

Razvoj metode za određivanje makrolida, tetraciklina i sulfonamida u medu metodom tekućinske kromatografije s masenom detekcijom

Pinčar, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:372291>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Ana Pinčar

1124/USH

**RAZVOJ METODE ZA
ODREĐIVANJE MAKROLIDA,
TETRACIKLINA I
SULFONAMIDA U MEDU
METODOM TEKUĆINSKE
KROMATOGRFIJE S
MASENOM DETEKCIJOM**

Diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i neposrednim vodstvom dr. sc. Ivane Varenine, znanstvene suradnice i dr. sc. Nine Biladžić, znanstvene savjetnice.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Mirjani Hruškar na pomoći i omogućavanju izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se i dr. sc. Saši Drakuli sa Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda.

Zahvaljujem se dr. sc. Nini Bilandžić na stručnom vodstvu kroz eksperimentalni dio rada i mogućnosti rada na Hrvatskom veterinarskom institutu.

Veliko hvala dr. sc. Ivani Varenini na stručnoj i srdačnoj pomoći oko provedbe eksperimentalnog dijela rada te svim djelatnicima Laboratorija za određivanje rezidua.

Hvala Marku, mojim roditeljima i prijateljima koji su bili uz mene tijekom cijelog mog studentskog putovanja te koji su mi bili najveća podrška u težim i lakšim trenucima te učinili ga lijepim i nezaboravnim iskustvom.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE MAKROLIDA, TETRACIKLINA I SULFONAMIDA U MEDU METODOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE S MASENOM DETEKCIJOM

Ana Pinčar 1124/USH

Sažetak: Sve veća prisutnost antibiotika u humanoj, ali i veterinarskoj medicini, dovela je do potrebnih mjera kojima se rezidue antibiotika moraju kontrolirati posebice u matriksima kao što je hrana jer predstavljaju izravnu prijetnju zdravlju potrošača. Od toga nije izuzet ni med kao prehrambeni proizvod izrazitog nutritivnog sastava, a za kojeg nema definiranih NDK (najmanja dopuštena količina) vrijednosti. Najzastupljeniji antibiotici u medu pokazali su se makrolidi, tetraciklini te sulfonamidi te je stoga posvećena pozornost njima u ovome radu, pri čemu je proveden razvoj metode prikladne za istovremeno određivanje svih već spomenutih vrsta antibiotika. Eksperimentom je utvrđeno da je metoda tekućinske kromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) prikladna za određivanje analita iz skupine makrolida, tetraciklina i sulfonamida.

Ključne riječi: antibiotici, masena spektrometrija, med, Quechers, tekućinska kromatografija

Rad sadrži: 61 stranica, 30 slika, 12 tablica, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Hruškar

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. Blaženka Kos
2. Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar
3. Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj.
4. Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

METHOD DEVELOPMENT FOR DETECTION OF MACROLIDES, TETRACYCLINES AND SULFONAMIDES IN HONEY WITH LIQUID CHROMATOGRAPY WITH MASS DETECTION

Ana Pinčar 1124/USH

Abstract: Wide usage of antibiotics in human and veterinary medicine brought more focus on monitoring of antibiotic residues in matrices as food due to potential risk for consumer's health. Honey, with a range of nutritional value is also being monitored despite no MRL (maximum residue levels) were established. Macrolides, tetracyclines and sulfonamides are most common antibiotics in honey, therefore the focus in this experiment was to develop a method suitable for detection of all the antibiotics above. After performed experiment, it is determined that liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS/MS) is suitable method for multiclass determination of analytes from group of macrolides, tetracyclines and sulfonamides.

Keywords: antibiotics, honey, liquid chromatography, mass spectrometry, Quenchers

Thesis contains: 61 pages, 30 figures, 12 tables, 46 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Mirjana Hruškar, Full professor

Technical support and assistance: PhD Ivana Varenina, Research associate and PhD Nina Bilandžić, Scientific advisor

Reviewers:

1. PhD. Blaženka Kos, Full professor
2. PhD. Mirjana Hruškar, Full professor
3. PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor
4. PhD. Marina Krpan, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 29 September 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MED.....	2
2.1.1. Definicija i osnovne karakteristike meda	2
2.1.2. Mikroorganizmi meda	3
2.1.3. Zakonska regulativa.....	4
2.2. ANTIBIOTICI.....	5
2.2.1. Povijest korištenja antibiotika	5
2.2.2. Osnovna svojstva antibiotika.....	6
2.2.2.1. Makrolidi.....	7
2.2.2.2. Tetraciklini	8
2.2.2.3. Sulfonamidi.....	9
2.2.3. Antibiotici u pčelarstvu, medu i proizvodima od meda.....	11
2.2.4. Antibiotička rezistencija i utjecaj na zdravlje	12
2.3. METODE DETEKCIJE ANTIBIOTIKA	14
2.3.1. Orijentacijske (engl. <i>screening</i>) metode	14
2.3.2. Potvrdne metode	15
2.3.2.1. Tekućinska kromatografija	15
2.3.2.2. Spektrometrija masa.....	16
2.3.2.3. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS).....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJALI	20
3.2. POPIS KORIŠTENE OPREME I KEMIKALIJA	20
3.2.1. Laboratorijska aparatura i pribor	20
3.2.2. Kemikalije	21
3.2.3. Standardi.....	21
3.3.1. Pročišćavanje uzoraka QuEChERS (engl. <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>) ekstrakcijom	26
3.3.2. Mjerenje na LC-MS/MS UREĐAJU.....	27
3.3.3. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata.....	31

3.4. VALIDACIJA LC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA ANTIBIOTIKA	31
3.4.1. Specifičnost metode.....	31
3.4.2. Linearnost instrumenta	32
3.4.3. Ponovljivost metode (engl. <i>Intra-assay precision</i>).....	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. SPECIFIČNOST METODE.....	33
4.2. LINEARNOST INSTRUMENTA	36
4.3. PONOVLJIVOST METODE.....	41
5. ZAKLJUČCI.....	55
6. LITERATURA.....	56

1. UVOD

Sve češća upotreba antibiotika u humanoj, ali i veterinarskoj medicini dovela je do zaostataka (rezidua) antibiotika u prehrambenih proizvodima koje svakodnevno konzumiramo te smo samim time suočeni i s problematikom antibiotske rezistencije. Obzirom da su antibiotici korišteni u veterinarskoj medicini primarno kako bi se prevenirale te izlječile bolesti životinja te zbog opasnosti da njihove rezidue i nepropisno korištenje mogu uzrokovati štetu, antibiotici kao sekundarni produkti mikrobnog metabolizma podliježu strogoj zakonskoj regulativi kao i visokosofisticiranim metodama za njihovu detekciju. Jedan od takvih prehrambenih proizvoda je i med u kojem primjena prvih antibiotika u poljoprivrednoj djelatnosti, pčelarstvu, seže u 1940-e godine, a sve s ciljem spriječavanja bolesti u kultiviranih biljaka (Barganska i sur., 2011).

Brojne analize pokazuju kako su rezidue antibiotika u medu, pa čak i onog koji je na tržištu, jako visoke, a tome pridonosi i nemogućnost pčela da metaboliziraju antibiotike koje su unjele pa oni u konačnici mogu uzrokovati kontaminaciju ostatka pčelinje zajednice, a rezidue antibiotika mogu završiti u proizvodu (Reybroeck i sur., 2012).

Podaci koji su pristutni na Sustavu brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (engl. *The Rapid Alert System for Food and Feed*, RASSF) platformi idu tome u prilog obzirom da je većina analita antibiotika korištena u medu i pčelinjim proizvodima iz skupine makrolida, tetraciklina i sulfonamida te su iz tog razloga oni uzeti za analizu u diplomskom radu. Uredbom komisije (EU) br. 37/2010 koja propisuje količine veterinarskih lijekova koji smiju biti prisutni u hrani, nema definirane NDK (najmanje dopuštena količina) vrijednosti za antibiotike stoga rezidue bilo kojeg analita antibiotika ne smiju biti prisutne u matriksu meda.

Cilj ovog rada bio je utvrditi raspodjelu analita makrolida, tetraciklina i sulfonamida u cvjetnom medu te je u tu svrhu provedena validacija potvrde metode (tekućinska kromatografija sa masenom detekcijom LC-MS/MS) za određivanje sve tri skupine antibiotika.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MED

2.1.1. Definicija i osnovne karakteristike meda

Med je tradicionalan prehrambeni proizvod koji je popularan zbog svog okusa i mirisa, ali također i s nutritivnog aspekta zbog velike energetske vrijednosti i korištenja u zdravstvene svrhe. Prema Pravilniku (2015a), med je prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja. Također, ovim su Pravilnikom (2015a) definirane dvije osnovne kategorije meda koje se mogu podijeliti:

a) prema podrijetlu:

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

b) prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja:

- med sa saćem ili med s dijelovima saća
- cijedeći med
- vrcani med
- prešani med
- filtrirani med

Neki od zahtjeva koji moraju biti ispunjeni kada se med stavlja na tržište ili upotrebljava u nekom drugom proizvodu, a koji je namijenjen za konzumaciju su da se ne smiju dodavati nikakvi sastojci, uključujući i prehrambene aditive, organske i anorganske sastojke koji su takvom proizvodu strani. Također, ne smije imati izmijenjenu kiselost, podvrgnuti se zagrijavanju koje potencijalno može dovesti do uništenja prirodnih enzima meda ili njihove inaktivacije (Pravilnik, 2015a).

Kao prirodan proizvod, med obiluje jednostavnim šećerima (fruktoza, glukoza), ali i drugim tvarima kao što su organske kiseline (glukonska kiselina te octena kiselina), enzimi (invertaza, glukooksidaza, fosfataza) kao indikatori svježine meda, aminokiselinama u niskim koncentracijama kao što je prolin, vitaminima (askorbinska kiselina, niacin, riboflavin) te raznim bioaktivnim komponentama i mineralnim tvarima (Grigoryan, 2016).

Ono što je specifično za med jest činjenica da boja meda može varirati od bezbojne ili svijetlo žute do tamnosmeđe, a okarakterizirana je kao posljedica mineralnog sastava i boje peluda kao i temperature na kojoj se proizvod skladišti. Tako su za intenzitet boje najzaslužniji pigmenti kao što su karotenoidi i flavonoidi, koji također imaju antioksidativna svojstva te pozitivan utjecaj na zdravlje. Tamniji medovi imaju značajno veće količine mineralnih tvari – kalcija, bakra te željeza, mangana i drugih (Grigoryan, 2016).

Fizikalno-kemijske karakteristike meda utječu na strukturu i viskozitet meda pa tako on može biti tekuće ili viskozne konzistencije te djelomično ili potpuno kristaliziran (Pravilnik, 2015a).

2.1.2. Mikroorganizmi meda

Prisutnost mikroorganizama u svim kategorijama prehrambenih proizvoda predstavlja potencijalnu opasnost za sigurnost potrošača, pa tako i u medu. Nadalje, mnoga istraživanja kako su naveli Al-Waili i suradnici (2012) dokazali su prisutnost bakterija, plijesni te kvasaca koji različitim putevima mogu dospjeti u med, bilo putem pčela, nektara ili neki eksternih izvora. Također, čovjek kao i oprema koja se koristi u pčelarstvu, vjetar i prašina potencijalno su mikrobiološki kontaminanti.

Probavni sustav pčela potencijalno je najveći izvor mikrobne kontaminacije obzirom da sadrži 1 % kvasaca, 27 % Gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus*, *Clostridium spp*) te 70 % Gram-negativnih bakterija (*Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*). Bez obzira na moguću mikrobnu kontaminaciju meda, te iste bakterije nemaju mogućnost rasta ili reprodukcije zbog niske vrijednosti a_w (aktivitet vode) koji sprječava preživljavanje bakterija i medu daje antimikrobna svojstva (Al-Waili i sur., 2012).

Već stoljećima, medonosne pčele pripitomljene su na život u umjetnim košnicama koje koriste za proizvodnju meda. Poznato je oko 20000 vrsta pčela koje veličinom variraju od 2 mm do 4 cm. Kao i svaki živući organizam, i pčele su izložene bolestima i štetočinama, a med kao proizvod okolišnoj kontaminaciji pesticidima, teškim metalima, bakterijama i radioaktivnim metalima (Reybroeck i sur., 2012), a koja se javlja kao posljedica industrijalizacije te intenzivne poljoprivrede. Tako se medonosne pčele smatraju biološkim indikatorima jer su njihova smrtnost i rezidue ksenobiotika pronađenih u njihovim proizvodima tijekom laboratorijskih analiza dobar sustav monitoringa (Barganska i sur., 2011).

2.1.3. Zakonska regulativa

Med je prehrambeni proizvod koji je otporan na mikrobiološki rast, ne zahtjeva hlađenje te ima dugi rok trajanja. Obzirom na navedeno, smatra se sigurnim proizvodom za konzumaciju, ali mora zadovoljiti zakonske propise od strane Europske unije kako bi se kod potrošača osigurao zdravstveno siguran proizvod, a ovo su neke od njih:

- Uredba br. 178/2002 Opći zakon o hrani
- Uredba br. 852/2004 o higijeni hrane
- Uredba br. 853/2004 o hrani životinjskog podrijetla
- Uredba br. 854/2004 pravila za službene kontrole proizvoda životinjskog porijekla
- Pravilnik br. 79/2008 o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla.

U službi osiguravanja zdravstvene ispravnosti hrane koriste se alati za provedbu analize rizika koje mogu primjeniti pčelari, institucije koje se ophode hranom kao i različite veterinarske službe i inspekcije. Jedan od najvažniji je HACCP (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Point*), odnosno proces analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka. Taj alat primijenjiv je od primarne proizvodnje do završne faze te se također koristi i u pčelarstvu (Pravilnik, 2015b).

2.2. ANTIBIOTICI

2.2.1. Povijest korištenja antibiotika

Prvo spominjanje antibiotika kao kemijskih supstanci poznato je već 1930-ih kada su u svijetu otkriveni sulfonamidi te benzipenicilin 1940-ih što je dovelo do velike revolucije u medicini i pridonijelo smanjenju poremećaja i smrtnosti uzrokovanih infektivnim bolestima.

Danas, međutim, antibiotici se koriste u različite svrhe. Neki od njih su svoju primjenjivost pronašli kod životinja kako bi se prevenirale, tretirale ili zaustavile bolesti koje u krajnosti mogu doći i do čovjeka a koje se, nažalost ni uz najbolje agrotehnoške mjere ne mogu zaustaviti. Povijesno gledano, nisu svi antibiotici bili korišteni samo u terapijske svrhe. Štoviše, koristile su se kao jedna od metoda kojom se omogućio brži i veći rast kod životinja u kraće vremensko razdoblje. Takav pristup je od velike važnosti prehrambenoj industriji kojom se omogućava veća produktivnost te se pridnosi ekonomiji proizvođača. No, u cijelom spektru mogućeg korištenja antibiotika, ipak postoje određeni zakonski propisi koji ograničavaju/zabranjuju korištenje pojedinih klasa antibiotika primarno zbog sve veće svjetske zabrinutosti oko rezistencije antibiotika koji se koriste u ljudskoj medicini, a posljedica su pretjeranog korištenja antibiotika u poljoprivredi (Greenlees i sur., 2012).

Slijedeći znanstvenu literaturu pojam antibiotik se odnosi na supstance koje su produkti metabolizma mikroorganizama koji već u malim koncentracijama imaju mogućnost ubiti ili inhibirati rast nekog drugog mikroorganizma, ali također izazvati malu, ako ne i nikakvu štetu domaćina, te nemaju sposobnost uništenja virusa (Reeves, 2012).

Posljedica korištenja antibiotika kod životinja namijenjenih za ljudsku konzumaciju su rezidue navedenih supstanci u hrani. Nakon tretiranja životinja, antibiotici dospijevaju u organske sustave te uzrokuju oštećenja ili u prevelikim dozama čak i smrtnost. Mjesto najvećeg nakupljanja rezidua su najčešće bubrezi te jetra.

Međutim, nije to jedina posljedica korištenja antibiotika, također neke od posljedica su poremećaj matične mikroflore u ljudskom gastrointestinalnom sustavu. Jedna od najvećih zabrinutosti čovjeka je, da će u narednim godinama zasad bezazlene bakterijske infekcije biti

gotovo nemoguće liječiti jer će se zbog dugotrajne izloženosti lijeku (antibiotiku) stvoriti rezistenciju na pojedini antibiotik (Greenlees i sur., 2012).

2.2.2. Osnovna svojstva antibiotika

Antibiotici su produkti mikrobnog metabolizma te mogu biti dobiveni prirodnim putem- mikrobnom sintezom, međutim sve veći naglasak zadnjih nekoliko godina je na sintetsku odnosno kemijsku modifikaciju mikrobnom biosintezom antibiotika. Osnovna klasifikacija antibiotika je prema kemijskoj strukturi kod koje već i najmanje promjene mogu promijeniti aktivnost lijeka ili dovesti do njegovog gubitka; prema mikroorganizmu producentu, načinu djelovanja te metaboličkom putu biosinteze (Šušković, 2007).

Osnovne skupine antibiotika:

- β -laktamski antibiotici (penicilini; cefalosporini) za tretiranje bakterijske infekcije, najčešće u stoke
- aminoglikozidi (neomycin, streptomycin, neomicin, gentamicin) - efikasnost u liječenju humanih i animalnih bolesti
- makrolidi (eritromicin, spiramicin, tilozin) u veterinarske svrhe za liječenje respiratornih bolesti
- peptidni antibiotici (efrotomcin, cink-bacitiracin) liječenje urinarnih infekcija
- tetraciklini (tetraciklin, klortetraciklin, oksitetraciklin, doksiciklin) antibiotici širokog spektra djelovanja
- kinoloni (sarafloksacin, difloksacin) – antibiotici širokog spektra djelovanja koji su ujedno sintetički agensi u upotrebi u akvakulturi i stočarstvu (Kos, 2018).

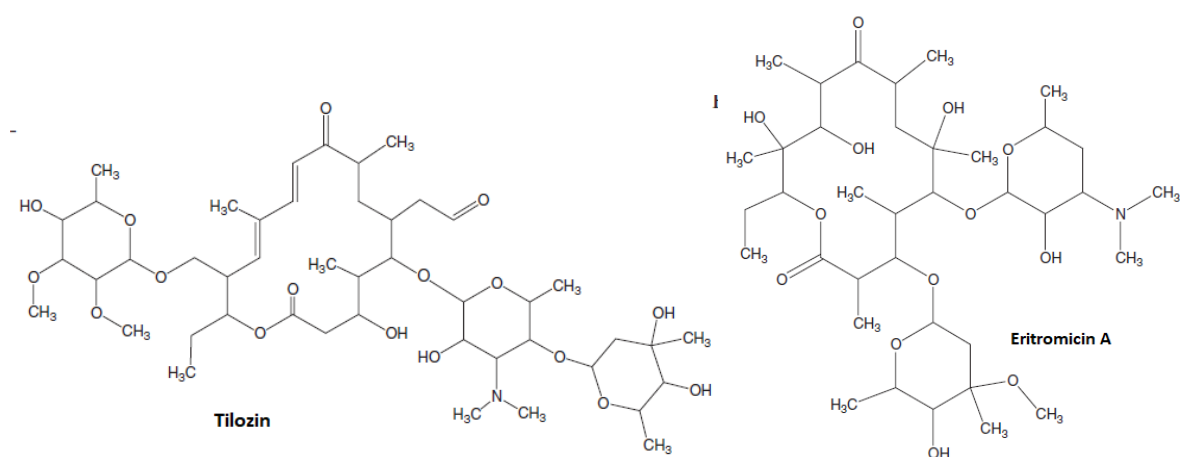
U svrhu razumijevanja mehanizma ispoljavanja efekta antibiotika koriste se tzv. modeli aktivnosti antibiotika. Oni omogućavaju lakše pronalaženje novih antibiotika ili njihovu modifikaciju i određuju kriterije kojima se antibiotik klasificira kao efikasan protiv bakterija. Ključno je da se koristi antibiotik koji djeluje ciljano na stanicu, da bude prisutan u određenoj količini te se ne smije inaktivirati ili modificirati.

