

Određivanje ostataka cefalosporinskih antibiotika u jajima LC-MS/MS metodom

Ernek, Roberta

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:422052>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2024.

Roberta Ernek

**ODREĐIVANJE OSTATAKA
CEFALOSPORINSKIH ANTIBIOTIKA U
JAJIMA LC-MS/MS METODOM**

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

ZAHVALA

Veliko hvala, na prvome mjestu, dugujem mentorici prof. dr. sc. Kos na stručnoj pomoći, korisnim savjetima i neizmjerenoj ljubaznosti. Hvala i dr. sc. Ivani Varenini, viša znan. sur. na pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela rada, susretljivosti i prijateljskom pristupu.

Hvala i mojim prijateljima i obitelji što su bili tu uz mene kroz ovih 5 godina i učinili ih lakšima.

Hvala Filipu na ljubavi, razumijevanju i strpljenju.

I za kraj, najveće hvala dugujem roditeljima. Mama i tata, hvala Vam na bezrezervnoj podršci, vjeri u mene u svakom trenutku, najveća zasluga za sva moja postignuća i ono što jesam danas pripada Vama!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ODREĐIVANJE OSTATAKA CEFALOSPORINSKIH ANTIBIOTIKA U JAJIMA LC-MS/MS METODOM

Roberta Ernek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058217867

Sažetak: Prekomjerna i neprikladna uporaba antibiotika pokrenula je razvoj antibiotske rezistencije u mikrobnim zajednicama. Antibiotici se pri uzgoju životinja ne koriste samo za liječenje infekcija, već izvan Europske unije i kao promotori njihovog rasta, što može uzrokovati kontaminaciju hrane životinjskog podrijetla ostacima antibiotika. Takva hrana može postati vektorom za prijenos antibiotske rezistencije na humani mikrobiom. Stoga je cilj ovog rada bio razviti metodu za identifikaciju ostataka cefalosporinskih antibiotika u jajima metodom tekućinske kromatografije – tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS) i usporediti dobivene rezultate s rezultatima mikrobiološkog testa za određivanje ostataka antibiotika. Mikrobiološki test ne može se koristiti kao metoda za određivanje ostataka cefalosporinskih antibiotika u jajima zbog nedovoljne osjetljivosti, za razliku od razvijene LC-MS/MS metode koja se prema dobivenim rezultatima pokazala pogodnom za određivanje ostataka cefalosporinskih antibiotika u jajima, osim za desfuroil-ceftiofur.

Ključne riječi: ostaci antibiotika, cefalosporinski antibiotici, antibiotska rezistencija, LC-MS/MS

Rad sadrži: 49 stranica, 17 slika, 19 tablica, 27 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Blaženka Kos

Komentor: dr. sc. Ivana Varenina, viša znan. sur., Hrvatski veterinarski institut

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
2. prof. dr. sc. Blaženka Kos
3. dr. sc. Ivana Varenina, viša znan. sur., Hrvatski veterinarski institut
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjenski član)

Datum obrane: 25. listopada 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

DETERMINATION OF CEPHALOSPORIN ANTIBIOTIC RESIDUES IN EGGS BY LC-MS/MS METHOD

Roberta Ernek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058217867

Abstract: Excessive and inappropriate use of antibiotics has triggered the evolution of antibiotic resistance in microbial communities. When raising animals, antibiotics are not only used to treat infections, but also outside the European Union as promoters of their growth, which can cause contamination of food of animal origin with antibiotic residues. Such food can become a vector for the transfer of antibiotic resistance to the human microbiome. Therefore, the aim of this work was to develop a method for the identification of cephalosporin antibiotic residues in eggs using the method of liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), to compare and obtain the results with the results of a microbiological test for the determination of antibiotic residues. The microbiological test cannot be used as a method for determining cephalosporin antibiotic residues in eggs due to insufficient sensitivity. On the contrary, according to the obtained results, the developed LC-MS/MS method proved to be suitable for the determination of residues of cephalosporin antibiotics in eggs, except for desfuroyl-ceftiofur.

Keywords: antibiotic residues, cephalosporin antibiotics, antibiotic resistance, LC-MS/MS

Thesis contains: 49 pages, 17 figures, 19 tables, 27 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Blaženka Kos, PhD, Full professor

Co-mentor: Ivana Varenina, PhD, senior research associate, Croatian Veterinary Institute

Reviewers:

1. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor
2. Blaženka Kos, PhD, Full professor
3. Ivana Varenina, PhD, Senior research associate, Croatian Veterinary Institute
4. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: October 25th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA	2
2.2. „ONE HEALTH“ KONCEPT	2
2.3. OSTATCI ANTIBIOTIKA U HRANI	3
2.4. BIOLOŠKI MEHANIZMI KOJI DOPRINOSU ŠIRENJU ANTIBIOTIČKE REZISTENCIJE	4
2.5. β- LAKTAMSKI ANTIBIOTICI	4
2.6. CEFALOSPORINI	5
2.6.1. Biosinteza cefalosporina	7
2.6.2. Mehanizam djelovanja cefalosporinskih antibiotika.....	8
2.6.3. Mehanizmi bakterijske rezistencije na cefalosporinske antibiotike	9
2.7. ODREĐIVANJE REZIDUA CEFALOSPORINA U HRANI ANALITIČKIM METODAMA	9
2.7.1. LC-MS/MS	11
2.7.2. Mehanizmi fragmentacije cefalosporina	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.2. KEMIKALIJE	15
3.3. OPREMA I MATERIJALI	15
3.4. STANDARDI	16
3.5. PRIPREMA UZORAKA JAJA	16
3.6. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKIH TVARI MIKROBIOLOŠKIM TESTOM	16
3.6.1. Priprema negativnog uzorka	17
3.6.2. Priprema uzorka sa standardnim dodatkom	17
3.6.3. Ekstrakcijska procedura za uzorke jaja	18
3.6.4. Kontrola kvalitete rezultata	18
3.6.5. Prikaz rezultata.....	18
3.7. ODREĐIVANJE CEFALOSPORINA LC-MS/MS METODOM	19
3.7.1. Postupanje s uzorcima	19
3.7.2. Priprema otopina	19
3.7.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova.....	19
3.7.4. Priprema standardne krivulje na otapalu i standarda za kontrolu stabilnosti sustava	20
3.7.5. Priprema matriks kalibracijske krivulje.....	20
3.7.6. Kontrolni uzorak stanja instrumenta	21
3.7.7. Kontrolni uzorak slijepe probe.....	21

3.7.8.	Negativni kontrolni uzorak otapala.....	21
3.7.9.	Negativni kontrolni uzorak matriksa.....	21
3.7.10.	Obogaćeni kontrolni uzorak – analiza mišićnog tkiva i mlijeka	21
3.7.11.	Pročišćavanje uzorka (QUECHERS ekstrakcija)	21
3.7.12.	Mjerenje na LC-MS/MS uređaju	22
4.	REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1.	MIKROBIOLOŠKI TEST	25
4.2.	TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS) ..	27
4.2.1.	LC kromatogrami.....	27
4.2.2.	Specifičnost metode	27
4.2.3.	Ponovljivost metode	28
4.2.4.	Linearnost.....	44
5.	ZAKLJUČCI.....	46
6.	LITERATURA.....	47

1. UVOD

Antibiotska rezistencija predstavlja jedan od gorućih problema današnjice kada su u pitanju zdravlje i medicina, iako je to prirodna pojava do koje dolazi zbog nastanka genskih mutacija. Prekomjerna i neprikladna uporaba antibiotika ubrzala je evoluciju bakterija i dovela čovječanstvo do post-antibiotske ere zbog čega se sve češće nailazi na neuspjeh u liječenju bakterijskih infekcija (Lim i sur., 2024). Jedan od vodećih problema jest alarmantan porast kontaminacije hrane antibioticima, naime, kontaminirana hrana može biti vektor za prijenos antibiotske rezistencije što dovodi do niza infekcija koje mogu rezultirati dužim trajanjem bolesti, povećanim troškovima zdravstvene skrbi, a ponekad i životno opasnim ishodima (Okaiyeto i sur., 2024).

Antibiotici su, prema definiciji, specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprječavajući im rast ili uništavajući ih. β -laktami su najraširenija skupina antimikrobnih lijekova koja se zbog vrlo snažnog mikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti najčešće koristi u humanoj i veterinarskoj medicini u liječenju bakterijskih infekcija, a dijele se na peniciline, cefalosporine, cefamicine, 7- α -formilaminocefalosporine, karbapeneme, oksapeneme (klavame), nokardicine i monobaktame (Šušćović i Kos, 2022; Solomun Kolanović i sur., 2011).

Cilj ovoga rada bio je validirati metodu za određivanje ostataka cefalosporinskih antibiotika u jajima primjenom tekućinske kromatografije - tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS) te usporediti dobivene rezultate s rezultatima dobivenim mikrobiološkim testom za određivanje rezidua antibiotika.

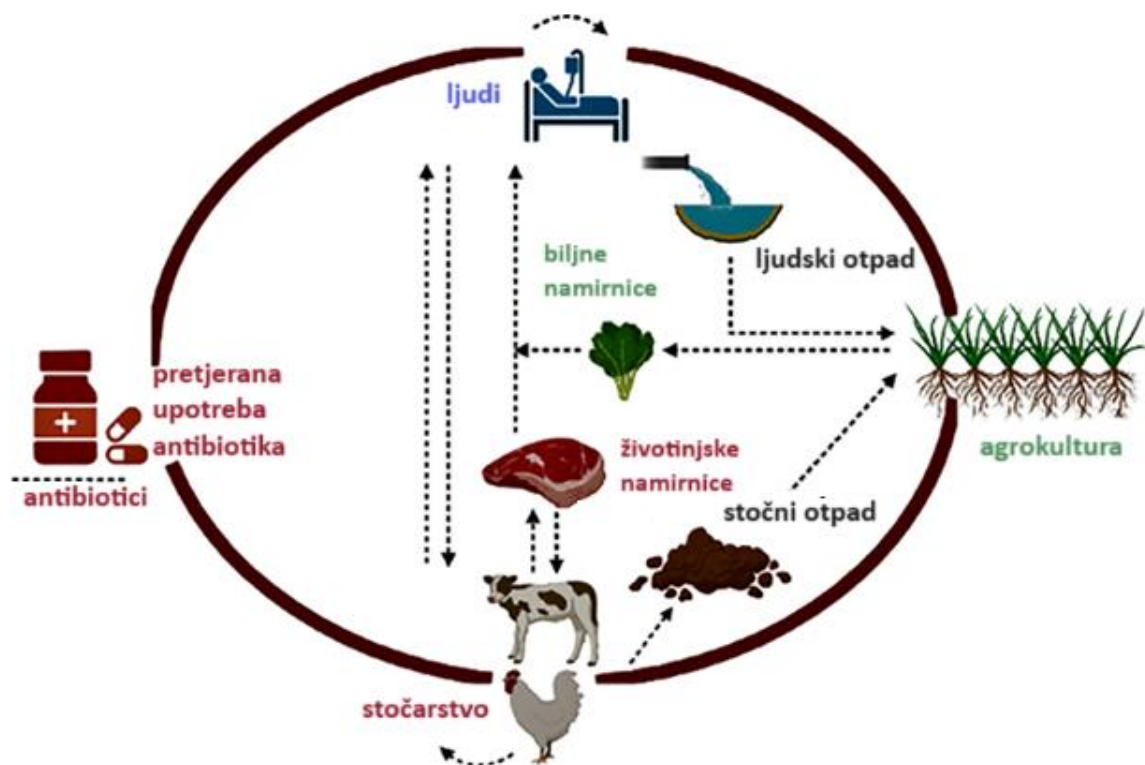
2. TEORIJSKI DIO

2.1. ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA

Antibiotička rezistencija predstavlja jedan od gorućih problema današnjice kada su u pitanju zdravlje i medicina. Iako je to prirodna pojava do koje dolazi zbog nastanka genskih mutacija, prekomjerna i neprikladna uporaba antibiotika ubrzala je evoluciju bakterija i dovela čovječanstvo do post-antibiotičke ere zbog čega se sve češće nailazi na neuspjeh u liječenju bakterijskih infekcija. Intrinzična rezistencija nastalih kromosomskih mutacija definira se kao svojstvo koje je zajedničko unutar bakterijske vrste, neovisno je o prethodnoj izloženosti antibioticima te nije povezana s horizontalnim prijenosom gena. Takve rezistentne bakterije mogu prenositi gene odgovorne za rezistenciju na druge, prethodno osjetljive bakterije što se naziva horizontalna evolucija. Ovaj način širenja antimikrobne rezistencije (engl. *AMR – antibiotic microbial resistance*) brz je zbog prisutnosti plazmida i drugih pokretnih genetičkih elemenata kao što su integroni, transpozoni i genomski otoci (Lim i sur., 2024). Obzirom da se bakterije i geni često prelaze granice okoliša i vrsta, ključno je razumjeti veze između ljudske, životinjske i okolišne mikrobiote (One Health koncept) (Larsson i Flach, 2022).

2.2. „ONE HEALTH“ KONCEPT

„One Health“ je objedinjujući pristup koji za cilj ima održivu ravnotežu i optimizaciju zdravlja ljudi, životinja i ekosustava (slika 1). Koncept „One Health“ nije nov, njegovo postojanje seže do 200 godina unatrag, najprije kao „One Medicine“, a zatim i „One Health, One World“. Ovo je načelo bilo ključan korak u prepoznavanju važnosti interdisciplinarnih pristupa za odgovor na pojavu bolesti, a posebice za uključivanje zdravlja životinja kao esencijalne komponente globalne prevencije, nadzora, kontrole i smanjenja bolesti. Iako se „One Health“ koncept prvenstveno usredotočuje na međudnos životinje-čovjek-ekosustav, njegov djelokrug obuhvaća i druge domene uključujući zdravlje okoliša i ekosustava, društvene znanosti, ekologiju, divlje životinje i bioraznolikost (Aslam i sur., 2021; Mackenzie i Jeggo, 2019).



Slika 1. One Health pristup i potencijalna povezanost s antimikrobnom rezistencijom (prema Aslam i sur., 2021)

2.3. OSTATCI ANTIBIOTIKA U HRANI

Kako bi se zadovoljile globalne potrebe za potražnjom hrane, uobičajena praksa proizvodnje počela se mijenjati što je dovelo do brojnih prijetnji i problema u sigurnosti hrane. Jedan od vodećih problema jest alarmantan porast kontaminacije hrane antibioticima i pokretanje evolucije antibiotske rezistencije u mikrobnim zajednicama. Kontaminirana hrana može biti vektor za prijenos antibiotske rezistencije što dovodi do niza infekcija koje mogu rezultirati dužim trajanjem bolesti, povećanim troškovima zdravstvene skrbi, a ponekad i životno opasnim ishodima.

Antibiotici se u poljoprivredi koriste ne samo za liječenje ili prevenciju infekcija već i za povećanje stope rasta životinja kako bi se zadovoljila golema potražnja tržišta za mesom i životinjskim proizvodima što stvara idealne uvjete za širenje antimikrobne rezistencije kod životinja i ljudi. U zemljama gdje nije regulirana neselektivna upotreba antibiotika, u životinjskim proizvodima identificirani su mikroorganizmi rezistentni na više vrsta antibiotika.

Zloupotreba antibiotika rezultira velikim količinama rezidua antibiotika u stočnom otpadu koji se onda koristi kao anorgansko gnojivo za usjeve nakon čega rezidue prodiru u tlo i dospijevaju u podzemne vode. Nakon što se nađu u okolišu, vrše selektivni pritisak na prirodnu mikrobiotu što dovodi do pojave rezistentnih mikroorganizama u tlu (Okaiyeto i sur., 2024).

