Određivanje rezidua sulfonamida u medu LC-MS/MS metodom

Šegudović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:721186

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016. Iva Šegudović

609/MB

ODREĐIVANJE REZIDUA SULFONAMIDA U MEDU LC-MS/MS METODOM

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

Zahvaljujem se mentorici, profesorici dr. sc. Blaženki Kos na pomoći tijekom pisanja diplomskog rada, te znanstvenoj savjetnici dr. sc. Nini Bilandžić koja mi je omogućila izradu diplomskog rada u Laboratoriju za određivanje rezidua na Odjelu za veterinarsko javno zdravstvo Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu.

Također se zahvaljujem dr. sc. Ivani Kurteš Varenini na velikoj pomoći, podršci i strpljenju tokom izrade diplomskog rada te Ines Vargi i Đurđici Božić na pomoći u eksperimentanom dijelu rada na Odjelu za veterinarsko javno zdravstvo Hrvatskog veterinarskg instituta.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji na strpljenju i velikoj podršci tijekom studiranja te prijateljima i kolegama koji su mi bili podrška i pomoć i tako doprinijeli završetku mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ODREĐIVANJE REZIDUA SULFONAMIDA U MEDU LC-MS/MS METODOM

Iva Šegudović, 609/MB

Sažetak: Sulfonamidi se koriste za prevenciju i liječenje bolesti u humanoj i veterinarskoj medicini. Posljedica prekomjerne upotrebe antibiotika u terapijske svrhe te kao promotora rasta životinja dovodi do pojave rezistentnih vrsta bakterija. Rezistencija na antibiotike predstavlja zdravstveni problem obzirom na povećanje broja otpornih mikroorganizama te nedostatka antibiotika za liječenje. Zbog tih razloga, nužna je kontrola sulfonamida u pčelinjim proizvodima kao jedna od temeljnih odrednica veterinarskog javnog zdravstva u svrhu zaštite krajnjih potrošača te sprječavanju širenja rezistencije. Legislativa koja zaštićuje potrošače od potencijalnog štetnih ostataka veterinarskih lijekova u hrani životinjskog podrijetla je Direktiva 96/23. Cilj ovog rada bio je razvoj potvrdne metode za određivanje sulfonamida u uzorcima meda. Za sve uzorke korišten je isti postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) te su analiti određivani metodom tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometijom masa (LC-MS/MS). Metoda je validirana u skaladu sa Odlukom Europske komisije (2002/657/EC) pomoću računalnog programa InterVAL Plus te primijenjena za analizu sulfonamida u uzorcima meda prikupljenih iz različitih dijelova Hrvatske.

Ključne riječi: LC-MS/MS, rezidue, SPE, sulfonamidi, validacija

Rad sadrži: 55 stranica, 21 slika, 16 tablica, 61 literaturnih navoda, 5 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr.sc. Blaženka Kos

Neposredni voditelj: Dr.sc. Nina Bilandžić, znan. savj.

Pomoć pri izradi: Dr.sc. Ivana Kurteš Varenina

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Jasna Novak
2. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
3. dr.sc. Nina Bilandžić, znan.savj.
4. Izv.prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Enginnering
Laboratory for technology antibiotics, enzyme, probiotic and starter culture

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

DETERMINATION OF SULFONAMIDE RESIDUES IN HONEY BY LC-MS/MS

Iva Šegudović, 609/MB

Abstract: Sulfonamides are widely used in human and veterinary medicine for prevention and treatment of diseases. The consequence of excessive use of antibiotics for therapeutic purposes and as growth promoters animals leads to the emergence of resistant strains of bacteria. Antibiotic resistance represents a global public health problem due to the steadily rising number of resistant bacteria on the one hand, and the lack of antibiotics capable of efficiently treating infections caused by such multidrug resistant bacteria, on the other. For these reasons, it is necessary to control sulfonamides in bee products as one of the guidelines of veterinary public health in order to protect final consumers and prevent the spread of resistance. Specific legislation protects consumers from exposure to potentially harmful residues of veterinary medicines, in food of animal origin (Directive 96/23). The aim of this study was to deployment confirmatory methods for determination of sulfonamides in honey samples. For all samples the same procedure was used solid phase extraction (SPE) and the analytes are determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method has been validated, in accordance with EU Commission Decision 2002/657/EC by a computer program interval Plus and applied to the analysis of sulfonamides in honey samples collected from different parts of Croatian.

Keywords: LC-MS/MS, residues, SPE, sulfonamides, validation

Thesis contains: 55 pages, 21 figures, 16 tables, 61 references, 5 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Blaženka Kos, Full professor

Principal investigator: PhD Nina Bilandžić, Scientific advisor

Technical support and assistance: PhD Ivana Kurteš Varenina

Reviewers:

1. PhD. Jasna Novak, Associate professor
2. PhD. Blaženka Kos, Full professor
3. PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor
4. PhD. Višnja Gaurina Srček, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 29 September 2016.

Sadržaj:

1. UVOD **1**

2. TEORIJSKI DIO .....

2.1. SULFONAMIDI 2

2.1.1. Rezidue antibiotika i njihov utjecaj na zdravlja ljudi 4

2.1.2. Prisutnost sulfonamida u okolišu 6

2.1.3. Zakonska regulativa 6

2.2. PRIMJENA ANTIBIOTIKA U PČELARSTVU 7

2.3. EKSTRAKCIJA ANTIBIOTIKA IZ PROIZVODA ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA NA ČVRSTOJ FAZI (SPE, engl. *solid-phase extraction*) 9

2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) 11

2.5. OSNOVE SPEKTROMETRIJE MASA 11

2.6. METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA SULFONAMIDA 12

2.6.1. Postavljanje metode LC-MS/MS za određivanje sulfonamida 13

2.6.2. Ionizacija 14

2.6.3. Udružena masena spektrometrija (engl. *Tandem MS*) 14

2.6.4. Tehnika snimanja iona 15

2.6.5. Primjena LC-MS/MS metode 15

2.7. VALIDACIJA LC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA SULFONAMIDA 16

2.8. DRŽAVNI PROGRAM MONITORINGA REZIDUA (DPMR) 19

3. EKSPERIMENTALNI DIO .....

3.1. MATERIJALI I OPREMA 20

3.1.1. Materijali 20

3.1.2. Potrebne kemikalije 20

3.1.3. Potrebna oprema i materijali 21

3.2. METODE RADA 23

3.2.1. Priprema otopina 23

3.2.2. Priprema standardnih otopina 24

3.2.2.1. Priprema uzorka sa standardnim dodatkom-matriks kalibracijska krivulja 25

3.2.2.2. Priprema standardne krivulje na otapalu 26

3.2.3. Priprema i čuvanje uzorka do analize 26

3.2.4. Pročišćavanje uzorka 27

3.2.4.1. Pročišćavanje na SPE kolonama C_{18}: 28

3.2.5. Postavke instrumentalne analize 29

4. REZULTATI I RASPRAVA .....

4.1. OPTIMIZIRANJE UVJETA MASENE SPEKTROMETRIJE I TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE 32

4.2. SPECIFIČNOST 33

4.3. REZULTATI OBOGAĆENIH UZORAKA MEDA 33

4.4. UTJECAJ MATRIKSA NA METODU 34

4.5. LINEARNOST INSTRUMENTA 38
4.6. PRECIZNOST METODE (ponovljivost) 40
4.7. ODREĐIVANJE GRANIČNE KONCENTRACIJE (KOLIČINE) ANALITA (CCα) i SPOSOBNOSTI DOKAZIVANJA (CCβ) 41
4.8. ODREĐIVANJE LIMITA DETEKCIJE (LOD) I KVANTIFIKACIJE (LOQ) 42
4.9. UTJECAJ PROCESA PROČIŠĆAVANJA I MATRIKSA NA ANALIT 43
4.10. REZULTATI REDOVNE KONTROLE SULFONAMIDA U MEDU PRIKUPLJENOG U HRVATSKOJ 46
5. ZAKLJUČCI 49
6. LITERATURA 50
7. PRILOZI 55

1. UVOD

Uporaba antimikrobnih sredstava u humanoj i veterinarskoj medicini može dovesti do razvoja antimikrobne rezistencije te širenja otpornosti mikroorganizma. Većina antibiotika djeluje na bakterije u fazi aktivnog razmnožavanja, posljedica toga je stvaranje rezistencije takvih perzistirajućih sojeva. Ostaci antibiotika u medu većinom potječu od neodgovarajuće pčelarstva prakse sa širokom primjenom u terapiji različitih oboljenja. Med se koristi širom svijeta, kao zamjena za šećer i prirodni konzervans u prerađenoj hrani, te kao dodatni zaslađivač u različitim namirnica. Ovisno o životnoj sredini okolnog bilja, med i ostali pčelinji proizvodi mogu biti zagađeni pesticidima, teškim metalima, te radioaktivnim materijalima. Medonosne pčele također mogu biti zaražene bakterijama, virusima, gljivicama i egzotičnim parazitskim grinjem u neprikladnim uvjetima okoline, što dovodi do bolesti kao što su američka gnjiloća (AFB), europske gnjiloće (EFB), akutna paraliza pčela (ABPV), nozeme (*Nosema ceranae*) ili varooze (*Varroa destructor*) te virus deformiranih krila (DWV). Različiti veterinarski lijekovi i pesticidi primjenjivali su se za kontrolu i liječenje bolesti, tako da se dodaju u hranu ili se njima prskaju košnice, ali ovi lijekovi dovode do pojave različitih ksenobiotičkih rezidua u medu, što predstavlja potencijalnu opasnost za potrošače.

U ovom radu za analizu rezidua skupine sulfonamida u medu, korišten je vezani sustav tekućinska kromatografija s dvostrukom spektrometrom masa (LC-MS/MS). Ovaj vezani sustav ima određene prednosti koje uključuju veću osjetljivost, selektivnost, robusnost i širi raspon m/z čime se proširuje paleta mogućih analiziranih tvari. Pročišćavanje uzoraka važan je korak i podrazumijeva dobro uhodanu tehniku ekstrakcije na čvrstoj fazi. Postupak ekstrakcije potreban je za izolaciju i koncentriranje rezidua koje se u složenom matriksu nalaze u niskim koncentracijama. Ekstrakt se djelomično pročisti prolaskom kroz kolonu silikagela (SPE) te filtrira, a potom analizira pomoću LC-MS/MS. Kao ionski izvor korišten je ESI, pri čemu nastaju ioni analita te dolazi do njihovog uvođenja u trostruki kvadrupolni analizator masa.

Cilj ovog rada je validiranje LC-MS/MS, potvrdne metode za praćenje rezidua sulfonamida u uzorcima meda prema kriterijima validacijskog postupka danog u Odluci komisije (Commission Decision 2002/657/EC) tj. u Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata objavljenom od Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva (NN 2/2005). U tu svrhu određivana je specifičnost, ponovljivost, limit detekcije i kvantifikacije, linearnost, granična koncentracija (količina) analita (CCα) te sposobnost dokazivanja (CCβ).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SULFONAMIDI

Zakonom o veterinarsko-medicinskim proizvodima (VMP) (NN 84/2008) definira se VMP kao svaka tvar ili mješavina tvari koja ima svojstvo liječenja ili sprječavanja bolesti životinja; ili svaka tvar ili mješavina tvari koje se mogu primijeniti na životinjama u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili postavljanjem medicinske dijagnoze, te sredstva za redukciju mikroorganizama za primjenu u veterini. Antimikrobna su sredstva ključna za zdravstvenu zaštitu i zdravlje životinja i populacija stoke. Rizik od razvoja antibiotičke rezistencije se povećava ako se antimikrobna sredstva upotrebljavaju neprimjereno, na primjer ne ciljano (npr. masovno liječenje ili primjena na neosjetljivim mikroorganizmima), u dozama manjima od terapijskih, ponavljano, ili u neprimjerenim razdobljima. Također, situacija se pogoršava uslijed nedovoljnog ulaganja u razvoj novih djelotvornih antibiotika (2015/C 299/04).

Sulfonamidi su sintetski antibiotici koji inhibiraju sintezu folne kiseline pa djeluju kao antifolati kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, *Nocardia, Chlamydia traehomatis,* kao i na neke *protozoe*. Folna kiselina je faktor rasta mnogim bakterijama i prekursor je purina koji su važan sastavni dio DNK i RNK. Sulfonamidni lijekovi derivati su sulfonilamida (p-amino benzensulfonamida) koji je strukturni analog para-amonibenzojeve kiseline (PABA) (kod bakterija, nužna komponenta za sintezu folne kiseline) i kompetitivno inhibiraju bakterijski enzim dihidropteroat sintetazu koja je odgovorna za ugrađivanje p-aminobenzojeve kiseline u dihidrofolnu kiselinu, neposredni prekursor folne kiseline (folat je potreban za sintezu DNA). Blokiranjem sinteze dihidrofolne kiseline smanjuje se količina metabolički aktivne tetrahidrofolne kiseline, kofaktora u sintezi nukleinskih kiselina, purina i DNK. Sulfonamidi imaju izrazito bakteriostatsko djelovanje, tj. ne ubijaju bakterije i viruse, već ih oštećuju i stvaraju nepovoljne uvjete za njihov rast i razmnožavanje. Na sulfonamide su osjetljive samo bakterije koje same sintetiziraju folnu kiselinu te je spriječen njihov rast i razvoj (Vardanyan i Hruby, 2006).

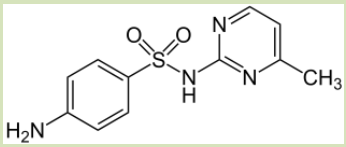
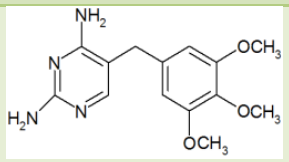
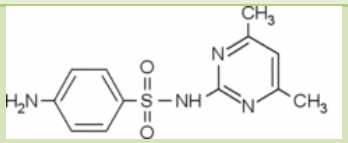
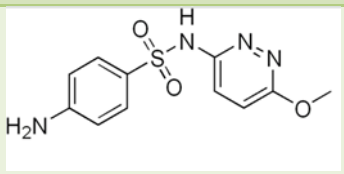
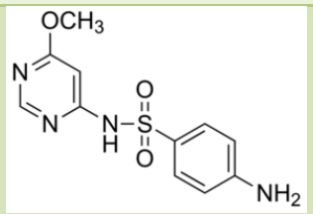
Humane i animalne stanice ne sintetiziraju folnu kiselinu već ju dobivaju gotovu iz vanjskih izvora, te uslijed toga nisu ugrožene antimetaboličkim učinkom sulfonamida. Razlika između bakterijskih i životinjskih stanica u korištenju folne kiseline, razlog je selektivne toksičnosti sulfonamida (Anonymus 2). Mehanizam bakterijske rezistencije na sulfonamide nastaje uslijed prelaze na metabolički put koji zaobilazi reakciju inhibiranu lijekom, pri čemu se koristi alternativni put za sintezu nukleinskih kiselina.

Dakle bakterije rezistentne na sulfonamide ne trebaju ekstracelularnu PABA, nego poput stanica sisavaca koriste prethodno formiranu folnu kiselinu iz okoliša. Većina antibiotika djeluje na bakterije u fazi aktivnog razmnožavanja, posljedica toga je stvaranje rezistencije takvih perzistirajućih sojeva. Kao rezultata genetskih promjena i posljedične selekcije rezistentnih mutanata nastaju rezistentni mikrorganizmi (Vardanyan i Hruby, 2006).

Era antimikrobne terapije počela je 1935.godine otkrićem sulfonamida, odnosno spoznajama Gerhard Domagk da narančasto-crvena sintetska boja, prontosil rubrum u organizmu prelazi u sulfonamid te ima sposobnost uništavanja *Streptoccocus* bakterija te je 1938. godine britanska grupa istraživača pokazala da je sulfanilamid stvarni antibakterijski agens u prontozilu. Spoznaja o antimikrobnom djelovanju sulfonamidne skupine potaknula je sintezu velikog broja sulfonamida, koji na sulfonamidskoj skupini imaju različite kemijske skupinama, koje prema svojoj građi različito djeluju (Tablica 1). Sulfonamidi se dobro resorbiraju u crijevima, a vrijeme djelovanja sulfonamida ovisi o stupnju vezanja na bjelančevine. Metaboliziraju se na način da se konjugiraju s acetilnom skupinom te se izlučuju kroz bubrege.

Djelovanje sulfonamida, značajno se može pojačati njihovom kombinacijom sa trimetoprimom (derivatom diaminpirimidina) sa slabije izraženom pojavom rezistencije pri čemu svaka komponenta djeluje bakteriostatski, dok zajedno djeluju sinergistički, često i na mikroorganizme koji su rezistentni na jednu ili na svaku od komponenti zasebno. Trimetoprim zaustavlja sljedeću fazu, a to je konverzija folne u foliničnu (tetrahidrofolnu) kiselinu. Ova inhibicija dviju sukcesivnih reakcija u sintezi DNK i RNK, pretvara dva bakteriostatska antibiotika u baktericidnu kombinaciju. Prva faza koju inhibiraju sulfonamidi ne odvija se u ljudskom organizmu, dok se druga faza koju inhibira trimetoprim odvija, odnosno taj lijek je relativno neškodljiv jer je osjetljivost inhibiranog enzima (dihidrofolat reduktaza) u bakterijama 50.000 puta veća nego u čovjeku. Međutim, dugotrajna primjena lijeka može ometati hematopoezu (Bedenić, 2009). Rezistencija na antibiotike može biti urođena i stečena otpornost kao posljedica genetičkih promjena u stanicama mikroorganizma, dok se širenje rezistencije temelji se na horizontalnom i vertikalnom prijenosu gena. Rezistencija na sulfonamide je široko zastupljena, a temelji se na promjeni inhibitornog metaboličkog puta, premošćivanjem ciljnog mjesta djelovanjem antibiotika. U metaboličkom putu sinteze folne kiseline, bakterija zaobilazi inaktiviran enzim dihidropteroat sintetazu te sintetizira enzim prema kojem sulfonamidi imaju smanjen afinitet (Džidić i sur., 2008).

