

JELENA BUDIMIR

**ODREĐIVANJE GRANICE KVANTIFIKACIJE
ANTIBIOTIKA U MEDU VEZANIM SUSTAVOM
TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA - TANDEMNA
SPEKTROMETRIJA MASA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

JELENA BUDIMIR

**ODREĐIVANJE GRANICE KVANTIFIKACIJE ANTIBIOTIKA U
MEDU VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA -
TANDEMNA SPEKTROMETRIJA MASA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja magistre kemije

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ pod neposrednim vodstvom dr.sc. Adele Krivohlavek, voditeljice službe za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, dr.sc. Martine Ivešić, i mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nives Galić u sklopu diplomskog studija kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra kemije.

PREDGOVOR

Posebno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nives Galić na razumijevanju, strpljenju i stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.

...

Također se zahvaljujem dr.sc. Adeli Krivohlavek, dipl. ing. voditeljici službe za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, na ustupljenoj mogućnosti za eksperimentalnu izradu ovoga rada te na pruženoj pomoći.

...

Velike zahvale upućujem i dr.sc. Martini Ivešić, dipl. ing. za vodstvo, pomoć, savjete, uloženi trud, strpljenje i susretljivost prilikom izrade diplomskog rada.

...

Uz ove zahvale uključila bih i zahvalu roditeljima bez čijeg razumijevanja i podrške tijekom studija ne bih uspjela ostvariti svoje ciljeve.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Svojstva meda.....	2
2.2. Sulfonamidi	4
2.3. Kloramfenikol	9
2.4. Određivanje sulfonamida i kloramfenikola u namirnicama	10
2.5. Ekstrakcija na čvrstoj fazi	12
2.6. Kromatografija	13
2.6.1. Tekućinska kromatografija.....	14
2.7. Spektrometrija masa	17
2.7.1. Elektoraspršenje	17
2.7.2. Analizatori masa u LC-MS-u	18
2.7.3. Vezani sustav tekućinski kromatograf – spektrometar masa ABSciex Qtrap 4500	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. Kemikalije	22
3.2. Instrumenti i pribor.....	23
3.3. Tekućinskokromatografski uvjeti za određivanje sulfonamida i kloramfenikola	24
3.4. Priprema uzorka	24
3.5. Ekstrakcija na čvrstoj fazi	25
3.6. LC-MS/MS analiza.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Optimizacija pH-vrijednosti uzorka	26
4.2. Optimizacija volumena eluensa.....	27
4.3. Identifikacija i kvantifikacija analita	27
4.4. MS/MS analiza uzoraka	42
5. ZAKLJUČAK	46
6. LITERATURA.....	47
7. POPIS KRATICA I SIMBOLA	49
8. ŽIVOTOPIS	51

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijски odsjek

Diplomski rad

ODREĐIVANJE GRANICE KVANTIFIKACIJE ANTIBIOTIKA U MEDU VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA – TANDEMNA SPEKTROMETRIJA MASA

JELENA BUDIMIR

Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

U ovom radu korištena je metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje sulfonamida i kloramfenikola u medu kombiniranom tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrije masa. Optimizirani su uvjeti za istovremeno izdvajanje sulfonamida i kloramfenikola iz meda ekstrakcijom na čvrstoj fazi, te je optimizacijom uvjeta postignuta niža granica kvantifikacije za sulfonamide koja iznosi 5,0 µg/kg. Granica detekcije za kloramfenikol iznosi 0,3 µg/kg. Uzorci su ukoncentrirani i pročišćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE, engl. *Solid phase extraction*). Daljnja analiza provodila se na temelju podataka o zadržavanju analita na C18 kromatografskoj koloni i podataka dobivenih MS/MS analizom pomoću sustava ABSciex Qtrap 4500. Optimizirani su volumeni otapala za eluiranje kolone za ekstrakciju i pH-vrijednost uzorka. Također je ispitana ponovljivost pripreme uzorka na granicama kvantifikacije, te je izražena relativnim standardnim odstupanjem (RSD). Prinosi metode ekstrakcije za kloramfenikol iznosi 84,62 % i za sulfonamide od 80,80 % do 125,00 %. Kao unutarnji standard tijekom kvantitativne analize spomenutih antibiotika koristio se izotopno obilježeni kloramfenikol, sulfametazin i sulfametoksazol. Metoda se primjenjivala za analizu sulfonamida i kloramfenikola u uzorcima meda prikupljenim sa različitih geografskih lokacija.

(vii + 51 stranica, 14 slika, 14 tablica, 32 literaturna navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: antibiotici / kloramfenikol / med / sulfonamidi / vezani sustav tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa (LC–MS/MS)

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Nives Galić

Izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Doc. dr. sc. Rosana Ribić

Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen: 26.02.216.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

QUANTIFICATION OF ANTIBIOTICS IN HONEY BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

JELENA BUDIMIR

Division of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science,
University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Quantitative and qualitative method was used for determination of sulfonamides and chloramphenicol in honey by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Conditions were optimized for simultaneous extraction of sulfonamides and chloramphenicol from honey in solid state. Lower detection limit was achieved for sulfonamides (5.0 µg/kg). Detection limit for chloramphenicol was 0.3 µg/kg. Samples were concentrated and refined by solid phase extraction. Further analysis was conducted by data of analyte retention at the C18 column chromatography and by the MS/MS data obtained with ABSciex Qtrap 4500 system. pH value of sample and the volume of elution solvent were optimized. Repeatability of method was determined and expressed as relative standard deviation (RSD). Extraction recoveries were high with values in the range 84.62 % for chloramphenicol and of 80.80 % to 125.00 % for sulfonamides. Isotopically marked chloramphenicol was used as internal standard for quantitative analysis of antibiotics. Method was applied for determination of antibiotic in honey samples obtained from the various geographical locations.

(vii + 51 pages, 14 figures, 14 tables, 32 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia.

Keywords: antibiotics / chloramphenicol / honey / liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) / sulfonamides

Supervisors: Dr. Nives Galić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Nives Galić, Assoc. Prof.

Dr. Biserka Prugovečki, Assoc. Prof.

Dr. Rosana Ribić, Asst. Prof.

Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 26.02.2016.

1. UVOD

Med se smatra jednom od najzdravijih namirnica u svakodnevnoj ljudskoj prehrani jer ne sadržava aditive. Međutim, danas se sve češće pronalaze zaostaci različitih kemikalija u medu. Najveći udio rezidua pronađenih u medu odnosi se na antibiotike, od kojih su vrlo često prisutni sulfonamidi i kloramfenikol čija analiza je i tema ovog rada.

Sulfonamidi zajedno sa kloramfenikolom svrstavaju se u skupinu sintetičkih antimikrobnih odnosno antiinfektivnih lijekova koja pokriva vrlo široko djelovanje u humanoj i veterinarskoj medicini zbog niske cijene i djelotvornosti. Koriste se za suzbijanje bolesti u svim vrstama životinja što za posljedicu ima prisutnost njihovih ostataka u prehrambenim proizvodima koje proizvode, uključujući i med. Ulaskom u hranidbeni lanac antibiotici, odnosno njihovi ostaci, mogu izazvati i poticati alergijske reakcije u čovjeku što predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje.

U ovom radu analizirat će se 10 realnih uzoraka meda različitog podrijetla vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa pri čemu će se koristiti novi sustav LC-MS/MS (ABSciex Qtrap 4500) kako bi se unaprijedila metoda koja se koristi u Zavodu za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu za određivanje antibiotika u medu. Daljnja svrha rada je optimalizacija uvjeta za kromatografsko razdvajanje sulfonamida pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi te postizanje što veće osjetljivosti detekcije sulfonamida i kloramfenikola. Da bi unapređenje metode bilo uspješno neizostavna je validacija iste koja uključuje određivanje granice detekcije, granice kvantitativnog određivanja analita, ponovljivost metode (RSD), ponovljivost pripreve standarda i uzorka, te standardnu devijaciju (σ), što je obuhvaćeno ovim diplomskim radom.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Svojstva meda

Ljudi danas vrlo često koriste skupe lijekove, te se svakodnevno sugerira okretanju zdravom načinu života i prehrani budući da se korištenjem zdravih namirnica mogu ublažiti razne tegobe. Jedna od takvih namirnica je svakako med budući da je rijedak prehrambeni proizvod koji do „stola“ dolazi u gotovo neizmijenjenom obliku, bez dodanih aditiva i konzervansa. Može se sa sigurnošću reći i da je najjeftiniji izvor zdravlja uz svakodnevno konzumiranje u malim količinama.

Prema Pravilniku o medu „med je sladak, gust, viskoznan, tekuć ili kristaliziran proizvod što ga medonosne pčele (lat. *Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka, sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koji pčele sakupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja”.¹ Kada se govori o vrstama meda radi se o dvjema podjelama, prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje. Tako med prema podrijetlu dijelimo na cvjetni ili nektarni med te medljikovac ili medun. Podjela prema načinu proizvodnje ubraja med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća, cijedeći med, vrcani med, prešani med i filtrirani med.^{1,2}

Svoju visoku energetska vrijednost zahvaljuje svom sastavu, spoju različitih šećera i vode koji se mijenja ovisno o podrijetlu i načinu proizvodnje. Med sadrži u prosijeku od 72 % do 75 % šećera, uglavnom su to jednostavni šećeri, od 15 % do 20 % vode, manje od 1% organskih kiselina i minerala, i u zaostacima nešto bjelančevina, enzima i viših alkohola. Ukupna kiselost iznosi od 0,05 % do 0,08 %.³ Vrijednosti jednostavnih šećera u medu okvirno iznose: 38 % fruktoza i 31 % glukoza. Također je prisutan određeni dio viših šećera, većinom su to disaharidi, saharoza, maltoza i izomaltoza. Osim navedenih, med također sadržava i druge tvari, a to su uglavnom organske kiseline, mineralne tvari, proteini, slobodne aminokiseline, vitamini, pigmenti te tvari zadužene za aromu (alkoholi, ketoni, aldehidi i dr.)⁴ Boja meda ovisi prvenstveno o prirodnim bojama koje sadrži nektar, te u tom slučaju paleta boja može se kretati od prozirne, žućkaste, zlatne, crvenkastosmeđe, smeđe i zagasito tamne boje.

Med je jedna od namirnica sa dužim rokom trajanja. Razlog tomu je taj što je med prezasićena otopina šećera s niskim udjelom vode. Uslijed nedostatke vode dolazi do nemogućnosti rasta i razvoja bakterija i kvasaca. Toj činjenici potpomaže i kiselost meda koja inhibira rast pojedinih bakterija, pH-vrijednost se najčešće kreće u rasponu od 3,5 do 4,5.⁴ Med je higijenski i zdrav proizvod zahvaljujući svom baktericidnom djelovanju.

Istraživanja provedena još devedesetih godina prošlog stoljeća pokazala su da med ima značajnu antioksidativnu aktivnost te u tom slučaju neutralizira slobodne radikale nastale u organizmu⁵, pa tako znanstvenici tvrde da svakodnevna upotreba meda znatno smanjuje rizik od pojave raka, kardiovaskularnih bolesti, Alzheimerove bolesti, kardiovaskularnog oboljenja, smanjuje kolesterol, trigliceride i štetni LDL, a povećava udio korisnog HDL-a.

Međutim, sve češće se ističe problem pronalaženja rezidua nedopuštenih kemoterapeutika u medu, i to ponajviše antibiotika. Medari prilikom nadohranjivanja pčela koriste nepropisane tvari kako bi spriječili ili liječili nastalu bolest, te su stoga pojačane kontrole analize meda.

2.2. Sulfonamidi

Sulfonamidi pripadaju skupini sintetičkih antimikrobnih, odnosno antiinfektivnih lijekova koja pokriva vrlo široko djelovanje u humanoj medicini, što potvrđuje činjenica da su to prvi antibiotici primijenjeni u liječenju raznih infektivnih bolesti, te veterinarskoj medicini, zbog niske cijene i djelotvornosti. Mehanizam djelovanja, kao i antimikrobni spektar svih sulfonamida je isti. Djeluju protiv Gram-pozitivnih ili Gram-negativnih bakterija, nekih *Chlamydia*, *Nocardia* i *Actinomyces*, a neki čak djeluju i na *Escherichiu coli*. Neki članovi ove skupine imaju antibakterijsko ili kokcidiostatsko djelovanje, jedni su aktivni prema Gram-pozitivnim bakterijama, a drugi prema Gram-negativnim. Otpornost bakterija na sulfonamide je razlog smanjenja permeabilnosti stanične membrane, mutacija koje rezultiraju povećanom sintezom PABA je pod genetskom kontrolom plazmida, a budući da se plazmidi sa ugrađenim željenim fragmentom eksponencijalno razmnožavaju u stanici domaćina, također će i širenje rezistencije biti vrlo ubrzano.^{6,7}

Tijekom posljednjeg desetljeća njihova primjena uzrokovala je popratne pojave na zdravlje ljudi. Farmakološke tvari, pa tako i sulfonamidi, koriste se za suzbijanje bolesti u svim vrstama životinja što za posljedicu ima prisutnost njihovih ostataka u prehrambenim proizvodima koje proizvode. Ulaskom u hranidbeni lanac sulfonamidi, odnosno njihovi ostaci, mogu izazvati i poticati alergijske reakcije u čovjeku. U slučaju nepoštivanja zakonom određenog udjela ostataka sulfonamida u prehrambenim namirnicama mogu izazvati preosjetljivost i direktne toksične učinke. Nuspojave mogu uključivati crvenilo i svrbež kože, te angioedem, anafilaktičke reakcije, hemolitičku anemiju, poremećaje probavnog sustava, a vrlo rijetko, u visokim dozama kod dehidracije organizma kristaliziraju u bubrezima.⁸

Zbog svoje kemijske sličnosti s *p*-aminobenzojevom kiselinom (PABA) koja je esencijalni metabolit za sintezu purinskih baza u mnogih mikroorganizama, također je neophodna za sintezu folne kiseline bitne za razmnožavanje i rast bakterija te čini centralni dio folne kiseline, sulfonamidi se ugrađuju u molekulu folne kiseline.⁹ Njezino djelovanje temelji se na kondenzaciji pteridina u dihidropteronsku kiselinu uz dodatak adenozin-trifosfata (ATP). Nadalje se dihidropteronska kiselina pretvara u folnu kiselinu koja je prekursor nukleinskih kiselina. Kako je već spomenuto, zbog veoma slične strukture sulfonamida i PABA, sulfonamidi inhibiraju sintezu dihidropteronske kiseline. Zamjenjuju PABA u reakciji i u tome slučaju nastaje nefunkcionalni analog folne kiseline, čiji rezultat je sprječavanje rasta bakterija, te se zaustavlja produkcija purina i sinteza nukleinskih kiselina.