2.4. BIOLOŠKI MEHANIZMI KOJI DOPRINOSE ŠIRENJU ANTIBIOTIČKE REZISTENCIJE

Odgovor bakterija na invaziju antibiotika jasan je dokaz evolucijske prilagodbe. Bakterijske stanice su genetički plastične što znači da mogu promijeniti svoj genetski kod kako bi se prilagodile uvjetima. Taj se proces može odviti vrlo brzo, u roku od 10 minuta, te ima potencijal radikalno promijeniti način na koji bakterije komuniciraju s okolinom što omogućuje širenje antibiotičke rezistencije stopama koje znatno opterećuju spektar trenutno učinkovitih antibiotika zbog čega je Svjetska zdravstvena organizacija patogene rezistentne na antibiotike proglasila vodećom prijetnjom javnom zdravlju u 21. stoljeću. Bakterije mogu primiti genetski materijal, uključujući gene odgovorne za nastanak rezistencije, putem dva mehanizma: horizontalnog i vertikalnog transfera gena.

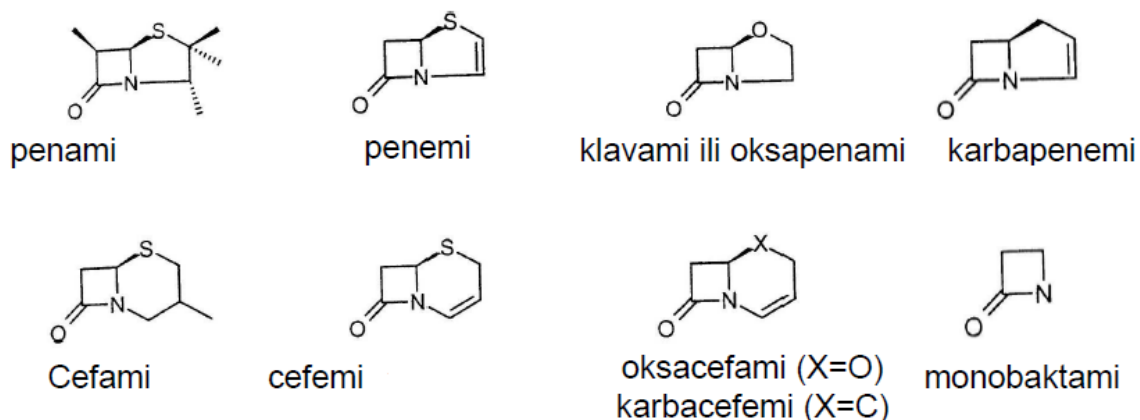
Vertikalni transfer gena, koji se naziva još i intrinzična antibiotička rezistencija, događa se u fazi evolucije te se genske mutacije nakupljaju u plazmidu ili kromosomu bakterijskih stanica. Jednostavan primjer intrinzične rezistencije je nedostatak ili gubitak mjesta djelovanja antibiotika.

Horizontalni transfer gena, koji se naziva i stečena antibiotička rezistencija, ima ključnu ulogu u specijaciji bakterija i razmjeni gena između vrsta. Mikroorganizmi stječu nove gene primanjem pokretnih genetičkih elemenata. Mehanizmi horizontalnog transfera gena mogu se klasificirati u tri skupine od kojih svaka ima različite implikacije na razvoj rezistencije. Prva skupina uključuje mutacije koje modificiraju mjesto djelovanja antibiotika. Druga skupina uključuje mehanizme koji modificiraju ili hidroliziraju molekulu antibiotika. Treću skupinu čine mehanizmi koji sprječavaju ulazak antibiotika u bakterijsku stanicu ili olakšavaju njihov efluks (Okaiyeto i sur., 2024).

2.5. β - LAKTAMSKI ANTIBIOTICI

Antibiotici su, prema definiciji, specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprječavajući im rast ili uništavajući ih. Osim onih prirodnih, dobivenih mikrobnom biosintezom, postoje i polusintetski i sintetski antibiotici, to jest kemijski spojevi nastali kemijskom modifikacijom antibiotika proizvedenih biosintezom (Šušković i Kos, 2022). β -laktamski antibiotici najraširenija su skupina antimikrobnih lijekova te se zbog iznimno snažnog mikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti najčešće koriste u humanoj i veterinarskoj medicini u liječenju bakterijskih infekcija (Solomon Kolanović i sur., 2011). Prema strukturi se dijele na peniciline, cefalosporine, cefamicine, 7- α -formilaminocefalosporine, karbapeneme, oksapeneme (klavame), nokardicine i monobaktame (slika 2), a zajedničko im je da u svojoj

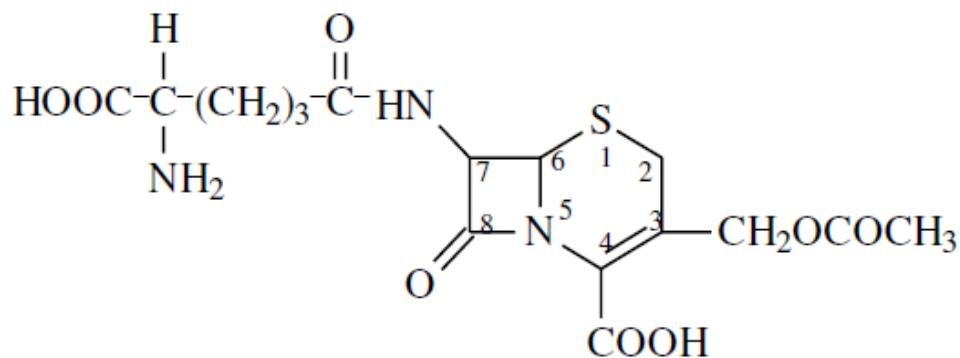
strukturi sadrže četveročlani β -laktamski prsten. Niske su toksičnosti za ljude. Mnogi od ovih spojeva imaju slabu antibiotičku aktivnost, no neki od njih su, poput klavulanske kiseline (klavami), inhibitori β -laktamaze te su stoga našli terapijsku primjenu u kombinaciji s različitim β -laktamskim antibioticima (Šušković i Kos, 2022).



Slika 2. Osnovne strukture β -laktamskih antibiotika (Šušković i Kos, 2022)

2.6. CEFALOSPORINI

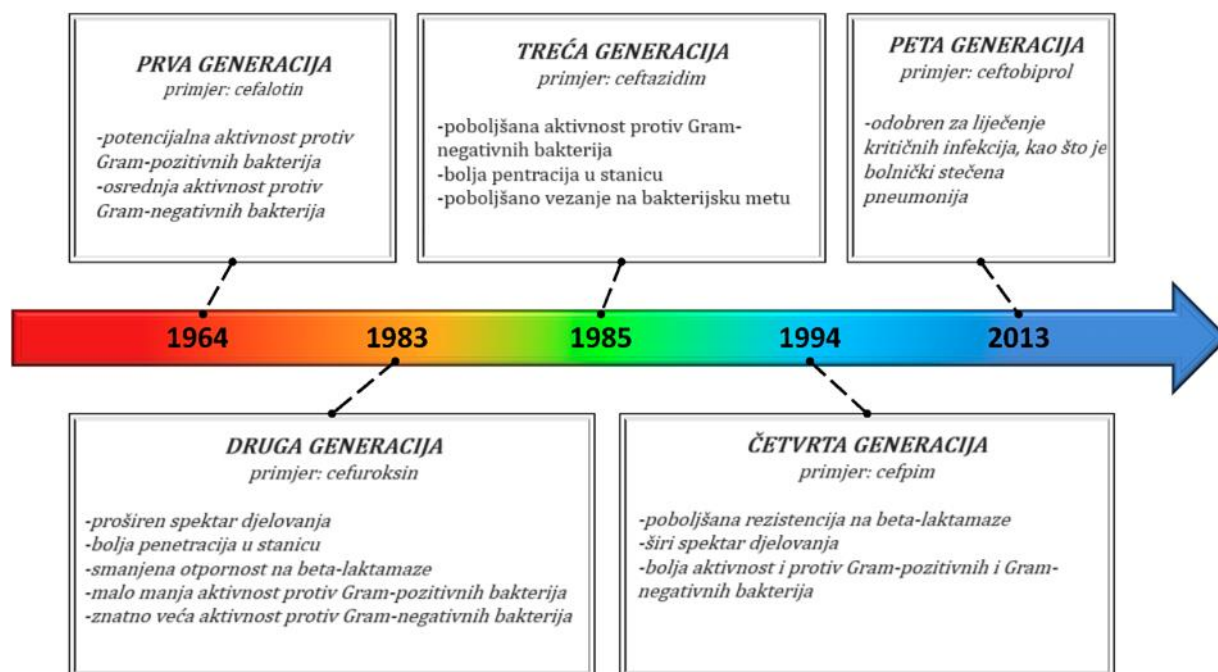
Iz kulture plijesni aktinomiceta izolirana su tri cefalosporina: P, N i C. Cefalosporin C je derivat 7-amino-cefalosporinske kiseline koja sadrži jedan dihidrotiazinski i jedan β -laktamski prsten (slika 3). Cefalosporinski antimikrobni lijekovi su topljivi u vodi i razmjerno stabilni u kiselini. U odnosu na peniciline, stabilniji su na temperaturne promjene i promjene pH sredine. Njihova je aktivnost općenito slabija u usporedbi s penicilinima, no imaju širi raspon djelovanja (Solomon Kolanović i sur., 2011).



CEFALOSPORIN C

Slika 3. Struktura cefalosporina C (Šušković i Kos, 2022)

Cefalosporini se klasificiraju prema generacijama i do sada je razvijeno pet generacija (Ribeiro da Cunha i sur., 2019). Prva generacija je najdjelotvornija na gram-pozitivne koke, uključujući MSSA (meticilin osjetljivi *Staphilococcus aureus*) i streptokoke. Prvoj generaciji pripadaju cefadroksil, cefaleksin, cefradin i cefazolin. Zbog veće otpornosti na β -laktamaze gram-negativnih bakterija, druga generacija ima pojačanu aktivnost protiv Enterobacteriaceae, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*, no imaju slabiju aktivnost protiv gram-negativnih patogena u odnosu na treću generaciju. Cefalosporini druge generacije također imaju dobru aktivnost na PRSP (penicilin rezistentni *Streptococcus pneumoniae*), a u njih se ubrajaju cefaklor, cefprozil, cefuroksim i cefamicini, odnosno cefoksitin. Treću generaciju cefalosporina čine cefoperazon, cefotaksim, ceftazidim i cefriakson. Koriste se kao baktericidi za gram-negativne bakterije. Cefalosporini četvrte generacije su cefepim, cefpirom i cefkvinom (Harrison i Bratcher, 2008). Razvijena je i peta generacija cefalosporinskih antibiotika s poboljšanom antimikrobnom aktivnošću prema širokom spektru bakterija te većom otpornošću na djelovanje β -laktamaza u odnosu na prethodne generacije ovih antibiotika (slika 4).

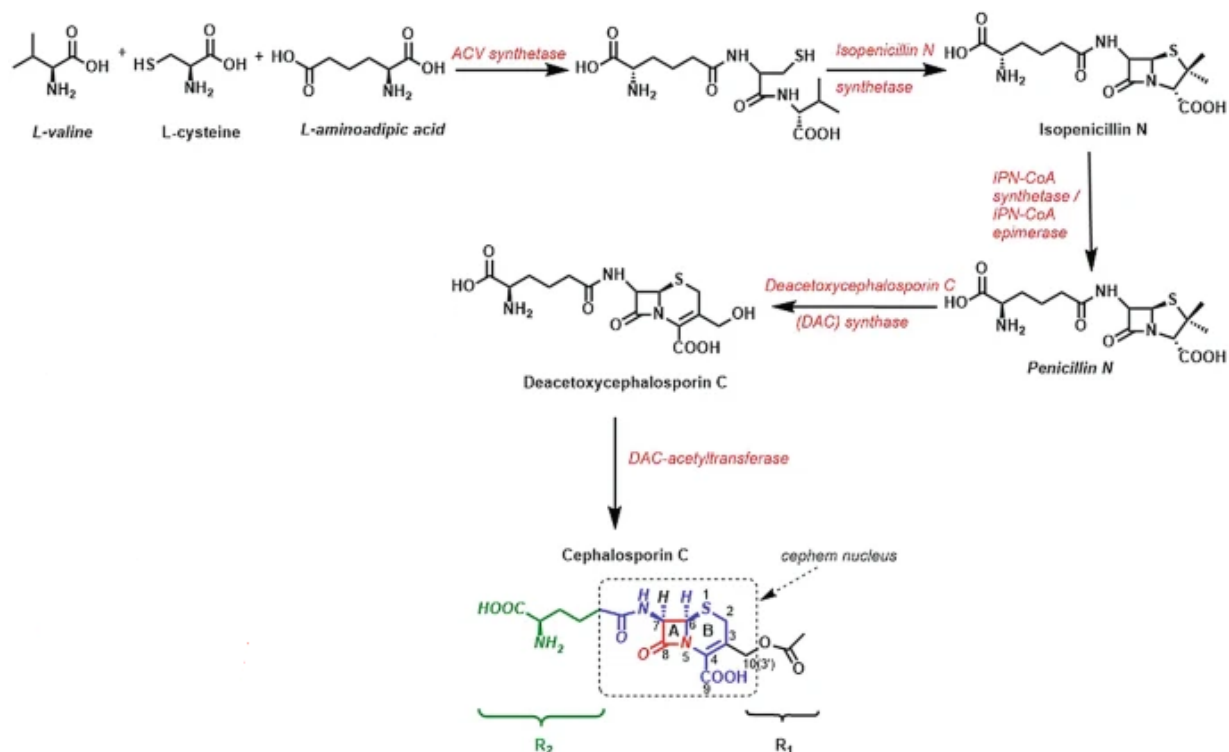


Slika 4. Razvoj cefalosporinskih antibiotika po generacijama (prema Ribeiro da Cunha i sur., 2019)

2.6.1. Biosinteza cefalosporina

β -laktamski antimikrobni lijekovi (penicilini i cefalosporini) izolirani su iz sojeva različitih plijesni. Prva dva koraka biosinteze penicilina i cefalosporina su identična. Svi penicilini i cefalosporini koje proizvode eukariotski ili prokariotski mikroorganizmi sintetiziraju se iz tri aminokiseline: L- α -aminoadipinske kiseline (L- α -AAA), L-cisteina i L-valina. U prvoj reakciji biosinteze prekursori aminokiseline se kondenziraju u tripeptid δ -(L- α -aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valin (ACV). Ovu reakciju katalizira multifunkcionalni enzim δ -(L- α -aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valin sintetaza (ACV sintetaza) mehanizmom tiokalupa. Iduća reakcija je oksidativno zatvaranje prstena linearnog tripeptida u biciklički prsten, četveročlani β -laktamski prsten pridružen peteročlanom tiazolidinskom prstenu. Ciklizacija uključuje dva desaturacijska stupnja u kojima je kisik akceptor vodika, a Fe^{2+} kofaktor. Ovu reakciju provodi izopenicilin N sintaza, a nastaje izopenicilin N, posljednji zajednički intermedijer biosinteze penicilina i cefalosporina. Prvi korak biosinteze cefalosporina je sinteza penicilina N reakcijom izomerizacije L- α -AAA bočnog lanca izopenicilina N u D-enantiomer koju provodi sustav izopenicilin N epimeraza. Penicilin N se djelovanjem deacetoksicefalosporin C sintetaze prevodi u deacetoksicefalosporin C (DAOC). Ovaj korak uključuje oksidativno otvaranje tiazolidinskog prstena i zatvaranje u šesteročlani dihidrotiazinski prsten, koji je karakterističan za sve cefalosporine, mehanizmom sličnim onome pri formiranju izopenicilina N te također zahtjeva kisik kao kosupstrat i Fe^{2+} kao kofaktor. Sljedeći stupanj je oksidacija i hidroksilacija 3-metilne skupine deacetoksicefalosporina C u

deacetylcefalosporin C (DAC) koji je posljednji zajednički metabolit u sintezi cefalosporina i cefamicina. Ovu reakciju katalizira enzim DAOC sintetaza/DAC hidroksilaza. U posljednjem koraku biosinteze cefalosporina C, acetilni ostatak acetil koenzima A se djelovanjem enzima acetil koenzim A deacetylcefalosporin C acetiltransferaze prebacuje na hidroksilnu skupinu deacetylcefalosporina C (slika 5) (Solomun Kolanović i sur., 2011).