Tablica 1. Kemijska struktura sulfonamida koji se primjenjuju kao lijekovi

SULFONAMID	**STRUKTURNA FORMULA**	**MOLARNA MASA (g mol^{-1})**	**KEMIJSKA FORMULA**
Sulfamerazin SMR **4-Aamino-N-(4-methyl-2-pyrimidinyl) benzolsulfonamid**		264,30	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$
Trimetoprim TMP **5-(3,4,5-Trimethoxybenzyl) pyrimidine-2,4-diamine**		290.32	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
Sulfametazine SMZ **4-amino-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl) benzenesulfonamide**		278.33	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$
Sulfametoksipiridazin SMP **4-amino-N-(6-methoxypyridazin-3-yl) benzenesulfonamide**		280.30	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$
Sulfamonometoksin SMM **4-amino-N-(6-methoxypyrimidin-4-yl) benzenesulfonamide**		280.302	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$

2.1.1. Rezidue antibiotika i njihov utjecaj na zdravlja ljudi

Sulfonamidi su polarne molekule s amfoternim svojstvom. Njihovu strukturu karakterizira p-amino fenilni prsten i amino skupina na N^4 položaju, a razlikuju se prema supstituentu na N^1 položaju (Varenina i sur., 2016). Ostaci antibiotika u medu većinom potječu od neodgovarajuće pčelarstva prakse sa širokom primjenom u terapiji različitih oboljenja. Rezidue antibiotika, nakon terapije životinja, imaju relativno dugo vrijeme poluživota, što ovisi o karenci pojedinog antibiotika, te mogu imati izravni toksični učinak na potrošače.

Proučavanjem dinamika razgradnje antibiotika sulfatiazola (STZ) u uzorcima meda u periodu od 6 mjeseci u tami na 25^{o}C, Gačić i sur. (2015) izvijestili su da se sulfonamidi sporije degradiraju u odnosu na oksitetraciklin i streptomicin te da je vrijeme poluživota sulfatiazola duže od 6 mjeseci.

Posljednjih nekoliko godina, pojava rezidua u medu bila je povezana sa prisustvom antimikrobnih ostataka sulfonamida (35%), tetraciklina (15%), nitrofurana (13%), linkomicina (13%), aminoglikozida (10%), nitroimidazola (8%), makrolida (5%) i kinolona (3%) (Galarini i sur., 2015). Često se govori o opasnostima od rezidua antibiotika, a rjeđe o značenju unošenja rezidua sulfonamida hranom. Stalno unošenje antibiotika i sulfonamida u ljudski organizam hranom te dugoročni učinak istih, osobito je opasno zbog njihove direktne toksičnosti odnosno kancerogenosti (poput sulfametazina), utjecaja na sastav crijevne mikroflore, mogućih alergijskih reakcija kod senzibilnih ljudi, te pojave otpornosti pojedinih patogenih mikroorganizama (Stark, 2000).

Najvažnije činjenice, koje se odnose na rezidue sulfonamida uključuju upotrebu tih antibiotika u veterinarskoj medicini i njihova prisutnost u okolišu što povećava rezistentnost mikroorganizma uključujući unakrsne rezistenciju (engl. *cross-resistence*) odnosno sposobnost toleriranja učinkovitosti dvije vrste sredstava iz različitih kemijskih skupina istog mehanizma djelovanja; broj bakterijskih sojeva otpornih na sulfonamide, posljednjih godina sustavno se povećava, te činjenica o najvećoj rezistentnosti mikroorganizama na sulfonamide u odnosu na druge antibiotike (Sarmah i sur., 2006). Povećanje bakterijske otpornosti na antibiotike pripisano je kombiniranim mikrobiološkim svojstvima, selektivnom pritisku antibiotika te društvenim i tehnološkim promjenama (Džidić i sur., 2008).

Američki centar za kontrolu i prevenciju bolesti (2000) opisao je otpornost bakterija na antibiotike kao jedan od najvećih svjetskih gorućih problema, te jedna od tri najveće prijetnje za ljudsko zdravlje. Primarni uzrok je dugoročna izloženost antibioticima i njihova upotreba kao lijekovi u ljudi i životinja. Tipovi antibiotika koji se koriste kod životinja, često su slični onima koji se koriste kod ljudi, pri čemu postoji jasan dokaz o posljedicama na zdravlje ljudi zbog rezistentnosti organizama koji proizlaze iz raširenosti korištenja antimikrobnih sredstava (WHO, 2003). Kod ljudi, otpornost *Salmonella typhimurium* na nalidiktinsku kiselinu, povezana je sa korištenjem antibiotika kao promotora rasta za životinje. WHO preporučuje da antibiotici koji su licencirani u humanoj medicini ne bi trebali biti korišteni kao promotori

rasta kod uzgoja životinja. U Europskoj uniji su zabranili primjenu antibiotika u svrhu stimulacije rasta životinja (promotori rasta).

2.1.2. Prisutnost sulfonamida u okolišu

Uobičajene vrste sulfonamida koji se koriste u zdravstvu i veterinarstvu predstavljaju probleme povezano s njihovom prisutnošću u biosferi. Uglavnom nakon njihove upotrebe, neiskorišteni sulfonamidi u izlučevinama ljudi i životinje ispuštaju se u okoliš i akumuliraju. Veliki dio doze sulfonamida iz organizma izlučuje se kao nepromijenjen spoj, dok se drugi dio ovisno o vrsti organizma podvrgava biotransformaciji poput oksidacije, acetilacije ili hidroksilacije na N^4-atomu dušika ili glukuronidaciji N^1- ili N^4-atoma dušika. Pretpostavlja se da se, nakon peroralne primjene, 50-70% od doze se izlučuje u urinu kao N^4-acetilsulfonamidi, a 15-20% kao N^1 glukuronidi (García-Galán i sur., 2008).

Kempre (2008), predstavlja tezu o utjecaju veterinarskih antibiotika na okoliš: rezistencija nastaje uslijed izlaganja subterapijskim dozama antibiotika u kontaminiranim fekalijama koje se koriste u poljoprivredi. Došlo je do prijenosa gena „rezistentnosti“ između bakterija istih sojeva ili rodova tijekom jednog rekombinacijskog procesa tj. horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju na antibiotike (ARG, engl. *antibiotic resistance gene*). Rezistentnost patogenih bakterija na sulfonamide može biti posljedica strukturne promjene u dihidropteroat sintetazi (DHPS, engl. *dihydropteroate synthase*) kao posljedica točkaste mutacije u genu DHPS (*fol*P). Ova mutacija utječe na ekspresiju DHPS enzima i enzim ima manji afinitet za sulfonamide. Mutanti *E.coli* pokazuju rezistenciju na sulfonamide kao rezultat supstitucije jednog ili više parova baza u genu DHPS (Graves i sur., 2011).

2.1.3. Zakonska regulativa

Zakonskom regulativom su određene najveće dopuštene količinama NDK rezidua (MRL, engl. *maximum residue limit*) za razne antibiotike u hrani životinjskog podrijetla. Značajni napori uloženi su prema razvoju metoda za istovremeno određivanje više klasa antimikrobnih agensa u hrani životinjskog porijekla.

Kada se radi o primjeni antibiotika u pčelarstvu, sve podatke o liječenju (dijagnoza, lijek aktivna tvar, način liječenja, duljina tretmana, karence i sl.) mora zapisati pčelar. Podatke o liječenju veterinarskim lijekovima mora potvrditi nadzorna stanica prije stavljanja meda ili

drugih pčelinjih proizvoda u trgovinu. Kada se primjenjuje konvencionalna medicina, razdoblje karence lijekova treba biti barem dvostruko dulje od razdoblja koje propisuje proizvođač (NN 13/02). Svrha Plana praćenja rezidua jest provjera da li se koriste zabranjene tvari u liječenju životinja, da li se u liječenju životinja poštovala karenca lijeka te da li se u hrani nalaze kontaminanti, a sve u cilju zaštite zdravlja potrošača. Poznato je da se u medu i ostalim pčelinjim proizvodima mogu javiti ostaci veterinarskih lijekova kao i okolišni kontaminanti pa se najčešće kvaliteta meda provjerava na prisutnost ostataka sulfonamida, organoklornih pesticida, organofosfornih pesticida, polikloridnih bifenila itd.

Trenutna legislativa vezana uz prisutnost antibiotika u medu u Republici Hrvatskoj propisane su Uredbom komisije (EU) br. 37/2010 o farmakološkim djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua farmakoloških djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla (Uredba, 2010) prema kojoj je prisutnost antibiotika u medu nedozvoljeno.

Izvještaj Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*) za 2014. godinu u kojem je ukupno ispitano 122 959 uzoraka hrane životinjskog podrijetla na antibakterijske lijekove (B1) od kojih je 223 bilo pozitivno (EFSA, 2015). Postotak nesukladnih uzoraka tj. uzoraka koji su sadržavali rezidue veterinarskih lijekova iznad dozvoljene NDK vrijednosti u 2014 bio je sličan u odnosu na prethodnih 7 godina (0,18%), a najviše nesukladnih uzoraka na antibiotike zabilježeno je u medu (0,72%) u odnosu na druge uzorke životinjskog podrijetla.

2.2. PRIMJENA ANTIBIOTIKA U PČELARSTVU

Prema definiciji Pravilnika (NN 53/15) med jest 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 mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja. Osnovne vrste meda možemo podijeliti prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranju. Stoga med prema izvoru iz kojeg je dobiven dijelimo na cvjetni ili nektarni med te medljikovac ili još nazvan medulin, dok u podjelu prema načinu proizvodnje ubrajamo med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća, cijeđeni med, vrcani med, prešani med i filtrirani med.

Med se najvećim dijelom sastoji od različitih šećera, pretežno glukoze i fruktoze, drugih tvari kao organske kiseline, enzimi i krute čestice. Med sadrži oko 76% šećera (voćnog šećera-fruktoze ili levuloze 41%, grožđanog šećera-glukoze ili dekstroze 34% i običnog šećera-saharoze 1%) 18% vode, te 6% ostalog (dekstrina, minerala, proteina, kiselina i neodređenih tvari). Pčelinji med bogat je i organskim kiselinama (jabučna, vinska, limunska) te vitaminima (B1, B2, B3 ili pantotenska kiselina, B5, B6 ili H, B9). Kako u medu ima i peludnih zrnaca, on sadrži nešto bjelančevina te neznatno vitamine. Dokazano je kako je sadržaj mikro elemenata i minerala u pčelinjem medu (magnezij, željezo, kalij, kalcij, mangan, cink, kobalt, bakar, natrij i dr.) gotovo jednak onome u plazmi ljudske krvi.

Količina vode važna je za njegovo čuvanje. Med može biti tekuće ili viskozne konzistencije, djelomično ili potpuno kristaliziran. Boja može biti od skoro bezbojne do tamnosmeđe, a prvenstveno ovisi o prirodnim bojama koje sadrži nektar, te u tom slučaju boja se može kretati od prozirne, žućkaste, zlatne, crvenkastosmeđe, smeđe i zagasito tamne boje. Aroma može varirati, ali mora potjecati od izvornog bilja.

Med prirodno ima visoki stupanj kiselosti. Njegov pH je približno od 3 do 4,5 i ta kiselost uništava gotovo sve što bi u njemu moglo rasti. Amina Harris iz Centra za med i oprašivanje objašnjava da med u prirodnoj formi je izuzetno male vlažnosti. Veoma mali broj bakterija i mikroorganizama može preživjeti u tako negostoljubivu okruženju, što je značajno za dugovječnost meda. Nevas i sur. (2006) dokazali su prisutnost spora *C.botulinum* u medu koja putem probavnog trakta dospije u debelo crijevo gdje prelazi u vegetativni oblik, razmnožava i izlučuje toksine, te može izazvat botulizam rana ili dojenački botulizam. Stoga bakterije i svi drugi organizmi svoje stanište moraju tražiti negdje drugdje jer je očekivani životni vijek u medu jednostavno prekratak (Anonymus 1).

Med se već stoljećima koristi kao lijek, pri čemu vodikov peroksid stvara savršenu barijeru protiv inficiranja rana. Al-Waili i sur. (2012) utvrdili su da med ima potencijalnu ljekovitost kod infekcija, zacjeljivanja rana i prevenciji raka. Antioksidansi i flavonoidi imaju antibakterijska svojstva. Također med oslobađa od nervoze i tjeskobe, poboljšava imunitet, rješava čireve kod dijabetičara te djeluje kao izvor energije.

Mnogi znanstvenici su predlagali primjenu antibiotika u pčelarstvu kao poticaj za razvoj pčelinje zajednice. Također, veterinarska struka je dozvolila primjenu antibiotika kao preventivnu mjeru za bolesti. Najčešće, lako prenosive, ekstremno opasne bakterijske bolesti pčela su američka i europska (*Streptococcus pluton*) gnjiloća pčelinjih zajednica (Bargańska i

sur., 2011). No, danas je poznato da uzročnik američke kuge pčelinjeg legla *Penibacillus larvae Whitekao* u nepovoljnim uvjetima, u uginuloj pčelinjoj ličinki stvara spore koje su vrlo otporne na toplinu, sušenje i kemijske tvari. Stoga primjena antibiotika nema svrhu.

U starijoj literaturi spominje se davanje pčelama šećernog sirupa sa antibiotikom, međutim upotreba antibiotika u liječenju pčela u Republici Hrvatskoj i državama Europske unije je zabranjena te su stoga pojačane kontrole analize meda. Posljedica nekontroliranog korištenja antibiotika u pčelarstvu kako u preventivne tako i u terapijske svrhe je učestalo pronalaženje rezidua antibiotika i sulfonamida u medu. Ukoliko nadležni veterinarski inspektor utvrdi prisutnost američke gnjiloće, naređuje mjere saniranja i uklanjanja izvora zaraze. Liječenja američke gnjiloće nema. Najbrži, najbolji i najskuplji način je radikalno suzbijanje bolesti gušenjem pčelinje zajednice sa sumpornim trakama te spaljivanjem saća i košnica. Košnice u dobrom stanju i pčelarski pribor potrebno je dezinficirati odgovarajućim dezinfekcijskim sredstvom (Rogulja, 2016).

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

Tradicionalne korištene tehnike koje zahtijevaju razmjerno velike količine uzoraka, toksičnih reagensa i organskog otapala zamijenjene su ekološki prihvatljivijim sa tendencijom smanjenja volumena otapala, količine toksičnih reagensa i vremena analize. Ekstrakcijom sa polarnim organskim otapalima (SE) kao što su acetonitril, aceton i metanol mogu se izdvojiti spojeve širokog raspon polarnosti. No međutim, ekstrahira se i veliki broj endogenih komponenata matriksa (Masiáa i sur., 2016). Prednost SPE postupka u odnosu na uobičajene postupke pripreme uzorka kao što je ekstrakcija otapalom je smanjenje vremena potrebnog za analizu, korištenje manje otapala te jednostavnost postupka.

Izolacija sulfonamida iz komponenata meda provedena ekstrakcijom na krutoj fazi (SPE) (Maudens i sur., 2004; Thompson i Noot, 2005) te analizira tekućinskom kromatografijom nakon koje slijedi fluorescenti ili UV sustav detekcije sa niskom granicom detekcije (Maudens i sur., 2004; Sheridan i sur., 2008)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) temelji se na zadržavanju odabranih analita na sorbensu, nakon čega slijedi njihovo ispiranje sa odgovarajućim otapalima. Kod ekstrakcije čvrstom fazom koriste se male kolone punjene raznim adsorbensima poput anorganskih (silikagel,

aluminijev-oksid, magnezijev silikat) ili sorbensima modificiranim uvođenjem različitih funkcionalnih skupina. Metoda se koristi za koncentriranje analita iz razrijeđenih otopina te za uklanjanje interferencija iz koncentriranih ekstrakta pod vakumom (Majors, 2013). Prvi korak u postupku ekstrakcije je kondicioniranje sorbensa propuštanjem organskog otapala kroz kolonu, čime se postiže bolja povezanost sorbensa i uzorka. Propuštanjem uzorka kroz kolonu dolazi do vezanja analita na površinu sorbensa. Ispiranje sorbensa odgovarajućim otapalom provodi se kako bi se uklonile moguće interferirajuće tvari, a analit ostaje vezan na čvrstu fazu. Završni korak je eluiranje analita odgovarajućim eluensom (Dead, 2009).

Kod veterinarskih lijekova, acetonitril se široko primjenjuje, zbog sposobnosti taloženja bjelančevina (glavne komponente u hrani). Glavni nedostatak kvantifikacije spojeva u biološkim uzorcima predstavlja učinak matriksa, odnosno osjetljivost tehnike na egzo (spojevi iz postupka pročišćavanja) i endogene tvari (spojevi potekli iz matriksa) prisutnih u uzorku. Učinci matriksa, uzrokovani su interakcijama (van der Waals, dipol-dipol ili elektrostatske sile) između veterinarskih lijekova i ko-ekstrakta, te mogu pospješiti ili smanjiti ionizaciju analita te dovesti da nastajanja supresije ili pojačanja signala analita, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata identifikacije. Za smanjenje utjecaja matriksa na rezultate analize u fazi pripreme uzorka za ispitivanje, koristi se sljedeće: kalibracija na matriksu (engl. *matrix-matched calibration*), dodatak unutarnjeg standarda (najčešće izotopom obilježen analoga analita) ili povećanjem intenziteta pročišćavanja ekstrakta; a u fazi instrumentalne analize mijenjaju se uvjeti kromatografije i produžuje vrijeme analize (Stachniuk i Fornal, 2015). Kalibracija pomoću uzorka matriksa temelji se na pripremi kalibracijske otopine koja sadrži komponente matriksa uzorka i čista otapala. Analitički signal analita u uzorku uspoređuje se sa kalibracijskim otopinama, te se za pripremu kalibracijska otopina za matrikse sličnog sastava, često primjenjuje jedan reprezentativni matriks (Gómez-Pérezi sur., 2015).

Spojevi sulfonamida vezani za šećere ne mogu se kromatografski identificirati. Kiselinskom hidrolizom ili razrjeđivanjem vodom, postiže se djelomično ili potpuno oslobađanje sulfonamida te omogućuje kromatografska identifikacija. Objavom Schwaiger i Schuch (2000) potvrdilo se da je za određivanje sulfonamida u medu potrebna kisela hidroliza prije samog postupka ekstrakcije sulfonamida. Korak hidrolize sa kiselinom osigurava oslobađenje šećera vezanih na sulfonamide u matriksu meda. Dobre performanse ekstrakcije s kiselinskom hidrolizom opisuju Mohamed i sur. (2007), Economou i sur. (2012), Dubreil-Chéneau i sur. (2014).

2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), dok se druga, pokretna (mobilna faza) kreće u određenom smjeru (definicija po IUPAC-u). Kromatografsko odjeljivanje temelji se na adsorpciji, razdjeljivanju, ionskoj izmjeni ili razlici fizikalno-kemijskih svojstava molekule poput veličine, mase, konfiguracije. Tekućinska kromatografija koristi se za separaciju otopljenih tvari, koje u različitoj mjeri stupaju u interakcije s nepokretnom i tekućom fazom, te imaju različito vrijeme zadržavanja na koloni. Tekućinski kromatograf sastoji se od sustava za dobavu i otplinjavanje pokretne faze (engl. *degasser*), injekcionog sustava, kućišta za kolonu te detektora.