Drugim riječima rečeno, bakteriostatsko djelovanje sulfonamida utječe na bakterije koje same proizvode folnu kiselinu, dok su one koje koriste gotovu folnu kiselinu neosjetljive na sulfonamide. Animalne stanice ne sintetiziraju vlastitu folnu kiselinu nego ju dobivaju iz vanjskih izvora, te uslijed toga nisu ugrožene antimetaboličkim učinkom sulfonamida. Stanice u čovjekovom organizmu nisu sposobne same sintetizirati folnu kiselinu tako da se koriste već formiranim folatima iz lisnatog povrća i stoga njegove stanice ne mogu biti oštećene metaboličkim učincima sulfonamida. Često se koriste u kombinaciji s trimetoprimom zbog sinergističkog učinka. Učinak sulfonamida može se poništiti prisustvom velike količine PABA mehanizmom kompetitivne inhibicije. Zamjene u amidnoj skupini (-CONH₂) imaju različite učinke na antibakterijsku aktivnost molekule sulfonamida. Najbolje rezultate u terapiji imali su spojevi kod kojih je u sulfonamidnoj -SO₂NH₂ skupini, koja je sastavni dio strukture grupe tih spojeva, zamijenjen jedan vodikov atom najčešće heterocikličkim prstenom. Heterociklički prsten utječe na polarnost cijele molekule sulfonamida i na kiselost preostalog vodikovog atoma na amidnoj skupini.¹⁰ Ipak topljivost sulfonamida ovisi o molekulama dušika koje se nalaze na dva različita položaja u benzenskom prstenu (jedan N¹ i četiri N⁴), a to je moguće u metanolu i acetonu. Danas se u razmjerno velikim količinama primjenjuju za tretiranje i prevenciju respiratornih infekcija, infekcija urinarnog trakta, injekcija trbušnog i mekog tkiva, uključujući razne infekcije u domaćih životinja. Jedan od načina da se izbjegnu komplikacije i vrlo često prouzrokovani neželjeni efekti je primjena kombiniranih sulfonamida, stoga se u jednom tableti obično nalaze tri sulfonamida. Takvim načinom se postiže isti terapijski efekt kao i kada bi se isti sulfonamid primijenio u punoj dozi budući da ne ometaju otapanje jedan drugome i mogu se otopiti do punog zasićenja u prisustvu drugog sulfonamida. To je pravi primjer farmakološkog potenciranja. Mikroorganizmi koji su slabije osjetljivi na pojedinačne komponente mogu biti učinkovitije uništeni primjenom kombinacije komponenata. Prva faza koju inhibiraju sulfonamidi ne odvija se u ljudskom organizmu, dok se druga faza koju inhibira trimetoprim odvija, ali je osjetljivost inhibiranog enzima u bakterijama 50 000 puta veća nego u čovjeku, tako da je lijek za čovjeka relativno neškodljiv. Međutim, dugotrajna uporaba može izazvati određena zdravstvena oboljenja i komplikacije, a jedna od njih je ometanje učinka hematopoeze. Postoje i određene indikacije djelovanja kombinacije sulfonamida i trimetoprima. Jedne od njih su pneumonije uzrokovane *Pneumocystis carinii*, infekcije uzrokovane *Nocardium asteroides*, crijevna groznica uzrokovana *S. Typhi* i *S. Paratyphi*, ako je uzročnik otporan na kloramfenikol, bacilarna dizenterija, ako je uzročnik otporan na amoksisilin.

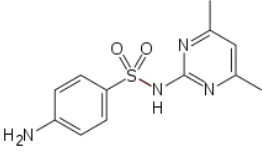
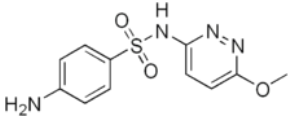
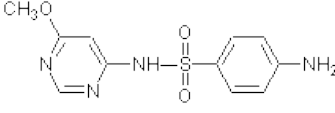
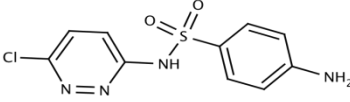
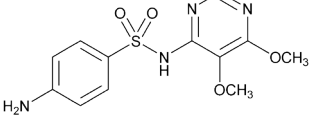
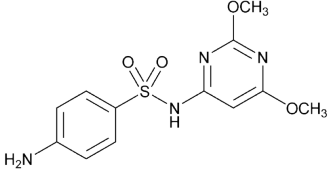
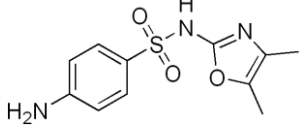
Mehanizam rezistencije nastaje izazvan promjenom ciljnog metaboličkog puta pri čemu se koristi alternativni metabolički put za sintezu nukleinskih kiselina ili zbog smanjenja permeabilnosti.

Još davne 1935. godine došlo se do saznanja da jedna kemijska boja Prontosil u organizmu prelazi u sulfanilamid, te tim sjedinjenjem učinkovito djeluje protiv nekih bakterija. Što je vrijeme odmicalo osnovni oblik molekule se mijenjao dodavanjem raznih kemijskih radikala u cilju poboljšavanja svojstva samoga lijeka.¹⁰ Danas postoji oko 150 različitih kombinacija radikala dodanih na prvotni molekulski oblik (Tablica 1.) Čak i nakon toliko vremena, sulfonamidi su ostali među najšire upotrebljavanim antibakterijskim lijekovima.

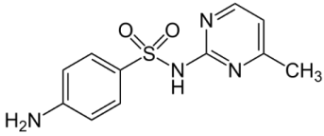
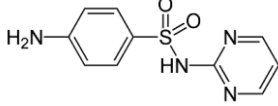
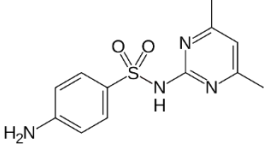
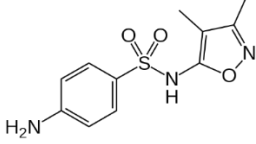
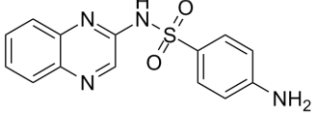
Sulfonamidi se dobro resorbiraju po crijevima, tako da su pogodni za oralnu primjenu. Apsorbiranje za bjelančevine plazme iznosi između 20 % i 90 %, ovisno o vrsti. Metaboliziraju se konjugacijom s acetilnom skupinom, a izlučuju se glomerularnom filtracijom ili tubularnom sekrecijom. U alkalnoj mokraći su djelotvorniji i postižu veće koncentracije.¹⁰

Uslijed primjene sulfonamida nuspojave koje se najčešće javljaju su slabost, glavobolja, mučnina, povraćanje, proljev, a u rijetkim slučajevima cijanoza zbog methemoglobinemije. Alergijske reakcije uključuju osip, temperaturu, hepatitis, agranulocitozu, purpuru, aplastičnu anemiju itd.¹¹

Tablica 1. Nazivi i strukture različitih sulfonamida.¹²

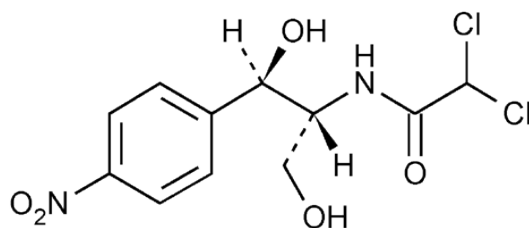
Naziv	Struktura
Sulfadimidin	
Sulfametoksipiridazin	
Sulfamonometoksin	
Sulfakloropiridazin	
Sulfadoksin	
Sulfadimetoksin	
Sulfamoksol	

Nastavak Tablice 1.

Sulfamerazin	
Sulfadiazin	
Sulfametazin	
Sulfisoksazol	
Sulfakinoksalin	

2.3. Kloramfenikol

Kloramfenikol (CAP) svrstava se u skupinu antibiotika s vrlo širokim spektrom djelovanja. Aktivnost njegovog djelovanja je jača prema gram-negativnim nego što je prema gram-pozitivnim mikroorganizmima. Mehanizam djelovanja pokreće se topljivošću u lipidima čime se raspršuje kroz bakterijske stanične membrane, zatim se reverzibilno vežu na L16 protein, 50S podjedinicu bakterijskih ribosoma, gdje se sprječava prijenos aminokiselina na rastućem peptidnom lancu (možda supresijom peptidil transferaze), na taj način se inhibira tvorba peptidne veze i naknadna sinteza proteina. CAP je strukturno derivat dikloroctene kiseline koju između ostaloga čini nitro-skupina vezana na benzenski prsten zadužena za proizvodnju toksičnih produkata u organizmu (Slika 1.).¹⁰



Slika 1. Struktura kloramfenikola (CAP),
2,2-diklor-*N*[(1*R*, 2*R*)-2-hiroksi-1-(hidroksimetil)-2-(4-nitrofenil)]etilacetamid.¹²

Tablica 2. Pojedina kemijska i fizikalna svojstva kloramfenikola.¹²

Molekulska masa	323, 129 g/mol
Molekulska formula	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅
Vrelište	sublimira
Talište	150.5 – 151.5 °C
Topljivost	Metanol, etanol, kloroform, voda
pK_a	5, 5

Svoju svakodnevnu primjenu ostvaruje ponajviše u veterini.¹³ Otkriven je 1949. godine te je njegova primjena u prošlosti bez ograničenja imala rasprostranjenu primjenu kako na životinje tako i na čovjeka.¹⁴ Danas je korištenje kloramfenikola u humanoj medicini ograničeno zbog mogućih štetnih nuspojava kao što je aplastična anemija budući da je toksični učinak kloramfenikola u ovom slučaju vrlo nepredvidiv i nerijetko koban.⁷ Prvotno je izoliran iz plijesni *Streptomyces venezuelae*, ali danas se proizvodi sintetskim putem. Otpornost na kloramfenikola razvija se sporije od otpornosti na neke druge antibiotike. Svoju uporabu pronalazi u liječenju teških infekcija kada drugi manje toksični antibiotici ne djeluju. Posebno je toksičan za depresiju koštane moždine, sivi sindrom dojenčadi, razne probavne smetnje, optički neuritis te mnoge druge. Osim toga, danas postoje i pripravci kloramfenikola za lokalnu primjenu.¹⁰

CAP se ne smije koristiti u namjenama koje mogu dovesti do prisutnosti ostataka istog u hrani, te je iz toga razloga Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) ograničila njegovu upotrebu. Povedene time, mnoge su zemlje zabranile njegovu primjenu na životinje koje proizvode hranu, ali budući da je to vrlo jeftin antibiotik unatoč međunarodnim zabranama široko se primjenjuje u zemljama u razvoju.⁷

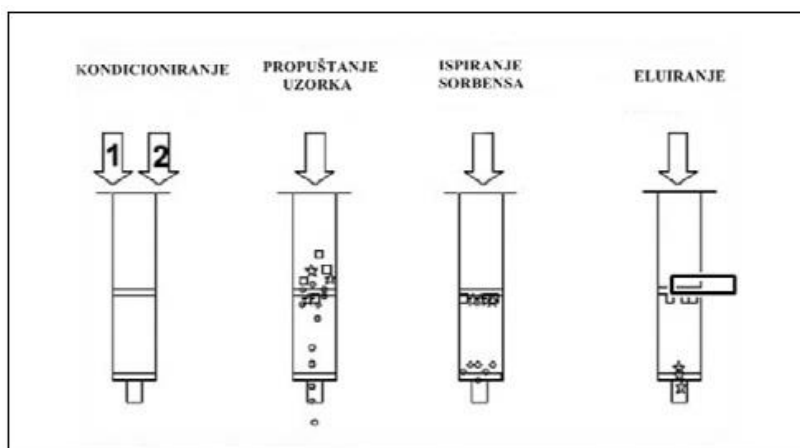
2.4. Određivanje sulfonamida i kloramfenikola u namirnicama

Tijekom zadnjeg desetljeća otkrivanje zaostataka odnosno rezidua antibiotika, uključujući sulfonamide i kloramfenikol, u namirnicama je evoluiralo. Na samu učinkovitost otkrivanja različitih vrsta spojeva u raznim namirnicama utjecaj su imale metode enzimske imunoanalize koje ne mogu razlikovati spojeve unutar iste klase i ne mogu se samostalno koristiti, već treba primijeniti i druge metode analize. Stoga se kao dodatna metoda koristi tekućinska kromatografija sa UV ili fluorimetrijskim detektorom kojim je moguće postići puno niže granice detekcije nego što je moguće enzimskom analizom. Osim navedenih detektora koristi se i spektrometar masa. Naime, tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (LC-MS) za određivanje sulfonamida i kloramfenikola u raznim namirnicama omogućuje puno kvalitetnije određivanje rezidua antibiotika. Ukoliko analiza zahtjeva još pouzdanije rezultate koristi se tandemna spektrometrija masa kojom se dodatno poboljšava selektivnost i osjetljivost. Razlozi zbog kojih tekućinska kromatografija spregnuta tandemnom masenom spektrometrijom nije sveprisutna u svakodnevnim laboratorijskim

analizama su visoka cijena opreme i složenost samog postupka ekstrakcije. Antibiotike koji su prisutni u medu teško je odrediti budući da se nalaze u vrlo složenom mediju, vezani su za šećere, te je potrebna kisela hidroliza. Na taj način mogu se odrediti samo sulfonamidi koji su stabilni u kiseloj sredini. Mnogi znanstvenici bavili su se upravo određivanjem sulfonamida i kloramfenikola u medu. Svako pojedino određivanje donosi veće ili manje izmjene od ranijih istraživanja. Usporedbom više znanstvenih radova iste tematike može se zaključiti da je prije ekstrakcije nužna homogenizacija uzorka meda, hidroliza te pročišćavanje. Nakon toga slijedi u većem broju ispitivanja ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) koja se može provesti na različitim sorbensima dajući selektivno izdvajanje analita čime se omogućuje daljnja analiza tekućinskom kromatografijom.⁹