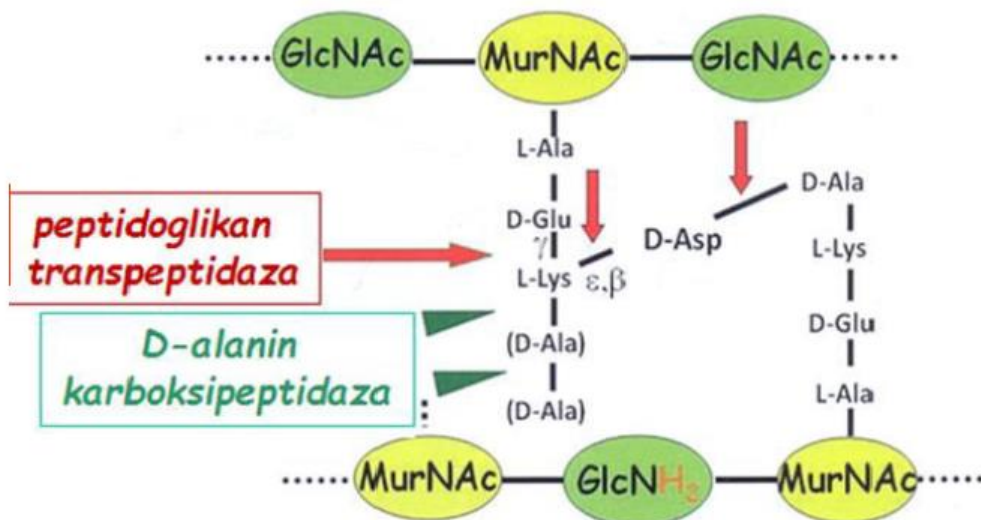


Slika 5. Biosinteza cefalosporina (De Rosa i Marabotti, 2021)

2.6.2. Mehanizam djelovanja cefalosporinskih antibiotika

β -laktamski antibiotici djeluju baktericidno, a osnovni mehanizam njihovog baktericidnog djelovanje je inhibicija sinteze bakterijske stanične stijenke. Gram-pozitivne i gram-negativne bakterije u svojoj građi sadrže sloj umreženih polimera peptidoglikanskih lanaca. Peptidoglikanski sloj sastavni je dio stanične stijenke koja obavlja citoplazmatsku membranu bakterijske stanice čime joj osigurava čvrstoću, sprječava lizu stanice pri visokom osmotskom tlaku te daje oblik stanici. Glavne komponente peptidoglikana su polisaharidi koji nastaju naizmjeničnim povezivanjem N-acetil glukoamina i N-acetil muraminske kiseline, a na završetku se nalaze D-alanil-D-alanin aminokiselinski ostatci. Nastajanje peptidoglikana odvija se u nekoliko stupnjeva, a β -laktamski antibiotici djeluju u posljednjima. U reakciji transpeptidacije, pentapeptid vezan na N-acetil muraminsku kiselinu jednog polisaharidnog lanca veže se za isti takav peptid susjednog lanca pri čemu otpušta terminalni D-alanin posredovanjem transpeptidaze (slika 6), enzima koji pripada skupini proteina koji vežu penicilin

(engl. *penicilin-binding proteins - PBP*).



Slika 6. Nastajanje interpeptidnog mosta prilikom formiranja peptidoglikana (Šušković i Kos, 2022)

β -laktamski antibiotici strukturni su analozi D-alanil-D-alanin konformacije, stoga se kovalentno vežu na aktivno mjesto PBP-a pri čemu inhibiraju reakciju transpeptidacije (Šalković-Petrišić i Bradamante, 2014). Uz sprječavanje sinteze stanične stijenke, β -laktamski antibiotici inaktiviraju inhibitore autolitičkih enzima u staničnoj stijenci što dovodi do liziranja bakterijske stanice. Dakle, djelovanje cefalosporinskih antibiotika zasniva se na istom mehanizmu kao i ostalih β -laktama, inhibiraju enzime neophodne za sintezu stanične stijenke vežući se na PBP (Mehta i Sharma, 2016).

2.6.3. Mehanizmi bakterijske rezistencije na cefalosporinske antibiotike

Svaki soj bakterija posjeduje različite vrste PBP-a. Mutacije u genima za PBP koje dovode do strukturnih promjena PBP-a mogu smanjiti vjerojatnost penetracije β -laktamskih antibiotika u bakterijsku stanicu obzirom da dolazi do smanjenja afiniteta PBP-a za vezanje β -laktamskih antibiotika. Drugi vrlo čest način razvoja rezistencije na cefalosporinske antibiotike je sinteza β -laktamaze, enzima koji cijepa β -laktamski prsten pri čemu dolazi do hidrolize molekule antibiotika (Shahbaz, 2017; Šalković-Petrišić i Bradamante, 2014).

2.7. ODREĐIVANJE REZIDUA CEFALOSPORINA U HRANI ANALITIČKIM METODAMA

Unošenje antimikrobnih lijekova u ljudski organizam hranom izrazito je opasno zbog njihove direktne toksičnosti, odnosno kancerogenosti, utjecaja na sastav crijevne mikroflore, mogućih

alergijskih reakcija te pojave rezistencije. U svrhu zaštite zdravlja potrošača i osiguranja kvalitete proizvodnje Europska Unija je Uredbom (Europska Komisija, 2010) utvrdila najveće dopuštene količine (NDK) ostataka antimikrobnih lijekova u hrani životinjskog podrijetla. U skladu s time u Hrvatskoj su ostatci veterinarskih lijekova određeni Pravilnikom o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (NN 21/2011). U tablici 1 prikazane su NDK vrijednosti ostataka cefalosporina u hrani životinjskog podrijetla.

Tablica 1. Najveće dopuštene koncentracije (NDK, µg/kg) ostataka cefalosporina prema Pravilniku o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (NN 21/2011)

CEFALOSPORINI	Životinjska vrsta	Mišić	Jetra	Bubreg	Masno tkivo	Mlijeko
Cefaleksin	goveda	200	200	100	200	100
Cefapirin	goveda	50	-	1000	50	60
Cefazolin	goveda, ovce,koze	-	-	-	-	50
Ceftiofur	sve	1000	2000	6000	2000	100
Cefalonij	goveda	-	-	-	-	100
Cefoperazon	goveda	-	-	-	-	50
Cefacetril	goveda	-	-	-	-	125
Cefkvinom	goveda	50	100	200	50	20

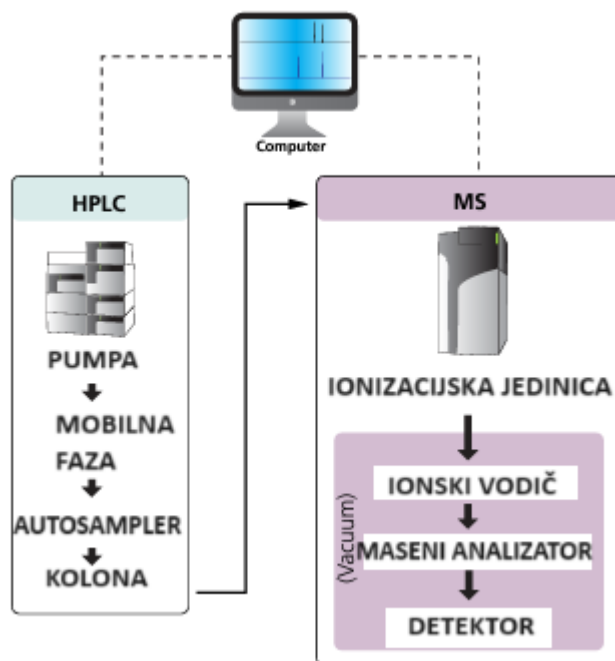
Metode određivanja ostataka antibakterijskih lijekova mogu biti kvalitativne (mikrobiološki i imuno-enzimatski testovi) i kvantitativne (pojedini imuno-enzimatski testovi, plinska i tekućinska kromatografija). Kao orijentacijske metode primjenjuju se mikrobiološke metode kao što su STAR (engl. *Structured Transparent Accessible Reproducible*) protokol, Premi® i Delvo® test i NAT (engl. *Nucleid Acid Test*) test. Identifikacija i detekcija, odnosno kvantifikacija β-laktama moguća je primjenom tekućinske kromatografije s UV ili fluorescentnom detekcijom nakon postupka derivatizacije. Većina analitičkih metoda razvijenih za kvantitativnu analizu β-laktama u hrani danas se temelji na tekućinskoj kromatografiji povezanoj sa spektrometrijom masa (LC-MS), tekućinskoj kromatografiji - tandemskoj spektrometriji masa (LC-MS/MS) ili tekućinskoj kromatografiji - tandemskoj spektrometriji masa „u stupici“ iona (LC-IT-MS/MS) (Solomon Kolanović i sur., 2011).

Kontinuirana evolucija tehnologije, zajedno s rastućom potražnjom za vrlo učinkovitim,

isplativim metodama detekcije, utrla je put razvoju luminiscentnih senzora. Korištenje luminiscentne analize novi je suvremeni pristup za detekciju rezidua antibiotika u hrani. Luminiscentna analiza visoko je osjetljiva metoda s brzim vremenom odgovora, visoko specifična te pojednostavljuje analitičke postupke zbog čega je posljednjih godina razvijen niz senzora za detekciju antibiotika. Senzori koriste različite strategije prepoznavanja, a one uključuju molekularni otisak, biološku interakciju, koordinacijske veze s lantanoidnim ionima te izravno vezanje s luminiscentnim nanomaterijalima (Zhang, 2024).

2.7.1. LC-MS/MS

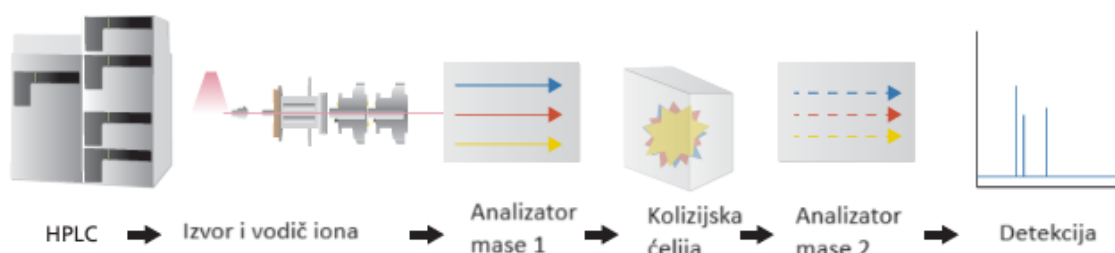
Tekućinska kromatografija je analitička metoda koja se koristi za separaciju otopljenih tvari. Tvari iz otopina s različitim afinitetom stupaju u interakcije s nepokretnom fazom i tekućom pokretnom fazom zbog razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli između faza ili veličini tvari koje se razdvajaju te imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni. Pogodna je za razdvajanje termički nestabilnih tvari zbog čega se može jednostavno spregnuti s masenim spektrometrom (Cindrić, 2009). Masena spektrometrija je visoko osjetljiva metoda detekcije koja ionizira komponente uzorka, u vakuumu odvaja nastale ione na temelju omjera njihovih masa i volumena (m/z) te mjeri intenzitet svakog iona. Sprezanjem tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom jednostavno se mogu dobiti informacije o molekularnoj masi i strukturi ioniziranih i fragmentiranih komponenti koje dopunjuju kvalitativne informacije temeljene na retencijskim vremenima. Tipični LC-MS sustav prikazan je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz LC-MS sustava (prema Ichiro, 2019)

Jednostruka masena spektrometrija ponekad ne pruža pouzdane kvalitativne i kvantitativne rezultate, primjerice kada rezolucija nije zadovoljavajuća. To je osobito slučaj kada je matriks uzorka kompleksan, a analiti se u njemu nalaze u tragovima pa je potrebna metoda koja pruža veću selektivnost, specifičnost i osjetljivost.

Tandemska spektrometrija masa (MS/MS) je sustav koji se sastoji od dva analizatora mase spojena u seriju s kolizijskom ili fragmentacijskom ćelijom između njih. Ioni se razdvajaju u prvom analizatoru mase (MS1), ulaze u kolizijsku ćeliju i podvrgavaju se fragmentaciji što rezultira nastajanjem produkt iona koji se razdvajaju i detektiraju u drugom analizatoru mase (MS2) (slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz tandemске spektrometrije masa LC-MS/MS (prema Ichiro, 2019)

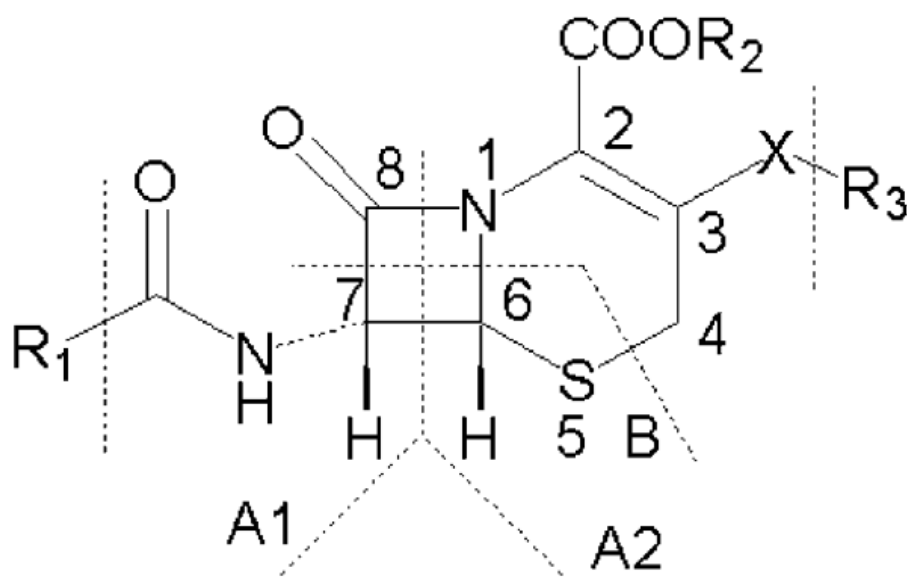
Kolizijski inducirana disocijacija (CID) najčešća je metoda fragmentacije u kolizijskoj ćeliji. Prekursor ioni koji su separirani u prvom kvadrupolu MS1 na temelju određenog omjera mase i naboja (m/z) ulaze u kolizijsku ćeliju koja je ispunjena inertnim plinom dušika. Tada dolazi do kolizije prekursor iona i molekula inertnog plina koja je inducirana primjenom oscilirajućeg polja. Kolizije uzrokuju pretvorbu kinetičke energije u molekularnu ekscitaciju koja uzrokuje pucanje kemijske veze generirajući pri tome produkt ione. Stupanj fragmentacije prekursor iona i vrste produkt iona ovise o količini primijenjene energije jer različite veze zahtijevaju različitu količinu aktivacijske energije kako bi disocirale (Ichiro, 2019).