Mehanizmi djelovanja antibiotika u stanici mikroorganizma dijele se u nekoliko kategorija:

- inhibicija biosinteze stanične stijenke koja dovodi do nemogućnosti stvaranja peptidoglikaskog sloja stanične stijenke te posljedično dovodi do lize stanice
- inhibicija biosinteze proteina koja je posljedica nemogućnosti očitavanja aminokiselina, a uzrok su antibiotici širokog spektra djelovanja (tetraciklini koji se vežu na 30S podjedinicu ribosoma ili makrolidi vežući se na 50S ribosomsku podjedinicu)
- inhibitori funkcije DNA - posljedično dovode do nemogućnosti sinteze nukleozida, DNA replikacije te transkripcije mRNA
- antibiotici koji imaju mogućnost vezanja na citoplazmatsku membranu kao prvu aktivnu liniju ovisno radi li se o Gram-pozitivnim ili Gram-negativnim bakterijama, onemogućavajući osmozu te kontrolirani prolaz otopljenih molekula
- inhibicija metaboličke sinteze na primjeru nemogućnosti sinteze folata kao kofaktora u biosintezi nukleotida (građevnih jedinica DNA i RNA) jer su neki koraci blokirani zbog vezanja sulfonamida (Džidić i sur., 2008).

2.2.2.1. Makrolidi

Makrolidni antibiotici klinički su široko zastupljeni te djelotvorni u liječenju kroničnih upalnih bolesti respiratornog sustava (cistična fibroza, brodifuzni panbronhiolitis), ali se koriste i kao stimulansi rasta kod životinja gdje se jako brzo raspršuju u tkivima kao što su jetra, bubrezi (Eraković Haber, 2011).



Slika 1. Strukturne formule za dva predstavnika skupine makrolida - tilozina i eritomicina A (Reeves, 2012)

Sekundarni metaboliti izolirani iz metabolizma gljiva i njihovih polusintetskih derivata. Osnova njihove strukture je laktonski prsten koji se sastoji od 12 do 16 ugljikovih atoma. Prsteni koji sadrže 12 atoma nemaju funkciju u kliničkim svrhama (Reeves, 2012).

Iz skupine makrolida najčešće se kao antibiotici koriste eritromicin, roksitromicin, azitromicin i klaritromicin, kod životinja također i tilozin. Glavna mjesta nakupljanja makrolidnih antibiotika su fagocitne stanice koje su urođena obrana organizma te djelovanje antibiotika modulira imunološki odgovor na mjestu infekcije (Eraković Haber, 2011).

Antimikrobna aktivnost makrolida očituje se u inhibiciji sinteze proteina tako što se reverzibilno vežu za 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma te onemogućuju reakcije koje provodi peptidil-transferaza te posljedično rast stanice. Primjenjive su kod aerobnih i anaerobnih Gram-pozitivnih bakterija, Gram-negativnih koka te protiv rodova bakterija kao što su *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Bordetella*, *Pasteurella*, *Campylobacter* i *Helicobacter* (Reeves, 2012).

Makrolidna skupina antibiotika pokazala se kao dobra alternativa penicilinu kod osoba koje su alergične na penicilin, a kod kojih je potrebno provesti liječenje infektivnih bolesti. Njihova aktivnost najizraženija je pri većim pH vrijednostima (pH 7,8 – 8,0), nisu stabilni pri kiselim uvjetima te da u tim slučajevima dolazi do njihove degradacije (Skinner i sur., 1993).

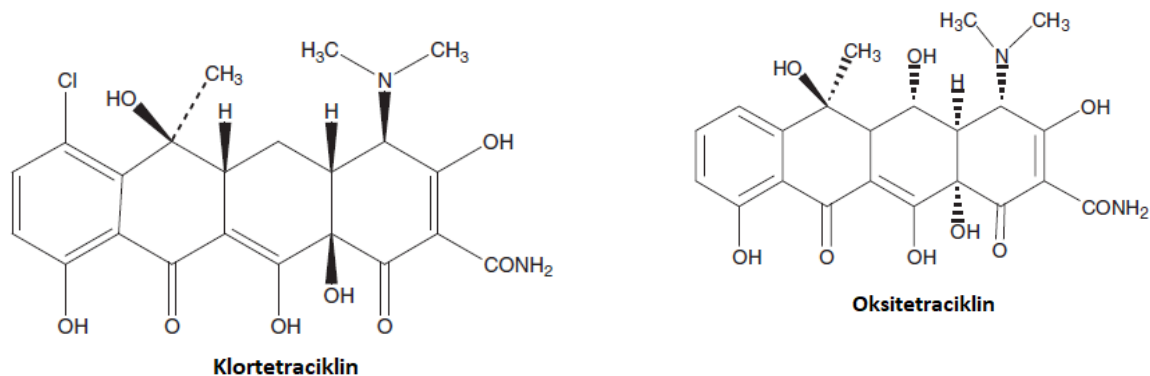
Makrolidne molekule su bazične (lužnate) te lipofilne, odnosno djelomično topljive u vodi, ali su izrazito topljive u organskim otapalima. Pritom se za ekstrakciju makrolida koriste neutralni ili djelomično bazični uvjeti kako bi se izbjegla njihova degradacija (Reeves, 2012).

2.2.2.2. *Tetraciklini*

Tetraciklini su antibiotici koji pripadaju skupini poliketidnih antibiotika, njih više od 30, a koji imaju zajedničku osnovnu kemijsku strukturu (Makovec i sur., 2014). To su antibiotici izolirani su iz roda *Streptomyces*, širokog su spektra djelovanja te relativno niske toksičnosti, a djelotovorni su protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, klamidije, mikoplazme, protozoalnih parazita (Chopra i Roberts, 2001).

Još od vremena njihovog otkrića, klorotetraciklini i oksitetraciklini, kao najčešći predstavnici ove skupine korišteni su u kliničke svrhe u humanoj i veterinarskoj medicini. Godinama kasnije, počela je sve veća primjena polusintetičkih tetraciklina – doksiciklin, minociklin te drugih derivata. Tetraciklinska aktivnost, slično kao i kod makrolidnih antibiotika uzrokuje inhibiciju sinteze proteina vežući se reverzibilno na 30S podjedinicu ribosoma. Interakcija molekule antibiotika s ribosomom, onemogućava da se amino-acil tRNA veže na akceptorskog mjesto na ribosomu (Indrani i Bandyopadhyay, 2020).

Ove amfoterične molekule imaju mogućnost tvoriti soli u reakciji sa bazom ili kiselinom, a zbog toga što su relativno jeftini, najčešće su korištena antimikrobna sredstva kod preživača i svinja, međutim i za tretiranje američke gnjiloće medonosne pčele, iako je sve više primjera kako uzročnik ove bolesti *Paenibacillus larvae spp.* pokazuje sve veću rezistenciju primjeni tetraciklina. Osobita pozornost pri analizi daje se mogućnosti tvorbe kelata u reakcijama s metalnim ionima koji se vežu za sastojke matriksa te otežavaju ekstrakciju, a ona se najčešće provodi pri pH 4,0 (Stolker i Danaher, 2012).



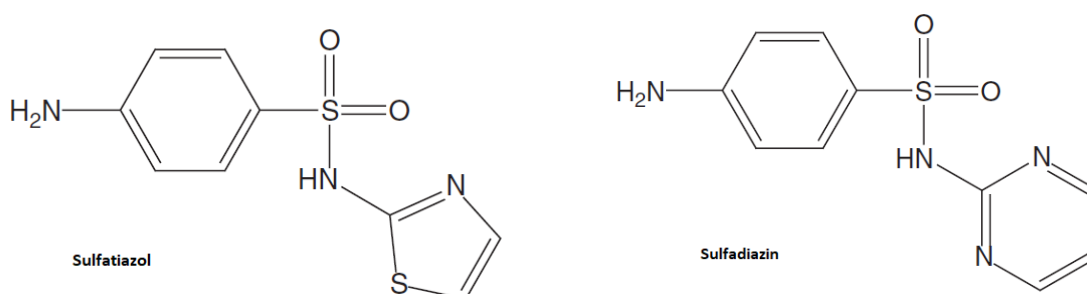
Slika 2. Strukturne formule za dva predstavnika skupine tetraciklina - klortetraciklin i oksitetraciklin (Reeves, 2012)

2.2.2.3. Sulfonamidi

Sulfonamidi su prvi korišteni kemoterapeutici koji su pokazali efikasnost u liječenju bakterijskih infekcija kod ljudi, a preteča, sulfanilamid otkriven je 1906. godine pri istraživanju azo bojila, iako se do 1930. službeno kliničkim ispitivanjem nije otkrio. Ova skupina antibiotika sastoji se od velikog broja antibakterijskih lijekova, uključujući sulfadiazine, sulfametazine, sulfatiazole i mnoge druge. Tek manji broj antibiotika iz skupine sulfonamida, dopušten je za korištenje u proizvodnji hrane od 2011. godine. Razlog tomu je zabrinutost zbog

moćnog toksikološkog efekta i manjka podataka koji pokazuju povijesni razvoj i korištenje sulfonamida. Antibiotici koji se koriste još od 1960-ih godina primjenjivi su u akvakulturi i stočarstvu. Izrazito su "popularni" zbog svoje niske nabavne cijene te širokog spektra njihove primjene (Wang i sur., 2006).

Te molekule su strukturni analozi para-aminobenzojeve kiseline (PABA) i uzrokuju inhibiciju dihidropteroat sintetaze, enzima koji katalizira sintezu folne kiseline. Za neke vrste sulfonamida utvrđeno je da se ponašaju kao bakteriostatici. Također, efikasnost pokazuju prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, klamidiji, vrstama aktinomiceta, nekim protozoama te toksoplazmozama.



Slika 3. Strukturne formule za dva predstavnika skupine sulfonamida - sulfatiazol i sulfadiazin (Economou i sur., 2012)

Uspoređujući s ostalim grupama antibiotika, znanstvenim istraživanjima zaključeno je da su sulfonamidi najčešće korišteni antibiotici u veterinarskoj medicini. Osim što se koriste za tretiranje akutnih sistemskih ili lokalnih infekcija (mastitis, respiratorne infekcije i dr.), također se koriste za tretiranje američke i europske pčelinje gnjiloće uzrokovane već spomenutom *Paenibacillus larvae* plijesni (Sheridan i sur., 2008). Unazad 10 do 15 godina korišteni su za tretiranje nametnika *Varroa destructor*, uzročnika varoe kod medonosnih pčela (Barganska i sur., 2011).

Sulfonamidni antibiotici su najefikasniji u ranim fazama akutnih infekcija kada dolazi do brzog umnožavanja. Koriste se u obliku aditiva u stočnoj hrani i vodi za piće te kao oralni pripravci. Također, ovi se antibiotici mogu aplicirati u pčelinje košnice u kombinaciji sa šećerom u prahu ili sirupom kao hrana za pčele, gdje se u obzir mora uzeti netopljivost sulfonamida (Reeves

2012). Obzirom da sulfonamidi imaju tendenciju vezanja sa šećerima iz meda te formiraju N-glikozidne veze, prije same detekcije na instrumentima obavezno je provesti hidrolizu jakim kiselinama kako se ne bi dobili krivi rezultati analize (Reybroeck, 2017).

2.2.3. Antibiotici u pčelarstvu, medu i proizvodima od meda

Antibiotici mogu biti pronađeni u medu jer se u pčelarstvu koriste za tretiranje bakterijskih bolesti, a najčešći izvori su okoliš ili nepravilna poljoprivredna (pčelarska) praksa kako su u svom radu opisali Chiesa i suradnici (2018). Prve godine primjenjivosti antibiotika u pčelarstvu sežu još iz 1940-ih. Tada su se sulfonamidi, tetraciklini, nitrofurani te makrolidi koristili u poljoprivredi kako bi spriječili bolesti kod kultiviranih biljaka te su ih pčelari koristili kako bi zaustavili širenje bolesti u medonosnih pčela (Barganska i sur., 2011).

Antimikrobne rezidue u medu nisu uvijek posljedica veterinarskog korištenja antibiotika koje pčelar primijenjuje. Kontaminacija meda može biti i posljedica takozvane "krađe" meda među pčelinjim zajednicama pa tako medonosne pčele postaju neposredni prenosioci antibiotika ili skupljanjem nektara na livadama koje su tretirane herbicidima koji sadržava sulfanilamid. Do prijenosa antibiotika može doći i zbog površinske vode koja je kontaminirana antibiotikom (najčešće sulfonamidi) ili miješanjem privatno proizvedenog meda s drugim medom upitne kvalitete (Reybroeck, 2017).

Među najbitnijim bolestima pčela ubraja se američka i europska pčelinja gnjiloća kao posljedica *Paenibacillus (Bacillus) larvae* i *Streptococcus pluton* bakterija, a u svrhu njihove prevencije koriste se oksitetraciklini i kloramfenikol kao pa se može reći kako antibiotici u ovom slučaju imaju profilaktička svojstva, iako se sve više utvrđuje da bakterije pokazuju rezistenciju prema oksitetraciklinu (Al-Waili i sur., 2012).

Također, istraživanje koje su proveli 2009. godine Baggio i suradnici utvrđuje da iako je korištenje antibiotika postala učestala praksa u tretiranju pčelinjih zajednica, antibakterijske supstance samo su efikasne u uništenju vegetativnih vrsta bakterija dok su za spore jedini infektivni oblik kojima se zaraza prenosi. Gledajući to na primjeru američke pčelinje gnjiloće, antibiotici (tetraciklini) su zaustavili replikaciju bakterije, ali simptomi bolesti su se ponovno pojavili nakon prestanka tretiranja antibioticima (Ratnieks, 1992). To je sve dovelo do

nekontrolirane upotrebe antibiotika u pčelarstvu kako bi se prevenirala pojava bolesti i njenih simptoma, ali i dovelo do povećane rezistencije bakterija prema tim skupinama antibiotika.

Pri analizama antibiotika u medu, dokazano je da su antibiotici prisutni u visokim koncentracijama koje se izražavaju u mg kg^{-1} rezidua u medu, a posljedica su dugotrajne prakse korištenja antibiotika kao promotora rasta. Najveće koncentracije supstanci utvrđene su tjedan dana nakon korištenja antibiotika (Reybroeck i sur., 2012). Nakon tog razdoblja utvrđeno je da se koncentracija smanjuje što se može pripisati nekom od sljedećih faktora: razrjeđenje u ostaloj količini meda, pčelinjom konzumacijom kontaminiranog meda, te kod antibiotika kao što su oksitetraciklini, tilozin, dolazi do degradacije primarnog metabolita. Ogroman problem predstavlja i nemogućnost pčele da metabolizira bilo koji antibiotik, pa se tako antibiotik može naći u medu i godinu dana nakon što se aplicirao na pčelinju zajednicu (Reybroeck i sur., 2012).

Iako se na razini Europske unije koristi Uredba br. 37/2010 koja propisuje količine veterinarskih lijekova koje mogu biti prisutne u matriksima koji se koriste kao hrana, za med nisu propisane NDK vrijednosti, što bi teoretski značilo da antibiotici nisu dopušteni u pčelarstvu na razini Europske unije. Međutim, anti-infektivni agensi mogu biti korišteni na razini EU na temelju kaskadnog sistema koja je opisana u Uredbi br. 82/2001 Europskog parlamenta, opisujući kako veterinarski lijekovi moraju proći karenca - razdoblje od posljednjeg korištenja antibiotika i vrcanja meda. Obzirom na nultu toleranciju za antimikrobne rezidue u medu, a nije definirano razdoblje eliminacije rezidua kao rezultat farmakokinetike, kaskadni sustav u ovom slučaju nije primjenjiv (Reybroeck, 2017).

Neke zemlje Europske unije (Švicarska, Belgija, Ujedinjeno Kraljevstvo) su pak, zbog nepostojanja definiranih NDK vrijednosti, uspostavile granične koncentracije na temelju legislative države, odnosno razina antibiotika u medu iznad koje se uzorak smatra nezadovoljavajuć, a kreće se između $0,01$ i $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ za svaku grupu antibiotika (Al-Waili i sur., 2012).

2.2.4. Antibiotička rezistencija i utjecaj na zdravlje

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) definirala je antibiotsku rezistenciju kao "jedno od tri najveće prijetnje za ljudsko zdravlje". Izloženost

antibioticima je sve veća, bilo da je to kroz lijekove za tretiranje bolesti u ljudi i životinja, u poljoprivredi ili za čuvanje hrane.

Antibiotiska rezistencija je jedna od evolucijskih značajki obzirom da svi organizmi razvijaju određene genetičke mutacije kako bi izbjegli letalne uvjete kojima su izloženi. Upravo zbog tog razloga što su antibiotici korišteni protiv njih, bakterije će i u budućnosti razvijati rezistentne mehanizme kako bi se obranili. Tomu je važno pridodati kako je više od 70 % patogenih bakterija rezistentno na barem jedan antibiotik (Watkins i Bonomo, 2016).

U radu Watkins i Bonomo (2016) također se navode brojni faktori koji potiču antibiotiku rezistenciju koji mogu biti posljedica velike gustoće bakterijske populacije u zdravstvenim ustanovama, gdje se događa brzi prijenos među ljudskom populacijom, povećani broj imunokompromitiranih pacijenata u populaciji, povećano korištenje antibiotika u poljoprivredi, globalna putovanja i turizam, loša higijena i kontaminirana voda koji povećavaju širenje rezistentnih bakterija u kanalizacijskim sistemima, pretjerano propisivanje antibiotika u humanoj medicini, pogotovo onih koji su širokog spektra djelovanja te nedostatak odobrenih cjepiva za patogene koji su rezistentni.

Poznato je da se antibiotici koji se koriste kod životinja, bitno ne razlikuju od onih koji se koriste kod (Al-Waili i sur., 2012). Štoviše, prisutstvo određenih rezidua antibiotika može imati niz negativnih posljedica obzirom da većina njih ima jaki toksični efekt (kloramfenikol može biti uzrokom aplastične anemije) nitrofurani su karcenogeni ili mutageni, fumagilin je klastrogeničan i citotoksičan i može uzrokovati alergijske reakcije kao i inhibirati rast kosti (Reybroeck, 2012).

Iako se zasad korištenje antibiotika ne smatra sociološkim problemom, ono što je stvarni problem, jest utjecaj na okoliš. Određena okolišna okruženja (komunalne otpadne vode, otpadne tekućine iz farmaceutskih kompanija, poljoprivredni otpad) sadrže ogromne koncentracije bakterija kao i terapijskih antibiotika, pri čemu se ta ista količina pohranjuje u okolišu, a s njima i rezistentne bakterije.

U pitanje se dovela i uporaba antibiotika u poljoprivredi, kao jednoj od grana gospodarstva gdje je zabilježen sve veći porast korištenja antibiotika. Za primjer se mogu uzeti Sjedinjene Amričke Države, gdje je upotreba antibiotika 13 milijuna kilograma godišnje u poljoprivredi,

što je 80 % sveopće upotrebe antibiotika. Chang i suradnici (2015) objasnili su kako antibiotska rezistencija može imati posljedice za zdravlje kroz tri mehanizma. Čovjek može biti zaražen rezistentnim patogenom u kontaktu sa stokom ili uzimanjem hrane ili vode koja je već kontaminirana bakterijama. U organizmu čovjeka dolazi do kolonizacije rezistentnim bakterijama koje onda jednostavno mogu prijeći i na drugu osobu. Rezistentni geni u poljoprivredni se mogu na čovjeka prenjeti tzv. horizontalnim prijenosom gena, koji rezultira rezistentnim sojevima koji se ne mogu tretirati antibioticima. Upravo iz tog razloga, Europska unija je zabranila korištenje svih neterapeutskih antibiotika u životinja još 2006. godine dok je Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 2012. godine izdao preporuku poljoprivrednicima i stočarima da se smanji upotreba antibiotika u njihovim praksama (Watkins i Bonomo, 2016).