Razdjelna kromatografija, kao najčešći mehanizam odjeljivanja, dijeli se na kromatografiju normalnih faza (engl. *normal-phase liquid chromatography*, NP-LC) gdje je nepokretna faza polarna (nemodificirani silikagel), a pokretna faza je nepolarna (heksan, kloroform, diklormetan) te kromatografiju obrnutih faza (engl. *reversed-phase* chromatography, RP-LC) sa nepokretnom nepolarnom fazom (vezanjem nepolarnih skupina na silikagel) i pokretnom polarnom fazom (smjesa vode i organskih otapala; acetonitrila, metanola). Većina postupaka koristi HPLC (engl. *high-performance liquid chromatogrphy*) tehniku obrnutih faza uz gradijentalno eluiranje sa linearnim povećanjem udjela organskog otapala za što bolje odvajanje komponenata smjese, pri čemu se najpolarniji sastojci eluiraju prvi. Za analizu se koriste kemikalije kromatografskog stupnja čistoće, odnosno ne smiju sadržavati čestice veće od 0,45 μm (HPLC), kako ne bi došlo do začepljenja kolone (Leo i sur., 2012).

2.5. OSNOVE SPEKTROMETRIJE MASA

Spektrometrija masa (MS) je analitička tehnika kod koje se nabijeni atomi ili molekule odvajaju s obzirom na njihov omjer mase i naboja (m/z). Spektrometar masa sastoji se od tri osnovna dijela: ionizatora, analizatora masa i detektora. Temelj svake masene spektrometrije je analizirati ione u plinovitoj fazi pod utjecajem električnog i/ili magnetskog polja. Spektrometrija masa se može koristiti za dobivanje podataka o strukturi molekule, a time posljedično i funkciju molekula šireg raspona masa. Između tekućinske kromatografije i spektrometra mase dolazi do otparavanja tekućine, ionizacije neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator, drugim riječima dolazi do promjene faze, prevođenjem molekula iz

krutog ili tekućeg stanja u plinovito. Procesi ionizacije i evaporacije se odvijaju u ionskim izvorima.

Analiza iona se vrši masenim analizatorima koji kontroliraju kretanje određenih iona kroz analizator do detektora gdje se stvara signal. Maseni analizatori sastoje se od kvadropola koji pomoću oscilacija u električnim poljima određuje koji ioni će dospjeti do detektora. Naboj se generira dodavanjem ili gubitkom protona, kationa, aniona ili elektrona na molekuli, te dopušta upravljanje molekulama pomoću električnog polja. Na četiri šipke kvadropola primijenjen je napon radio frekvencije i istosmjerne struje koji filtriraju sve ione osim one određene m/z vrijednosti. Jedan par šipki ima konstantni napon i promjenjivu radiofrekvenciju, a drugi ima napon i radiofrekvenciju suprotne polarnosti. Promjenom vrijednosti napona u kvadropolu omogućuje se propuštanje samo određenih m/z vrijednosti iona do detektora. Kvadropol može analizirati ione na dva načina: kompletno (Scan) ili snimanje odabranih iona (engl. *selected ion monitoring*, SIM). Pomoću takve analize moguće je odrediti kvalitativni sastav analiziranog uzorka, primjerice molekulsku masu ili kemijski sastav, a uz odgovarajući standard i kvantitativni sastav (Stachniuk i Fornal, 2015).

2.6. METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA SULFONAMIDA

Analitičke metode za detekciju i/ili određivanje ostataka zabranjenih supstancija, veterinarskih lijekova i kontaminanata mogu biti orijentacijske i potvrdne metode, a moraju udovoljavati zadanim analitičkim kriterijima. Kvantitativnim metodama se određuje da li je koncentracija prisutnih lijekova u uzorcima iznad ili ispod dozvoljene koncentracije (Makovec i sur., 2014). Orijentacijske metode (engl. *screening methods*) omogućuju dokazivanje prisutnosti neke tvari, te imaju sposobnost brze obrade velikog broja uzoraka i otkrivanje mogućih pozitivnih rezultat. Pozitivni uzorci i oni za koje se sumnja da su pozitivni na antibiotik, dalje se analiziraju kvantitativnom potvrdnom metodom koja omogućuje jasnu identifikaciju i kvantifikaciju analita. Potvrdne metode (engl. *confirmatory methods*) jednoznačno i potpuno identificiraju i kvantificiraju određenu supstancu, te ih karakterizira visoka osjetljivost, niska granica određivanja, selektivnost, preciznost i brzina analize (spektrometrija masa (MS): GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS/MS (NN2/05). Kvantitativne metode i metode kojima se potvrđuje prisutnost rezidua i njegova koncentracija ne smiju davati lažno-pozitivne rezultate (Šušković i Kos, 2007).

Metode utvrđivanja rezidua antibakterijskih lijekova mogu biti kvalitativne (mikrobiološki i imuno-enzimski testovi) te kvantitativne (pojedini imuno-enzimski testovi, plinska i visokotlačna tekućinska kromatografija). Mikrobiološki testovi tradicionalni su testovi koji se baziraju na inhibiciji rasta određenog mikroorganizma uzrokovanoj prisutnošću antibiotika. To su kvalitativni odnosno „screening“ testovi. Ovakvi testovi mogu biti izrazite osjetljivosti, ali nedostatak im je niska specifičnost.

Salinas i Espinosa Mansilla (1990) u rasponu *ppm* utvrdili su ostatke sulfonamida u medu pomoću reakcija "Bratton-Marshall" u spektrofotometru. Neidert i sur. (1986) predstavili su tankoslojnu kromatografiju (TLC) kao metodu za kvantitativno određivanje ostataka sulfatiazola u med.

Osnovni napredak u razvoju osjetljivije i specifičnije analize farmaceutskih rezidua u hrani, dovela je primjena tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s detekcijom masene spektrometrije (UPLC-MS/MS). To je sofisticirana tehnika koja omogućuje vrlo učinkovitu izolaciju iona analita iz šuma kojeg stvara matriks uzorka. UPLC-MS/MS karakterizira brza analiza, veća rezolucija, te viši pik i osjetljivost (Tamošiūnas i Padarauskas, 2008). Istovremenu analiza različitih klasa antibiotika u uzorcima meda proveli su Kivrak i sur. (2016) uporabom analitičke kolone Acquity BEH C_{18} za kromatografsku separaciju sa gradijentnom eluacijom, mobilnom fazom i udruženom spektrometrijom masa i ionizacijom elektrosprejem. U konačnici, razvijena metoda simultano određuje spojeve na razini ng kg^{-1}.

2.6.1. Postavljanje metode LC-MS/MS za određivanje sulfonamida

Vezani sustav tekućinska kromatografija visokog učinka i spektrometrija mase (HPLC-MS/MS, engl. *high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) predstavlja sustav koji omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Kod tandemske MS/MS kombinira se masena spektrometrija u dva koraka sa analizatorom iste ili različite vrste, te fazom fragmentacije između. Spajanje HPLC i MS omogućuje analizu najrazličitijih spojeva, uključujući termički nestabilne analite i analite s visokom molekularnom težinom, gdje je analiza pomoću GC-MS nemoguća. Jedna od najčešćih tehnika fragmentacije u kolizijskim čelijama (heksapol) je CID (engl. *collision-induced dissociation*) koja uključuje uvođenje inertnog plina (dušika,argona) pri čemu dolazi do sudara između molekula plina i uzorka, uslijed čega se molekula raspada na sebi specifičan način (Suder i Silberring, 2006). Tijekom identifikacije sulfonamida

generiraju se tri produkt iona: $[M\text{-}RNH_2]^+$ m/z 156 (cijepanjem S-N veza), $[M\text{-}RNH_2\text{-}SO]^+$ m/z 108 (elimirana RNH_2SO grupa) i $[M\text{-}RNH_2\text{-}SO2]^+$ m/z 92 (cijepanjem $[M\text{-}RNH_2\text{-}SO]^+$ grupe). Ostali specifični tranzicijski ioni potječu od promjenjivih substituenata amina (Abdallah i sur., 2014). Kombinacija tekućinske kromatografije s MS/MS-om osigurava „najidealnije“ odvajanje i identifikaciju analita iz smjese što se u tom stupnju ne može postići korištenjem samo jedne od navedenih metoda. Unutar analizatora i detektora, spektrometra masa održava se visoki vakuum kako bi se izbjegli slučajni sudari analita s molekulama zraka, pri čemu maleni analiti nikada nebi dospio do detektora (Varga, 2010).

2.6.2. Ionizacija

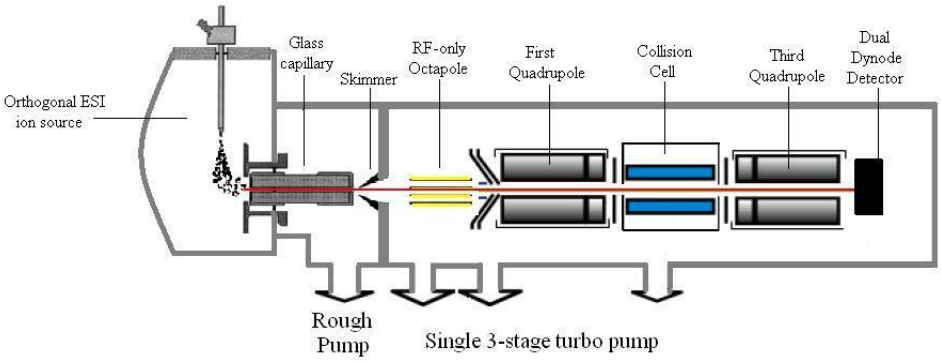
Mogućnost ionizacije tvari, osnovni je uvjet za analizu u masenom spektrometru. Jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS je ESI (engl. *Electrospray Ionization),* a ujedno je kompatibilan sa svim analizatorima. Ionizacija može biti pozitivna i negativna (u ovisnosti o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi), a ionizacija i nebulizacija se događaju pri atmosferskom tlaku uz optimalnu temperaturu iznad 100 °C u struji dušika (Stachniuk i Fornal, 2015).

Ionizacija se odvija tako da pokretna faza i analit protječu kroz kapilaru (obično 1-1000 μL min^{-1}) koja ujedno predstavlja elektrodu pod visokim naponom (2-5 kV), te se uvode u ionizacijski izvor (Seger i Griesmacher, 2007). Na vršku igle se formira maglica sastavljena od niza kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Kapljice se smanjuju otparavanjem otapala pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala. Nakon što se dovoljno smanje, da se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i kapljice se otparavaju ili se razbiju na manje kapljice. Analit prelazi u plinsku fazu, a ti ioni bivaju privučeni prema otvor iza kojeg je visoki vakuum i analizator (Cindrić, 2009).

2.6.3. Udružena masena spektrometrija (engl. *tandem MS*)

Nekoliko analizatora smještenih u seriji čini standardnu metodu za visoku točnost prilikom utvrđivanja kvantitativnih rezultata. Najpopularniji udruženi maseni spektrometri uključuju trostruki kvadropol (QQQ) u kojem su dva kao ion analizatori, a treći predstavlja kolizijonu ćeliju. Kod trostrukog analizatora svaki analizator ima odvojenu funkciju (Slika 1.) Prvi kvadropol (Q1) radi u načinu rada SIM, odnosno izabire ione od interesa, određene m/z

vrijednosti, koji se fragmentiraju, te samo najintenzivniji fragmenti prolaze dalje. Drugi kvadropol (Q2) predstavlja kolizijona ćelija koja fokusira i prenosi ione (engl. *precursor*) , a istovremeno u putanju odabranih iona uvodi kolizijoni plin. Treći kvadropol analizira fragmente iona (engl. *product*) koji su generirani u kolizijonoj ćeliji. Nakon što je odabrao prekursor ion u MS1 analizatoru, te nakon što je fragmentiran u kolizijskoj ćeliji MS2 je postavljen da prati višestruke reakcije ili MRM (engl. *multiple reaction monitoring*), odnosno da snima više određenih produkt iona. U analizi MRM spoj karakterizira nekoliko parametara: kromatografskog vremena retencije, masu molekularnih iona, dva fragmentirana ione i omjera intenziteta fragmentirane ione (Agilent Technologies, 2012).



Slika 1. Udruženi maseni spektrometar (Anonymus 3. <https://sites.google.com/site/masonaco/Home/mass-spectrometry/mass-analyzers>)

2.6.4. Tehnika snimanja iona

Detektor se sastoji od dviju dinoda koje pretvaraju kinetičku energiju fragmenta molekula iona u električni signal odnosno elektrone. Nastali elektroni se umnažaju odbijajući se od stakalca (engl. *conversin dinode*) i broje u brojaču elektrona, a time se smanjuje mogućnost detektiranja eventualno zaostalih neutralnih molekula (Agilent Technologies, 2012).

2.6.5. Primjena LC-MS/MS metode

Prednost tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometijom masa u odnosu na ostale sustave je mogućnost istovremenog praćenja analize korištenjem dvaju detektora: spektrometra mase i DAD (engl. *diode array detector*) s mogućnošću izbora do 8 valnih duljina. Ovom analitičkom metodom moguća je kvantitativna analiza: koristeći standardne otopine analita i interni standard, MRM tehnikom izradi se kalibracijska krivulja na temelju koje se odredi koncentracija u uzorcima. Također je moguća i kvalitativna analiza: snimanje

spektra uzorka, određivanje molekulske mase spoja, analiza fragmentacije određenog molekulskog iona (engl. *product ion*) te određivanje prekursora određenog fragmenta (engl. *precursor ion*).

Široka primjena analitičkih metoda, LC-MS/MS kao dijagnostički alati ima mnoge prednosti u odnosu na tradicionalne molekularne tehnike, uključujući visoke propusnosti sposobnosti, veću osjetljivost, posebno za niskomolekularne spojeve i jednostavnost standardizacije. Iz tih razloga, korištenje ove tehnologije u kliničkim aplikacijama dramatično se povećao u posljednjih nekoliko godina i LC-MS/MS se sada rutinski koristi za mjerenje koncentracije lijekova i toksina, hormona, te za otkrivanja drugih specifičnih gljivičnih proizvoda (invazivna aspergiloza) u uzorcima bolesnika (Grebe i sur., 2011). Također, postoje razni literaturni navodi o primjeni metode kvantitativnog „screeninga“ LC-MS/MS poput određivanja antimikrobnih agenasa u hrani životinjskog podrijetla (mišić, mlijeko, jaja) (Chen i sur., 2016) uz ekstrakciju pomoću ultrazvuka (UAE, engl. *ultrasound-assisted extraction*) sa acetonitrilnom i vodom te pročišćavanje ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Detektirani i kvantificirani su ovi antimikrobni agensi: kinoloni, makrolidi, β-laktami, nitroimidazoli, sulfonamidi, linkomicini, kloramfenikol, tetraciklini, polipeptidi, antibakterijski sinergisti.

2.7. VALIDACIJA LC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA SULFONAMIDA

Prije nego se metoda odobri za korištenje u analizi mora joj se utvrditi valjanost, te osigurati pouzdanost i točnost analitičke metode. Validacijom analitičke metode se osigurava da je odabrana metoda prikladna za kvantitativno mjerenje određenih tvari u specifičnom matriksu. Potvrdne metode za veterinarske lijekove moraju biti u skladu sa Odlukama 2002/657/EC (European Commission, 2002). Vrednovanje metode (validacija) je potvrđivanje metode ispitivanjem i pribavljanjem stvarnih dokaza, da su ispunjeni posebni zahtjevi u pogledu specifične primjene. Metode ili kombinacije metoda trebaju biti pogodne za otkrivanje rezidua veterinarskih lijekova ili organskih zagađivala za grupe određenih tvari. Zahtjevi potvrdnih kvantitativnih metoda su točnost i preciznost.

Točnost metode se dobiva ponavljanjem analize uzorka certificiranih referentnih materijala ili ukoliko nije dostupan, analizom slijepih uzoraka obogaćenih na određenu koncentraciju analita koji se određuje. Granične vrijednosti iskorištenja (Tablica 2) koje metoda mora zadovoljit propisane su Pravilnikom o analitičkim metodama.

Tablica 2. Minimalna točnost kvantitativnih metoda (Odluka, 2002)

Koncentracija	Interval
≤ 1 μg kg^{-1} od 1 μg kg^{-1} do10 μg kg^{-1} ≥ 10 μg kg^{-1}	od – 50 % do + 20 % od – 30 % do+ 10 % od – 20 % do + 10 %

Točnost je stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Utvrđuje se utvrđivanjem istinitosti i preciznosti.

Preciznost

Preciznost metode se određuje koeficijentom varijacije (CV), a opisuje odstupanje rezultat ponovljenih analiza unutar određenog vremena. Koeficijent varijacije dobivenih vrijednosti ponavljajućih analiza referentnog materijala ne smije prelaziti vrijednost dobivenu Horwitzovom jednadžbom (Odluka, 2002):

$$CV\ \% = 2^{(1 - 0{,}5 \log C)} \quad [1]$$

gdje je C maseni udio izražena kao potencija (eksponent) s bazom 10 (npr. 1 mg $g^{-1} = 10^{-3}$).

Za koncentracije manje od 100 μg kg^{-1} jednadžba daje neprihvatljivo visoke koncentracije te CV vrijednost mora biti što niže je moguće, a iznad 100 μg kg^{-1} nesmije biti veća od 23 %.

Struka, regulativa i zakonodavstvo prihvatili su osam izvedbenih značajki validacije: specifičnost/selektivnost, linearnost, područje, preciznost, ponovljivost (engl. *repeatability*), međupreciznost (engl. *intermediate precision*), obnovljivost (engl. *reproducibility*) istinitost (engl. *trueness*), granica kvantifikacije, granica detekcije, postojanost. Prema Odluci komisije (2002/657/EZ) o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata navedeno je značenje sljedećih pojmova:

Specifičnost/selektivnost svojstvo je metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matriksu uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Specifičnošću metode može se odrediti samo jedan analit, a selektivnost nam omogućuje određivanje više komponenata istodobno. U praksi se dokazuje usporedbom odziva metode na referencijski materijal i analit u uzorku, uz provjeru prisutnosti eventualnih koeluiranja na retenciji analita uzimajući u obzir interval ± 2,5% (min).

Linearnost je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Određuje se mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referencijskog materijala. Kalibracijske krivulje u otapalu se izračunavaju linearnom regresijom ovisnosti omjera površina pikova analita i internog standarda (An/Ais) i inicijalne mase injektiranog analita (pg). Linearna krivulja se sastoji od minimalno 4 koncentracijske razine sa po 3 ponavljajuća testiranja te također uračunava točku (0,0).

Iskorištenje (engl. recovery): postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. Određuje se tijekom vrednovanja metode, ako potvrđeni referentni materijal nije dostupan

Istinitost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta.

Ponovljivost (engl. Intra-assay precision): stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod unaprijed određenim propisanim uvjetima. Preciznost se obično izražava kao nepreciznost i računa se kao standardna devijacija rezultata ispitivanja. Što je manja preciznost, veća je standardna devijacija (NN 02/2005).