Trostruki kvadrupolni (QqQ) maseni spektrometar najčešće je korišten tandemski maseni spektrometar za analizu antibiotika zbog njegove sposobnosti generiranja kvantitativnih podataka s izvanrednom osjetljivošću, ponovljivošću i dinamičkim rasponom. Koristi iste principe razdvajanja iona kao i pojedinačni kvadrupol (Wang i sur., 2011). Kvadrupol se sastoji od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane pri čemu jedan par ima pozitivni, a drugi negativni polaritet te su parovi dodatno spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje (Cindrić, 2009). Razdvaja ione prema njihovom omjeru m/z kao funkciji putanje kroz oscilirajuće električno polje. Dok se ioni ubrzavaju kroz to dinamičko električno polje, oni osciliraju na način da samo ioni specifičnih m/z imaju stabilnu putanju do detektora. U trostrukom kvadrupolu nalaze se tri niza kvadrupolnih šipki. Prvi i zadnji kvadrupol djeluju kao

ionski filtri koristeći različite napone radiofrekvencije i izmjenične struje poput pojedinačnog kvadrupola. Srednji kvadrupol je reakcijska ćelija u kojoj se provodi CID reakcija. Trostruki kvadrupol može raditi u četiri različita načina rada s CID-om: MRM skeniranje (engl. *Multiple-reaction monitoring*), SRM skeniranje (engl. *Selected-reaction monitoring*), skeniranje prekursor iona i skeniranje konstantnog neutralnog gubitka. MRM skeniranje je najčešće korištena funkcija za kvantifikaciju i potvrdu. Prvi kvadrupol filtrira odabrani prekursor ion u kolizijskoj ćeliji te se taj ion kolizijski disocira u produkt ione. Mali broj tih produkt iona, oni koji su odabrani zbog njihove strukturne važnosti, prolazi kroz treći kvadrupol do detektora. MRM filtrira šum matriksa što rezultira superiornom selektivnošću i visokom osjetljivošću (Wang i sur., 2011).

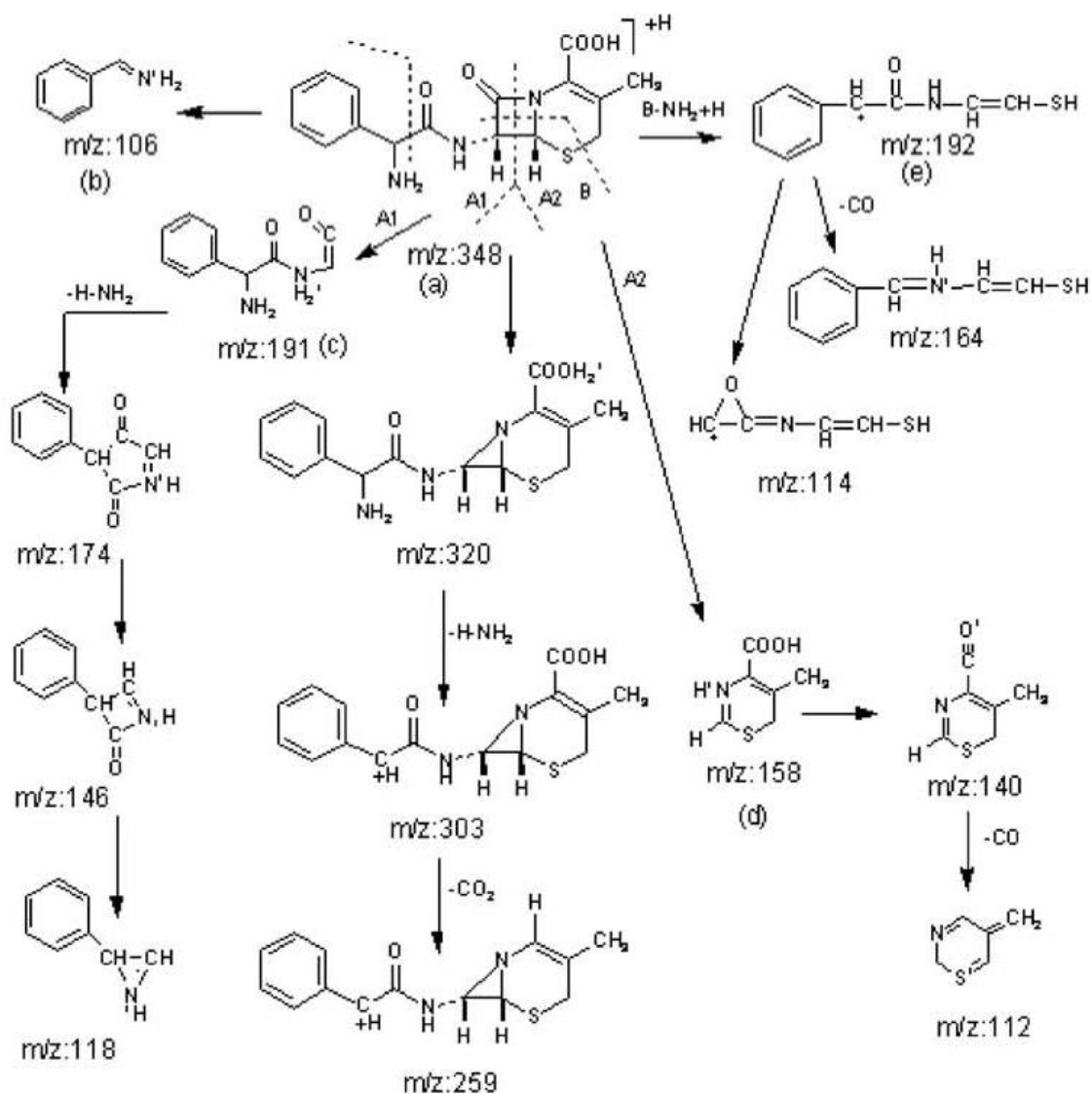
2.7.2. Mehanizmi fragmentacije cefalosporina

Uočeno je da se cefalosporini prilikom elektrosprej ionizacije (ESI) u pozitivnom načinu rada uvijek fragmentiraju istim mehanizmima. Mehanizam A uključuje cijepanje amidne veze i C6-C7 jednostruke veze β -laktamskog prstena dok se unutar β -laktamskog prstena odvija [2,2]-trans-Diels-Alder cijepanje. Nastali fragment A1 sadrži R1 skupinu dok fragment A2 predstavlja šesteročlanu heterocikličku strukturu. Mehanizam B uključuje cijepanje C7-C8 jednostruke veze β -laktamskog prstena kao i N1-C6 i C5-S6 jednostrukih veza šesteročlanog heterocikličkog prstena. Ovaj se proces odvija α -cijepanjem C7-C8 jednostruke veze koje je inducirano karbonilnom skupinom na položaju 8, dok istovremeno dolazi do [2,4]-trans-Diels-Alder cijepanja unutar šesteročlanog heterocikličkog prstena. Produkt ioni nastali ovim mehanizmom fragmentacije daju strukturne informacije o supstituentu R1 i matriksu (slika 9).



Slika 9. Mehanizmi parcijalne fragmentacije cefalosporina (Li i sur., 2010)

Produkt ioni koji nastaju elektrosprej ionizacijom cefaleksina su $A_1 + H$ i $A_2 + H$ cijepanjem β -laktamskog prstena te R1, a do njihovog nastanka dolazi nakon gubitka $-C=O$ skupine β -laktamskog prstena. Nakon ovih bazičnih reakcija, ostali produkt ioni nastaju gubitkom manjih fragmenata molekule cefaleksina (Chong i Hu, 2008). Mehanizam nastanka produkt iona cefaleksina prikazan je na slici 10.



Slika 10. Glavni mehanizmi fragmentacije cefaleksina (Li i sur., 2010)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Materijale predstavljaju kokošja jaja prikupljena s farmi u sklopu državnog monitoringa odmjerena u količini od 2 g za mikrobiološki test i 5 g za LC-MS/MS koja su u prethodnim analizama pokazala negativan rezultat na prisutnost antibiotika.

3.2. KEMIKALIJE

- Acetonitril (J. T. Baker, SAD ili ekvivalentno)
- Aceton (Sigma – Aldrich, SAD ili ekvivalentno)
- Lab Lemco broth (Oxoid, UK ili ekvivalentno)
- Voda, LC/MS (J. T. Baker, SAD ili ekvivalentno)
- Ultra čista voda (uređaj za ultra čistu vodu), Milli-Q system Millipore®, SAD
- Acetonitril, LC-MS čistoće (Biosolve Chimie, Francuska)
- Metanol, LC-MS čistoće (Biosolve Chimie, Francuska)
- Mravlja kiselina, 98 - 100%, LC - MS čistoće (Honeywell Burdick Jackson, SAD)
- EMR-Lipid dSPE tube (Agilent p/n 5982 – 1010, SAD)
- Polish pouch (Agilent p/n 59820102, SAD)
- Amonijev acetat, HPLC grade (Honeywell Burdick Jackson, SAD)
- DMSO, HPLC grade (Honeywell Burdick Jackson, SAD)
- Na₂EDTA (Honeywell Burdick Jackson, SAD)

3.3. OPREMA I MATERIJALI

- vaga (Ohaus) i posude za vaganje
- rukavice
- homogenizatori (blender, Ultra Turrax, mixer)
- centrifuga s termostatom (Rotanta 460R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka))
- oprema za uparavanje dušikom (MultiVap 54, LabTech)
- MCI- inkubator
- MCI-12 Premi® test 2-Steps inkubator
- škare
- laboratorijsko posuđe (tikvice, konusne epruvete)
- termometar
- automatske pipete volumena 10 - 100 µL, 20 - 200 µL i 100 - 1000 µL (Eppendorf)
- štoperica

- hladnjak + 2/+ 8 °C
- ledenica s najnižom temperaturom od - 18 °C
- polipropilenske epruvete 15 mL (Eppendorf)
- precizne analitičke pipete volumena od 10 µL do 5 mL (Eppendorf)
- centrifuga s max 15000 o/min (Thermo Fisher Scientific, Watham MA, SAD)
- vortex homogenizator (IKA® Vortex MS2 Minishaker (IKA® - WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Njemačka))
- Epruvete za ultracentrifugu volumena do 2 mL (Eppendorf)
- HPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity
- Agilent Triple Quad 6470A
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1x150 mm, Part No.186003540, Waters
- Predkolona: Acquity HSS T3 1.8 µM vanguard Pre-Col, Waters

3.4. STANDARDI

- Cefaleksin (Vetranal)
- Cefazolin (Sigma)
- Cefoperazon (Vetranal)
- Cefalonij (Vetranal)
- Cefacetril (Vetranal)
- Cefkvinom (Vetranal)
- Desacetil-cefapirin (Toronto Research Chemicals)
- Desfuroil-ceftiofur (Toronto Research Chemicals)
- Ceftiofur (Vetranal)
- Cefapirin (Sigma)

Interni standardi:

- Cefaleksin-D5 (Toronto Research Chemicals)
- Penicilin V-D5 (Toronto Research Chemicals)

3.5. PRIPREMA UZORAKA JAJA

Jaja koja su donesena u laboratorij na analizu, pohranjuju se u hladnjak na temperaturi 2 - 8 °C na 24 sata ili se homogeniziraju te se mogu čuvati do tri mjeseca na temperaturi -18 °C. Prije analize homogenizirani uzorak jaja ostavi na sobnoj temperaturi da se otopi.

3.6. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKIH TVARI MIKROBIOLOŠKIM TESTOM

3.6.1. Priprema negativnog uzorka

Za negativnu probu u svakoj analizi koristi se uzorak kojem je u prijašnjim analizama utvrđen negativan odziv testa (žučkasto obojenje).

3.6.2. Priprema uzorka sa standardnim dodatkom

Za svaku seriju uzoraka provjerava se najmanje na jednom analiziranom uzorku osjetljivost metode.

Postupak obogaćivanja je naveden u tablici 2.

Tablica 2. Priprema otopina standardnih dodataka (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2022)

ANALITI	OBOGAĆENJE (ng/g)	g uzorka	koncentracije otopina standarda (ng/mL)	volumen otopina standarda (μ L)
AMOKSICILIN	10	2	100	200
PENICILIN V	25	2	1000	50
CEFALEKSIN	10	2	100	200
CEFTIOFUR	10	2	100	200
CEFKVINOM	10	2	100	200
ENFROFLOKSACIN	2,5	2	100	50
TILMIKOZIN	2,5	2	100	50
TILOZIN A	200	2	1000	400
FLORFENIKOL	2	2	100	40
DOKSICIKLIN	10	2	100	200
TETRACIKLIN	200	2	1000	400
TETRACIKLIN epi	200	2	1000	400
OKSITETRACIKLIN	200	2	1000	400
OKSITETRACIKLIN epi	200	2	1000	400
KLORTETRACIKLIN	200	2	1000	400
KLORTETRACIKLIN epi	200	2	1000	400
SULFAMETAZIN	1	2	100	20
SULFADOKSIN	1	2	100	20
TRIMETOPRIM	1	2	100	20
DAPSON	1	2	100	20

Standardne otopine pripremaju se kako slijedi:

- Otopina međustandarda MS (1000 µg/mL): 50 mg standarda kvantitativno prenijeti u tikvicu od 50 mL, nadopuniti s otapalom do polovice, otopiti i zatim nadopuniti tikvicu do oznake
- Radni standard RS₁ (10 µg/mL): 1 mL otopine MS → 100 mL tikvica
- Radni standard RS₂ (1000 ng/mL): 5 mL otopine RS₁ → 50 mL tikvica
- Radni standard RS₃ (100 ng/mL): 5 mL otopine RS₂ → 50 mL tikvica
- Radni standard RS₄ (500 ng/mL): 2,5 mL otopine RS₁ → 50 mL tikvica

Otopina međustandarda se čuva na +2 do +8 °C 1 mjesec.

Radni standard RS₁ se čuva na +2 do +8 °C najdulje 1 mjesec.

Ostale radne otopine čuvati na temperaturi od +2/+8°C najdulje 3 tjedna.

Za pripremu standarda korištena su sljedeća otapala:

PBS pufer pH 6: penicilin, trimetoprim.

PBS pufer pH 5: cefaleksin, dapson, tilmikozin, doksiciklin.

Metanol: ceftiofur, tilozin.

Metanol-PBS pufer pH 7,4: Oksitetraciklin, klortetraciklin

Etanol-PBS pufer pH 7,4: Tetraciklin

Radne otopine pripremane su u odgovarajućem puferu.

3.6.3. Ekstrakcijska procedura za uzorke jaja

1. Odvagati 2 g ± 0,5 g homogeniziranog uzorka u epruvetu od 50 mL.
2. Dodati 5 mL acetonitril:acetona (70:30) i vorteksirati 45 sekundi.
3. Centrifugirati na 4500 rpm 10 minuta na 4 °C.
4. Dekantirati supernatant u čistu staklenu epruvetu.
5. Upariti do gotovo do suha u blagoj struji dušika na 45 °C.
6. Dodati 250 µL Lab Lemco broth (8 g/L) i vorteksirati.
7. 100 µL ekstrakta jaja pipetirati u ampulu Premi[®] testa.
8. Ampula se zatvori plastičnom ili aluminijskom folijom.
9. Odmah inkubirati na 64 °C do promjene boje negativne kontrole (oko 4 h za uzorke jaja).