2.3. METODE DETEKCIJE ANTIBIOTIKA

Obzirom na sve veću raširenost zaostataka antibiotika u hrani koja se svakodnevno konzumira, te na stroge pravilnike koje je potrebno primjenjivati kako bi se osigurala zdravstveno ispravna hrana, došlo je do razvoja brojnih analitičkih metoda, a mogu se podijeliti u osnovne kategorije:

- Orijehtacijske (engl. *screening*) metode koje se primarno koriste kao semi-kvalitativne metode tako što definiraju postoji li ili ne određeni analit u uzorku (mikrobiološke metode, imunoafinitetni testovi)
- Potvrđne (engl. *confirmatory*) metode koje su selektivne, precizne i služe za određivanje točne koncentracije analita u uzorku (metode tekućinske kromatografije s različitim detektorima)

2.3.1. Orijehtacijske (engl. *screening*) metode

Ove vrlo raširene metode za određivanje rezidua antibiotika u hrani koriste se već više od 10 godina upravo zbog svoje jednostavnosti, ne zahtjevaju skupu opremu, kratkog vremena provedbe analize, visoke ponovljivosti. Analitički laboratoriji koji provode analize velikog broja različitih antibiotika, prvo koriste orijehtacijske metode kako bi utvrdili postoji li određeni antibiotik u uzorku, a za uzorke za koje se utvrdi da su pozitivni, nakon toga analiziraju potvrđnim metodama (Barganska i sur., 2011).

Ove metode je također moguće podijeliti u tri osnovne skupine:

1. Mikrobiološki testovi - temelje se na specifičnoj reakciji između bakterije i antibiotika prisutnog u uzorku. Vrlo su jeftini i jednostavni te se sve više koriste kao komercijalni mikrobiološki testovi.
2. Imunološki testovi - visoke specifičnosti, selektivnosti, jednostavnosti koji se temelje na reakciji antigena i antitijela a najpoznatiji je ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).
3. Biosenzori - analitički uređaji koji se sastoje od osjetljivog biološkog elementa, bioreceptora, sonde ili elementa za detekciju i uređaja za čitanje elektronskih signala (Butorac i sur., 2013).

2.3.2. Potvrdne metode

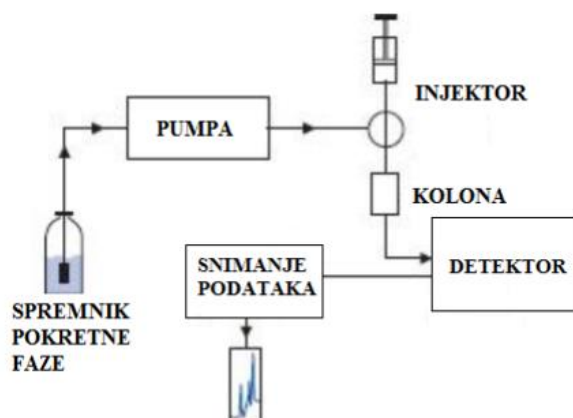
Sukladno Odluci komisije (EU) br. 657/2002, potvrdne metode se koriste za pouzdano utvrđivanje točne koncentracije analita u uzorcima farmaceutskih proizvoda uključujući antibiotike te pesticida. Tim metodama se kod organskih spojeva dolazi se do informacija o kemijskoj strukturi analita, a smatra se i kako potvrdne metode najučinkovitije kada se koriste kombinacije kromatografije i spektrometrije. Prednosti ovakvih metoda su brojne, prvenstveno jer analize obuhvaćaju detekciju i do nekoliko stotina analita, ali su optimizirani i za individualno određivanje pojedinih klasa ili spojeva. Sa razvojem metoda i njihovom implementacijom, moderna analitička kemija dobila je novo značenje jer omogućavaju kvantifikaciju, konfirmaciju (potvrdu) i identifikaciju rezidua antibiotika u hrani jer se odlikuju visokom specifičnošću i osjetljivošću prema analitu (Spörri i sur., 2014).

2.3.2.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) je separacijska tehnika kojom se razdvajaju tvari na temelju razdiobe između dvije faze: nepokretne (stacionarne) faze te pokretne (mobilne) faze. Sukladno tome, tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom zbog razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi među fazama ili veličine tvari te se različitih retencijskih vremenom zadržavaju na kromatografskoj koloni (Cindrić i sur., 2009).

Najčešće korištena separacijska tehnika je kromatografija obrnutih faza gdje se kao pokretna faza koristi polarno otapalo (npr. voda, acetonitril, metanol), a nepokretna faza sadrži nepolarno otapalo, najčešće silikagel C₈ ili C₁₈ (Butorac i sur., 2013).

Osnova svakog kromatografskog sustava su spremnici mobilne faze, crpke, sustavi za unošenje uzoraka (injektori), predkolone i kolone, detektori te uređaji za snimanje i integriranje.



Slika 4. Shematski prikaz kromatografskog sustava (preuzeto od Beganović, 2015)

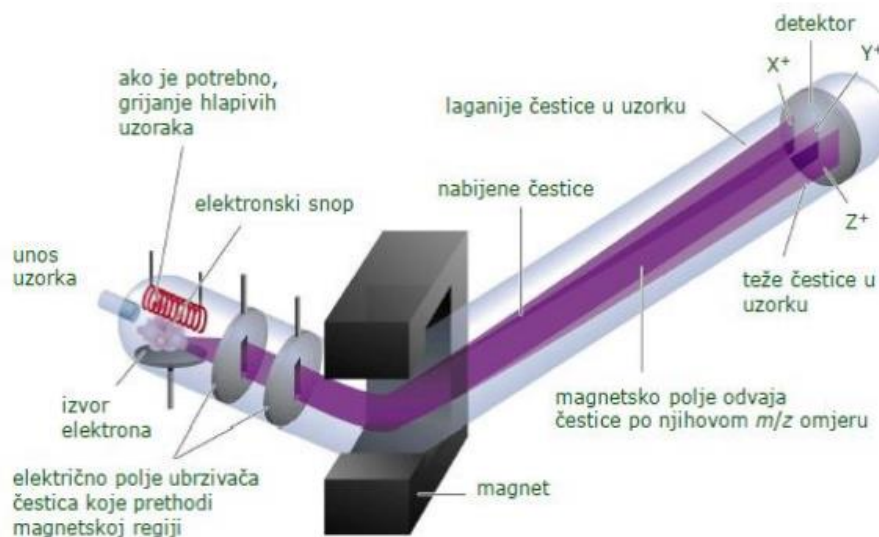
2.3.2.2. Spektrometrija masa

Spektrometrijom masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) razdvajaju se ioni u plinskoj fazi pod visokim vakuumom pod utjecajem električnog ili magnetskog polja, a razdvojeni ioni se detektiraju prema omjeru mase i naboja (m/z). Ovom analitičkom metodom omogućava se kvantifikacija (količina analita u uzorku), određivanje izotopskog sastava uzorka, određivanje strukture molekula te određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava. Višestruko primjenjiva je tehnika koja se koristi za određivanje gotovo svih antibiotika u hrani. Osnovni princip masene spektrometrije je ionizacija (stvaranje molekularnih iona), analiza (razdvajanje molekularnih iona prema omjeru m/z) te detekcija (mjerenje količine molekularnih iona za svaki omjer m/z).

Nakon prolaska kroz analizator dobiva se spektar masa koji uključuje sve ionizirane mase pojedinih sastojaka u nekom uzorku (Butorac i sur., 2013). Najviše korištene spektrometrijske tehnike su:

- Elektrospej ionizacija (engl. *Electron Spray Ionization*, ESI)
- Ionizacija brzim atomima i ionima (engl. *Fast Ion Bombardment*, FAB /FIB)

- Kemijska ionizacija uz atmosferski tlak (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI)
- Matriksom potpomognuta laserska ionizacija i desorpcija (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI)



Slika 5. Princip rada masenog spektrometra (Pleadin, 2018)

Najbitniji element svake spektrometrijske tehnike je analizator. Upravo taj segment u spektrometru masa omogućava da se ioni radvajaju na temelju različitog omjera mase i naboja, pri čemu različiti analizatori zahtjevaju i različite ionizacijske izvore te različite detektore iona (Cindrić i sur., 2009).

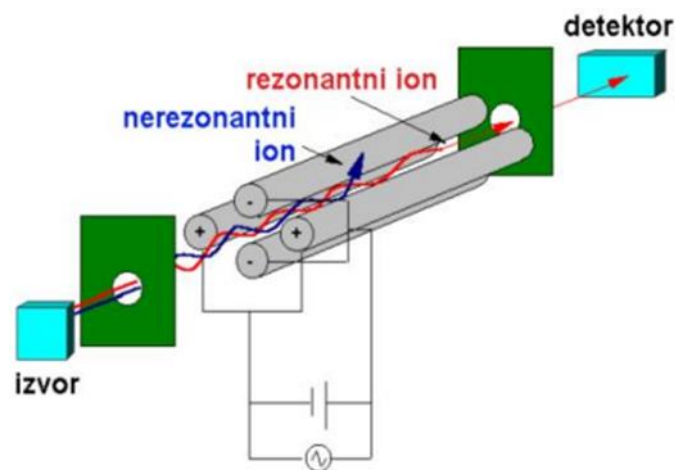
Današnji instrumenti koji se koriste u razdvajanju iona mogu se podijeliti na:

- Magnetski analizator
- Električni ionizator
- Analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF)
- Ion ciklotronska rezonancija
- Kvadrupolni analizator

Među nabrojenim analizatorima, najveću primjenjivost obzirom na jednostavnost imaju TOF i kvadrupolni analizator.

Analizator vremena leta (TOF) koristi električno polje te omogućuje da plinovita faza kroz tunel prođe do detektora, a separacija iona se provodi u odnosu na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima. Osnovni princip je po pravilu da brzina iona ovisi o masi iona te svi ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu, a koja je pritom ovisna o njihovoj masi, pa tako manji ioni imaju veću, dok veći ioni imaju manju brzinu. TOF analizatori imaju veliku osjetljivost, točnost i visoku rezoluciju. Izvršni su u toksikološkom “screeningu”, ali nisu pouzdani u kvantifikaciji pa se preferiraju druge metode te se često hibridiziraju s kvadrupolnim analizatorima, što im daje bolju mogućnost u MS/MS metodama (Lynch, 2017).

Kvadrupolni analizator je u odnosu na prethodno navedeni jeftiniji i brži te kvadrupol masa ne treba vrlo nizak tlak (vrlo visoki vakuum) koji je preduvjet za razdvajanje iona. Ovaj najzastupljeniji analizator sastoji se od četiri elektrode (dvije pozitivne i dvije negativne) među kojima se razdvajaju ioni, a pri čemu se stvara oscilirajuće magnetsko polje. Ioni koji nastaju u ionizacijskoj komori, dovode se u evakuirani prostor između štapića te samo oni ioni koji imaju određeni omjer m/z tijekom prolaska kroz električno polje rezoniraju s kvadrupolnom frekvencijom. Time se svi ostali ioni koji se nalaze izvan rezonacije te nemaju stabilnu putanju, ne usmjeravaju prema detektoru (Pine, 1994).



Slika 6. Kvadrupolni analizator masa (Pleadin, 2018)

2.3.2.3. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)

Analitička višenamjenska separacijska tehnika koja prednjači u analizi veterinarskih rezidua u hrani, a postiže se kombinacijom kromatografije kao separacijske tehnike te spektrometrije

koja potom omogućava analizu stotina kompleksnih spojeva u vrlo kratkom vremenu. Upravo ta kombinacija omogućava najbolje odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju brojnih analita istovremeno (Spörri i sur., 2014), a sve na temelju mehanizama desorpcije, otparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi, ionizaciji pri atmosferskom tlaku. U radu autora Cindrić i suradnika (2009) ističe se kako je time unaprijeđena separacija te poboljšana fragmentacija pri čemu je moguće kvalitetnije odrediti strukturu analiziranog iona.

Spajanje dvaju spektrometra masa (MS/MS), u prvom spektrometru (koji je konstruiran tako da ne nastupa fragmentacija sastojaka) smjesa se naprije razdvoji na sastavne spojeve prema molekulskoj masi. Nakon toga, dolazi do uvođenja pojedinačnih sastojaka u drugi spektrometar u kojem se cijepaju sastojci, a fragmenti se analiziraju (Pine, 1994).

Pritom, MS/MS spektrometri masa imaju tri skupine analizatora, od kojih se u analizama kvantifikacije rezidua antibiotika najviše koriste trostruki kvadrupoli masa (engl. *triple quadrupole*, QQQ) zbog svoje mogućnosti da generiraju podatke za kvantifikaciju s izrazitom osjetljivošću uređaja, reproducibilnošću i s optimalnim limitom detekcije (Cindrić i sur., 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U provedbi eksperimentalnog dijela korišten je uzorak cvjetnog meda (samo jedan proizvođač) koji ne sadrži analite određivane u analizi. Takav uzorak meda korišten je kao slijepi uzorak te za pripremu uzoraka koje je potrebno obogatiti internim i analitičkim standardima (M1-M3).

3.2. POPIS KORIŠTENE OPREME I KEMIČALIJA

3.2.1. Laboratorijska aparatura i pribor

- Tikvice različitih volumena (25 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL)
- Polipropilenske epruvete (15 mL)
- Konusne epruvete (50 mL)
- Precizna analitička vaga (preciznost $\pm 0,001$ g), Analytical Plus AP110, OHAUS
- Precizne analitičke pipete volumena od 10 μ L do 5 mL
- Centrifuga s max 4600 o min^{-1} i max 15000 o min^{-1} , Hettich Zentrifugen
- Sustav za otparavanje s dušikom, N-Evap Model 112 Orgamonation Associates Inc.
- Vorteks homogenizator, Vortex Model MS2 Mini Shaker, Ika
- Epruvete za ultracentrifugu (2 mL), Eppendorf
- Homogenizator, Ika
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex Model RK255H Bandelin Electronic
- Zamrzivač s najnižom temperaturom od -18 °C
- Digestor
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1 x 150 mm, Waters
- Predkolona: Acquity HSS T3 1,8 μm vanguard Pre-Col, Waters
- LC-Q-TOF: HPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity sa Time of flight TOF analizatorom Q-TOF G6550A
- LC-MS/MS: HPLC Agilent Technologies 1290 i Triple Quad LC/MS 6470

3.2.2. Kemikalije

- Ultračista voda MilliQ Advantage A10 sustav za pročišćavanje, Millipore
- Mravlja kiselina, 98-100 %, LC-MS čistoće, Fluka
- Metanol, LC-MS čistoće, Riedel De Haen
- Acetonitril LC-MS čistoće, Merck
- Amonijev acetat, Fluka
- Dimetilsulfoksid, Sigma-Aldrich
- Magnezijev sulfat u obliku soli *Polish pouch*, Agilent
- EMR-Lipid dSPE epruvete s mješavinom soli za QUECHERS pročišćavanje, Agilent

3.2.3. Standardi

- Enrofloksacin-D5, Toronto Research Chemicals (TRC)
- Sulfametazin-d4, Toronto Research Chemicals (TRC)
- Tetraciklin-d6, Toronto Research Chemicals (TRC)
- Linkomicin hidroklorid, Sigma
- Tilosin tartarat, Vetranal
- Erithromicin A dihidrati, Vetranal
- Sulfadiazin, Sigma
- Sulfadimetoksin, Vetranal
- Sulfamerazin, Sigma
- Sulfametoksazol, Vetranal
- Sulfatiazol, Vetranal
- Sulfametazin, Vetranal
- Tetraciklin hidroklorid, Vetranal

3.3. PRIPREMA MATERIJALA, OTAPALA I STANDARDNIH OTOPINA

Za analizu pripremljene su epruvete od 15 mL u koje je odvagano $2 \pm 0,05$ g ili $5 \pm 0,05$ g uzorka meda, ovisno o postupku pripreme.

Priprema otopina

- **Mobilna faza A:** 0,1 % mravlja kiselina (u tikvicu od 1000 mL s ultračistom vodom dodati 1 mL mravlje kiseline, nadopuniti do oznake ultračistom vodom). Valjanost mobilne faze A je 4 dana čuvanja na sobnoj temperaturi u zatamnjenom posuđu.
- **Mobilna faza B:** metanol, MeOH (LC-MS čistoće)
- **0,5 % mravlje kiseline u acetonitrilu:** u tikvicu od 100 mL pipetirati 500 μ L mravlje kiseline, nadopuniti acetonitriplom do oznake.
- **2,5 M amonijev acetat:** 4,8 g amonijevog acetata otopiti u 25 mL ultračiste vode
- **5 mM amonijevog acetata:** pipetirati 400 μ L 2,5 M amonijevog acetata u tikvicu od 200 mL i nadopuniti ultračistom vodom.

Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova

Bazne otopine su otopine pojedinih analita pripremljene iz certificiranog referentnog materijala, tj. primarnog standarda u praškastom obliku. Bazne otopine služe za pripremu otopine mješavine svih analita koje želimo analizirati. Otopina mješavine standarda potrebna je da bi se izradila matriks kalibracijska krivulja te kako bi se obogatili kontrolni uzorci. Sve otopine pripremljene su u odmjernom posuđu A klase. Bazne otopine standarda tetraciklina, makrolida i sulfonamida pripremaju se tako da se standardi pripremaju u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ odvagom 10 mg standarda u tikvicu od 10 mL. Standardi su otopljeni u metanolu na način da se otapalo doda u tikvicu do oznake.

Za skupinu antibiotika koji pripadaju makrolidima i tetraciklinima priprema se zasebna mješavina standarda S1 (S1-MAKR-TETRA) koncentracije 10 μ g mL⁻¹ na način da se pipetira 250 μ L bazne otopine (1000 μ g mL⁻¹) u tikvicu od 25 mL (razrijeđenje 100 puta). Mješavina standarda za sulfonamide S1-SULF koncentracije 10 μ g mL⁻¹ priprema se pipetiranjem 100 μ L svake pojedine bazne otopine u tikvicu od 10 mL.

Za pripremu radne otopine mješavine analita S2 (koncentracije $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) pipetira se $100 \mu\text{L}$ otopine S1-MAKR-TETRA i $100 \mu\text{L}$ otopine S1-SULF u tikvicu od 10 mL . Sva razrijeđenja provedena su metanolom nadopunjavanjem do oznake. Pripremljena S2 otopina čuva se u zamrzivaču do sljedećeg dana. Izvagani uzorci meda čuvaju se na sobnoj temperaturi. Način pripreme standardnih otopina prikazan je u tablicama 1-3.

Bazne otopine makrolida, tetraciklina te sulfonamida čuvaju se na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Rok trajanja baznih standardnih otopina različit je za pojedine grupe antibiotika. Tako je valjanost otopina analita makrolida do 6 mjeseci, izuzev eritromicina A kod kojeg je valjanost 3 mjeseca. Za korištene analite iz skupine tetraciklina valjanost otopina je 6 mjesecim dok kod svih sulfonamida te internog standarda korištenog u analizi (enrofloksacin-d6) valjanost je 1 godina.

Tablica 1. Priprema standardne radne otopine MIX S1-MAKR-TETRA

Analiti	Konc. BAZNE otopine MS. (ng mL^{-1})	Volumen BAZNE otopine (mL)	Ciljana koncentracija standardne mješavine MIX S1 (makrolidi, tetraciklini) (ng mL^{-1})	Volumen S1 tikvice (mL)
Tilozin	1000000	0,25	10000	25
Eritromicin A				
Linkomicin				
Klorotetraciklin				
Oksitetraciklin				
Tetraciklin				

Tablica 2. Priprema standardne radne otopine MIX S1-SULF

Analiti	Konc. BAZNE otopine MS. (ng mL^{-1})	Volumen BAZNE otopine (mL)	Ciljana koncentracija standardne mješavine MIX S1 (sulfonamidi) (ng mL^{-1})	Volumen S1 tikvice (mL)
Sulfadiazin	1000000	0,100	10000	10
Sulfadimetoksin				
Sulfamerazin				
Sulfametazin				
Sulfametoksazol				
Sulfatiazol				

Tablica 3. Priprema standardne radne otopine S2

	Koncentracija standardne mješavine MIX S1 (ng mL ⁻¹)	Volumen otopine MIX S1 (mL)	Ciljana koncentracija standardne mješavine MIX S2 (ng mL ⁻¹)	Volumen S2 tikvice (mL)
MIX S1 (makrolidi, tetraciklini)	10000	0,1	100	10
MIX S1 (sulfonamidi)	10000	0,1		

Priprema standardne kalibracijske krivulje na otapalu

Standardna kalibracijska krivulja koristi se za kontrolu linearnosti odziva instrumenta te kontrolu stabilnosti standardnih otopina. U tablici 4 je prikazan postupak za pripremu standardne kalibracijske krivulje na otapalu za med.