Granična koncentracija (količina) analita (CCα) je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost α pogreške da uzorak ne udovoljava, odnosno da uzorak sadrži ispitivani analit. α pogreška je vjerojatnost lažno pozitivne odluke. Za zabranjene tvari ne smije prelaziti 1 %

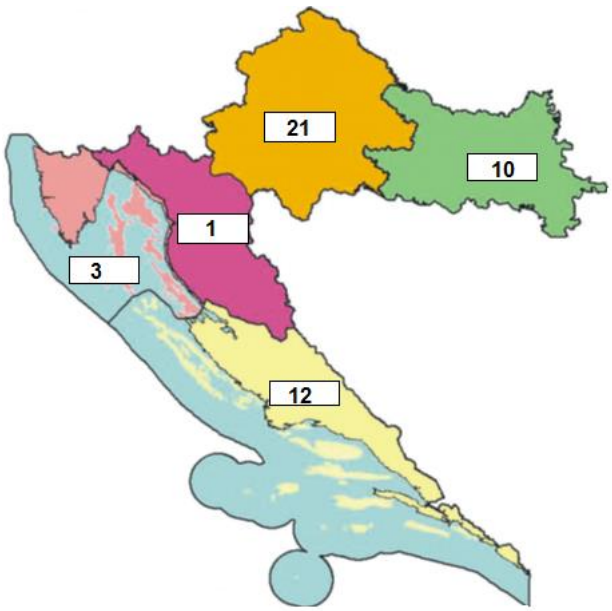
CCα za zabranjene tvari poput sulfonamida utvrđuje se postupkom s baždarnom krivuljom prema normi HRN ISO. U tom slučaju, koristi se slijepi uzorak koji se obogaćuje na razinu MRPL ili iznad nje, u jednakim razmacima. Analizirati uzorke. Nakon identifikacije, grafički prikazati odnos signala i dodane koncentracije. CCα jednaka je pripadajućoj koncentraciji u točki sjecišta s ordinatom y uvećana za 2,33 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti.

Sposobnost dokazivanja (CCβ) predstavlja najmanji udio tvari koji se metodom može dokazati, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost ß pogreške. β pogreška je vjerojatnost lažno negativne odluke, te je ograničena na 5%. Definirana je kao najniža koncentracija koja se može detektirat sa statističkom sigurnošću od 1–β za tvari za koje nije

utvrđena dopuštena količina. Granica dokazivanja za zabranjene količine slufonamida jednaka je odgovarajućoj CCα uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti za razinu srednje vrijednosti CCα. CCβ utvrđuje se postupkom s baždarnom krivuljom prema normi HRN ISO 11843, korištenjem reprezentativnog slijepog uzorka koji je obogaćen na razinu ili ispod najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode u jednakim razmacima. Analizirati uzorke te nakon identifikacije, grafički prikazati odnos signala i dodane količine analita.

2.8. DRŽAVNI PROGRAM MONITORINGA REZIDUA (DPMR)

Svrha monitoringa je na utvrđeni način pratiti da li se provode zakoni s ciljem općeg uvida u situaciju. Prilikom monitoringa potrebno se pridržavati propisanih postupaka uzorkovanja, analize uzoraka i tumačenja rezultata, te obaveznog poduzimanja mjera u slučaju nesukladnih nalaza. DMPR obavezan je za sve članice Europske unije i jedinstven je na cijelom teritoriju Hrvatske. Zemlje članice EU obavezne su dostaviti Europskoj komisiji sljedeće: plan za tekuću godinu, izvještaj o broju stvarno uzetih uzoraka u prethodnoj godini, te mjerama poduzetim kod nesukladnih nalaza do 31. ožujka tekuće godine.



Slika 2. Prikaz ukupnog broja analiziranih uzoraka meda unutar 5 regija Hrvatske provedenih u tekućoj godini (vlastita slika)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I OPREMA

3.1.1. Materijali

Za eksperimentalni dio, korištena su dva uzorka meda; cvjetni i med od bagrema, koji ne sadrži analite ove metode. Koristit će se u analizi kao slijepi uzorci i za pripremu uzoraka uz standardni dodatak.

3.1.2. Potrebne kemikalije

- Aceton, *Merck*, Darmstadt, Njemačka
- Diklormetan (CH_2Cl_2) bez etilnog alkohola kao stabilizatora, *J.T. Baker*, Deventer, Nizozemska
- Natrijev klorid (NaCl), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev sulfat, *Carlo Erba*, Milan, Italija
- CH3COOH ledena octena kiselina, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Kolone SPE SO_3H Aromatic sulfonic acid, 500mg, 3ml, *J.T. Baker*, Deventer, Nizozemska
- Koncentrat amonijaka (NH_4OH) (30%) *Merck*, Darmstadt, Njemačka
- Metanol (MeOH) za HPLC, *J.T. Baker*, Deventer, Nizozemska
- Amonij formiat (CH_3COONH_4), *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Ultračista voda
- Mravlja kiselina (HCOOH), *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD
- Referentni standardi:

  Sulfamerazin, *Vetranal*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

  Sulfametoksipiridazin, *Vetranal*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

  Sulfametazin (Sulfadimidin), *Vetranal*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

  Sulfamonometoksin, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD

  Sulfathiazole, *Vetranal*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

  Trimetoprim, *Fluka*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

- Interni standardi (IS):

  Sulfametazin Fenil-13C6, *Cambridge Isotope Laboratory*, Andover, MA, SAD

  Sulfamerazin fenil-13C6, *Vetranal*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.3. Potrebna oprema i materijali

- Uobičajeni laboratorijski materijal
- Homogenizator tipa stator/rotor (Polytron ili ekvivalentno)
- Analitička vaga (preciznost ± 0,0001 g), *OHAUS*, Parsippany, SAD
- Tehnička vaga (preciznost ± 0,001 g), *OHAUS*, Parsippany, SAD
- pH metar, *Sartorius*, Goetingen, Njemačka
- Vortex mješalica
- Vrtložna mješalica, IKA®, *Werke,* Staufen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (PP čašice visoke čistoće, i ostalo stakleno posuđe)
- Automatske pipete za volumen od 10µL do 5 mL, *Eppendorf,* Wesseling, Njemačka
- pH metar, *Sartorius*, Goetingen, Njemačka
- Centrifuga do 4000 rpm s termostatom, Rotanta 460R, *Hettich Zentrifugen*, Tuttlingen, Njemačka
- Hladnjak +2 do +8 ˚C
- Zamrzivač sa najnižom temperaturom od -18 ˚C
- Digestor
- Viale za instrument od 1,5 mL, PTFE čepovi sa silikonskom septom, te umetci za viale od 250 µL
- Jednokratni filteri RC (regeneriranom celulozom) promjera 0,45 µm > 1 mL, *Phenomenex Inc*., Torrance, Njemačka

- Spremnik od 15 ml
- Filtracijske kolone od 6 mL
- Adapteri za SPE kolonice
- Vakum pumpa
- Ultrazvučna kupelj, *Iskra*, Šentjernej, Slovenija
- Inzulinske igle i injekcije od 1 mL
- Vakuum sustav za SPE- ekstrakcija u čvrstoj fazi od 24 mjesta sa pipama kojima se regulira protok i manometrom za kontrolu
- Sustav evaporacije tekućim dušikom sa kupelji, N-EVAP® model 112, *Organomation Associates Inc.*, Berlin, Njemačka
- Dušik 99,999%
- Kupka za degaziranje
- Sustav za membransku filtraciju i odgovarajući filteri RC 0,45 μm
- Kromatografska kolona: Zorbax XDB C18, 4.6x75mm, 3,5μm, termostatirana na 40 ˚C
- Aparati LC-MS/MS: HPLC Agilent Tech. 1200 i Triple Quad LC/MS 6410 (ili ekv.) opremljen sa ESI sustavom za ionizaciju, sa uređajem za samouzorkovanje povezani sa računalom sa softverom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka (ili ekvivalent)- Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS G6410A (laboratorijska oznaka I-2 053/7), LC/MS degasser G1379B (I-2 053/1), LC/MS BINpump G1312A (I-2 053/2), LC/MS Hip-ALS G1367B (I-2 053/3), LC/MS FC/ALS Therm G1330B (I-2 053/4), LC/MS TCL G1316A (I-2 053/5), LC/MS DAD G1315B triplequad (I-2 053/5), *Agilent*, Santa Clara, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema otopina

2M Solna kiselina: u tikvicu od 1L pomiješati 197,1 g 37% kloridne kiseline i 400 mL vode, temperaturu prilagoditi sobnoj i nadopuniti do oznake.

10M NaOH: 40 g natrij-hidroksida, otopiti u vodi i nadopuniti do 100 mL.

Otopine acetona/diklormetan/octena kiselina 47,5:47,5:5 (v/v): u tikvicu od 1L dodati 50 mL octene kiseline, 475 mL acetona i 475 mL diklormetana- otopina je stabilna 1 mjesec

Otopina NH_4OH u MeOH: 2.5 mL koncentrata NH_4OH stave se u cilindar od 100 ml i dovesti do volumena sa MeOH. Pripremiti u trenutku korištenja- otopina je stabilna 1 mjesec

Otopina amonij formijata 5M: 7,875 g NH_4HCO_2 otopiti u 25 mL- otopina je stabilna 2 tjedna

Mobilna faza A: 1mL 5M otopine amonij formijata u tikvicu od 1 L, nadopuniti vodom, te namjestiti pH na 3,5 pomoću mravlje kiseline- prije stavljanja na instrument otapalo potrebno staviti u ultrazvučnu kupelj kroz 5 minuta- otopina je stabilna 4 dana

Mobilna faza B: 1mL 5M otopine amonij formijata u tikvicu od 1 L, nadopuniti metanolom- prije stavljanja na instrument otapalo potrebno staviti u ultrazvučnu kupelj kroz 5 minuta- otopina je stabilna 4 dana

*Skraćeni nazivi analita korišteni u daljnjem tekstu: SMR-sulfamerazin, TMP- trimetoprim, SMZ-sulfametazin, SMP-sulfametoksipiridazin, SMM-sulfamonometoksin

3.2.2. Priprema standardnih otopina

Za kvantitativnu, potvrdnu analizu sulfonamida koriste se standardne i matrix krivulje u različitim koncentracijskim područjima, koja su ovisna o zadanim MRL vrijednostima za svaki pojedini analit (Tablica 3).

Standardne kalibracije pripremane su u svrhu testiranja linearnosti instrumentalnog sustava dok za kvantitativnu procjenu služi isključivo kalibracija na matriksu.

Tablica 3. Postupak pripreme standardne otopine mješavine sulfonamida

Analit*		POLAZNA OTOPINA (ppm)	Polazni v1 (mL)	Ciljana konc. c2 (ppm)	Ciljani vol. v2 (mL)-tikvica	Oznaka std mješavine
Baz. otop.= SMR, SMZ, SMP, SMM		**1000**	**0,1**	**10**	**10**	**S1**
Baz. otop.= TMP		**1000**	**0,1**	**10**		
S1	**SMR, SMZ, SMP, SMM**	**10**	**1**	**1**	**10**	**S2**
	TMP	**10**		**1**		
S2	**SMR, SMZ, SMP, SMM**	**1**	**1**	**0,1**	**10**	**S3**
	TMP	**1**		**0,1**		

U ovom radu za obogaćivanje se koristi bazna otopina mješavine svih sulfonamida, a samo njih 5 je od interesa; SMR-sulfamerazin, TMP-trimetoprim, SMZ-sulfametazin, SMP-sulfametoksipiridazin, SMM-sulfamonometoksin. Postupak pripreme standarne mix otopine internih standarda naveden u tablici 4.

Tablica 4. Standarne mix otopine internih standarda

Analit*	POLAZNA OTOPINA (ppm)	Polazni v_1 (mL)	Ciljana konc. c_2 (ppm)	Ciljani vol. v_2 (mL)-tikvica	Oznaka std mješavine
SMZ-13C6	**100**	**0,250**	**1**	**25**	**IS1**
SMR-13C6	**200**	**0,125**	**1**		

Radne otopine pripremane su u metanolu u odmjernim tikvicama volumena 10 ml. Radne otopine (S1, S2, S3, IS1) stabilne su 6 mjeseci, pohranjene u hladnjaku na +4 °C.

Interni standardi se pripremaju u acetonitrilu, te zatim radne otopine u metanolu. Nakon pripreme standarde vorteksirati, te ih profiltrirati izravno u viale pomoću 0,45 µm RC filtera.

Izrada standardne i matriks kalibracije (Tablica 5) bazirana je na izradi ukupne mješavine standardne otopine koja sadrži svaki pojedini analit u različitim koncentracijama (Tablica 3 i 4).

3.2.2.1. Priprema uzorka sa standardnim dodatkom-MATRIKS KALIBRACIJSKA KRIVULJA

Standardna krivulja na matriksu meda priprema se iz standardne mješavine sulfonamida za matriks meda prethodno navedene u Tablici 3. Obogaćenje uzorka se provodi na 4 razine navedene u Tablici 5.

Tablica 5. Matriks krivulja za med

Analit*	**Razina M**			
	1	**2**	**3**	**4**
SMR, SMZ, SMP, SMM µg kg $^{-1}$	1	2,5	5	10
SMZ-13C6, SMR13C6 µg kg $^{-1}$	5			
Volumen RS-SULF-MIX-MED µL	50 S3	125 S3	25 S2	50 S2
Volumen RS-SULF-MIX-IS µL	**25 IS1**			

Dodavanje standarda vrši se izravno na odvaganu količinu uzorka (5g meda), nakon čega se uzorci ostave 10 minuta da se izjednače koncentracije. Analiti su fotosenzibilni, stoga je potrebna pažnja prilikom pripreme, tako da se spriječi izlaganje izravnoj sunčevoj svjetlosti.

3.2.2.2. Priprema standardne krivulje na otapalu

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

Tablica 6. Standardna krivulja i koncentracijska područja po grupi analita

Analit*	Razina L					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**s.p.**
SMR, SMZ, SMP, SMM, TMP μg kg^{-1}	12,5	25	50	150	300	
SMZ-13C6, SMR-13C6, μg kg^{-1}	**25**					
Volumen RS-SULF-MIX -MED μL	25 S2	50 S2	100 S2	30 S1	60 S1	0
Volumen RS-SULF-MIX-IS μL	50 IS1					
Volumen MeOH μL	925	900	850	920	890	1000
Volumen Mobilne faze A μL	1000					

Nakon pripreme standarde vorteksirati, te ih profiltrirati izravno u viale pomoću 0,45 μm RC filtera. Standard razine L3 se priprema u svakoj analizi kao kontrola stabilnosti metode i sustava LC-MS/MS-a. Koncentracija internog standarda dodana na svaku razinu iznosila je 25 μg kg^{-1}. Krivulja regresije nacrtana je kao omjer površine pika ionske tranzicije analita i internog standarda (An1/AnIS) u odnosu na teoretsku koncentraciju analita.

3.2.3. Priprema i čuvanje uzorka do analize

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja odgovorno je izraditi Plan monitoringa rezidua radi provođenja kontrole i monitoringa određenih rezidua od strane ovlaštenih osoba. Zatim sakupiti, obraditi i analizirati podatke za procjenu načina i učinka propisanog monitoringa, dostaviti izvješća, podatke i nalaze uključujući i rezultate drugih provedenih studija Europske komisije (NN 79/08). Propisan je način odabira i uzimanje uzoraka. To su službeni uzorci koji se uzimaju od živih životinja koje su zdrave i/ili proizvoda

životinjskog podrijetla koji su higijenski ispravni, a koji su namijenjeni stavljanu na tržište u cilju prehrane ljudi. Veličina uzorka meda ovisi o zahtjevima korištenih analitičkih metoda. Uzorke službena osoba (službeni veterinar, ovlašteni veterinar) može uzeti u bilo kojoj točki proizvodnog lanca pod uvjetom da je moguće utvrditi proizvođača meda (NN 15/10).

Ukoliko se analiza ne izvodi odmah, uzorci se pohranjuju u hladnjaku na temperaturi 2–8 ºC najdulje 24 sata ili do 3 mjeseca na temperaturi –18 ºC.

U svrhu izbjegavanja kontaminacije, prije pripreme uzorka, pažljivo oprati noževe homogenizatora ili miksera sredstvom za čišćenje, toplom vodom i redestiliranom vodom. Nakon svake upotrebe homogenizator očistiti etanolom.

Prije svakog uzorka, kako bi se izbjegla kontaminacija, noževe homogenizatora potrebno je isprati nanovo i to ekstrakcijskim otapalom (aceton/diklormetan), a zatim redestiliranom vodom.

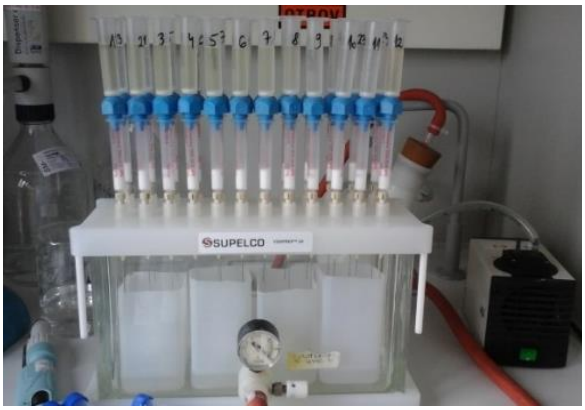
3.2.4. Pročišćavanje uzorka

- Izvagati 5 g meda u konusne epruvete od 50 mL, dodati standarde i ostaviti 10 min u mraku
- Dodati 5 mL 2 M solne kiseline
- 30 min miješati na vrtećoj miješalici (brzina 10)
- Dodati 980 μL 10 M NaOH, pH vrijednost namjestiti na 4,3-4,8 s 1 M ili 0,1 M NaOH i 1M ili 0,1M HCl (podesiti pH otopine NaOH i provjeriti pH nakon dodavanja u uzorke)
- inkubirati na 40 °C tijekom 1 h
- Dodati 10 mL ACN i 1g natrijklorida
- Miješati 15 min na vrtećoj miješalici (brzina 10)
- Centrifugirati pri 3600 rpm 10 minuta, pri sobnoj temperaturi
- Uzeti 5 mL organske (gornje) faze i staviti u epruvetu od 12 mL (u ovom koraku je pogodno prekinuti postupak za nastavak slijedećeg dana)
- Dodati 250 μL ledene octene kiseline
- Vorteksirati oko pola minute

- Uzorak je spreman za SPE pročišćavanje

3.2.4.1 Pročišćavanje na SPE kolonama C_{18}:

- Na vakuum sustav spojiti adaptere za kolonice, na njih kolonice (SPE SO_3H), te potom filtracijske kolone od 6 mL



Slika 3. Uzorci meda na filtracijskoj koloni (vlastita fotografija)

- Kondicionirati kolonice sa 5 + 5 mL mješavine aceton/ diklormetan/octena kis., puštajući eluate u otpad- paziti da od sada u kolonicama uvijek ima otapala i da protok ide 1 kap/ sek
- Kvantitativno prenijeti uzorak iz epruvete na filtracijsku kolonu (Slika 3)
- Ispiranje kolonice obaviti dodavanjem 5 mL UP H_2O te zatim 5 mL MeOH- pustiti eluat u otpad
- Od sada sakupljat eluat u novu konusnu epruvetu (polipropilenske epruvete s čepom)
- Eluirati analite sa 5 mL mješavine metanol/ NH_4OH
- Upariti uzorak do suhoga sa dušikom pri 50 ± 5 ˚C
- Otopiti ostatak sa 100 µL MeOH i 100 µL 5 mM otopine amonij-formijata s pH vrijednosti 3,5
- Otopiti vorteksiranjem. Kako bi se ostatak sasvim otopio potrebno je staviti epruvete u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta
- Prije instrumentalne analize filtrirati uzorak kroz 0,45 µm disk filter (za volumene < 1 mL) puštajući filtrat direktno u vialu za instrumentalnu analizu (Slika 4.) ili centrifugirati pri 3000 rpm 10 minuta



Slika 4. Oprema za filtriranje i analizu uzoraka (vlastita fotografija)

3.2.5. Postavke instrumentalne analize

Za kvantitativnu, potvrdnu analizu uzorak je potrebno pripremiti u minimalno 2 probe. Svaka serija mjerenja mora uključivati 6 uzoraka kontrole kvalitete.