3.6.4. Kontrola kvalitete rezultata testa

U svakoj seriji injektirati slijepu probu.

3.6.5. Prikaz rezultata

- Očitavanje rezultata provodi se samo na 2/3 dijela od dna ampule
- Jasna promjena boje iz ljubičaste u žutu ukazuje na odsutnost antibakterijskih tvari u uzorku na prikazanim razinama detekcije ili iznad njih.

- Žuto-ljubičasta boja ukazuje na prisutnost antibakterijskih tvari u odgovarajućem uzorku blizu prikazanih razina detekcije.
- Ako ne dođe do promjene boje to ukazuje na prisutnost antibakterijskih tvari u odgovarajućem uzorku mlijeka na razini detekcije testa ili iznad njega.

3.7. ODREĐIVANJE CEFALOSPORINA LC-MS/MS METODOM

3.7.1. Postupanje s uzorcima

Uzorci doneseni u laboratorij na analizu, pohranjuju se u hladnjak na temperaturi 2 - 8 °C na 24 sata ili se homogeniziraju te se mogu čuvati do tri mjeseca na temperaturi -18 °C. Prije analize homogenizirani uzorak se ostavi na sobnoj temperaturi da se otopi.

3.7.2. 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 čuvana na sobnoj temp. u zatamnjenu posuđu
- Mobilna faza B: MeOH (LC-MS čistoće)
- 0,5 % mravlje kiseline u acetonitrilu: pipetirati 2,5 mL mravlje kiseline u tikvicu od 500 mL
- 5 M amonijev acetat: 9,625 g amonijevog acetata otopiti u 25 mL ultračiste vode
- 5 mM amonijevog acetata: pipetirati 200 µL 5 M amonijevog acetata u tikvicu od 200 mL
- 0,5 % Na₂EDTA: 0,5 g Na₂EDTA u tikvicu od 100 mL
- ACN/H₂O (80:20, v/v): pomiješati 400 mL acetonitrila s 100 mL ultračiste H₂O

3.7.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova

Bazne otopine standarda pripremaju se zasebno nakon čega se pripremaju mješavine zasebnih grupa analita. Radne otopine služe za obogaćivanje kontrolnih uzoraka tj. pripremu matriks kalibracijske krivulje i za izradu standardne krivulje. Za kvantitativnu analizu cefalosporina koriste se standardne i matriks krivulje u različitim koncentracijskim područjima.

Priprema mješavine standarda cefalosporina za analizu na LC-MS/MS

- Otopina međustandarda MS svakog cefalosporina (1000 µg/mL): 50 mg standarda kvantitativno prenijeti u tikvicu od 50 mL, nadopuniti s otapalom do polovice, otopiti i zatim nadopuniti tikvicu do oznake
- Radni standard MIX-JAJA-S₁ (10 µg/mL): 0,25 mL otopine MS → 25 mL tikvica

- Radni standard MIX-JAJA-S₂ (1000 ng/mL): 1 mL otopine MIX-JAJA-S1 → 10 mL tikvica

Priprema mješavine standarda internih standarda Penicillin V-D5 i Cefalexin-d5 za analizu na LC-MS/MS

- Otopina međustandarda MS svakog internog standarda (1000 µg/mL): 50 mg standarda kvantitativno prenijeti u tikvicu od 50 mL, nadopuniti s otapalom do polovice, otopiti i zatim nadopuniti tikvicu do oznake
- Radni standard RS-ISTD1 (10 µg/mL): 0,1 mL otopine MS → 10 mL tikvica
- Radni standard RS-ISTD2 (1000 ng/mL): 1 mL otopine RS-ISTD1 → 10 mL tikvica

3.7.4. Priprema standardne krivulje na otapalu i standarda za kontrolu stabilnosti sustava
Za kontrolu linearnosti odziva instrumenta te stabilnosti standardnih otopina priprema se kalibracijska krivulja na otapalu prema tablici 3.

Tablica 3. Standardna krivulja na otapalu (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2021)

	L1(µL)	L2(µL)	L3(µL)	L4(µL)	L5(µL)	Slijepa proba(µL)
0,1% Mravlja kiselina (mL)	800	800	800	800	800	800
MeOH (mL)	130	100	50	0	40	200
MIX-JAJA-S2	10	25	50	75	100	-
CEF-S2	10	25	50	75	10(S1)	-
RS-ISTD2	50	50	50	50	50	-

3.7.5. Priprema matriks kalibracijske krivulje

U svakoj analizi priprema se matriks kalibracijska krivulja na način da se jaje obogati na 4 koncentracijske razine, kao što je prikazano u tablici 4 ovisno o postavljenom MRL-u ili najnižoj koncentraciji, obzirom da niti jedan analit nije odobren za upotrebu.

Tablica 4. Matriks kalibracija (Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta, 2021)

MATRIKS		1/10 MRL (C ₀)	M1 (µL)	M2 (µL)	M3 (µL)	M4 (µL)	Slijepa proba (µL)
JAJA 5 g	MIX-JAJA-S2	25	125	250	375	500	-
	RS-ISTD2	250	250	250	250	250	-

3.7.6. Kontrolni uzorak stanja instrumenta

Kontrolni uzorak osjetljivosti instrumenta predstavlja mješavina standarda u koncentraciji koja za uzorak jaja odgovara MRL koncentraciji. To predstavlja koncentracijska razina L3 pripremljena prema tablici 3.

3.7.7. Kontrolni uzorak slijepe probe

Kontrolni uzorak slijepe probe (Blank) predstavlja mješavina metanola i mravlje kiseline prema tablici 3.

3.7.8. Negativni kontrolni uzorak otapala

Kontrolni uzorak slijepe probe otapala (Solvent blank) predstavlja uzorak proveden kroz ekstrakciju bez prisustva matriksa.

3.7.9. Negativni kontrolni uzorak matriksa

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

3.7.10. Obogaćeni kontrolni uzorak – analiza mišićnog tkiva i mlijeka

Negativni jaja obogaćuju se standardnim otopinama mješavine analita prema tablici 4.

3.7.11. Pročišćavanje uzorka (QUECHERS ekstrakcija)

- Odvagati $5 \pm 0,05$ g uzorka jaja
- U sve uzorke dodati interni standard 250 μ L RS-ISTD2 za jaja
- uzorcima za kalibraciju dodati mješavinu standarda prema tablici 4
- Obogaćene uzorke ostaviti 15 min na tamno mjesto

Ekstrakcija:

- Dodati 10 ml 0,5 % mravlje kiseline u acetonitrilu (2,5 mL mravlje kiseline u tikvicu od 500 mL), te nakon dodatka odmah vorteksirati
- Miješati na mehaničkoj mješalici/vorteksu kroz 10 minuta (2000 o/min)
- Centrifugirati 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4 °C
- EMR aktivacija praška (p/n 5982-1010 KEM153 Prašak u epruветama s narančastim čepom): Dodati 3 ml 5 mM amonijevog acetata (pr. 200 μ L 5 M Amonijevog acetata u tikvicu od 200 mL) u epruветu s EMR praškom te odmah vorteksirati kroz 20 s, dodavati pufer dok je epruвета s praškom na vorteksu, pazeći da se stvorila jednolika emulzija

- Prebaciti 7 mL supernatanta (0,5 % mravlje kiseline u ACN) u aktiviranu emulziju s praškom
- odmah vorteksirati tijekom 5 minuta
- Centrifugirati 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4 °C
- Supernatant dekantirati u novu epruvetu od 50 mL s čepom
- Dodati sadržaj soli MgSO₄ iz vrećice (p/n 5982-0102 KEM 159 prašak u vrećici) i snažno mućkati dok se ne razbiju stvrdnuti komadi soli, te zatim odmah vorteksirati ručno
- Dodatno vorteksirati na mehaničkoj miješalici kroz 2 minute
- Centrifugirati 4000 okretaja/min kroz 10 minuta pri 4 °C
- Prebaciti 2 ml supernatanta u staklenu epruvetu od 12 - 15 ml
- Dodati 50 µl DMSO
- Odpariti u struji dušika pri 40 °C dok ne zaostane volumen od ~ 50µl
- Otopiti uzorke dodatkom 100µl MeOH, vorteksirati i zatim dodati 850 µl 0,1 % mravlje kiseline
- otopiti kroz 5 minuta u ultrazvučnoj kupelji
- prebaciti otopinu u epruvetu od 2 ml za ultracentrifugu te centrifugirati pri 15000 okretaja/min, kroz 5 minuta pri 4 °C
- Bistru otopinu uzorka (400 µl) prebaciti u vialu s insertom

3.7.12. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju

Za provođenje analize koristi se HPLC uređaj *1290 Infinity* udružen s masenim spektrometrom s trostrukim kvadropolom (LC-MS/MS G6470) s *Dual AJS ESI* sustavom za elektrosprej ionizaciju. U tablici 5 prikazane ionske tranzicije zasvaki od analita. Analiti se ioniziraju u pozitivnom i negativnom načinu rada.

Instrumentalna analiza se obavlja na instrumentu oznake I-2 145, koristeći *MassHunter Acquisition software* prema metodi: *Antibiotici-dMRM-opt-20211130-rev02-JAJA.m*.

Tablica 5. Parametri detekcije supstancija pomoću LC-MS/MS spektrometra

Analit	Prekursor ion m/z	Produkt ion			RT min	Fragmentor	Kolizijska energija
Cefaleksin	348,1	174,1	158,1		7,34	100	10
Cefaleksin-D5	353,1	179,1			7,34	135	20
Cefalonijum	459,1	337,1	152,1		6,99	100	10
Cefazolin	455	323	156	124	7,64	135	4
Cefoperazon	646,2	530,2	290,3	143,2	7,8	100	10
Cefkvinome	530,1	397,1	324	134,2	6,88	120	10
Ceftiofur	524	241	210	126	8,69	135	20
Cefapirin	424,1	364	124,1	112	6,5	135	8
Desacetil-cefapirin	382,1	292	226	152	5,68	135	20
Desfuroil-ceftiofur	430	241	210	126	7,71	135	20
Penicilin V-D5	356,1	197	160		9,6	135	20
Cefacetil	357,1	252	280		7,0	135	5

Tablica 6. Kromatografski uvjeti

Kromatografska kolona	Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m, 2,1x150 mm																																				
Predkolona	Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m, 2,1x5mm VanGuard Pre-Column																																				
Protok	0,4 mL/min																																				
Temperatura odjeljka kolone	40°C																																				
Sustav za uzorkovanje	Volumen injektiranja 10 μ L 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 grade Gradijent: <table border="1" data-bbox="821 869 1396 1238"> <thead> <tr> <th></th> <th>Vrijeme</th> <th>A</th> <th>B</th> <th>Protok</th> <th>Tlak</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3 min</td> <td>100 %</td> <td>0 %</td> <td>0,400 mL/min</td> <td>1000 bar</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>10 min</td> <td>5 %</td> <td>95 %</td> <td>0,400 mL/min</td> <td>1000 bar</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>13 min</td> <td>5 %</td> <td>95 %</td> <td>0,400 mL/min</td> <td>1000 bar</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>13,5 min</td> <td>100 %</td> <td>0 %</td> <td>0,400 mL/min</td> <td>1000 bar</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>17 min</td> <td>100 %</td> <td>0 %</td> <td>0,400 mL/min</td> <td>1000 bar</td> </tr> </tbody> </table>		Vrijeme	A	B	Protok	Tlak	1	3 min	100 %	0 %	0,400 mL/min	1000 bar	2	10 min	5 %	95 %	0,400 mL/min	1000 bar	3	13 min	5 %	95 %	0,400 mL/min	1000 bar	4	13,5 min	100 %	0 %	0,400 mL/min	1000 bar	5	17 min	100 %	0 %	0,400 mL/min	1000 bar
	Vrijeme	A	B	Protok	Tlak																																
1	3 min	100 %	0 %	0,400 mL/min	1000 bar																																
2	10 min	5 %	95 %	0,400 mL/min	1000 bar																																
3	13 min	5 %	95 %	0,400 mL/min	1000 bar																																
4	13,5 min	100 %	0 %	0,400 mL/min	1000 bar																																
5	17 min	100 %	0 %	0,400 mL/min	1000 bar																																

Uvjeti LC-MS/MS spektrometra:

Ionizacija se odvija u ESI izvoru u pozitivnom i negativnom *mode*-u *Dynamic MRM* načinom rada.

Parametri masene spektrometrije su:

Gas Temp (°C) 150

Gas Flow (l/min) 11

Nebulizer (psi) 35

SheathGasHeater 300

SheathGasFlow 6

Capillary (V) 4000

VCharging 500

Delta EMV iznosi 250.

Parametri instrumentalne optimizacije koji se tiču instrumenta, prikazani su u Tune File-u računala.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu provedena je usporedba rezultata određivanja ostataka cefalosporinskih antibiotika Premi[®] testom za određivanje ostataka antibiotika i metodom tekućinske kromatografije – tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS). Premi[®] test je orijentacijska metoda pa je i za taj test potrebno provesti analitičku, kvantifikacijsku metodu. Priprema uzoraka za LC-MS/MS uključuje pročišćavanje QuEChERS (eng. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) ekstrakcijom. Rezultati dobiveni provedenom LC-MS/MS analizom korišteni su kako bi se utvrdila ponovljivost metode za svaki od cefalosporina. Ispitano je područje linearnosti metode izradom kalibracijskih pravaca te je uspoređena linearnost kada se kao standard koristi cefaleksin D5, odnosno penicilin V D5.

4.1. MIKROBIOLOŠKI TEST

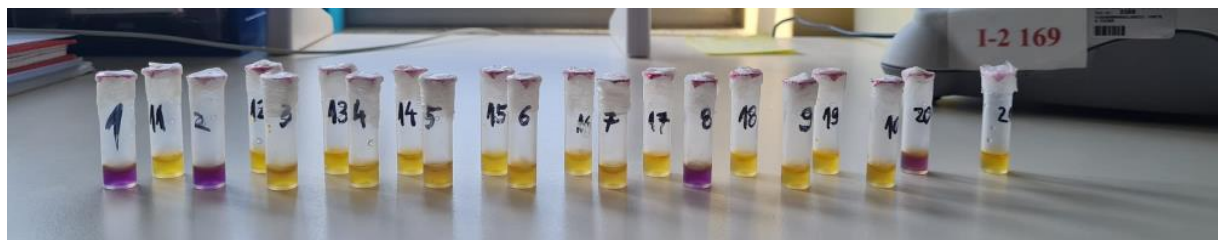
Uzorci jaja obogaćeni su kako je prikazano u tablici 2, 100 μ L tako pripremljenih uzoraka nanosi se u ampule Premi[®] testa, te se inkubira na 64 °C do promjene boje oko 4 h.

Premi[®] test zasniva se na inhibiciji rasta *Bacillus stearothermophilus*, mikroorganizma vrlo osjetljivog na mnoge antibiotike. U agaru je standardiziran broj spora s određenim nutrijentima. Kada se uzorak doda na agar i inkubira na 64 °C spore će rasti. Izrasle spore će se umnožavati i stvarati karbonatnu kiselinu kada nisu prisutne inhibitorne tvari. Proizvedena kiselina uzrokuje promjenu boje indikatora bromokrezola iz ljubičaste u žutu. Žuta boja agara nakon inkubacije ukazuje na negativni uzorak. Ako ispitivani uzorak sadrži inhibitorne tvari u dovoljnoj količini (iznad granica detekcije) ne dolazi do rasta spora pri čemu boja agara ostaje ljubičasta. Očitavanje rezultata provodi se samo na 2/3 dijela ampule od dna.