Tablica 4. Kalibracijska krivulja na otapalu

	Slijepa proba (µL)	L1 (µL)	L2 (µL)	L3 (µL)	L4 (µL)	L5 (µL)
H₂O	800	800	800	800	800	800
MeOH	200	140	125	100	75	50
INT STD	/	50	50	50	50	50
MIX S2	/	10	25	50	75	100

Priprema matriks kalibracijske krivulje

U svakoj analizi priprema se matriks kalibracijske krivulje obogaćivanjem na tri koncentracijske razine te se koristi najniža vrijednost koncentracije određena metodom obzirom da za med ne postoji definiran NDK (najmanja dopuštena količina) analita antibiotika. U tablici 5 je prikazan postupak pripreme za uzorke meda dodatka mješavine standarda **S2** te interni standard (**INT STD**).

Tablica 5. Postupak pripreme matriks kalibracijske krivulje

MATRIKS		Slijepa proba	M1 (µL)	M2 (µL)	M3 (µL)
MED 5 g ± 0,05 g	Obogaćenje µg kg ⁻¹	-	1	5	10
	µL radna standardna otopina S2 (100 ng L ⁻¹)	0	50	250	500
	µL radna otopina IS2 (100 ng L ⁻¹)	0	250	250	250

Priprema internih standarda

Uzorci koji se koriste za kalibraciju te ispitni uzorci obogaćuju se mješavinom internih standarda MIX-Q-TOF-IS2 pri koncentraciji koja je približno jednaka MRL (engl. *maximum residue level*) koncentraciji odgovarajućeg analita. Kao interni standardi korišteni su enrofloksacin-D5, sulfametazin-d4 te tetraciklin-d6. Postupak pripreme otopine internog standarda prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Priprema otopina internih standarda

Analit	Polazna otopina (ng mL ⁻¹)	Volumen polazne otopine V1 (mL)	Ciljana koncentracija (ng mL ⁻¹) INTSTD	Volumen tikvice V2 (mL)
Enrofloksacin-D6	1000000	0,5	20000	25
Tetraciklin-d6	1000000	0,5	20000	25
Sulfametazin-d4	1000000	0,25	10000	25

3.3.1. Pročišćavanje uzoraka QuEChERS (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) ekstrakcijom

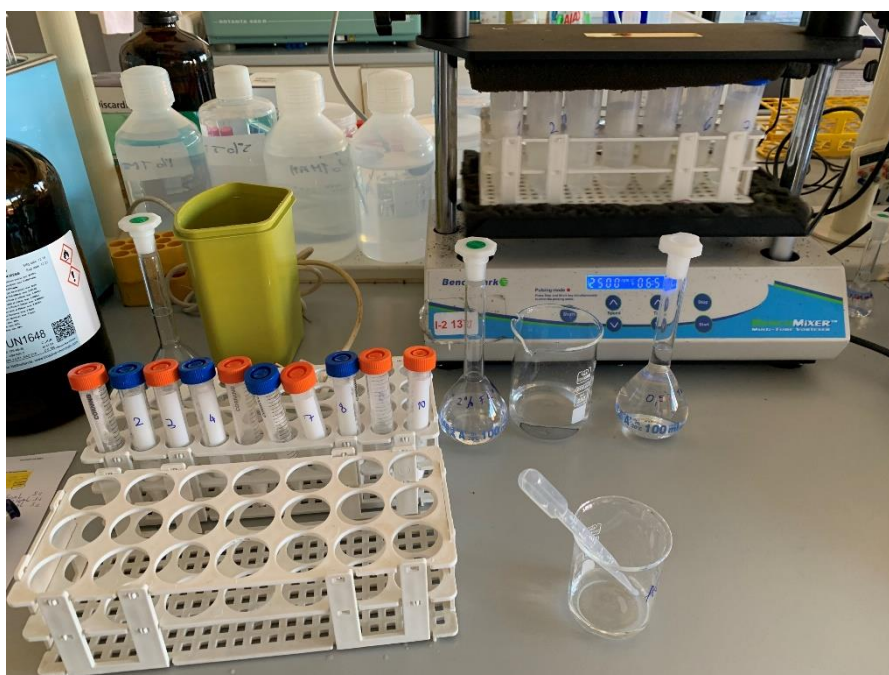
- Odvagati $2 \pm 0,05$ g (napraviti probu i sa $5 \pm 0,05$ g) homogeniziranog uzorka meda u epruvetu od 50 mL s čepom
- Obogatiti sve uzorke (osim slijepe probe) dodatkom internog standarda 250 μ L INTSTD te uzorke za kalibraciju mješavinom standarda S2
- Dodati 5 mL vode te vorteksirati
- Dodati 10 mL 0,5 % mravlje kiseline u acetonitrilu u te nakon dodatka odmah vorteksirati; napraviti probu sa 2 % mravljom kiselinom u acetonitrilu
- Miješati na mehaničkoj mješalici/vorteksu kroz 10 minuta (2000 o min^{-1})
- Centrifugirati 4000 o min^{-1} kroz 10 minuta pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$
- **EMR aktivacija praška:** Dodati 3 mL 5 mM amonijevog acetata u epruvetu s EMR praškom (korištene dvije vrste soli: **NaCl/MgSO₄** te **dSPE-EMR**) te odmah vorteksirati kroz 20 s pazeći da se stvorila jednolika emulzija
- Prebaciti 5 mL supernatanta od uzorka meda (0,5 % mravlja u acetonitrilu) u aktiviranu emulziju s praškom
- Odmah vorteksirati tijekom 5 minute
- Centrifugirati 4000 o min^{-1} kroz 10 minuta pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$
- Supernatant dekantirati u novu epruvetu od 50 mL s čepom
- Dodati sadržaj soli magnezijeva sulfata (MgSO₄) iz vrećice te snažno mućkati dok se ne razbiju stvrdnuti komadi soli, te zatim odmah vorteksirati ručno
- Dodatno vorteksirati na mehaničkoj mješalici kroz 2 minute
- Centrifugirati 4000 o min^{-1} kroz 10 minuta pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$
- Prebaciti 2 mL supernatanta u staklenu epruvetu od 12 do 15 mL
- Dodati 50 μ L dimetilsulfoksid (DMSO)
- Odpariti u struji dušika pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ dok ne zaostane volumen od $\sim 50 \mu\text{L}$
- Otopiti uzorke dodatkom 100 μ L metanola (MeOH), vorteksirati i zatim dodati 850 μ L vode (H₂O)
- Otopiti kroz 5 minuta u ultrazvučnoj kupelji
- Prebaciti otopinu u epruvetu od 2 mL za ultracentrifugu te centrifugirati pri 15000 o min^{-1} , kroz 5 minuta pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$
- Bistru otopinu uzorka (400 μ L) prebaciti u vialu s insertom

- *Faktor razrijeđenja $f = 1$

Za svaku analizu priprema se 12 uzoraka na način kako je prikazano u tablici 7.

Tablica 7. Obogaćivanje uzoraka S2 otopinama na tri koncentracijske razine

uzorci	naziv	sol	obogaćenje S2 (μL)
1	slijepa proba	dSPE-EMR	/
2		NaCl/MgSO ₄	
3	razina L1	dSPE-EMR	50
4		NaCl/MgSO ₄	
5	razina L2	dSPE-EMR	250
6		NaCl/MgSO ₄	
7	razina L3	dSPE-EMR	500
8		NaCl/MgSO ₄	
9		dSPE-EMR	
10	slijepa proba	dSPE-EMR	/



Slika 7. Priprema uzoraka za analizu (vlastita fotografija)

3.3.2. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju

Za svaku analizu potrebno je pripremiti minimalno 2 probe te svaka serija mjerenja mora uključivati nekoliko razina kontrole kvalitete. Način injektiranja uzoraka u uređaj je sljedeći:

- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)

- Uzorci za pripremu standardne kalibracije na otapalu (razine L1-L5)
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)
- Negativni uzorak matriksa (engl. *Matrix Blank*)
- Uzorci za pripremu kalibracije na matriksu (M1-M3)
- Uzorak koji sadrži samo otapala
- Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*)

Za provođenje analize koristi se HPLC uređaj 1290 Infinity udružen s masenim spektrometrom s trostrukim kvadrupolom (MS Q-TOF) Agilent Technologies Triple Quadrupole LC/MS 6470A. Instrumentalna analiza provodi se koristeći MassHunter Acquisition software.

Parametri analize:

Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1 x 150 mm

Predkolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1 x 5mm VanGuard
Pre-Column

Protok: 0,4 mL min⁻¹

Temperatura odjeljka kolone: 40 °C

Sustav za uzorkovanje: Volumen injektiranja 10 μL
Temperatura 10 °C
Injektiranje s ispiranjem igle 15 s
(MeOH/ACN/PropOH 5: 2,5: 2,5)

Mobilna faza: Otopina A: 0,1 % mravlja kiselina
Otopina B: MeOH LC-MS gradijent



Slika 8. HPLC uređaj udružen s masenim spektrometrom s trostrukim kvadrupolom (vlastita fotografija)

Prije početka analize, uz podešene kromatografske uvjete, važno je optimizirati kolonu protokom mobilne faze te omogućiti da se tlak ustali na potrebnu razinu, kako bi se izbjegle moguće pogreške analize.

Tijekom eksperimenta testirane su i druge mobilne faze u svrhu poboljšanja ionizacije analita; pripremljene su mobilne faze otopine A s dodatkom pufera: 5 mM amonijev formijat ili 5 mM amonijev acetat.

Tablica 8. Ionske tranzicije snimane MRM tipom skeniranja

Analit	Prekursor Produkt Ion Fragmentor			Kolizijska energija (V)
	m/z	m/z	(V)	
Tilozin A	916,5	<u>174,1</u>	135	20
		772,4	135	20
Eritromicin A	734,5	576,4	135	20
		<u>158,1</u>	135	20
Linkomicin	407,2	359,2	135	10
		<u>126,1</u>	135	20
Tetraciklin	445,2	<u>427,1</u>	135	10
		410,1	135	20
Tetraciklin-d6	451,2	<u>433,2</u>	135	10
		416,2	135	20
Klortetraciklin	479,1	<u>462,0</u>	140	20
		154,1	140	20
Oksitetraciklin	461,2	<u>443,1</u>	135	5
		201,1	135	5
Sulfadiazin	251,1	108,1	135	20
		<u>92,1</u>	135	28
Sulfadimetoksin	311,1	156	135	16
		<u>92,1</u>	135	36
Sulfamerazin	265,1	156	135	12
		<u>92,1</u>	135	28
Sulfametazin	279,1	<u>124,1</u>	135	12
		186,1	135	24
Sulfametoksazol	254,1	156	135	12
		<u>92,1</u>	135	24
Sulfatiazol	256	156	135	12
		<u>92,1</u>	135	28

*Najzastupljenija tranzicija je podcrtana

Ionizacija se odvija u ESI izvoru u negativnom načinu rada. Delta EMV iznosi 200. Temperatura plina iznosi 300 °C, protok plina je 9 L min⁻¹, tlak u raspršivaču je 35 psi, Sheath Gas Temp. 300 °C, Sheath Gas Flow 6 l min⁻¹, a napon kapilare je 3000 V.

3.3.3. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata

Izražavanje rezultata i korekcija iskorištenja

Koncentracija analita izražava se u ng g⁻¹ ili µg kg⁻¹ koristeći 3 značajne decimale. Korekcija iskorištenja uračunata je u rezultat jer se kvantitativno određivanje provodi pomoću matriks kalibracijske krivulje te se koristi interni standard. Iskorištenja moraju odgovarati propisanim limitima određenim u Odluci (EU) br. 657/2002. Kvantitativna analiza zasniva se na nekoliko uvjeta:

- Retencijsko vrijeme, odstupanje ± 0,5 min,
- Prisutnost iona prekursora analita, S/N > 10,
- Prisutnost minimalno 2 produkt iona, S/N > 10 (vrijedi za analizu na Q-TOF), i
- Odstupanje ionskog odnosa prekursora i produkta mora biti manji od 20 % do 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.

3.4. VALIDACIJA LC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA ANTIBIOTIKA

Vrjednovanjem (validacijom) se mora pokazati da analitička metoda udovoljava kriterijima koji se odnose na odgovarajuće značajke učinkovitosti. Jedan od prvih koraka koji se provode u svrhu optimizacije instrumenta za analizu jest definiranje ionskih oblika analita, odnosno ionske tranzicije prekursor iona u produkt ione procesom fragmentacije.

3.4.1. Specifičnost metode

Za analitičke metode je važna sposobnost razlučivanja između analita i njima sličnih spojeva kao što su izomeri, metaboliti, produkti razgradnje i drugi. Pritom se analiziraju odgovarajući

broj reprezentativnih slijepih uzoraka i provjeravaju interferencije u području, tj. retencijskom vremenu u kojem očekujemo otpuštanje dokazivanog analita te se procjenjuje njihov učinak.

3.4.2. Linearnost instrumenta

Parametar koji se može definirati kao sredstvo za testiranje odgovora instrumenta u području određivanja. Linearnost se ispituje u pet točaka matriks kalibracijske krivulje u koncentracijskom rasponu od 1 do 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4.3. Ponovljivost metode (engl. *Intra-assay precision*)

Analiza ponovljivosti provedena je kao stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod unaprijed određenim propisanim uvjetima analize određenog broja uzoraka identičnog matriksa kojem je dodan analit. Osnovni uvjeti ponovljivosti metode su oni u kojima isti analitičar koristeći se istom opremom u istom laboratoriju, dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu. Parametri koji su potrebni za izračun:

- **standardna devijacija (STDEV)** kao mjeru analitičke metode,
- **srednju koncentracija (AVERAGE)**, i
- **koeficijent varijacije CV (%)** obogaćenih uzoraka koji predstavlja omjer standardne devijacije (STDEV) te srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija analita u uzorku.

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

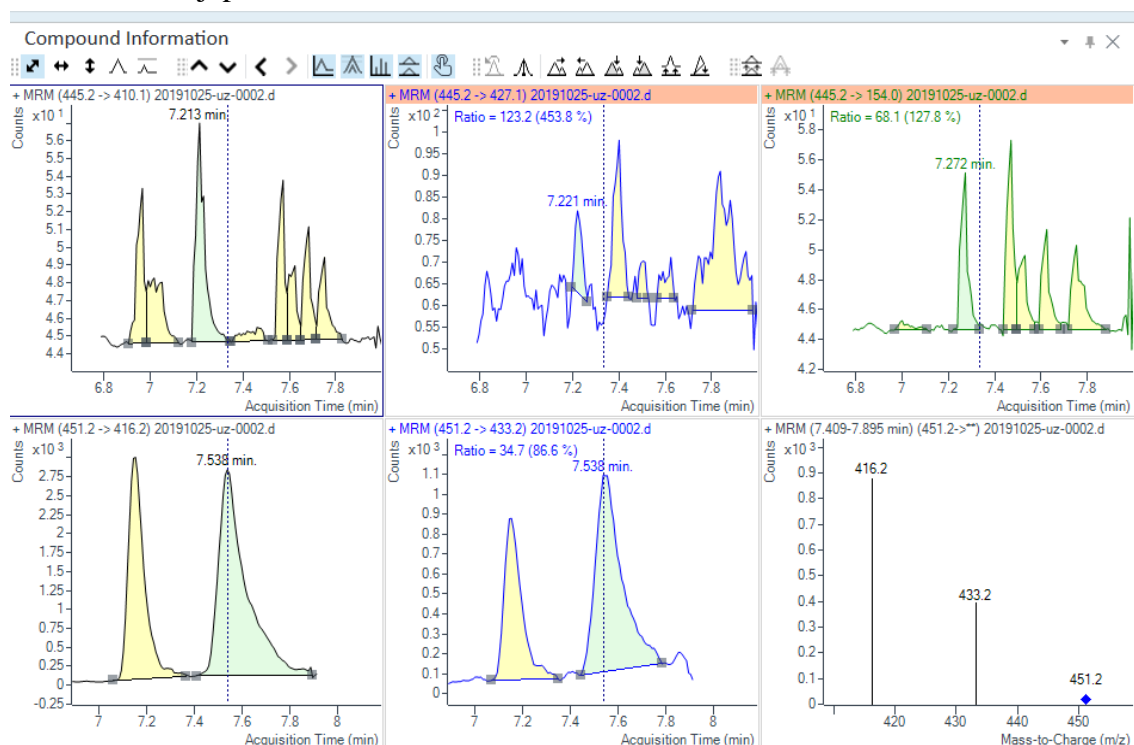
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti neke od parametara (specifičnost, linearnost, ponovljivost) za razvoj metode koja bi istodobno mogla određivati sve analite iz skupine makrolida, tetraciklina te sulfonamida, a također ispitati kako različite mobilne faze te Quechers ekstrakcija utječu na ekstrakciju analita.