2.5. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je analitički postupak koji podrazumijeva ekstrakciju analita koji su otopljeni ili suspendirani u tekućoj smjesi. Ova metoda iz analitičke uporabe istiskuje ekstrakciju tekuće-tekuće budući da je efikasnija, selektivnija, koristi mnogo manje količine štetnih otapala i postiže veće ukoncentriravanje analita. Ekstrakcijski postupak temelji se na nekoliko koraka. Prvo se kondicionira sorbens na čvrstoj fazi što podrazumijeva propuštanje organskog otapala kroz kolonu, čime se postiže bolja povezanost sorbensa i uzorka. Sljedeći korak je propuštanje uzorka kroz kolonu uz konstantan protok potpomognut vakuumom pri čemu dolazi do vezanja analita na površinu sorbensa. Nakon toga sorbens se ispire odgovarajućim otapalom kako bi se uklonile interferencije, a analit u tom slučaju ostaje vezan za čvrstu fazu. Završi korak u ovom postupku je eluiranje analita odgovarajućim eluensom (Slika 2.)^{15,16}



Slika 2. Shematski prikaz ekstrakcije na čvrstoj fazi u četiri koraka.¹⁵

Otopine koje se koriste pri ekstrakciji na čvrstoj fazi imaju vrlo širok raspon pH. Sorbens na bazi silikagela, stalan raspon pH od 2 do 7,5. Ispod i iznad navedenih vrijednosti vezana faza može biti hidrolizirana ili odcjepljena s površine silikagela. SPE ulošci ili patrone (engl. *cartridges*) namijenjeni su za jednokratnu primjenu, prikladni su za optimizirano pH zadržavanje ili ispiranje analita. U ovom radu korištene su Oasis HLB 6cc / 200 mg kolone koje se široko primjenjuju pri ekstrakciji kiselih, baznih i neutralnih spojeva iz različitih matrica.

2.6. Kromatografija

Kromatografija je jedna od najprimjenjivanijih kemijskih metoda čiji razvoj je počeo šezdesetih godina prošlog stoljeća. Sam razvoj tehnike potaknut je dodjelom Nobelove nagrade dvojici kemičara A.J.P Martin-u i R.L.M Synge-u 1952. godine za otkriće tekućinske kromatografije s tekućom nepokretnom fazom. Procjenjuje se da se danas oko 60% svih kemijskih analiza povezuje s kromatografijom.¹⁷

Pojednostavljeno se može reći da se ova tehnika temelji na razdvajanju kemijskih vrsta, tj. razlikama u njihovoj raspodjeli između dviju faza koje se međusobno ne miješaju, od kojih je jedna faza nepokretna, a druga pokretna. Uzorak koji se podvrgava kromatografskoj analizi mora biti topljiv u pokretnoj fazi. Pokretne faze mogu biti tekućina, plin ili fluid pri superkritičnim uvjetima, te se prema tome kromatografija dijeli na tekućinsku, plinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Nepokretna faza pak može biti krutina, gel ili tekućina.¹⁸

Nepokretna faza smještena je u koloni ili na plohi. Uzorak se kreće kroz nepokretnu fazu nošen pokretnom fazom. Pritom dolazi do ravnotežne raspodjele između faza, tj. sastojci naizmjenice prelaze iz jedne faze u drugu, a o pokretljivosti ovisi samo razdvajanje sastojaka. Dobro razdvajanje dat će dobre rezultate kvantitativne i kvalitativne analize.

Kromatografija se osim podjele prema fizičkom stanju pokretne faze, može podijeliti i prema mehanizmu odvajanja. U tome slučaju razlikujemo adsorpcijsku razdjelnu, afinitetnu, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem. Kako samo ime kaže, u adsorpcijskoj kromatografiji odvajanje se temelji na različitoj adsorpciji sastojaka smjese na površini čvrstog sorbensa, u razdjelnoj na razdjeljenju između dvije faze, a u afinitetnoj kromatografiji na specifičnim biološkim interakcijama između analita i liganda vezanog na nepokretnoj fazi. U ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji odvajanje se temelji na afinitetu uzorka prema ionskoj izmjeni, dok se u kromatografiji isključenjem sastojci odjeljuju na temelju razlike u veličini molekula.¹⁷

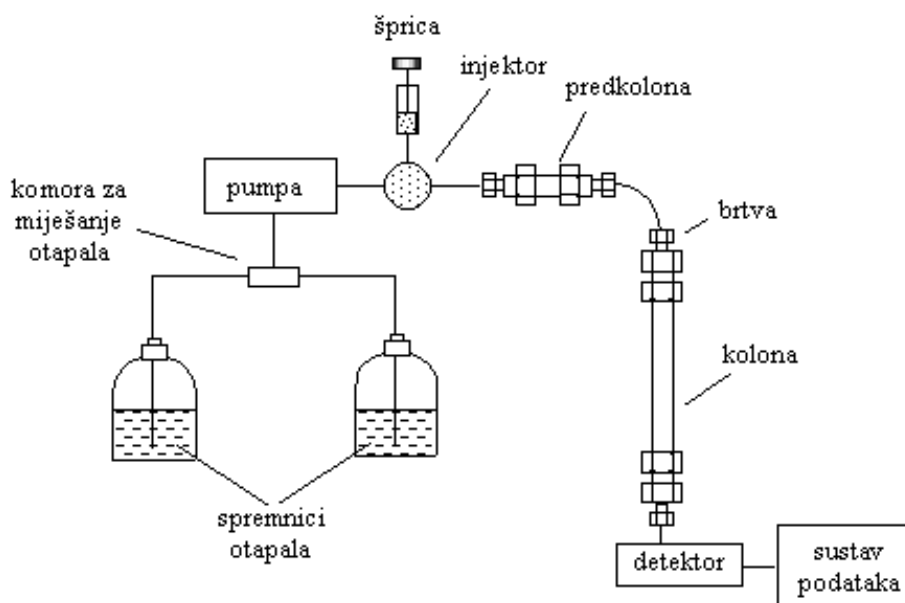
2.6.1. Tekućinska kromatografija

U prvim tekućinskokromatografskim analizama korištene su staklene kolone duljine od oko 50 cm do 500 cm te unutarnjeg promjera od oko 1 cm do 5 cm. Promjer čestica stacionarne faze iznosio je od 150 do 200 μm . Kasnije su se počela proizvoditi punila sa zrcima promjera 10 μm . Korištenjem takvih kolona koje omogućuju primjenu visokog tlaka poboljšala se je djelotvornost razdvajanja sastojaka odnosno smanjila visina tavana, povećala brzina pokretne faze, a time skratilo vrijeme analize. Od tada pa sve do danas razvija se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti prikladna je za odjeljivanje spojeva male i velike molekulske mase, te termički nestabilnih spojeva. Zbog široke mogućnosti primjene, koristi se u medicini, farmaciji, ekologiji, modernim biološkim znanostima, srodnim područjima molekularne biologije te analitičkoj i preparativnoj kemiji. Uspješno se koristi za razdvajanje različitih spojeva kao što su proteini, polimeri, vitamini, lijekovi, aminokiseline, steroidi, lipidi, te različite organske tvari.

Pokretna faza je tekućina, u njoj se analizirani uzorak mora dobro otapati i ne smije se miješati s tekućom nepokretnom fazom. Nepokretna faza je smještena u koloni (kolonska kromatografija) ili se nanosi na čvrstu podlogu najčešće načinjenu od stakla ili aluminijske plošne kromatografije). Postoje razlike između nekadašnje i današnje kolonske kromatografije, uznapredovala moderna verzija naziva se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Danas se koriste i spregnute tehnike, npr. tekućinska kromatografija i spektrometrija masa.^{17, 19}

Shematski prikaz tekućinskog kromatografa vidljiv je na Slici 3. To je sustav u kojem se analiziraju većinom polarni spojevi. Sastojci smjese razdvajaju se na kromatografskoj koloni i detekcijom istog uz pomoć odgovarajuće tehnike detekcije.



Slika 3. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa.²⁰

Tekućinski kromatograf sastoji se od sustava za dovod pokretne faze, sustava za injektiranje, kolone i detektora. Sustav za dovod pokretne faze sastoji se od spremnika pokretne faze i pumpe koja omogućuje potiskivanje pokretne faze u kromatografsku kolonu uz kontrolirani protok. U kromatografskoj analizi važan je pravilan odabir pokretne faze što znači da tekućine moraju biti visoke čistoće te ujedno ne smiju sadržavati otopljene plinove i čvrste čestice. Da bi se postiglo što bolje odvajanje komponenata smjese koristi se gradijentno eluiranje, odnosno sustav pokretne faze se kontinuirano mijenja tijekom ispiranja. Pumpa, koja može biti ubrizgavajuća ili naizmjenična, kontrolira protok pokretne faze u kromatografsku kolonu uz tlak do 15 MPa, protok u rasponu od 0,1 do 10 ml min⁻¹ i uz relativnu pogrešku manju od 0,5 %. Sustav za injektiranje služi za unošenje uzorka, špricom ili injektorom s petljom kojim se uzorak dovodi u kolonu bez prekida protoka pokretne faze. Kolone su izrađene od nehrđajućeg čelika s glatkim unutarnjim stjenkama duljine 250 mm i unutarnjeg promjera 4,6 mm. Najčešća nepokretna faza je silikagel. Osim glavne kolone u sustavu postoje i predkolone čija je uloga zaštita glavne kolone i postizanje boljeg razdvajanja sastojaka. Detektori detektiraju sastojake na temelju njihovih svojstava kao što je indeks loma, vodljivost, fluorescencija, elektrokemijska reakcija, apsorpcija UV svjetla itd. Apsorpcijski se zasnivaju na mjerenju apsorpcije UV i vidljivog svjetla, a fluorimetrijski detektiraju sastojke koji fluoresciraju. Fluorimetrijski detektori su mnogo osjetljiviji od UV-detektora, a mogu detektirati i sastojke koji ne fluoresciraju ako se prethodno prevedu u fluorescentne derivate. Unaprjeđenje apsorpcijskih detektora predstavlja detektor s nizom

fotodioda koji omogućava snimanje cijelog UV spektra analiziranog sastojka, za razliku od fotometra sa živinom lampom i prizmom koji imaju mogućnost detekcije samo pri određenim valnim duljinama.¹⁹

2.7. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa ubraja se u jednu od najvažnijih analitičkih metoda. Temelji se na analiziranju molekula prema omjeru masa i naboja (m/z). U spektrometriji masa molekule se prevode u molekulske ione koji se mogu fragmentirati na druge ione-fragmente. Spektar masa je grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta iona o njihovom omjeru m/z . Spektrometrija masa široko se primjenjuje pri određivanju strukture organskih i anorganskih molekula, izotopnog omjera atoma u uzorku, elementnog sastava nekog uzorka te kvalitativnog i kvantitativnog određivanje sastava smjesa.^{21, 22}

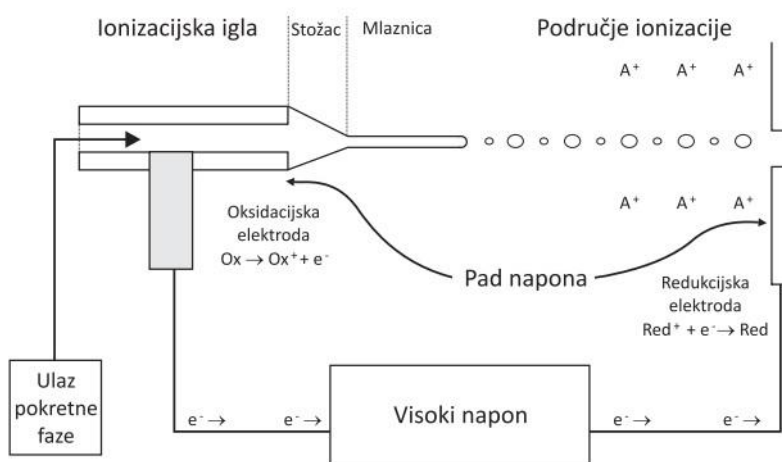
Uređaj, spektrometar masa, sastoji se od ionskog izvora gdje nastaju ioni, analizator masa gdje se analizirani ioni razdvajaju na temelju omjera m/z te detektora i sustava za obradu podataka.²³

Moguće ionizacijske tehnike su ionizacija elektronima (engl. *Electron Impact* - EI), kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionization* - CI), ionizacija brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment* - FAB), matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization* - MALDI), te elektroraspršenje (engl. *Electrospray Ionization* - ESI).²¹

2.7.1. Elektroraspršenje

Elektroraspršenje (ESI) je jedan od najčešće korištenih načina ionizacije u vezanim sustavima LC-MS. ESI uspijeva ionizirati i prevesti masivnu, termolabilnu i nehlapljivu molekulu u plinsku fazu što je glavni uvjet za daljnju analizu spektrometrom masa, te iz toga razloga svoju primjenu pronalazi u analizi bioloških molekula koje teško prelaze u plinovito stanje i ioniziraju. Radni protok iznosi od 5 μ l do 1000 μ l u minuti, a ovisi o elementima od kojih je instrument sastavljen. Ionizacija može biti pozitivna i negativna, ovisno o naponu na kapilari i elektrodi, a događa se pri atmosferskom tlaku. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C i događa se u struji dušika. Ionizacija se odvija tako da se uzorak otopi u polarnom hlapljivom otapalu i pod visokim tlakom tjera kroz kapilaru na čijem se vrhu nalazi jako električno polje (Slika 4). Na vršku igle stvara aerosol sačinjen od kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Zatim se jako nabijene kapi provode kroz struju dušika, te na taj način otapalo isparava i kapljice smanjuju. Kapljice postaju sve sitnije, kad sile odbijanja postanu veće od napetosti površine kapljice se dijele. Postupak traje sve dok u kapljici ne ostane jedna

ionizirana molekula. ESI svoju primjenu pronalazi u analizi sintetskih i bioloških polimera kao što su peptidi, proteini, glikoproteini, oligonukleotidi i oligosaharidi. Tim postupkom snižene su granice određivanja koje se postižu klasičnim tehnikama ionizacije.^{24,22}