Uzorci su obogaćeni cefalosporinima u koncentraciji od 10 μ g/kg što odgovara osjetljivosti metode koja je sljedeća primijenjena, odnosno LC-MS/MS metodi, obzirom da za cefalosporine nije propisana NDK vrijednost, to jest nisu odobreni za upotrebu. Ostali antibiotici testirani su kako bi se provjerila ukupna osjetljivost testa na antibiotike, a služe i kao pozitivna kontrola da je postupak testa proveden prema propisu.

Rezultati nakon inkubacije prikazani su na slici 11 i u tablici 7. Pozitivni su uzorci, oni ljubičastog obojenja, obogaćeni amoksicilinom, penicilinom V, tilozinom A i dapsonom što potvrđuje da su koncentracije antibiotika unutar granice detekcije. U ostalim uzorcima došlo je do promjene obojenja u žuto što ukazuje na negativan uzorak bez obzira na provedena obogaćenja što je rezultat loše osjetljivosti testa na određeni antibiotik. Iste rezultate pokazala je i studija koju su proveli Wu i sur. (2021), Premi[®] test bio je nedovoljno osjetljiv kako bi se njime detektirali cefaleksin, ceftiofur i cefkvinom, kao i svi ostali ispitani cefalosporini u uzorcima kokošnjih jaja.

Međutim, ovaj test samo je orijentacijska metoda te njegova pouzdanost nije potpuna stoga je potrebno potvrditi rezultate analitičkim metodama.



Slika 11. Rezultati mikrobiološkog testa nakon inkubacije uzoraka

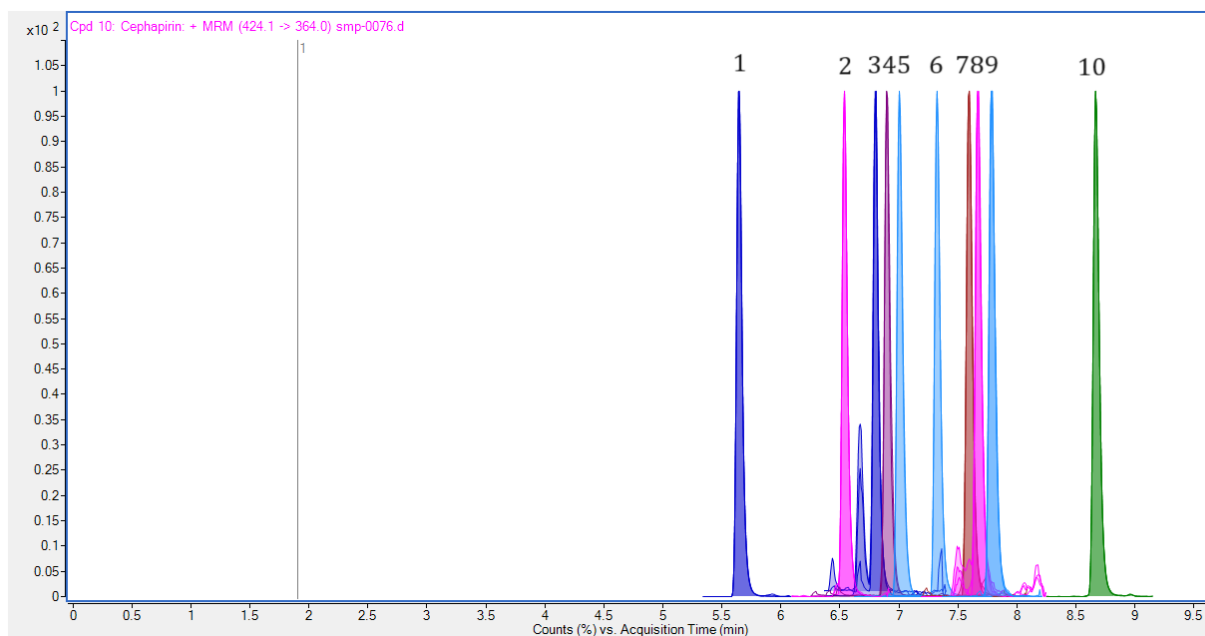
Tablica 7. Prisutnost antibiotika u uzorcima

UZORAK	ANALIT	OBOGAĆENJE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	PRISUTNOST ANTIBIOTIKA
1	AMOKSICILIN	10	+
2	PENICILIN V	25	+
3	CEFALEKSIN	10	-
4	CEFTIOFUR	10	-
5	CEFKVINOM	10	-
6	ENFROFLOKSACIN	2,5	-
7	TILMIKOZIN	2,5	-
8	TILOZIN A	200	+
9	FLORFENIKOL	2	-
10	DOKSICIKLIN	10	-
11	TETRACIKLIN	200	-
12	TETRACIKLIN epi	200	-
13	OKSITETRACIKLIN	200	-
14	OKSITETRACIKLIN epi	200	-
15	KLORTETRACIKLIN	200	-
16	KLORTETRACIKLIN epi	200	-
17	SULFAMETAZIN	1	-
18	SULFADOKSIN	1	-
19	TRIMETOPRIM	1	-
20	DAPSON	1	+
21	SLIJEPA PROBA	/	-

4.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS)

4.2.1. LC kromatogrami

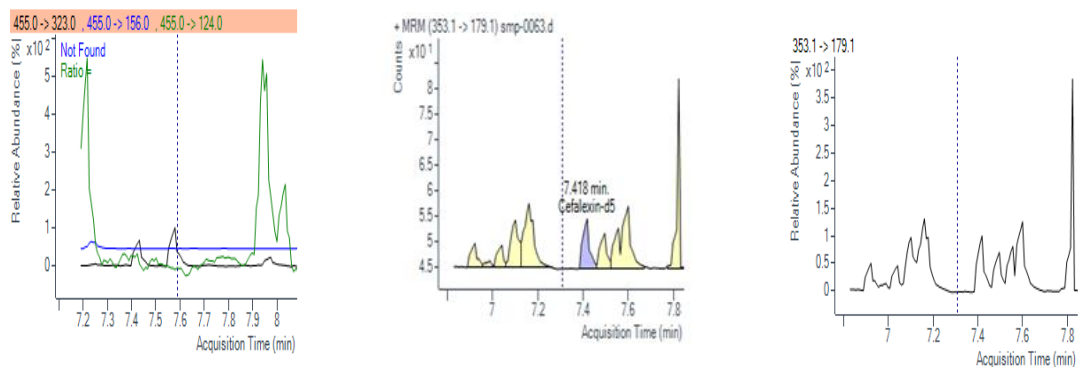
Pri provedbi kromatografije primijenjena je gradijentna elucija na kromatografskoj koloni, a dobiveni kromatogram te retencijska vremena mogu se vidjeti na slici 12.



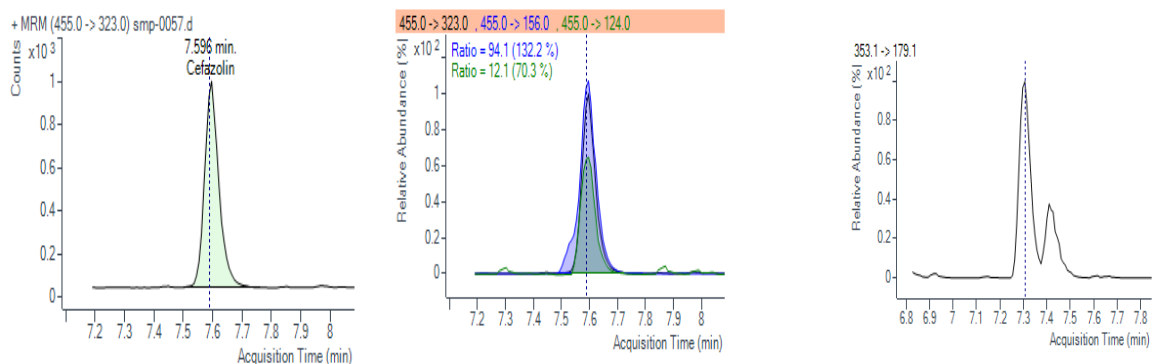
Slika 12. Kromatogram uzorka jaja obogaćenog cefalosporinima: desacetil-cefapirin (1), cefapirin (2), cefkvinom (3), cefacetril (4), cefalonij (5), cefaleksin (6), cefazolin (7), desfuroil-ceftiofur (8), cefoperazon (9), ceftiofur (10)

4.2.2. Specifičnost metode

Kako bi se potvrdila specifičnost metode analizirano je 5 uzoraka slijepih proba (Blank). Na dobivenim kromatogramima nisu pronađeni pikovi koji bi mogli interferirati s analitom kao ni lažno pozitivni rezultati čime je potvrđena specifičnost metode. Na slikama 13 i 14 je navedena usporedba kromatograma slijepe probe i obogaćenog uzorka cefazolina.



Slika 13. Kromatogram uzorka slijepe probe za cefazolin



Slika 14. Kromatogram obogaćenog uzorka za cefazolin

4.2.3. Ponovljivost metode

Kako bi se potvrdila ponovljivost metode, analizirano je ukupno 25 uzoraka obogaćenih na 5 koncentracijskih razina s 5 ponavljanja na razini. Obogaćenja su provedena ovisno o najnižoj koncentraciji kao što je prikazano u tablici 8.

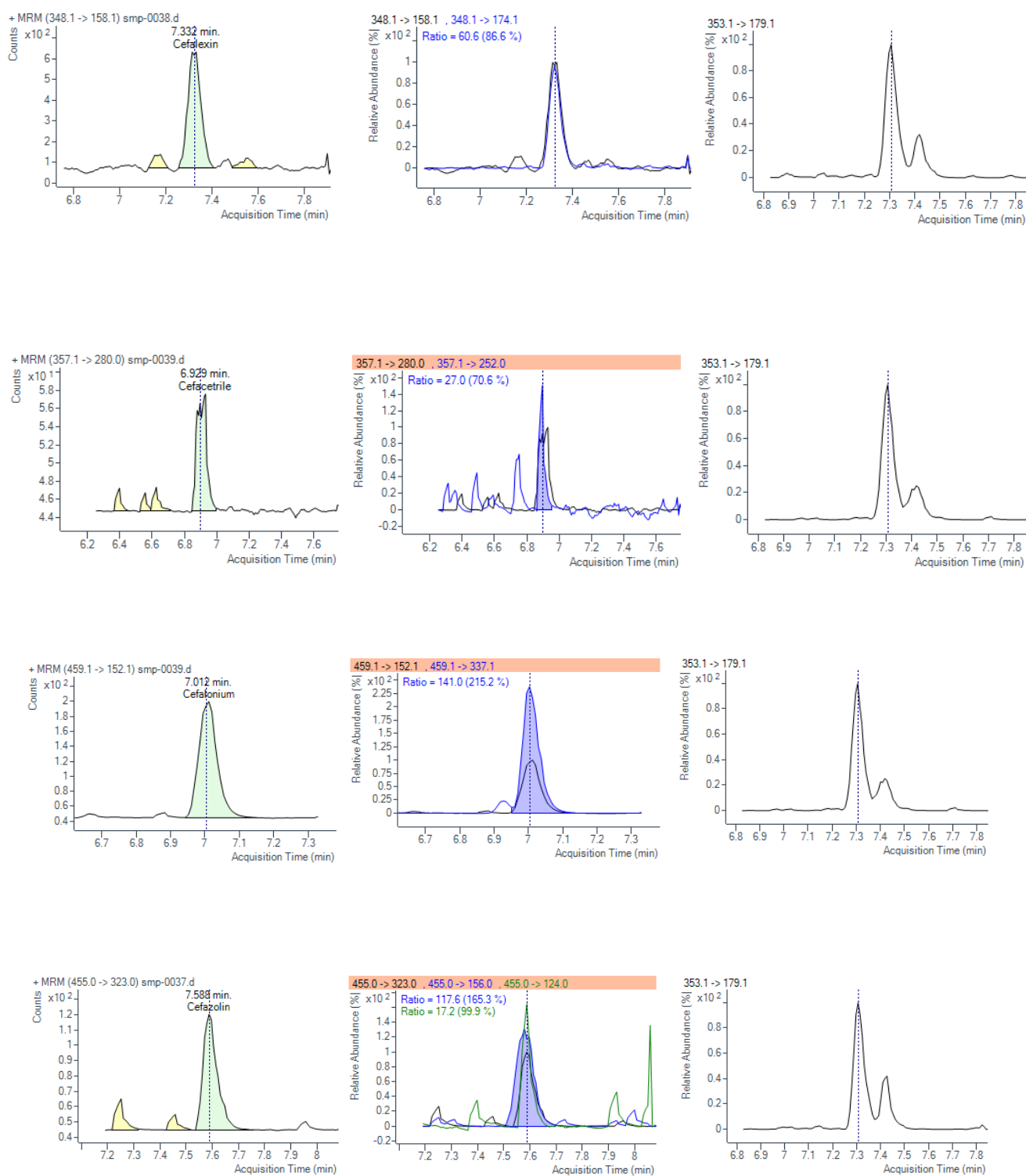
Tablica 8. Uzorci jaja obogaćeni cefalosporinima (cefaleksin, cefazolin, cefoperazon, cefalonij, cefacetril, cefkvinom, desacetil-cefapirin, desfuroil-ceftiofur, ceftiofur, cefapirin)

Uzorak	Razina obogaćenja	Obogaćenje [mg/kg]
uz-jaja-1	M1	5
uz-jaja-2	M1	5
uz-jaja-3	M1	5
uz-jaja-4	M1	5
uz-jaja-5	M1	5
uz-jaja-6	M2	25
uz-jaja-7	M2	25
uz-jaja-8	M2	25
uz-jaja-9	M2	25
uz-jaja-10	M2	25
uz-jaja-11	M3	50
uz-jaja-12	M3	50
uz-jaja-13	M3	50
uz-jaja-14	M3	50
uz-jaja-15	M3	50
uz-jaja-16	M4	75
uz-jaja-17	M4	75
uz-jaja-18	M4	75
uz-jaja-19	M4	75
uz-jaja-20	M4	75
uz-jaja-21	M5	100
uz-jaja-22	M5	100
uz-jaja-23	M5	100
uz-jaja-24	M5	100
uz-jaja-25	M5	100