4.1. SPECIFIČNOST METODE

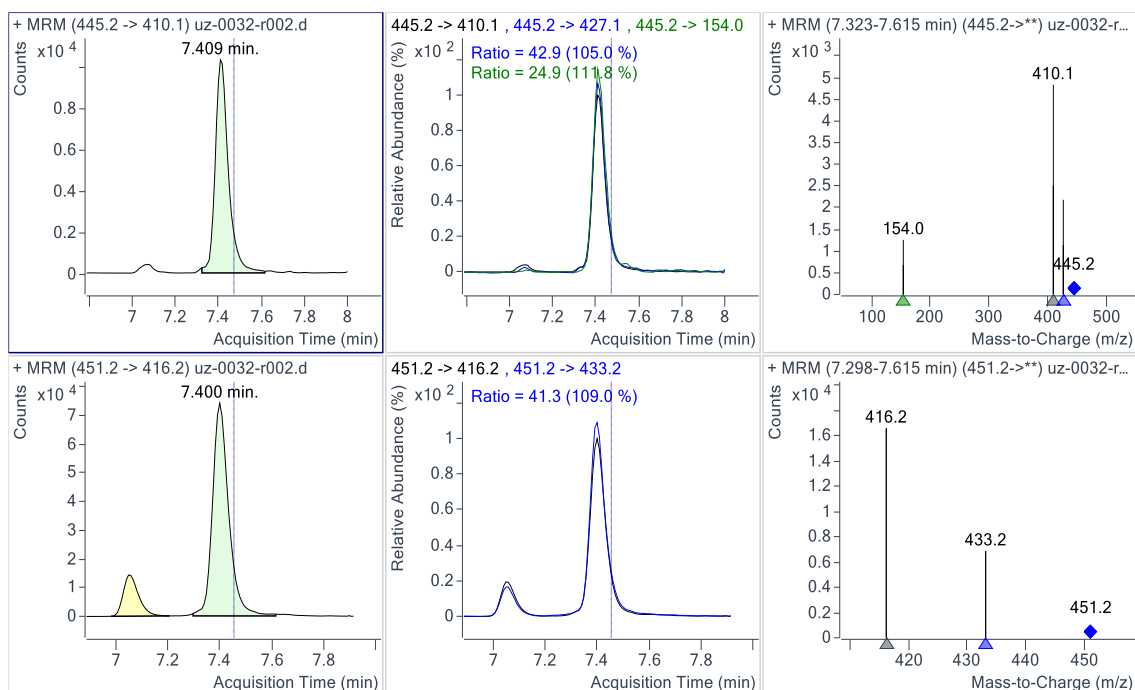
U slučaju uzoraka meda, uspoređeni su slijepi uzorci i obogaćeni uzorci standardima tetraciklina, makrolida te sulfonamida, kako je prikazano na slikama 9 i 10 te se na taj način uspješno može utvrditi da je metoda sposobna razlučiti pozitivne od negativnih uzoraka, poštujući uvjet odstupanja od retencijskog vremena pika $\pm 2,5 \%$.

a) Tetraciklin, slijepi uzorak meda

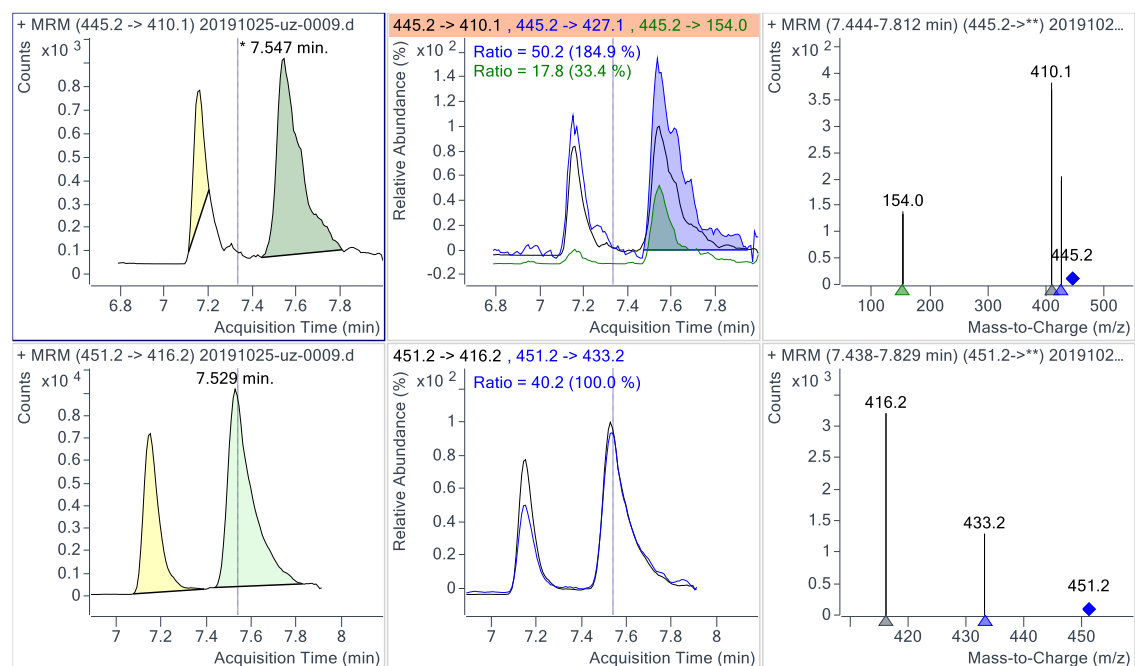


Slika 9. Kromatogrami za produkte tetraciklina nakon provedene analize na LC-MS/MS uređaju

b) Tetraciklin, standard na L3 koncentracijskoj razini

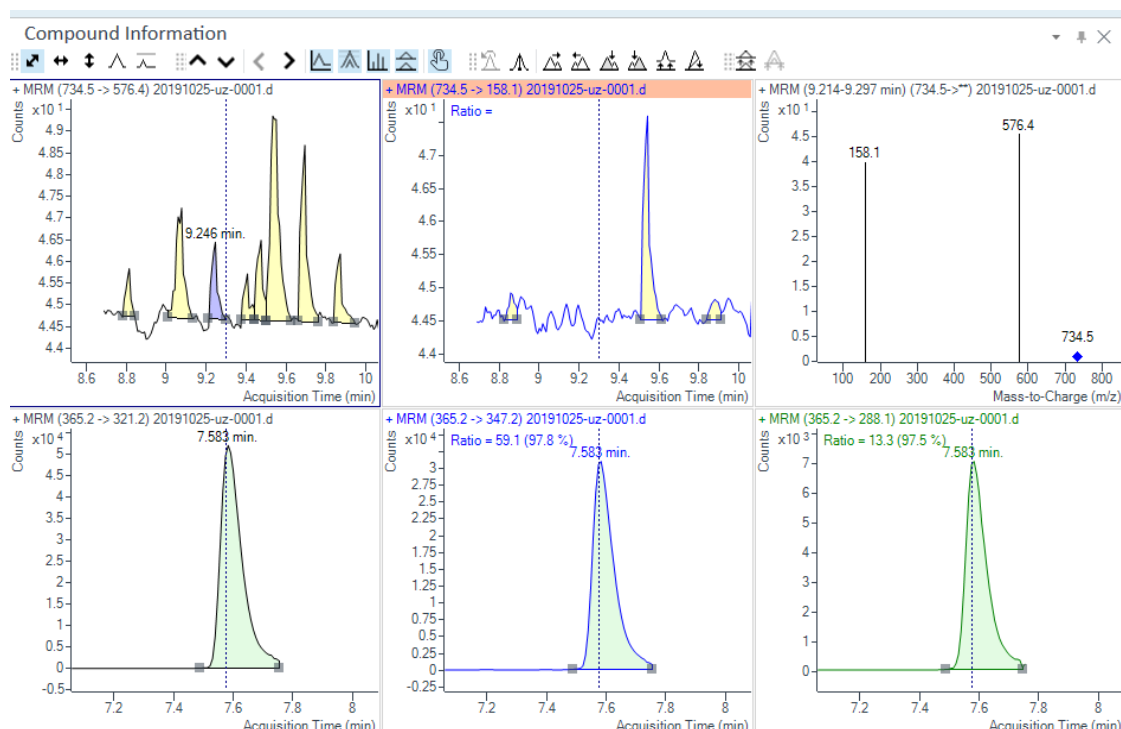


c) Tetraciklin, obogaćeni uzorak meda

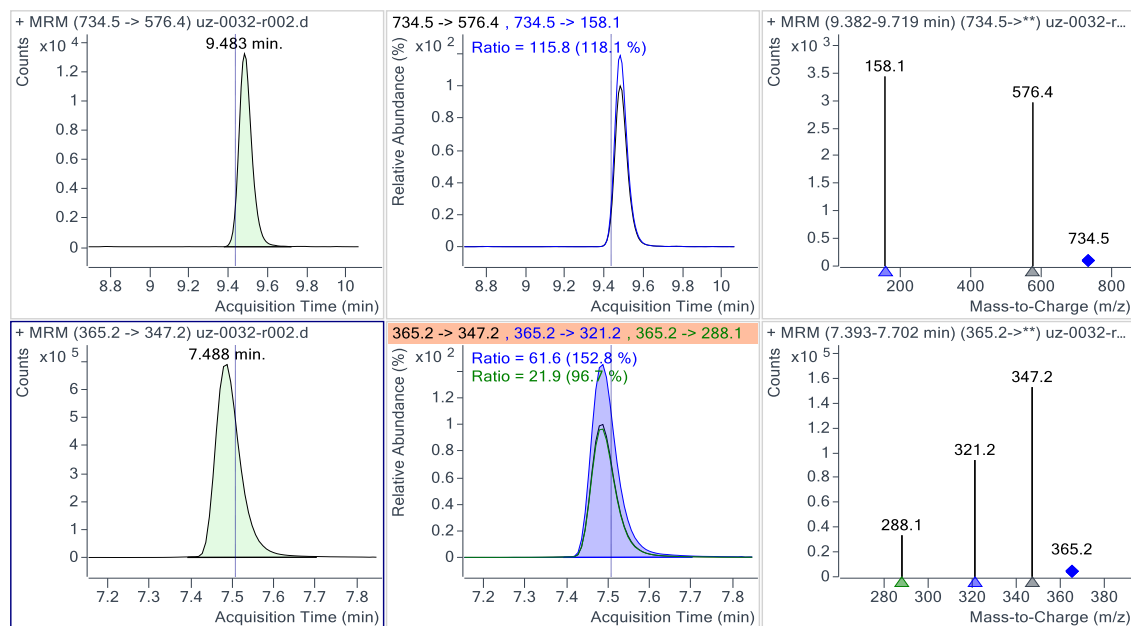


Slika 9. Kromatogrami za produkte tetraciklina nakon provedene analize na LC-MS/MS uređaju – nastavak

a) Eritromicin, slijepi uzorak meda

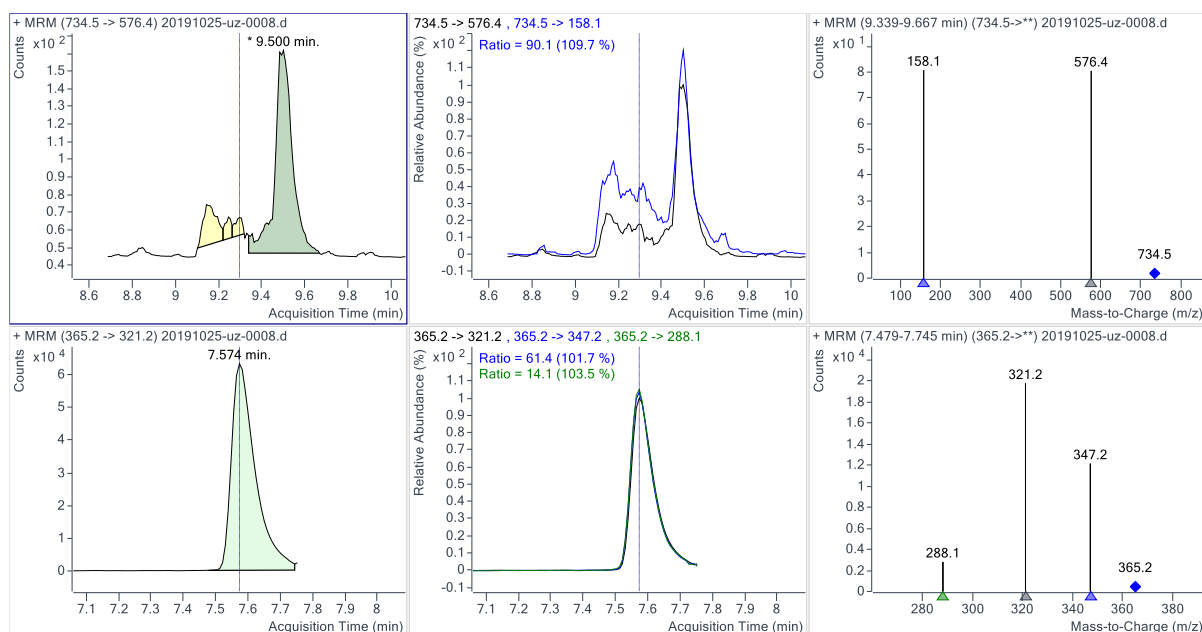


b) Eritromicin, standard na koncentracijskoj razini L3



Slika 10. Kromatogrami za produkte eritromicina nakon provedene analize na LC-MS/MS uređaju

c) Eritromicin, obogaćeni uzorak meda

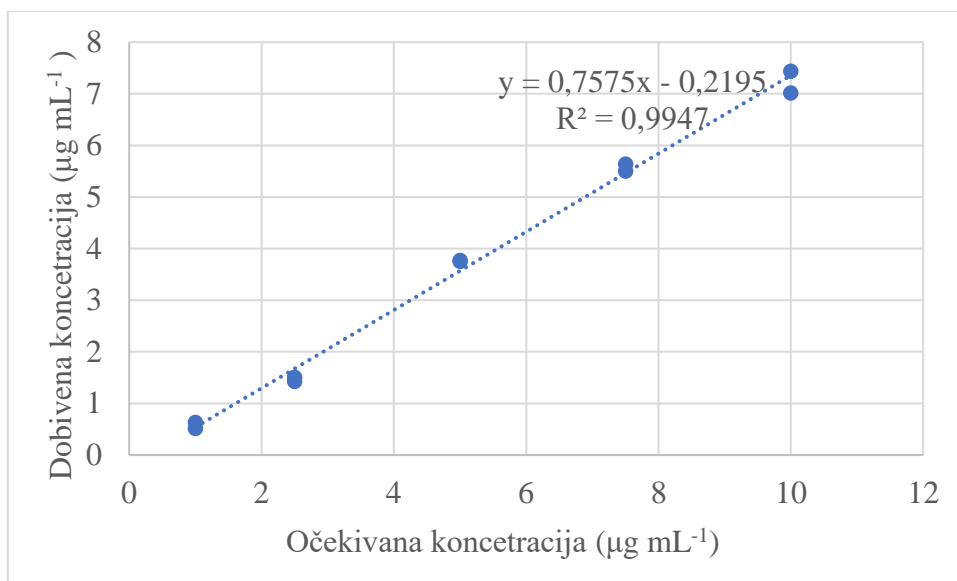


Slika 10. Kromatogrami za produkte eritromicina nakon provedene analize na LC-MS/MS uređaju – nastavak

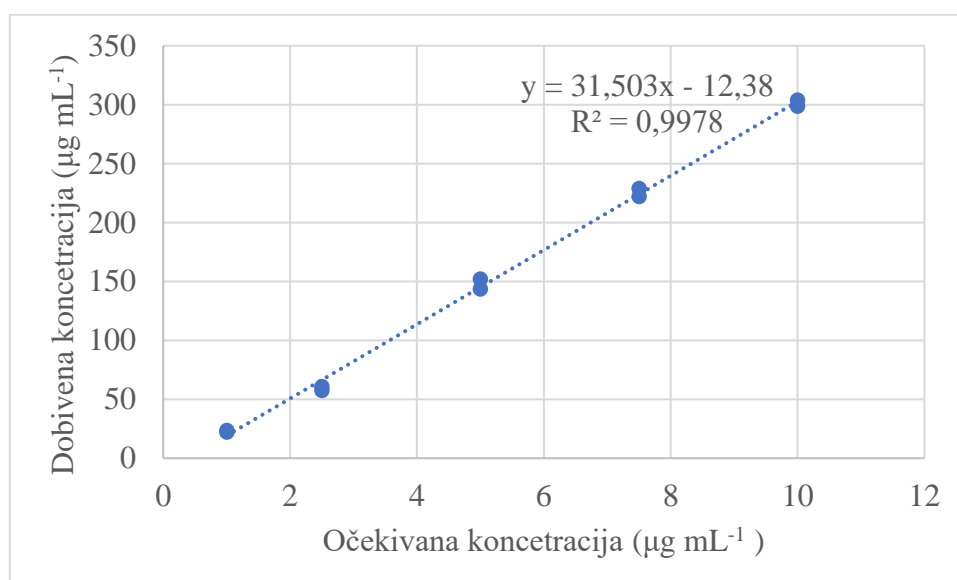
Provedeno je ispitivanje specifičnosti na negativnim uzorcima meda (*Matrix Blank*) te uspoređeno obogaćenim uzorcima analita (tetraciklin i eritromicin). Iz slika 9 i 10 je vidljivo da kod slijepih uzoraka nema nikakvih interferencija u području retencijskog vremena analita. Kod obogaćenih uzoraka standardima tetraciklina i eritromicina u retencijskom vremenu na kromatogramima pojavljuju pikovi specifični za analite, uzimajući u obzir retencijski interval $\pm 2,5$ %. Iz dobivenih rezultata, metodom je moguće razlučiti pozitivne od negativnih uzoraka te je metoda kao takva selektivna.

4.2. LINEARNOST INSTRUMENTA

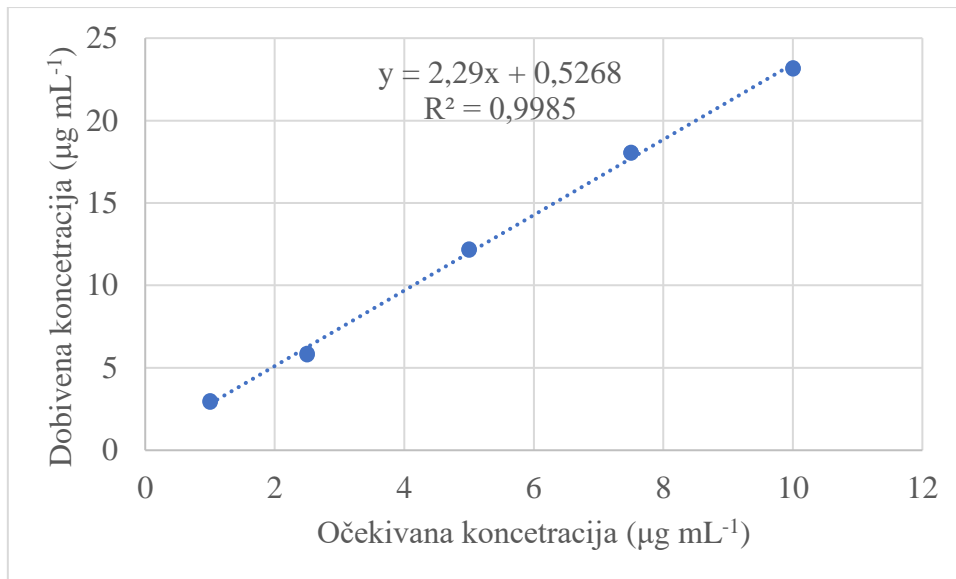
Linearnost je u ovom slučaju prikazana kao standardna kalibracijska krivulja pripremljena u otapalu te je izražena grafički (slike 11-18) linearnom regresijom. U tablici 9 su prikazane vrijednosti faktora linearnosti kalibracijskih krivulja za sulfonamide, tetracikline te makrolide.