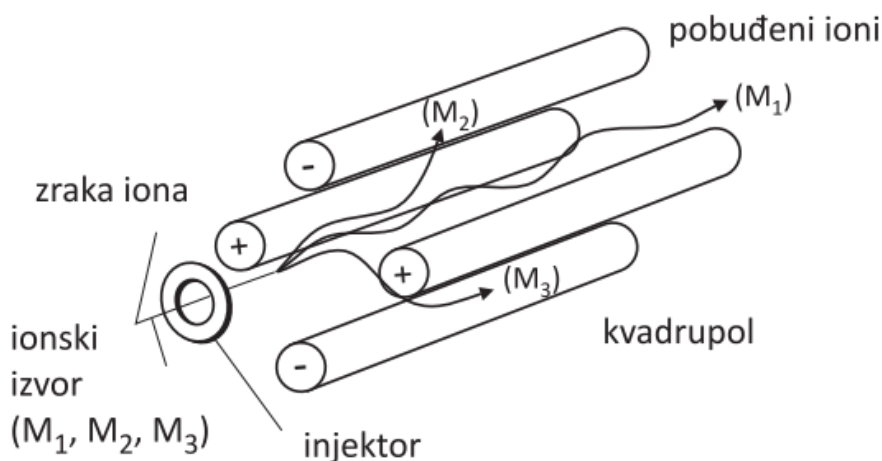


Slika 4. Shematski prikaz procesa prijenosa naboja u tehnici elektroraspršenja.²⁴

2.7.2. Analizatori masa u LC-MS-u

Spektrometrom masa moguće je analizirati ione u vremenu ili prostoru. Poboljšanom separacijom ili dodatnom fragmentacijom moguće je pouzdanije odrediti strukturu analiziranog iona. Spektrometre masa možemo podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom, kod kojih je teorijski moguća analiza do MS^n (FTMS ili stupica iona), spektrometri masa s više analizatora (trostruki kvadrupol QqQ, engl. *Triple Quadrupole*), analiza moguća do MS^2 , te spektrometri masa s dva analizatora, između kojih se nalazi kolizijska ćelija (tzv. hibridni spektrometri masa npr. Q-TOF, engl. *Quadrupole Time of Flight*), kod kojih je moguća analiza do MS. Analizator je sastavni dio spektrometra masa čija je uloga razdvajanje iona na temelju različitog omjera mase i naboja. Različiti analizatori zahtijevaju različite ionizacijske izvore i različite detektore iona. Jedan od najprimjenjivijih analizatora je kvadrupol. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri cilindrične elektrode, spojene u dva para, na koje se primjenjuje istosmjerni ili izmjenični napon (Slika 5). Dvije elektrode imaju pozitivni polaritet, a druge dvije negativni. Tijekom masenospektrometrijskog procesa preklapaju se izmjenični i istosmjerni napon, što rezultira

kvadrupolnim električnim poljem. Ioni koji se nalaze u analizatoru imaju različite vrijednosti m/z , te to određuje hoće li neometano proći kroz analizator ili će dotaknuti elektrode i tako postati neutralne molekule. Dodatni parametri koji određuju karakteristike njihovog gibanja su napon, kutna frekvencija, masa čestice, radijus i dr.^{24,23}



Slika 5. Shema kvadrupolnog analizatora masa.²⁴

Način rada kvadrupola temelji se na tome da se pozitivno nabijeni ioni kreću prema fokusu za vrijeme pozitivne polovice izmjeničnog ciklusa kada je odsutan istosmjerni potencijal, a prema elektrodama dok traje negativni izmjenični ciklus. Do neutralizacije iona dolazi ako se ioni sudare s elektrodom. U odsutnosti izmjeničnog potencijala svi pozitivni ioni bit će privučeni negativnim elektrodama. Ako je ion dovoljno lagan, na njega će djelovati izmjenični potencijal koji će ga držati u stabilnoj putanji podalje od elektroda. Djelovanjem određenog izmjeničnog napona nastat će rezonantni ioni tj. ioni iste mase postići će jednaku amplitudu gibanja te će tako jedino ti ioni doći do detektora, budući da će ioni s različitim masama imati nepravilno gibanje.²²

Kao što je već spomenuto, jedan od spektrometra masa s više analizatora je trostruki kvadrupol (QqQ). Analizatori s kvadrupolom u kombinaciji primjenjuju se za analizu spojeva mase manje od 1000 u. Kvadrupoli nisu najpogodniji za suvremena visokobrzinska izdvajanja, nisu dobri selektori jako velikih masa te imaju ograničenu brzinu pregleda (< 4000 u/s). Kako bi se premostili ti nedostaci koristi se trostruki kvadrupol u kojem su povezana tri kvadrupola, od kojim središnji ima funkciju kolizijske ćelije u kojoj se odvija kontrolirana fragmentacija iona. Trostrukim kvadrupolom moguće je snimati sve ione, ali i kombinacija

odabranih iona. Trostruki kvadrupol QqQ primjenjuje se u sudskoj medicini, farmaceutskoj industriji te kliničkoj kemiji.^{24,23}

2.7.3. Vezani sustav tekućinski kromatograf – spektrometar masa

Spajanje LC i MS-a u jedan sustav omogućuje analizu širokog spektra spojeva što uključuje termički nestabilne analite i analite s visokom molekulskom masom što je nemoguće analizirati plinskim kromatografom vezanim sa spektrometrom masa. Pokretnu fazu potrebno je uvesti u spektrometar masa pod visokim naponom, te se iz toga razloga tekućinski kromatogram povezuje sa spektrometrom masa određenim međuspojevima, npr. MALDI. Komercijalno su dostupne različite nepokretne faze za tekućinskokromatografske kolone čime je omogućena analiza različitih spojeva obzirom na njihova fizičko-kemijska svojstva. Ipak ovaj vezani sustav ograničava izbor otapala koje je moguće koristiti. Kako bi se spriječilo taloženje soli u spektrometru masa mnoga do sada korištena otapala zamijenjena su nekim drugima, pa se danas koriste hlapljivi puferi i organski aditivi. Uspješnost rada vezanim sustavom LC-MS uvelike ovisi o prethodnoj pripremi uzoraka budući da je uređaj vrlo osjetljiv te kontaminacije u uzorku mogu izazvati razne komplikacije prilikom analize. Vanjski uvjeti, npr. temperatura, također znatno utječu na rezultate analize sustavom LC-MS. Kako bi se spriječile pogreške prilikom analize, potrebna je temeljita validacija protokola pripreme uzoraka. Danas ručno podešavanje i praćenje same analize sve više zamjenjuje računalna podrška spektrometra masa.

U ovom radu za analizu skupine sulfonamida i kloramfenikola u medu, korišten je vezani sustav tekućinski kromatograf spregnut s dvostrukim spektrometrom masa (LC-MS/MS, Slika 6.). Ovaj vezani sustav ima određene prednosti u odnosu na ranije korištene vezane sustave koje uključuju veću osjetljivost, selektivnost, robusnost i širi raspon m/z čime se proširuje paleta mogućih analiziranih tvari.²⁵ Kao što je već napomenuto, pročišćavanje uzoraka važan je korak i podrazumijeva dobro uhodanu tehniku ekstrakcije na čvrstoj fazi objašnjenu u točki 2.5. Kao ionski izvor korišten je ESI koji opisan pod točkom 2.7.1., pri čemu nastaju ioni analita te dolazi do njihovog uvođenja u trostruki kvadrupolni analizator masa, također već spomenut u točki 2.7.2.



Slika 6. Vezani sustav tekućinski kromatograf–spektrometar masa u Zavodu za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Pri određivanju sulfonamida i kloramfenikola korišteno je nekoliko kemikalija i reagensa:

- acetatni pufer pH-vrijednosti 7,49, pripremljen otapanjem 5,249 g natrijevog acetata u 0,5 L redestilirane vode; otopina je profiltrirana, te je podešena pH-vrijednost dodatkom octene kiseline
- acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade, 2,5 L, J. T. Baker, Nizozemska)
- metanol (Ultra Gradient HPLC Grade, 2,5 L, J.T. Baker, Nizozemska)
- 0,1 % mravlja kiselina u vodi, FCA , Sigma-Aldrich, Švicarska (otopina pripravljena u laboratoriju otapanjem 1mL 100 % FCA u 1L vode)
- deionizirana voda vodljivosti 0,05 Scm⁻¹ pripravljena u laboratoriju

Uzorci meda analizirani u radu prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Uzorci meda analizirani u diplomskom radu.

Hrvatsko podrijetlo	Kombinacija zemalja članica EU	Kombinacija zemalja članica EU i država koje ne pripadaju EU	Kinesko podrijetlo
cvjetni med	med bagrema	cvjetni med	med bagrema
med kadulja	cvjetni med	cvjetni med	-
med lipa	-	med bagrema	-
med bagrema	-	-	-
med kesten	-	-	-

Unutarnji standardi:

- **Kloramfenikol D5** (D5, 98% , 100 µg / mL u acetonitrilu, CAS broj nemarkiranog standarda No. 56-75-7, Lot: SCHA-002, Cambridge Isotope Laboratories)

- **Sulfametazin 6C13** (Phenyl-13C6, 90%, 100 µg / mL u acetonitrilu, CAS No. 57-68-1, Lot: SCID-004, Cambridge Isotope Laboratories)
- **Sulfametoksazol 6C13** (Ring-13C6, 99%, 100 µg / mL u acetonitrilu, CAS No. 723-46-6; Lot: SCID-042, Cambridge Isotope Laboratories)

Analiti:

- sulfadiazin (CAS No. 68-35-9, Lot: 02525, ULTRA)
- sulfametazin (CAS No. 57-68-1, Lot: 2527, ULTRA)
- sulfametoksipiridazin (CAS No. 80-35-3, Lot: 3859, ULTRA)
- sulfadoksin (CAS No. 2447-57-6, Lot: 6009, ULTRA)
- kloramfenikol (CAS No. 56-75-7, Lot: 20606, ULTRA)

3.2. Instrumenti i pribor

Za eksperimentalni dio rada od instrumenata korištena je analitička vaga (*Sartorius* BP 6100 i *Mettlet Toledo* GmbH), ultrazvučna kupelj (Branson 1210, Branson Ultrasonics), pH metar (InoLab pH Level 2), uparivač (EVA-EC2-24-L), tresilica (IKA HS 501 digital), vortex (IKA Vortex Genius 3, Vortex shaker), filter (Acrodisc 13 mm Syringe Filter) s membranom (Nylon Acrodisc CR, veličine pora 0,2 µm). Uređaj korišten prilikom kromatografije je tekućinski kromatograf, UHPLC (Flexar UHPLC, PerkinElmer) koji se sastoji od termostiranog autouzorkivača (Flexar UHPLC), binarne pumpe (Flexar BX – 10) i termostiranog odjeljka za kolonu. Kromatografska kolona je Zorbax SB-C18 sa unutarnjim promjerom 2,1 mm, duljine 150 mm i veličine čestica 3 µm; (Agilent Technologies Deutschland GmbH Chemische Analysentechnik) i predkolone Zorbax Eclipse XDB-C8 sa unuarnjim promjerom 2,1 mm duljine 12,5 mm i veličine čestica 5µm (Agilent Tehnologies Deutschland GmbH Chemische Analysentechnik). Spektrometar upotrebljen prilikom analize je ABSciex QTRAP 4500 System koji se sastoji od ESI kao ionskog izvora, te trostrukog kvadrupolnog analizatora masa.

Tijekom eksperimentalnog rada od pribora je korištena staklena čaša od 250 mL, stakleni štapić i odmijerna tikvica od 500 mL.

3.3. Tekućinskromatografski uvjeti za određivanje sulfonamida i kloramfenikola

Temperatura kolone prilikom analize sulfonamida i kloramfenikola iznosila je 40 °C, dok je temperatura automatskog uzorkivača bila 4 °C. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 µL. Primijenjeno je gradijentno ispiranje. Pokretna faza A je 0,1 % mravlja kiselina u deioniziranoj vodi, dok je pokretna faza B 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu. Ukupno vrijeme kromatografske analize iznosilo je 18 min (Tablica 4.)

Tablica 4. Kromatografski parametri pri LC analizi kloramfenikola i sulfonamida. A = 0,1 % - tna mravlja kiselina u vodi, B = 0,1 % - tna mravlja kiselina u acetonitrilu.

	Ukupno vrijeme (min)	Protok pokretne faze (µL/min)	A %	B %
1	0,1	300,00	90,0	10,0
2	8,0	300,00	10,0	90,0
3	15,0	300,00	10,0	90,0
4	15,1	300,00	90,0	10,0
5	18,0	300,00	90,0	10,0

3.4. Priprema uzorka

Odvagano je po 5,0 g bagremovog meda u 5 staklenih čaša od 250 mL na analitičkoj vagi osjetljivosti 0,01 mg. Nakon toga su dodani unutarnji standardi sulfonamida i kloramfenikola (kloramfenikol D5, sulfametazin 6C13 i sulfametoksazol 6C13). Nadalje, u

uzorke je dodano 5 mL 0,1 % mravlje kiseline u vodi, te su radi homogenizacije postavljeni u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta. Nakon što se med otopio i uzorci homogenizirali dodalo se je 10 mL acetatnog pufera (pH 7,49). Zatim su se uzorci ponovno vratili u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta.

3.5. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) provedena je na uređaju proizvođača Supelco Sigma, Aldrich Chemie GmbH. SPE kolone (Oasis HLB, 200 mg, 6 mL, Waters) za ekstrakciju aktivirane su propuštanjem 3 mL metanola, te 3 mL pufera. Nakon toga je uslijedilo propuštanje uzoraka kroz kolonu. Po završetku istjecanja uzorka iz kolone, staklene čaše u kojima se nalazio uzorak isprane su dodatno s puferom kako bi se kvantitativno prenio uzorak na kolonu. Zatim su kolone isprane s 3 mL pufera, te nekoliko puta s 9-10 mL deionizirane vode. Nadalje, kolone su se ostavile sušiti pod vakuumom oko 90 minuta. Nakon što su se kolone dobro osušile, uslijedilo je eluiranje analita acetonitriлом (dva puta po 2 mL acetonitrila). Eluat je skupljan u epruvete i uparen u struji dušika na uparivaču pri 38 °C. Da bi uzorak bio spreman za daljnju analizu, suhi ostatak se otopio u 0,5 mL 20 % acetonitrila u vodi (H₂O:ACN = 4:1, što ujedno predstavlja i pokretnu fazu) te filtrirao kroz Acrodisc 13 mm Syringe filter sa najlonskom membranom veličine pora 0,2 μm (PALL) u bočice za injektiranje tzv. viala.

3.6. LC-MS/MS analiza

Analiza sulfonamida i kloramfenikola provedena je metodom tekućinske kromatografije – tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS). Pri tome se koristio sustav ABSciex Qtrap 4500. Tekućinskokromatografski uvjeti navedeni su u točki 3.3.

Za MS/MS analizu korišten je trostruki kvadrupol. Sulfonamidi su analizirani u pozitivnom načinu rada, a kloramfenikol u negativnom. Za svaki analizirani sulfonamid praćena su dva prijelaza (SRM), a kao ion prekursor odabran je protonirani molekularni ion $[M+H]^+$, dok je za kloramfenikol odabran deprotonirani molekularni ion $[M-H]^-$. Nastankom fragmenata molekularnog iona, najintenzivniji ion odabire se za kvantitativnu analizu, dok drugi preostali fragment služi kao potvrda odabranog iona.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija pH-vrijednosti uzorka

Metoda određivanja sulfonamida i kloramfenikola u pojedinim uzorcima meda zasniva se na ekstrakciji uzoraka na čvrstoj fazi, te analizi ekstrakta vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa uz praćenje iona specifičnih omjera m/z . Budući da je med prirodno bogat šećerima postoji mogućnost kristalizacije uzoraka u kapilarama tijekom kromatografske analize. Metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi sprječava se potencijalna opasnost kristalizacije, kao i utjecaj matrice na rezultate analize.

Budući da različiti antibiotici vrlo često posjeduju različite pK_a vrijednosti, za njihovu uspješnu analizu u uzorcima meda što uključuje ekstrakciju na čvrstoj fazi, bilo je važno optimizirati vrijednost pH.

Tablica 5. pK_a vrijednosti kloramfenikola, sulfametazina, sulfadiazina, sulfametoksipiridazina i sulfadoksina.¹³

Analiti	pK_a vrijednosti
kloramfenikol	5,5
sulfametazin	7,59
sulfadiazin	6,36
sulfametoksipiridazin	7,19
sulfadoksin	6,1

Za uspješnu ekstrakciju na čvrstoj fazi trebalo je naći optimalnu pH-vrijednost koja će odgovarati svim navedenim analitima. Optimalna vrijednost za ekstrahiranje analita određena je tako što je provedena kisela hidroliza s otopinom s 0,1 % mravlje kiseline u vodi, a prije

toga podešene vrijednosti pH acetatnim puferom. Nakon dodatka pufera otopina sa ranije dodanim unutarnjim standardima imala je pH-vrijednost 5,59 što ulazi u okvire optimalnih pH-vrijednosti za određivanje sulfonamida dobivenih istraživanjima pojedinih znanstvenika.²⁷ Stoga je daljnja analiza provedena pri spomenutoj pH-vrijednosti pufera. Treba napomenuti da su u odvagane uzorke meda dodani unutarnji standardi.

4.2. Optimizacija volumena eluensa

Nakon što je uspješno određena optimalna pH-vrijednost za različite sulfonamide i kloramfenikol, ispitan je drugi parametar, volumen eluensa potreban za ispiranje sorbensa. Propuštanjem otopine meda kroz kolone, valjani rezultati pokazali su se ispiranjem sorbensa s 3 mL pufera i tri puta po 3 mL vode. Nakon sušenja, najbolji rezultati eluiranja s kolone postignuti su ispiranjem kolone dva puta s po 2 mL acetonitrila. Eluati su upareni u struji dušika. Optimalno vrijeme sušenja kolona iznosilo je 90 min. Ukoliko kolone nisu dovoljno suhe, uparivanje eluata zahtjeva mnogo više vremena.

4.3. Identifikacija i kvantifikacija analita

Identifikacija kloramfenikola i skupine sulfonamida određena je na temelju vremena zadržavanja sastojaka na kromatografskoj koloni i odgovarajućih podataka MS/MS analize. Za pozitivnu identifikaciju analita vrijeme zadržavanja analita na kromatogramu uzorka ne smije odstupati više od 5 % od vremena zadržavanja analita na kromatogramu standardnih otopina uz odgovarajući omjer dvaju tranzicija ($RSD < 20\%$). U Tablicama 7.-11. prikazana su vremena zadržavanja odabranih sulfonamida i kloramfenikola, na kromatogramima uzoraka i na kromatogramu standardne otopine navedenih spojeva. Iz Tablica 7.-11. je vidljivo vrlo dobro preklapanje vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja standardnih otopina.

Također su u Tablicama 7.-11. prikazane vrijednosti relativnih standardnih odstupanja (RSD) za standardne otopine pojedinih sulfonamida i kloramfenikola, te istih spojeva ekstrahiranih iz meda. Masena koncentracija spojeva u analiziranim standardima kloramfenikola bila je 3 ng/mL, dok je za sulfonamide iznosila 50 ng/mL. Metoda za određivanje granica kvantifikacije zahtjeva odgovarajuću preciznost pod uvjetima ponovljivosti i točnosti. Iz toga razloga pripremljeni su uzorci poznate koncentracije (primjenom metode standardnog dodatka) u području oko moguće granice kvantifikacije i

izračunata su relativna standardna odstupanja za svaki analit. Vrijednosti relativnih standardnih odstupanja kreću se od 1,95 % za sulfametoksazol do 4,37 % za sulfametazin što dokazuje da je ponovljivost ove metode zadovoljavajuća. Granica kvantifikacije pojedinih sulfonamida i kloramfenikola u medu određena je kao najniži maseni udio traženog analita u medu uz određenu točnost i preciznost. Granice kvantifikacija za kloramfenikol (CAP, 0,3 µg/kg) i skupinu sulfonamida (SAS, 5 µg/kg) određene su injektiranjem ekstrakta meda iz 10 realnih uzoraka u koje je kroz postupak dodavana sve manja masena koncentracija analita.

Tablica 6. Vrijednosti dobivenih granica kvantifikacija kloramfenikola i navedenih sulfonamida iz deset realnih uzoraka meda.

Uzorci meda Analit	Uzorci meda									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kloramfenikol (µg/mL)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Sulfametazin (µg/mL)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Sulfadiazin (µg/mL)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Sulfametoksipiridazin (µg/mL)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Sulfadoksin (µg/mL)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Maseni udjel kloramfenikola iznosio je 0,25 µg/kg što je vidljivo u tablicama 7.-11., a udjeli sulfonamida iznosili su: 5,7 µg/kg za sulfametazin, 4,04 µg/kg za sulfadiazin, 5,53 µg/kg za sulfametoksipiridazin, te 6,25 µg/kg za sulfadoksin. Također, u tablicama su navedene vrijednosti iskorištenja metode ekstrakcije. Tako je iskorištenje metode za kloramfenikol iznosilo 84,62 %, a za skupinu sulfonamida većinom iznad 100 %. Najveće iskorištenje metode ekstrakcije je pri određivanju sulfadiazina (125,00 %), nešto malo manje za sulfametazin (113,95 %) i sulfametoksipiridazin (110,59 %), dok je jedino vrijednost iskorištenja za sulfadoksin ispod većinske vrijednosti (80,80 %). No, bez obzira na to, ove visoke vrijednosti ukazuju na dobru ponovljivost metode.

Tablice 7.-11. prikazuju parametre ispitivane tijekom ekstrakcije kloramfenikola i pojedinih sulfonamida na čvrstoj fazi u uzorcima bagremovog meda.

Tablica 7. Unutarnji standardi na granici kvantifikacije metode, vrijednosti površina pika vanjskog i unutarnjeg standarda, srednje iskorištenje, ponovljivost, standardna devijacija i vrijeme zadržavanja za ekstrakciju kloramfenikola na čvrstoj fazi u uzorcima bagremovog meda

Uzorci	Analit	Unutarnji standard	Površina pika	Površina pika US	Omjer površine pika	µg / kg	Iskorištenja, %	Vrije -me zadržavanja t_R	Vrije -me zadržavanja US, t_R US
Standard CAP, 3 ng/mL	Kloramfenikol 1	Kloramfenikol-D5 1			0,99			5,17	5,15
	Srednja vrijednost				0,99				
Med 1	Kloramfenikol 1	Kloramfenikol-D5 1	3,82E + 05	4,51E + 05	0,85	0,26	85,62	5,17	5,15
Med 2	Kloramfenikol 1	Kloramfenikol-D5 1	3,52E + 05	4,25E + 05	0,83	0,25	83,70	5,17	5,16
Med 3	Kloramfenikol 1	Kloramfenikol-D5 1	3,53E + 05	4,31E + 05	0,82	0,25	82,85	5,17	5,15
Med 4	Kloramfenikol 1	Kloramfenikol-D5 1	3,83E + 05	4,49E + 05	0,85	0,26	86,24	5,17	5,16
Med 5	Kloramfenikol 1	Kloramfenikol-D5 1	3,51E + 05	4,19E + 05	0,84	0,25	84,68	5,17	5,15
	Srednja vrijednost					0,25	84,62		
	Stand. devijacija, σ					0,0041	1,3800		
	RSD %					1,63	1,63		

Tablica 8. Unutarnji standardi na granici kvantifikacije metode, vrijednosti površina pika vanjskog i unutarnjeg standarda, srednje iskorištenje, ponovljivost, standardna devijacija i vrijeme zadržavanja za ekstrakciju sulfametazina na čvrstoj fazi u uzorcima bagremovog meda

Uzorci	Analit	Unutarnji standard	Površina pika	Površina pika US	Omjer površina pika	µg / kg	Iskorištenja, %	Vrije -me zadržavanja, t_R	Vrije -me zadržavanja US, t_R US
Standard SAS, 50 ng/mL	Sulfametazin 1	Sulfametazin 6C13 1	8,84E + 05	1,56 + 06	0,54			4,42	4,41
	Srednja vrijednost				0,54				
Med 1	Sulfametazin 1	Sulfametazin 6C13 1	2,10E + 06	3,59E + 06	0,59	5,42	108,48	4,41	4,41
Med 2	Sulfametazin 1	Sulfametazin 6C13 1	2,00E + 06	3,37E + 06	0,60	5,52	110,32	4,42	4,41
Med 3	Sulfametazin 1	Sulfametazin 6C13 1	2,15E + 06	3,41E + 06	0,63	5,85	116,91	4,41	4,41
Med 4	Sulfametazin 1	Sulfametazin 6C13 1	2,00E + 06	3,22E + 06	0,62	5,77	115,47	4,42	4,42
Med 5	Sulfametazin 1	Sulfametazin 6C13 1	2,10E + 06	3,29E + 06	0,64	5,93	118,56	4,40	4,40
	Srednja vrijednost					5,70	113,95		
	Stand. devijacija, σ					0,2171	4,3421		
	RSD %					3,81	3,81		

Tablica 9. Unutarnji standardi na granici kvantifikacije metode, vrijednosti površina pika vanjskog i unutarnjeg standarda, srednje iskorištenje, ponovljivost, standardna devijacija i vrijeme zadržavanja za ekstrakciju sulfametoksipiridazina na čvrstoj fazi u uzorcima bagremovog meda

Uzorci	Analit	Unutarnji standard	Površina pika	Površina pika US	Omjer površina pika	µg / kg	Iskorištenja, %	Vrije -me zadržavanja, t_R	Vrije -me zadržavanja US, t_R US
Standard SAS, 50 ng/mL	Sulfametoksipiridazin 1	Sulfametazin 6C13 1	1,43E + 06	1,56E + 06	0,92			4,37	4,41
	Srednja vrijednost				0,92				
Med 1	Sulfametoksipiridazin 1	Sulfametazin 6C13 1	3,53E + 06	3,59E + 06	0,99	5,36	107,21	4,37	4,41
Med 2	Sulfametoksipiridazin 1	Sulfametazin 6C13 1	3,29E + 06	3,37E + 06	0,98	5,32	106,42	4,37	4,41
Med 3	Sulfametoksipiridazin 1	Sulfametazin 6C13 1	3,52E + 06	3,41E + 0,6	1,03	5,62	112, 30	4,37	4,41
Med 4	Sulfametoksipiridazin 1	Sulfametazin 6C13 1	3,45E + 06	3,22E + 06	1,07	5,84	116,87	4,38	4,42
Med 2	Sulfametoksipiridazin 1	Sulfametazin 6C13 1	3,33E + 06	3,29E + 06	1,01	5,51	110,12	4,36	4,40
	Srednja vrijednost					5,53	110,59		
	Stand. devijacija, σ					0,2112	4,2244		
	RSD %					3,82	3,82		

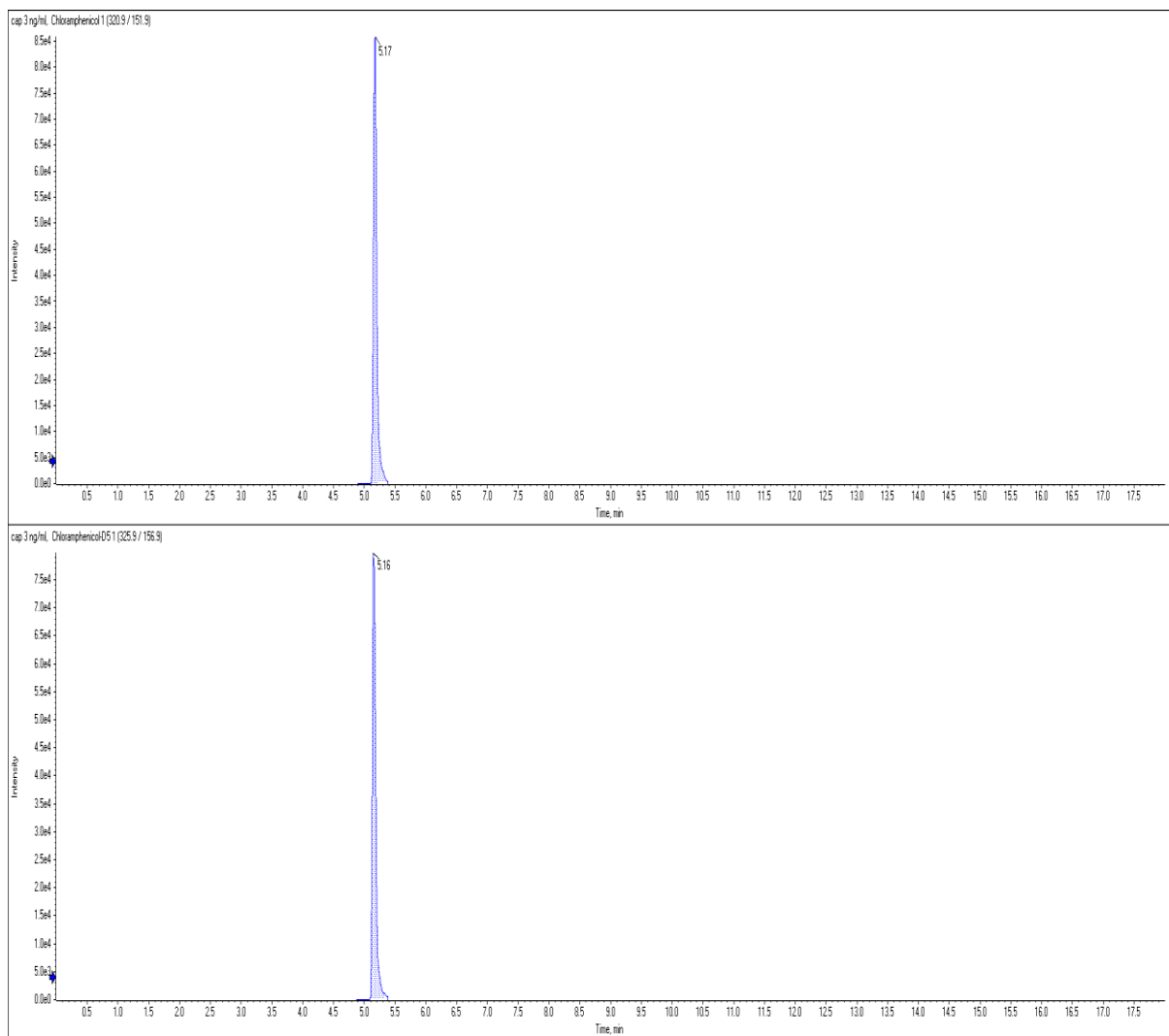
Tablica 10. Unutarnji standardi na granici kvantifikacije metode, vrijednosti površina pika vanjskog i unutarnjeg standarda, srednje iskorištenje, ponovljivost, standardna devijacija i vrijeme zadržavanja za ekstrakciju sulfadoksina na čvrstoj fazi u uzorcima bagremovog meda

Uzorci	Analit	Unutarnji standard	Površina pika	Površina pika US	Omjer površina pika	µg / kg	Iskorištenja, %	Vrije-me zadržavanja, t_R	Vrije-me zadržavanja US, t_R US
Standard SAS, 50 ng/mL	Sulfadoksin 1	Sulfametazin 6C13 1	1,90E + 06	1,56E + 06	1,13			4,99	4,41
	Srednja vrijednost				1,13				
Med 1	Sulfadoksin 1	Sulfametazin 6C13 1	4,81E + 06	3,59E + 06	1,34	5,94	118,78	4,99	4,41
Med 2	Sulfadoksin 1	Sulfametazin 6C13 1	4,59E + 06	3,37E + 06	1,37	6,05	120,90	4,99	4,41
Med 3	Sulfadoksin 1	Sulfametazin 6C13 1	4,87E + 06	3,41E + 06	1,43	6,32	126,40	4,98	4,41
Med 4	Sulfadoksin 1	Sulfametazin 6C13 1	4,82E + 06	3,22E + 06	1,50	6,64	132,77	4,99	4,42
Med 5	Sulfadoksin 1	Sulfametazin 6C13 1	4,68E + 06	3,29E + 06	1,42	6,31	126,13	4,98	4,40
	Srednja vrijednost					6,25	125,00		
	Stand. devijacija, σ					0,2729	5,4573		
	RSD %					4,37	4,37		

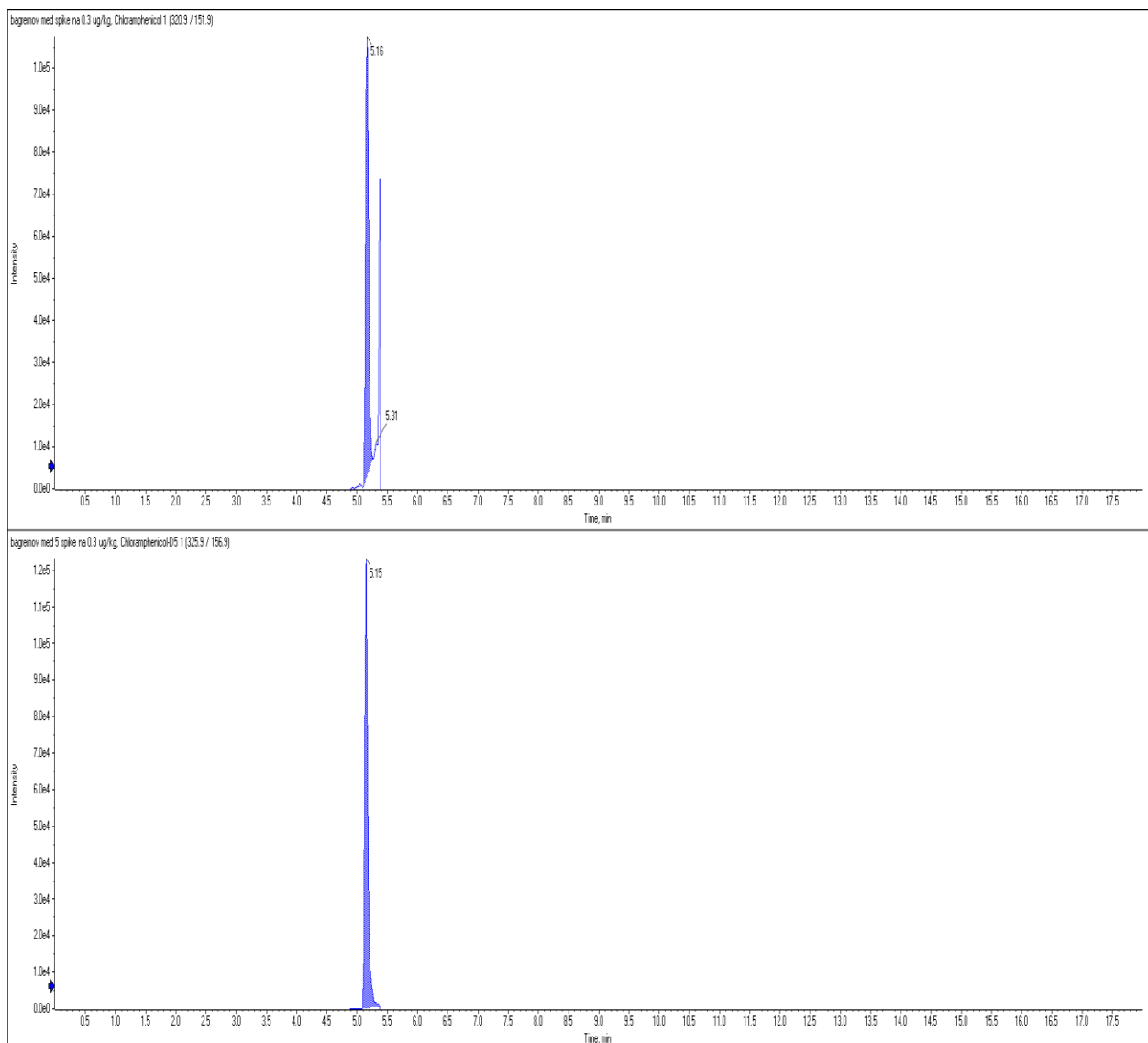
Tablica 11. Unutarnji standardi na granici kvantifikacije metode, vrijednosti površina pika vanjskog i unutarnjeg standarda, srednje iskorištenje, ponovljivost, standardna devijacija i vrijeme zadržavanja za ekstrakciju sulfadiazina na čvrstoj fazi u uzorcima bagremovog meda

Uzorci	Analit	Unutarnji standard	Površina pika	Površina pika US	Omjer površina pika	µg / kg	Iskorištenja, %	Vrije -me zadržavanja, t_R	Vrije -me zadržavanja US, t_R US
Standard SAS, 50 ng/mL	Sulfadiazin 1	Sulfametoksazol 6C13 1	1,74E + 06	1,65E + 06	1,03			3,84	4,99
	Srednja vrijednost				1,03				
Med 1	Sulfadiazin 1	Sulfametoksazol 6C13 1	3,62E + 06	4,25E + 06	0,85	4,13	82,54	3,83	4,99
Med 2	Sulfadiazin 1	Sulfametoksazol 6C131	3,50E + 06	4,20E + 06	0,83	4,03	80,65	3,83	5,00
Med 3	Sulfadiazin 1	Sulfametoksazol 6C131	3,62E + 06	4,29E + 06	0,84	4,08	81,68	3,83	4,99
Med 4	Sulfadiazin 1	Sulfametoksazol 6C131	3,46E + 06	4,28E + 06	0,81	3,92	78,32	3,85	5,00
Med 5	Sulfadiazin 1	Sulfametoksazol 6C131	3,38E + 06	4,05 + 06	0,83	4,04	80,81	3,82	4,99
	Srednja vrijednost					4,04	80,80		
	Stand. devijacija, σ					0,0789	1,5775		
	RSD %					1,95	1,95		

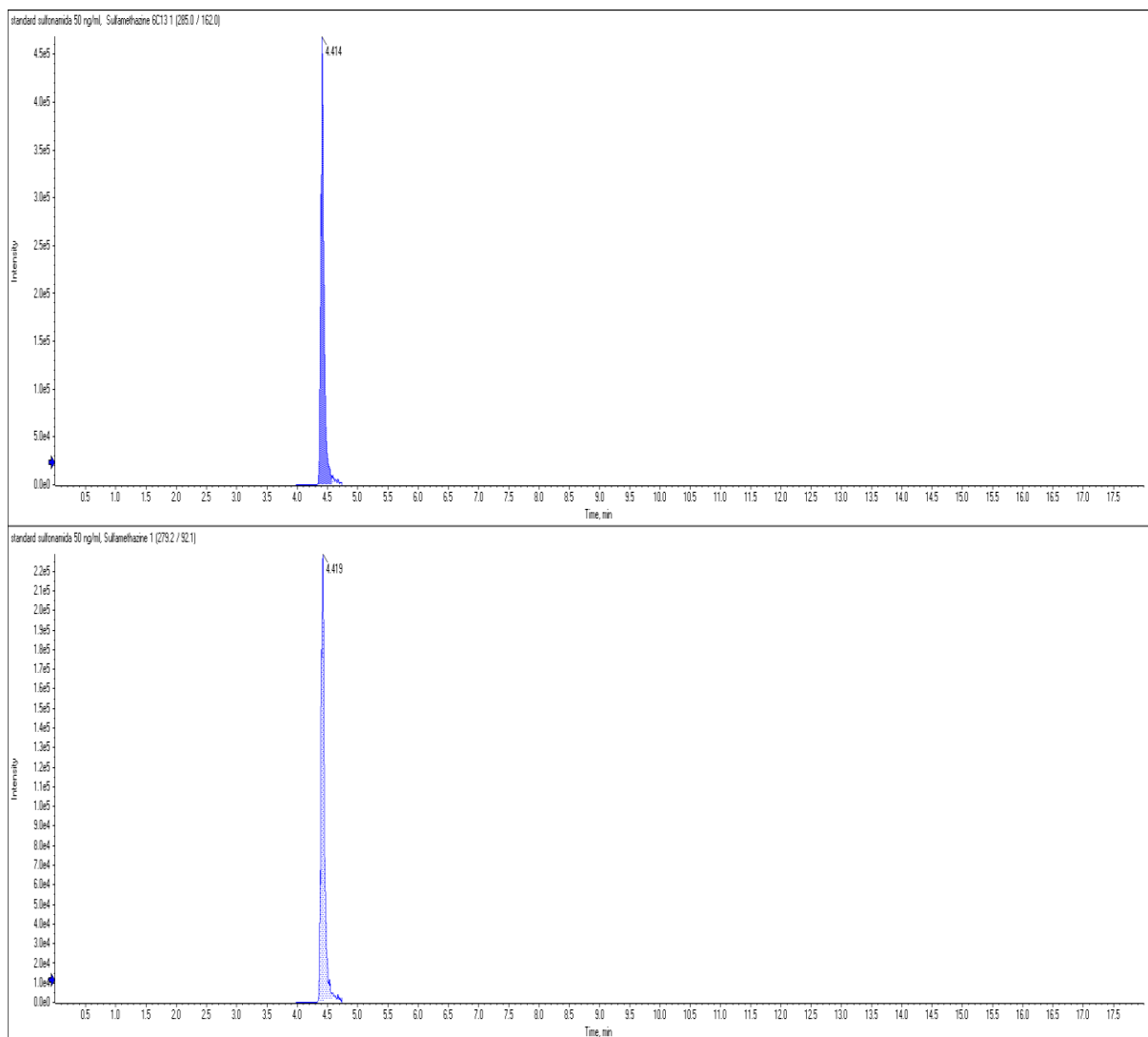
Na slikama 7.-12. prikazani su kromatogrami standardne otopine kloramfenikola i izotopom obilježenog kloramfenikola, kromatogram uzorka bagremovog meda s dodatkom standarda koji odgovara granici kvantifikacije i standarda izotopom obilježenog kloramfenikola, kromatogram sulfametazina i standardne otopine izotopom obilježenog sulfametazina, kromatogram uzorka bagremovog meda sa dodatkom standarda sulfametoksazola i standarda izotopom obilježenog sulfametoksazola u količini koja odgovara granici kvantifikacije, kromatogram realnog uzorka bagremovog meda sa dodatkom unutarnjeg standarda kloramfenikola u količini koja odgovara granici kvantifikacije i dodatkom unutarnjeg standarda izotopom obilježenog kloramfenikola u količini koja odgovara granici kvantifikacije, te kromatogram realnog uzorka bagremovog meda s dodatkom unutarnjeg standard sulfametazina u količini koja odgovara granici kvantifikacije dodatkom unutarnjeg standarda izotopom obilježenog sulfametazina u količini koja odgovara granici kvantifikacije.



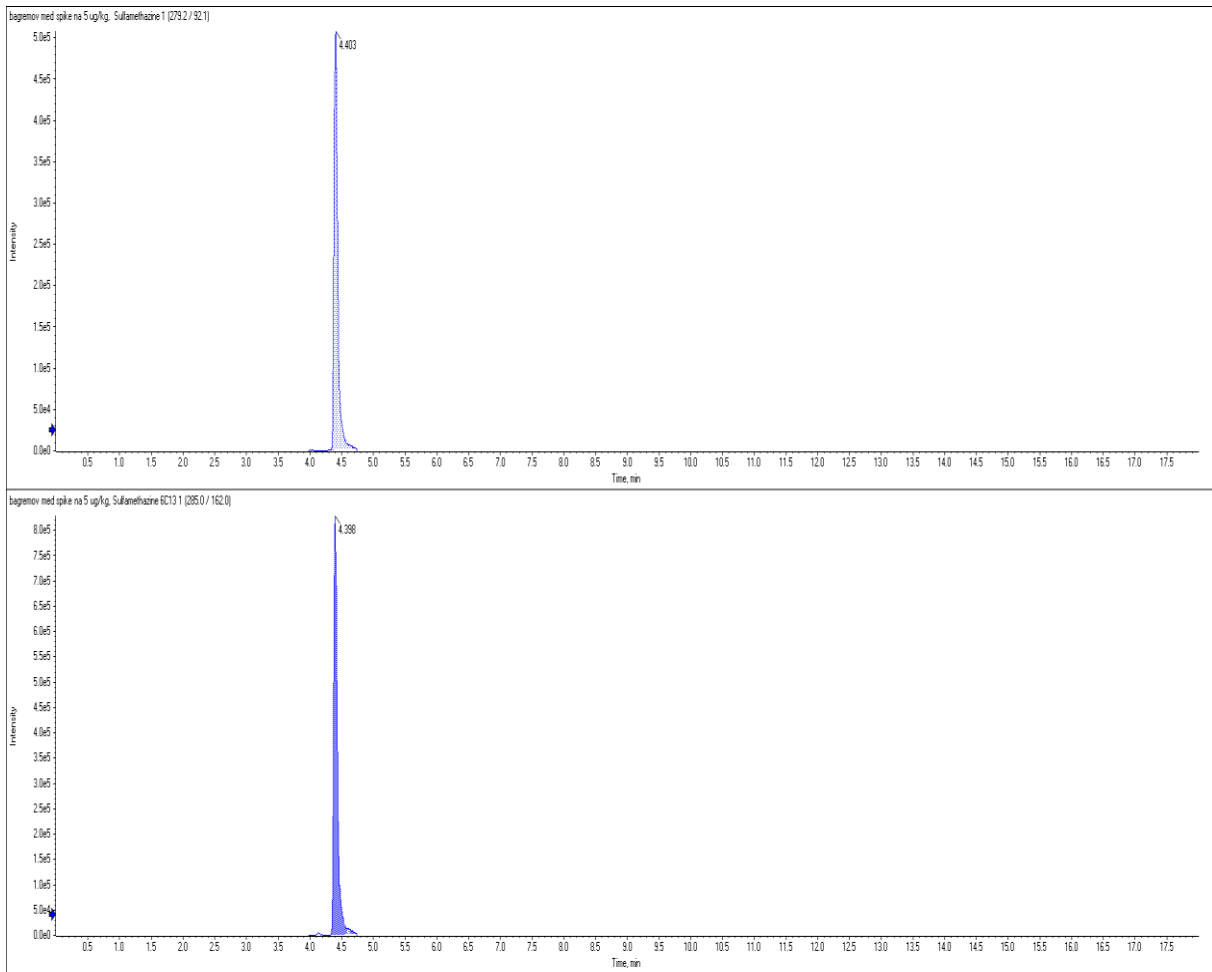
Slika 7. Kromatogram standardne otopine kloramfenikola (gornji kromatogram) i izotopom obilježenog kloramfenikola koncentracija 3 ng mL⁻¹ (donji kromatogram).



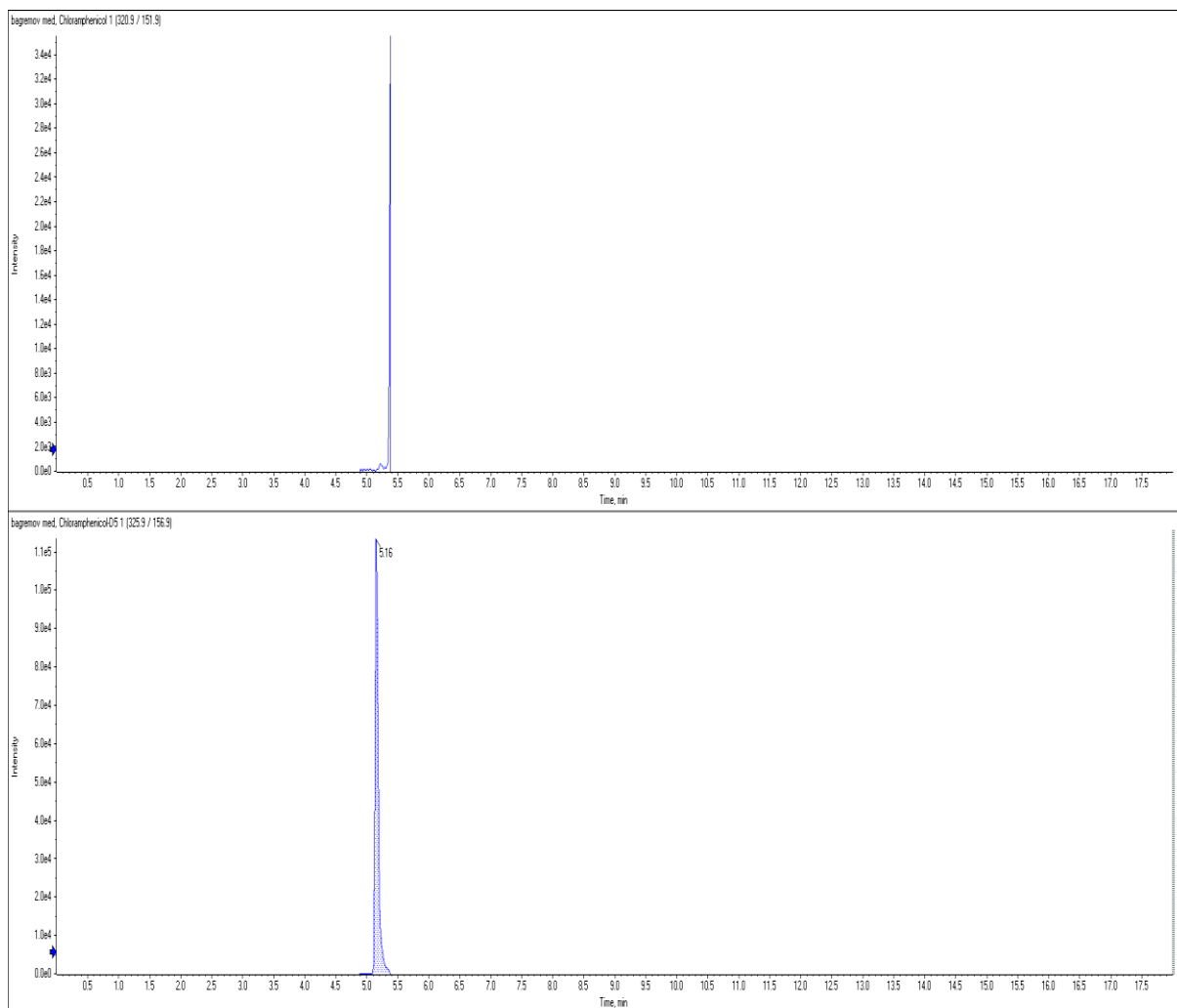
Slika 8. Kromatogram uzorka bagremovog meda s dodatkom standarda kloramfenikola u količini koja odgovara granici kvantifikacije (gornji kromatogram) i dodatkom standarda izotopom obilježenog kloramfenikola u količini koja odgovara granici kvantifikacije (donji kromatogram).



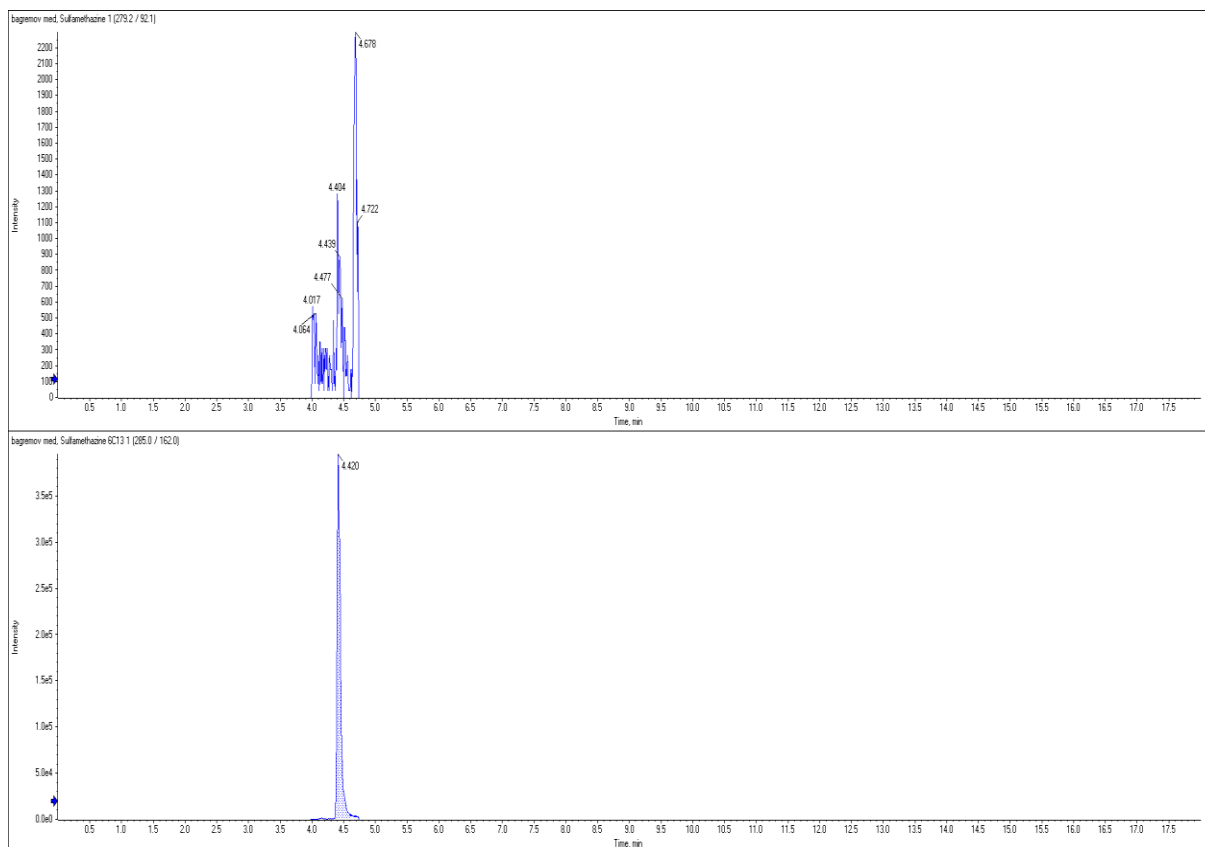
Slika 9. Kromatogram standardne otopine izotopom obilježenog sulfametazina koncentracija 50 ng mL^{-1} (gornji kromatogram) i sulfametazina (donji kromatogram).



Slika 10. Kromatogram uzorka bagremovog meda s dodatkom standarda sulfametoksazola u količini koja odgovara granici kvantifikacije (gornji kromatogram) i dodatkom standarda izotopom obilježenog sulfametoksazola u količini koja odgovara granici kvantifikacije (donji kromatogram).



Slika 11. Kromatogram realnog uzorka bagremovog meda s dodatkom unutarnjeg standarda kloramfenikola u količini koja odgovara granici kvantifikacije (gornji kromatogram) i dodatkom unutarnjeg standarda izotopom obilježenog kloramfenikola u količini koja odgovara granici kvantifikacije (donji kromatogram).



Slika 12. Kromatogram realnog uzorka bagremovog meda s dodatkom unutarnjeg standarda sulfametazina u količini koja odgovara granici kvantifikacije (gornji kromatogram) i dodatkom unutarnjeg standarda izotopom obilježenog sulfametazina u količini koja odgovara granici kvantifikacije (donji kromatogram).

4.4. MS/MS analiza uzoraka

Prilikom MS/MS analize uzorka primijenjeno je praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple reaction monitoring*, MRM), što je ujedno i najčešći način u rutinskoj tandemnoj spektrometriji masa. Pri ionizaciji elektroraspršenjem, ovisno o pozitivnom ili negativnom načinu rada, nastaju molekularni ioni $[M+H]^+$ ili $[M-H]^-$. Odabir molekularnog iona odvija se u prvom kvadrupolu. Ioni s istim omjerom mase i naboja (m/z) koji odgovara analitu se odabiru, a ioni različitog omjera m/z bivaju uklonjeni. Nakon sudara iona s inertnim plinom u središnjem kvadrupolu, u trećem kvadrupolu se očitava samo omjer m/z , fragmentnih iona, te se prenose na ploču detektora. Dakle, visoka selektivnost tandemne spektrometrije masa temelji se na tvorbi molekularnog iona, odabira iona koji se odvija u prvom kvadrupolu, tvorbe ionskog fragmenta koji se odvija u središnjem kvadrupolu i odabira ionskog fragmenta.

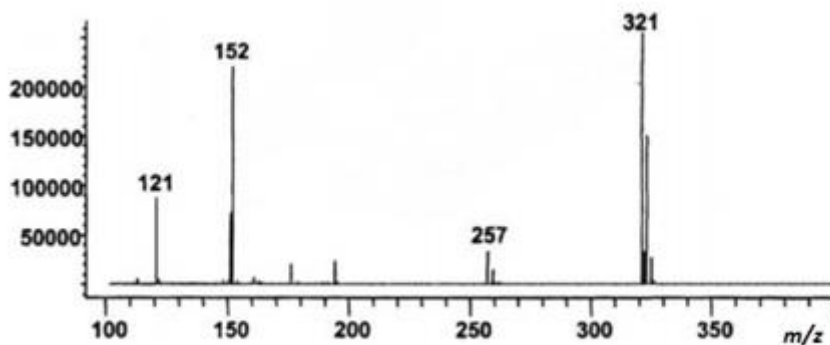
Za analizu sulfonamida korištena je pozitivna ionizacija analita elektroraspršenjem. Za analizu kloramfenikola optimalnom se pokazala negativna ionizacija analita.

Kao što je vidljivo iz Tablice 12. za analit se bilježe dva MRM, pri čemu jedan služi za kvantifikaciju, a drugi koji je uglavnom manje osjetljivosti kao dodatna kontrola kvalitete kojom se dokazuje identitet analita, pa se stoga naziva kvalifikator. Uspoređujući dobivene vrijednosti s literaturnim vrijednostima ionskih tranzicija za kloramfenikol i kloramfenikol – D5 može se zaključiti da gotovo dolazi do njihovih preklapanja. U jednom od literaturnih izvora stoji da vrijednost omjera m/z molekularnog iona kloramfenikola iznosi 321, a njegovi fragmentni ioni nalaze se pri vrijednosti $m/z = 152$ i $m/z = 257$. Molekularni ion kloramfenikola – D5 nalazi se pri vrijednosti $m/z = 326$, a njegovi fragmentni ioni nalaze se pri vrijednosti $m/z = 157$ i $m/z = 262$.²

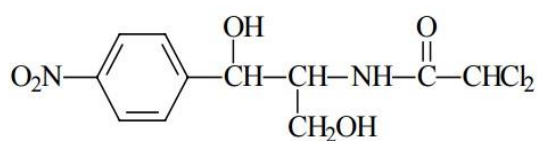
Tablica 12. Ionske tranzicije korištene za kvantifikaciju i potvrdu prisutnosti kloramfenikola i kloramfenikola D-5.

Analit	Molekularni ion (m/z)	Tranzicija iona (m/z)	Vrijeme zadržavanja (min)
Kloramfenikol 1	320,91	151,9	5,14
Kloramfenikol 2	320,91	256,7	5,14
Kloramfenikol-D5 1	325,9	156,9	5,13
Kloramfenikol-D5 2	325,9	261,7	5,13

1 – kvantifikator; 2 - kvalifikator



Slika 13. Spektar masa kloramfenikola i njegova fragmentacija.²⁹



Slika 14. Molekulska struktura kloramfenikola.

Tablica 13. Identifikacija iona dobivenih u spektru masa kloramfenikola i njegove fragmentacije

<i>m/z</i>	Identifikacija iona
321	[M-H] ⁻
257	[M-H-(HCOCl')] ⁻
194	[M-H-(NH ₂ COCHCl ₂ ')] ⁻
176	[<i>m/z</i> 194 - (H ₂ O')] ⁻
152	[O ₂ N-C ₆ H ₄ -CHOH'] ⁻
121	[O ₂ N-C ₆ H ₄ '] ⁻

Prema literaturi u MS/MS spektru sulfadiazina, signal molekularnog iona nalazi se pri vrijednostima omjera mase i naboja $m/z = 251,07$, a signali fragmentnih iona imaju vrijednost $m/z = 156,0$ i $m/z = 92,0$.²⁹ Signal molekularnog iona sulfametazina ima vrijednost $m/z = 279,09$, a signali fragmentnih iona imaju vrijednost $m/z = 92,0$ i $m/z = 156,0$.³⁰ Signal molekularnog iona sulfametoksipiridazina ima vrijednost $m/z = 281,08$, a signali fragmentnih iona imaju vrijednost $m/z = 156,0$ i $m/z = 92,0$.³¹ Signal molekularnog iona sulfadoksina ima vrijednost $m/z = 311,1$, a signali fragmentnih iona imaju vrijednost $m/z = 156,0$ i $m/z = 92,0$.³²

Tablica 14. Ionske tranzicije korištene za kvantifikaciju i potvrdu prisutnosti navedenih sulfonamida i njihovih unutarnjih standarda.

Analit	Molekularni ion (m/z)	Tranzicija iona (m/z)	Vrijeme zadržavanja (min)
Sulfadiazin 1	251,1	156	3,78
Sulfadiazin 2	251,1	92,1	3,77
Sulfametazin 1	279,2	92,1	4,36
Sulfametazin 2	279,2	156	4,36
Sulfametoksipiridazin 1	281,1	155,9	4,32
Sulfametoksipiridazin 2	281,1	92,1	4,32
Sulfadoksin 1	311,2	156,2	4,94
Sulfadoksin 2	311,2	92,1	5,43
Sulfametoksazol 6C13 1 (US1)	260	162	4,95
Sulfametazin 6C13 1 (US2)	285	162	4,36

Oznaka 1 pokraj naziva analita predstavlja ion korišten za kvantifikaciju, dok oznaka 2 predstavlja ion korišten za potvrdu. Oznaka US1 odnosi se na unutarnji standard 1, oznaka US2 na unutarnji standard 2.

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu su primjenom metode standardnog dodatka, ekstrakcije na čvrstoj fazi i analizom na vezanom sustavu određene granice kvantifikacije kloramfenikola i skupine sulfonamida (sulfadiazin, sulfametaun, sulfametoksipiridazin i sulfadoksin) u medu. Određene su granice kvantifikacije za skupinu sulfonamida i kloramfenikol primjenom metode tekućinske kromatografije spregnute s tandemnom spektrometrijom masa primjenom sustava ABSciex Qtrap 4500. Granica kvantifikacije za skupinu sulfonamida iznosi 5 µg/kg, a za kloramfenikol 0,3 µg/kg. Ekstrakcija svih navedenih spojeva na čvrstoj fazi provedena je istovremeno iz homogeniziranih uzoraka meda razrijeđenih acetatnih puferom pH = 7,49. Kao primarni unutarnji standard za kloramfenikol korišten je kloramfenikol D5 pripremljen u acetonitrilu, a unutarnji standardi za sulfonamide pripremljeni također u acetonitrilu bili su sulfametazin 6C13 i sulfametoksazol 6C13.

Skupina navedenih sulfonamida analizirana je u pozitivnom načinu rada, dok je za određivanje kloramfenikola primijenjena negativna ionizacija elektroraspršenjem. Spojevi su kvantitativno analizirani metodom omjera površina vanjskog i unutarnjeg standarda.

Iz uzoraka bagremovog meda uspješno su određeni kloramfenikol, sulfadiazin, sulfametazin, sulfametoksipiridazin i sulfadoksin. Njihova prisutnost je potvrđena analizom ekstrakta sustavom LC-MS/MS praćenjem produkata višestrukih prijelaznih reakcija molekuskog iona. Postignuta iskorištenja imaju visoke vrijednosti te se kreću od 125,00 % do 80,80 % za navedene sulfonamide, dok iskorištenje za kloramfenikol iznosi 84,62 %. Rezultati relativnih standardnih odstupanja (RSD), niži od 10 %, upućuju na dobru ponovljivost metode što čini metodu prikladnom za osjetljivo i pouzdano određivanje sulfonamida i kloramfenikola u različitim uzorcima meda. Nakon što su provjereni validacijski parametri, metoda je primjenjena na 10 realnih uzoraka meda različitih prema podrijetlu i vrsti. Dobivene vrijednosti za skupinu sulfonamida i kloramfenikola niže su od dokazanih granica kvantifikacije (0,3 µg/kg za kloramfenikol i 5 µg/kg za skupinu sulfonamida). Time možemo zaključiti da su ispitivani uzorci meda zdravstveno valjani.

6. LITERATURA

1. Ministarstvo poljoprivrede, *Pravilnik o medu*, Narodne novine, 30/2015.
2. A. Krivohlavek, I. Žuntar, M. Ivešić, I. Mandić Andačić i S. Šikić, *Psychiatr Danub* **26** (2014) 537-545.
3. M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernandez-Lopez and J.A. Perez-Alvarez, *J. Food Sci.* **73** (2008) 117-124.
4. I. Gobin, D. Vučković, D. Lušić, *Medicina fluminensis* **50** (2014) 150-157.
5. M. Blasa, M. Candiracci, A. Accorsi, M. P. Piacentini, M. C. Albertini, E. Piatti, *Food Chemistry* **97** (2006) 217-222.
6. R. S. Vandaryn, V. J. Hurby, *Elsevier* (2006) 449-501.
7. R. Sheridan et al, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 3509–3516.
8. I. Pušić, L. Kozačinski, B. Njari, Ž. Cvrtila, *Meso* **8** (2011) 6.
9. I. P. Y Bruice, *Organic Chemistry 5th*, Prentice Hall (2004) 1068-1120.
10. M. Bulat, J. Geber, Z. Lacković, *Medicinska farmakologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2001.
11. [URL:http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/bakterije-i-antibakterijski-lijekovi/sulfonamidi](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/bakterije-i-antibakterijski-lijekovi/sulfonamidi) (17.08.2015)
12. [URL:http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) (17.08.2015)
13. A. Krivohlavek et al., *Kem. Ind.* **56** (2007) 53-56.
14. European Food Safety Authority (EFSA), *Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed*, EFSA Journal **12** (2014).
15. J.R Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, WILEY (2009) 49-53.
16. [URL:http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf) (14.09.2015)
17. D. A. Skoog, F.J. Holler, T. A. Nieman, *Principles od Instrumental Analysis 5th*, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998.
18. S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley and Sons, New Jersey (2004) 78-97.
19. N.Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2006.
20. [URL:http://www.free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm](http://www.free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (21.09.2015)

21. J. H. Gross, *Mass Spectrometry*, Springer, Heidelberg, 2004.
22. N. Galić, *Spektrometrija Masa*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2004.
23. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry, Principles and Applications 3th*, Wiley, 2007.
24. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina* **45** (2009) 218-232.
25. URL: <http://www.sciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-Multiple-Reaction-1282310.pdf> (01.10.2015)
26. URL:<http://www.drugbank.ca> (15.09.2015.)
27. G.-F. Pang, Y.-Z. Cao, C.-L. Fan, J.-J. Zhang, X.-M. Li, Z.-Y. Li, G.-Q. Jia, *Anal. Bioanal. Chem.*, **376** (2003) 534–541.
28. A. F. Forti, G. Campana, A. Sinonello, M. Multari, G. Scortichini, *Anal. Chem. Acta* **529** (2004) 257-263.
29. T. Pfeifer, *Structural Characterization of Sulfadiazine Metabolites Using H/D Exchange Combined with Various MS/MS Experiments*, *Mass Spectrom* 16 (2005) 1687–1694
30. URL:<http://www.massbank.jp> (21.01.2016)
31. Y. Yamagishi, *Analysis of Sulfonamides in River Water using EQUAN, an Online Concentration Analysis System*, *Thermo Scientific* **435** (2008).
32. URL:<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (21.01.2016)

7. POPIS KRATICA I SIMBOLA

ATP – adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

CAP – kloramfenikol (engl. *Chloramphenicol*)

CI – kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionization*)

EI – elektronska ionizacija (engl. *Electron Impact*)

ESI – elektroraspršenje (engl. *Electrospray Ionization*)

FAB – ionizacija brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment*)

HDL – visoka razina kolesterola (engl. *High density lipoprotein*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LDL – niska razina kolesterola (engl. *Low density lipoprotein*)

MALDI - matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix-assisted laser desorption ionization*)

MRM - praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple reaction monitoring*)

MS – spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*)

MS/MS – dvojna spektroskopija masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*)

PABA – paraaminobenzojeva kiselina (engl. *Para-aminobenzoic acid*)

QQQ – trostruki kvadropul (engl. *Triple Quadrupole*)

Q-TOF – hibridni spektrometar masa (engl. *Quadrupole – Time of flight*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

SAS – sulfonamidi (engl. *Sulfonamides*)

50 S – ribosomska jedinica uključena u stvaranje peptidne veze uz pomoć peptidil transferaze

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*)

SRM – praćenje odabrane reakcije (engl. *Solid phase extraction*)

t_R – vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

US – unutarnji standard

UV – ultraljubičasto zračenje (engl. *Ultraviolet*)

WHO – svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 01. lipnja 1990. godine u Požegi. Osnovnu školu završila sam 2005. godine u Kutjevu i iste godine upisala Opću gimnaziju u Požegi. Maturirala sam 2009. godine, te iste godine upisala preddiplomski studij kemije na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, te sam 2013. godine stekla akademski stupanj prvostupnice kemije. Iste godine upisala sam diplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, istraživački smjer, grane biokemija i analitička kemija.