Interni standard se dodaje u uzorke za matriks kalibraciju, u uzorke za analizu i negativni kontrolni uzorak.

Instrumentalna analiza se obavlja na instrumentu oznake I-2 053, MassHunter Acquisition software. Svaki početak analize podrazumijeva da je instrument (pročišćena kolona i izvor iona MS-a) ispran mobilnom fazom.

Prije početka instrumentalne analize optimizirati kolonu protokom mobilne faze kroz pola sata, dok na trenutnom prikazu stanja linija tlaka pumpe ne postane stabilna, a struja unutar kapilare (engl. *Capillary Current*) ne postigne konstantnost pri 40 ± 5 nA.

Također je potrebno optimizirat voltažu fragmentora i kolizijsku energiju prema svakom analitu ubrizgavanjem 2 µl ,10 µg ml^{-1} standardne otopine svakog sulfonamida direktno u sustav MS/MS s protokom < 0,15 mL min^{-1} te snimanjem i odabir najboljeg signala prekursora i dva iona produkta. Postupak snimanja iona je slijedeći: MS2 Scan snima prekursor ione; MS2 SIM snima odabrani prekursor uz optimizaciju fragmentora; Product Ion snima produkate odabranog prekursora pri 4 različite kolizijske energije te odabire najjači produkat, a MRM se vrši optimizacija kolizijske energije za svaki pojedini produkt. U konačnici, podaci su u skladu sa MRM pristupom, odabirom najintenzivnijeg iona tranzicijske iz prekursora u produkt ion.

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

Kromatografski uvjeti

Odvajanje se izvodi na koloni Zorbax XDB C18, 4.6x75mm, 3,5µm, pri 40 °C.

Mobilna faza se sastoji od otopine (A) 5mM amonij formijat (pH= 3,5) i otopine (B) 5mM amonij formijat u MeOH.

Analiza tekućinske kromatografije provodi se gradijentnom eluacijom te je prikazana u tablici 7:

Tablica 7. Protok pokretne faze u različitim vremenskim intervalima

Vrijeme (min)	**% B**	**% A**
početno stanje	10	90
0,38	10	90
8,25	25	75
11,25	60	40
12	100	0
13,2	100	0
14,3	10	90

Protok mobilne faze je 0,56 mL min^{-1}. Kompresibilnost mobilne faze A je 46 $*10^{-6}$ bar te B 120 $*10^{-6}$ bar.

Jedno kromatografsko snimanje traje 22 minute, te se kolona stabilizira dodatnih 7 minuta protokom mobilne faze u početnom stanju.

Kolona treba biti termostatirana na 40 °C.

Volumen injektiranja je 10 µL te se provodi uz ispiranje igle u poziciji za pranje (engl. *FlushPort*) kroz 3 sek i to otopinom 25% ACN, 25% MeOH, 50% ultračista voda i 0,01 % mravlje kiseline.

Snimanje ionskih tranzicija se vrši u 6 segmenata navedenih u tablici 8 u rezultatima.

Ionske tranzicije snimaju su MRM tipom skeniranja, snimanje jednog prekursora sa dvije tranzicije u produkt ione, ili 2 prekursora, svaki sa jednom tranzicijom, te su navedene u tablici 8 u poglavlju rezultati.

Snimanje u svih 6 segmenata se provodi pod slijedećim uvjetima: Temperatura plina iznosi 350 °C, protok plina je 11 L/min, tlak u Nebulizer-u je 35 psi, a napon kapilare je 4000 V. Provjeriti prisutnost eventualnih koeluirnja na retenciji analita uzimajući u obzir interval ± 2,5%.

Izvedbeni kriteriji i drugi zahtjevi za dokazivanje spektrometrijom mase

Omjer između kromatografskog vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja unutarnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora odgovarati vremenu zadržavanja baždarne otopine uz toleranciju od ±2,5 % za LC. Također omjer signal-šum (S/N engl. *signal to noise*) za svaki dijagnostički ion treba biti > 3:1. Relativna zastupljenost dokazanih iona, izražena kao omjer zastupljenijeg iona (engl. *quantifier*) prema manje zastupljenom (engl. *qualifier*), mora odgovarati zastupljenosti istih kod baždarnog standarda.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPTIMIZIRANJE UVJETA MASENE SPEKTROMETRIJE I TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE

Optimizirana voltaža fragmentora i kolizijske energije u MS/MS-u, za svaki analit prikazana je u tablici 8 u skladu sa MRM pristupom snimanja i odabira najboljeg signala prekursora i dva iona produkta, najzastupljenija tranzicija je podcrtana u tablici.

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

Tvar	Seg.	ISTD	RT (min)	Ion prekursor	Ion produkt	Fragmentor (V)	Kolizijska energija (V)
Sulfamerazin SMR	4	SMR-13C6	8,9	265	156 172	140	13 13
SMR-13C6	4	-	8,9	271	162	80	13
Trimetoprim TMP	5	-	11,0	291	123 230	85	29 25
Sulfametazin SMZ	6	SMZ 13C6	11,9	279	186 124	120	12 19
SMZ 13C6	6	-	11,6	285	186	120	12
Sulfametoksi-piridazin SMP	6	SMZ 13C6	11,9	281	156 92	110	12 30
Sulfamono-metoksin SMM	6	SMZ 13C6	12,8	281	92 108	135	30 24

Kod tekućinske kromatografije bitni su uvjeti protoka mobilne faze kroz kolonu unutar koje se postižu najbolji uvjeti za vrijednost mobilne faze B u iznosu od 100% nakon 13 minuta.

U svakom segmentu maseni spektrometar pretražuje određene masene tranzicije sulfonamida. Kada bi imali jedan segment, tada bi spektrometar morao cijelo vrijeme provjeravati sve analite, te bi se smanjila osjetljivost, signali bi bili nespecifični. Stoga, treba rasporediti segmente prema poznatom retencijskom vremenu svakog analita, pri čemu svaki analit podijelimo u određeni segment i u tom segmentu maseni spektrometar provjerava samo prethodno definirani analit.

4.2. SPECIFIČNOST

Specifičnost je testirana na slijepim uzorcima matriksa cvjetnog meda, te meda od bagrema gdje se pratio utjecaj matriks efekta na analizu pojedinih analita tijekom različitog vremena retencije (Slika 5).



Slika 5. Kromatogrami slijepih uzoraka bagremovog i cvjetnog meda

U slijepim uzorcima nisu nađeni nikakvi ineterferirajući signali sulfonamida, kao ni spojevi potekli od matriksa, a koji bi mogli ometati snimanje analita pri ciljanim koncentracijama, odnosno koeluiranja na retenciji analita uzimajući u obzir interval ± 2,5%.

4.3. REZULTATI OBOGAĆENIH UZORAKA MEDA

Uzorci cvjetnog i meda od kestena obogaćeni su na 3 razine, a rezultati detektiranih koncentracija pojedinih sulfonamida prikazani su u tablici 9 provedeni tijekom 2 dana.

Tablica 9. Rezultati uzoraka meda obogaćeni sulfonamidima (sulfamerazin-SMR, Trimetoprim-TMP, sulfametazin-SMZ, sulfametoksipiridazin-SMP, sulfamonometoksin-SMM)

Analit	Vrsta meda		BAGREM				CVJETNI			
	MAT KAL.		01	02	03	04	05	06	07	08
	Konc.	dan	dan 1		dan 2		dan 1		dan 2	
SMR	1		1,30	1,17	0,77	1,24	1,11	1,11	1,01	0,90
	2,5		2,42	2,46	2,61	3,13	2,25	3,02	2,73	2,81
	5		0	0	4,75	4,79	0	0	4,59	4,35
TMP	1		0,90	1,16	0,81	1,07	1,16	1,13	0,84	0,99
	2,5		2,57	2,32	2,80	2,63	2,62	2,66	2,75	2,91
	5		0	0	4,73	4,99	0	0	4,70	4,58
SMZ	1		1,32	1,25	0,92	1,11	1,07	1,05	1,18	1,13
	2,5		2,39	2,35	2,54	2,75	2,43	2,98	2,71	2,81
	5		0	0	4,55	4,58	0	0	4,51	4,53
SMP	1		1,49	2,36	0,85	1,07	0,74	0,68	1,20	1,06
	2,5		2,24	2,44	2,30	2,86	2,17	3,01	2,94	2,78
	5		0	0	4,63	4,98	0	0	4,45	4,56
SMM	1		1,29	1,31	0,84	1,05	1,09	0,99	1,33	1,25
	2,5		2,36	2,51	2,24	2,73	1,91	2,88	2,97	2,72
	5		0	0	4,67	4,57	0	0	4,35	4,38

4.4. UTJECAJ MATRIKSA NA METODU

Obogaćeni su uzorci meda različitih vrsta (bagrem, cvjetni) na različite razine u svrhu testa specifičnosti metode prema matriksu uz prisutnost analita (Tablica 5). Pratio se utjecaj matriks efekta na analizu pojedinih analita.

Usporedbom odsječka i nagiba pravca matriks kalibracijske krivulje za različite vrste meda dani su rezultati specifičnosti metode (Tablica 10). Cilj je bio pratiti matriks kalibracijsku krivulju na 4 razine i to kod 1 te 2,5 zatim 5 i 10 ppb (μg kg^{-1}). No, nakon dobivenih rezultata,

uočavamo značajna odstupanja kod najveće koncentracije. Stoga za procjenu ponovljivosti metode koristimo rezultate prve tri razine obogaćenja.

Tablica 10. Rezultati uzoraka meda obogaćeni sulfonamidima i odsječak (b) te nagib pravaca (a) njihovih krivulja (sulfamerazin-SMR, trimetoprim-TMP, sulfametazin-SMZ, sulfametoksipiridazin-SMP, sulfamonometoksin-SMM)

Analit	**Vrsta meda**	**BAGREM**				**CVJETNI**			
	Run	**Run 01**	**Run 02**	**Run 03**	**Run 04**	**Run 05**	**Run 06**	**Run 07**	**Run 08**
SMR	Intercept (b)	0,553	0,310	-0,069	0,603	0,350	-0,163	0,284	0,314
	Slope (a)	0,747	0,860	0,981	0,865	0,760	1,273	0,880	0,837

Analit	**Vrsta meda**	**BAGREM**				**CVJETNI**			
	Run	**Run 01**	**Run 02**	**Run 03**	**Run 04**	**Run 05**	**Run 06**	**Run 07**	**Run 08**
TMP	Intercept (b)	-0,213	0,387	0,063	0,130	0,187	0,110	0,083	0,350
	Slope (a)	1,113	0,773	0,959	0,976	0,973	1,020	0,946	0,874

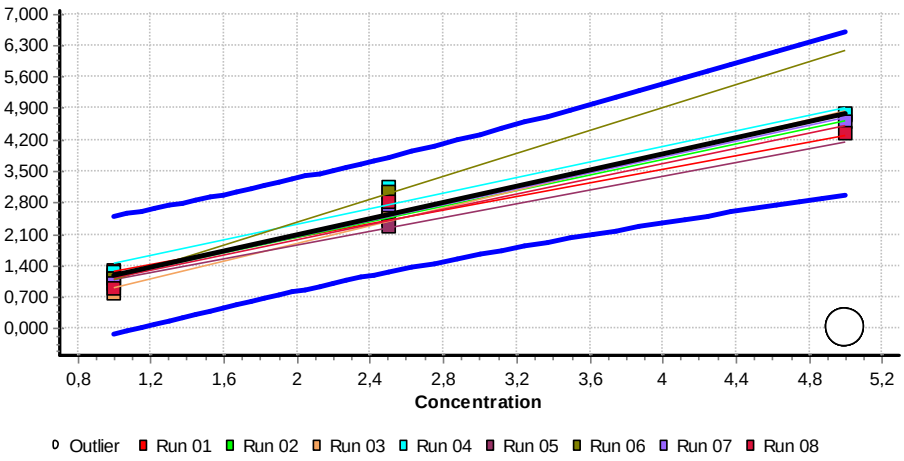
Analit	**Vrsta meda**	**BAGREM**				**CVJETNI**			
	Run	**Run 01**	**Run 02**	**Run 03**	**Run 04**	**Run 05**	**Run 06**	**Run 07**	**Run 08**
SMZ	Intercept (b)	0,607	0,517	0,129	0,395	0,163	-0,237	0,474	0,462
	Slope (a)	0,713	0,733	0,897	0,854	0,907	1,287	0,821	0,833

Analit	**Vrsta meda**	**BAGREM**				**CVJETNI**			
	Run	**Run 01**	**Run 02**	**Run 03**	**Run 04**	**Run 05**	**Run 06**	**Run 07**	**Run 08**
SMP	Intercept (b)	0,990	0	-0,080	0,238	-0,213	-0,873	0,622	0,368
	Slope (a)	0,500	0	0,944	0,964	0,953	1,553	0,791	0,858

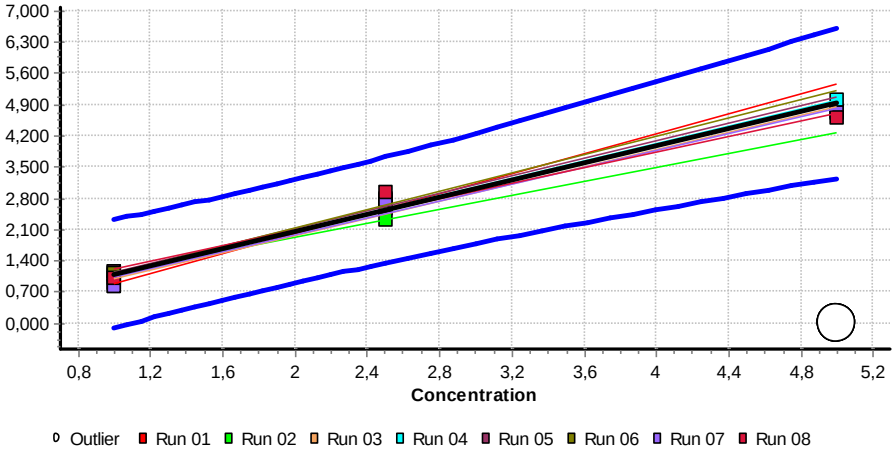
Analit	**Vrsta meda**	**BAGREM**				**CVJETNI**			
	Run	**Run 01**	**Run 02**	**Run 03**	**Run 04**	**Run 05**	**Run 06**	**Run 07**	**Run 08**
SMM	Intercept (b)	0,577	0,510	-0,134	0,332	0,543	-0,270	0,803	0,601
	Slope (a)	0,713	0,800	0,959	0,865	0,547	1,260	0,734	0,770

Na temelju vrijednosti nagiba pravca vidimo da nema značajnih odstupanja između dvije vrste meda, iako se tijekom mjerenja pojave pojedinačna odstupanja, koja se mogu zanemariti.

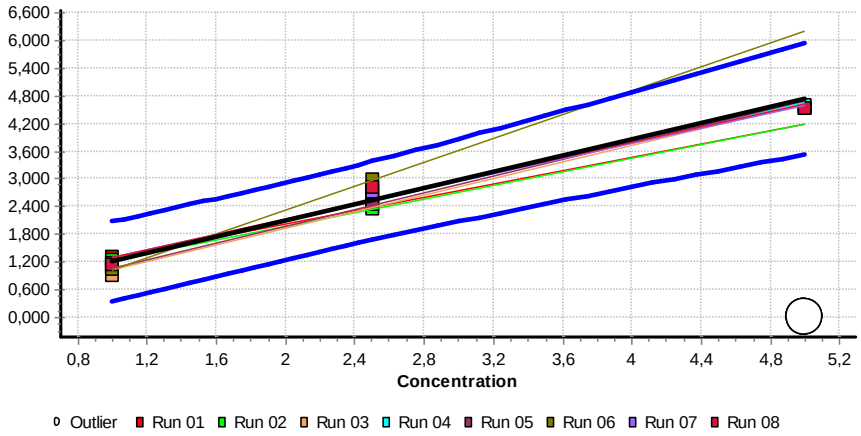
Linearnost na matriksu prikazana je grafički na slikama od 6 do 10.