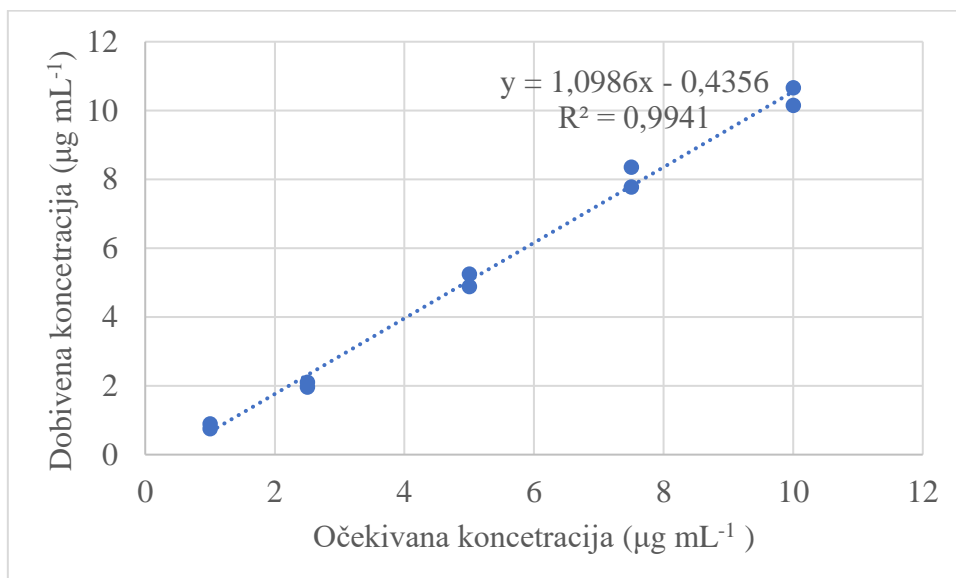
Slika 11. Linearnost kalibracijske krivulje na otapalu za tilozin A



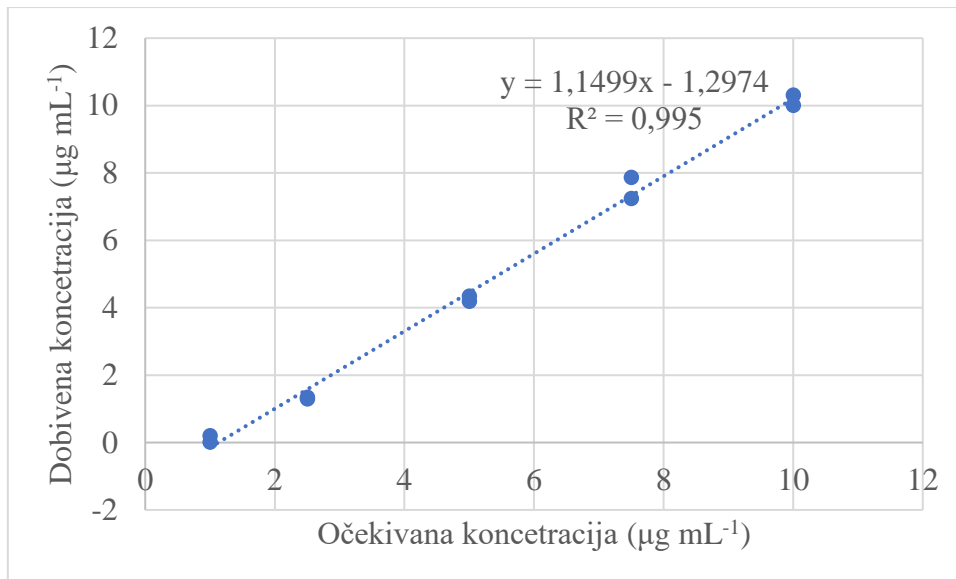
Slika 12. Linearnost kalibracijske krivulje otapala za eritromicin A



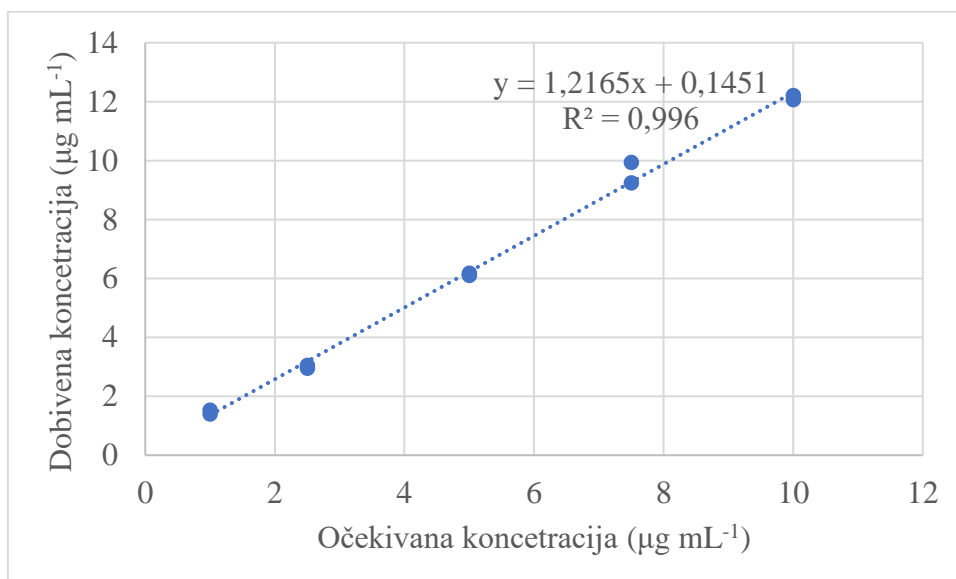
Slika 13. Linearnost kalibracijske krivulje otapala za linkomicin



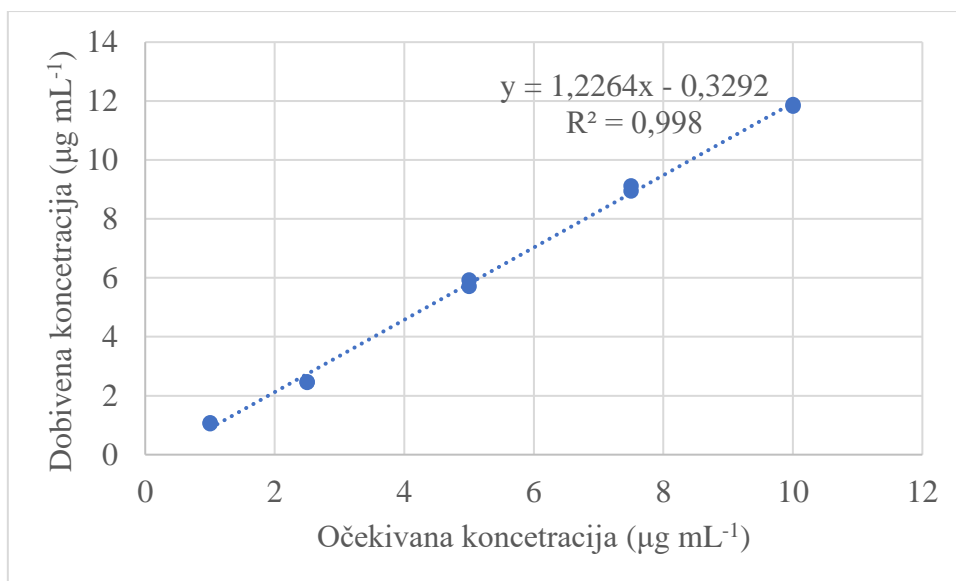
Slika 14. Linearnost kalibracijske krivulje otapala za tetraciklin



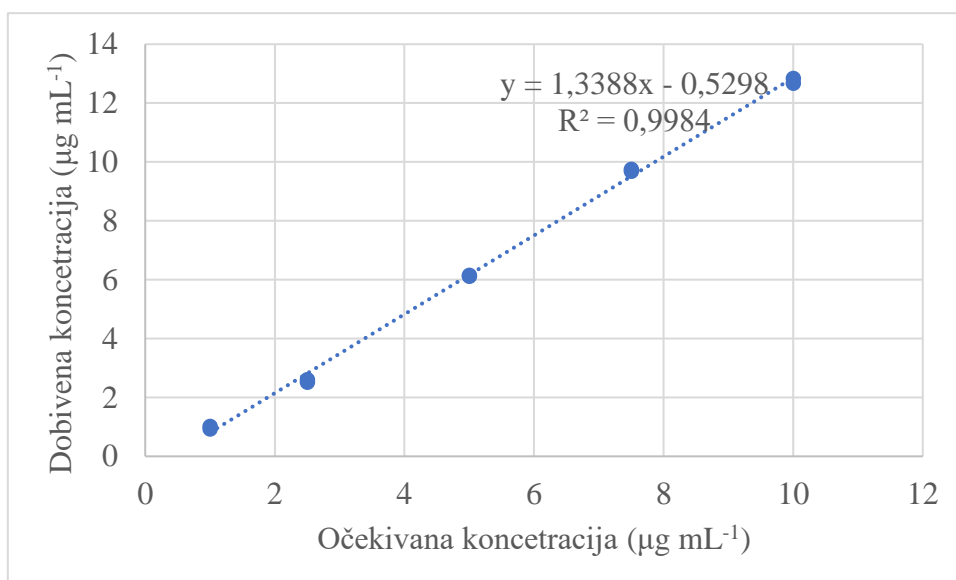
Slika 15. Linearnost kalibracijske krivulje otapala za klorotetraciklin



Slika 16. Linearnost kalibracijske krivulje otapala za oksitetraciklin



Slika 17. Linearnost kalibracijske krivulje otapala za sulfadiazin



Slika 18. Linearnost kalibracijske krivulje otapala za sulfatiazol

Tablica 9. Linearnost kalibracijskih krivulja na otapalu iskazana jednadžbom pravca za analite te koeficijentom determinacije (R^2)

Analit	Jednadžba pravca	Odsječak na y osi (b)	Nagib pravca (a)	Koeficijent determinacije (R^2)
Tilozin A	$y = 0,07575 x - 0,2195$	- 0,2195	0,07575	0,9947
Eritromicin A	$y = 31,503 x - 12,38$	- 12,38	31,503	0,9978
Linkomicin	$y = 2,29 x + 0,5268$	+ 0,5268	2,29	0,9985
Tetraciklin	$y = 1,0968 x - 0,4356$	- 0,4356	1,0968	0,9941
Klortetraciklin	$y = 1,1499 x - 1,2974$	- 1,2974	1,1499	0,9949
Okstetraciklin	$y = 1,2165 x + 0,1451$	+ 0,1451	1,2165	0,9959
Sulfadiazin	$y = 1,2264 x - 0,3292$	- 0,3292	1,2264	0,998
Sulfatiazol	$y = 1,3388 x - 0,5298$	- 0,5298	1,3388	0,998

Ispitivanje linearnosti kalibracijskih krivulja za navedene analite provedeno je na 5 koncentracijskih razina u dva uzastopna ponavljanja. Na temelju dobivenih vrijednosti koeficijenta determinacije R^2 većim od 0,99 za sve analite iz skupina makrolida, tetraciklina te sulfonamida dokazana je dobra linearnost s minimalnim odstupanjima.

4.3. PONOVLJIVOST METODE

U tablici 10 je prikaz proračuna standardne devijacije te koeficijenta varijacije za po dva analita iz skupine tetraciklina, makrolida te sulfonamida na tri koncentracijske razine obogaćenja (M1, M2, M3) te standardne devijacije retencijskih vremena ($Stdev_{RT}$).

Tablica 10. Proračuni parametara za predstavnike analita iz svake skupine antibiotika

Analit	parametri	M1	M2	M3	Stdev RT
Klortetraciklin	stdev	0,40559	1,402817317	1,4591	0,0062
	average	0,68589	4,304540264	9,4322	
	CV (%)	59,1332	32,58924836	15,469	
Oksitetraciklin	stdev	0,53369	1,649284315	1,9427	0,0143
	average	1,79809	4,867101727	11,98	
	CV (%)	29,6811	33,88637443	16,216	
Tetraciklin	stdev	0,16095	0,909220719	0,6534	0,0143
	average	1,01286	4,514465429	10,062	
	CV (%)	15,8911	20,14016352	6,4933	
Tilozin A	stdev	0,22062	1,069873786	0,9528	0,0087
	average	1,07795	4,38630484	9,8303	
	CV (%)	20,4663	24,39123191	9,6926	

Tablica 10. Proračuni parametara za predstavnike analita iz svake skupine antibiotika - nastavak

Eritromicin A	stdev	0,156	1,239019219	1,4805	0,0075
	average	1,10304	4,522775644	9,6647	
	CV (%)	14,1426	27,39510683	15,319	
Linkomicin	stdev	0,18245	1,525985675	1,8669	0,0043
	average	1,67826	4,389299015	12,131	
	CV (%)	10,8713	34,76604509	15,39	
Sulfadiazin	stdev	0,06408	0,800323783	0,1907	0,002
	average	1,07424	4,450907063	9,9874	
	CV (%)	5,96533	17,98113893	1,9092	
Sulfatiazol	stdev	0,08103	0,852644717	0,4317	0,004
	average	0,95288	4,393698336	9,9613	
	CV (%)	8,50413	19,40608233	4,3336	

Tablica 11. Primjeri vrijednosti maksimalnih koeficijenata varijacije (CV) kao parametara reproducibilnosti kvantitativnih metoda za različite masene udjele analita (Odluka, 2002)

Maseni udio	CV %
1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-
10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	23
1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (1 mg kg^{-1})	16

Uvjeti koji bi se trebali zadovoljiti za koeficijente varijacije CV (%) kod kvantitativne metode određivanja navedenih analita u medu ne bi trebao biti veći od 23 %. Iz tablice 10 može se zaključiti da rezultati zadovoljavaju kriterije te da su kod tetraciklina najbolje vrijednosti u skladu sa Pravilnikom (2005a) dobivene pri razinama M3 tj. kod najvećeg koncentracijskog obogaćenja a isto se može primjetiti i kod sulfonamida. Jedina odstupanja vidljiva su kod makrolida gdje su podjednako dobre vrijednosti bile i kod obogaćenja na razini M1, kao i na razini M3.

Povećanjem koncentracije analita u obogaćenom uzorku meda uočena je bolja ponovljivost te manje odstupanje u iskorištenju metode. Obzirom da je standardna devijacija mjera preciznosti analitičke metode, što je vrijednost niža, metoda je preciznija. Također, iz tablice 10 vidljivo je da je retencijsko vrijeme u skladu sa Pravilnikom (2005b) uz uvjet da odstupanje bude $\pm 2,5$ % (min). Sve vrijednosti iz navedene tablice 10 imaju vrijednosti manje od 1 % odstupanja, što znači da su kriteriji zadovoljeni.

Utjecaj različitih vrsta ekstrakcija na odziv analita

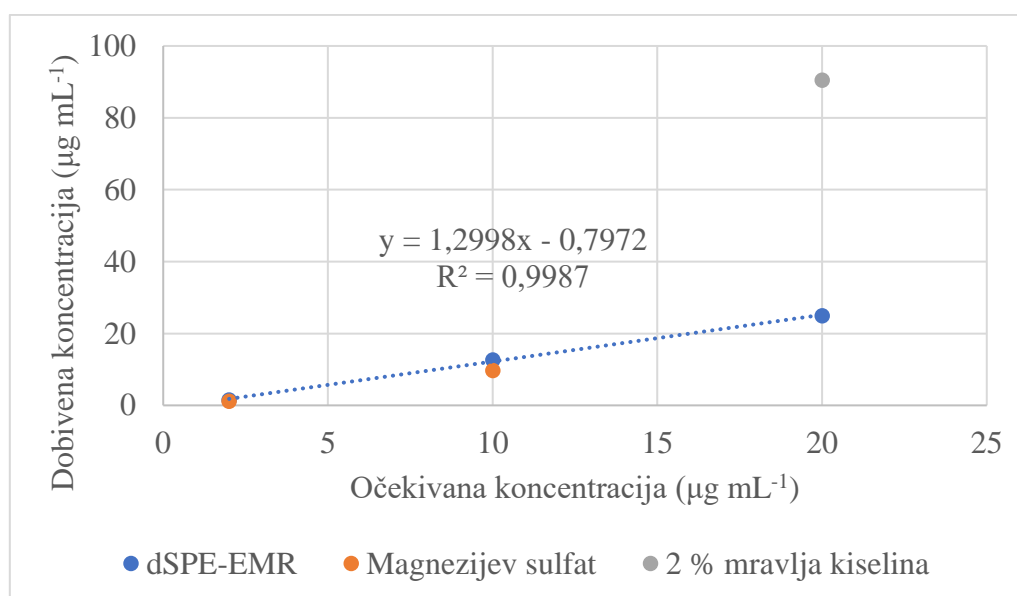
Novije kvantitativne metode baziraju se na ekstrakciji organskih otapalima, a jedan od njih je acetonitril koji se pokazao kao jedan od ključnih koraka u pročišćavanju sulfonamida koji imaju polarna svojstva (Tamošiūnas i Padarauskas, 2008), ali također i kod polarnih analita tetraciklina koji imaju tendenciju keliranja sa dvovalentnih kationima pa se ekstrakcija organskih otapalima koristi kako bi se pospješila deproteinizacija (Spisso i sur., 2009). Testirane su tri vrste ekstrakcije: ekstrakcija acetonitriplom bez dodatne obrade QUECHERS solima, i ekstrakcija acetonitriplom uz dodatak dvije vrste soli; **NaCl/MgSO₄** i **dSPE-EMR** (tablica 12). Analiza je provedena ekstrakcijom sa acetonitriplom bez dodatnog uklanjanja matriksa solima na M3 koncentracijskoj razini usporedno sa QuEChERs ekstrakcijama koje su pripremljene na sve tri koncentracijske razine.

Tablica 12. Usporedba QuEChERs ekstrakcija te ekstrakcije acetonitriplom

Uzorak	Koncentracijska razina	Površina pika
med M3 dSPE EMR Oksitetraciklin (Oxttc)	M3	2476
med M3 NaCl MgSO₄ Oxttc	M3	898
med M3 NaCl MgSO₄ 2 % mravlja kis. Oxttc	M3	5414
med acetonitril (ACN) Oxttc	M3	2341
med M3 dSPE EMR Tetraciklin (Ttc)	M3	3925
med M3 NaCl MgSO₄ Ttc	M3	898
med M3 NaCl MgSO₄ 2 % mravlja kis. Ttc	M3	1740
med ACN Ttc	M3	3483
med M3 dSPE EMR Tilozin A (Tyl A)	M3	5374
med M3 NaCl MgSO₄ Tyl A	M3	6063
med M3 NaCl MgSO₄ 2 % mravlja kis. Tyl A	M3	1868
med ACN Tyl A	M3	4086
med M3 dSPE EMR Linkomicin (Linco)	M3	22457
med M3 NaCl MgSO₄ Linco	M3	9134
med M3 NaCl MgSO₄ 2 % mravlja kis. Linco	M3	25609
med ACN Linco	M3	19806

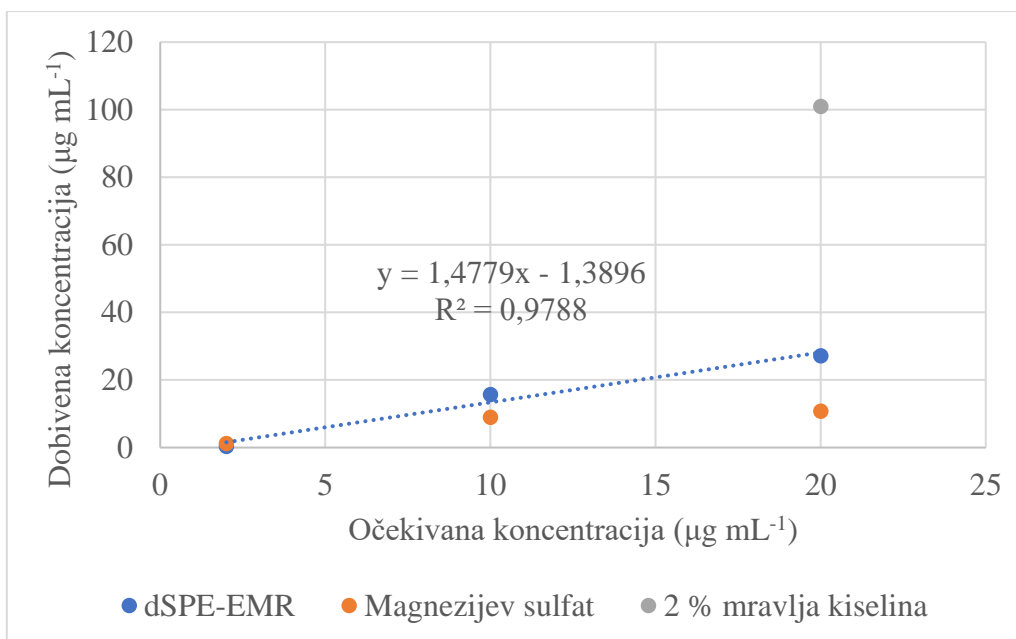
Rezultati dobiveni analizom na M3 koncentracijskoj razini pokazuju kako su ekstrakcijom samo acetonitrilom i kod tetraciklina te makrolida zabilježeni relativno niži odzivi analita od QuEChERs ekstrakcije. Ekstrakcija provedena samo acetonitrilom utječe na odziv analita jer puno matriksa zaostaje u ekstraktu uzorka što dovodi do velikog odziva bazne linije, odnosno pik analita pokazuje puno manji odziv.

Usporedbom različitih vrsta soli uočen je manji odziv solima **NaCl** **MgSO₄** za oba analita iz skupine tetraciklina te za linkomicin. Naime, dodatak anorganskih soli **Na₂SO₄**, **MgSO₄** i **NaCl** trebao bi povoljno utjecati na ekstrakciju željenih analita između organske i vodene faze, a o tom utjecaju prikazano je u radu Jin i suradnici (2016) gdje su soli dale puno veće iskorištenje osim u slučaju tetraciklina gdje vezanje vode solima utječe za preraspodjelu iona analita između dvije faze u ekstrakciji.