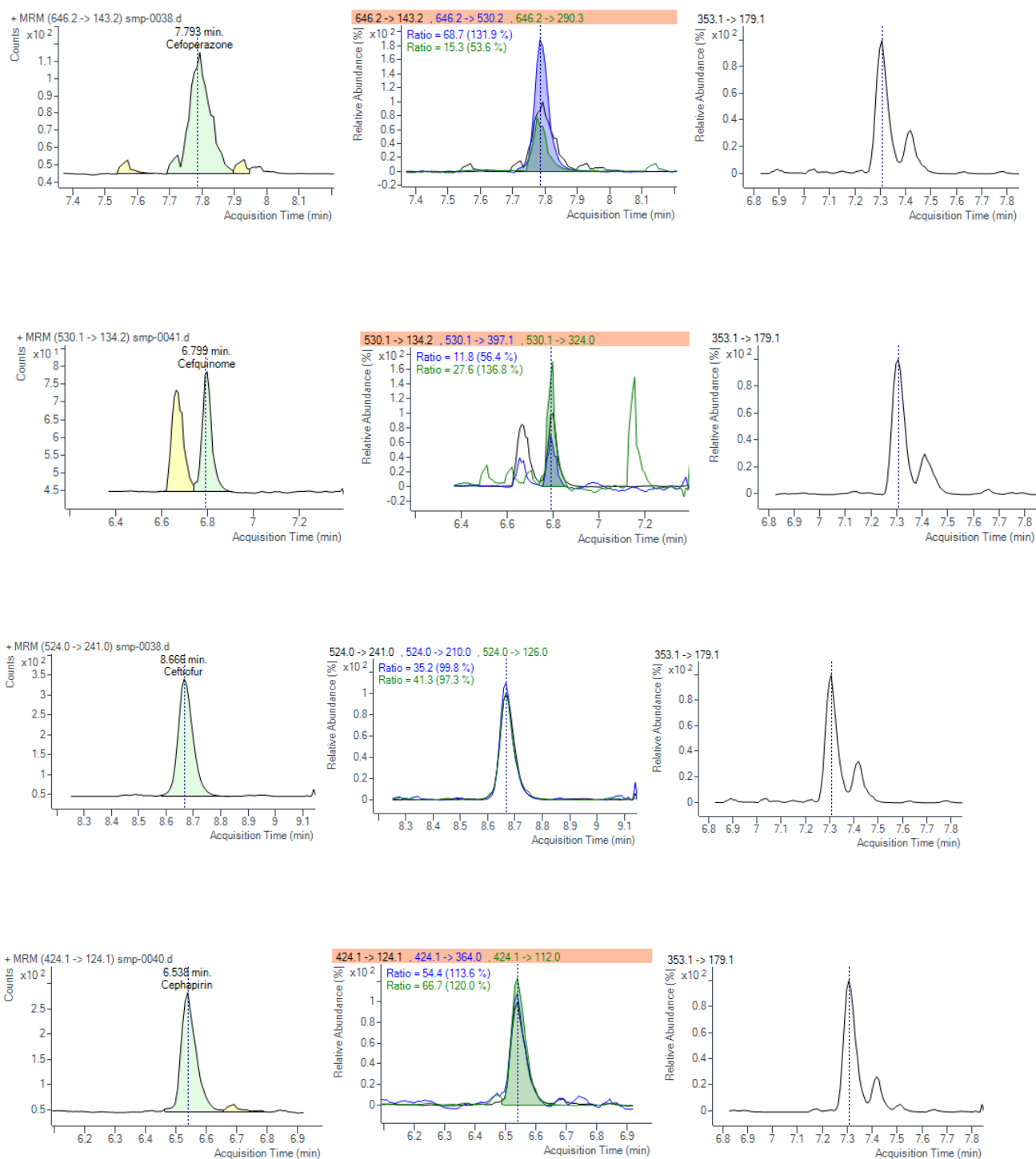
U tablici 9 su prikazane dobivene koncentracije kontrole ponovljivosti cefaleksina u uzorcima. Relativna standardna devijacija, odnosno točnost određivanja masa, povećava se porastom koncentracije analita u uzorcima iz čega se može zaključiti kako točnost određivanja mase ovisi o koncentraciji analita u uzorku. Slika 15 prikazuje kromatogram uzorka uz-jaja-2 pri obogaćenju od 5 µg/kg iz kojeg je vidljiv visok odziv te retencijsko vrijeme 7,332 što odgovara standardu.

Tablica 9. Rezultati ponovljivosti rezidua cefaleksina

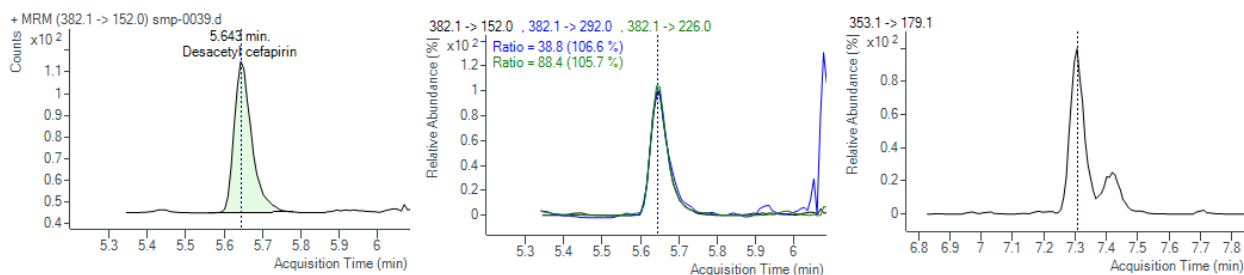
Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija %
uz-jaja-1	6,2	0,4	6,0
uz-jaja-2	6,5		
uz-jaja-3	5,7		
uz-jaja-4	5,7		
uz-jaja-5	5,7		
uz-jaja-6	22,5	1,9	7,7
uz-jaja-7	24,6		
uz-jaja-8	24,4		
uz-jaja-9	26,9		
uz-jaja-10	27,1		
uz-jaja-11	46,1	6,6	14,1
uz-jaja-12	42,4		
uz-jaja-13	54,2		
uz-jaja-14	53,3		
uz-jaja-15	39,1		
uz-jaja-16	94,0	11,9	15,7
uz-jaja-17	65,7		
uz-jaja-18	78,4		
uz-jaja-19	64,7		
uz-jaja-20	77,5		
uz-jaja-21	82,6	15,7	15,6
uz-jaja-22	6,2		
uz-jaja-23	6,5		
uz-jaja-24	5,7		
uz-jaja-25	5,7		



Slika 15. Kromatogram cefaleksina, cefazolina, cefoperazona, cefalonija, cefacetrila, cefkvinoma, ceftiofura, cefapirina i desacetil-cefapirina u uzorku uz-jaja-2 obogaćen na razini od 5 µg/kg



Slika 15. Kromatogram cefaleksina, cefazolina, cefoperazona, cefalonija, cefacetrila, cefkvinoma, ceftiofura, cefapirina i desacetil-cefapirina u uzorku uz-jaja-2 obogaćen na razini od 5 µg/kg - nastavak



Slika 15. Kromatogram cefaleksina, cefazolina, cefoperazona, cefalonija, cefacetrla, cefkvinoma, ceftiofura, cefapirina i desacetil-cefapirina u uzorku uz-jaja-2 obogaćen na razini od 5 µg/kg - nastavak

Iz dobivenih koncentracija kontrole ponovljivosti cefacetrla u uzorcima u tablici 10 vidljivo je kako metoda nije primjenjiva pri svim koncentracijama. Pri obogaćenju od 5 µg/kg relativna standardna devijacija iznosi 57,1 %, dok slika 15 prikazuje kromatogram cefacetrla na kojemu su prisutni šumovi pri istom obogaćenju što potvrđuje da metoda nije primjenjiva pri koncentraciji od 5 µg/kg. Paoletti i sur. (2021) su to dokazali tijekom razvoja i validacije iste metode za detekciju antibiotika u jajima, cefacetrlil nije bilo moguće detektirati pri koncentracijama od 3,3 µg/kg i 10 µg/kg. Povećanjem koncentracije dolazi do smanjenja relativne standardne devijacije pa se metoda može koristiti pri koncentracijama iznad 25 µg/kg.

Tablica 10. Rezultati ponovljivosti rezidua cefacetрила

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija %
uz-jaja-1	3,1	3,0	57,1
uz-jaja-2	2,2		
uz-jaja-3	4,2		
uz-jaja-4	9,2		
uz-jaja-5	7,8		
uz-jaja-6	11,7	8,5	33,7
uz-jaja-7	25,5		
uz-jaja-8	33,7		
uz-jaja-9	24,1		
uz-jaja-10	30,7		
uz-jaja-11	38,0	10,3	21,0
uz-jaja-12	42,8		
uz-jaja-13	61,6		
uz-jaja-14	58,1		
uz-jaja-15	44,5		
uz-jaja-16	95,0	13,0	16,8
uz-jaja-17	64,8		
uz-jaja-18	86,0		
uz-jaja-19	73,1		
uz-jaja-20	66,8		
uz-jaja-21	94,7	17,0	17,2
uz-jaja-22	110,7		
uz-jaja-23	121,0		
uz-jaja-24	89,4		
uz-jaja-25	78,2		

Metoda se može primijeniti za cefalonij u cijelom opsegu ispitanih koncentracija, u opsegu od 5 µg/kg do 100 µg/kg, što je prikazano u tablici 11. Relativna standardna devijacija odgovarajuća je pri ispitivanim koncentracijama. Slika 15 prikazuje kromatogram cefalonija pri obogaćenju od 5 µg/kg na kojem je vidljiv visok odziv i retencijsko vrijeme 7,012.

Tablica 11. Rezultati ponovljivosti rezidua cefalonija

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija %
uz-jaja-1	7,7	0,9	12,0
uz-jaja-2	8,1		
uz-jaja-3	6,4		
uz-jaja-4	9,0		
uz-jaja-5	7,7		
uz-jaja-6	20,6	2,6	10,6
uz-jaja-7	24,5		
uz-jaja-8	24,1		
uz-jaja-9	23,9		
uz-jaja-10	27,8		
uz-jaja-11	40,1	6,9	15,7
uz-jaja-12	38,8		
uz-jaja-13	55,1		
uz-jaja-14	45,6		
uz-jaja-15	39,3		
uz-jaja-16	104,9	16,9	22,4
uz-jaja-17	63,6		
uz-jaja-18	69,2		
uz-jaja-19	65,4		
uz-jaja-20	75,4		
uz-jaja-21	95,8	9,1	8,9
uz-jaja-22	117,9		
uz-jaja-23	102,2		
uz-jaja-24	102,0		
uz-jaja-25	95,3		

Tablica 12 prikazuje koncentracije kontrole ponovljivosti cefazolina. Cefazolin se ne može detektirati pri koncentraciji od 5 µg/kg, a relativna standardna devijacija odgovarajuća je pri koncentraciji od 50 µg/kg i iznosi 13,4 %, dok je pri ostalim koncentracijama visoka. Stoga je metoda za cefazolin primjenjiva pri koncentraciji od 50 µg/kg.

Tablica 12. Rezultati ponovljivosti rezidua cefazolina

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija %
uz-jaja-1	/	nije primjenjivo	nije primjenjivo
uz-jaja-2	/		
uz-jaja-3	/		
uz-jaja-4	/		
uz-jaja-5	/		
uz-jaja-6	17,5	6,8	26,6
uz-jaja-7	19,6		
uz-jaja-8	28,0		
uz-jaja-9	33,2		
uz-jaja-10	30,3		
uz-jaja-11	59,9	8,4	13,4
uz-jaja-12	61,0		
uz-jaja-13	77,5		
uz-jaja-14	58,1		
uz-jaja-15	56,8		
uz-jaja-16	90,8	19,6	22,8
uz-jaja-17	51,7		
uz-jaja-18	101,8		
uz-jaja-19	91,9		
uz-jaja-20	93,2		
uz-jaja-21	59,1	21,5	25,1
uz-jaja-22	109,2		
uz-jaja-23	99,2		
uz-jaja-24	94,0		
uz-jaja-25	67,1		

Cefoperazon se može detektirati u području od 5 µg/kg do 100 µg/kg što je vidljivo u tablici 13 te je metoda primjenjiva u ispitivanom rasponu.

Tablica 13. Rezultati ponovljivosti rezidua cefoperazona

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija
uz-jaja-1	5,9	0,8	14,9
uz-jaja-2	5,5		
uz-jaja-3	3,9		
uz-jaja-4	4,8		
uz-jaja-5	5,4		
uz-jaja-6	20,6	2,9	12,7
uz-jaja-7	22,5		
uz-jaja-8	21,3		
uz-jaja-9	23,8		
uz-jaja-10	28,0		
uz-jaja-11	42,3	5,4	11,1
uz-jaja-12	45,2		
uz-jaja-13	54,3		
uz-jaja-14	49,6		
uz-jaja-15	54,6		
uz-jaja-16	99,5	14,3	17,6
uz-jaja-17	61,8		
uz-jaja-18	89,8		
uz-jaja-19	74,9		
uz-jaja-20	82,4		
uz-jaja-21	83,7	10,8	11,3
uz-jaja-22	112,2		
uz-jaja-23	92,5		
uz-jaja-24	99,9		
uz-jaja-25	90,8		

Tablica 14 prikazuje koncentracije kontrole ponovljivosti cefkvinoma. Najniža standardna devijacija iznosi 7,8 % pri koncentraciji od 5 µg/kg. Metoda nije primjenjiva pri koncentraciji od 75 µg/kg obzirom da relativna standardna devijacija na toj razini obogaćenja iznosi 42,5 %. Slika 15 prikazuje kromatogram cefkvinoma te je detektiran relativno nizak odziv. Retencijsko vrijeme cefkvinoma je 6,799.

Tablica 14. Rezultati ponovljivosti rezidua cefkvinoma

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija %
uz-jaja-1	9,3	0,7	7,8
uz-jaja-2	8,8		
uz-jaja-3	9,2		
uz-jaja-4	10,7		
uz-jaja-5	9,6		
uz-jaja-6	16,4	3,9	17,0
uz-jaja-7	26,6		
uz-jaja-8	23,4		
uz-jaja-9	23,3		
uz-jaja-10	25,2		
uz-jaja-11	33,5	10,2	22,0
uz-jaja-12	49,9		
uz-jaja-13	56,4		
uz-jaja-14	54,5		
uz-jaja-15	37,8		
uz-jaja-16	133,6	33,1	42,5
uz-jaja-17	56,5		
uz-jaja-18	66,1		
uz-jaja-19	52,1		
uz-jaja-20	80,6		
uz-jaja-21	132,5	17,6	16,1
uz-jaja-22	116,9		
uz-jaja-23	111,4		
uz-jaja-24	92,4		
uz-jaja-25	90,7		

Ceftiofur se ne može detektirati pri koncentraciji od 5 µg/kg, a pri višim koncentracijama relativna standardna devijacija raste porastom koncentracija što je vidljivo u tablici 15 pa je metoda najbolje primjenjiva pri koncentracijama od 25 µg/kg i 50 µg/kg.

Tablica 15. Rezultati ponovljivosti rezidua ceftiofura

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija %
uz-jaja-1	/	nije primjenjivo	nije primjenjivo
uz-jaja-2	/		
uz-jaja-3	/		
uz-jaja-4	/		
uz-jaja-5	/		
uz-jaja-6	21,7	3,0	12,1
uz-jaja-7	23,4		
uz-jaja-8	26,3		
uz-jaja-9	23,8		
uz-jaja-10	29,5		
uz-jaja-11	53,0	9,0	14,4
uz-jaja-12	58,6		
uz-jaja-13	75,3		
uz-jaja-14	68,5		
uz-jaja-15	57,9		
uz-jaja-16	84,0	16,8	20,3
uz-jaja-17	57,9		
uz-jaja-18	99,5		
uz-jaja-19	76,0		
uz-jaja-20	96,2		
uz-jaja-21	53,0	22,7	25,7
uz-jaja-22	115,9		
uz-jaja-23	92,6		
uz-jaja-24	93,4		
uz-jaja-25	86,0		

Iz relativnih standardnih devijacija prikazanih u tablici 16 vidljivo je da se cefapirin može detektirati u rasponu od 5 µg/kg do 100 µg/kg, međutim najbolja ponovljivost je pri 5 µg/kg gdje relativna standardna devijacija iznosi 7,8 %. Slika 15 prikazuje kromatogram cefapirina pri obogaćenju od 5 µg/kg pri čemu je detektiran visok odziv što potvrđuje prethodne rezultate.