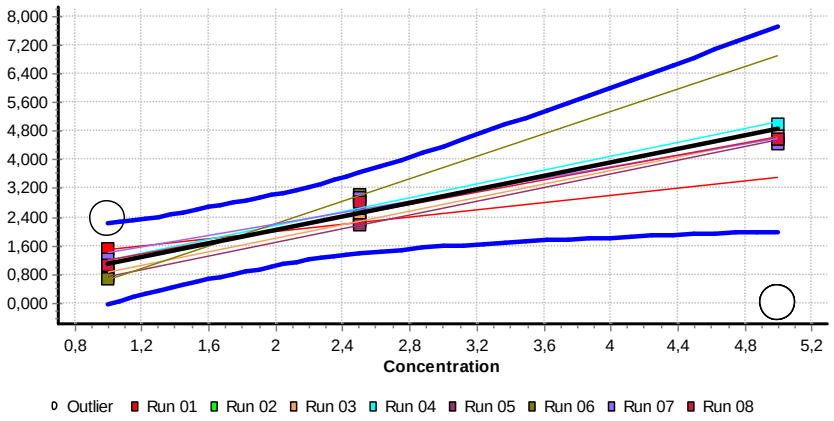
Slika 6. Linearnost metode na matriksu meda za sulfamerazin



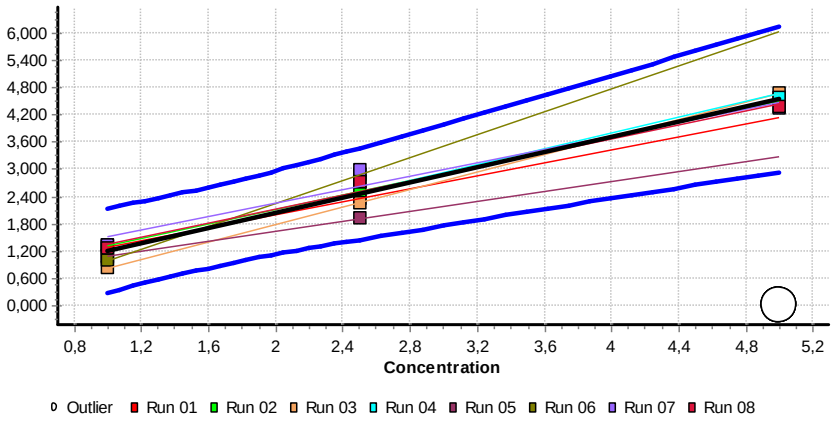
Slika 7. Linearnost metode na matriksu meda za trimetoprim



Slika 8. Linearnost metode na matriksu medu za sulfametazin



Slika 9. Linearnost metode na matriksu meda za sulfametoksipiridazin



Slika 10. Linearnost metode na matriksu meda za sulfamonometoksin

*Legenda: Outlier- točka sa značajnim odstupanjem

Analitičar 2:	Run 01, Run 02=Bagrem	Run 05, Run 06=Cvjetni
Analitičar 1:	Run 03, Run 04=Bagrem	Run 07, Run 08= Cvjetni

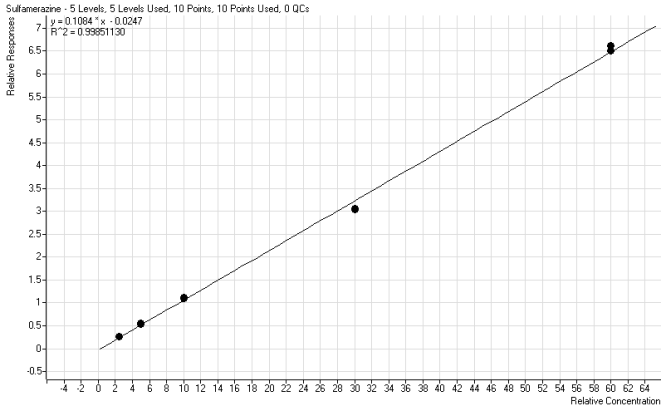
Iz grafičkog prikaza nagiba pravaca linearnosti na matriksu cvjetnog meda uočeno je odstupanje u matriks kalibraciji 6 za sve sulfonamide, što možemo povezati sa mogućnostima pogreški prilikom pročišćavanja uzorka.

Med od bagrema ima nešto niže vrijednosti nagiba pravca, izraženog kao srednja vrijednost nagiba pravaca svih razina u odnosu na cvjetni med za svaki analit.

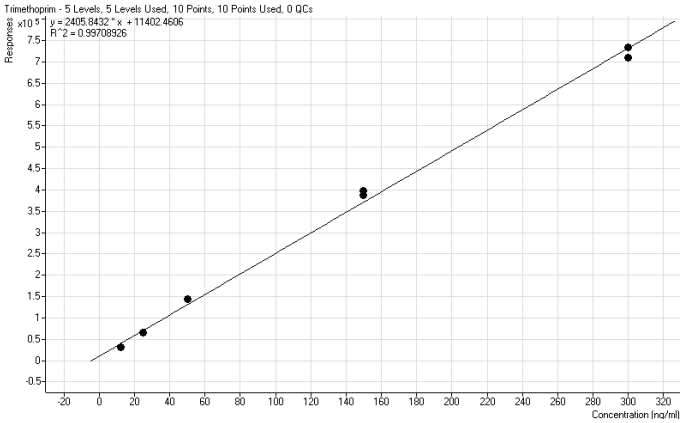
Analizom linearnosti za TMP u odnosu na druge analite uočena su najmanja odstupanja rezultata, dok su kod SMP i SMM uočena veća odstupanja iskorištenja.

4.5. LINEARNOST INSTRUMENTA

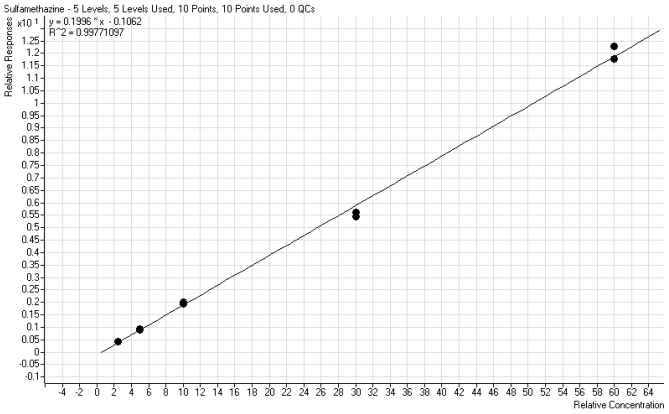
Definicija opsega linearnosti je samo sredstvo za testiranje odgovora instrumenta u području određivanja. Linearnosti kalibracijske krivulje testirane u različitim područjima za svaki pojedini analit prikazane su na slikama 11-15, a vrijednosti linearnosti navedene su u Tablici 11.



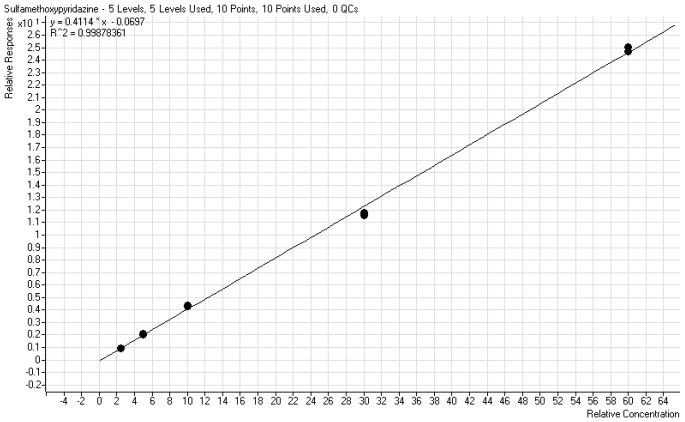
Slika 11. Linearnost kalibracijske krivulje za sulfamerazin



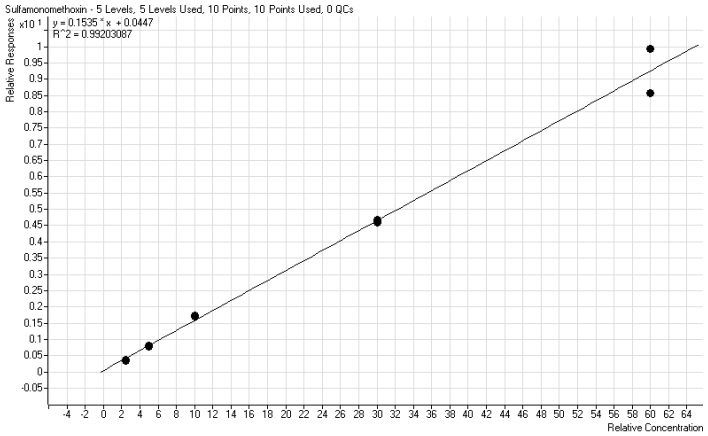
Slika 12. Linearnost kalibracijske krivulje za trimetoprim



Slika 13. Linearnost kalibracijske krivulje za sulfametazin



Slika 14. Linearnost kalibracijske krivulje za sulfametoksipiridazin



Slika 15. Linearnost kalibracijske krivulje za sulfamonometoksin

Tablica 11. Linearnost kalibracijskih krivulja za sulfonamide opisana pomoću jednadžbi pravca za sulfamerazin (SMR), trimetoprim (TMP), sulfametazin (SMZ), sulfametoksipiridazin (SMP), sulfamonometoksin (SMM)

Analit	**Jednadžba pravca**	**Odsječak na y-osi (b)**	**Nagib pravca (a)**	**Koeficijen pravca regresije (R^2)**
SMR	y= 0,1084 x – 0,0247	-0,0247	0,1084	0,998
TMP	y=2405,8432x+11402,4	2405,84	11402,46	0,997
SMZ	y= 0,1996 x – 0,1062	- 0,1062	1,996	0,997
SMP	y= 0,4114 x – 0,0697	-0,0697	0,4114	0,998
SMM	y= 0,1535 x + 0,0447	0,0447	0,1535	0,992

Postupak linearnosti procjenjuje se u rasponu koncentracije od 12,5 do 300 µg kg^{-1} pripremljenog analita u otapalu koristeći 5 točaka kalibracijskoj krivulji. Ispitivani raspon linearnosti obuhvaća koncentraciju koja odgovara koncentraciji analita u obogaćenom uzorku. Za svaki analit, kalibracijska krivulja je linearna sa koeficijenta pravca regresije (R^2) većim od 0,992.

4.6. PRECIZNOST METODE (ponovljivost)

Rezidue sulfonamida u uzorcima meda nisu dozvoljene. Iskorištenje se izražava kao omjer koncentracije u obogaćenom uzorku u odnosu na koncentraciju dodanu u slijepi uzorak prije ekstrakcije, pomnoženo sa 100. Koncentracije su dobivene pomoću matriks kalibracijskih krivulja dobivenih postavljanjem teoretskih masenih udjela obogaćenja uzoraka meda na x-osi i omjera površine pika analita i internog standarda na y-osi. U tablici 12 dani su rezultati preciznosti.

Tablica 12. Preciznost metode u matriksu meda za različite sulfonamide: sulfamerazin (SMR), trimetoprim (TMP), sulfametazin (SMZ), sulfametoksipiridazin (SMP), sulfamonometoksin (SMM)

Analit	**Obogaćenje [µg kg^{-1}]**	**1**	**2,5**	**5**
SMR	Standardna devijacija	0,337	0,391	0,414
	RSD %	33,7	15,36	8,3
	Iskorištenje %	117,3	100,9	95,5

Analit	**Obogaćenje [µg kg^{-1}]**	**1**	**2,5**	**5**
TMP	Standardna devijacija	0,366	0,363	0,373
	RSD %	33,6	14,5	7,5
	Iskorištenje %	109,1	100,9	98,2
SMZ	Standardna devijacija	0,221	0,262	0,279
	RSD %	22,1	10,5	5,6
	Iskorištenje %	119,4	100,6	94,3
SMP	Standardna devijacija	0,284	0,299	0,308
	RSD %	27,4	11,9	6,2
	Iskorištenje %	108,8	99,8	96,8
SMM	Standardna devijacija	0,232	0,285	0,308
	RSD %	23,2	11,4	6,2
	Iskorištenje %	120,1	97,39	90,5

Točnost analitiče metode za određivanje sulfonamida u medu odgovara zahtjevima, odnosno rezultati zadovoljavaju kriterije da je točnost kvantitativne metode unutar intervala -30 % do +10 %, točnije najveće odstupanje je nađeno kod sulfamonometoksina od 90,5 % do 120,1 %. Povećanjem koncentracije analita uočana je bolja ponovljivost rezultata te manje odstupanje u iskorištenju metode.

Preciznost kvantitativne metode također je zadovoljila uvjete da je CV (RSD) < 23 % u matriksu meda obogaćenog na 2,5 i 5µg kg^{-1}, dok je na najnižoj razini obogaćenja CV iznosio 33% kod SMR, TMP te 27 % SMP. Dakle rezultati ponovljivosti u matriksu meda nisu nikad prelazili 15%. Rezultati si pokazali zadovoljavajuće performanse metode u vezi preciznosti i točnosti.

4.7. ODREĐIVANJE GRANIČNE KONCENTRACIJE (KOLIČINE) ANALITA (CCα) I SPOSOBNOSTI DOKAZIVANJA (CCβ)

CCα je određena na način da se uzimaju u obzir 5 uzoraka obogaćenih na razinu C_0 za nepropisane i na razinu MRL u sklopu unutar laboratorijske reproducibilnosti, a pomoću slijedeće formule vrijednosti izračunate u tablici 13:

$$CC\alpha = C_o + 2{,}33 * S_{r,co}$$ za analit bez MRL [2]

gdje je

$\mathbf{S_{r,C0}}$ standardna devijacija reproducibilnosti pri C_0 vrijednosti

CCβ je računata iz podataka dobivenih za CCα vrijednost, a računata je prema slijedećoj formuli :

$$CC\beta = CC\alpha + 1{,}64 * S_{r,Co} \quad [3]$$

gdje je

$\mathbf{S_{r,CC\alpha,0}}$ standardna devijacija inter lab. reproducibilnosti pri $CC\alpha_{,0}$

Tablica 13. Granična koncentracija i sposobnost detekcije sulfamerazina (SMR), trimetoprima (TMP), sulfametazina (SMZ), sulfametoksipiridazina (SMP), sulfamonometoksina (SMM)

Analit	$\mathbf{C_0}$ **(µg kg^{-1})**	**CCα (µg kg^{-1})**	**CCβ (µg kg^{-1})**
SMR	1	2,38	3,39
TMP	1	2,21	3,07
SMZ	1	1,94	2,60
SMP	1	2,23	3,22
SMM	1	2,06	2,08

Nakon utvrđivanja ponovljiosti rezultata i točnosti određeni su maseni udjeli analita u uzorku iznad kojih sa sigurnošću možemo odrediti prisutnost određenog analita.

CCα i CCβ vrijednost zadovoljavale su postavljene kriterije. Vrijednost CCα se kreće od 1,94 do 2,38 µg kg^{-1} dok je CCβ u rasponu od 2,08 do 3,39 µg kg^{-1}.

4.8. ODREĐIVANJE LIMITA DETEKCIJE (LOD) I KVANTIFIKACIJE (LOQ)

Limit detekcije se određuje na temelju najniže koncentracije metode koja je ispitana prema slijedećoj formuli:

$$LOD = S_{Co} * t_{0,02} \quad [4]$$

gdje je: $t_{0,02}$ Student t vrijednost pri n-1 stupnjeva slobode i vjerojatnost od 98 %

S_{Co} standardna devijacija reproducibilnosti rezultata pri C_0

Iz toga slijedi proračun limita kvantifikacije prema formuli:

$$LOQ = 10 * S_{Co} \quad [5]$$

Te su zadovoljeni određeni uvjeti, kako bi postupak proračuna bio prihvatljiv, a naveden u tablici 14:

1) Koncentracija obogaćenja < 10 x LOD
2) Koncentracija obogaćenja > LOD
3) LOD < MRL
4) Odnos odziva i šuma instrumenta je prihvatljiv, odnosno veći od 3

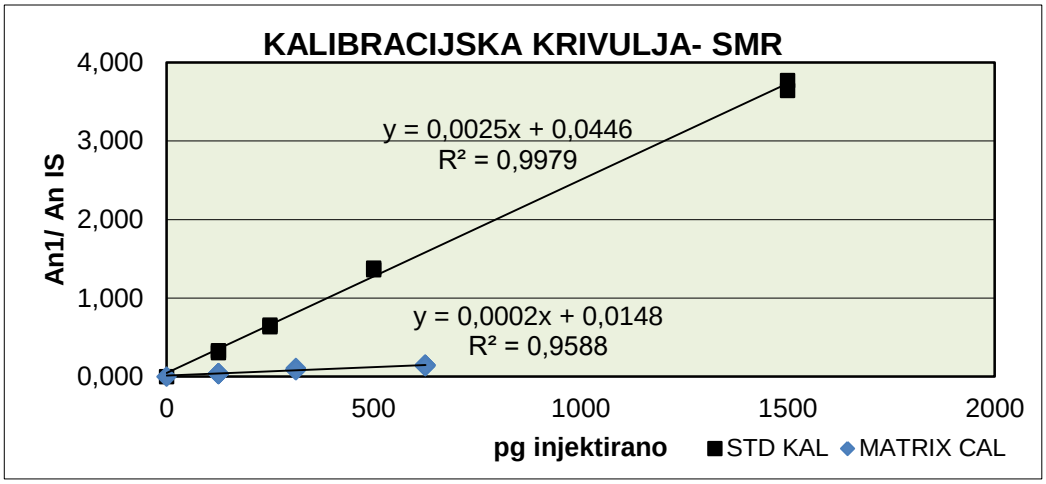
Tablica 14. LOD i LOQ vrijednosti za sulfamerazin (SMR), trimetoprim (TMP), sulfametazin (SMZ), sulfametoksipiridazin (SMP), sulfamonometoksin (SMM)

Analit	**LOD (µg kg^{-1})**	**LOQ(µg kg^{-1})**
SMR	0,8706352	3,37
TMP	0,9455563	3,66
SMZ	0,5709507	2,21
SMP	0,7337104	2,84
SMM	0,599369	2,32

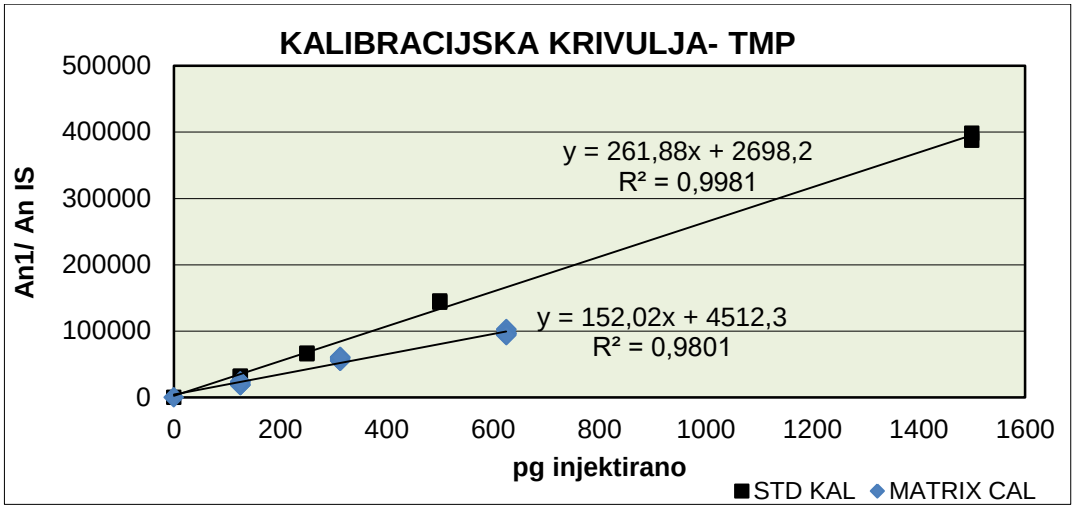
Limit detekcije i kvantifikacije još je jedan od načina za utvrđivanje karakteristike metode u kojem se u obzir uzimaju odzivi analita utvrđeni pri najnižim ispitivanim koncentracijama. Nešto niže vrijednosti od CCα i CCβ jer ne uzimaju u obzir ponovljivost utvrđenu pri svim ispitivanim razinama.Vrijednost LOD je povezana sa ponovljivosti.