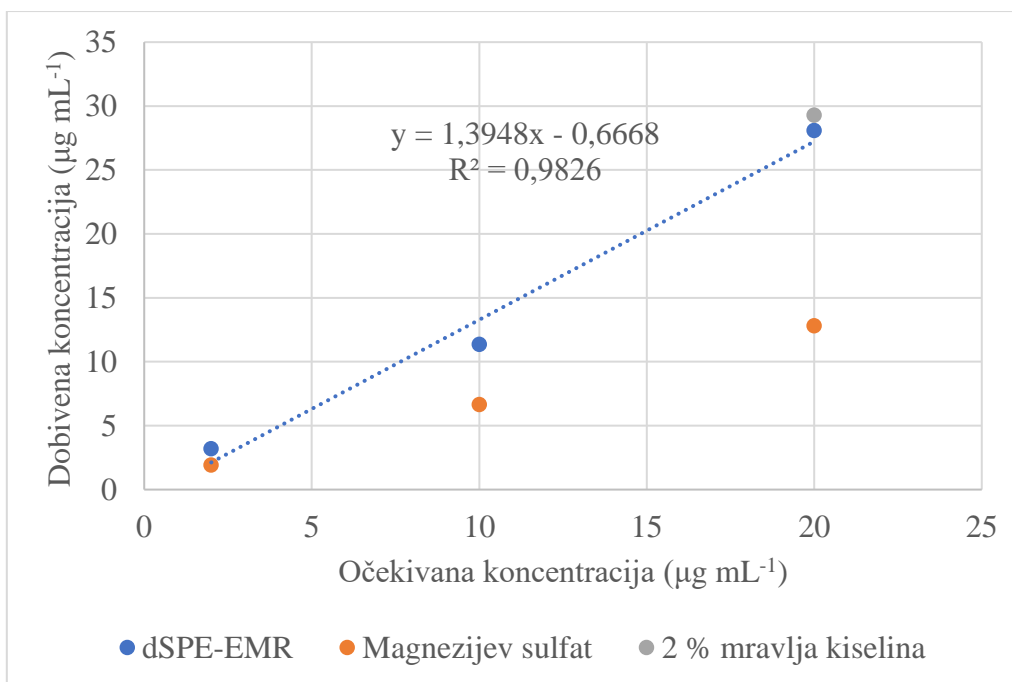
Slika 19. Grafički prikaz kalibracijske krivulje oksitetraciklina s usporedbom ekstrakcija dSPE-EMR soli (plave oznake), **MgSO₄** soli (crvene oznake) te dodatak 2 % mravlje kiseline

Ekstrakcija analita oksitetraciklina (slika 19) pokazala je najbolji odziv uz dodatak 2 % mravlje kiseline čime su se poboljšala separacijska svojstva dok su se primjećuju značajne razlike u korištenju soli, gdje se EMR sol pokazala kao bolja opcija te se vrijednosti odziva relativno podudaraju sa korištenjem acetonitrila u istoj analizi.



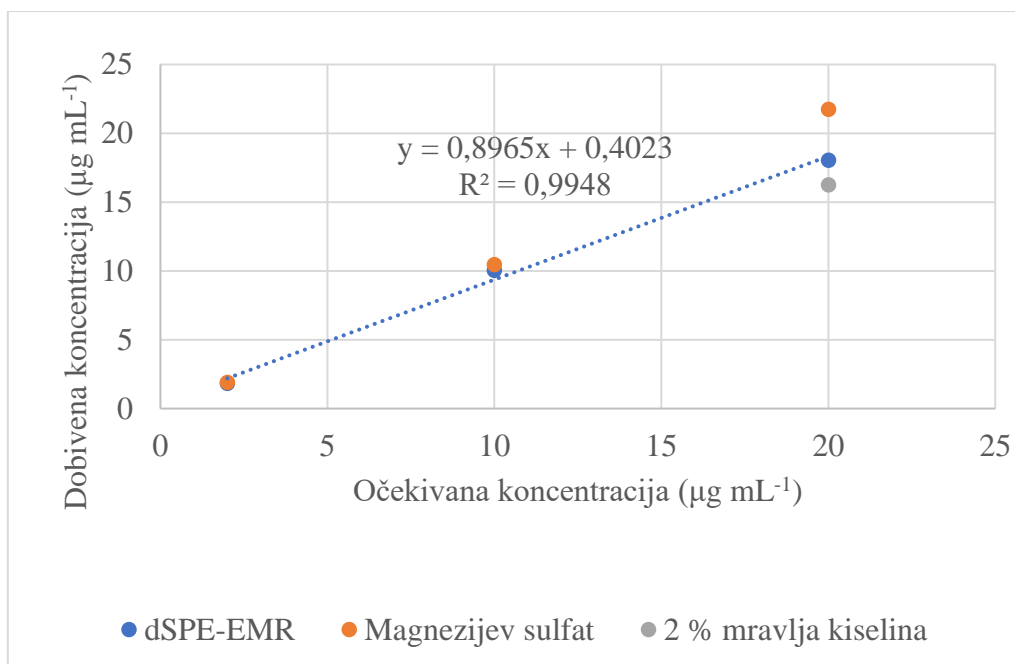
Slika 20. Grafički prikaz kalibracijske krivulje tetraciklina sa usporedbom ekstrakcija dSPE-EMR soli (plave oznake), MgSO₄ soli (crvene oznake) te dodatak 2 % mravlje kiseline

Obzirom da su oba analita (oksitetraciklin i tetraciklin) iz iste grupe antibiotika sa istim kemijskih svojstvima, bilo je za očekivati kako će ove ekstrakcije imati gotovo isti utjecaj na odzive analita. Također se kao i kod tetraciklina primjećuje da su puno manji odzivi bili kada se kao sol koristio MgSO₄ te je vrijednost ekstrakcije acetonitrilom bila relativno iste vrijednosti kao i ekstrakcija sa EMR soli kako je vidljivo na slici 20. Jedina razlika je korištenje 2 % mravlje kiseline, gdje nije poboljšala separacijska svojstva obzirom da su zabilježene dvostruko manje vrijednosti u odnosu na ostale ekstrakcije.



Slika 21. Grafički prikaz kalibracijske krivulje linkomicina s usporedbom ekstrakcija dSPE-EMR soli (plave oznake), MgSO₄ soli (crvene oznake) te dodatak 2 % mravlje kiseline

U slučaju različitih vrsta ekstrakcije koje su provedene s linkomicinom, iz tablice 12 te iz grafičkog prikaza (slika 21) može se zaključiti da postoji značajno velika razlika u solima korištenima za ekstrakciju, u kojoj veći odzivi su postignuti sa dSPE-EMR. Acetonitril i 2 % mravlja kiselina nisu utjecali na vrijednosti odziva analita, štoviše, 2 % mravlja kiselina je pokazala najbolji odziv, čak veći od EMR soli, pa se može zaključiti kako mravlja kiselina poboljšava separacijska svojstva.

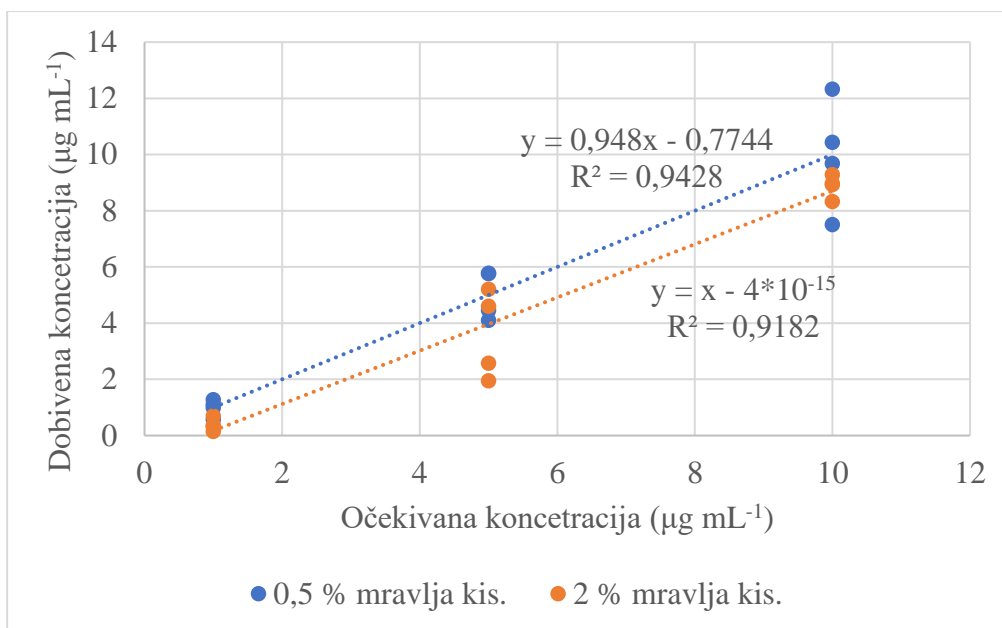


Slika 20. Grafički prikaz kalibracijske krivulje tilozina A sa usporedbom ekstrakcija dSPE-EMR soli (plave oznake), MgSO₄ soli (crvene oznake) te dodatak 2 % mravlje kiseline

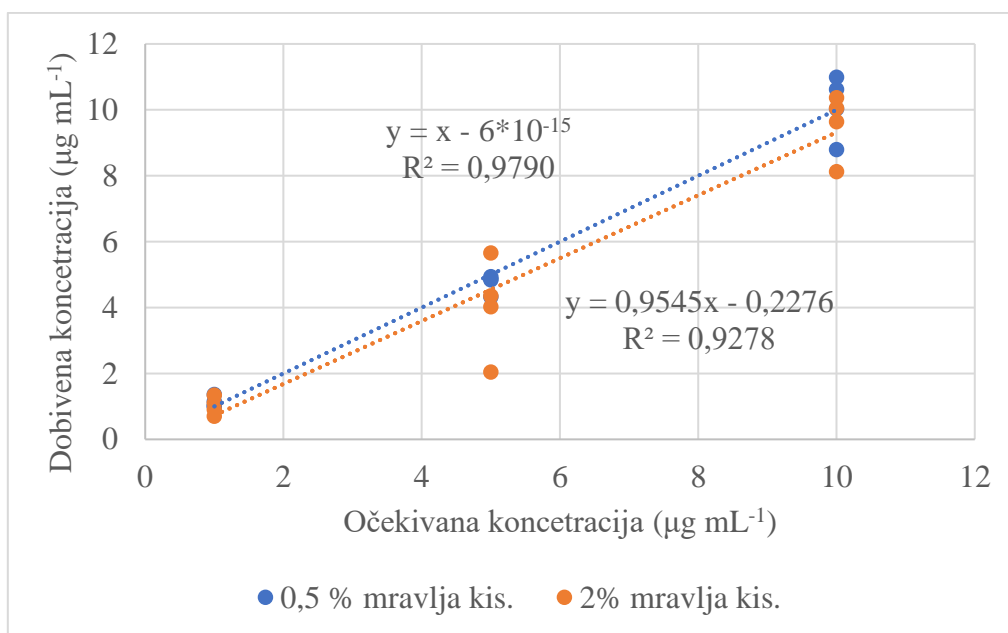
Kod analita tilozina (slika 20) nema razlike u odzivu kada su u analizi korištene soli ali je puno niži odziv kada je u analizi korištena i 2 % mravlja kiselina. Acetonitril nema značajnog utjecaja na odziv. Štoviše, acetonitril se pokazalo kao najbolja opcija za ekstrakciju makrolida u uzorcima meda, dok analiti sulfonamida i eritromicina A nisu bili uopće ekstrahirani primjenjenom ekstrakcijom u radu koje su proveli El Hawari i suradnici (2017).

Procjena utjecaja različite koncentracije mravlje kiseline na QuEChERs ekstrakciju analita

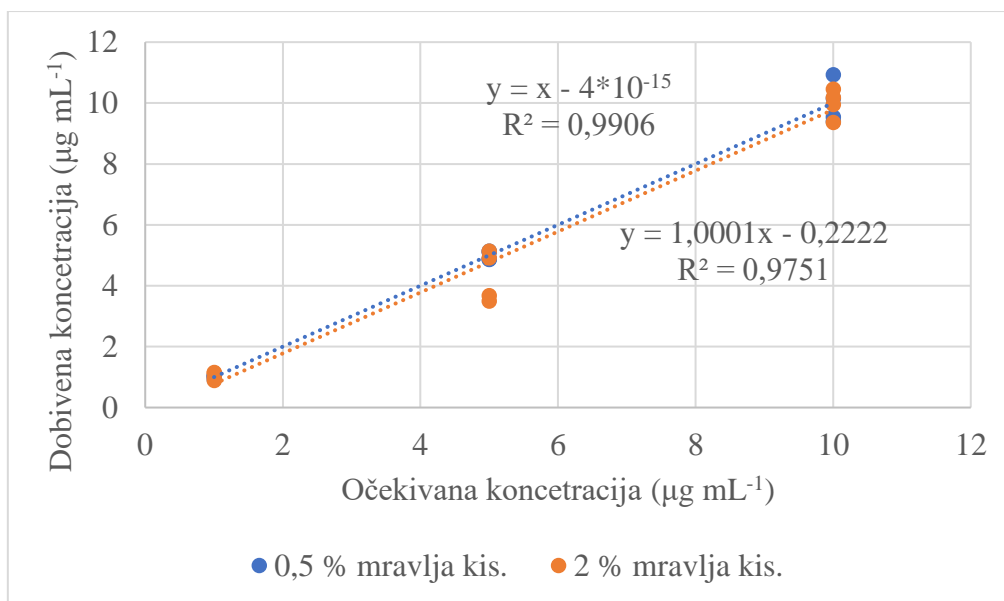
Analiza je provedena postupkom QuEChERs ekstrakcije po opisanim procedurama te je proveden test sa dvije različite koncentracije mravlje kiseline u acetonitrilu u postupku ekstrakcije. Analizirano je 24 uzoraka na tri koncentracijske razine (M1-M3) uz 0,5 % mravlju kiselinu u acetonitrilu te sa 2 % mravljom kiselinom u acetonitrilu.



Slika 22. Grafički prikaz utjecaja 0,5 % te 2 % mravlje kiseline u ACN na ekstrakciju klortetraciklina



Slika 23. Grafički prikaz utjecaja 0,5 % te 2 % mravlje kiseline u ACN na ekstrakciju tilozina A



Slika 24. Grafički prikaz utjecaja 0,5 % te 2 % mravlje kiseline u ACN na ekstrakciju sulfamerazina

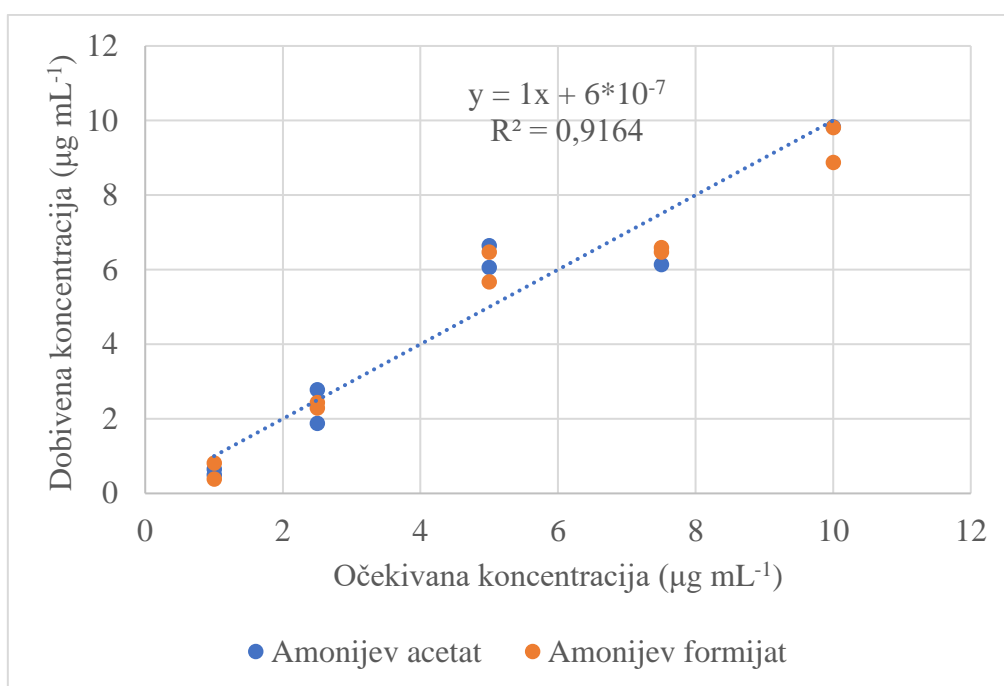
Predstavnicima svake skupine analita pokazali su bolju ponovljivost sa 0,5 % mravljom kiselinom u ACN, što je vidljivo iz grafičkih prikaza (slike 22-24) te jednadžbe kalibracijske krivulje i koeficijenta determinacije. Također, ekstrakcija je uspješno provedena i sa 2 % mravljom kiselinom u ACN bez obzira na manje vrijednosti pa se može zaključiti kako je ekstrakcija analita neovisna o koncentraciji mravlje kiseline. U radu El Hawari et al. (2017) navode kako neki analiti poput makrolida nisu stabilni pri kiselim uvjetima te je najbolji način za njihovu ekstrakciju potvrđen u bazičnim uvjetima kako bi se umanjio gubitak analita. Za primjer se može uzeti eritromicin A koji vrlo brzo degradira u anhidroeritromicin A u medu. Autori rada Thompson i suradnici (2007) predlažu da se u takvim slučajevima obrati pažnja na prekursor ione u LC-MS/MS analizama kako bi se utvrdili produkti nastali degradacijom te potvrdili njihovo korištenje u pčelarstvu.

Iskorištenje ekstrakcija sulfonamida ovisi o provedenom postupku hidolize kiselinama (dodatak kiselina u acetonitril) kako bi se oslobodile N-glikozidne veze sa reducirajućim šećerima u medu. U radu Jin i suradnici (2016) tvrde kako koncentracija kiselina veća od 2 % može prouzročiti štetan utjecaj na iskorištenje sulfonamida i makrolida ali može povoljno utjecati na pročišćavanje analita.

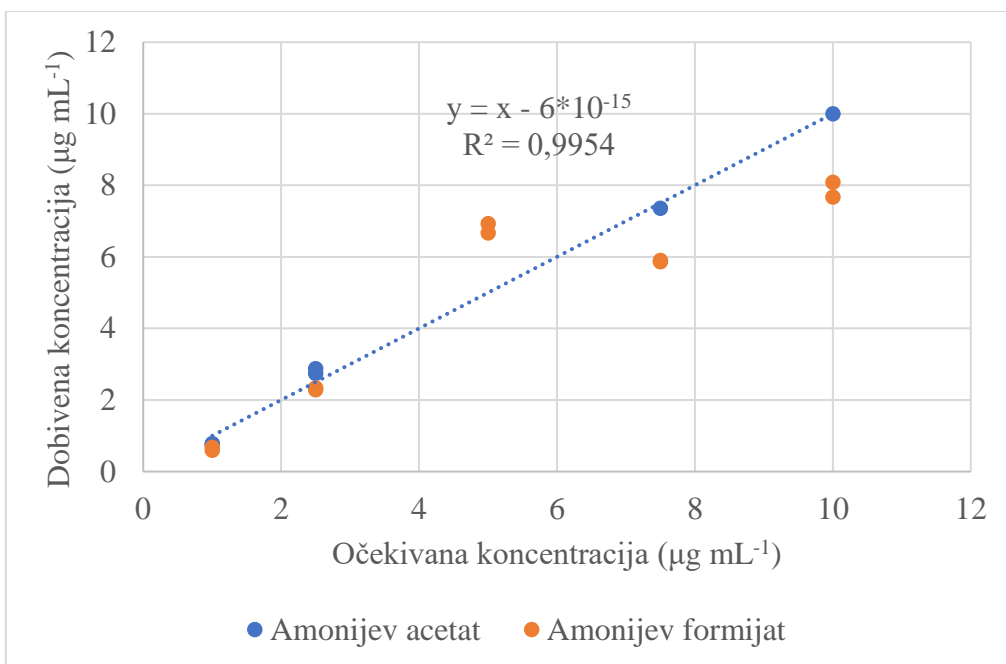
Utjecaj različitih mobilnih faza na ekstrakciju analita

Kod LC-MS/MS analiza koriste se različiti modifikatori i aditivi kako bi se dobili što jasniji grafički prikazi na kromatografima a uključuju mravlju kiselinu, octenu kiselinu amonijeve soli i druge.

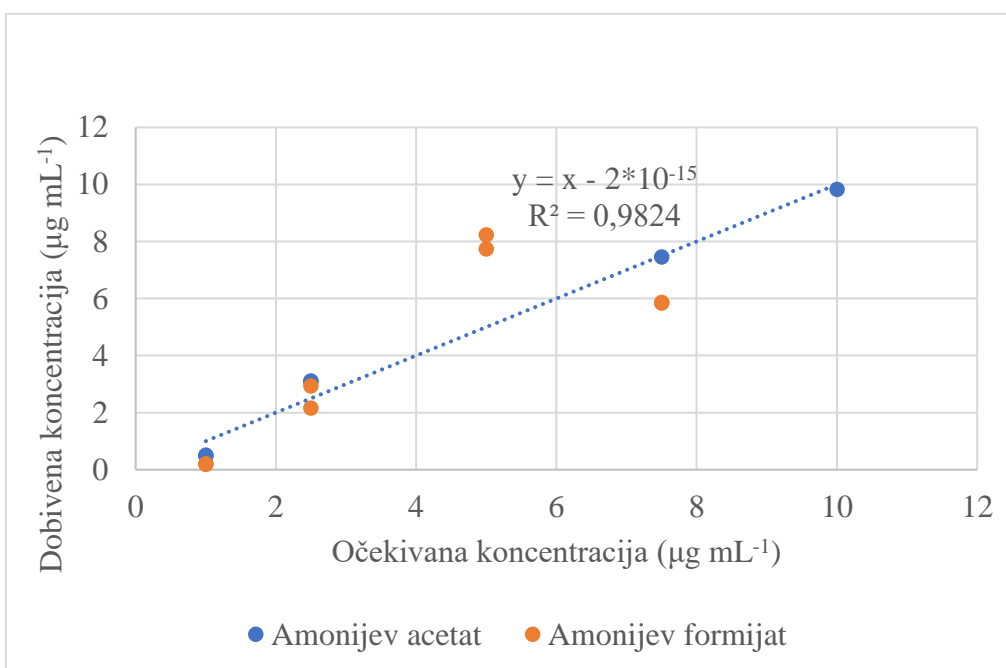
Proveden je test sa različitim mobilnim fazama tj. puferima koji se koriste u svrhu poboljšanja ionizacije spoja te pikova na kromatogramima. Kao mobilne faze korišteni su 5 mM amonijev acetat te 5 mM amonijev formijat te je dodana i mravlja kiselina a u svrhu analize pripremljeno 19 uzoraka na 5 koncentracijskih razina (L1-L5). Soli amonijeva formijata te amonijeva acetata pripremaju se u koncentracijskim razinama 5-20 mM a služe za pozitivnu ili negativnu ionizaciju u neutralnim uvjetima (Wang i Turnipseed, 2012).



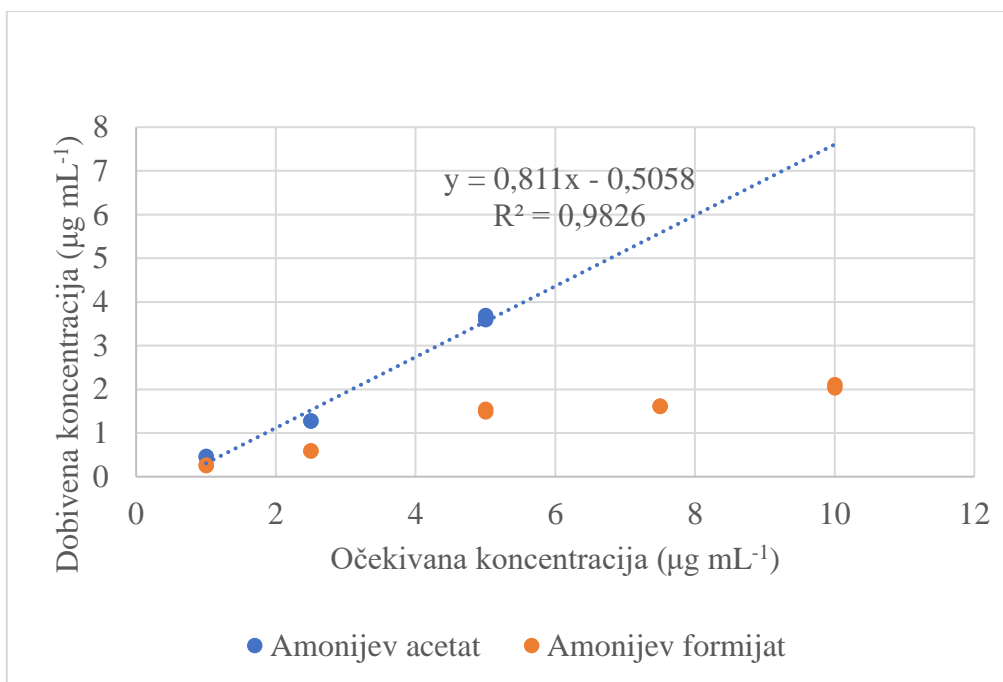
Slika 25. Grafički prikaz kalibracijske krivulje testa mobilnih faza za tetraciklin



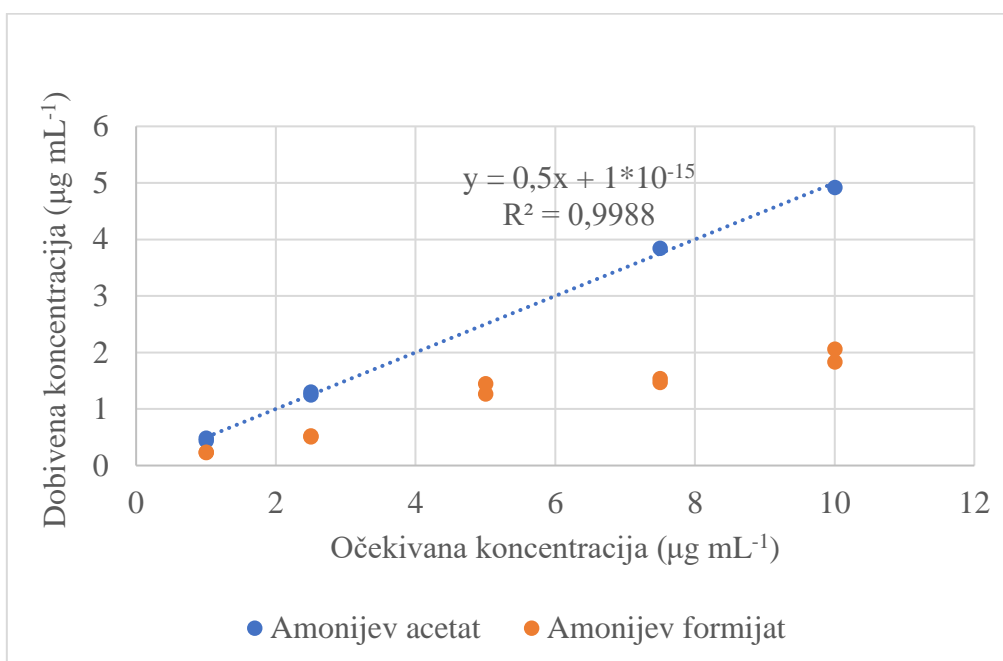
Slika 26. Grafički prikaz kalibracijske krivulje testa mobilnih faza za eritromicin A



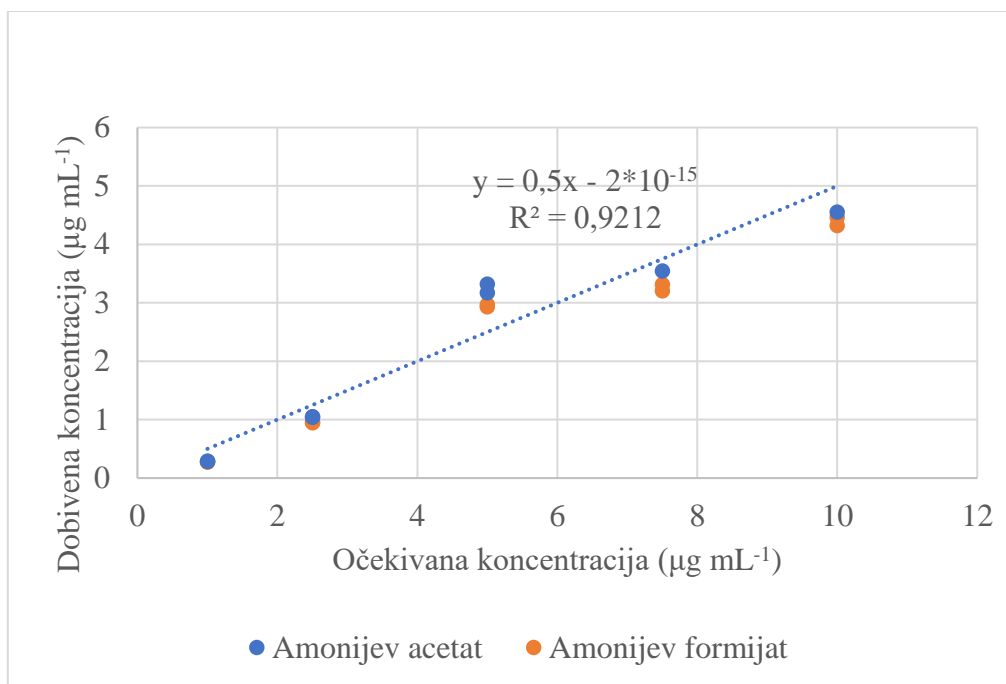
Slika 27. Grafički prikaz kalibracijske krivulje testa mobilnih faza za tilozin A



Slika 28. Grafički prikaz kalibracijske krivulje testa mobilnih faza za sulfadoksin



Slika 29. Grafički prikaz kalibracijske krivulje testa mobilnih faza za sulfametoksipiridazin



Slika 30. Grafički prikaz kalibracijske krivulje testa mobilnih faza za sulfatiazol

Plave oznake na kalibracijskih krivuljama pokazuju vrijednosti sa amonijevim acetatom dok žute oznake pokazuju vrijednosti dobivene amonijevim formijatom. Iz grafičkih prikaza se može zaključiti kako se kod eritromicina (slika 26) vidi manji odziv za vrijednosti amonijeva formijata. Kod dva sulfonamida- sulfadoksina (slika 28) te sulfametoksipiridazina (slika 29) vidi se kako je puno jači odziv sa amonijevim acetatom dok kod sulfatizola (slika 30), tilozina (slika 27) i tetraciklina (slika 26) nema utjecaja različitih mobilnih faza (pufera) što se vidi po preklapanju vrijednosti za amonijev acetat te za amonijev formijat.

Uz odabir prikladnog pufera u mobilnoj fazi, također je potrebno odabrati i koncentraciju koja je dodaje kako bi separacija i pikovi bili što bolji. Rad koji su objavili Jin i suradnici (2016) bazirao se na separaciji čak 42 analita uz različite koncentracije amonijeva formijata (1 mM, 2 mM, 3 mM i 5 mM) te su zadovoljavajući rezultati ispali sa 2 mM amonijevim formijatom dok je kod manjih koncentracija rezultiralo nesimetričnim pikovima i slaboj separaciji a kod koncentracije od 5 mM došlo je do kasnog eluiranja analita i slabe separacije. Veće koncentracije amonijeva formijata u mobilnim fazama koje se pripremaju za LC-MS/MS analize može dovesti do začepljenja kromatografske kolone zbog kristalizacije soli koja je prisutna u organskim otopinama.

U znanstvenim radovima kombinacija mravlje kiseline i acetonitrila kao mobilne faze u kromatografiji obrnutih faza pokazala se kao uspješna metoda za ekstrakciju sulfonamida, makrolida te tetraciklina u medu (Mol i sur., 2008) jer omogućava jasnije definiranje i pojačavanje pikova na kromatografu. Kao dobra supstitucija acetonitrilu, pokazao se i metanol, iako tijekom analize može doći do ekstrakcije i drugih komponenata matriksa (Stolker i Danaher, 2012).

5. ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje obuhvatilo je razvoj i validaciju metode za određivanje antibiotika makrolida, tetraciklina i sulfonamida u medu te se nakon provedenog istraživanja može zaključiti sljedeće:

- Potvrдна metoda tekućinska kromatografija sa masenom spektrometrijom visoko je specifična i selektivna metoda pogodna za detekciju rezidua antibiotika u matriksu – hrani.
- Dobra selektivnost potvrđena je kroz jasnu razdiobu između pozitivnih i negativnih rezultata.
- Metoda je linearna s minimalnim odstupanjima i zadovoljen je kriterij koeficijenta determinacije (R^2) > 0,99.
- Povećanjem koncentracije analita u obogaćenom uzorku meda uočena je bolja ponovljivost te manje odstupanje u iskorištenju metode.
- QuEChERs ekstrakcija pokazala se uspješnom za sve vrste analita.
- Dodatak pufera (amonijev acetat te amonijev formijat) nije imao utjecaja na bolju ionizaciju te iskorištenje.

6. LITERATURA

Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., Ansari, M. J. (2012) Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: Human health hazards. *Sci. World J.* **2012**, 1–9.

Baggio, A., Gallina, A., Benetti, C., Mutinelli, F. (2009) Residues of antibacterial drugs in honey from the Italian market. *Food Addit. Contam.* **2**, 52–58.

Bargańska, Z., Namieśnik, J. Ślebioda, M. (2011) Determination of antibiotic residues in honey. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **30**, 1035–1041.

Beganović, J. (2015) Hidrolitička razgradnja nitrofurantoina (završni rad). Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu.

Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Brnčić, S. R. Družina, V. B. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol.* **8**, 90–101.

Chang, Q., Wang, W., Regev-yochay, G., Lipsitch, M. Hanage, W. P. (2014) Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* **8**, 240–245.

Chiesa, L. M., Panseri, S., Nobile, M., Ceriani, F. Arioli, F. (2018) Distribution of POPs, pesticides and antibiotic residues in organic honeys from different production areas. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **35**, 1340–1355.

Chopra, I., Roberts, M. (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65**, 232-260.

Cindrić, M., Marković, A. Horvatić, A. (2009) Sprengute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218–232.

Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol. Biotechnol.* **46**, 11-21.

Economou, A., Petraki, O., Tsiipi, D., Botitsi, E. (2012) Determination of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in honey and validation according to Commission Decision 2002/657/EC for banned compounds. *Talanta* **97**, 32–41.

El Hawari, K., Mokh, S., Doumyati, S., Al Iskandarani, M., Verdon, E. (2018) Development and validation of a multiclass method for the determination of antibiotic residues in honey using liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A* **34**, 582–597.

Eraković Haber, V. (2011) Makrolidi - Više od antibiotika. *Infektološki Gla.* **31**, 29–39.

Greenlees, K. J., Friedlander, L. G., Boxall, A. (2012) Chemical analysis of antibiotic residues in food., 1. izd., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, str. 111.

Grigoryan, K. (2016) Safety of Honey. U: Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods, (Prakash V., Martin-Belloso, O., Keener, L., Astley, S., Braun S., McMahon H., Lelieveld H., ured.), Elsevier Science, str. 217-246.

Hrvatski veterinarski institut (2018) Interna metoda Laboratorija za određivanje rezidua, SOP Z-I-2-AM02, Zagreb.

Indrani, S., Bandyopadhyay, S. (2020) Resistance to aminoglycoside, tetracycline and macrolides. *Antimicrob. Resist. Agric.* 81–95.

Jin, Y., Zhang, J., Zhao, W., Zhang, W., Wang, L., Zhou, J. Li, Y. (2016) Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 1–10.

Kos, B. (2018/19.) predavanja iz modula "Ostaci antibiotika u hrani", Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu <www.pbf.hr>. Pristupljeno 12. veljače 2020.

Lynch, K. L. (2017) Toxicology: liquid chromatography mass spectrometry U: Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory, (Nair, H., Clarke, W., ured.), Academic Press, str. 109–130.

Makovec, S., Kos, B., Šušković, J. (2014) Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. *Hrvat. časopis za prehrambenu Tehnol. Biotehnol.* **9**, 7–16.

Mol. H. G. J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., De Rijk, T. C., Stolker, A. A. M., Mulder, P. P. J. (2008) Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal. Chem.* **80**, 9450–9459.

Odluka komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata.

Pine, S. H. (1994) *Organska kemija*, 3. izd., Školska knjiga, Zagreb.

Pleadin, J. (2018) predavanja iz modula "Suvremene metode u analitici hrane", Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu <<https://moodle.srce.hr/2018-2019/>>. Pristupljeno 15. lipnja 2020.

Pravilnik o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskoga podrijetla. (2008) *Narodne novine* **79**, Zagreb.

Pravilnik o medu (2015a) *Narodne novine* **53**, Zagreb.

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

Pravilnik o pravilima uspostave sustava i postupaka temeljenih na načelima HACCP sustava (2015b) *Narodne novine* **68**, Zagreb.

Pravilnik o najvišim dopuštenim količinama ostataka veterinarskih lijekova u hrani (2005b) *Narodne novine* **29**, Zagreb.

Ratnieks, F. L. W. (1992) American Foulbrood: The Spread and Control of an Important Disease of the Honey Bee. *Bee World* **73**, 177–191.

Reeves, P. T. (2012) Antibiotics: groups and properties. U: Chemical analysis of antibiotic residues in food, (Jian Wang, James D. MacNeil Kay, J. F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey str. 1-53.

Reybroeck, W. (2017) Residues of antibiotics and chemotherapeutics in honey. *J. Apic. Res.* **57** 97–112.

Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F. Herman, L. (2012) Antimicrobials in beekeeping. *Vet. Microbiol.* **158**, 1–11.

Sheridan, R., Policastro, B., Thomas S., Rice, D. (2008) Analysis and Occurrence of 14 Sulfonamide Antibacterials and Chloramphenicol in Honey by Solid-Phase Extraction Followed by LC / MS / MS Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3509–3516.

Spisso, B. F., de Araújo Júnior, M. A. G., Monteiro, M. A., Lima, A. M. B., Pereira, M. U., Luiz, R. A., Nóbrega, A.W. (2009) A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Anal. Chim. Acta* **656**, 72–84.

Staub Spörri, A., Jan, P., Cognard, E., Ortelli, D., Edder P. (2014) Comprehensive screening of veterinary drugs in honey by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants A*, **31** 806–816.

Stolker, A. A., Danaher, S. M. (2012) Sample preparation: extraction and clean-up. U:

Chemical analysis of antibiotic residues in food, (Wang J., MacNeil, J. D. Kay, J. F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, str. 125-146.

Šušković, J., Kos, B. (2007) Mikrobiološke metode i antibiotici. U: Metode u molekularnoj Biologiji, (Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katusić Hećimović, S., Meštović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D., ured.), Institut «Ruđer Bošković», Zagreb, str. 949-963.

Tamošiūnas, V., Padarauskas, A. (2008) Comparison of LC and UPLC coupled to MS–MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. *Chromatographia* **67**(9/10), 783-788.

Thompson, T. S., Pernal, S. F., Noot, D. K., Melathopoulos, A. P., van den Heever, J. P. (2007) Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. *Anal. Chim. Acta* **586**, 304–311.

Uredba komisije (EZ) 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.

Uredba komisije (EZ) br. 178/2002 – opća načela i uvjeti zakona o hrani.

Uredba komisije (EZ) br. 852/2004 Europskoga parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o higijeni hrane.

Uredba komisije (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla.

Wang, J, Turnipseed, S. B. (2012) Chemical analysis: quantitative and confirmatory methods. U: Chemical analysis of antibiotic residues in food, (Wang J., MacNeil, J. D. Kay, J. F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, str. 187–226.

Wang, S., Zhang, H., Wang, L., Duan, Z. J., Kennedy, I. (2006) Analysis of sulphonamide

residues in edible animal products: A review. *Food Addit. Contam.* **23**, 362–384.

Watkins, R. R. Bonomo, R. A. (2016) Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **30**, 313–322.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ana Pinčar