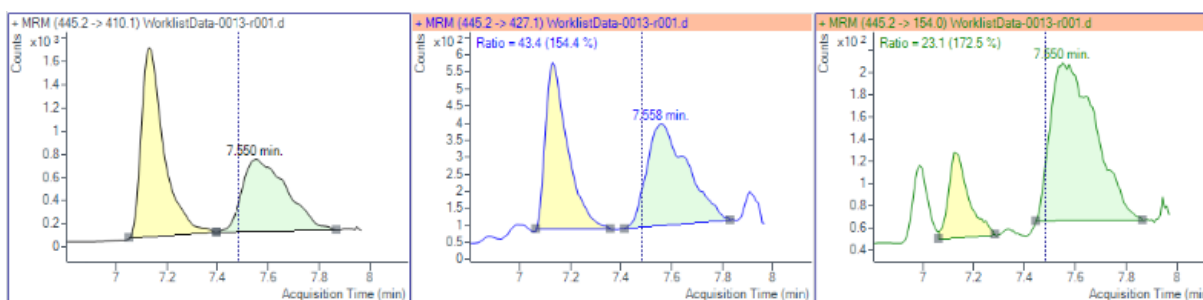
a)



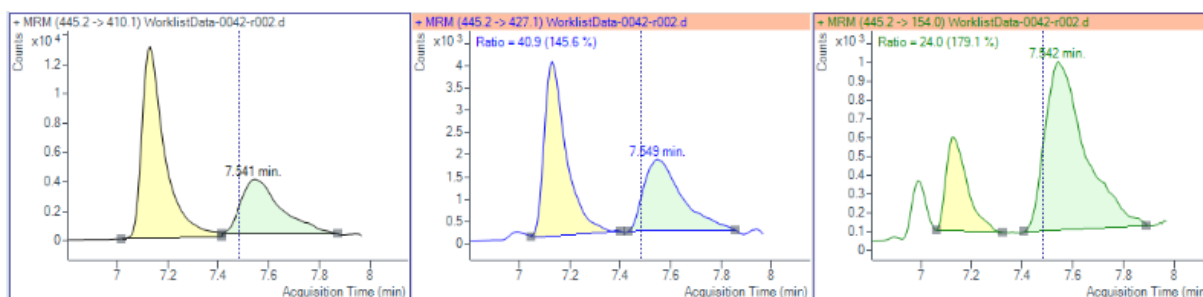
b)



c)

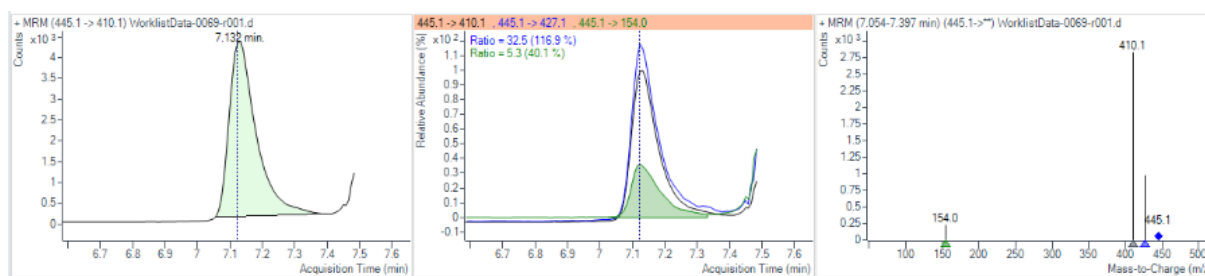


d)

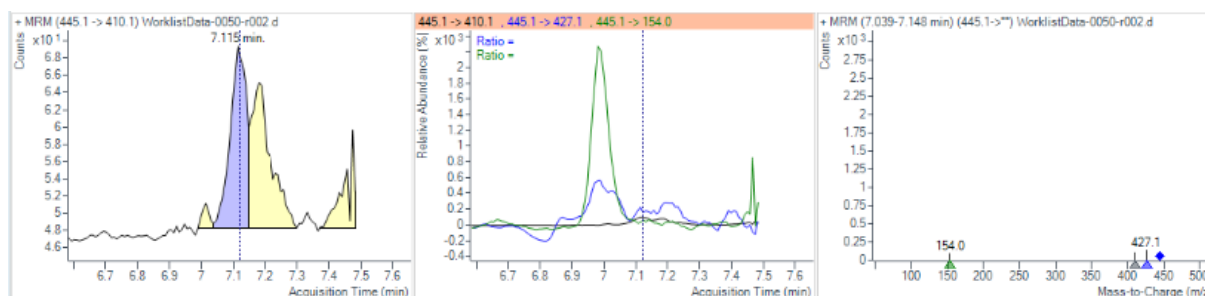


**Slika 17.** Kromatogrami produkata iona tetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)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

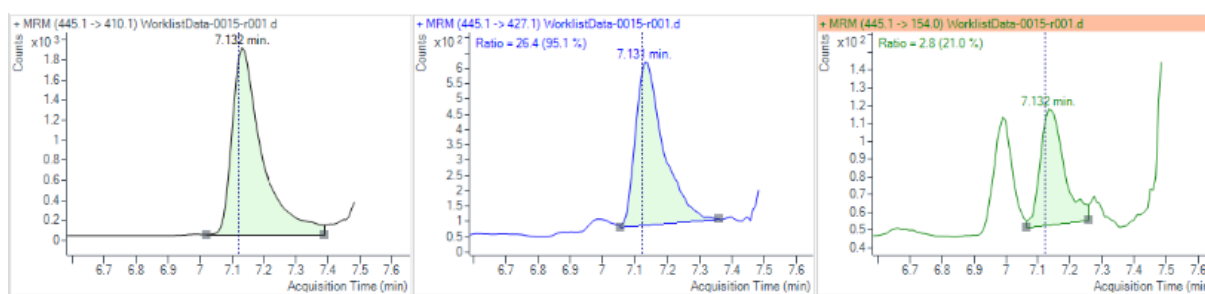
a)



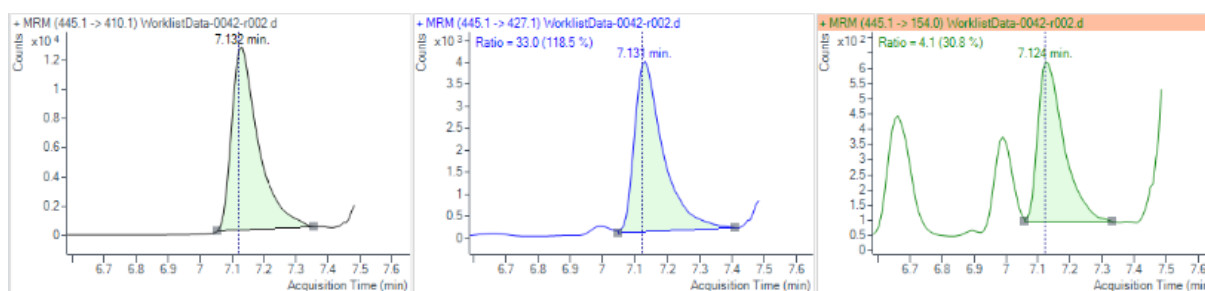
b)



c)

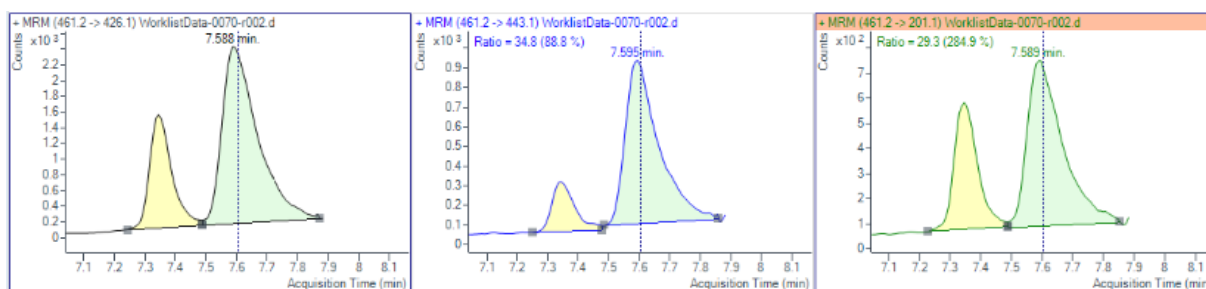


d)



**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

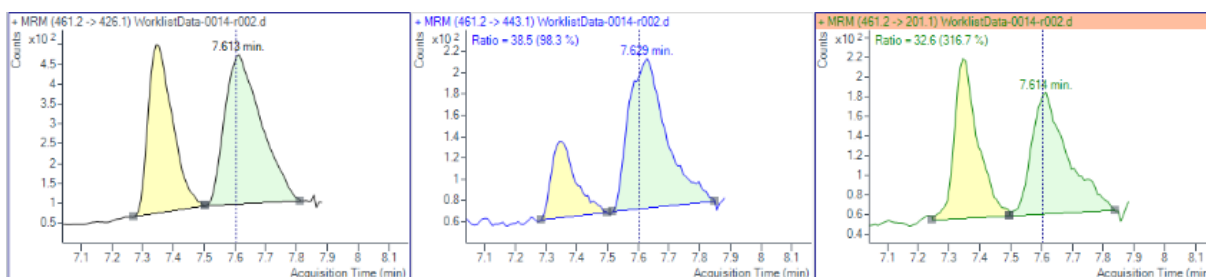
a)



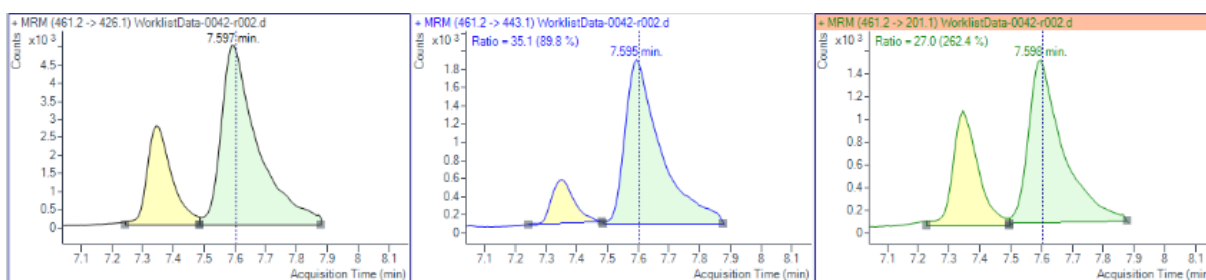
b)



c)

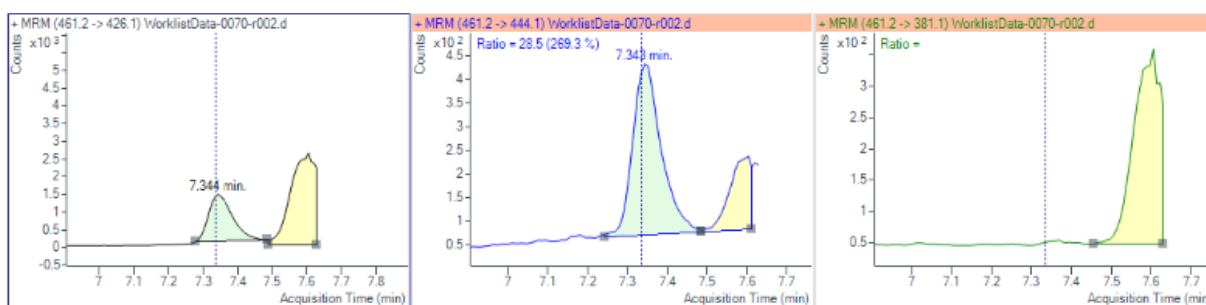


d)

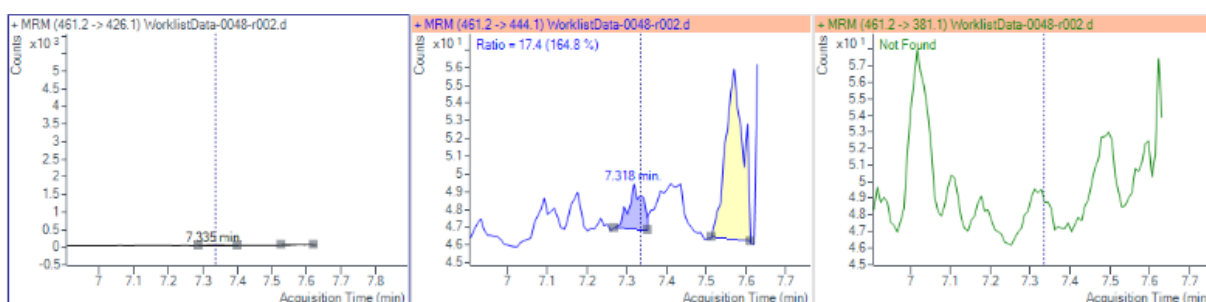


**Slika 19.** Kromatogrami produkata iona oksitetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina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

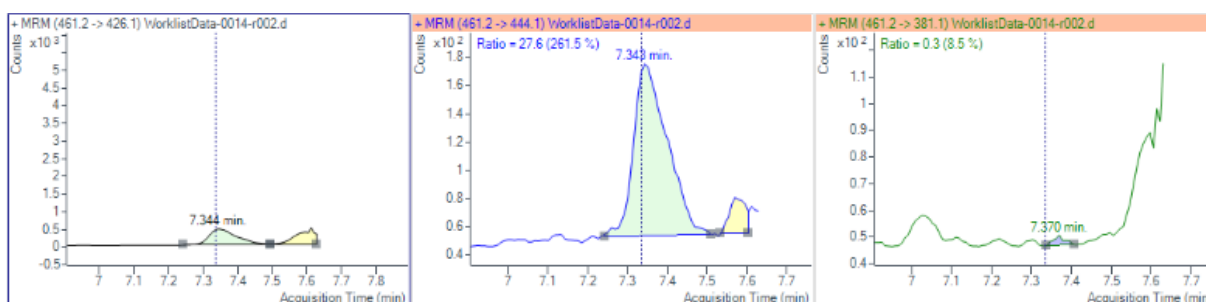
a)



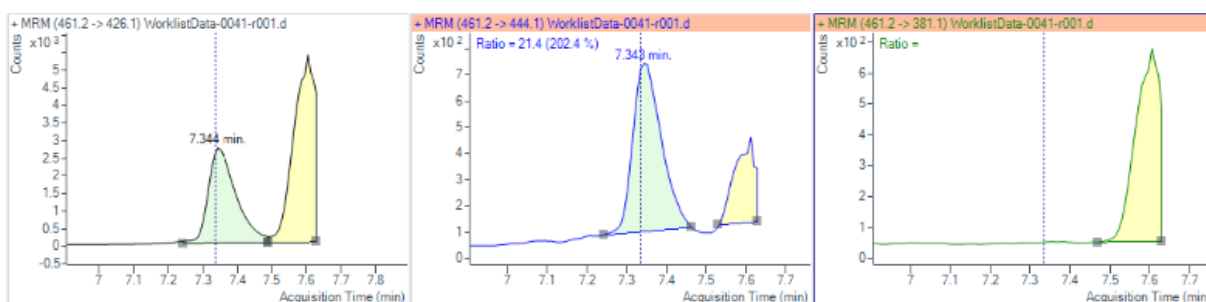
b)



c)

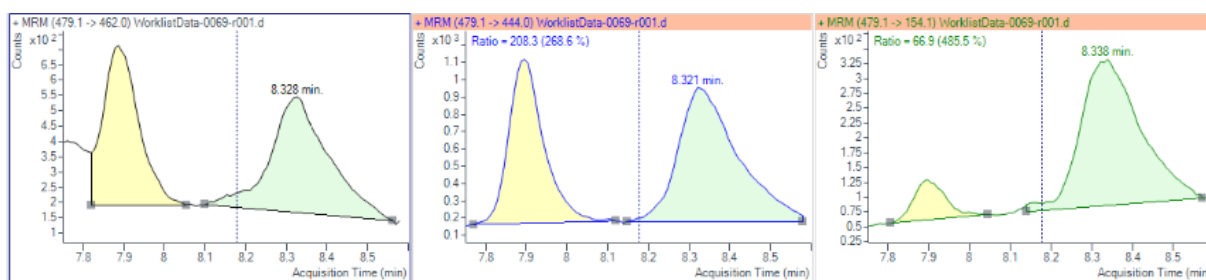


d)



**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)



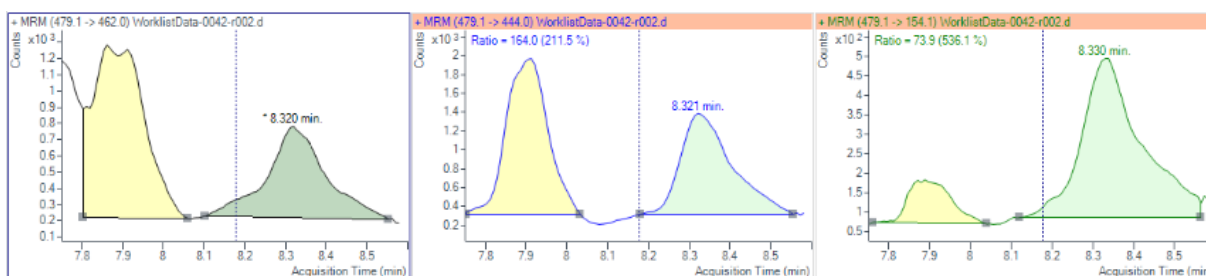
b)



c)



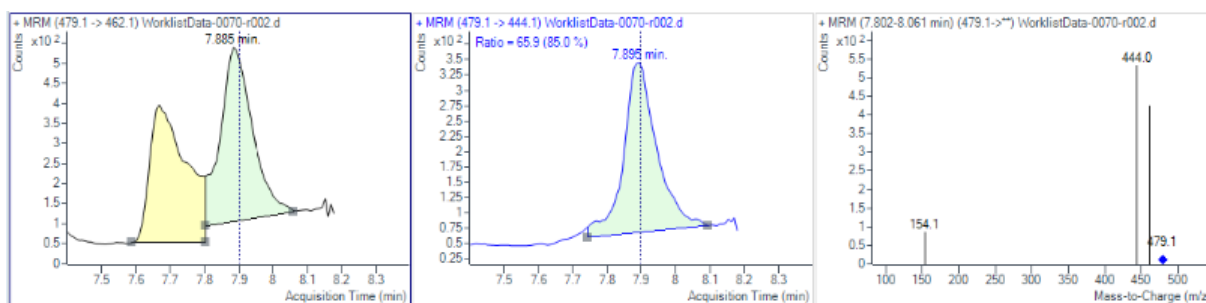
d)



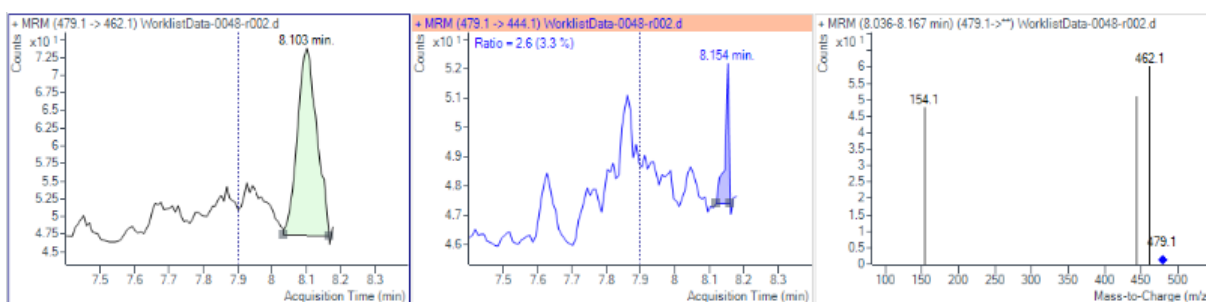
**Slika 21.** Kromatogrami produkata iona klortetraciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina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



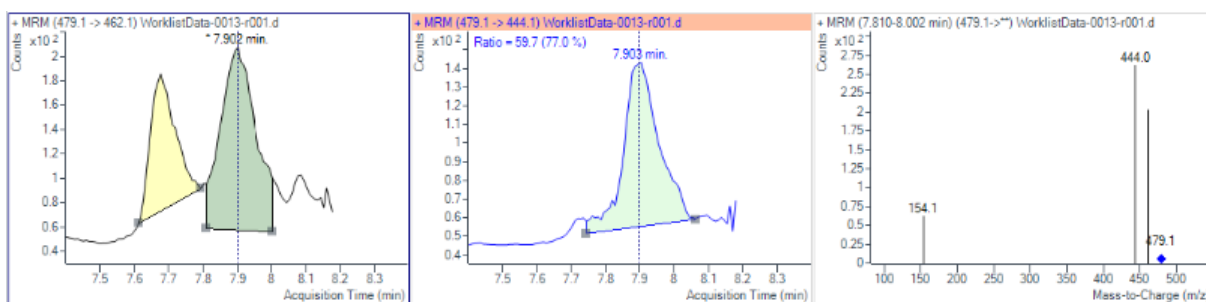
a)



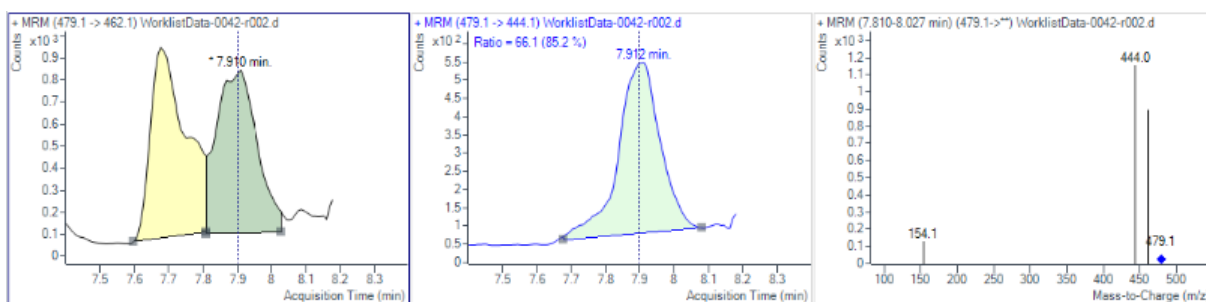
b)



c)

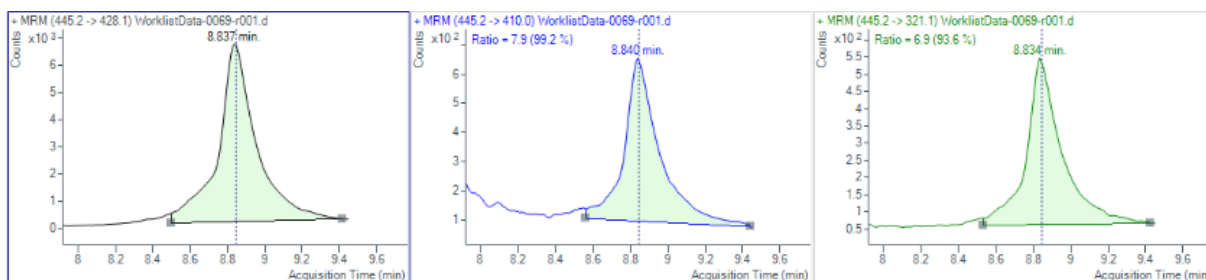


d)



**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

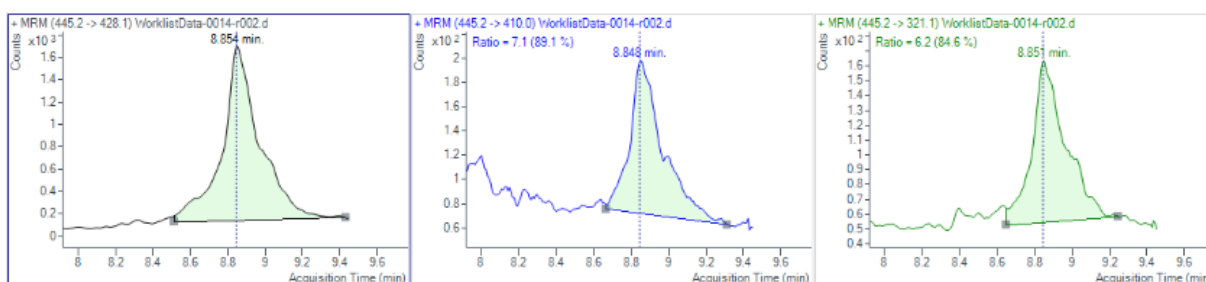
a)



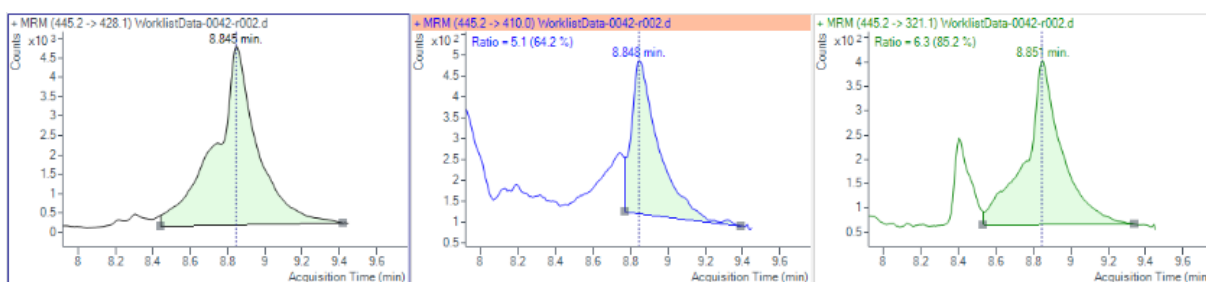
b)



c)



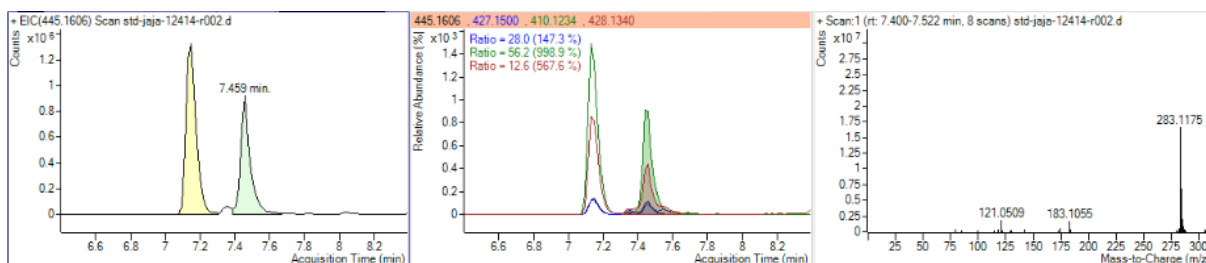
d)



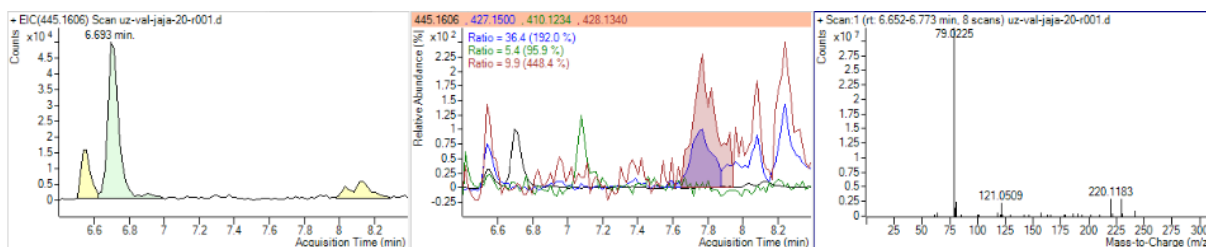
**Slika 23.** Kromatogrami produkata iona doksiciklina dobivenih na LC-MS/MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3) – Quechers ekstrakcija, d) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)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

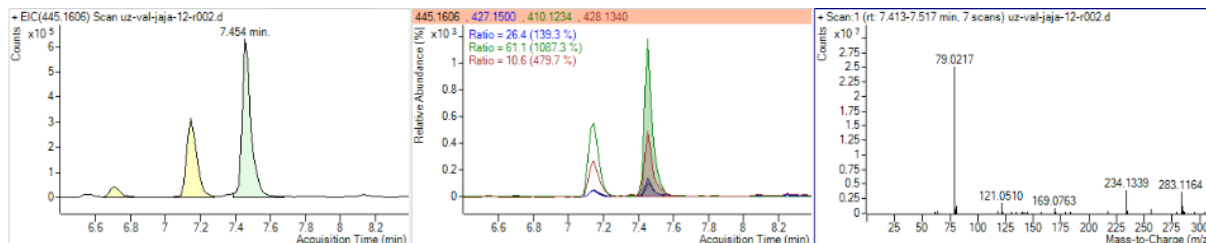
a)



b)

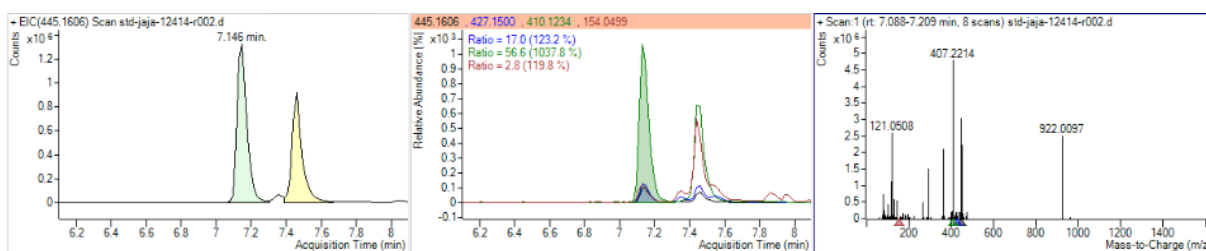


c)

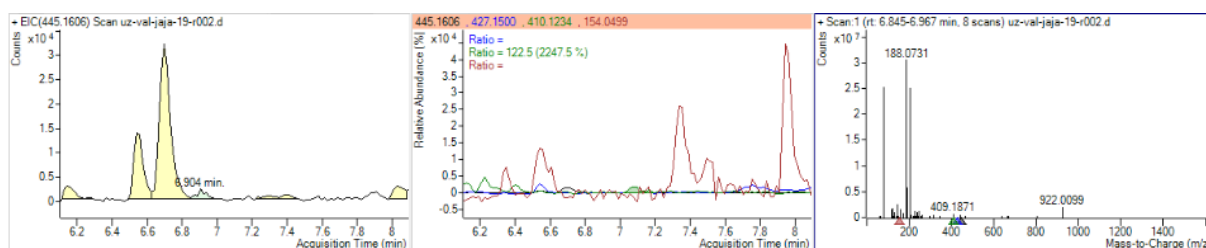


**Slika 24.** Kromatogrami produkata iona tetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

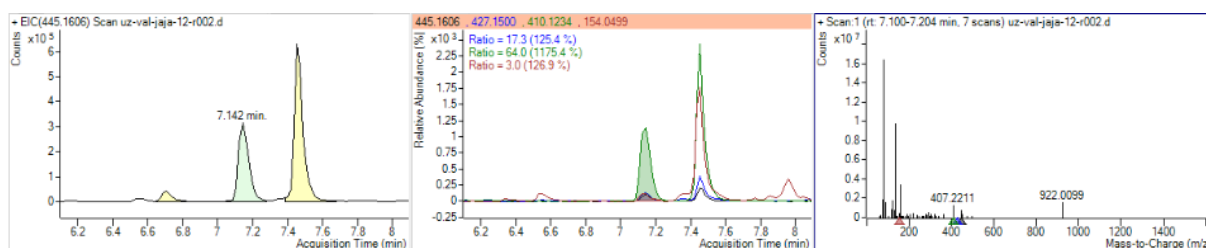
a)



b)

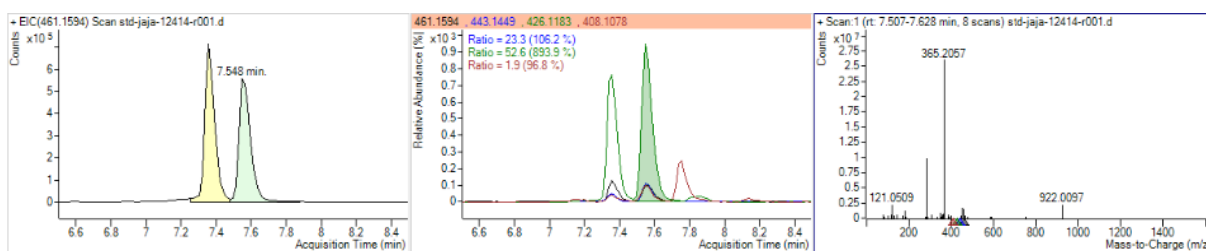


c)

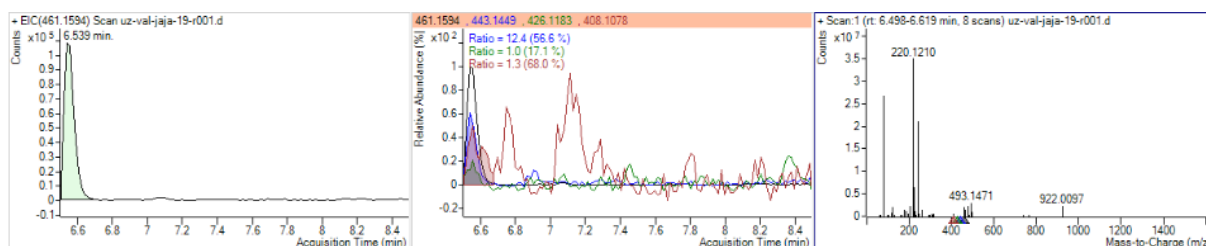


**Slika 25.** Kromatogrami produkata iona epitetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

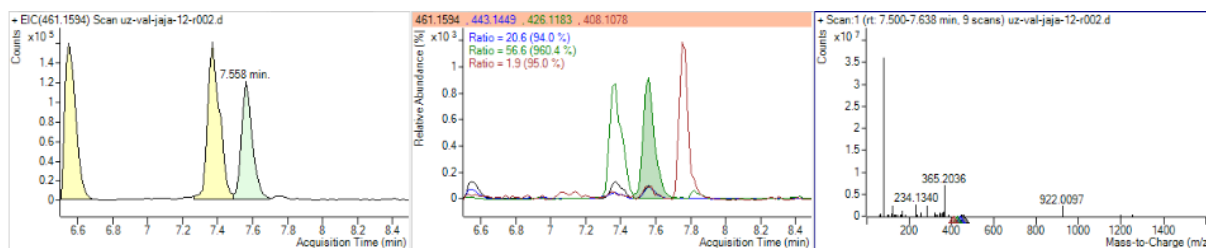
a)



b)

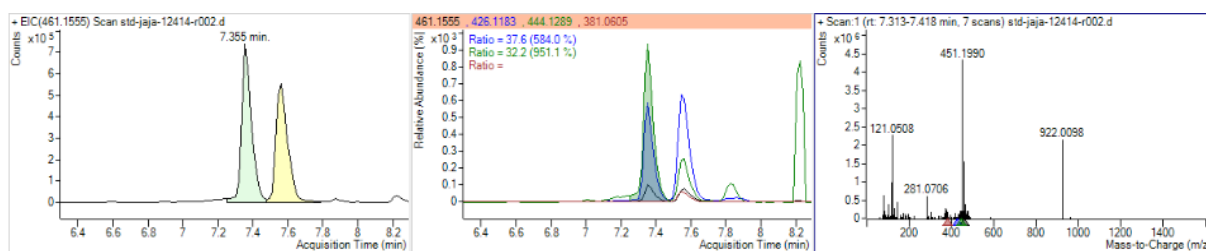


c)

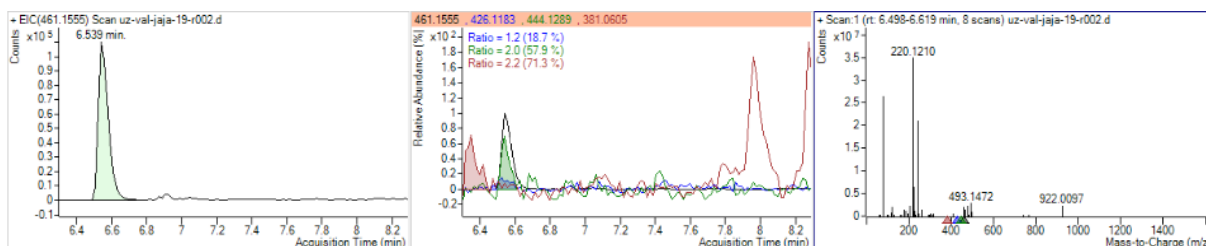


**Slika 26.** Kromatogrami produkata iona oksitetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

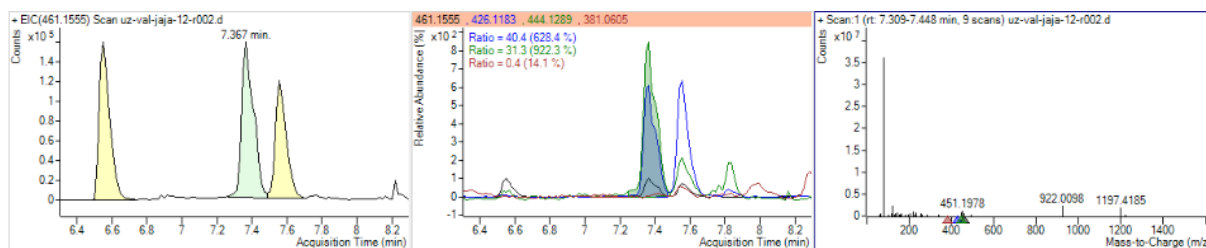
a)



b)

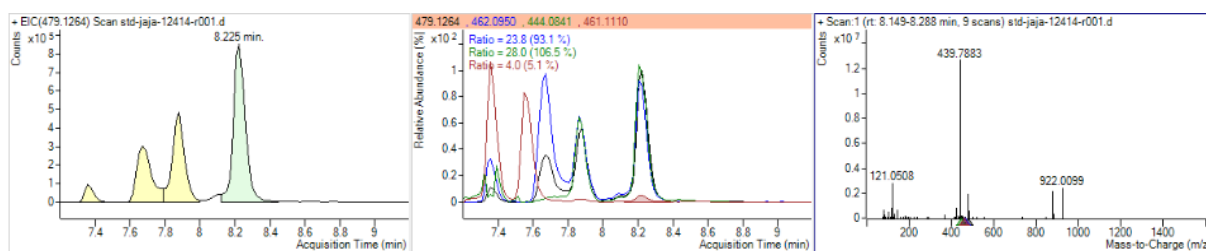


c)

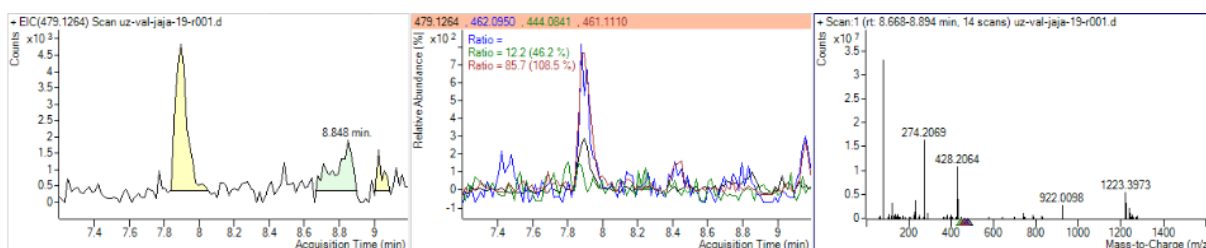


**Slika 27.** Kromatogrami produkata iona epioksitetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

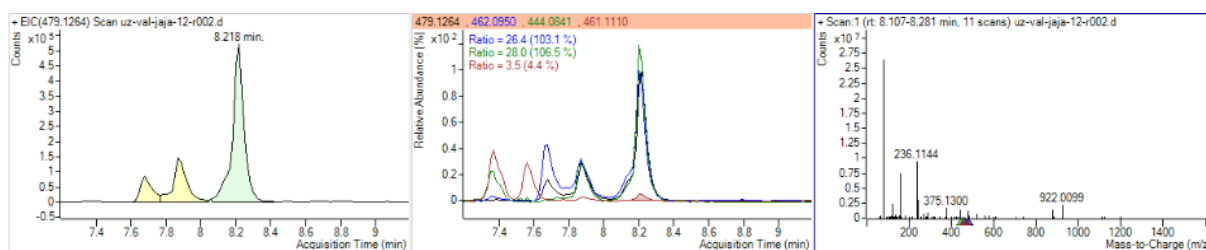
a)



b)

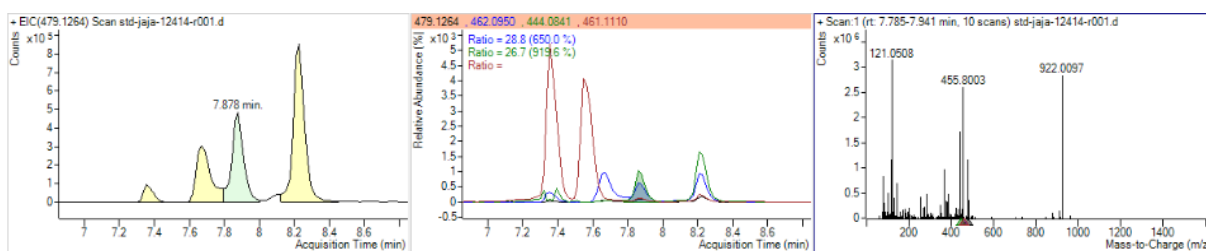


c)

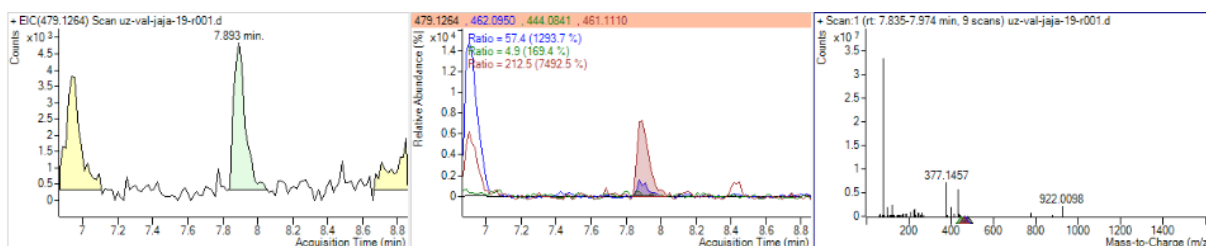


**Slika 28.** Kromatogrami produkata iona klortetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

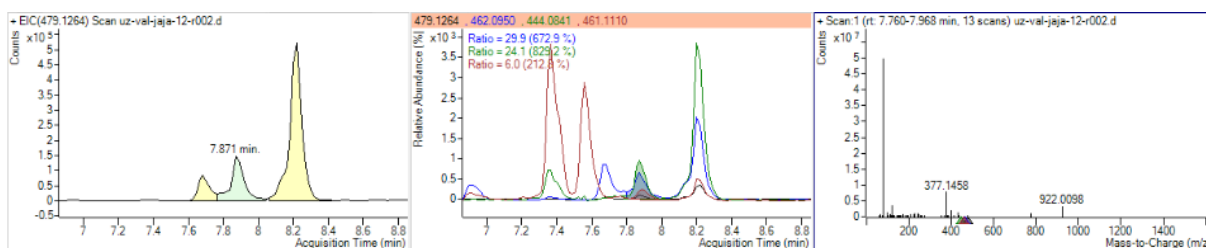
a)



b)



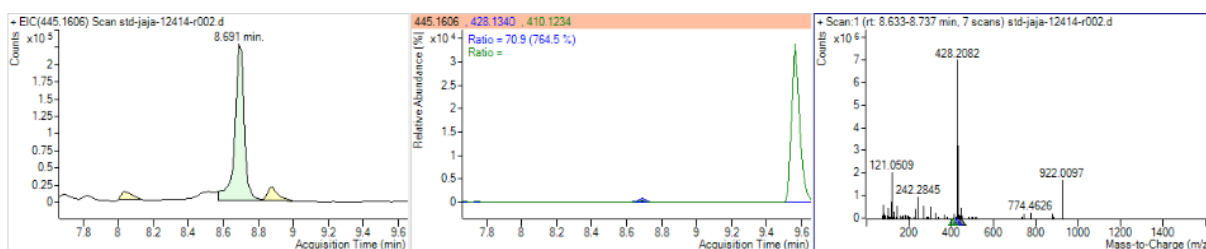
c)



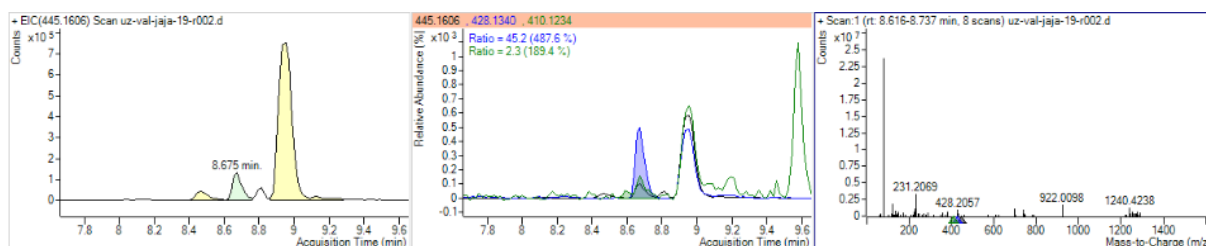
**Slika 29.** Kromatogrami produkata iona epiklortetraciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)



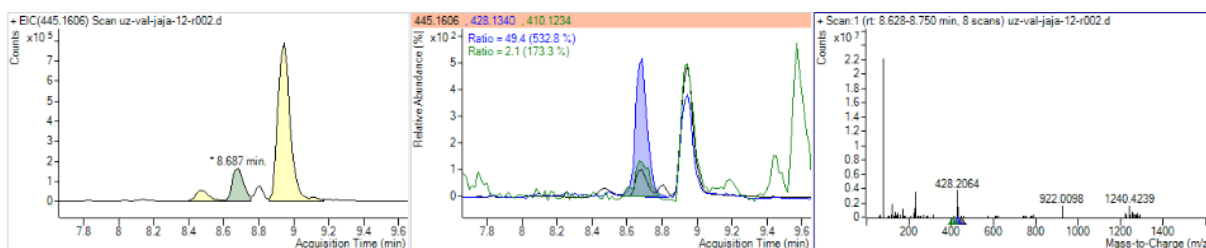
a)



b)



c)



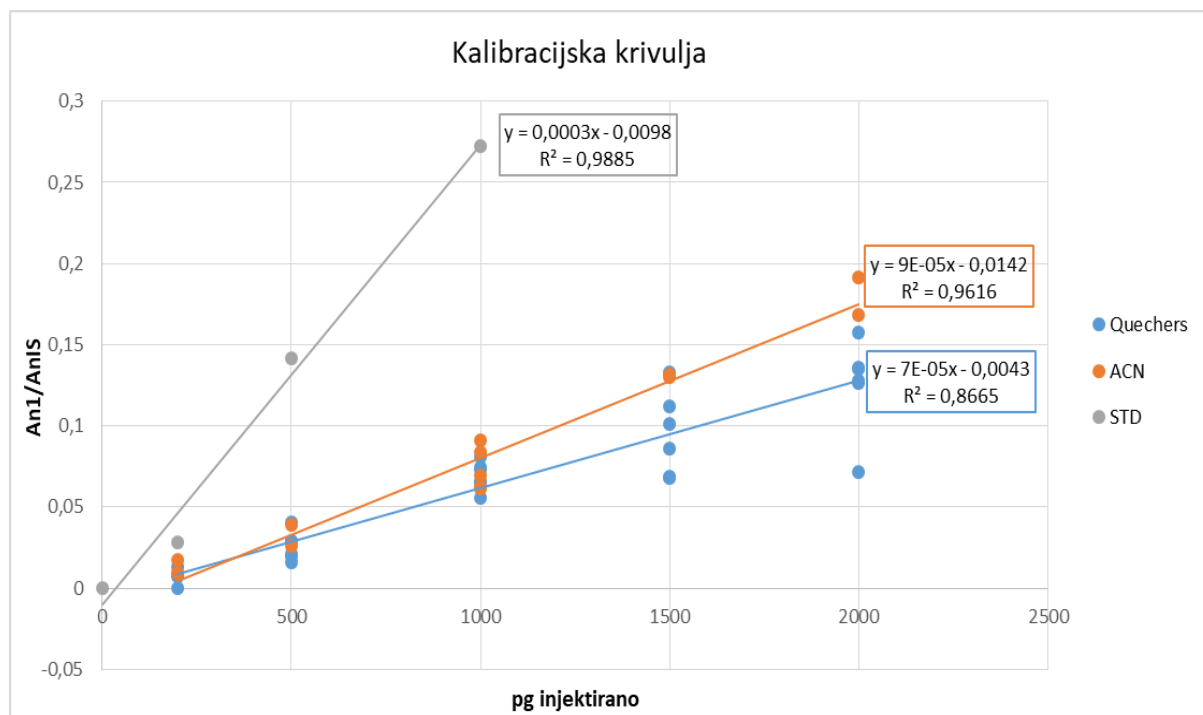
**Slika 30.** Kromatogrami produkata iona doksiciklina dobivenih na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju: a) standard (L3 koncentracijska razina), b) negativni kontrolni uzorak (engl. *Matrix blank*), c) obogaćeni uzorak (koncentracijska razina M3)

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.

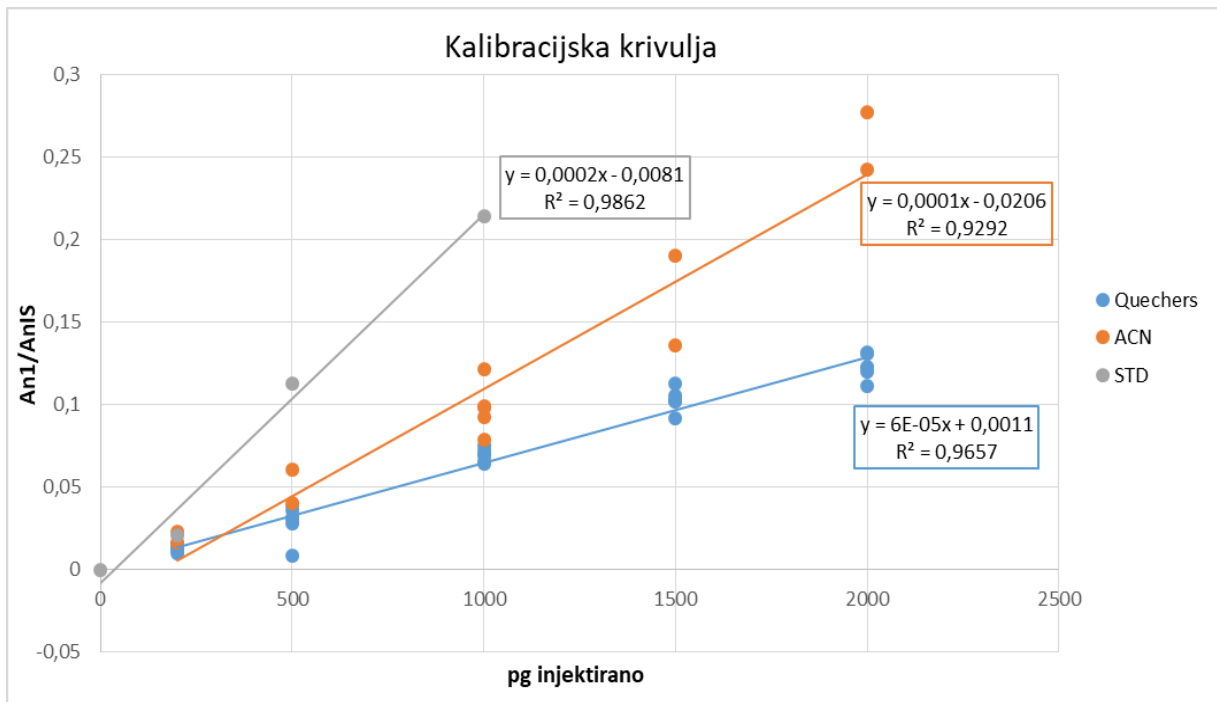
### 4.3. ODREĐIVANJE UTJECAJA MATRIKSA NA ODREĐIVANJE REZIDUA TETRACIKLINA

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

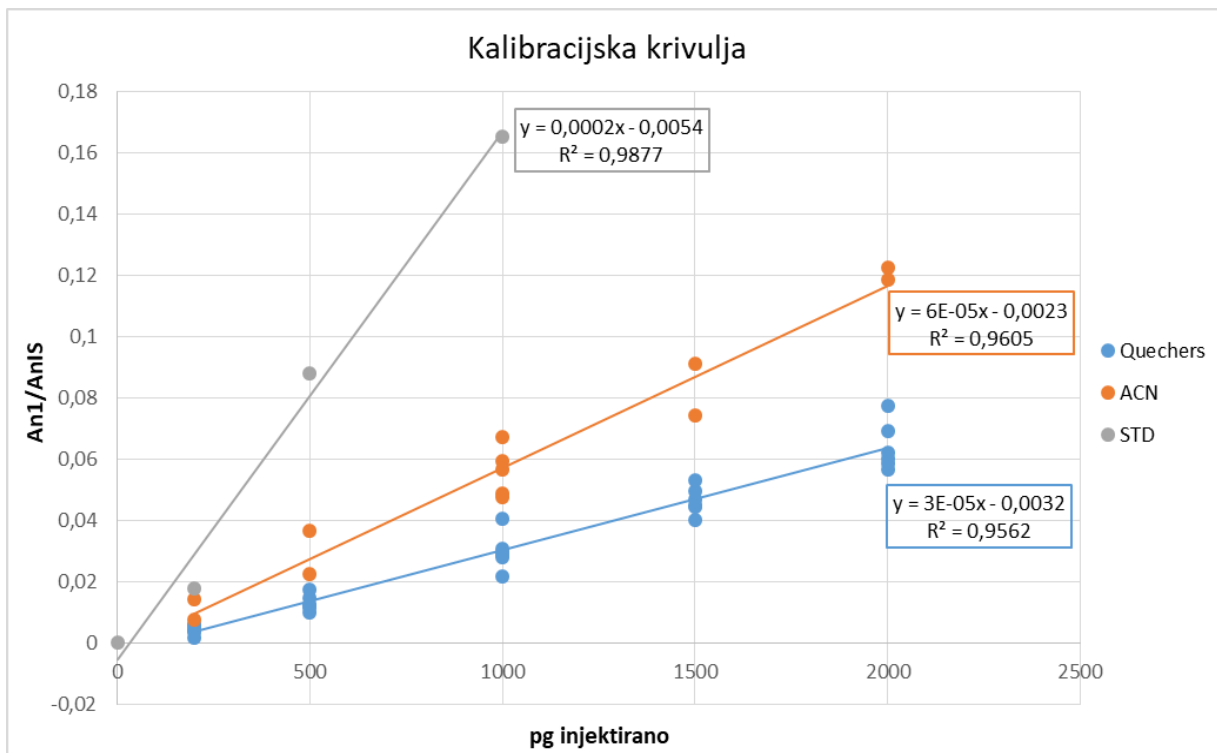
analizirani na LC-MS/MS uređaju dobiveni su Quechers ekstrakcijom (Quechers) i ekstrakcijom organskim otapalom (acetonitril, ACN), pa su dobivene dvije matriks kalibracijske krivulje. Slike 31 – 37 grafički prikazuju utjecaj matriksa na uzorke analizirane na LC-MS/MS uređaju – prikaz ovisnosti količine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



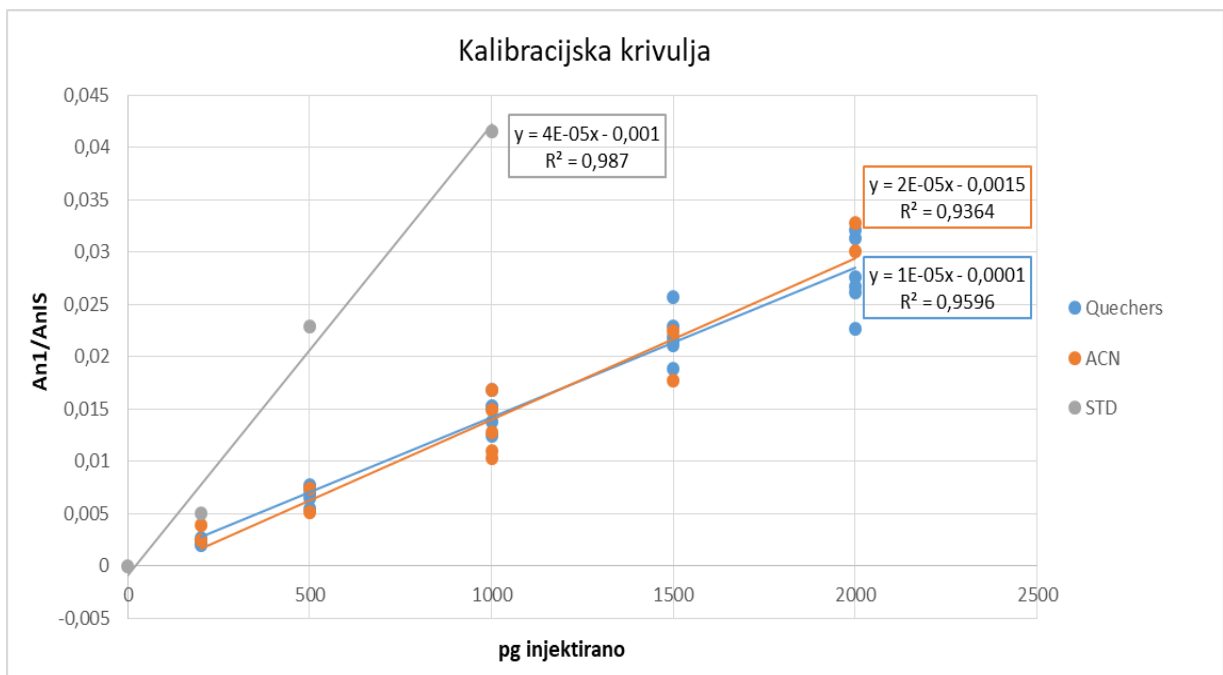
**Slika 31.** Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za tetraciklin na LC-MS/MS uređaju



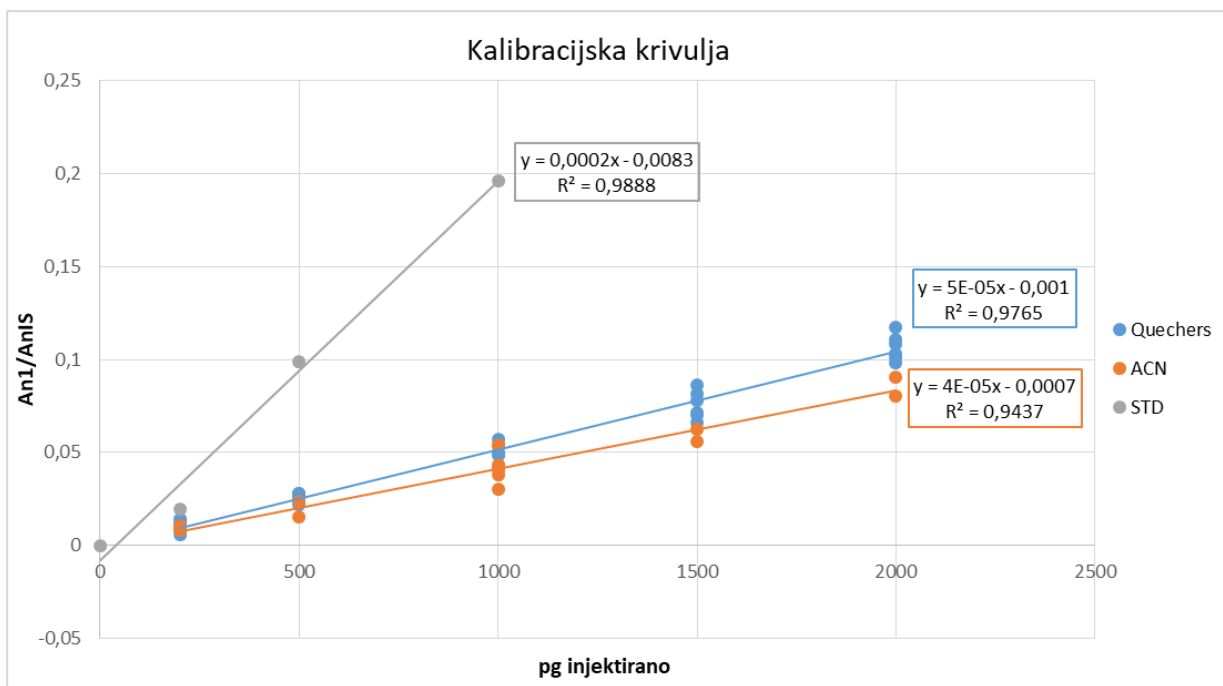
**Slika 32.** Usporedba standardne (STD) i matricks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za epitetraciklin na LC-MS/MS uređaju



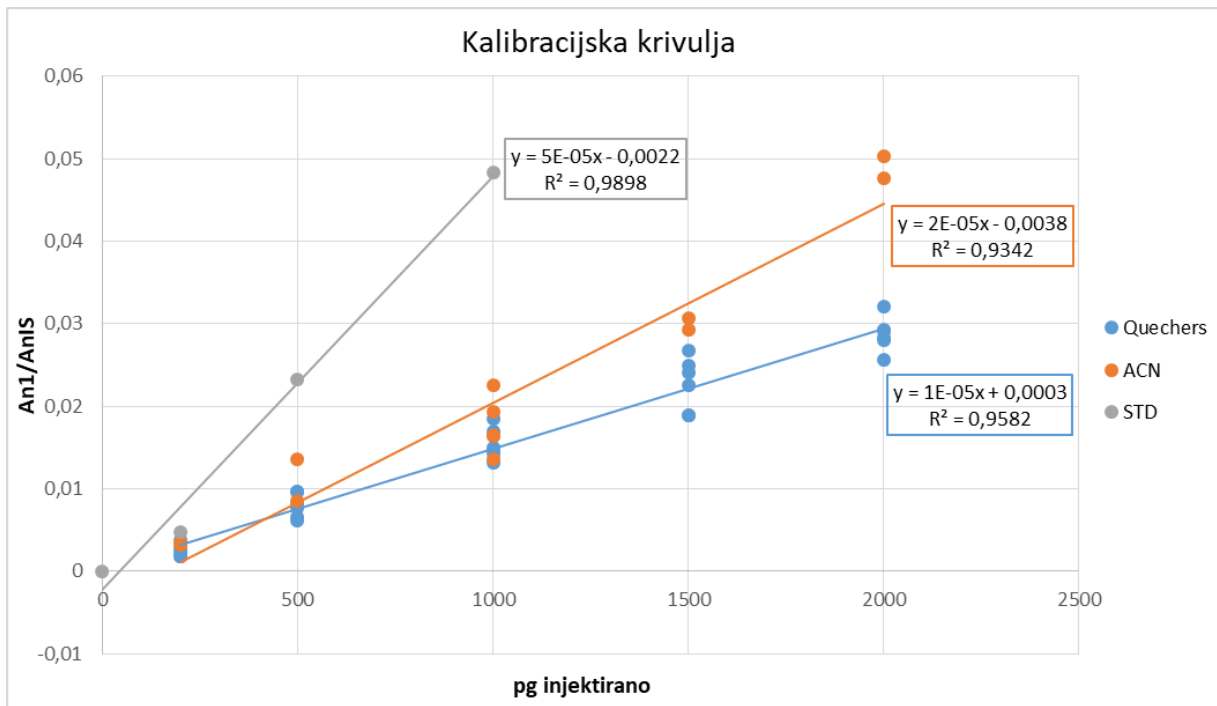
**Slika 33.** Usporedba standardne (STD) i matricks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za oksitetraciklin na LC-MS/MS uređaju



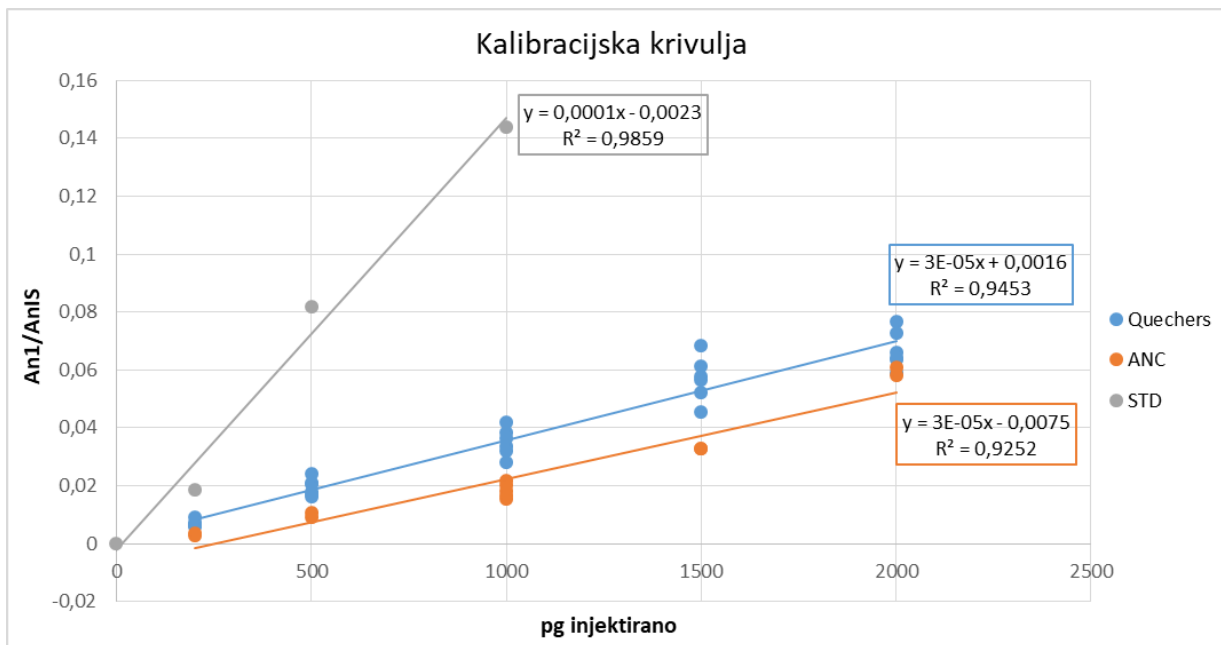
**Slika 34.** Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za epioksitetraciklin na LC-MS/MS uređaju



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

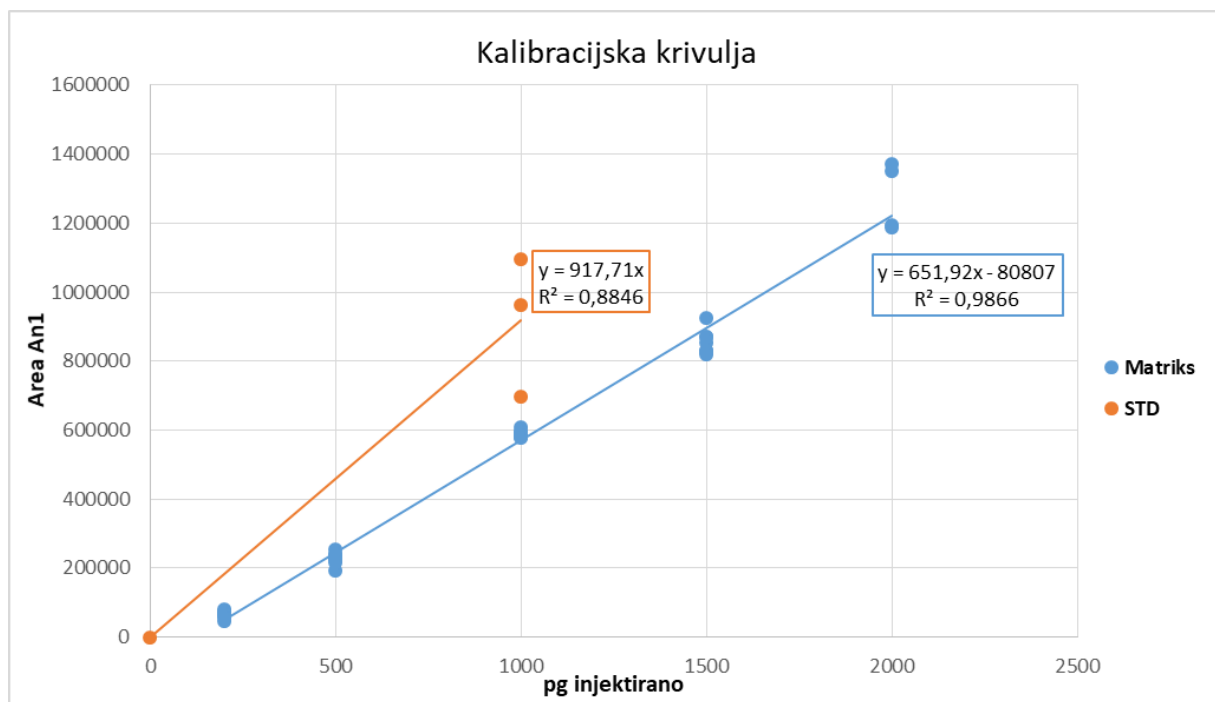


**Slika 36.** Usporedba standardne (STD) i matriks (Quechers, ACN) kalibracijske krivulje za epiklortetraciklin na LC-MS/MS uređaju



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

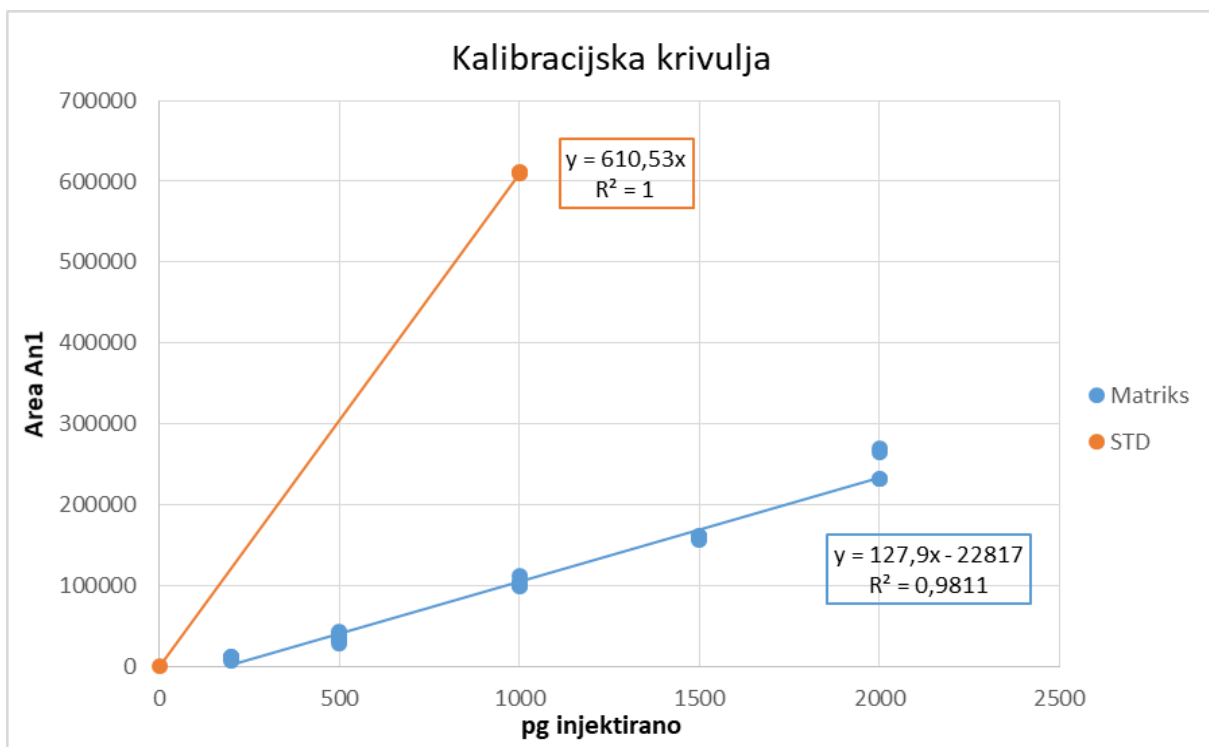
Uzorci analizirani na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju dobiveni su Quechers ekstrakcijom, te su rezultati prikazani grafički na slikama 38 – 44, grafovi prikazuju ovisnosti količine standarda (pg injektirano) o površini analita (Area An1).



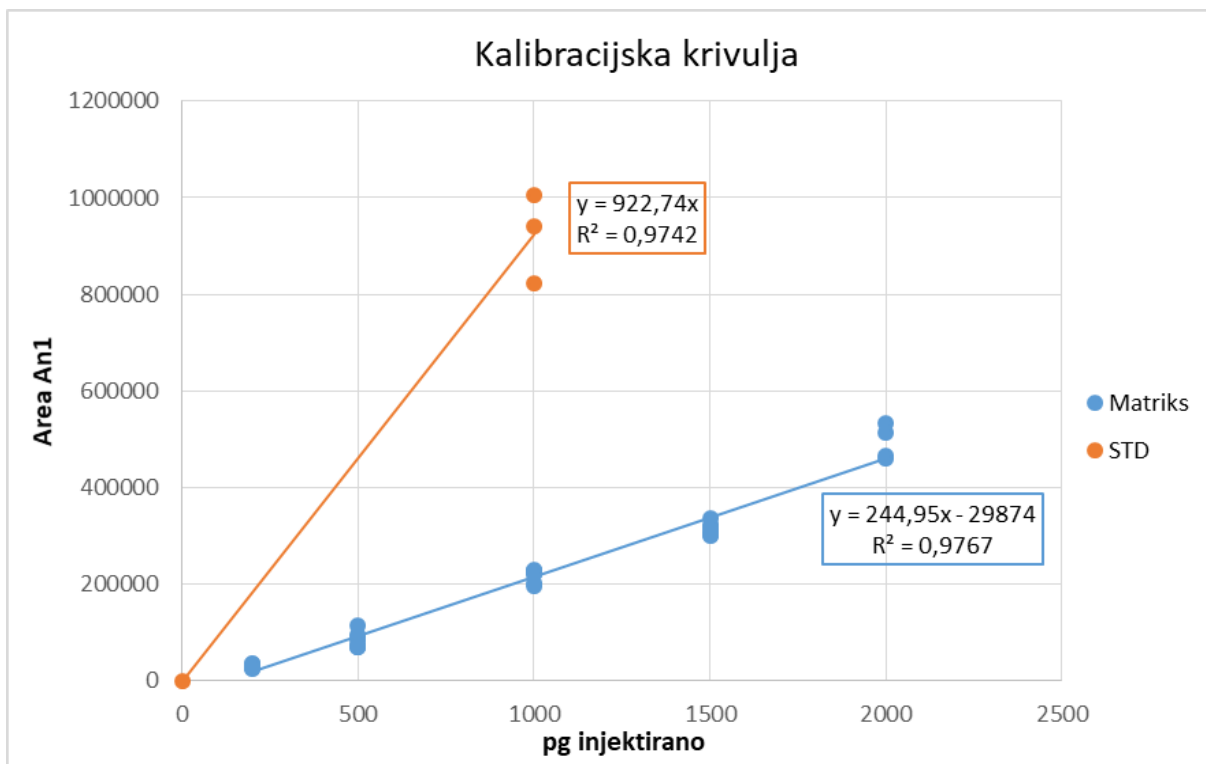
**Slika 38.** Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za tetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



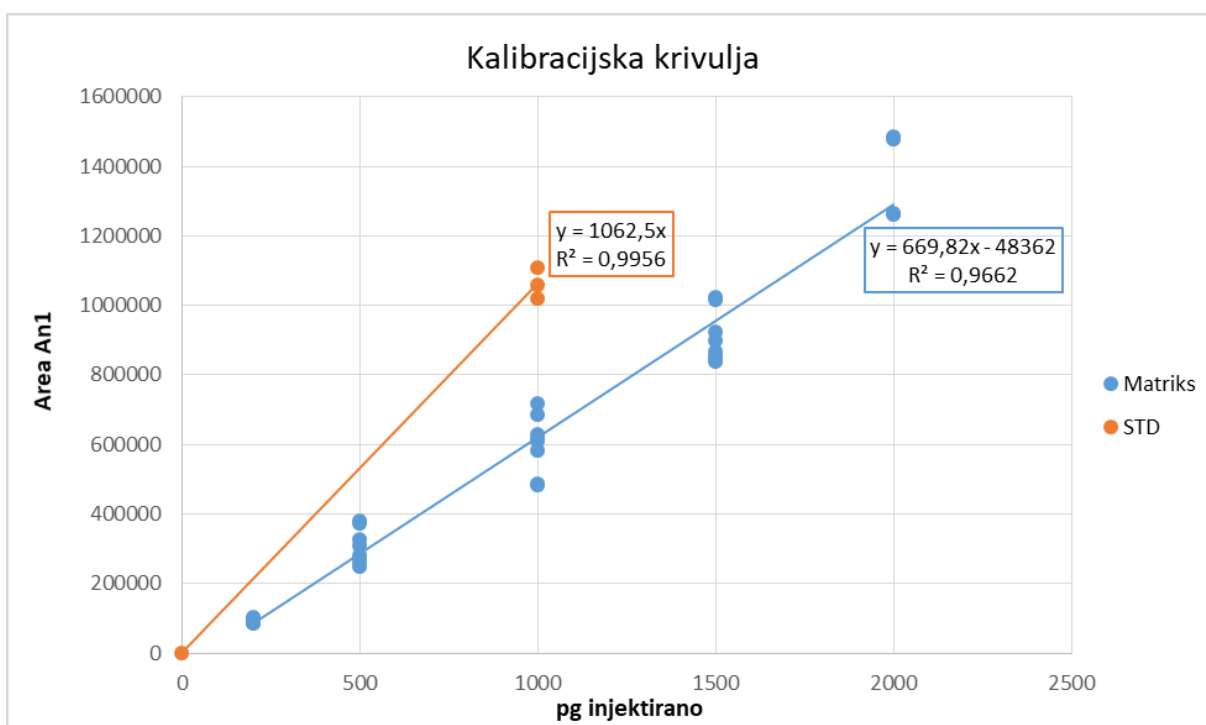
**Slika 39.** Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za epitetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju



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

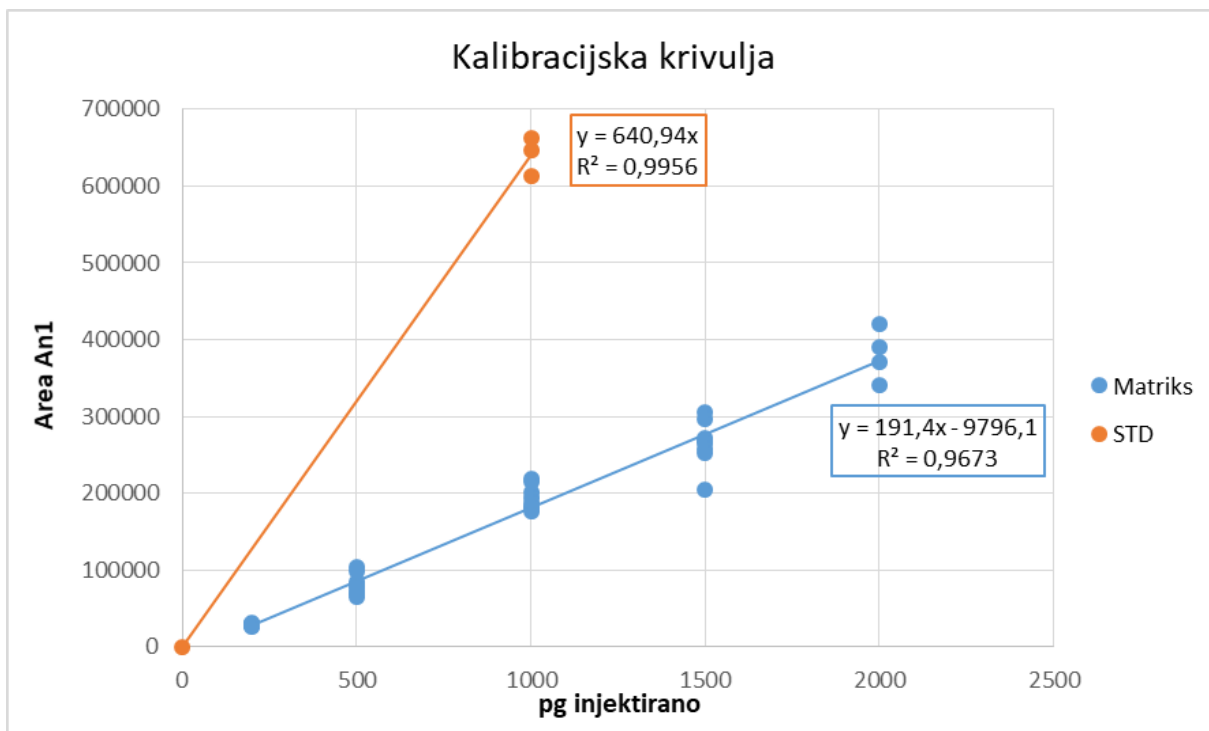


**Slika 41.** Usporedba standardne (STD) i matriks (Matriks) kalibracijske krivulje za epioksitetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju

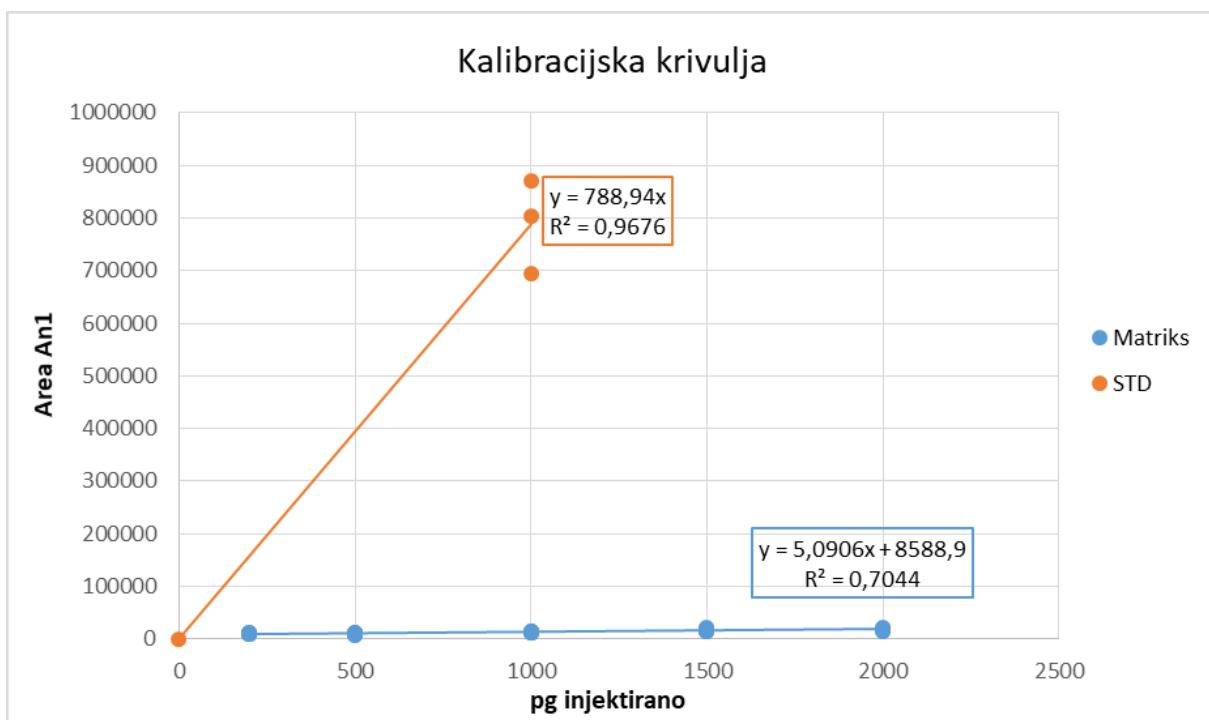


**Slika 42.** Usporedba standardne (STD) i matriks kalibracijske (Matriks) krivulje za klortetraciklin na UHPLC/Q-TOF-MS uređaju





**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		
<b>Tetraciklin</b>	0,0003	$6,6279 \cdot 10^{-5}$	$9,4451 \cdot 10^{-5}$	23,41	33,36
<b>Epitetraciklin</b>	0,0002	$6,3725 \cdot 10^{-5}$	0,0001	28,53	58,21
<b>Oksitetraciklin</b>	0,0002	$3,3371 \cdot 10^{-5}$	$5,9525 \cdot 10^{-5}$	19,37	34,55
<b>Epioksitetraciklin</b>	$4,3188 \cdot 10^{-5}$	$1,4303 \cdot 10^{-5}$	$1,5419 \cdot 10^{-5}$	33,12	35,7
<b>Klortetraciklin</b>	0,0002	$5,2619 \cdot 10^{-5}$	$4,1882 \cdot 10^{-5}$	25,74	20,49
<b>Epiklortetracilin</b>	$5,0193 \cdot 10^{-5}$	$1,4545 \cdot 10^{-5}$	$2,4158 \cdot 10^{-5}$	28,98	48,13
<b>Doksiciklin</b>	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
<b>Tetraciklin</b>	STDEV	0,99	2,926	3,837	5,782	9,358
	CV (%)	4,99	6,12	3,72	3,78	4,78
<b>Epitetraciklin</b>	STDEV	1,03	1,819	8,155	11,356	4,908
	CV (%)	5,39	4,02	7,57	7,58	2,514
<b>Oksitetraciklin</b>	STDEV	1,081	1,658	5,143	4,989	9,247
	CV (%)	4,83	3,79	5,1	3,32	4,6
<b>Epioksitetraciklin</b>	STDEV	0,402	1,132	6,039	6,766	8,107
	CV (%)	1,83	2,54	5,95	4,49	4,06
<b>Klortetraciklin</b>	STDEV	0,631	2,42	8,867	12,849	12,091
	CV (%)	3,38	4,5	9,26	8,49	6,03
<b>Epiklortetraciklin</b>	STDEV	1,396	2,282	7,841	25,07	17,8
	CV (%)	8,43	4,74	7,11	16,8	9,25
<b>Doksiciklin</b>	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](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](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