4.9. UTJECAJ PROCESA PROČIŠĆAVANJA I MATRIKSA NA ANALIT

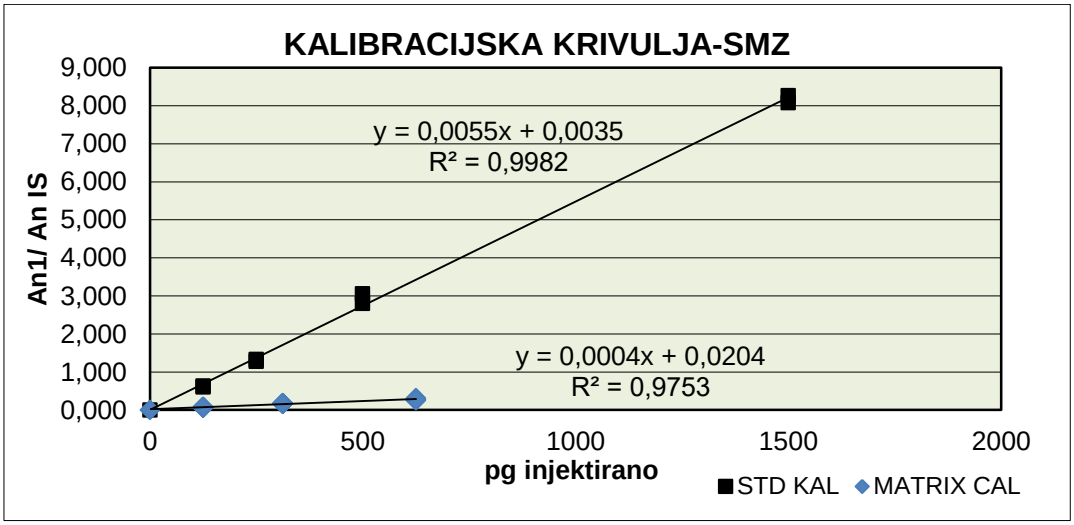
Praćenje utjecaja efekta matriksa provodi se usporedbom nagiba standardne kalibracijske krivulje (STD KAL) i nagiba matriks kalibracijske krivulje (MATRIX KAL) te prikaz utjecaja matriksa na rezultate prikazani su grafički na slikama 16-20, dok su brojčane vrijednosti prikazane u tablici 14.



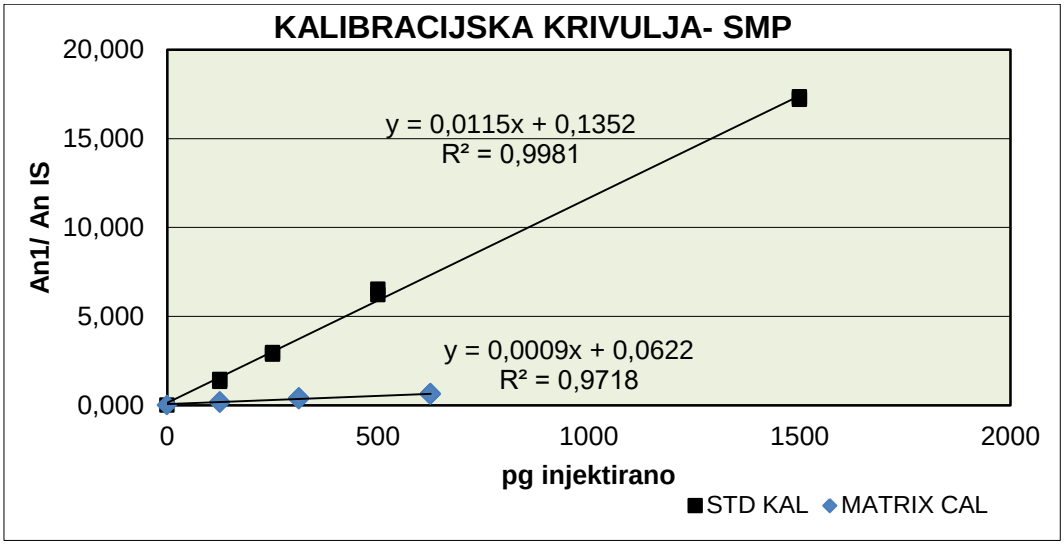
Slika 16. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za sulfamerazin



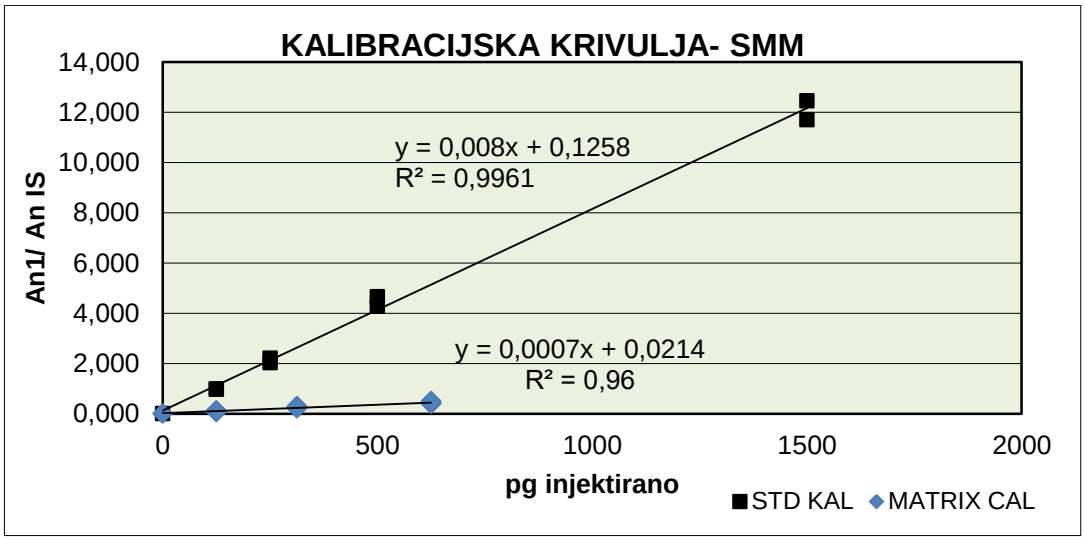
Slika 17. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za trimetoprim



Slika 18. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za sulfametazin



Slika 19. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za sulfametoksipiridazin



Slika 20. Usporedba standardne i matriks kalibracijske krivulje za sulfamonometoksin

U svrhu procjene matriks efekta proračunat je omjer nagiba pravca na otapalu (s) i nagiba pravca na matriksu (m) (Tablica 15).

Tablica 15. Vrijednosti nagiba i omjera nagiba kalibracije na otapalu i matriksu za različite sulfonamide: sulfamerazin (SMR), trimetoprim (TMP), sulfametazin (SMZ), sulfametoksipiridazin (SMP), sulfamonometoksin (SMM)

		SMR	TMP	SMZ	SMP	SMM
Nagib (a)	Kal. matriks(m)	0,00021	152,015	0,00043	0,00093	0,00068
	Kal. otapalo (s)	0,00263	240,584	0,0056	0,01166	0,00782
s/m		12,5	1,58	13,02	12,53	11,5

Eksperimenti utjecaja matriksa na analit pokazuju potrebu za korištenjem matriks kalibracijske krivulje jer proces ionizacije analita značajno ovisi o samom analitu te matriksu.

Analizom SMZ uočeno je najveće odstupanje matriks krivulje i do 13,02 puta više nego kod standardne kal. krivulje, i to supresijom analita tj. smanjenim odzivom analita pri istoj koncentraciji analiziranog sulfonamida. Najmanje odstupanje matriks krivulje u odnosu na standardnu TMP, a razloga je najmanji utjecaj matriksa na analit

Validacijski rezultati LC-MS/MS metode, razvijene u ovom istraživanju, ukazuju na dobru osjetljivost i ponovljivost za daljnje određivanje sulfonamida prisutnih u medu.

U znanstvenim radovima gdje su provedene slične validacijske studije sulfonamida u medu u odnosu na ovo istraživanje, nisu utvrđene niže koncentracije CCα i CCβ (Economou i sur., 2012, Estelle Dubreil i sur. 2014, Varenina i sur., 2016), a dobivene su slične vrijednosti iskorištenja i ponovljivosti metode. Studije specifičnost za različite vrste meda ranije nisu objavljene.

4.10. REZULTATI REDOVNE KONTROLE SULFONAMIDA U MEDU PRIKUPLJENOG U HRVATSKOJ

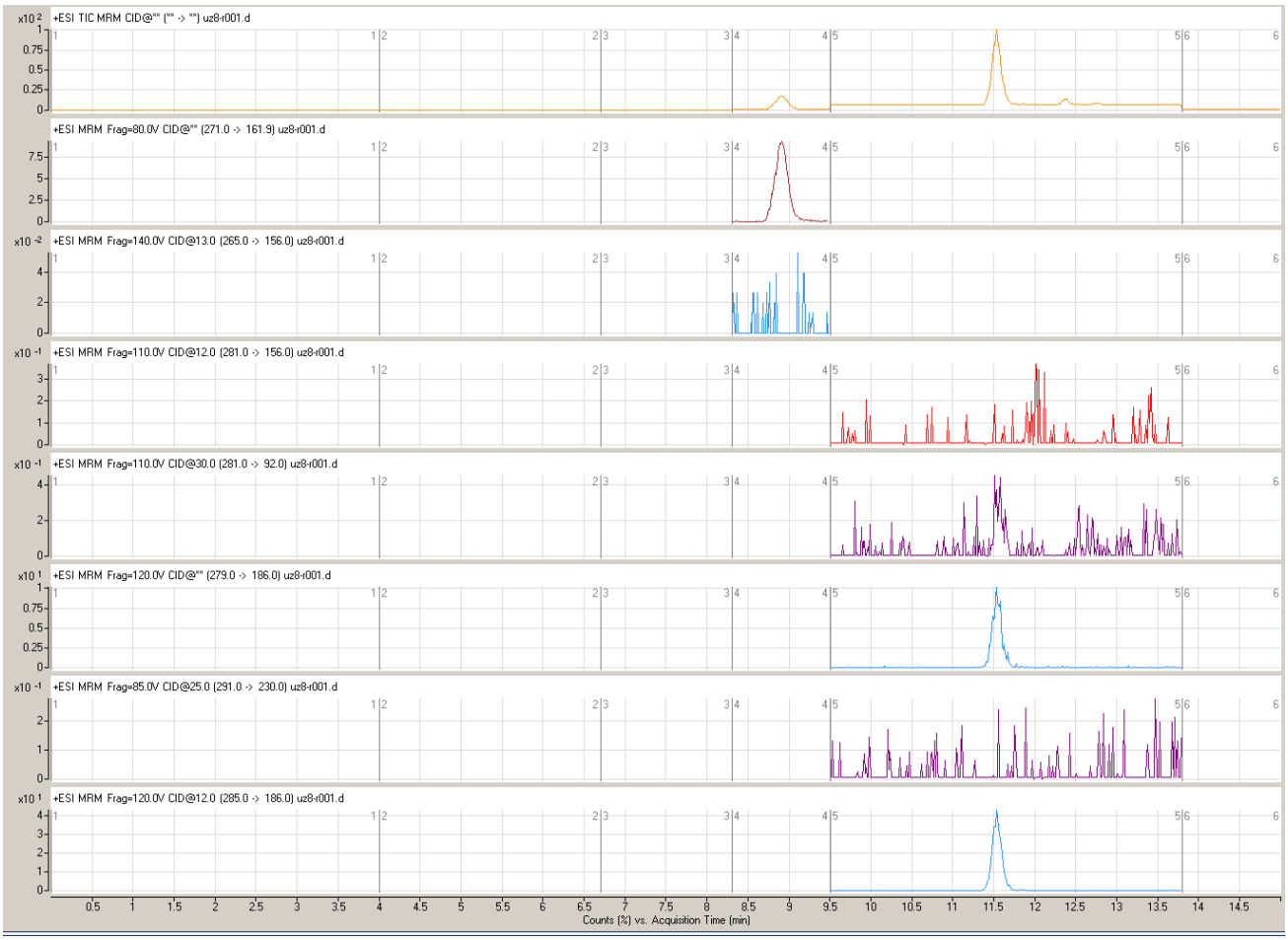
U svrhu provjere i potvrde zdravstvene ispravnosti životinjskih proizvoda, odnosno dokaza da proizvodi ne sadrže rezidue i kontaminante prikupljeni su uzorci meda iz različitih dijelova Hrvatske (Slika 2) prema Pravilniku o monitoringu i uzorkovanju od strane državnih inspektora (Tablica 16).

Tablica 16. Rezultati redovne kontrole sulfonamida u medu

Regija Hrvatske	Županija	Broj uzoraka	Maseni udio sulfonamida μg kg^{-1}
SREDIŠNJA HRVATSKA	Sisačko-moslavačka	2	n.d.
	Karlovačka	1	n.d.
	Zagrebačka	4	n.d.
	Grad Zagreb	1	n.d.
	Bjelovarsko- bilogorska	2	n.d.
	Krapinsko- zagorska	3	n.d.
	Koprivničko- križevačka	3	n.d.
	Varaždinska	5	n.d.
ISTOČNA HRVATSKA	Vukovarsko-srijemska	1	n.d.
	Virovitičko- podravska	6	n.d.
	Osječko- baranjska	3	n.d.
SJEVERNO I JUŽNO DALMATINSKA	Splitsko- dalmatinska	4	n.d.
	Dubrovačko- neretvanska	3	n.d.
	Šibensko-kninska	5	n.d.
PRIMORSKA	Istarska	3	n.d.
GORSKA	Primorsko-goranska	1	n.d.*

*nije detektiran

Nesukladni nalazi ukazuju na nedopušteno liječenje, upotrebom zabranjenih tvari ili ne poštivanje propisanog razdoblja karence, a pronalazak kontaminanata ukazuje na onečišćenje okoliša. Za takve nesukladne uzorke slijedi daljnje postupanje prema pravilnicima i zakonima. Izvještaj o pozitivnim i negativnim rezultatima bit će objavljeno od strane EFSA-e na cjelogodišnjoj razini monitoringa rezidua u hrani životinjskog podrijetla.



Slika 21. Prikaz kromatograma ispitivanog uzorka meda

Na slici 21 prikazan je kromatogram jednog od ispitivanih uzoraka meda iz Hrvatske na temelju kojega je vidljivo da u uzorku nema ni jednog od ispitivanih sulfonamida. Dok su jasno vidljive površine pikova internog standarda, kojim je obogaćen sam uzorak.

5. ZAKLJUČCI

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

1. LC-MS/MS metoda za određivanje sulfonamida u medu validirana je za mjerno područje koje odgovara masenim udjelima koji odgovaraju najnižim koncentracijama koje metoda može detektirati u matriksu meda.
2. Postupak pripreme uzorka meda uključuje ekstrakciju na čvrstoj fazi. Značajni utjecaj matriksa na metodu kompenzira se primjenom matriks kalibracijskih krivulja i dodatkom internog standarda.
3. Validirana metoda LC-MS/MS prikladna je za provođenje potvrdnih metoda određivanja sulfonamida u medu jer utvrđene karakteristike udovoljavaju zahtjevima postavljenim odlukom 2002/657/CE.
4. Metoda za određivanje sulfonamida u medu zadovoljava kriterije o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata prema važećoj Uredbi komisije 2002/657/EZ.
5. Rezultati određivanja sulfonamida u uzorcima meda nisu pokazali prisutstvo sulfonamida.
6. LC-MS/MS je potvrdna metoda za analizu rezidua antibiotika koja je točna, selektivna, osjetljiva, precizna te automatizirana i primjenjiva na širok raspon analita i vrsta uzoraka i omogućava nedvosmisleno određivanje strukture molekula.

6. LITERATURA

Abdallah, H., Arnaudguilhem, C., Lobinskibc, R., Jaber, F. (2014) A multi-residue analysis of sulphonamides in edible animal tissues using QuEChERS extraction and HPLC-MS/MS. *Anal. Methods*. **7**, 1548-1557. doi: 10.1039/C4AY01727G.

Agilent Technologies (2012) Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS Concepts Guide < https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3335-90135_QQQ_Concepts.pdf> Pristupljeno 05.07.2016.

Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., Ansari, M.J. (2012) Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *Scientific World J.* doi:10.1100/2012/930849.

Anonymus 1 (2013) <http://znanost.geek.hr/clanak/kako-znanost-objasnjava-neograniceni-rok-trajanja-meda> .Pristupljeno 15.lipnja.2016.

Anonymus 2 (2011) Sulfonamidi < http://zdravlje.eu/2011/04/04/sulfonamidi > . Pristupljeno 15.svibnja.2016.

Anonymus 3 <https://sites.google.com/site/masonaco/Home/mass-spectrometry/mass-analyzers>. Pristupljeno 05. svibnja. 2016.

Bargańska, Z., Ślebioda, M., Namieśnik, J. (2011) Determination of antibiotic residues in honey. *Trends Anal. Chem.* **30**(7), 1035-1041.

Bedenić, B. (2009) Antibakterijski lijekovi. U: Medicinska mikrobiologija (Uzunović-Kamberović S. ured.) Zenica **15**, str. 221-251.

Chen, D., Yu, J., Tao, Y., Pan, Y., Xie, S., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Wang, Y., Liu, Z., Yuan, Z. (2016) Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr*. **1017**, 82-88. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.02.037.

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

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

Dubreil-Chéneau, E., Pirotais, Y., Verdon, E., Hurtaud-Pessel, D. (2014) Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography- tandem mass spectrometry for monitoring plans: Validation according to European Unioun Decision 2002/657/EC. *J. Chromatogr.* A. **1339,** 128–136.

Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008) Antibiotic Resistance Mechanism in Bacteria: Biochemical and genetic aspect. *Food Technol. Biotechnol*. **45**(1), 11-21.

Economou, A., Petraki, O., Tsipi, 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.

European Food Safety Authority EFSA (2015) Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Journal*, **13** (5). < https ://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/923e>. Pristupljeno 21.srpnja. 2016.

Gačić, M., Bilandžić, N., Ivanec Šipušić, Đ., Petrović M., Kos, B. Vahčić, N., Šušković, J. (2015) Degradation of Oxytetracycline, Streptomycin, Sulphathiazole and Chloramphenicol Residues in Different Types of Honey. *Food Technol. Biotechnol*. **53** (2) 154–162.

Galarini, R., Saluti, G., Giusepponi, D., Rossi, R., Moretti, S. (2015) Multiclass determination of 27 antibiotics in honey. *Food Control*. **48**, 12-24.

García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, S., Barceló, D. (2008) Identification and determinationof metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *Trends Anal.Chem*. **27**, 1008–1022.

Gómez-Pérez, M.L, Romero-González, R., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G. (2015) Analysis of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Talanta* **131**, 1–7.

Graves, A.K, Liwimbi, L., Israel, D.W., van Heugten, E., Robinson, B., Cahoon, C.W., Lubbers, J.F. (2011) Distribution of ten antibiotic resistance genes in E. coli isolates from swine manure, lagoon effluent and soil collected from a lagoon waste application field. *Folia Microbiol.* **56**, 131–137.

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

HRN ISO 11843,: 2003 Mogućnost dokazivanja -- 1. dio: Nazivi i definicije.

Hrvatska enciklopedija, sulfonamidi http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=58718. Pristupljeno 15.svibnja. 2016.

Interna metoda Laboratorija za određivanje rezidua, SOP Z-I-2-AM35 rev 00, Hrtvatski veterinarski institut, Zagreb.

IRB, Vezani sustav tekućinska kromatografija visokog učinka soektrometrija mase hplc-ms/ms<http://www.irb.hr/Gospodarstvo/Usluge-i-ekspertize/Vezani-sustav-tekucinska-kromatografija-visokog-ucinka-spektrometrija-mase-hplc-ms-ms>. Pristupljeno 21. srpnja. 2016.

Kemper, N. (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrialenvironment, review. *Ecol. Indic*. **8**, 1–13.

Kivrak, I., Kivrak, S., Harmandar, M. (2016) Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Sci. Technol*. **36**(1), 90-96.

Leo, M.L. Nollet, F.T. (2012) Food analysis by HPLC. U: Antimicrobial residues, 3.izd.[online] (Rath, S., Orlando, R.M. ured.), Taylor & Francis Group, London/New York, str. 567-584. Pristupljeno 21.lipnja.2016.

Majors, R.E. (2013) Sample preparation fundamentals for chromatography. *Agilent technologies*. Canada.

Makovec, S., Kos, B., Šušković, J., Bilandžić, N. (2014) Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **9** (1-), 7-6.

Masiáa, A., Suarez-Varelac, M.M., Llopis-Gonzalezc, A., Picóa, Y. (2016) Determination of pesticides and veterinary drug residues determination in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal. Chim. Acta* **936**, 40-61.

Maudens, K. E., Zhang, G. i Lambert, W E. (2004) Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey by high-performance liquid chromatography with post-column derivitization and fluorescence detection. *J. Chromatography. A* **1047**, 85-92.

Mohamed, R., Hammel, Y-A., LeBreton, M-H., Tabet, J-C., Jullien, L., Guy, PA. (2007). Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. *J Chromatogr.* A **1160**, 194–205.

Neidert, E., Baraniak, Z., Sauvé, A. (1986) Rapid quantitative thin layer chromatographic screening procedure for sulfathiazole residues in honey. *J. Assoc. Off.Anal. Chem*. **69**, 641–643.

Nevas, M., Lindström, M., Hörman, A., Keto-Timonen, R., Korkeala, H. (2006) Contamination routes of Clostridium botulinum in the honey production environment *Environ. Microbiol*. **8**(6), 1085-94.

OBAVIJEST KOMISIJE (2015) Smjernice za opreznu uporabu antimikrobnih sredstava u veterinarskoj medicini (2015/C 299/04).

Odluka komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, 2002/657/EZ.

Pravilnik o ekološkoj proizvodnji životinjskih proizvoda (2002) *Narodne novine* **13**, Zagreb.

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

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

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

Pravilnik o obimu i učestalosti uzorkovanja u svrhu monitoringa određenih tvari i njihovih rezidua u određenim proizvodima životinjskog podrijetla (2010) *Narodne Novine* **10**, Zagreb.

Rogulja D. (2016) Američka gnjiloća - iskustva terenskog rada u Zagrebu <http://www.pcelinjak.hr/OLD/index.php/Veterinarstvo-i-entomologija/amerika-gnjiloa-iskustva-terenskog-rada-u-zagrebu.html>. Pristupljeno 02.lipnja.2016.

Salinas, F. i Espinosa Mansilla, A. (1990) Derivative spectrophotometric determination of sulphonamides by the Bratton-Marshall reaction. *Analytica Chimica Acta* **233**, 289–294.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A. (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **65**, 725–759.

Schwaiger, I. i Schuch, R. (2000) Bound sulfathiazole residues in honey - Need of a hydrolysis step for the analytical determination of total sulfathiazole content in honey *Deuts Lebens* **96**, 93–98.

Seger, C. i Griesmacher, A. (2007) Važni aspekti uspostave dvojne spektrometrije masa u uvjetima rutinskoga kliničkog laboratorija. *Biochemia Medica* **17**(1), 29-51.

Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S. i 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**(10), 3509-3516.

Službeni list Europske unije (2015) Smjernice za opreznu uporabu antimikrobnih sredstava u veterinarskoj medicini. C 299/7.

Stachniuk, A. i Fornal E. (2016) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal. Methods* **9,** 1654–1665. (objavljeno online 28.studenog 2015.). doi: 10,1007 / s12161-015-0342-0

Stark, J. (2000) Antibiotica - Nachweis in Fleish. *Fleishtwirtschaft* **80**, 46-50.

Suder, P., Silberring, J. (2006) Spektrometria mass (book in Polish) Wydawnictwo UJ, Kraków.

Šušković, J., Kos, B. (2007) Mikrobiološke metode za određivanje antibiotika. U: Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

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

Thompson, T.S. i Noot, D.K. (2005). Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. **551**(1-2), 168-176.

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.

Vardanyan, R.S., Hruby, V.J. (2006) Synthesis of Essential Drugs. U: Antimicrobial Drugs, 1.izd. *Elsevier*. str.499-523.

Varenina, I., Bilandžić, N., Solomun Kolanović, B., Božić,Đ., Sedak, M., Đokić M., Varga, I. (2016) Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in muscle, egg, milk and honey. *Food Addit Contam* Part A, DOI: 10.1080/19440049.2016.1152569.

Varga. E. Validation and application of an LC-MS/MS based multi target method for the determination of mycotoxins in nuts and dried grapes. Diplomski rad *University of Natural Resorces and Applied Life Science*, Beč, 2010.

Wikipedia, sulfamerazin (SMR), trimetoprim (TMP), sulfametazin (SMZ), sulfametoksipiridazin (SMP), sulfamonometoksin (SMM) < https://bs.wikipedia.org/wiki/Po%C4%8Detna_strana>. Pristupljeno 10.lipnja.2016.

Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima (2008) *Narodne novine* **84,** Zagreb.

7. PRILOZI

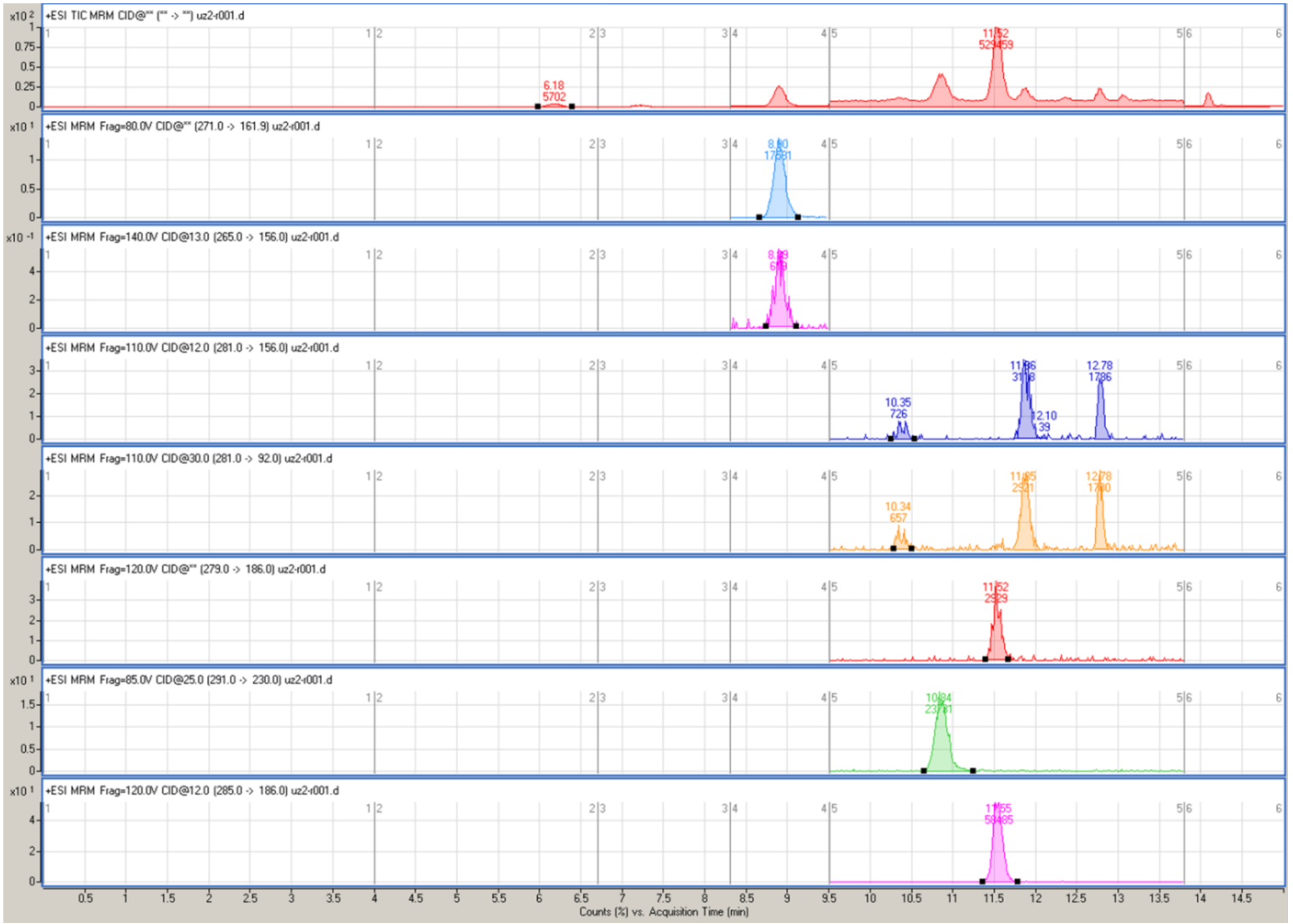
7.1. KROMATOGRAMI



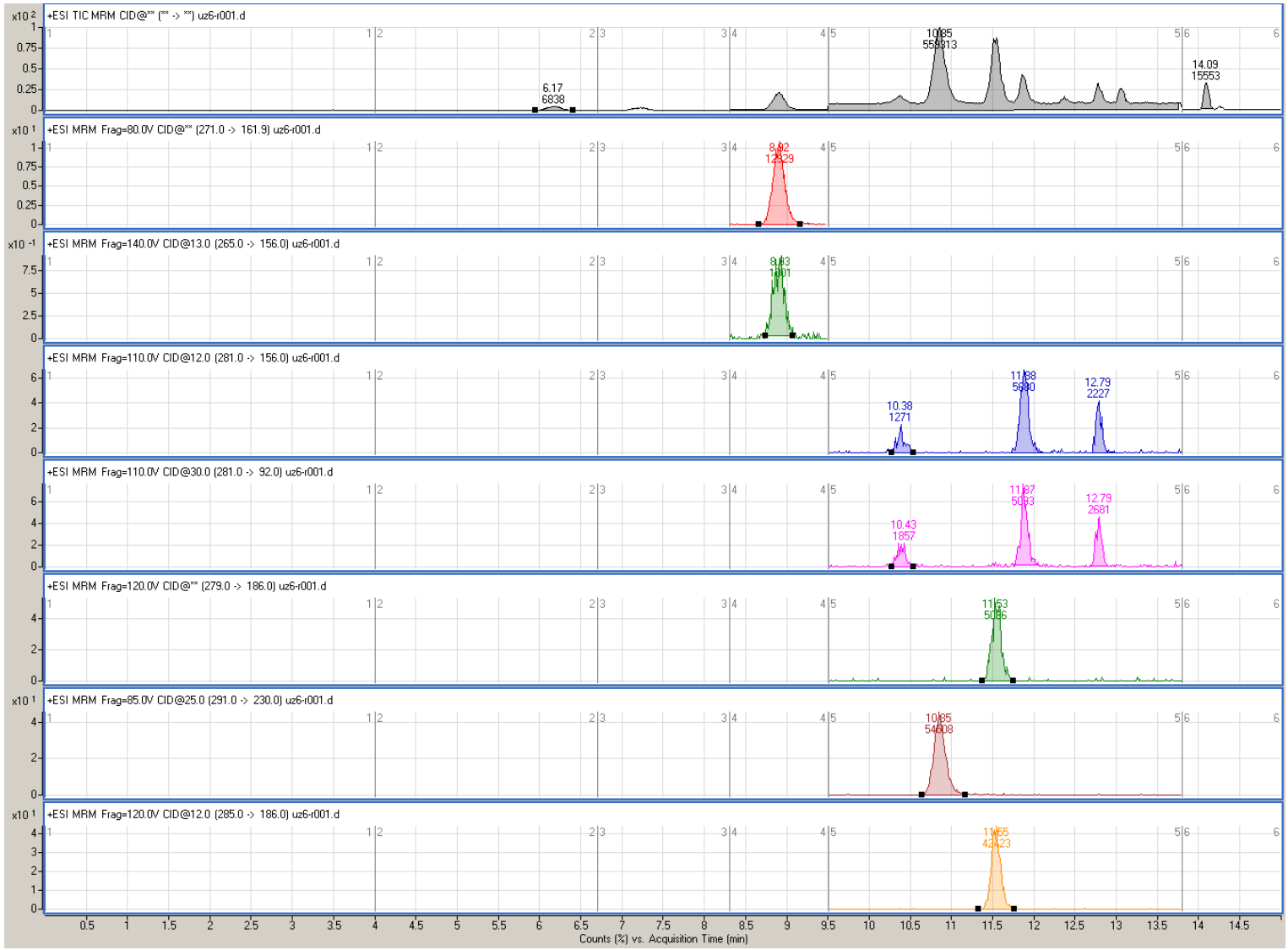
Prilog 1. Prikaz kromatograma slijepe probe meda od bagrema



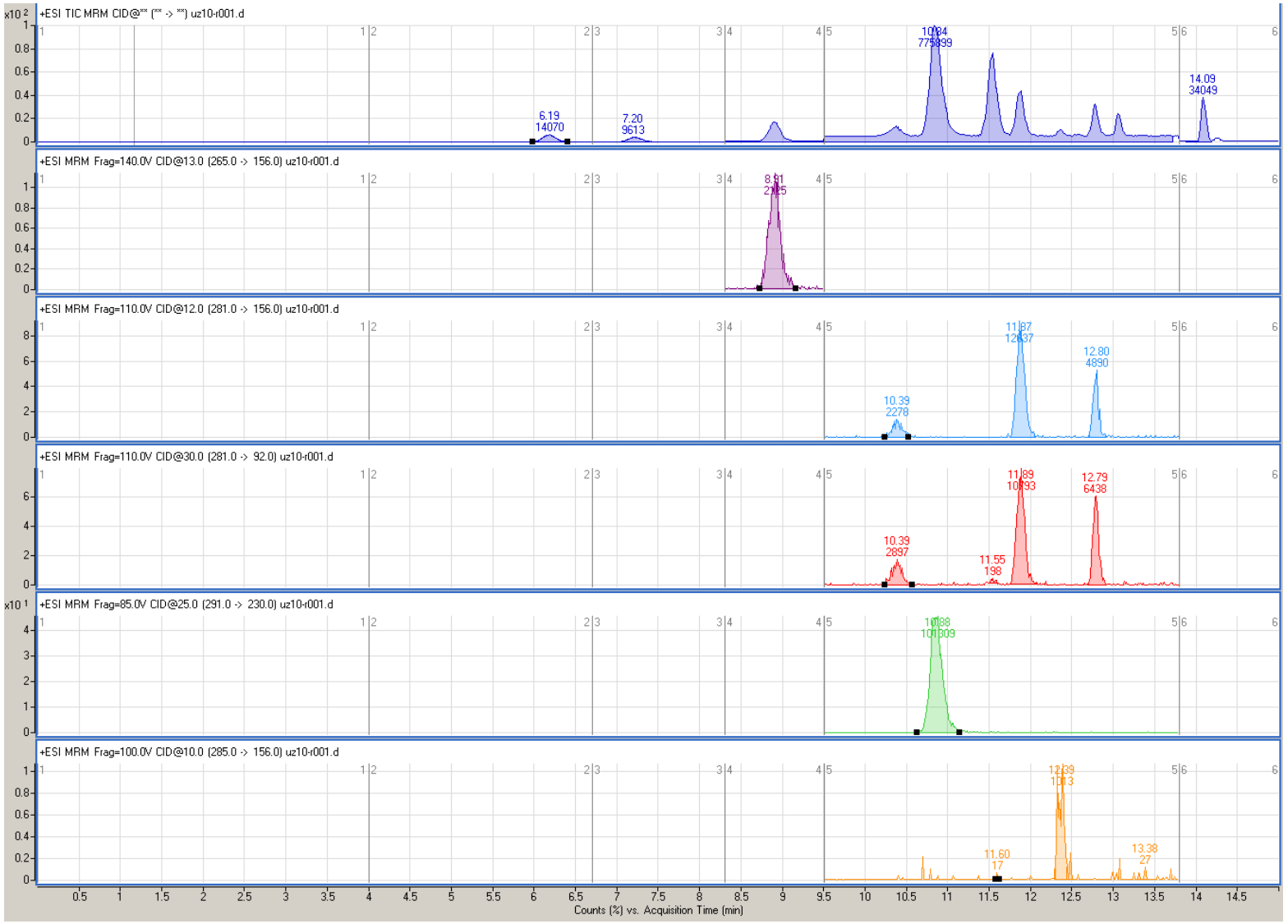
Prilog 2. Prikaz kromatograma slijepe probe cvjetnog meda



Prilog 3. Prikaz kromatograma obogaćenog matriksa meda na razinu od 1 µg kg^{-1}



Prilog 4. Prikaz kromatograma obogaćenog matriksa meda na razinu od 2,5 µg kg^{-1}



Prilog 5. Prikaz kromatograma obogaćenog matriksa meda na razinu od 5 µg kg^{-1}