Tablica 16. Rezultati ponovljivosti rezidua cefapirina

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija %
uz-jaja-1	6,4	0,5	7,8
uz-jaja-2	6,8		
uz-jaja-3	5,5		
uz-jaja-4	6,3		
uz-jaja-5	6,7		
uz-jaja-6	21,3	2,5	10,7
uz-jaja-7	23,1		
uz-jaja-8	21,8		
uz-jaja-9	25,9		
uz-jaja-10	27,1		
uz-jaja-11	45,0	6,1	13,0
uz-jaja-12	45,1		
uz-jaja-13	51,7		
uz-jaja-14	54,8		
uz-jaja-15	39,2		
uz-jaja-16	97,4	14,7	19,2
uz-jaja-17	60,8		
uz-jaja-18	76,1		
uz-jaja-19	65,2		
uz-jaja-20	84,0		
uz-jaja-21	90,5	12,4	12,4
uz-jaja-22	120,5		
uz-jaja-23	103,7		
uz-jaja-24	96,2		
uz-jaja-25	90,9		

Desacetil-cefapirin najbolje je određivati pri koncentracijama od 5 µg/kg i 10 µg/kg pri čemu relativne standardne devijacije iznose 1,1 %, odnosno 5,4 % što je prikazano u tablici 17. Kromatogram na slici 15 prikazuje da je detektiran visok odziv desacetil cefapirina pri retencijskom vremenu 5,643.

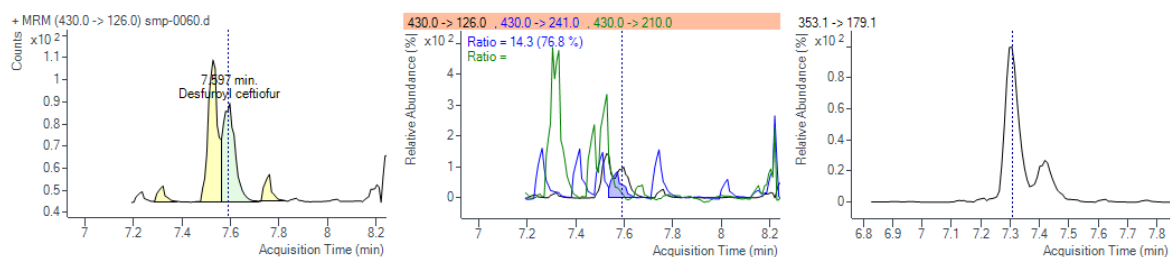
Tablica 17. Rezultati ponovljivosti rezidua desacetil-cefapirina

Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija
uz-jaja-1	11,0	0,1	1,1
uz-jaja-2	11,2		
uz-jaja-3	11,1		
uz-jaja-4	10,9		
uz-jaja-5	11,0		
uz-jaja-6	20,7	1,2	5,4
uz-jaja-7	23,6		
uz-jaja-8	21,3		
uz-jaja-9	23,2		
uz-jaja-10	22,5		
uz-jaja-11	39,2	6,8	16,9
uz-jaja-12	36,9		
uz-jaja-13	43,6		
uz-jaja-14	49,2		
uz-jaja-15	31,3		
uz-jaja-16	95,3	13,7	18,8
uz-jaja-17	70,1		
uz-jaja-18	74,2		
uz-jaja-19	57,9		
uz-jaja-20	68,3		
uz-jaja-21	118,5	11,7	11,0
uz-jaja-22	119,0		
uz-jaja-23	103,7		
uz-jaja-24	92,4		
uz-jaja-25	100,1		

U tablici 18 su prikazane dobivene koncentracije kontrole ponovljivosti rezidua desfuroil-ceftiofura. Točnost mjerenja, odnosno relativna standardna devijacija nisu odgovarajući te se metoda ne može primijeniti za desfuroil-ceftiofur. Instrument je dovoljno osjetljiv što je vidljivo u standardu, međutim desfuroil ceftiofur je nestabilan analit te mu ne odgovara priprema čemu se može doskočiti skraćivanjem pripreme, ali onda je analit slabije pročišćen te zaostaje više matriksa. Da metoda nije primjenjiva za desacetil-ceftiofur, vidljivo je i iz šumova na kromatogramu na slici 16. Dong i sur. (2022) dokazali su da je nakon prilagodbe pripreme moguće detektirati desfuroil-ceftiofur već pri koncentraciji od 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pri čemu relativna standardna devijacija iznosi manje od 10 %.

Tablica 18. Rezultati ponovljivosti rezidua desfuroil-ceftiofura

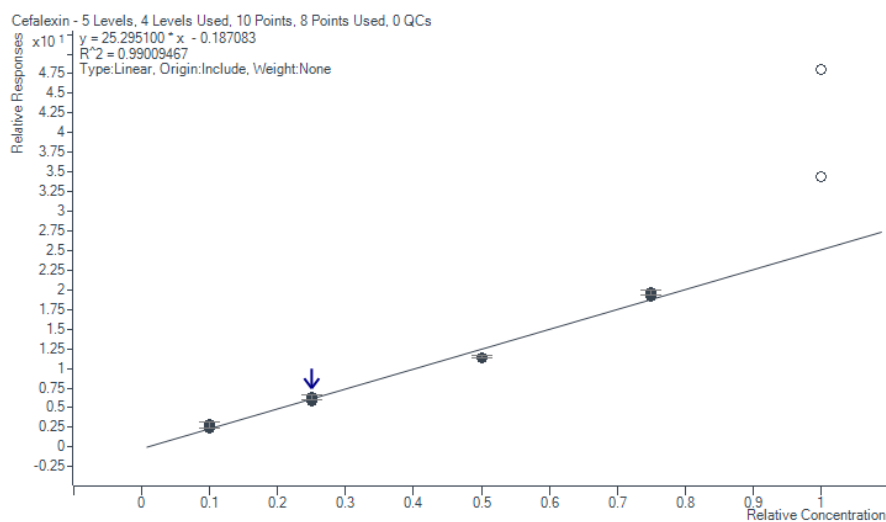
Oznaka uzorka	Konačna koncentracija	Standardna devijacija	Relativna standardna devijacija
uz-jaja-1	19,4	7,1	84,7
uz-jaja-2	5,2		
uz-jaja-3	9,2		
uz-jaja-4	0,0		
uz-jaja-5	8,1		
uz-jaja-6	0,0	15,1	82,9
uz-jaja-7	40,2		
uz-jaja-8	24,7		
uz-jaja-9	11,9		
uz-jaja-10	14,3		
uz-jaja-11	79,9	25,8	54,6
uz-jaja-12	42,6		
uz-jaja-13	29,2		
uz-jaja-14	67,1		
uz-jaja-15	17,9		
uz-jaja-16	230,9	83,5	81,5
uz-jaja-17	126,2		
uz-jaja-18	17,5		
uz-jaja-19	95,0		
uz-jaja-20	42,8		
uz-jaja-21	20,6	67,5	81,8
uz-jaja-22	179,7		
uz-jaja-23	125,3		
uz-jaja-24	47,1		
uz-jaja-25	39,7		



Slika 16. Kromatogram desfuroil-ceftiofura u uzorku uz-jaja-24

4.2.4. Linearnost

Linearnost metode ispitana je kalibracijskom krivuljom u 5 točaka prema tablici 3. Kako bi se postigla linearnost metode, u obzir su uzete samo 4 točke, dok je 5. isključena. Testirani raspon linearnosti pokriva koncentracije koje odgovaraju koncentracijama analita u obogaćenim uzorcima što se može potvrditi konačnim koncentracijama cefaleksina iz tablice 9 i kalibracijskom krivuljom cefaleksina na slici 17.



Slika 17. Standardna kalibracijska krivulja cefaleksina

Rezultati ispitivane linearnosti izraženi su kao koeficijent pravca (R^2) čija vrijednost bliže 1 označava bolju linearnost (González i Herrador, 2007). Uspoređena je linearnost kada se kao standard koristi cefaleksin D5, odnosno penicilin V D5 obzirom da cefaleksin ima razdvojene pikove pa ponekad nije pogodan kao standard. Iz tablice 19 vidljivo je kako je za svaki analit

kao i za standardnu kalibracijsku krivulju linearnost bolja ako se kao standard koristi cefaleksin D5. Za svaki analit kalibracijska krivulja je linearna u zadanom rasponu koncentracija s koeficijentom linearnosti koji se kreće od 0,843 za cefacetril do 0,997 za cefalonij.

Tablica 19. Usporedba linearnosti ovisno koristi li se kao standard cefaleksin D5 ili penicilin V D5

Analit	R ²			
	Linearnost standardne krivulje		Linearnost matriks kalibracijske krivulje	
	Cef-D5	PenV-D5	Cef-D5	PenV-D5
Korišteni interni STD				
cefacetril	0,843	0,788	0,923	0,869
cefaleskin	0,990	0,992	0,946	0,921
cefalonij	0,997	0,983	0,940	0,927
cefazolin	0,983	0,975	0,823	0,747
cefoperazon	0,993	0,985	0,946	0,912
cefkvinom	0,914	0,888	0,903	0,892
ceftiofur	0,993	0,997	0,847	0,804
cefapirin	0,983	0,993	0,947	0,934
desacetil-cefapirin	0,989	0,996	0,925	0,919
desfuroil-ceftiofur	0,931	0,079	0,359	0,369

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivana mikrobiološka metoda nije pogodna za određivanje rezidua cefalosporina u jajima. Pozitivan je rezultat detektiran kod uzoraka obogaćenih amoksicilinom, penicilinom V, tilozinom A i dapsonom dok u uzorcima obogaćenim cefaleksinom, ceftiofurom i cefkvinomom nije došlo do inhibicije rasta *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* što je rezultiralo nastankom žutog obojenja. Metoda je nedovoljno osjetljiva za cefalosporine obzirom da je primjena cefalosporina zabranjena za upotrebu kod nesilica.
2. Razvijena metoda tekućinske kromatografije – tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS) pogodna je za detekciju cefaleksina, cefazolina, cefoperazona, cefalonija, cefacetrila, cefkvinoma, ceftiofura, cefapirina i desacetil-cefapirina, dok nije primjenjiva za desfuroil-ceftiofur kojemu ne odgovara protokol pripreme uzoraka jer je nestabilan analit.
3. Najbolja ponovljivost metode pokazala se za cefaleksin pri 5 µg/kg, cefacetril pri 75 µg/kg, cefalonij pri 100 µg/kg, cefazolin pri 50 µg/kg, cefoperazon pri 50 µg/kg, cefkvinom pri 5 µg/kg, ceftiofur pri 25 µg/kg, cefapirin pri 5 µg/kg i desacetil-cefapirin pri 5 µg/kg.
4. LC-MS/MS metoda linearna je za sve cefalosporinske antibiotike osim desfuroil-ceftiofura u koncentracijskom području od 10 do 75 ng/mL.
5. Linearnost metode je bolja kada se kao standard koristi cefaleksin D5 u odnosu na penicilin V D5.

6. LITERATURA

Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N i sur. (2021) Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>.

Chong XM, Hu CQ (2008) Compilation of an ESI-MS library of β -lactam antibiotics for rapid identification of drugs. *Chromatographia* **68**, 759-766. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0790-4>.

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

De Rosa M, Marabotti A (2021) Cephalosporins. U: Offermanns S, Rosenthal W (ured.) *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, 3. izd., Springer Cham, Berlin, str. 429-439.

Dong W, Zeng Y, Wu X, Zhou Q, Zong Yang (2022) Determination of desfuroyl ceftiofur residues in poultry eggs by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Food Saf Qual* **13**, 941-947.

González GA, Herrador AM (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem* **26**, 227-238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>

Harrison CJ, Bratcher D (2008) Cephalosporins: A Review. *Pediatr Rev* **29**, 264-273. <https://doi.org/10.1542/pir.29-8-264>

Ichiro H (2019) *Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)*, e-book, 1. izd., Shimadzu Corporation.

Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta (2022) Određivanje antibakterijskih tvari mikrobiološkim testom.

Interna procedura Hrvatskog veterinarskog instituta (2024) Određivanje veterinarskih lijekova primjenom UPLC-MS-MS.

Larsson DGJ, Flach CF (2022) Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* **20**, 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>.

Li J, Zhang D, Chong X, Hu C (2010) Influence of substituent groups at the 3-position on the mass spectral fragmentation pathways of cephalosporins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **24**, 2143-2150. <https://doi.org/10.1002/rcm.4626>.

Lim J, Chai J, Ser W, Van Haeren A, Lim Y, Raja T i sur. (2024) Novel drug candidates against antibiotic-resistant microorganisms: A review. *Iran J Basic Med Sci* **27**, 134-150. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.71672.15593>.

Mackenzie JS, Jeggo M (2019) The one health approach-why is it so important? *Trop Med Infect Dis* **4**, 5-8. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>.

Mehta D, Sharma AK (2016) Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Mol Pharmacol* **2016**, 1-16.

Okaiyeto SA, Sutar PP, Chen C, Ni J, Wang J, Mujumdar AS i sur. (2024) Antibiotic resistant bacteria in food systems: Current status, resistance mechanisms, and mitigation strategies. *Agric Commun* **2**, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.agrcom.2024.100027>.

Paoletti F, Sdogati S, Barola C, Moretti S, Galarini R (2021) Development and validation of a multiclass confirmatory method for the determination of over 60 antibiotics in eggs using liquid-chromatography high-resolution mass spectrometry. *Food Control* **127**, 108109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108109>

Pravilnik (2011) Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla. Narodne novine 21, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011_02_21_441.html Pristupljeno 9.8.2024.

Ribeiro da Cunha B, Fonseca LP, Calado CRC (2019) Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? *Antibiotics* **8**, 45.

Shahbaz K (2017) Cephalosporins: pharmacology and chemistry. *Pharm Biol Eval* **4**, 234. <https://doi.org/10.26510/2394-0859.pbe.2017.36>.

Solomon B, Bilandžić N, Đokić M, Varenina I, Sedak M (2011) Mehanizam djelovanja, biosinteza i identifikacija beta-laktamskih antimikrobnih lijekova. *Croatian journal of food science and technology* **3**, 65-75.

Šalković-Petrišić M, Bradamante V (2014) Beta-laktamski antibiotici (i): Penicilini. *Medicinar*, e-nastavni članak. Katedra za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <http://medicinar.mef.hr/assets/arhiva/penicilini.pdf>. Pristupljeno 5.8.2023.

Šušković, J., Kos B. (2022): predavanja iz modula "Tehnologija antibiotika", Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <https://moodle.srce.hr/2021-2022/course/view.php?id=124996>. Pristupljeno 2.8.2023.

Uredba Komisije (EZ) Br. 37/2010 Uredba o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u donosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037>. Pristupljeno 9.8.2024.

Wang J, Macneil JD, Kay JF (2011) *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, John Wiley & Sons, New Jersey, str. 200-210.

Wu Q, Shabbir MAB, Peng D, Yuan Z, Wang Y (2021) Microbiological inhibition-based method for screening and identifying of antibiotic residues in milk, chicken egg and honey. *Food Chem* **363**, 130074. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130074>

Zhang Z, Zhang H, Tian D, Phan A, Seididamyeh M, Alanazi M i sur. (2024) Luminescent sensors for residual antibiotics detection in food: Recent advances and perspectives. *Coord Chem Rev* **498**, 215455. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215455>.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis