



Универзитет Свети Кирил и Методиј во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје
Школа за докторски студии
Безбедност на храна

Докторска дисертација

**„МУЛТИРЕЗИДУАЛНА АНАЛИЗА НА АНТИБИОТИЦИ ВО МЛЕКО СО
ПРИМЕНА НА LC-MS/MS МЕТОД“**

м-р Ѓулаи Алија

Ментор: проф. д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу

Скопје, 2021

Ментор: Проф. д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу, редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје

Лабораториските истражувања во оваа докторска дисертација беа изработени во Лабораторијата за резидуи и контаминенти при Институтот за храна на Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Благодарност

Бескрајна и огромна благодарност до мојата менторка проф. д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу за нејзината безрезервна поддршка, како и охрабрувањето за време на сите неочекувани ситуации. Ми беше вистинско задоволство да соработувам со научник и професионалец во текот на изработката на оваа докторска дисертација.

Благодарност до проф. д-р Велимир Стојковски за корисните совети при истражување на литературата во изработката на докторската дисертација.

Благодарност до проф. д-р Павле Секуловски за воведувањето во областа на научните истражувања и правилното насочување во изработката на трудот.

Благодарност до проф. д-р Деан Јанкулоски за неговите стручни сугестии и за неговиот голем научен придонес во изработката на оваа дисертација.

Благодарност до проф. д-р Радмила Чрчева за нејзината професионална поддршка при реализација на докторската дисертација.

Неизмерна благодарност до доц. д-р Ристо Узунов за искрената соработка, несебичната помош и безрезервната поддршка во текот на целокупното мое стручно и научно усовршување при изработката на докторската дисертација.

Огромна благодарност до Факултетот за ветеринарна медицина – Скопје при Универзитетот „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје што ми овозможи да го реализирам ова истражување.

Најтопла и неизмерна благодарност до моите родители и мојата свекрва за нивната доверба и храброст што ми овозможија да ја завршам оваа дисертација.

На крај најголема благодарност до моето семејство сопругот Илир, ќерката Мерве и синот Мерван, кои несебично и во целост ме поддржуваат, како во текот на докторските студии така и при изработката на овој труд и ми се постојана мотивација и инспирација за остварување на моите лични цели во областа на науката.

МУЛТИРЕЗИДУАЛНА АНАЛИЗА НА АНТИБИОТИЦИ ВО МЛЕКО СО ПРИМЕНА НА LC-MS/MS МЕТОД

ИЗВАДОК

Антибиотиците се употребуваат кај домашните животните за терапија и превенција на одредени заболувања, а во некои случаи се користат како промотори на раст поради тоа што ја подобруваат ефикасноста и искористувањето на храната. Несодветната употреба и апликација на овие лекови може да резултира со присуство на нивни остатоци во млекото, месото, јајцата и внатрешните органи. Последиците од остатоците на антибиотиците во храната од животинско потекло, можат сериозно да влијаат врз здравјето на луѓето што може да резултира со појава на алергиски реакции, резистенција на патогени микроорганизми, нарушување на нормалната микрофлора во организмот, канцерогено влијание, а покрај тоа во млечната индустрија ја инхибираат бактериската ферментацијата и негативно влијаат врз квалитетот на крајниот производ. Поради сите претходно наведени несакани ефекти потребен е постојан мониторинг и контрола на присуството на антибиотиците во храната од животинско потекло со цел да се стави во промет храната која ги одржи истите. За таа цел потребно е да се развијат соодветни прецизни, точни, селективни и сензитивни аналитички методи кои ги детектираат овие супстанции. Целта на оваа дисертација беше да се развие LC-MS/MS метод за детекција на антибиотици од повеќе класи во сурово млеко. Во истражувањето беа оптимизирани хроматографските услови, условите на масениот детектор, методот за екстракција, методот беше валидиран, а исто така беше направена и рутинска анализа на 400 примероци сурово млеко.

Од добиените резултати може да се заклучи дека методот е соодветен за анализа на 23 антибиотици во сурово млеко. Методот е точен, прецизен, селективен и специфичен, што може да се заклучи од параметрите за валидација: линеарност, селективност/специфичност, LOD, LOQ, CC α , CC β , точност и прецизност кои се во согласност со критериумите пропишани во Одлуката на Комисијата 2002/657/EC. Од вкупно испитани 400 примероци сурово млеко, антибиотици беа детектирани во 21 примерок (5.25 %). Концентрациите на антибиотиците беа во рамки на дозволените MRL граници, што значи дека ниеден од примероците не содржеше антибиотик над пропишаната вредност. Како резултат на горенаведеното може да заклучиме дека

методот може да се користи во рутинска анализа, при што контролата на млекото, како и на другата храна од животинско потекло мора да биде постојана, со цел да се заштити јавното здравје.

Клучни зборови: антибиотици, сурово млеко, оптимизација, валидација, LC-MS/MS

MULTI-RESIDUAL ANALYSIS OF ANTIBIOTICS IN MILK USING LC-MS/MS METHOD

ABSTRACT

Antibiotics are used in domestic animals to treat and prevent certain diseases, and in some cases are used as growth promoters because they improve the efficiency and utilization of food. Inadequate use and application of these drugs can result in the presence of their residues in milk, meat, eggs and internal organs. The effects of antibiotic residues in food of animal origin can seriously affect human health which can result in allergic reactions, resistance to pathogenic microorganisms, disruption of the normal microflora in the body, carcinogenic impact, and in addition to the dairy industry inhibit bacterial fermentation and adversely affect the quality of the final product. Due to all the previously mentioned side effects, it is necessary to constantly monitor and control the presence of antibiotics in food of animal origin in order to place on the market the food that maintains them. To this purpose, it is necessary to develop appropriate precise, accurate, selective and sensitive analytical methods for detection of these substances. The aim of this dissertation was to develop an LC-MS / MS method for the detection of multi-class antibiotics in raw milk. In the study were optimized the chromatographic conditions, the conditions of the mass detector, the extraction method, after that the method was validated, and a routine analysis of 400 samples of raw milk was also performed.

From the obtained results it can be concluded that the method is suitable for the analysis of 23 antibiotics in raw milk. The method is accurate, precise, selective and specific, which can be concluded from the validation parameters: linearity, selectivity / specificity, LOD, LOQ, CCA, CC β , accuracy and precision which are in accordance with the criteria prescribed in the Commission Decision 2002 / 657 / EC. A total of 400 raw milk samples were tested. Antibiotics were detected in 21 samples (5.25%). Antibiotic concentrations were within the permitted MRLs, meaning that none of the samples contained an antibiotic above the prescribed value. As a result of the above we can conclude that the method can be used in routine analysis, and the control of milk, as well as other foods of animal origin must be constant, in order to protect public health.

Keywords: antibiotics, raw milk, optimization, validation, LC-MS / MS

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

Кратенка	Значење на кратенка / Превод
ACN	Acetonitrile / Ацетонитрил
CC α	Decision Limit / Лимит на одлучување
CC β	Decision Capability / Способност за детекција
CV	Кофициент на варијација
СТДМ	Стандарди во матрикс
EC	European Commission / Европска Комисија
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid / Етилемдиаминотетраоцетна киселина
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESI	Electrospray ionization / Јонизација со електроспреј
FDA	Food and Drug Administration / Управување со храна и лекови
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry / Гасна хроматографија со масена спектрометрија
HPLC	High pressure liquid chromatography / Високоефикасна течна хроматографија
LLE	Liquid-liquid extraction / Течно-течна екстракција
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry / Течна хроматографија со тандем масена спектрометрија
MeOH	Metanol / Метанол
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry / Тандем масена спектрометрија
MRL	Maximum Residue Limit / Максимално ниво на остатоци
MRM	Multiple Reaction Monitoring / Следење на повеќе кратна реакција
UPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography / Ултра високо ефикасна течна хроматографија
WHO	World Health Organization / Светска здравствена организација
PCM	Република на Северна Македонија
CI	Chemical ionization / Хемиска јонизација
m/z	Маса / полнеж
$\mu\text{g/kg}$	Микрограм / килограм
EY	Европска Унија
Сор.	Соработници

СОДРЖИНА

1	ВОВЕД	1
2	ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА	4
2.1	Историски осврт	4
2.2	Антимикробни средства	5
2.2.1	Антибиотици.....	6
2.3	Употреба на антибиотици кај домашните животни.....	22
2.4	Остатоци од антибиотици во млеко	25
2.5	Несакани ефекти кај луѓето и во млечната индустрија.....	26
2.6	Контрола на остатоци од антибиотици, законски регулативи и MRL	28
2.7	Аналитички методи за определување на остатоци од ветеринарни лекови.....	31
2.7.1	Скрининг методи за определување на антибиотици во млеко.....	32
2.7.2	Потврдни методи за определување на антибиотици во млеко.....	34
3	ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	39
4	МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ	40
4.1	Примероци за анализа.....	40
4.2	Реагенси и растворувачи	Error! Bookmark not defined. 41
4.3	Стандарди.....	41
4.4	Лабораториска опрема	41
4.5	Подготовка на раствори.....	42
4.6	Подготовка на стандардни раствори	43
4.7	LC-MS/MS метод.....	44
4.8	Оптимизација на процедурата за екстракција	45
4.9	Подготовка на примероци млеко	46
4.10	Валидација на методот.....	47
5	РЕЗУЛТАТИ	53
5.1	Оптимизација на LC-MS/MS методот	53
5.2	Оптимизација на процедурата за екстракција на аналитите од примерокот.....	54
5.3	Валидација на методот.....	55
5.3.1	Линеарност на методот	55

5.3.2	Специфичност и селективноста на методот	58
5.3.3	LOD, LOQ, CС α и CС β	59
5.3.4	Точност и прецизност на методот	60
5.4	Анализирани примероци	64
6	ДИСКУСИЈА	68
6.1	Оптимизација на LC-MS/MS методот	68
6.2	Оптимизација за подготовка на примерокот од сурово млеко	71
6.3	Линеарност на методот	76
6.4	Селективност/специфичност.....	76
6.5	LOD, LOQ, CС α и CС β	77
6.6	Точност и прецизност на методот	79
6.7	Анализа на примероци.....	81
7	ЗАКЛУЧОК.....	85
8	КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	87

1. ВОВЕД

Потрошувачите на храна треба да бидат сигурни во исправноста на храната што ја конзумираат, односно дека храната е безбедна, поради што од значителна важност е безбедното чување и преработката на храната, како и заштита на храната од можна контаминација. Контаминентите во храната може да бидат физички, микробиолошки или хемиски. Физички контаминенти се оние кои може да се видат со голо око и овде се вклучени минерали како што се почва, камења, потоа маснотии, парчиња стакло, пластика, накит и сл. Хемиските контаминенти вклучуваат ветеринарно-медицински препарати кои вклучуваат антибиотици, хормони, промотори на раст и сл., како и други остатоци кои може да бидат како резултат на третман на животните со овие препарати или како резултат на контаминирана храна која што ја конзумираат, а исто така контаминентите може да потекнуваат од околината (пестици, микотоксини, тешки метали). Во табела 1 прикажан е детален преглед на најчестите хемиски контаминенти/опасности по безбедноста на храната.

Хемиски контаминенти/опасности	Подкатегории
Агрохемиски	Ветеринарни лекови, пестициди, хербициди, хормони, фунгициди, вештачки ѓубрива
Контаминенти од околината и индустријата	Тешки метали, полихлорирани бифенили, диоксини, полициклични ароматични, јаглеводороди, радионуклиди
Опасности предизвикани при процесирање и чување на храната	Хемиски опасности произведени од топлина (акриламид, фуран, хетероцикличен ароматичен амини, полициклични ароматични јаглеводороди, N-нитрозамини, деградациони производи од липиди). Хемиски опасности произведени при нетермичка обработка и складирање (етил карбамат)
Опасности поради пакување на храната	Мономери (винил хлорид, стирен, акрилонитрил), пигменти (олово), пластификатори (фталати), други (бисфенол А, полукарбазид)
Алергени	Главни алергени од храна (млеко, кикирики, јајце, соја)
Природни токсини	Микотоксини, растителни токсини, морски токсини
Неконвенционални хемиски опасности	Меламин

Табела 1. Хемиски контаминенти/опасности во храна (Kumar, 2014)

Микробиолошките загадувачи вклучуваат микроорганизми како што е различни видови бактерии, габи, нивни метаболити и сл.

Антибиотиците и сулфонамидите се фармаколошки супстанции кои во ветеринарната медицина се употребуваат во терапевтски цели, во превенција на одредени заболувања и во некои случаи и како промотори на раст (Wang и сор., 2012; Yarsan, 2012; Nisha, 2008; Furgasa и Beuene, 2018). По употребата на антибиотиците кај домашните животни истите се излачуваат од организмот одреден временски период, па доколку не се почитува каренцата од страна на фармерите, истите може да се најдат како остатоци во млекото. Освен каренцата, нивоата на концентрации на остатоци од антибиотици во голема мера зависат и од дозата и начинот на апликација (Abebew и сор., 2014; Jayalakshmi и сор., 2017). Остатоките од ветеринарни лекови претставуваат опасност по здравјето на луѓето заради тоа што може да предизвикаат голем број на несакани ефекти, како што се различни видови на алергиски реакции, создавање на бактериска резистенција поради што истите стануваат неефикасни при понатамошните терапии, а исто така дел од нив имаат канцерогени, мутагени и тератогени својства. Како еден од почестите несакани ефекти може да се спомене преосетливоста на пеницилин, за што е познато дека 5-10% од популацијата е преосетлива на пеницилинот во концентрација од 1 µg/kg. При употреба на пеницилинот кај преосетливите пациенти се јавуваат алергиски реакции и тоа кожни осипи, уртикарии, астма и анафилактичен шок. Антимикробната резистенција, исто така е еден од најчестите несакани ефекти, па поради тоа, многу земји вклучувајќи ги и земјите во ЕУ, ја забранија употребата на антимикробни соединенија, како промотори на раст, со што се намалува овој несакан ефект (Amol и сор., 2015; Khaskheli и сор., 2018). Освен негативните ефекти по јавното здравје, остатоките од антимикробните супстанции претставуваат и сериозен проблем во млечната индустрија при производство на ферментирани млечни производи (јогурт, путер, сирење и сл.) поради тоа што ја инхибираат бактериската ферментацијата и негативно влијаат врз квалитетот на крајниот производ (Bayou и Haile, 2017). Поради појавата на несакани ефекти, воведена е строга контрола на храната, во однос на присуство на ветеринарни лекови, вклучително и контрола на присуство на антибиотици во млеко. Утврдувањето на остатоките од антибиотици во млеко, како и остатоките од другите ветеринарни лекови, се врши со употреба на различни методи за определување, со што се овозможува постојана заштита на јавното здравје. Максималната дозволена концентрација на антибиотици во храна од животинско потекло е регулирана со Европската Регулатива 37/2010/ЕС, а истата е прифатена и од страна на Агенција за храна и ветеринарство на РСМ.

Контролата и мониторингот на остатоците од антибиотиците во храната од животинско потекло во ЕУ е регулирана преку Директивата 96/23/EC (Council Directive 96/23/EC) со која се утврдени контролните механизми и мерките за следење на одредени супстанции и остатоците од истите кај живи животни и производи од животинско потекло. Контролата на остатоци од ветеринарни лекови, вклучително и остатоци од антибиотици во млекото во РСМ е опфатена со националната мониторинг програма и е уредена со посебен Правилник (Правилник за начинот на вршење на мониторинг и контрола на присуството на резидуи и контаминенти во живите животни и храната од животинско потекло, 2011). Лабораториите за тестирање и аналитичките методи за тестирање примероци од синцирот на храна и добиточна храна го формираат јадрото на таквите контролни програми при што обезбедуваат докази за регулаторните тела да донесуваат одлуки. Како резултат на широката употреба на антибиотици при терапија на одредени заболувања или како промотори на раст, се јави потреба за брз развој на аналитички методи за определување на овие соединенија во храната. Аналитичките методи треба да обезбедуваат висока селективност и специфичност, висока точност, прецизност, робусност и достапност. Аналитичките методи кои се користат за определување на остатоци од антибиотици во храната можат да се класифицираат во две главни групи, и тоа: скрининг методи и потврдни методи. Критериумите за изведување на аналитичките методи за анализа на остатоци од ветеринарни лекови се пропишани во Одлуката на Комисијата 2002/657/EC (Commission Decision 2002/657/EC).

2. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА

2.1 Историски осврт

Денес живееме во ера на широко достапни антибиотици, со кои се справуваме со могу инфекции. Но, може да се претпостави дека, во периодот пред нивното воведување, голем дел од луѓето инфицирани со некој патоген, на крајот им подлегнувале на инфекциите. Но, ова очигледно не е така, бидејќи секогаш имало преживевани дури и од најсмртоносните инфекции, како што се дифтерија, туберкулоза, тифус итн., благодарение на ефикасноста на вродениот имунолошки одговор. Сепак, стапките на смртност некогаш биле многу повисоки отколку денес (Gould, 2016). Пред појавата на хемиските препарати во борба против бактериските инфекции предизвикани од патогените микроорганизми, се користеле препарати добиени од растенија и габи, мед, па дури и измет од животинско потекло. Еден од поуспешните третмани бил локална примена на мувлосан леб, со многу референци за неговите корисни ефекти од антички Египет, Кина, Србија, Грција и Рим (Gustafson и Bowen, 2017; Gould, 2016).

Пиоцијаназата се смета за првиот антибиотик што се користел за лекување инфекции кај луѓето. Emmerich и Oscar во почетокот на 20th век откриле дека зелените бактерии кои се изолирани од завоите на повредени пациенти го инхибираат растот на другите микроби. Имено тие продуцирале раст на микроорганизмот *Pseudomonas aeruginosa* во серии и супернатантот го користеле како лек, а лекувањето било со различен успех, поради што пиоцијаназата не доживеала вистинска клиничка употреба. Во 1909 година Ehrlich и неговиот тим го пишувале концептот „магични куршуми“ за третман на сифилис, со салварсан - хемикалија базирана на арсен. Терапијата со салварсан се покажала како ефикасен третман за сифилис и веројатно салварсанот бил првиот вистински модерен антимикробен агенс, иако не бил антибиотик во строга смисла на зборот. Во 1928 година Alexander Fleming го открил првиот природен антибиотик пеницилин од габата *Penicillium notatum*, која го инхибирала растот на стафилококи на агарните плочи, а при понатамошната употреба покажала ефикасност против голем број бактерии. Модерната ера на антибиотската терапија започнала во 1935 година со клиничка употреба на сулфонамидот пронтосил, кој се смета за првиот синтетички антибиотик со широка активност против Грам-позитивните бактерии (Salih, 2006; Virolainen, 2012).

Од воведувањето на сулфонамидите во 1930-тите, а подоцна и пеницилинот во 1940-тите, драматично се намалила смртноста од заразни болести. Инспирирани од првичниот успех научниците вложиле огромни напори во потрага по нови антибиотици. Во 1944 година од микробиолог Waksman бил изолиран уште еден антибиотик, стрептомицинот од *Streptomyces griseus*. Стрептомицинот бил првиот антибиотик кој се користел за лечење на туберкулоза. Во 1956 година, првиот цефалоспорински антибиотик кој е тесно поврзан со пеницилините бил изолиран од видот на габи *Acremonium*. Шестчлениот дихидротиазински прстен споен со четиричлен β -лактамски прстен е одговорен за биолошката активност на оваа група соединенија. Тетрациклините се друга важна група на антибиотици кои биле воведени од Duggar (1948) кој го изолирал хлортетрациклинот од почвените бактерии *Streptomyces aureofaciens*, а истата година Gottlieb изолирал нов антибиотик со широк спектар на дејство од почвената бактерија *Streptomyces venezuelae* и го нарекол хлорамфеникол (Berendsen, 2013). Налидиксичната киселина била достапна за клиничка употреба во 1967 година, иако нејзина употребата била ограничена на некомплицирани третмани на уринарни инфекции. Развојот на флуорокинолоните продолжил подоцна, при што ципрофлоксацинот бил воведен во средината на 1980-тите, но многу други нови кинолони или не успеале да станат клинички достапни или биле повлечени како резултат на несакани ефекти при нивното воведување (Gould, 2016). Сепак, бактериите пронашле начини да им се спротивстават на многу од овие антибиотици и со тоа создале глобален медицински проблем. За жал, со несоодветна и неодговорна употреба на антибиотиците се појавува способност на бактериите да ја заобиколат нивната ефикасност, односно стануваат резистентни кон одреден антибиотик (Makut и Owolewa, 2011; Yoneyama и Katsumata 2006).

2.2 Антимикробни средства

Хемотерапевтски или антимикробни средства се лекови, односно природни, полусинтетички или синтетички хемиски супстанции кои после апсорпцијата во организмот на животните и луѓето имаат способност да ги уништат или да го спречат растот и размножувањето на патогените микроорганизми (бактерии, габи, протозои, вируси). При употребата антимикробните лекови не делуваат токсично на организмот на домаќинот.

Главниот концепт на антимикробната терапија е:

- Селективната токсичност само кон патогените микроорганизми, без да предизвикаат позначајни штети на организмот кој ги прима;
- Да бидат доволно хемиски стабилни, без да се намали терапевтскиот ефект;
- Фармакокинетиката треба да биде доволно бавна за да овозможи дефинирање на соодветен режим на дозирање (Yarsan, 2012; Велев, 2013).

Антимикробните средства се делат на природни соединенија добиени од живи организми, на пример тетрациклините добиени од бактериите и пеницилините добиени од габите, но почесто соединенија се добиени по полусинтетички пат, како што е амоксицилин или по синтетички пат, на пример сулфонамидите и флуорокинолоните. Во зависност од микроорганизмите на кои делуваат антимикробните лекови се делат во неколку групи: антибактериски, антимикотични, антивирусни, антипротозоични и антихелмитични лекови (Virolainen, 2012).

Во хемиски поглед антимикробните лекови претставуваат хетерогени групи на мали органски молекули со ист механизам на дејство и сличен спектар на антимикробна активност. Лекување или спречување на микробните инфекции со антимикробните лекови го сочинуваат хемотерапевтскиот триаголник кој ги вклучува сложените врски меѓу живиот домаќин, заразниот патоген и лекот (Makut и Owolewa, 2011).

2.2.1 Антибиотици

Прв пат терминот „антибиотик“ бил воведен од Waksman во 1942 година и истиот означува супстанца добиена од еден микроорганизам која инхибира раст и/или уништува друг микроорганизам. Денес терминот „антибиотици“ ги вклучува и синтетичките соединенија како што се сулфонамидите и кинолоните (Yoneyama и Katsumata, 2006).

Антибиотиците се соединенија со мала молекулска маса добиени од живи микроорганизми (различни видови на габи, мувли и бактерии) кои во ниска концентрација се способни да ги убијат или да го инхибираат растот или опстанокот на еден или повеќе видови на микроорганизми. Покрај природните постојат и полусинтетички и синтетички антибиотици (Salih, 2006; Makovec и сop., 2014).

Антибиотиците и сулфонамидите се фармаколошки супстанции кои можат целосно да го уништат клеточниот сид на патогените микроорганизми (бактерициди) или да го спречат

нивниот раст или размножување (бактериостатици), без притоа да делуваат токсично на организмот кој ги прима. (Etebu и Arikekpar, 2016).

➤ Класификација на антибиотиците

Антибиотиците може да се класифицираат на повеќе начини, а најчесто се делат според антимикробниот спектар на дејствување, начинот на делување врз бактериите, според механизмот на дејствување, според хемиската структура и според видот на микроорганизмите на кои дејствуваат (Etebu и Arikekpar, 2016; Khan, 2018; Ullah и Ali, 2017; Adzitey, 2015).

Според антимикробниот спектар на дејство антибиотиците се делат на антибиотици со тесен спектар на дејство и антибиотици со широк спектар на дејство, во зависност од опсегот на бактериски видови кои се подложни на овие агенсии. Антибиотиците со тесен спектар на дејство го спречуваат растот и размножувањето само на еден или неколку видови бактерии, како што се пеницилините кои делуваат исклучиво на Грам-позитивни бактерии или полимиксини кои делуваат само на Грам-негативни бактерии. Антибиотици со широк спектар на дејство дејствуваат на повеќето Грам позитивни и Грам негативни бактерии, но и на други видови на микроорганизми. Во оваа група спаѓаат тетрациклините кои делуваат на Грам-позитивни бактерии и на Грам-негативни бактерии, рикеции, микоплазми.

Според начинот на делување врз бактериите антибиотиците се делат на бактерициди кои претставуваат лекови кои ги убиваат бактериите (бета-лактами, хинолони, аминогликозиди, нитроимидазоли) и бактериостатици кои претставуваат лекови кои го инхибираат растот и размножувањето на бактериите (тетрациклини, макролиди, сулфонамиди, триметоприм). Често пати, во доволно високи концентрации, антимикробниот лек покажува и бактериостатско и бактерицидно дејство.

Според механизмот на делување антибиотиците се делат на антибиотици кои ја спречуваат синтезата на клеточниот сид, антибиотици кои ја спречуваат синтезата на протеините, антибиотици кои ја спречуваат синтезата на нуклеинските киселини и антибиотици кои вршат инхибиција на ензимите вклучени во синтезата на фолатите. Антибиотиците кои ја спречуваат синтезата на клеточниот сид го оштетуваат клеточниот

сид или ја инхибираат неговата синтеза, односно го спречуваат создавањето на пептидогликанот во клеточниот сид на патогенот. Инхибицијата се манифестира со активирање на ензими кои ги раскинуваат врските на пептидогликанот, што доведува до деградација на сидот и целосно распаѓање (лизирање) на бактериите. Во оваа група припаѓаат: пеницилините и цефалоспорините. Антибиотиците кои ја спречуваат синтезата на протеините се врзуваат за 30S и 50S субединиците на рибозомите, органели во кои се врши синтезата на протеините. Во оваа група припаѓаат: стрептомицин, гентамицин, хлорамфеникол, тетрациклините и еритромицинот. Антибиотиците кои ја спречуваат синтезата на нуклеинските киселини ги деградираат молекулите на DNA и RNA или се врзуваат за ензими кои помагаат во репликација на DNA, како на пример DNA полимеразата. Во оваа група спаѓаат рифампицинот и хинолоните. Антибиотици кои вршат инхибиција на ензимите вклучени во синтезата на фолатите го блокираат создавањето на пурилот и синтезата на нуклеинските киселини. Во оваа група спаѓаат сулфонамидите и триметопримот. Организмите чувствителни на сулфонамиди не можат да користат фолати од околината, туку мораат да ги синтетизираат од парааминобензоевата киселина. Сулфонамидите се структурни аналози на парааминобензоевата киселина, кои ја инхибираат дихидроптероат синтазата, а со тоа и синтезата на фолати. Триметопримот селективно ја инхибира бактериската редуктаза на дихидрофолната киселина, а со тоа и формирањето на тетрахидрофолната киселина, со што се спречува синтезата на пурин и на крајот синтезата на DNA (слика 1).

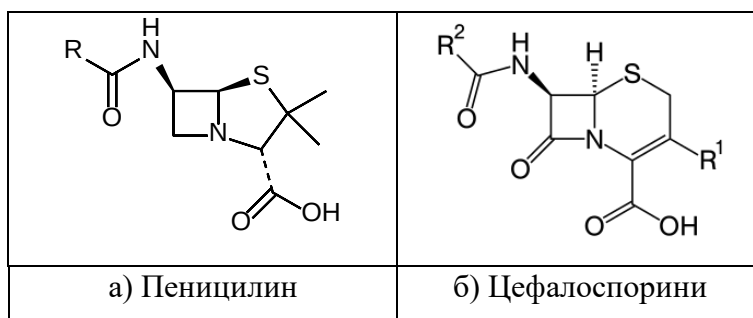


Слика 1. Механизам на делување на антимикробните лекови

Според нивната хемиска структура, секоја класа на фармацевтски препарати се карактеризира со типична јадрена структура, односно членовите на оваа класа се диференцираат со додавање или отстранување на секундарните хемиски структури од основната структура.

➤ β -лактамски антибиотици

Овие група антибиотици се најшироко користени антимицробни лекови во ветеринарната медицина. Заедничка карактеристика на оваа група е β -лактамскиот прстен (четири член цикличен амид) и механизмот на делување (инхибиција на синтеза на клеточниот сид). Во ова група на антибиотици спаѓаат пеницилините, цефалоспорините, карбапенемите, монобактамите и трибактамите. Примарната разлика во структурата помеѓу пеницилините и цефалоспорините е прстениот систем споен со лактамскиот прстен, кој кај пеницилините е петчлен тиазолиден прстен, а кај цефалоспорините е шестчлен дихидротиазински прстен (Слика 2, а и б). Носител на антибактериската активност е β -лактамскиот прстен, но разните терапевтски ефекти и физичко-хемиските особини на антибиотиките зависат од природата на радикалите врзани за јадрото (Wang и сор., 2012). β -лактамите се хемотерапевтици кои делуваат бактерицидно, поточно основниот механизам на делување преставува инхибиција на биосинтезата на пептидогликанот неопходен за обезбедување на јачина и ригидност на бактерискиот клеточен сид. Некои бактерии може да синтетизираат β -лактамази, ензими кои со хидролиза го разградуваат β -лактамскиот прстен, поради што доаѓа до инактивација на антибиотикот (Martinez-Huelamo и сор., 2009; Virolainen, 2012; Amaty, 2010).



Слика 2. Хемиска структура на β -лактамите

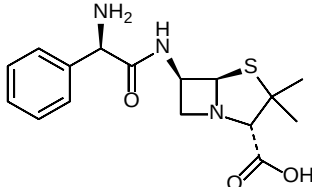
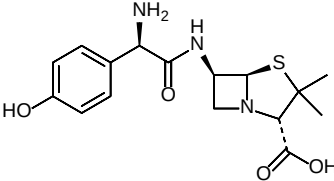
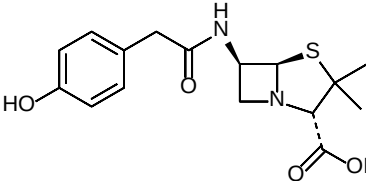
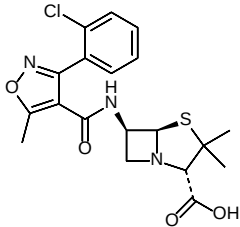
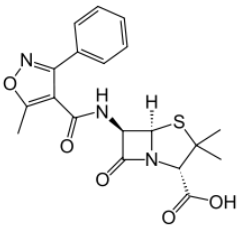
➤ Пеницилини

Хемиска структура, претставници и добивање. Сите пеницилини имаат заедничко јадро 6-аминопеницилинска киселина составена од β -лактамски и тиазолидински прстен. Голем број на пеницилини се добиени по полусинтетички пат и по синтетички пат од различните видови на *Penicillium notatum* и *P. chrysogenum* (Wang и соp., 2012).

Класификација на пеницилините:

- Пеницилини со тесен спектар на дејство: природни пеницилини (пеницилин Г кој претставува бензилпеницилин, пеницилин В), депо пеницилини (прокаин пеницилин Г), пеницилини за перорална употреба (пеницилин В, пропицилин) и антистафилококни пеницилини (оксацалин, клоксацалин, диклоксацалин);
- Пеницилини со широк спектар на дејство: ампицилин, амоксицилин, хетацалин, талампицилин);
- Антипсеудомонас пеницилини: карбоксипеницилини (карбепеницилин, тикарцилин) и уреидопеницилини (азлоцилин, пиперацилин);
- Пеницилини активни против ентеробактерии: амидопеницилини (мецилинам); и
- Пеницилаза резистентни пеницилини: метицилин, нафцилин, оксацилин, клоксацилин, диклоксацилин и мецилинам (Cupic и соp., 2014; Allen и соp., - British National Formulary 2012).

На слика 3 се прикажани хемиските формули на некои најчесто користени пеницилини.

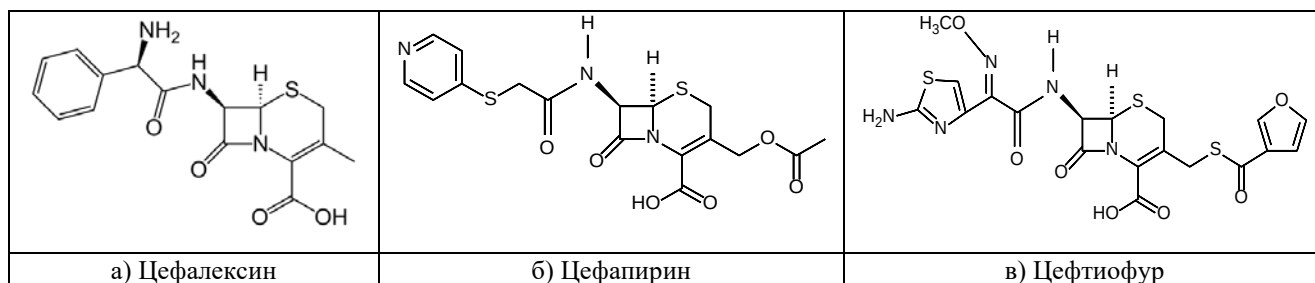
		
а) Ампицилин	б) Амоксицилин	в) Бензилпеницилин
		
г) Клоксацилин	д) Оксацилин	

Слика 3. Хемиски формули на најчесто употребуваните пеницилини

Спектар на делување. На повеќето пеницилини чувствителни се *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Borrelia* spp., *Leptospira* spp., *Haemophilus* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp. (Preston и соp. 2006; Cupic и соp., 2014).

➤ Цефалоспорини

Хемиска структура, преставници и добивање. Цефалоспорините се природни или полусинтетични β -лактамски антибиотици добиени од габите *Cephalosporium*. Првиот цефалоспорин е изолиран во 1945 година од габата *Cephalosporium acremonium*. Нивното јадро се состои од шестчлен дихидротиазински прстен (7-аминоцефалоспоранска киселина) врзан за β -лактамскиот прстен. Предностите на полусинтетиските цефалоспорини резултирале од нивна активност кон резистентните микроорганизми, зголемена киселинска стабилност, подобри фармакокинетички карактеристики, проширување на антибактериски спектар и намалена алергиска реакција (Berendsen, 2013; Etebu1 и Arikekpar, 2016; Botsoglou и Fletouris, 2001; Велев, 2013). Цефалоспорините се поделени во четири генерации во зависност од времето на нивното добивање, антибактерискиот потенцијал и спектарот на дејство. Најважните цефалоспорини се цефалексин, цефтиофур и цефапирин (Слика 4, а-в) (Amatya, 2010; Botsoglou и Fletouris, 2001).



Слика 4. Хемиска структура на најчесто употребуваните цефалоспорини

Спектар на делување. Цефалоспорините се антибиотици со широк спектар на дејство и делуваат на многу Грам⁺ и Грам[−] бактерии: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Haemophilus influenza*, *Enterobacter aerogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pseudomonas*

aeruginosa, стрептококи, пнеумококи, стафилококи, некои бактерии од родот *Neisseria* (Etebu и Ariekpar, 2016; Cupic и sor., 2014).

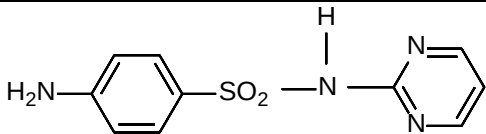
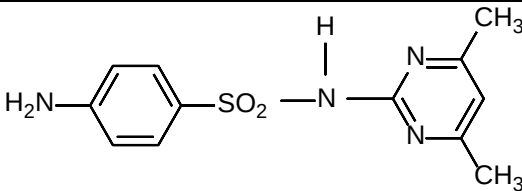
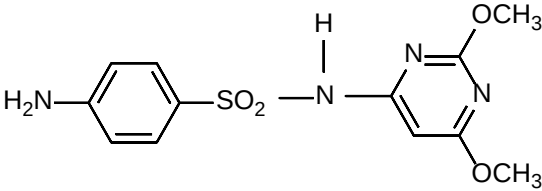
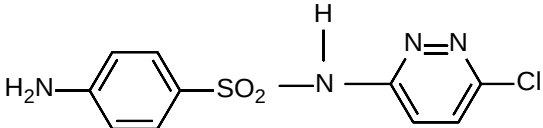
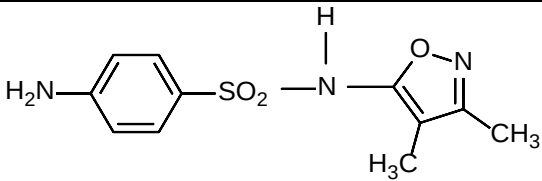
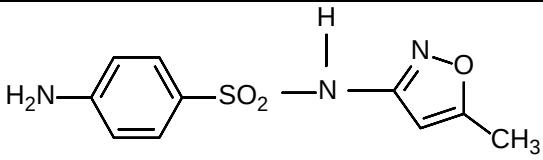
Фармакодинамика. Антибактериската активност на β -лактамските антибиотици се должи на селективната инхибиција на синтезата на бактерискиот клеточен ѕид, односно инхибиција на бактерискиот ензим транспептидаза неопходен за изградба на пептидогликанот во клеточниот ѕид на патогенот. Инхибицијата се манифестира со активирање на ензими кои ги раскинуваат врските на пептидогликанот, што доведува до деградација на ѕидот, без кој бактеријата не може да опстане. Нарушената синтеза на ѕидот ги спречува бактериите да го одржуваат осмотскиот градиент помеѓу клетката и околината, така што клетката набабрува и пука (Marilena, 2015; Botsoglou и Fletouris, 2001, Berendsen, 2013).

Фармакокинетика. Растворливоста зависи од природата на ацилниот дел од страничниот синџир и од природата на катјоните кои се составен дел на беталактамските антибиотици кои се среќаваат во облик на соли. Натриумовите и калиумовите соли лесно се раствораат во вода и се абсорбираат после орална или парентерална апликација. Како киселини не се погодни за орална или парентерална апликација. Се администрираат перорално и максималната концентрација во плазмата ја достигнуваат за околу 2 часа. Оралната доза се повторува во интервал од 6 часа, поради екстензивната елиминација во непроменет облик преку бубрезите со активна тубуларна секреција. Пеницилините со неполярни и липофилни субституенти и повеќе од 90% се врзани за протеините, додека пак оние со помалку сложен ацил групи (бензилпеницилин) покажуваат врзување од 30-60%. Се смета дека протеинското врзување ја ограничува ткивната расположливост на антибиотикот и се намалува дистрибуцијата. Се излачуваат од организмот преку реналниот транспортен систем на анјони (Padol, 2015; Botsoglou и Fletouris, 2001).

➤ Сулфонамиди

Хемиска структура, претставници и добивање. Сулфонамидите се група на синтетички антибиотици кои се откриени од страна на G. Domagk во 1929 година, од кога практично и се употребуваат. Имено сулфонамидите и денес во ветеринарната медицина се користат за профилактички и терапевтски третман на бактериски и протозоални инфекции. Сулфонамидите делат заедничко хемиско јадро кое потекнува од сулфаниламид. Основните

сулфонамиди се состојат од сулфон-амидна група ($-\text{SO}_2\text{NH}_2$ -) каде што азотот е означен како N^1 и од amino група ($-\text{NH}_2$) каде што азотот е означен како N^4 и која се наоѓа во пара позиција во однос на бензеновиот прстен. Повеќето сулфонамиди се синтетизираат со хемиска супституција на водородниот атом на азотот од сулфон-амидната група (N^1 позиција), бидејќи супституцијата на водородниот атом на азотот на amino групата (N^4 позиција) резултира со намалена антибактериска активност, со одредени исклучоци, во однос на несупституираните аналози. Сулфонамидите се разликуваат по нивните физичко-хемиски, фармакокинетички и фармакодинамички својства. Сулфадиазин, сулфадимидин, сулфадиметоксин, сулфаметоксазол, сулфахлоропиридазин и сулфафуразол се најчесто употребуваните сулфонамиди кај животните (Слика 5, а-ѓ) (Botsoglou и Fletouris, 2001; Bitas и соp., 2018; Gonzalez и Usher, 2009).

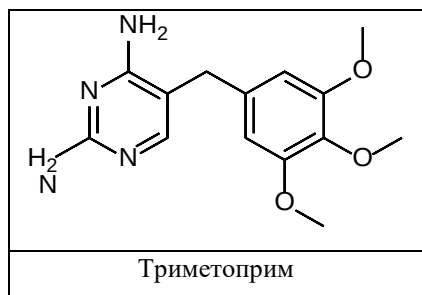
	
а) Сулфадиазин	б) Сулфадимидин
	
в) Сулфадиметоксин	г) Сулфахлоропиридазин
	
д) Сулфафуразол	ѓ) Сулфаметоксазол

Слика 5. Хемиска структура на најчесто употребуваните сулфонамиди

Спектар на делување. Сулфонамидите се хемотерапевтски средства со широк антимикробен спектар на дејство. Се користат во многу земји ширум светот, заради нивната

ниска цена и лесна администрација. Тие делуваат бактериостатски против Грам⁺ и Грам⁻ бактерии (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Brucella spp.*, *Streptococcus spp.* итн.) и на некои кламидии и протозои. Исто така сами или во комбинација со антибиотици или кокцидиостатици, сулфонамидите се употребуваат и како додатоци во храната за терапија или профилакса на кокцидиоза (Gonzalez и Usher, 2009; Таџиќ и соп., 2017; Etebu и Ariekpar, 2016; Bitas 2018; Botsoglou и Fletouris, 2001).

Фармакодинамика. Сулфонамидите во бактериските клетки се структурни аналози на пара-аминобензоевата киселина (ПАВА) и дејствуваат како конкурентни инхибитори на ензимот дихидроптероат синтетаза, односно се врзуваат за исто место. Овој ензим е вклучен во синтезата на фолна киселина. Со врзување на сулфонамидите за дихидроптероат синтетаза наместо пара-аминобензоевата киселина се спречува синтезата на фолна киселина, а со тоа и синтезата на DNA. Клетките на цицачите кои се третираат со сулфонамиди, остануваат поштедени од овој процес, со тоа што тие користат готова фолна киселина. Диаминопиримидините како што е триметопримот, се синтетички антимицтобни лекови, кои ја инхибираат дихидрофолат редуктазата, а со тоа ја инхибираат синтезата на фолна киселина. Комбинацијата на сулфонамид и диаминопиримидин резултира синергетски, бактерицидно на осетливи организми, а комбинацијата се нарекува "потенциран" сулфонамид и поради тоа при терапија се користат во оваа комбинација. (Botsoglou и Fletouris, 2001; Таџиќ и соп., 2017).



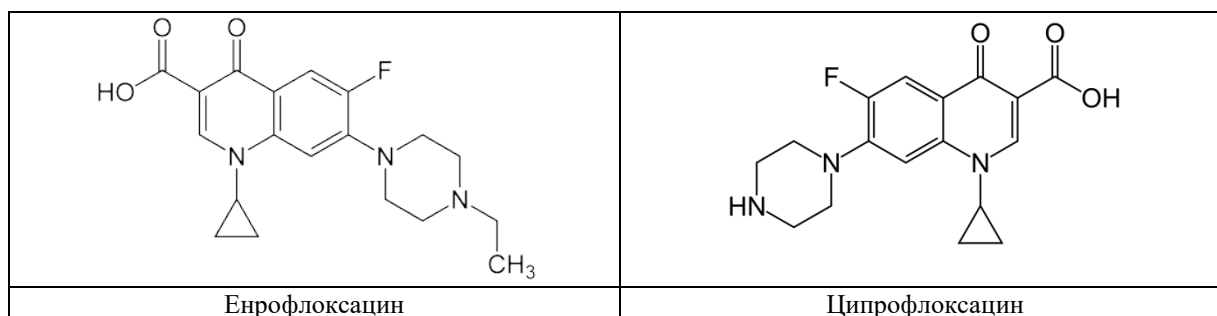
Слика 6. Хемиска структура на триметоприм

Фармакокинетика. Иако постојат и препарати за парентерална и интраутерина примена, повеќето сулфонамиди се администрираат перорално. По орална администрација добро се

ресорбираат во дигестивниот систем (освен сулфагванидин и сулфасалазин, поради што се користат во терапија на цревни инфекции). Максимална концентрација во крвта по орална администрација достигнуваат за 30 минути до 3 часа, во зависност од структурата на сулфонамидот. Сулфонамидите се дистрибуираат во сите ткива на телото и телесните течности, вклучително феталното ткиво и цереброспиналната течност. Дистрибуцијата зависи од физичко-хемиските карактеристики, афинитетот за врзување за протеините на плазмата и видот и кондицијата на животното. Од 20 до 90% се сврзуваат со протеини на плазмата, во зависност од видот на животното и од сулфонамидот. Се метаболизираат во црниот дроб преку процесот на ацетилација (кучиња), ароматска хидроксилација (други животни и луѓе) и оксидација (желки и мајмуни). Се излачуваат преку бубрезите. Ацетилираните сулфонамиди и коњугати на глукуронска киселина се уринарни метаболити кај животните. (Tasić и сор., 2017; Padol и сор., 2015; Ciprić и сор., 2014)).

➤ Кинолони

Хемиска структура, претставници и добивање. Кинолоните се синтетички антибиотици, кои се синтетизирани од 3-кинолон карбоксилна киселина. Најважни претставници од првата генерација кинолони се налидиксичната, оксиплинската и пипемидинската киселина. Втората (енрофлоксацин, ципрофлоксацин, данофлоксацин), третата (марбофлоксацин, прадофлоксацин) и четвртата (се уште нема одобрен претставник во ветеринарна медицина) генерација кинолони се нарекуваат флуорокинолони. Флуорокинолоните во својата структура содржат флуор и други хемиски групи со што се проширува спектарот на антибактериско дејство на Грам+ и Грам- бактерии (Marilena, 2015; Amatya, 2010).



Слика 7. Хемиски структури на најчесто употребуваните кинолони

Спектар на делување. Првите претставници на кинолоните како што е налидиксичната киселина имаат лимитирана активност кон Грам- бактерии, додека флуорокинолоните (пример енрофлоксацин) имаат широк спектар на дејство. Делуваат бактерицидно против Грам- аеробни бактерии и некои Грам+ бактерии. Тие се ефикасни против *Pseudomonas aeruginosa* и некои ентеробактерии (Amatya, 2010; Etebu и Ariekpar, 2016; Scheld, 2003).

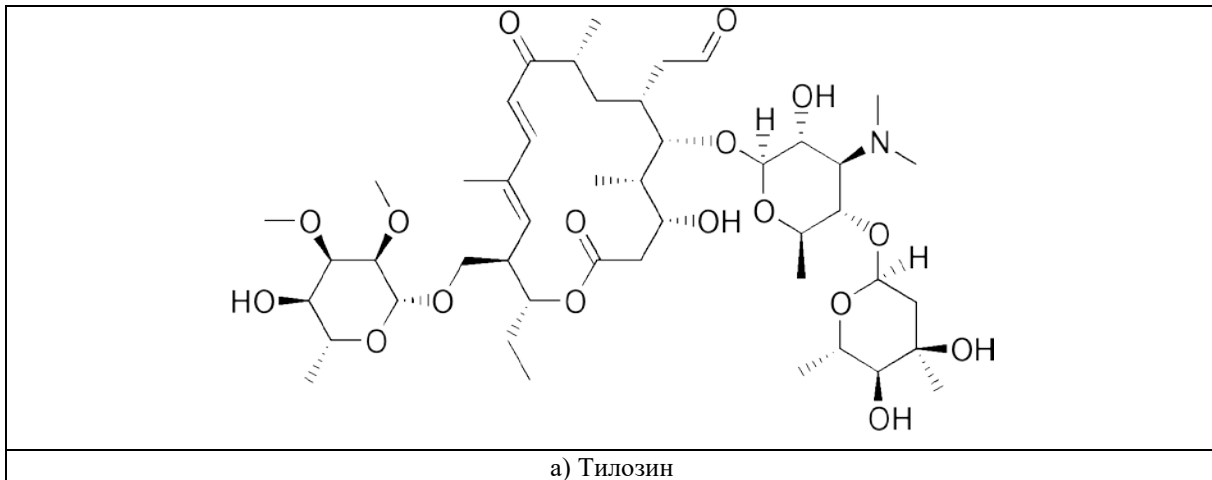
Фармакодинамика. Кинолоните ги инхибираат бактериската топоизомераза II (DNA гираза) или топоизомераза IV, во зависност од самиот кинолон. DNA гиразата ја спречува релаксација на DNA која е потребна за нормална транскрипција и репликација, а со тоа ја спречува и синтезата на DNA. Инхибиција на DNA гираза практично доведува до смрт на бактериите (бактерицидно дејство). Топоизомеразата IV врши релаксација на DNA и помага при сегрегација на реплицирачки хромозоми или плазмиди кај бактериите. Инхибицијата на топоизомеразата IV го нарушува овој процес, придонесувајќи за бактерицидно дејство на флуорохинолоните (Adzitey, 2015; Ullah и Ali, 2017; Zhanel и соp, 1999).

Фармакокинетика. Постојат значајни разлики меѓу кинолоните во однос на нивната фармакокинетска судбина кај домашните животни. Кинолоните при орално аплицирање кај моногастрични животни брзо се апсорбираат од гастроинтестиналниот тракт. Максималната концентрација во плазмата се забележува за 2 часа по администрацијата. Кај преживарите се инактивираат во преджелудникот. Во присуство на храна споро се апсорбираат, а присуство на јони на калциум, магнезиум и алуминиум ја намалува нивната апсорпција. Делумно се метаболизираат во црниот дроб. Се дистрибуираат во сите ткива и телесни течности, но малку се врзуваат за протеините на плазмата. Се излачуваат главно преку урина и жолчка. (Botsoglou и Fletouris, 2001, Cupic и соp., 2014).

➤ Макролиди

Хемиска структура, претставници и добивање. Макролидите се голема група на антибактериски лекови изолирани од актиномицети. Прв идентификуван макролид е пиромидин, а моментално постојат 40 макролидни соединенија. Имаат заеднички хемиски карактеристики и се состојат од макроцикличен лактонски прстен за кој се врзани кето група и гликозидно поврзан аминок шеќер (Слика 8, а). Класификацијата на макролидите е според големината на лактонскиот прстен кој се состои од 14 (еритромицин), 15

(азитромицин) или 16 јаглехидрати (спирамицин, тилмикозин и тилозин) поврзани со шеќерни молекули преку гликозидни врски (Jank и сop., 2015; Ullah и Ali, 2017).



Слика 8. Хемиска структура на најчесто употребуваниот макролид

Спектар на делување. Макролидите имаат широк антимикиробен спектар на дејство. Имаат бактериостатско дејство против Грам⁺ и Грам⁻ бактерии, коки и бацили. На повеќето макролиди чувствителни се *Neisseria spp.*, *Legionella spp.*, *Treponema palidum*, *Chlamydia Mycoplasma*, *Corynebacterium diptheriae*, и *Listeria monocytogenes* и *Campylobacter* (Etebu и и Ariekpar, 2016; Wang и сop., 2012).

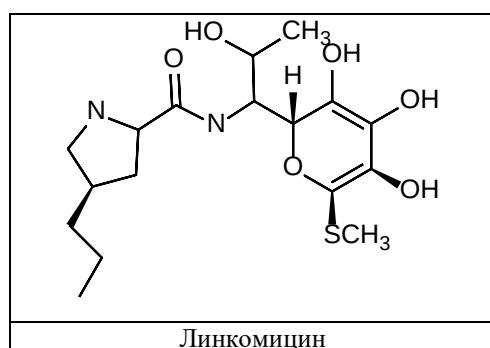
Фармакодинамика. Инхибиција на синтеза на протеините се одвива преку врзување и оштетување на рибозомската 50S поединица на микроорганизмите (Etebu и и Ariekpar, 2016).

Фармакокинетика. Макролидите најдобро се апсорбираат од гастроинтестиналниот тракт кога се администрирани перорално во форма на стабилни соли или естери (како што се стеарат, лактобионат, глукохептат, пропионат и етилсукцинат). Исто така обезбедуваат високи концентрации во плазмата по интрамускулна апликација. Се дистрибуираат во сите ткива и телесни течности, вклучително и во цереброспиналната течност. Се излучуваат преку жолчката каде може да достигнат концентрацијата 20 пати повисока од концентрацијата во плазмата и често се подложуваат на ентерохепатична реапсорпција. Метаболичката инактивација на макролидите обично е голема, но релативната пропорција

зависи од начинот на администрација и од одреден антибиотик. Се елиминират преку урината, фецесот, жолчката и млекото (Botsoglou Fletouris, 2001).

➤ Линкозамиди

Хемиска структура, преставници и добивање. Линкозамидите се моногликозиди кои содржат аминокиселински страничен ланец. Во оваа група на антибиотици спаѓаат линкомицин (Слика 9, а), клиндамицин и пирлимицин. Линкомицин прв пат е изолиран од *Streptomyces lincolnensis*, додека клиндамицин и пирлимицин се добиени по полусинтетички пат. Клиндамицинот се карактеризира со поголема антибактериска потентност и подобри фармакокинетски особини од родителскиот линкомицин (Marilena, 2015; Jank и сор., 2015; Wang и сор., 2012).



Слика 9. Хемиска структура на најчесто употребуваниот линкозамид

Спектар на делување. Линкозамидите се пример за антибиотици со широк антиминокробен спектар на делување. Делуваат против Грам+ бактерии, пред сè коки, но покажуваат ефикасност и во третман на инфекции прекизвикани од неспорогени анаеробни бактерии, актиномицети, микоплазми и одредени соеви на *Plasmodium* (Etebu и Arikekpar, 2016).

Фармакодинамика. Линкозамидите имаат слична антиминокробна активност со макролидите. Тие делуваат бактериостатски и бактерицидно во зависност од концентрацијата на лекот, видот и сојот на бактеријата. Линкозамидите ја инхибираат синтезата на протеините со врзување за 50S подединиците на бактериските рибозоми (Wang и сор., 2012).

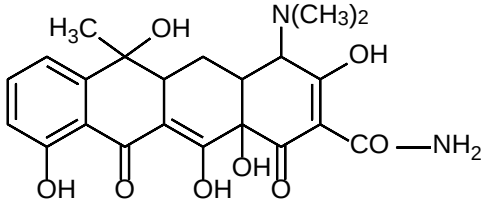
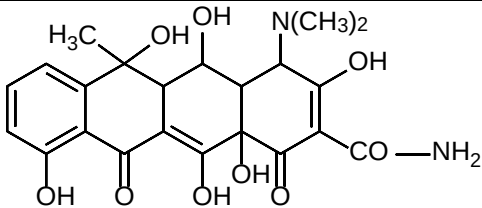
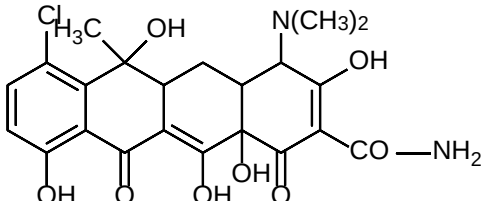
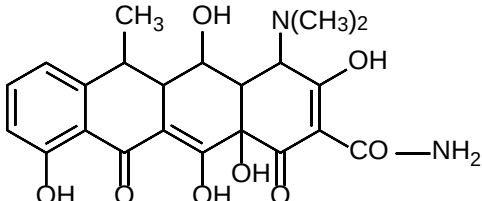
Фармакокинетика. Линкозамидите при орална администрација добро се абсорбираат во интестиналниот тракт кај моногастрични животни. Се аплицираат и интрамускуларно. Линкозамидите широко се дистрибуираат во сите ткива и телесни течности. Врз оралната абсорпцијата на линкозамидите негативен ефект има присуството на храна. Линкозамидите се врзуваат за протеините на плазмата во висок процент, а се метаболизираат во црниот дроб. Се излучуваат преку урината, фецесот и млекото (Botsoglou и Fletouris, 2001).

➤ Тетрациклини

Хемиска структура, преставници и добивање. Тетрациклините се деривати на полицикличниот нафтаценкарбоксамид. Првиот претставник од групата на тетрациклините е хлортетрациклинот кој е изолиран во 1948 година под името ауреомицин. Хлортетрациклинот спаѓа во природните тетрациклини добиени со изолација од габите *Streptomyces*, а покрај него во оваа група спаѓаат и окситетрациклин и демеклоциклин. Другите тетрациклини како што се доксициклин и тетрациклин се добиени по полусинтетички пат. Најважните тетрациклини се тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин (Слика 10, а-г). Овие соединенија се релативно стабилни во кисели и во базни раствори. Може да бидат фото-дистрибуирани формирајќи изомерни *epi*-тетрациклини (Makovec и соp., 2015; Botsoglou и Fletouris, 2001). Тетрациклините се силни агенси за формирање на металните хелати неопходни за нивната антимикробна активност. (Gaugain-Juhel и соp., 2009; Schwaiger и соp., 2018; Anderson и соp., 2005 и Oka и соp., 2000).

Спектар на делување. Тетрациклините имаат широк спектар на делување. Тие делуваат против Грам⁺ и Грам⁻ бактерии, спирохети, микоплазми, рикетсии и против некои вируси. Појавуваат умерна активност во однос на следните видови *Staphylococcus aureus*, *Spirochete*, *Actinomyces*, *Chlamydophila*, *Rickettsia* и *Mycoplasma* (Etebu и Ariekpar, 2016).

Фармакодинамика. Тетрациклините делуваат бактериостатски на микроорганизмите. Тие имаат афинитет да се врзуваат за двовалентни или поливалентни метали и да ги хелираат есецијалните метали важни за животот на бактериската клетка. Тие иреверзибилно се врзуваат за 30S рибозомските субединици на бактериите и ја спречуваат синтезата на протеините (Ullah и Ali, 2017; Велев, 2013).

	
Тетрациклин	Окситетрациклин
	
Хлортетрациклин	Доксициклин

Слика 10. Хемиска структура на најчесто употребуваните тетрациклини

Фармакокинетика. Тетрациклините кај животните може да се применуваат перорално, парантерално и преку интраматерна апликација. Тетрациклините брзо се апсорбираат од гастроинтестиналниот тракт. Присуството на двовалентните метални јони во гастроинтестиналниот тракт може да влијае негативно врз апсорпцијата на тетрациклините, поради што треба да се избегнува истовремена исхрана со млеко или храна која е богата со калциум. Исто така, степенот на апсорпција зависи од липофилноста на тетрациклините (тетрациклините со помала липофилност послабо се апсорбираат). Фракција од тетрациклини кои се концентрирани во црниот дроб, се излучуваат преку жолчката, се реапсорбираат преку ентерохепатичната циркулација поради што може да бидат присутни во крвта и подолго време после администрацијата (Botsoglou и Fletouris, 2001; Padol и соп., 2015). Тетрациклините се дистрибуираат брзо во организмот, особено по парентералната администрација. Биотрансформацијата на тетрациклините е ограничена кај повеќето домашни животни, и генерално околу една третина од дадена доза се излучува непроменета. Стапката на метаболизам на тетрациклините кај кравите е проценета на 25-75% и значителен процент на администрираните тетрациклини се излучуваат во говедско млеко. Тетрациклините можат да ја преминат плацентата и да влезат во феталната циркулација и амнионската течност, а релативно високи концентрации на овие лекови се наоѓаат и во

мајчиното млеко. Се излачуваат преку урина и фецес (Padol и сop., 2015; Botsoglou и Fletouris, 2001).

2.3 Употреба на антибиотиците кај домашните животни

Во ветеринарната медицина антибиотиците се користат за да го подобрат здравјето и да ја зголемат продуктивноста кај животните кои произведуваат храна, а истовремено да ја намалат стапката на морбидитет и морталитет кај добитокот. Од овде произлегува дека антибиотиците кај домашните животни се употребуваат за терапевтски цели (кај болни животни), за профилактички цели (превентивна мерка, со цел да се заштитат животните од одредени заболувања) и како додатоци во добиточната храна (за подобро искористувањето на храната или како промотори на растот). Антибиотиците кај животните може се аплицират орално, парентерално и/или интрамамарно. Тетрациклините, сулфонамидите, флуорокинолоните, макролидите, линкозамидите и бета-лактамите се најчесто користени антибактериски средства кај животните кои може да се користат единечно или комбинирано (Bitas и сop., 2018; Wang и сop., 2012; Padol и сop., 2015).

- Употреба на антибиотиците во терапевтски цели

При терапевтската употреба на антибиотиците и изборот на антибиотик, важно е да се напомене дека покрај чувствителноста на бактериите во предвид треба да се земат и следните фактори: видот на патоген, атрибутите на лекот (како што се фармакодинамика, фармакокинетика, токсичност, дистрибуција во ткивата), карактеристиките на животното кое се третира (како што се возраст, вид, имунолошки статус), отчетност пред јавноста, ефективноста на трошоците. Секој од овие прашања се важни при донесување здрава одлука во врска со препорачливоста на секоја антимикуробна терапија (Furgasa и Beyene, 2018). Инфицираните животни добиваат антимикуробна терапија, која обично вклучува високи дози на антибиотици во релативно краток временски период. Антибиотици и сулфонамидите се користат за третман на маститис, артритис, респираторни заболувања, гастроинтестинални инфекции и други заразни бактериски заболувања кај животните (Daeseleire и сop., 2017; Baynes и сop., 2016). Кај домашните животни кои се користат за производство на млеко, маститисот кој претставува инфекција на млечните жлезди, генерално се смета за најсериозна болест, проследена со големи економски загуби како резултат од намаленото производство на млеко и млеко со слаб квалитет (Padol и сop., 2015).

β -лактамите се веројатно најкористената класа на антибиотици во ветеринарната медицина за третман на бактериски инфекции особено кај маститис, кластридијални болести, листериоза, кожни инфекции предизвикани од стафилококи, инфекции на уринарниот тракт и β -хемолитички стрептококни инфекции. (Sulejmani, 2012; Amatya, 2010; Daeseleirei *cor.*, 2017). Една неодамнешна студија спроведена низ 25 Европски држави открива дека сулфонамидите се еден од трите најпопулари антимикробни средства што се користат во ветеринарната медицина (после тетрациклините и пеницилините) и дека сулфонамидите претставуваат 11% од вкупната продажба на ветеринарни антимикробни лекови низ цела Европа во 2011 година (Baupes и *cor.*, 2016). Сулфонамидите се користат во третманот на бактериски ентеритис, бактериски инфекции, пневмонија, маститис, колибацилоза, пододерматитис, полиартритис и кокцидијални заболувања на животни за производство на млеко и како промотор на раст кај свињите (Botsoglou и Fletouris, 2001; Padol и *cor.*, 2015). Кинолоните се индицирани за третман на локални и системски инфекции предизвикани од осетливи микроорганизми, особено против длабоко вкоренети инфекции и интрацелуларни патогени. Тие се користат во ветеринарната медицина за третман на белодробни инфекции, уринарни инфекции и дигестивни инфекции кај крави, свињи, мисирки или пилиња (Jayalakshmi и *cor.*, 2017; Botsoglou и Fletouris, 2001; Amatya, 2010). Макролидите се користат за лекување на респираторни заболувања особено оние поврзани со *Pseudomonas aeruginosa*, ентерични, системски и локални инфекции кај говеда, овци, свињи и живина. Тие често се сметаат за алтернативи на пеницилините за третман на стрептококна и стафилококна инфекција. (Jank и *cor.*, 2015; Ćurčić и *cor.*, 2011).

Линкозамидите се група на антибиотици кои многу често се користат, како во хумана, така и во ветеринарна медицина. Се користат во терапија на инфекции предизвикани од Грам+ бактерии, пред сè стафилококи, β -хемолитички стрептококи и пнеумококи кај најразлични животински видови. Клиндамицин е одобрен за употреба кај мачки и кучиња за третман на инфицирани рани, апсцеси и забни инфекции (Wang и *cor.*, 2012; Jank и *cor.*, 2015). Тетрациклините се користат за лекување на системски и локални инфекции, дел од нив се следните: заразен кератоконјуктивитис кај говеда, кламидиоза, анаплазмоза, актиномикоза, актинобацилоза, нокардиоза (особено миноциклин), ерлихиоза (особено доксициклин). Исто така откриено е дека тетрациклините се ефикасни во третман на маларија (*Plasmodium*

falciparum), респираторни и гастроинтестинални инфекции (Virolainen, 2012; Makovec и сор., 2014).

➤ Употреба на антибиотици во профилактички цели

Во ветеринарната медицина антимикуробните лекови се употребуваат за профилактички цели кај животните кои моментално не се болни од одредена болест, но се изложени на висок ризик од инфекција или стрес. Животните може да се третираат со антибиотици откако биле подложени на некоја хируршка интервенција, трауматски повреди, вакцинација, мешање и транспорт на животни или пак доколку се изложени на ризик од појава на заразни болести. Животните може да се третираат поединчно или групно, а дозите кои се користат при тоа се значително пониски во однос на терапевтските дози. Профилактичката употреба на антибиотиците е од значителна помош во контролата и спречувањето на бројни заразни болести кај домашните животни. Употребата на антибиотиците никогаш не треба да биде замена за добри практики на управување (Schwarz и Chaslus-Dancla, 2001; Nisha, 2008).

➤ Промотори на раст

Континуираната употреба на антимикуробните промотори на раст како адитиви во храната за животните за производство на храна е главна карактеристика во современите системи за интензивно производство. Овој ефект кај нив за прв пат е откриен во доцните 40-ти години од минатиот век, кога е утврдено дека хлортетрациклино доведува до поголема маса кај пилињата, а малку подоцна истото е утврдено и за мисирките и свињите. За оваа цел антибиотиците се даваат во ниски концентрации во текот на целиот период на растот на животните. При тоа за достапните антибиотици условите за употреба (целни животни, дозирање, времетраење) се јасно дефинирани во нивните упатства за употреба. Антибиотиците делуваат на тој начин што доведуваат до истенчување на мукозната мембрана на цревата, ја олеснуваат апсорпцијата, го менуваат мотилитетот на цревата и доведуваат до подобра асимилација, овозможуваат поволни услови за корисните микроорганизми во цревата на животното со уништување на штетните бактерии, а покрај тоа го фаворизираат растот со намалување на степенот на активност на имунолошкиот систем и намалено формирање на токсини. Забележано е дека малите субтерапевтски дози

на антибиотици, особено пеницилини и тетрациклини додадени кај домашните животните го подобруваат искористувањето на храната, а исто така тетрациклините кај кокошките и мисирките го зголемуваат производство на јајца. Поради појавата на антимикробната резистенција и токсичните ефекти кај луѓето Велика Британија забрани употреба на пеницилините и тетрациклините како промотори на раст во раните 1970-ти, додека Шведска ја забрани нивната употреба во 1985 година и при тоа била развиена алтернатива на антибиотици кои се користат како промотори на раст (Schwarz и Chaslus-Dancla, 2001; Botsoglou и Fletouris, 2001; McGinnis и соp., 1950; Bitas и соp., 2018; Seri, 2013; Nisha, 2008). Со Регулатива ЕС 1831/2003 ЕУ забранува употреба на антибиотици како промотори на раст од 01 јануари 2006 година (Castanon, 2006).

2.4 Остатоци од антибиотици во млеко

Антибиотиците во ветеринарната медицина, како што е претходно наведено, се користат за терапија, профилакса или како промотори на раст. Кај животните кои се користат за млеко, антибиотиците најчесто се користат за лекување и контрола на маститис со интрамамарна администрација. Маститис е воспаление на млечната жлезда, најчесто предизвикано од патогени микроорганизми, а се смета за многу сериозно заболување на домашни животни кои се користат за млеко со многу големи економски загуби во индустријата за производство на млеко и млечни производи. Значителни делови од антибиотиците, кај третираните животни, се излучуваат преку млекото непроменети и имаат сериозни штетни ефекти врз здравјето на човекот. Покрај тоа антибиотиците се излучуваат преку млекото одреден временски период и при третирање на други заболувања кај домашните животни (Seri, 2013; Sachi 2019). Поради тоа остатоците од ветеринарните лекови во храната се клучен проблем за безбедноста на храната и јавното здравство. Времето кое е потребно за целосно излучување на антибиотиците од млекото, како и од организмот на животните зависи од физичко-хемиските својства на лекот, начинот на администрација, како и дозата на лекот која е администрирана кај животното (Sachi, 2019). Постојат многубројни студии и истражувања за присуството на остатоци од антибиотици во млекото. Во една студија во САД во 1988 година 71% од примероци млеко земени од фармите и малопродажниот пазар биле позитивни на остатоци од антибиотици и сулфонамиди, а од нив 63% биле тетрациклини и сулфонамиди (Goulette, 2007). Во друго истражување Bando и соp., (2009)

утврдувале присуство на остатоци од антибиотици во 151 примерок пастеризирано млеко, кое било пуштено во промет во Бразил. Од испитаните примероци, 59 примероци (41.3%) содржеле остатоци од антибиотици и сулфонамиди. Во квантитативна анализа утврдено е дека 41 од 151 примероци содржеле тетрациклини (тетрациклин, хлортетрациклин и/или окситетрациклин), 4 од 82 примероци содржеле гентамицин и 5 од 151 примероци содржеле бета-лактами, односно во 9 од 151 примерок содржеле остатоци од два или повеќе антибиотици. Само еден примерок содржел повисоко ниво на стрептомицин (260 $\mu\text{g/kg}$) од MRL за овој антибиотик (200 $\mu\text{g/kg}$). Sulejmani и сор., (2012) детектирале присуство на остатоци од бета-лактами и сулфонамиди во 127 примероци млеко. При тоа утврдиле дека над 70% од сите испитани примероци млеко содржеле остатоци од антибиотици (во 64 примероци детектирале бета-лактами и во 24 примероци детектирале сулфонамиди).

Остатоките од антибиотици во млеко најчесто се јавуваат поради непочитување на каренцата (периодот кој е потребно да помине од последната доза на лекот до моментот кога концентрацијата на лекот во ткивата или продуктите од животните е понизок или еднаков на одредената MRL вредност) или поради неправилна употреба на лековите (поголема доза од пропишаната), но исто така и поради слаба евиденција за третманот на животните, грешки од страна на производителот на антибиотикот, проблеми со идентификација на животните, статус на болеста, особено бубрежни и хепатални болести, истовремена употреба на повеќе лекови итн. Кај млекото исто така може да биде резултат на случаен трансфер на млекото од третирани животни во резервоарот за млекото од нетретирани животни или контаминиран апарат за молзење итн. (Daeseleire, 2017; Berruga и сор., 2016). Со цел да се спречи присуство на остатоци од антибиотици во храната од животинско потекло, а со тоа да се намалат и можните несакани ефекти кај луѓето, покрај почитувањето на времето на каренца, правилното третирање на животните и почитување на останатите добри земјоделски практики, потребна е и постојана контрола со современи сензитивни и специфични аналитички методи со кои ќе се овозможи конзумирање на безбедна храна без присуство на антибиотици.

2.5 Негативни ефекти кај луѓето и во млечната индустрија

Остатоците од антибиотици и сулфонамиди, како и другите ветеринарни лекови, играат важна улога во безбедноста на храната, бидејќи по нивната употреба кај домашните животни истите се излачуваат од организмот одреден временски период, па доколку не се почитува каренцата, дозата и начинот на апликација, како и добрите земјоделски практики, истите може да се најдат во млекото, месото, јајцата и другите производи од животинско потекло кои се конзумираат од луѓето (Asredie и Engdaw, 2013; Seri, 2013). Присуството на антимикробни остатоци во млекото може да доведе до следните несани ефекти: инхибиција на млечни почетни култури што се користат во производството на сирење и јогурт, несакани ефекти кај луѓето и развој на антибиотска резистенција.

Многу почетни култури кои се користат во производството на ферментирани производи (пример јогурт и сирење), може да бидат целосно инхибирани доколку антимикробните супстанции се во високи концентрации, или пак да бидат со намален квалитет кога остатоците од антимикробните супстанции се во помали концентрации. Поради тоа, најголем дел од млекарите имаат воведено брзи тестови за анализа на присуство на антибиотици во млекото кое го откупуваат од фармерите.

Веројатноста за акутна токсичност од ветеринарните лекови или нивните метаболити, кои потекнуваат од млекото и другата храна од животинско потекло е исклучително ниска поради тоа што остатоците од антибиотици во млекото се во ниски концентрации. Покрај тоа, повеќето од лековите што се користат кај млечни говеда, овци и кози се исто така одобрени за хумана употреба. Употребата на ветеринарни лекови кои имаат висок потенцијал да предизвикаат токсични ефекти кај луѓето како што се хлорамфеникол (токсичност на коскената срцевина, хепатотоксичност, репродуктивни пореметувања) и нитрофурани (потенцијално канцерогени и мутагени) е забранета кај сите животни кои се користат за производство на храна (ЕС 37/2010). Исто така канцерогени својства, но и негативни ефекти по имунолошкиот систем, имаат и сулфаметазин, окситетрациклин, фуразолидон, додека нефропатија и мутагени ефекти може да предизвика гентамицинот. Покрај директните токсични ефекти, исто така се опишани и други негативни ефекти кои се должат на таложување на остатоци од антибиотици. Остатоците од тетрациклин се таложат во коските и забите, па оттаму можат и да го забават растот на

скелетот, а исто така неповратно ја менуваат бојата на забите кај децата, но може да доведат и до алергиски реакции и промени на периферната крв. Другите остатоци можат да влијаат на имунолошкиот систем, цревната флора или да бидат причина за преосетливи реакции. Преосетливоста кон пеницилин е најчестиот несакан ефект, а инциденцата се движи од 0.7% до 10% од популација. Реакциите на преосетливост на пеницилин се идиосинкратични, не се поврзани со дозата и не се наследни. Луѓето можат да страдаат од алергиски реакции како што се осип на кожата, уртикарии, астма или анафилактичен шок, кои може да бидат предизвикани дури и од многу ниски концентрации на антибиотици и нивни метаболити. Остатоките од сулфонамидите може да предизвикаат токсични ефекти (тироидна жлезда), алергиски реакции, тромбоцитопениа, хепатитис, хемолитичка анемија (Baynes и сор., 2016; Doyle, 2006; Asredie, 2015; Bayou и Haile, 2017; Reybroeck, 2010; Hesmati, 2015). Антимикробните препарати со широк спектар можат негативно да влијаат на широкиот спектар на цревната флора и следствено на тоа да предизвикаат гастроинтестинални нарушувања (Fangama, 2019).

Друг несакан ефект кај луѓето е појавата на бактериската резистенција по ингестија на субтерапевтски дози на антибиотици преку храната од животинско потекло, како резултат на што антибиотиците стануваат неефикасни при понатамошни терапии (Hesmati, 2015; Sachí и сор., 2019).

2.6 Контрола на остатоци од антибиотици, законски регулативи и MRL

Безбедноста на храната е еден од главните приоритети на ЕУ, поради што во современата индустрија за производство на храна од животинско потекло Европската Комисија има воведено строги регулативи за употреба на ветеринарните лекови, вклучително и антибиотиците, со оглед на потенцијалните негативни ефекти врз јавното здравје. Исто така, поради загриженоста од појавата на антимикробна резистенција, многу земји вклучувајќи ги и оние во ЕУ, почнале да ги повлекуваат одобренјата за употреба на антимикробните средства како промотори на раст. Од јануари 2006 година, после донесувањето на Регултивата ЕС 1831/2003, во која стои дека е неопходно да се утврди датум од кој ќе се забрани употребата на антибиотици како промотори за раст, забранета е употребата на антибиотиците за оваа цел.

Контролата и мониторингот на остатоците од ветеринарно-медицински препарати во храна од животинско потекло во ЕУ е регулирана преку Директивата 96/23/ ЕС. Оваа Директива ги пропишува националните планови за контрола на остатоци од ветеринарно-медицински препарати кај живи животни и производи од животинско потекло. Во истата Директива, соединенијата што се користат во ветеринарната медицина се поделени во две групи: А и Б (Табела 2). Во групата А спаѓаат супстанциите кои се забранети за употреба кај животните кои се огледуват за производство на храна, а во групата Б спаѓаат супстанциите кои се дозволени за употреба кај животните со утврдени максимално дозволени концентрации (MRL-Maximum residue limit) (Council Directive 96/23/EC).

Табела 2. Класификација на ветеринарно-медицински препарати (Council Directive 96/23/EC)

Група А	
A1	Стилбени
A2	Тиреостатици
A3	Стероиди
A4	Деривати на резорцилната киселина, вклучувајќи го и зеранолот
A5	Бета агонисти
A6	Хлорамфеникол, нитрофурани, нитроимидазоли, дапсон, хлорпромазин, (според Директивата 2377/90/ЕЕС)
Група Б	
B1	Антибактериски супстанции, вклучувајќи ги и сулфонамидите и кинолоните
B2	Други ветеринарни лекови
	B2a - антихелминтици
	B2б - кокцидиостатици
	B2ц - карбамати и пиретроиди
	B2д - седативи
	B2е - нестероидни антиинфламаторни лекови
	B2ф - други фармаколошки активни супстанции
B3	Други супстанции и контаминенти од околината
	B3а - органохлорни пестициди, вклучувајќи и РСВ
	B3б - органофосфорни пестициди
	B3ц - хемиски елементи
	B3д - микотоксини
	B3е - бои
	B3ф - други

Терминот MRL претставува максималната дозволена концентрација на остатоци од ветеринарно-медицински препарати прифатена од ЕУ во производи добиени од

третираните животни. Вредностите за MRL на антибиотиците се важен податок врз основа на која се определува периодот на неговата каренца (Bayou и Haile, 2017; Asredie и Engdaw, 2015). MRL за фармаколошки активните супстанции во храна од животинско потекло се дефинирани во Регулацијата на ЕУ 37/2010 (Commission Regulation (EU) 37/2010). Во Табела 3 дадени се вредностите за MRL за антибиотици во млеко (Табела 2 се однесува само на MRL за антибиотици во млеко кои се опфатени во оваа дисертација).

Табела 3. MRL вредности за антибиотици во млеко

Антимикробни супстанции	MRL ($\mu\text{g/kg}$)
Амоксицилин	4
Ампицилин	4
Бензилпеницилин	4
Клоксацилин	30
Оксацилин	30
Цефалексин	100
Цефтиофур	100
Цефапирин	60
Ципрофлоксацин	100
Енрофлоксацин	100
Линкомицин	150
Тилозин	50
Доксициклин	100
Хлортетрациклин	100
Окситетрациклин	100
Тетрациклин	100
Триметоприм	50
Сулфаклоропиридазин	100
Сулфафуразол	100
Сулфадиазин	100
Сулфадиметоксин	100
Сулфадимидин	100
Сулфаметоксазол	100

Мониторингот за остатоци од антибиотици во млеко, како и за другите ветеринарно-медицински препарати, во Република Северна Македонија, секоја година го спроведува Агенцијата за храна и ветеринарство, согласно Европските прописи и Правилник за начинот на вршење на мониторинг и контрола на присуството на резидуи и контаминанти во живите животни и храната од животинско потекло, начинот на вршење на официјалните контроли и постапките за мониторинг и контрола на резидуи и недозволени супстанции и мерките кои се преземаат во случај на сомнение и на позитивен наод на присуство на резидуи и недозволени супстанции, Службен весник на Република Македонија, 80/2011 (Службен Весник на РМ 80/2011,) кој е во согласност со Директивите на Советот 96/23/ЕС. Анализите

се вршат на Факултетот за Ветеринарна медицина – Скопје, со акредитирани методи, со што Факултетот претставува една од клучните алки во следење на безбедноста на храната во РСМ.

2.7 Аналитички методи за определување на остатоци од ветеринарни лекови

Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС ги дефинира критериумите за аналитички методи кои се користат за анализа на остатоци од ветеринарни лекови, односно воспоставува критериуми за ефикасност и постапка за валидација на скрининг и потврдни методи. Покрај тоа, со оваа Одлука се одредува заеднички критериум за проценка на добиените резултати за примероците во овластени контролни лаборатории. Резултатот од анализата се смета за позитивен ако е поголем од границата на одлучување на потврдна метода. Во Табела 4 е прикажана класификацијата на аналитичките методи според критериумите на ефикасност кои треба да се определат.

Табела 4. Класификација на аналитичките методи според критериумите за ефикасност кои треба да се определат (Decision 2002/657/ЕС)

		Способност за докажување (CC β)	Лимит на одлучување (CC α)	Точност/ Аналитичк и принос	Прецизност	Селективност/ специфичност	Применливост /робустност/стабилност
Квалитативни методи	С	+	-	-	-	+	+
	П	+	+	-	-	+	+
Квантитативни методи	С	+	-	-	+	+	+
	П	+	+	+	+	+	+

(С) - Скрининг метод; (П) - потврден метод; (+) – задолжително определување

Скрининг методите се користат за определување на присуство на супстанција или класа на супстанции на ниво на интерес. Карактеристично за овие методи е тоа што имаат можност за истовремена анализа на голем број примероци со цел откривање на потенцијални позитивни резултати. Тие се специјално дизајнирани за да се избегнат лажно негативни резултати (2002/657/ЕС). Согласно Директивата 96/23/ЕС како скрининг методи може да се

користат само оние аналитички техники за кои што на документиран и следлив начин може да се покаже дека се валидирани и на нивото на интерес процентот на лажно негативни резултати да биде помал од 5%. Во случај на сомнеж на позитивен резултат, истиот треба да се поврди со потврден метод (2002/657/EC; 96/23/EC).

Потврдни методи се методи кои обезбедуваат целосни или дополнителни податоци што овозможуваат недвосмилена идентификација, а доколку е потребно и квантификација на супстанциите на нивото на интерес. Потврдните методи даваат информација за хемиската структура на аналитот и најчесто се темелат на хроматографска анализа со спектрометриска детекција (2002/657/EC).

2.7.1 Скрининг методи за определување на антибиотици во млеко

Историски гледано, скрининг методите за детекција на остатоци од антимикробните супстанции во храна од анимално потекло започнало во 60-тите години на минатиот век, кога практично во млечната индустрија бил забележан проблемот со инхибиторна активност при преработка на млеко (јогурт и сирење) (Ibrahim и соp., 2016).

Скрининг методите се полуквантитативни методи кои се користат за анализа на остатоци од ветеринарни лекови. Овие методи се едноставни за употреба, кратко е времето за анализа, имаат добра селективност и ниска цена. (Dimitrieska и соp., 2011; Berruga и соp., 2016; Pelvan, 2011). Скрининг методите што се користат за анализа на антибиотици и сулфонамиди во млеко може да се поделат на: инхибиторни микробиолошки тестови, имунохемиски испитувања и физичко-хемиски методи (Dimitrieska и соp., 2011; Berruga и соp., 2016; Pelvan, 2011).

- Инхибиторни микробиолошки тестови

Тестовите за инхибиција на микробиолошки раст се квалитативни или полуквантитативни тестови. Овие тестови се базираат на основа на реакција помеѓу бактеријата која е присутна во тестот и антибиотикот/антибиотиците присутни во примерокот за анализа. Ако не постојат антибиотици во млекото, бактериите почнуваат да растат и да произведуваат киселина, што ќе предизвика забележлива промена на бојата. Доколку во примерокот се

присутни антибиотици, тие го инхибираат растот на бактериите, а како резултат на тоа не доаѓа до промена на бојата. Овие тестови се евтини и овозможуваат анализа на голем број на примероци за кратко време, со оглед на тоа дека не е потребна екстракција на анализите од примерокот. Некои од придобивките од овие тестови се нивната сигурност, едноставност и комерцијална достапност. Многу важна предност во однос на имуноензимските и потврдните методи е тоа што овие тестови може да ги детектираат сите антибиотски компоненти кои покажуваат антибиотска активност. Инхибиторните микробиолошки тестови се применливи доколку нивните перформанси се соодветни за детекција на ниво на остатоци од антибиотиците околу и под MRL вредностите. Недостаток на ваквите тестови е тоа што микроорганизмите што се користат во тестот не се подеднакво чувствителни на сите типови антибиотици и од таа причина, некои антибиотици подобро се откриваат од другите. Познати тестови се Delvo test и Copan test (Fangama, 2019; Ibrahim и сop, 2016; Juščáková и Kožárová, 2017).

- Имунолошки тестови

Овие методи примарно се базирани на реакција антиген-антитело кои се доста специфични за остатоците од ветеринарни лекови. Најчесто користени се ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) методите, кои се полуквантитативни методи, сензитивни, едноставни, селективни и се корисни за секојдневна рутинска анализа. ELISA методите овозможуваат истовремена анализа на голем број примероци за кратко време и детекција на широк спектар на аналити на ниво на интерес, со минимална подготовка на примероците. Со оваа техника може да се утврдат многу ниски концентрации на аналити (до ng/kg), што ги прави погодни и за анализа на забранети субстанции. Главниот предизвик на имуноензимските тестови е производството и снабдувањето со антитела, кои треба да бидат селективни кон насоченото соединение или група на соединенија. Овие методи се користат во анализа на храната преку 30 години, но иако се ефтини и едноставни за апликација, поради перењето и инкубацијата тешко може да се автоматизираат многу често матрикс ефектот може да влијае на детекцијата (Gaurav и сop., 2014; Jayalakshmi и сop., 2017; Shankar и сop., 2010; Virolainen, 2010).

- Биосензори

Биосензори се тестови кои доставуваат специфични квантитативни или полуквантитативни информации со помош на биолошките елементи на препознавање (на пр. антитела, ензими, рецептори, нуклеински киселини) кои доаѓаат во близок контакт со сигнал од трансдукциски елемент (на пр. оптички, акустички или електрохемиски) поврзан со база за собирање и обработка на податоци. Во овој метод сигналот од биолошкиот елемент се конвертира во мерлив електричен сигнал. Овие тестови се употребуваат за анализа на антибиотици во храна, како што се беталактами, тетрациклини, макролиди, сулфонамиди и др. Генерално биосензорите се користат во контролните лаборатории бидејќи тие може да детектираат повеќе остатоци во еден примерок со што се овозможува анализа на повеќе остатоци во голем број на примероци. Овие техники за анализа се развиваат во последните 10-15 години, бидејќи времето за анализа е пократко, може да се автоматизираат, имаат подобра осетливост, поефтини се од софистицираните методи и се „friendly user“. Недостатоци на овој метод се високи оперативни трошоци и анализата е ограничена на достапните чипови (Huet и сop., 2010; Falowo и Akimoladun, 2017; Shankar и сop., 2010; Virolainen, 2012).

2.7.2 Потврдни методи за определување на антибиотици во млеко

Потврдни методи се методи кои обезбедуваат дополнителни информации при определување на остатоци од ветеринарни лекови, меѓу кои и антибиотиците и сулфонамидите. Со овие методи се овозможува недвосмислена идентификација на хемиска структура на аналитот и квантификација на аналитот на ниво на интерес (Wang, 2012; Kaufmann и сop., 2011). Негативна страна на овие методи е што се многу скапи за изведување, поради скапите опрема, хемикалии и реагенси, траат подолг временски период, бараат стручен и добро обучен персонал. Како потврдни методи се користат хроматографските техники во комбинација со различни видови на детектори, како што се течна хроматографија со високи перформанси со електроспреј јонизација и масена спектрометрија (HPLC-ESI-MS), течна хроматографија со високи перформанси со флуоресцентен детектор (HPLC-FLD), течна хроматографија со високи перформанси со

детектор со систем на диоди (HPLC-DAD), течна хроматографија со тандем масена спектрометрија (LC-MS/MS), масена спектрометрија со висока резолуција (HRMS), гасна хроматографија со масена спектрометрија и сл. (GC-MS) (Shankar и сop., 2010, Marilena, 2015).

- Течна хроматографија тандем масена спектрометрија (LC-MS/MS)

Течната хроматографија е високоосетлива селективна техника за детекција на остатоци од антибиотици и сулфонамиди во храна. Компонентите се раствораат во соодветниот растворувач и се раздвојуваат преку инјектирање на примерокот (смесата) во колоната под висок притисок. Супстанците од растворот се задржуваат во хроматографската колона различно време поради нивниот различен афинитет кон мобилната и стационарната фаза, апсорпцијата и јонската измена (Martins-Júnior и сop., 2007; Freitas и сop., 2015).

За ефикасно хроматографско раздвојување значаен е степенот на раздвојување на одделните аналити и времето потребно за изведување на анализата. На овие параметри влијаат услови како што се: состав и проток на мобилната фаза, полнење (стационарна фаза), соодветна колона и температура на колоната (McGrane, 2000).

Течниот хроматограф се состои од повеќе основни делови: резервоари за мобилна фаза, пумпа која обезбедува проток на мобилните фази низ системот, инјектор кој ги зема примероците од виалите и ги инјектира во системот, термостат за колона, колона за раздвојување на аналитите, детектор (може да биде различен, а во оваа докторска дисертација е користен MS/MS детектор) и софтвер со кој се обработуваат и во кој се чуваат податоците од анализираните примероци, валидацијата на методите, контролните примероци.

Течна хроматографија тандем масена спектрометрија (LC-MS/MS) е моќен аналитички метод кој ја комбинира резолуционата моќ на течната хроматографија со детекционата специфичност на масената спектрометрија. Добиените резултати со LC-MS/MS може да се користат за да се обезбедат информации за хемиска структура, идентитетот, молекуларната маса и количеството на специфични компоненти на примерокот (Brcina и Gjorgjeska, 2018; Berendsen, 2013; Samanidou и Nisyriou, 2008).

Масената спектрометрија (MS) е високоосетлива техника за анализа, детекција и квантификација на остатоци од антибиотици и сулфонамиди во сложени матрици. Принципот на работа на оваа техника се заснова на раздвојување на јонизирани атоми или молекули врз основа на разликата на нивната маса/полнеж (m/z). Според ова, масената спектрометрија, служи за квантифицирање на атоми или молекули, како и за добивање на хемиски и структурни информации за одредена молекула. Бидејќи молекулите имаат различни профили на фрагментација, на овој начин може да се добијат информации за структурата на соединенијата, односно на овој начин може да се изврши нивната идентификација. Масената спектрометрија овозможува поголема специфичност, брзина на скенирање и точност отколку конвенционалниот UV или FLD детектор. Масениот детектор се состои од јонски извор, анализатор и детектор (McGrane, 2000; Fangama, 2019; Јованов, 2014).

Принципот на масената спектрометрија се состои во:

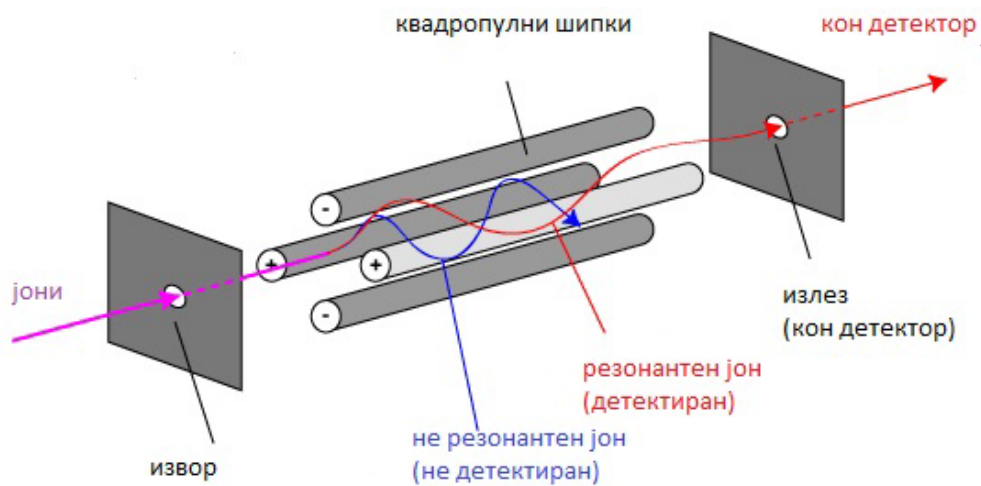
- јонизација на испитуваниот примерок,
- раздвојување на добиените јони под дејство на магнетно поле,
- регистрирање според масата, т.е. според односот маса/полнеж (m/z).

Постојат неколку техники на јонизација кои се користат во масената спектрометрија и тоа: EI (Electron impact – електронски удар) јонизација; CI (Chemical ionization – хемиска јонизација); FD&FI (Field desorption/ionization- десорпција/јонизација во јако поле); FAB (Fast Atom Bombardment - бомбардирање со брзи атоми); MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption-ласерска десорпција на матриксот) и ESI (Electrospray Ionization-јонизација со електроспреј) (Berendsen, 2013; Узунов, 2019). Во ова истражување е користена електроспреј јонизација. Електроспреј јонизација се врши преку инјектирање на растворот од аналитот низ метална капилара (небулајзер), при атмосферски притисок под висок напон. Напонот на капиларите произведува електричен градиент на течноста, што ја раздвојува течноста на високо наелектризирани капки, кои наидуваат на струја од азот, што овозможува нивно растопување на патот кон масениот анализатор. Големината на капките се намалува сè до моментот кога кулоновото одбивање на површината го надминува површинскиот напон и капките експлодираат во помали капки, ослободувајќи јони. Бидејќи јонизацијата се изведува директно од раствор, термолабилните компоненти можат да се јонизираат без нивната деградација. За разлика од другите извори на јонизација, повеќето

од произведените јони се високо наелектризирани, што е од големо значење поради фактот што масенскиот спектрометар го мери односот m/z . На јачината на ESI сигналот влијаат составот и врстата на мобилната фаза, pH и физичко-хемиските особини на аналитот. Растворувачи како метанол и ацетонитрил со вода се покажале како добар извор за снимање на позитивна јонизација (ESI +) при што се додава мала количина на мравска киселина за подобрување на процесот на протонирање на молекулите (Pitt, 2009; Jovanov, 2014).

По јонизацијата и создавањето на јони со употреба на соодветен метод на јонизација, следи раздвојување на јоните според m/z односот, одредување на тој сооднос и мерење релативниот интензитет на секоја јонска група.

Раздвојувањето на јоните се врши во масениот анализатор. Во ова истражување е користен квадруполен масен анализатор кој користи две фази на анализа на масите (Слика 11). Во првата фаза се врши изолирање на јоните од интерес, а во втората фаза се анализираат фрагментите. Овој анализатор има три предности и тоа: толерантен е на релативно висок притисок, мери приличен распон на масите (m/z до 4000) и релативно е поефтин во однос на другите масени анализатори. Се состои од 4 електроди кои се паралелно поврзани. Спротивните електроди се поврзани со електричен пат, како пар. Двете електроди од еден пар во секое време имаат потенцијал со ист интензитет но, со спротивен полнеж. Под влијание на електричното поле јоните осцилираат во насока на полнежот. Кај тандем масената спектрометрија поставени се три квадрипола еден позади друг. Во првиот квадрипол (Q1) се одвојува главниот (прекурзор јон), во вториот квадрипол (Q2) главниот јон се судира со гас (N_2) при што настанува колизиски индуцирана дисоцијација и истиот се активира и подвргнува на понатамошна фрагментација, како резултат на што настануваат јони кои се следат со помош на третиот квадрипол (Q3) и даваат структурна информација за молекулата. Јоните кои доаѓаат од анализаторот во детекторот се претвораат во соодветен сигнал кој се снима и се прикажува како масен спектар (Pitt, 2009; Freitas, 2015; Jovanov, 2014; Radishic 2013).



Слика 11. Шематски приказ на квадруполен анализатор (Узунов, 2019)

3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Главната цел на истражувањето е да се изврши оптимизација и валидација на селективен, прецизен и точен аналитички LC-MS/MS метод за мултирезидуална анализа на остатоци од антибиотици и сулфонамиди во сурово млеко со потекло од Република Северна Македонија.

Во истражувањето беа вклучени дваесет и три антибиотици и сулфонамиди и тоа: ампицилин, амоксицилин, бензилпеницилин, цефалексин, цефтиофур, цефапирин, ципрофлоксацин, флоксацилин, хлортетрациклин, доксициклин, еритрофлоксацин, линкомицин, оксацилин, окситетрациклин, сулфакворопиридазин, сулфазуразол, сулфадиазин, сулфадиметоксин, сулфадимидин, сулфаметоксазол, триметоприм, тилозин и тетрациклин.

Целите на оваа докторска дисертација се:

- Оптимизација на аналитички метод за екстракција на различни класи на антибиотици од сурово млеко;
- Оптимизација и валидација на соодветен потврден LC-MS/MS метод за мултирезидуална анализа на остатоци од антибиотици во сурово млеко согласно Одлуката на Комисијата 2002/657/EC;
- Споредба на добиените резултати од валидацијата со резултатите добиени од студии во светски рамки;
- Примена на методот за рутинска за мултирезидуална анализа на остатоци од антимикробни супстанции во сурово млеко;
- Добивање на информации на безбедноста на храната во однос на присуство на остатоци од антибиотиките во суровото млеко;
- Зајакнување на капацитетот на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, за поуспешно спроведување на анализите во однос на безбедноста на храната.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

4.1 Примероци за анализа

Во ова истражување беа анализирани вкупно 400 примероци од сурово млеко и тоа 240 примероци кравјо млеко, 98 примероци овчо и 62 примероци козјо млеко, во периодот 2017-2019 година. Примероците беа складирани во пластични чашки и беа чувани на температура од -20°C се до нивното анализирање.

4.2 Реагенси и растворувачи

- Метанол, CH_3OH , LC-MS чистота, Carlo Erba
- Ацетонитрил, CH_3CN , LC-MS чистота, Carlo Erba
- Вода, H_2O , LC-MS чистота, Carlo Erba
- Мравска киселина, HCOOH , 98-100 %, Merck
- Хлороводородна киселина 37 %, HCl , Carlo Erba
- Амониум хидроксид, NH_4OH , 32 %, p.a., Scharlau
- Динатриум хидрогенфосфат дихидрат $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba
- Етилендиамин тетраоцетна киселина, дитариумова сол Na_2EDTA , Carlo Erba
- Трихлороцетна киселина, CCl_3COOH , p.a. Carlo Erba
- Диметил сулфоксид, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, p.a., Sigma-Aldrich
- Натриум хлорид NaCl , p.a. Sigma-Aldrich
- Лимонска киселина, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, p.a. Sigma-Aldrich

4.3 Стандарди

- Ciprofloxacin ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$) чистота > 99.5%, Fluka-Vetranal
- Penicillin G potassium salt ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{KN}_2\text{O}_4\text{S}$), чистота > 99.3%, Fluka-Vetranal
- Tetracycline hydrochloride ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{xHCl}$), чистота > 98%, Fluka-Vetranal
- Doxycycline hyclate ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8\text{xHCl}$), чистота > 99.1%, Fluka-Vetranal

- Lincomycin hydrochloride monohydrate ($C_{18}H_{34}N_2O_6S \cdot HCl \cdot H_2O$), чистота 100.3%, Fluka-Vetranal
- Cefalexin ($C_{16}H_{17}N_3O_4S$), чистота > 99.3%, Fluka-Vetranal
- Ampicillin ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$), чистота > 99%, Sigma-Aldrich
- Amoxicillin ($C_{16}H_{19}N_3O_5S$), чистота > 99%, Sigma-Aldrich
- Cloxacillin sodium salt monohydrate ($C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$), чистота > 98.5%, Fluka-Vetranal
- Oxacillin sodium salt monohydrate ($C_{19}H_{19}N_3O_5S$), чистота > 99.2%, Fluka-Vetranal
- Ceftiofur ($C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$), чистота > 97.7%, Fluka-Vetranal
- Cefapirin sodium ($C_{17}H_{17}N_5O_6S_2$), чистота > 98%, Fluka-Vetranal
- Enrofloxacin ($C_{19}H_{22}FN_3O_3$), чистота > 99.8%, Fluka-Vetranal
- Tylosin tartrate ($C_{46}H_{77}NO_{17}$), чистота > 98%, Fluka-Vetranal
- Sulfadiazin ($C_{10}H_{10}N_4O_2S$), чистота > 99.3%, Fluka-Vetranal
- Sulfafurazol (Sulfisoxazole), ($C_{11}H_{13}N_3O_3S$), чистота > 99.9%, Fluka-Vetranal
- Sulfachloropyridazine ($C_{10}H_9ClN_4O_2S$), чистота > 99.4%, Fluka-Vetranal
- Sulfadimethoxine ($C_{12}H_{14}N_4O_4S$), чистота > 99.9%, Fluka-Vetranal
- Sulfadimidin ($C_{12}H_{14}N_4O_2S$), чистота > 99.8%, Fluka-Vetranal
- Sulfamethoxazole ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$), чистота > 99%, Fluka-Vetranal
- Trimethoprim ($C_{14}H_{18}N_4O$), чистота > 99.5%, Fluka-Vetranal
- Oxytetracycline hydrochloride ($C_{22}H_{24}N_2O_9$), чистота > 97.9%, Fluka-Vetranal
- Chlorotetracycline hydrochloride ($C_{22}H_{23}ClN_2O_8$), чистота > 98.9%, Fluka-Vetranal

4.4 Лабораториска опрема

а) Лабораторски стакларија и опрема

- Техничка вага, Sartorius $d=0.01$ g
- Аналитичка вага, Sartorius $d=0.0001$ g
- Азот евапоратор, Organomation
- Водена бања на азот евапоратор, Organomation
- Ултразвучна бања DC 200H Cole Parmer
- Хоризонтална мешалка IKA Labortechnik

- Вортекс, Heidolph
- Центрифуга MPW-352 R
- Дигестор Chem Free
- pH метар, Sartorius
- Пластични туби 50 mL
- Одмерни тиквичи 10 mL
- Стаклени епрувети
- Темни стаклени виали од 2 mL Supelco
- Стаклени инсерти за виали 300 µl Supelco
- Вариабилен едно канален пипетор 10-100 µl Eppendorf
- Вариабилен едно канален пипетор 100-1000 µl Eppendorf
- Мензури од 25 mL, 100 mL, 1000 mL
- Колони за цврсто-фазна екстракција OASIS® HLB 3cc (60 mg)
- Филтри 0,22 mm

б) LC-MS/MS опрема

Инструментот LC-MS/MS се состои од два составни дела и тоа течен хроматограф и масен детектор. Бинарната пумпа (Waters, ser. no. C11UPB296A), просторот за колони (Waters, ser. no. C11UPM410G), аналитичката колона Kinetex®C18 (1.7µm 100A, LC Column 50x2.1 mm) и автосамплерот (Waters, ser. no. C11UPA931M) се составни делови на течниот хроматограф. Масениот (MS/MS) детекторот е од типот троен квадрипол (Waters, ser. no. QBB1427). За собирање и обработка на податоци од инструментот се користи софтверот MassLynx software version 4.1.

4.5 Подготовка на раствори

- **Подготовка на McIlvaine пуфер pH 3.5, 0.01 mol/dm³**

Во одмерна корба од 1000 mL се растворот 11.80 g лимонска киселина, 13.72 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, и 33.62 g Na₂EDTA. Се додава 950 mL вода и се подесува pH на 3.5 со 1 M

хлороводородна киселина, а потоа се дополнува со вода до 1 L. Овој пуфер може да употребува 1 месец ако се чува во фрижидер.

- **Подготовка на 20% раствор од трихлороцетна киселина**

Растворот се подготвува со растворање на 20 g трихлороцетна киселина со 80 ml вода (H₂O).

- **Подготовка на мобилна фаза**

Мобилна фаза А: вода со 0.1 % мравска киселина

Во мензура од 1000 ml се полни 950 ml LC-MS/MS вода, се додава 1 ml мравја киселина и се дополнува со LC-MS/MS вода до 1 L.

Мобилна фаза Б: ацетонитрил со 0.1 % мравска киселина

Во мензура од 1000 ml се полни 950 ml LC-MS/MS ацетонитрил, се додава 1 ml мравска киселина и се дополнува со LC-MS/MS ацетонитрил до 1 L.

4.6 Подготовка на стандарди раствори

Основните стандарди од антибиотиците со концентрација од 1 mg/mL се подготвени во метанол, освен цефтиофлур кој е подготвен во метанол и диметилсулфоксид во сооднос 9:1 и ципрофлоксацин кој е подготвен во метанол и 2 M амониум хидроксид во сооднос 9:1. Основните раствори се чуваат на -20°C.

За добивање на масениот спектар од основните стандарди беа подготвени поединечни стандарди со концентрација од 1 µg/ml и истите беа директно инјектирани во масениот детектор за добивање на главниот јон и продукт јоните.

За потребите на валидацијата на методот работните стандарди беа поделени во групи врз основа на максималното дозволено ниво на остатоци (MRL), при што во една група припаѓаат антибиотиците кои имаат иста MRL вредност (Табела 5).

Миксовите од работни стандарди беа подготвени од основните раствори. Работните раствори за групи 1 и 2 се со концентрација 1000 µg/L, за работните групи 3 и 4 се со концентрација 1000 µg/L и 10 mg/L, додека за 5 и 6 група концентрацијата на работниот раствор е 10 mg/L. Збогатувањето на примероци млеко за калибрација во матрикс, како и за прецизност и точност на методот се прикажани во табела 7 и табела 8 во делот за валидација.

Табела 5. Групи на антибиотици за потребите на валидацијата на методот

Група	Антибиотици	MRL ($\mu\text{g/L}$)
Група 1	Амоксицилин Ампицилин Бензилпеницилин	4
Група 2	Клоксацилин Оксацилин	30
Група 3	Тилозин Триметоприм	50
Група 4	Цефапирин	60
Група 5	Цефалексин Цефтиофур Ципрофлоксацин Енрофлоксацин Доксициклин Хлортетрациклин Окситетрациклин Тетрациклин Сулфахлоропиридазин Сулфафуразол Сулфадиазин Сулфадиметоксин Сулфадимидин Сулфаметоксазол	100
Група 6	Линкомицин	150

4.7 LC-MS/MS метод

➤ Оптимизација на MS/MS услови

Со цел да се определи масениот спектар на антибиотиците и сулфонамидите вклучени во ова истражување во масениот детектор беа директно инјектирани поединечни стандарди со концентрација од $1 \mu\text{g/mL}$. При тоа беше скениран масениот спектар и беа утврдени главните-прекурсор јони (precursor ions) и продукт јоните (daughter ions). Условите на MS/MS детекторот дадени се во Табела 6.

Табела 6. MS/MS услови

Type of ionization	ES+	Cone gas flow (L/Hr)	100
Capillary (kV)	4.0	LM 1 resolution	11
Cone (V)	26	HM 1 resolution	14.7
Extractor (V)	3.0	Ion energy 1	0.5
RF Lens (V)	0.1	Entrance	50
Source temperature °C	150	LM 2 resolution	10.0
Desolvation gas flow (L/Hr)	400	Ion energy 2	1.8

➤ Хроматографски услови

Хроматографската сепарација се врши со користење на колоната Kinetex®C18 (1.7µm 100A, LC Column 50x2.1 mm). Температурата на колоната е 40°C, а температурата на автосамплерот е 10°C. Раздвојувањето е градиентно, а градиентот се состои од две мобилни фази: мобилна фаза А: вода (LC-MS чистота) со 0.1 % мравска киселина и мобилна фаза Б: ацетонитрил со 0.1 % мравска киселина (Табела 7). Волуменот на ињектирање е 10 µl. Времето на една анализа изнесува 13 минути.

Табела 7. Сооднос на мобилните фази и протокот

Време (min)	Проток (ml/min)	Мобилна фаза А (%)	Мобилна фаза Б (%)
0.00	0.4	98.0	2.0
0.75	0.4	98.0	2.0
7.0	0.4	50.0	50.0
11.0	0.4	0.00	100.0
11.5	0.4	98.0	2.0
13.0	0.4	98.0	2.0

4.8 Оптимизација на процедурата за екстракција

Подготовката на примерокот за анализа честопати претставува критичен чекор во воспоставувањето на еден аналитички метод. Поради тоа беше направена оптимизација на процедурата за екстракција, при што беа користени различни растворувачи. Тоа се следните растворувачи: ацетонитрил, метанол, ацетонитрил:метанол (50:50) и 20 % трихлорооцетна киселина и McIlvaine пуфер. Прочистување на примероците во сите случаи беше изведено со Oasis HLB колони за цврсто-фазна екстракција. Исто така беше користена и една процедура со течно-течна екстракција со употреба на мешавина од ацетонитрил (10 ml) и 5 % трихлорооцетна киселина (2 mL). Како критериум за прифатливост на процедурата беше користен аналитичкиот принос. За таа цел, при оптимизација на претходно наведените растворувачи за екстракција, беше направено збогатување на негативни примероци млеко со стандарди од антибиотици на 3 концентрациски нивоа и тоа 0.5, 1.0, 1.5 * MRL. На секое концентрациско ниво беа подготвени по 6 репликати и истите се анализираа трикратно на LC-MS/MS. Истата процедура беше повторена за сите растворувачи. Во следниот чекор

беше направена пресметка на аналитичкиот принос и врз основа на резултатите, беше одбран најсоодветниот растворувач.

4.9 Подготовка на примероци млеко

Пред подготовката примероците се одмрзнуваат, се стабилизираат на собна температура и се промешуваат. Потоа следи екстракција на остатоците од антибиотици.

- Се одмеруваат 5 ml млеко во пластична туба од 50 ml
- Се додаваат 2 mL од 20% TCA и примерокот се меша 5 min на хоризонтална мешалка
- Се додаваат 20 mL McIlvaine пуфер и примерокот се меша 1 min на вортекс
- Примероците се центрифугираат на $+4^{\circ}\text{C}$, 4000 rpm, 20 min.
- Се одвојува супернатантот по што следи цврсто-фазна екстракција со Oasis HLB колони

➤ Цврсто-фазна екстракција

- Колоните се активираат со 3 mL метанол
- Колоните се мијат со 2 mL вода
- Се аплицира супернатантот од пробите
- По истекувањето на примерокот колоните се мијат со 4 mL вода
- Колоните се сушат 20 min под вакуум
- Остатоците од антибиотици се елуират со 3mL метанол
- Елуатот се испарува под струја од азот на 35°C
- Остатоците се раствораат со 250 μl мешавина од мобилна фаза(98% А : 2% Б)
- Примероците се филтрираат со филтер, 0.22 μm , во виали за автосамплер од 2 ml
- 10 μl се инјектираат во LC-MS/MS системот

4.10 Валидација на методот

Валидацијата на методот претставува истражување кое се спроведува со цел да се добијат аналитички резултати со прифатливо ниво на несигурност. Исто така, валидацијата претставува потврда од испитување и обезбедување на објективни докази дека се исполнети посебни барања за одредена намена. Со валидацијата на методот се обезбедува потврда за дека протоколот за дефиниран аналитички метод е применлив за одреден тип на материјал за тестирање и за одредена концентрација на аналитот. Методот за определување на антибиотици во млеко беше валидиран согласно критериумите за дозволени супстанции (супстанции кои имаат MRL-вредност) пропишани во Одлуката на Европската Комисија од 12 август 2002 година. За целите на валидацијата, за секој антибиотик, беа проценети параметрите: линеарност на методот, лимит на детекција (LOD), лимит на квантификација (LOQ), лимит на одлучување (Decision limit – $CC\alpha$), способност за докажување (Detection capability – $CC\beta$), специфичност/селективност, точност (изразена преку аналитичкиот принос) и прецизност (изразена преку повторливост и репродуцибилност) (2002/657/EC; Taverniers и соп. 2004)

➤ Линеарност

Линеарност е способност на аналитичкиот метод за добивање на резултати од тестирањето кои се директно пропорционални на концентрацијата на аналитот во примерокот. Всушност линеарноста претставува односот помеѓу добиениот сигнал (во нашиот случај сигналот добиен со LC-MS/MS техниката и концентрацијата на аналитот). Линеарноста се определува преку конструирање на калибрациона крива со растворање на стандардите во соодветен растворувач или во матриксот кој се испитува (калибрација во матрикс). При тоа се врши мерење на одговорот на методите на различни концентрациски нивоа на аналитите. Мерењето се врши во минимум 5 точки и минимум 3 повторувања. Коефициентот на корелација (r^2) е параметар кој се користи за проценка на линеарноста на методот. За методот да биде линеарен овој коефициент треба да изнесува ≥ 0.98 .

Во оваа истражување калибрационата крива беше конструирана од шест стандардни раствори, со ниво на концентрација 0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 и $3,0 * MRL$, при што секој

стандарден раствор беше инјектиран по шест пати. Стандардите беа подготвени во млеко (калибрација во матрикс) што всушност значи дека стандардите поминуваат низ целата постапка на екстракција како и примероците за тестирање, односно стандардите и примероците се подготвени под истите услови. Во табела 8 е прикажано збогатувањето на примероците со млеко со стандарди од антибиотици за конструирање на калибрациона крива. Волуменот на млеко кој се користи е 5 ml.

Табела 8. Збогатување на примероците од млеко со стандарди од антибиотици за калибрациона крива

Група 1, KPP* 1000 µg/L		Група 2, KPP* 1000 µg/L		Група 3, KPP* 1000 µg/L ¹ и 10 mg/L ²		Група 4, KPP* 1000 µg/L ¹ и 10 mg/L ²		Група 5, KPP* 10 mg/L		Група 6, KPP* 10 mg/L	
KM** µg/L	ДВ*** µL	KM** µg/L	ДВ*** µL	KM** µg/L	ДВ*** µL	KM** µg/L	ДВ*** µL	KM** µg/L	ДВ*** µL	KM** µg/L	ДВ*** µL
1	5	7.5	37.5	12.5	62.5 ¹	15	7.5 ¹	25	12.5	37.5	18.75
2	10	15	75	25	12.5 ²	30	15 ²	50	25	75	37.5
4	20	30	150	50	25 ²	60	30 ²	100	50	150	75
8	40	60	300	100	50 ²	120	60 ²	200	100	300	150
12	60	90	450	150	75 ²	180	90 ²	300	150	450	225

*KPP – Концентрација на работен раствор; **KM – концентрација на млеко; *** ДВ – додаден волумен; ¹ се зема од стандардот со концентрација 1000 µg/L; ² се зема од стандардот со концентрација 10 mg/L

➤ Селективност/специфичност

Специфичност на аналитичкиот метод е дефинирана како способност на методот за разликување на сигналите кои потекнуваат од аналитите кои се од интерес од останатите интерферирачки компоненти. За аналитичкиот метод најважна е способноста за разликување на целниот аналит од неговите сродни супстанции (хемиски и физички интерференции) што придонесуваат за несигурност на анализата. Селективноста на аналитичкиот метод е дефинирана како способност на методот да го квантифицира аналитот во присуство на други слични компоненти што може да бидат присутни во примерокот, под услов тие компоненти да не се мешаат меѓусебе.

Специфичност/селективност е својство на методот што овозможува точно и конкретно да се одреди посакуваниот аналит во присуство на други компоненти во примерокот под одредени услови за тестирање. Специфичноста и селективноста на методот се утврдени

преку анализа на серија од 20 негативни примероци на млеко и анализа на серија од 20 примероци млеко кои се збогатени со стандарди од антибиотици.

➤ **Лимит на детекција (LOD).**

LOD ја претставува најмалата концентрација од аналитот која може да се детектира во матриксот. Во ова истражување LOD е определен преку односот сигнал/шум (S/N) при анализа на примероци од сурово млеко збогатени со стандарди од антибиотици во концентрација од $0,05 * \text{MRL}$. LOD се пресметува како концентрација што одговара на сигнал (S), што е 3 пати поголема од висината на шумот (N) ($\text{LOD} = 3 \times \text{S/N}$).

➤ **Лимит на квантификација (LOQ)**

LOQ ја претставува најниската концентрација на аналитот во матриксот која може квантитативно да се определи со соодветна прецизност и точност. LOQ е определен преку односот сигнал/шум (S/N) при анализа на примероци од сурово млеко збогатени со стандарди од антибиотици во концентрација од $0,05 * \text{MRL}$. LOQ се пресметува како концентрација што одговара на сигнал (S), што е 10 пати поголема од висината на шумот (N) ($\text{LOQ} = 3 \times \text{S/N}$).

➤ **Лимит на одлучување – $\text{CC}\alpha$**

Лимит на одлучување $\text{CC}\alpha$ е граница на која и изнад која може да се заклучи дека примерокот е позитивен (не задоволува), со веројатност на α грешка ($\alpha=5\%$). α грешка претставува веројатност дека анализираниот примерок е навистина негативен иако се добиени позитивни резултати (лажно позитивен резултат). Во оваа истражување $\text{CC}\alpha$ е определена со збогатување на 20 негативни примероци млеко со стандарди од антибиотици на концентрациско ниво на MRL вредноста. Лимитот на одлучување се пресметува на следниот начин: соодветната MRL концентрација $+1,64*$ соодветната стандардна девијација.

$$\text{CC}\alpha = \text{MRL} + 1.64 * \text{SD}$$

➤ Способност за докажување – ССβ

Способност за докажување ССβ, е најмалата содржина на аналитот што може да се детектира, идентификува и квантифицира во примерокот со веројатност на β-грешка (β=5%). β-грешка е веројатност дека анализираниот примерок е навистина позитивен иако се добиени негативни резултати (лажно негативен резултат). ССβ е определена со збогатување на 20 негативни примероци млеко со стандарди од антибиотици на концентрациско ниво кое одговара на добиената вредност за ССа. ССβ се пресметува на следниот начин: добиената вредност за ССа + 1,64* соодветната стандардна девијација.

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 * SD$$

➤ Точност

Точноста на аналитичкиот метод се дефинира како совпаѓање помеѓу средната вредност добиена во текот на експериментот и прифатената референтна вредност. Одредувањето на овој параметар овозможува проценка на ефектот на систематската грешка на методот врз конечниот резултат. Во случај кога не постои сертифициран референтен материјал точноста се изразува преку аналитичкиот принос. Аналитичкиот принос се добива при збогатување на негативни примероци со стандарден раствор од целните аналити на 3 концентрациски нивоа, и претставува однос помеѓу вредноста од добиената концентрација и вредноста од додадената концентрација.

$$\text{Аналитички принос (\%)} = \text{измерена концентрација} / \text{додадена концентрација} \times 100$$

Точноста е определена преку збогатување на примероци млеко со стандарди од антибиотици на 3 концентрациски нивоа и тоа 0.5, 1.0, 1.5 * MRL. На секое концентрациско ниво беа подготвени по 6 репликати. Сите примероци беа анализирани на LC-MS/MS по три пати. Прифатливите критериуми за аналитичкиот принос, според 2002/657/EC, се следните:

- За концентрација $\leq 1 \mu\text{g/kg}$ граничната вредност за аналитичкиот принос е од **-50 до + 20 %**, што практично значи дека аналитичкиот принос треба да се движи од **50 до 120 %**;
- За концентрација $> 1 \mu\text{g/kg}$ до $10 \mu\text{g/kg}$ граничната вредност за аналитичкиот принос е од **-30 до + 10 %**, што практично значи дека аналитичкиот принос треба да се движи од **70 до 110 %**;
- За концентрација $\geq 10 \mu\text{g/kg}$ граничната вредност за аналитичкиот принос е од **-20 до + 10 %**, што практично значи дека аналитичкиот принос треба да се движи од **80 до 110 %**

➤ Прецизност

Прецизността на аналитичкиот метод се дефинира како совпаѓање на добиените резултати од експериментот добиени со серија мерења, под строго определени услови. Прецизността на методот се определува преку повторливоста и репродуцибилноста, а се проценува преку релативната стандардна девијација (RSD, %) односно коефициентот на варијација (CV, %), изразен во проценти.

Повторливоста (CV_r) на аналитичкиот метод ја изразува прецизността при истите услови во краток временски интервал. Повторливоста се нарекува и прецизност во текот на денот. Во оваа истражување повторливоста на методот беше определена со збогатување на 18 (3×6 ; 3 концентрациски нивоа, 6 репликати) негативни примероци млеко на три концентрациски нивоа и тоа 0.5 , 1.0 , $1.5 \times \text{MRL}$. Сите примероци беа анализирани трикратно.

Репродуцибилноста (CV_R) беше процената со истите аналитичка постапки, ист метод, ист инструмент, ист аналитичар и исти примероци, но во три различни дена.

Во табела 9 е прикажано збогатувањето на примероците од млеко со стандарди од антибиотици, во три концентрациски нивоа ($0.5 \times \text{MRL}$; $1 \times \text{MRL}$; $1.5 \times \text{MRL}$). Волуменот на млеко е 5 ml .

Табела 9. Збогатувањето на примероците од млеко со стандарди од антибиотици за прецизност и точност

Група 1, КРР* 1000 µg/L		Група 2, КРР* 1000 µg/L		Група 3, КРР* 10 mg/L		Група 4, КРР* 10 mg/L		Група 5, КРР* 10 mg/L		Група 6, КРР* 10 mg/L	
КМ** µg/L	ДВ*** µL	КМ** µg/L	ДВ*** µL	КМ** µg/L	ДВ*** µL	КМ** µg/L	ДВ*** µL	КМ** µg/L	ДВ*** µL	КМ** µg/L	ДВ*** µL
2	10	15	75	25	12.5	30	15	50	25	75	37.5
4	20	30	150	50	25	60	30	100	50	150	75
6	30	45	225	75	37.5	90	45	150	75	225	112.5

*КРР – Концентрација на работен раствор; **КМ – концентрација на млеко; *** ДВ – додаден волумен

Прифатливите критериуми за прецизноста, според 2002/657/ЕС, се следните:

- За концентрација **1 µg/kg** коефициентот на варијација да биде **колку што е можно понизок**;
- За концентрација **10 µg/kg** коефициентот на варијација да биде **колку што е можно понизок**;
- За концентрација **100 µg/kg** коефициентот на варијација да биде максимално до **23 %**;
- За концентрација **1000 µg/kg** коефициентот на варијација да биде максимално до **16 %**.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 Оптимизација на LC-MS/MS методот

Со оптимизација на MS/MS методот со директно инјектирање на поединечни стандарди од антибиотиците со концентрација од 1 µg/mL во масениот детектор е добиен масениот спектар на антибиотиците, главниот јон, продукт јоните, како и енергијата на колизија. Со оптимизација на LC методот добиени се ретенционите времиња на антибиотиците. Продукт јонот со најголем интензитет се користи за квантификација, додека вториот продукт јон се користи за идентификација. Сите антибиотици беа добиени со електроспреј + јонизација (ESI+). Вкупното време за анализа изнесуваше 13 минути. Параметрите од оптимизација се прикажани во Табела 10.

Табела 10. MRM параметри и ретенционото време од оптимизација на LC-MS/MS методот

Стандард	Формула/Маса		Главен јон	Колинс енер.	Продукт јон	KE	CV	PВ
Амоксицилин	365.4+H ⁺ =366.4	1 2	367.07 367.07	28 28	159.96 90.89	16 40	28	6.06
Ампицилин	349.4+H ⁺ =350.4	1 2	350.05 350.05	26 26	105.98 159.96	20 12	26	3.00
Бензилпеницилин	334.4+H ⁺ =335.4	1 2	334.99 334.99	44 44	90.96 80.94	42 52	44	3.31
Цефалексин	347.4+H ⁺ =348.4	1 2	347.99 347.99	22 22	157.89 173.95	8 16	22	2.97
Цефтиофур	523.5+H ⁺ =524.5	1 2	523.96 523.96	34 34	241.00 125.17	16 58	34	5.67
Цефапирин	423.4+H ⁺ =424.4	1 2	423.99 423.99	24 24	291.99 151.97	16 30	24	2.40
Ципрофлоксацин	331.3+H ⁺ =332.3	1 2	332.01 332.01	38 38	245.05 230.94	28 40	38	3.43
Клоксацилин	435.8+H ⁺ =436.8	1 2	435.94 435.94	26 26	159.97 276.96	18 14	26	7.68
Доксициклин	444.4+H ⁺ =445.4	1 2	445.05 445.05	28 28	153.92 97.92	30 44	28	3.31
Енрофлоксацин	359.4+H ⁺ =360.4	1	360.05	36	245.09	30	36	

		2	360.05	36	72.02	36		4.32
Линкомицин	406.5+H ⁺ =407.5	1	407.09	34	126.02	30	34	2.59
		2	407.09	34	41.79	72		
Оксацилин	401.4+H ⁺ =402.4	1	402.05	24	159.96	10	24	7.51
		2	402.05	24	243.01	12		
Окситетрациклин	460.4+H ⁺ =461.4	1	462.01	46	97.92	38	46	4.23
		2	462.01	46	153.98	30		
Сулфаклоропирида зин	284.7+H ⁺ =285.7	1	284.90	28	155.93	16	28	3.23
		2	284.90	28	91.93	34		
Сулфадиазин	250+H ⁺ =251	1	250.97	28	91.93	30	28	1.71
		2	250.97	28	155.93	14		
Сулфадиметоксин	310+H ⁺ =311	1	310.97	36	155.93	20	36	5.01
		2	310.97	36	91.93	32		
Сулфадимидин	278.3+H ⁺ =279.3	1	278.95	34	185.93	18	34	2.70
		2	278.95	34	91.93	36		
Сулфафуразол	267+H ⁺ =268	1	267.97	26	155.95	16	26	4.81
		2	267.97	26	112.95	18		
Сулфаметоксазол	253.2+H ⁺ =254.2	1	253.91	28	92.00	30	28	3.47
		2	253.91	28	155.94	16		
Триметоприм	290.3+H ⁺ =291	1	291.08	44	122.95	24	44	3.01
		2	291.08	44	230.06	24		
Тиловин	916.1+H ⁺ =917.1	1	916.43	56	174.07	46	56	7.87
		2	916.43	56	100.97	56		
Тетрациклин	444.4+H ⁺ =445	1	445.05	26	410.08	20	26	4.29
		2	445.05	26	97.92	48		
Хлортетрациклин	478.8+H ⁺ =479.8	1	479.1	25	444.0	25	25	4.75
		2	479.1	25	462.0	15		

PВ –ретенционо време, KE-енергија на колизија, CV-cone voltage

5.2 Оптимизација на процедурата за екстракција на анализите од примерокот

Подготовката на примерокот пред хроматографската анализа за определување на остатоци од антибиотици и сулфонамиди во млеко, слично како и подготовката на другите остатоци и контаминенти од различни матрикси, вклучува екстракција на остатоците од сложените хетерогени матрици, отстранување на интерференциите со соодветен растворувач и концентрирање на анализите. Една од целите на оваа истражување е оптимизација на единствен аналитички метод за екстракција на различни класи на антибиотици, вклучувајќи β-лактами, сулфонамиди, тетрациклини, макролиди, цефалоспорини, хинолони, линкомицин, со многу различни карактеристики и со висок степен на хетерогеност, од сурово млеко. При оптимизација на процедурата за екстракција беа користени 5 различни

протоколи, при што кај 4 протоколи беше користена цврсто-фазна екстракција, а кај еден протокол беше користена течно-течна екстракција. Во првиот случај беа користени 4 различни растворувачи ацетонитрил, метанол, ацетонитрил:метанол (50:50) и 20 % трихлорооцетна киселина и McIlvaine пуфер. Прочистувањето на примероците во сите случаи беше изведено со Oasis HLB колони за цврсто-фазна екстракција. Во вториот случај, при течно-течна екстракција беше користена мешавина од ацетонитрил (10 ml) и 5 % трихлорооцетна киселина (2 mL). Критериум за прифатливост беше аналитичкиот принос, кој беше определен на три концентрациски нивоа, со збогатување на негативни примероци млеко со стандарди на следните нивоа 0.5, 1.0, 1.5 * MRL.

Резултатите за аналитичкиот принос при употреба на протоколите со 4 различни растворувачи и цврсто-фазна екстракција се прикажани во табела 10. Резултатите од употребата ацетонитрил и трихлорооцетна киселина беа незадоволителни бидејќи тетрациклините, како и ампицилинот и бензилпеницилинот, воопшто не беа екстрахирани и детектирани, а за останатите бета-лактами аналитичкиот принос беше многу низок, поради што овие резултати воопшто не се вклучени во табеларниот приказ на резултатите. Во останатите случаи аналитичкиот принос се движи од 71.96 до 108.74 % при употреба на TCA 20% и Na₂EDTA- McIlvaine пуфер, од 14.36 до 105.25 % при употреба на ацетонитрил, од 12.36 до 89.78 % при употреба на метанол, а додека при употреба на ACN:MeOH (50:50) аналитичкиот принос се движеше од 20.78 до 108.15 % (Табела 11). Од добиените резултати може да се заклучи дека пропишаните критериуми, согласно 2002/657/EC, за аналитичкиот принос ги исполнува единствено методот за екстракција во кој се употребува TCA 20% и Na₂EDTA- McIlvaine пуфер, поради што овој метод беше одбран како соодветен метод за екстракција на повеќе класи на антибиотици во сурово млеко, односно антибиотиците кои беа цел на оваа истражување.

Табела 11. Аналитички принос на методот при употреба на различни растворувачи за екстракција

Р.б.	Антибиотик	Ниво на збогатување µg/L)	Аналитички принос, %			
			TCA 20% и Na ₂ EDTA-McIlvaine пуфер	ACN	MeOH	ACN:MeOH (50:50)
1	Амоксицилин	2.0	73.00	74.56	75.26	85.15
		4.0	81.25	71.22	70.48	72.11

		6.0	80.33	78.13	70.56	104.15
2	Ампицилин	2.0	76.15	81.34	72.11	91.36
		4.0	94.50	87.84	75.88	84.13
		6.0	86.17	75.30	71.13	97.22
3	Бензилпеницилин	2.0	71.96	78.34	72.68	108.24
		4.0	85.25	95.15	74.35	103.15
		6.0	74.33	81.35	77.18	88.64
4	Клоксацилин	15	83.20	71.65	71.36	88.35
		30	95.40	77.21	70.18	92.44
		45	85.51	80.15	78.25	79.18
5	Оксацилин	15	86.40	81.36	69.36	79.18
		30	87.53	88.54	74.18	91.90
		45	80.36	91.15	72.11	101.36
6	Триметоприм	25	107.23	90.12	72.11	91.36
		50	95.93	81.45	71.45	88.88
		75	102.37	88.35	77.12	94.17
7	Тилозин	25	92.46	71.34	82.55	90.36
		50	97.88	75.14	89.78	81.45
		75	95.43	70.34	81.20	85.15
8	Цефепирин	30	83.08	81.26	74.15	81.33
		60	91.88	74.13	72.18	81.54
		90	90.77	85.14	72.15	94.13
9	Цефалексин	50	83.50	84.56	72.15	94.13
		100	88.38	91.45	78.14	77.87
		150	88.10	86.18	70.46	79.14
10	Цефтиофур	50	92.30	84.36	78.46	97.88
		100	87.46	89.15	77.15	91.46
		150	94.10	80.32	70.26	92.18
11	Енрофлоксацин	50	97.54	78.61	68.34	82.17
		100	92.54	75.14	70.25	77.46
		150	96.77	77.22	73.14	85.12
12	Ципрофлоксацин	50	85.76	81.36	70.36	88.36
		100	84.16	79.54	72.55	81.55
		150	90.81	76.33	69.34	74.13
13	Тетрациклин	50	81.56	29.34	26.38	34.41
		100	84.15	31.15	22.15	31.48
		150	80.89	26.54	24.36	37.89
14	Окситетрациклин	50	83.56	15.22	22.11	31.46
		100	88.25	18.17	24.13	24.15
		150	97.43	21.35	27.32	22.45
15	Хлоротетрациклин	50	84.88	14.36	12.36	22.15
		100	102.15	21.48	15.46	29.64
		150	98.32	21.55	17.13	20.78
16	Доксициклин	50	86.78	22.45	21.48	39.40
		100	89.12	17.34	17.35	38.42
		150	95.03	18.55	23.44	36.15
17	Линкомицин	75	105.08	81.36	88.36	82.54
		150	88.46	82.15	78.48	85.46
		225	102.88	91.35	81.36	90.17
18	Сулфаклорпиридазин	50	108.70	91.36	70.18	81.84
		100	97.88	92.54	74.36	85.86
		150	102.09	87.46	72.14	79.12
19	Сулфафуразол	50	95.56	92.36	75.76	81.88
		100	92.15	98.77	81.38	85.14

		150	94.22	102.15	80.46	82.17
20	Сулфадиазин	50	84.88	91.94	70.13	80.14
		100	97.48	90.15	72.15	81.56
		150	96.77	79.14	69.40	89.14
21	Сулфадимидин	50	100.92	90.36	71.38	75.14
		100	108.74	92.11	70.32	79.36
		150	99.43	87.56	73.18	71.22
22	Сулфаметоксазол	50	89.32	103.18	75.46	80.25
		100	82.14	105.25	78.23	74.33
		150	91.68	92.11	81.14	77.18
23	Сулфадиметоксин	50	85.50	75.22	74.22	81.33
		100	98.14	81.36	79.46	75.17
		150	89.57	80.12	71.55	81.46

5.3 Валидација на методот

5.3.1 Линеарност на методот

Линеарноста на аналитичкиот метод за определување на антибиотици во сурово млеко е добиена преку конструирање на калибрациона крива од 6 точки со шест повторувања со стандарди во матрикс млеко (калибрација во матрикс). Поради различните препорачани концентрации калибрационите криви за стандардите припремени во сурово млеко беа во различен опсег и тоа 0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 * MRL (Табела 8). Проценка на линеарноста на методот се врши преку коефициентот на корелација (r^2) кој е прикажан во Табела 12. Вредноста на коефициентот на корелација се движеше во граници од 0.9800 (оксацилин) до 0.9991 (тилозин и сулфафуразол), што значи дека постои линеарна зависност помеѓу површината на пиковите и концентрацијата на стандардите, односно дека методот е линеарен.

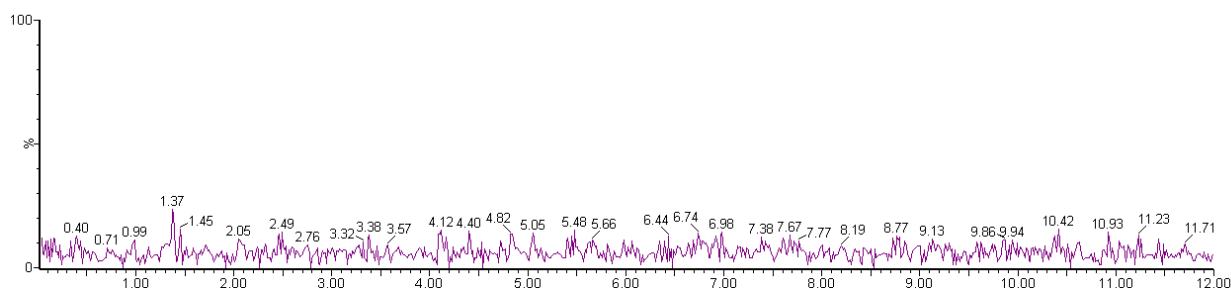
Табела 12. Линеарност на методот за определување на антибиотици во сурово млеко

Антибиотици	Калибрациона крива ($\mu\text{g/L}$)	r^2
Амоксицилин	0-12	0.9941
Ампицилин	0-12	0.9831
Бензилпеницилин	0-12	0.9900
Клоксацилин	0-90	0.9834

Оксацилин	0-90	0.9800
Сулфаклоропиридазин	0-300	0.9936
Сулфафуразол	0-300	0.9991
Сулфадиазин	0-300	0.9974
Сулфадимидин	0-300	0.9964
Сулфаметоксазол	0-300	0.9935
Сулфадиметоксин	0-300	0.9812
Триметоприм	0-150	0.9846
Тилозин	0-150	0.9991
Цефтиофур	0-300	0.9917
Цефалексин	0-300	0.9804
Цефапирин	0-180	0.9848
Енрофлоксацин	0-300	0.9817
Ципрофлоксацин	0-300	0.9946
Тетрациклин	0-300	0.9880
Окситетрациклин	0-300	0.9801
Хлоротетрациклин	0-300	0.9874
Доксициклин	0-300	0.9940
Линкомицин	0-225	0.9877

5.3.2 Селективност/специфичност на методот

Специфичноста и селективноста на методот се утврдени преку анализа на серија од 20 негативни примероци на млеко и анализа на серија од 20 примероци млеко кои се збогатени со стандарди од антибиотици. На слика 12 е прикажан негативен примерок од млеко, додека на слика 2 е прикажан примерок од млеко збогатен со стандарди со антибиотици, од што може да се заклучи дека пиковите се јасно раздвоени, не се преклопуваат и нема ефекти на матриксот во опсегот на ретенционото време во кое се појавуваат пиковите од антибиотиците.



Слика 12. Хроматограм од негативен примерок млеко

5.3.3 LOD, LOQ, CC α и CC β

Резултатите за LOD, LOQ, CC α и CC β се прикажани во Табела 13. За подобра прегледност и појасна слика во табелата е прикажана вредноста за MRL. Резултатите за LOD се во опсег 0.17 $\mu\text{g/L}$ за бензилпеницилин до 6.94 $\mu\text{g/L}$ за сулфадимидин, додека резултатите за LOQ се движат во опсег од 0.50 $\mu\text{g/L}$ за бензилпеницилин до 22.71 $\mu\text{g/L}$ за сулфадимидин.

Од добиените резултати за LOD и LOQ може да се заклучи дека антибиотиците во сурово млеко може да се детектираат во значително ниски концентрациски нивоа, односно дека методот има добра и ниска осетливост. Тоа практично значи дека и при анализа на реални примероци млеко антибиотиците ќе бидат детектирани во ниски концентрациски нивоа, што е од огромно значење за безбедноста на млекото и заштитата на здравјето на луѓето. Вредностите за CC α во сурово млеко беа во граница од 4.43 $\mu\text{g/L}$ (амоксицилин) до 151.74 $\mu\text{g/L}$ (линкомицин), додека вредностите за CC β беа во опсег од 4.88 $\mu\text{g/L}$ (амоксицилин) до 178.33 $\mu\text{g/L}$ (линкомицин). Добиените вредности за CC α и CC β се во согласност со критериумите пропишани во 2002/657/EC, од што може да се заклучи дека методот ги исполнува условите за CC α и CC β за дозволени супстанции.

Табела 13. Резултати за LOD, LOQ, CC α и CC β

Р.б.	Антибиотик	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	CC α ($\mu\text{g/L}$)	CC β ($\mu\text{g/L}$)	MRL ($\mu\text{g/L}$)
1	Амоксицилин	0.23	0.76	4.43	4.88	4
2	Ампицилин	0.29	0.98	4.49	4.92	4
3	Бензилпеницилин	0.17	0.50	4.58	5.10	4
4	Клоксацилин	2.14	7.06	33.77	36.83	30
5	Оксацилин	1.78	5.87	32.31	35.58	30
6	Триметоприм	2.36	7.80	54.45	59.63	50
7	Тилозин	2.57	8.48	54.97	61.70	50
8	Цефапирин	3.24	10.70	68.73	75.78	60
9	Цефалексин	5.23	17.25	111.28	125.85	100
10	Цефтиофур	4.46	14.72	109.83	123.86	100
11	Енрофлоксацин	5.46	18.04	113.17	121.50	100
12	Ципрофлоксацин	4.01	13.23	107.12	111.35	100
13	Тетрациклин	4.12	13.60	115.34	121.57	100
14	Окситетрациклин	5.32	17.54	109.46	115.23	100
15	Хлоротетрациклин	6.86	22.23	106.14	109.44	100

16	Доксициклин	5.51	18.18	122.33	139.78	100
17	Линкомицин	6.31	20.82	151.74	178.33	150
18	Сулфалхоропиридазин	5.15	17.00	104.13	108.22	100
19	Сулфафуразол	3.98	13.13	107.33	115.47	100
20	Сулфадиазин	5.56	18.31	106.22	112.00	100
21	Сулфадимидин	6.94	22.71	117.38	134.66	100
22	Сулфаметоксазол	4.22	14.05	112.36	124.33	100
23	Сулфадиметоксин	5.92	19.55	109.22	118.15	100

5.3.4 Точност и прецизност на методот

Точноста на аналитичкиот метод е утврдена преку пресметување на аналитичкиот принос (%), со збогатување на примероците со стандарди на антибиотици на три концентрациски нивоа (0.5, 1.0, 1.5 * MRL). Прецизноста на аналитичкиот метод е добиена преку повторливоста и репродуцибилноста во текот на 3 различни дена на три концентрациски нивоа (0.5, 1.0, 1.5 * MRL). Прецизноста е изразена преку коефициентот на варијација за повторливост (во еден ден) (CV_r , %) и коефициент на варијација за репродуцибилност (во 3 различни дена) (CV_R , %). Резултатите за точноста и прецизноста се прикажани во Табела 14. Аналитичкиот принос за сурово млеко се движи во граници од 71.96 % (бензилпеницилин, концентрациско ниво од 2.0 $\mu\text{g/L}$) до 108.74% (сулфадимидин, концентрациско ниво од 100.0 $\mu\text{g/L}$). Коефициентот на варијација (CV_r , %) за повторливоста на методот се движи во опсег од 1,08% (тилозин во концентрација од 50 $\mu\text{g/L}$ и линкомицин во концентрација од 100 $\mu\text{g/L}$) до 20.28% (амоксицилин во концентрација од 2.0 $\mu\text{g/L}$), додека CV_R на методот се движи во граница од 3.14 % (линкомицин во концентрација од 100 $\mu\text{g/L}$) до 22.88% (окситетрациклин при концентрација од 50 $\mu\text{g/L}$). Резултатите за аналитичкиот принос и CV не ги надминаа прифатливите вредности пропишани во 2002/657/EC, што всушност значи дека методот е соодветен за неговата намена и може да се користи за определување на антибиотици во сурово млеко.

На слика 13 се прикажани хроматограмите од примероци млеко збогатени со стандарди од антибиотици на концентрациски ниво 2.

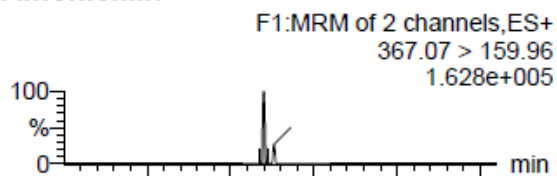
Табела 14. Точност и прецизност на методот

Антибиотик	Ниво на збогатување (µg/L)	Аналитички принос (%)	CV _r , %	CV _R , %
Амоксицилин	2.0	73.00	20.28	22.17
	4.0	81.25	8.14	10.56
	6.0	80.33	12.46	14.78
Ампицилин	2.0	76.15	19.24	21.23
	4.0	94.50	15.36	17.66
	6.0	86.17	3.54	6.12
Бензилпеницилин	2.0	71.96	13.46	17.11
	4.0	85.25	8.12	12.03
	6.0	74.33	12.56	16.04
Клоксацилин	15	83.20	17.45	22.17
	30	95.40	15.22	19.14
	45	85.51	6.12	9.66
Оксацилин	15	86.40	8.14	11.14
	30	87.53	12.06	18.05
	45	80.36	7.08	13.55
Триметоприм	30	107.23	2.06	7.11
	60	95.93	4.40	9.12
	90	102.37	4.20	8.66
Тилозин	50	92.46	1.08	4.06
	100	97.88	3.02	7.12
	150	95.43	4.06	9.88
Цефепирин	50	83.08	17.45	20.99
	100	91.88	12.55	17.48
	150	90.77	10.32	15.11
Цефалексин	50	83.50	12.02	15.36
	100	88.38	15.06	21.12
	150	88.10	8.46	13.51
Цефтиофур	50	92.30	18.22	22.88
	100	87.46	12.03	17.14
	150	94.10	11.06	15.22
Енрофлоксацин	50	97.54	3.04	6.87
	100	92.54	2.16	6.02
	150	96.77	5.12	11.64
Ципрофлоксацин	50	85.76	7.08	11.45
	100	84.16	4.06	8.18
	150	90.81	7.55	11.08
Тетрациклин	50	81.56	15.06	20.05
	100	84.15	14.38	21.13
	150	80.89	6.14	9.12
Окситетрациклин	50	83.56	20.09	22.88
	100	88.25	18.46	21.14
	150	97.43	11.38	15.11
Хлоротетрациклин	50	84.88	16.22	19.54
	100	102.15	15.46	19.68
	150	98.32	9.18	14.02
Доксициклин	50	86.78	8.04	11.56
	100	89.12	13.41	20.11
	150	95.03	7.15	13.51

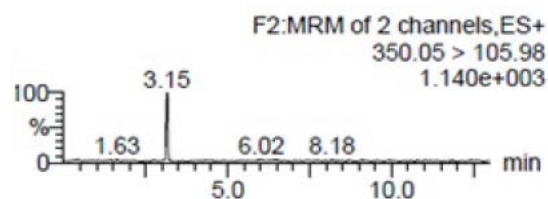
Линкомицин	50	105.08	4.03	9.12
	100	88.46	1.08	3.14
	150	102.88	2.15	7.15
Сулфаклоропиридазин	50	108.70	6.15	12.53
	100	97.88	6.22	10.66
	150	102.09	8.14	14.02
Сулфафуразол	50	95.56	12.56	15.21
	100	92.15	7.13	9.14
	150	94.22	9.56	13.51
Сулфадиазин	50	84.88	3.02	7.08
	100	97.48	3.04	10.21
	150	96.77	1.12	4.16
Сулфадимидин	50	100.92	3.18	8.81
	100	108.74	5.66	9.15
	150	99.43	2.02	6.64
Сулфаметоксазол	50	89.32	12.26	17.78
	100	82.14	9.15	14.46
	150	91.68	7.78	13.11
Сулфадиметоксин	50	85.50	3.15	5.88
	100	98.14	6.66	10.14
	150	89.57	5.81	10.08

Слика 13. Хроматограми од примероци млеко збогатени со стандарди од антибиотици на ниво 2

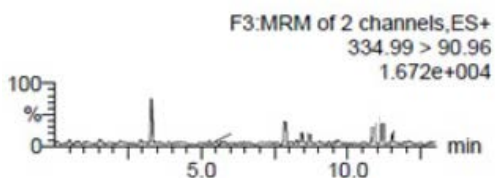
Amoxicillin



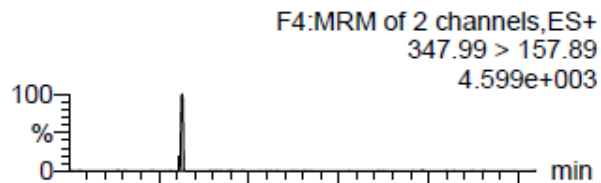
Ampicillin



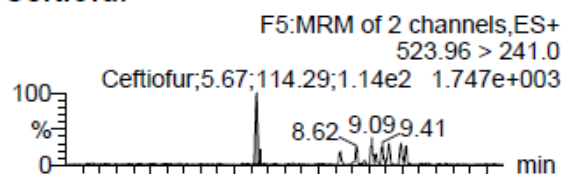
Benzylpenicillin



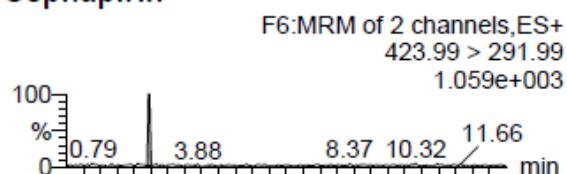
Cefalexin



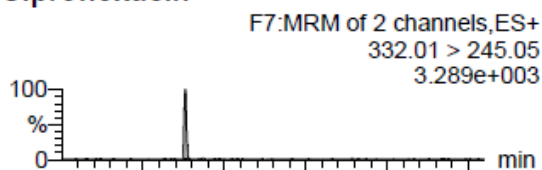
Ceftiofur



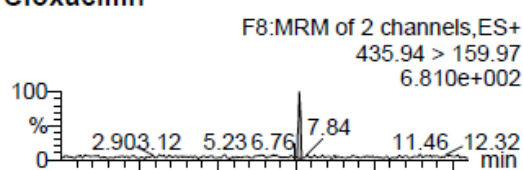
Cephapirin



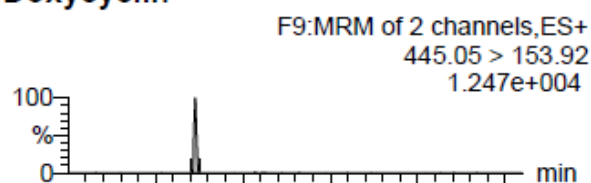
Ciprofloxacin



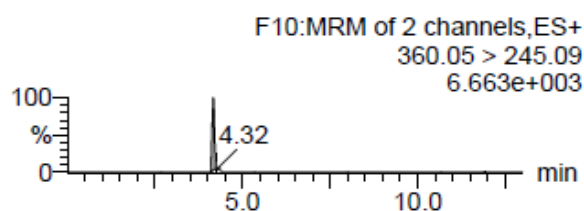
Cloxacillin



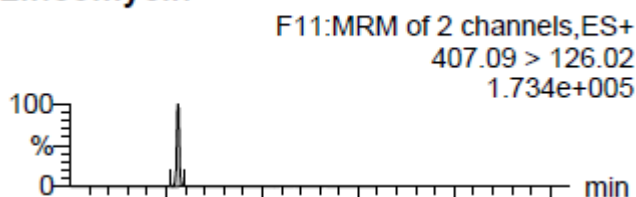
Doxycyclin



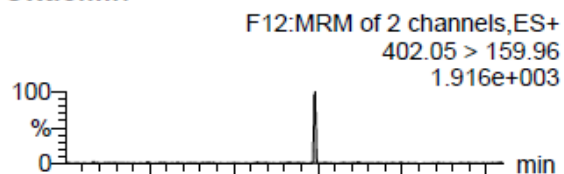
Enrofloxacin



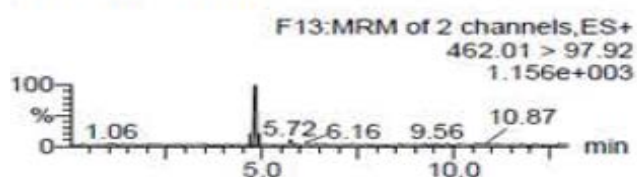
Lincomycin



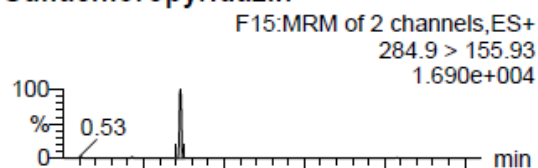
Oxacillin



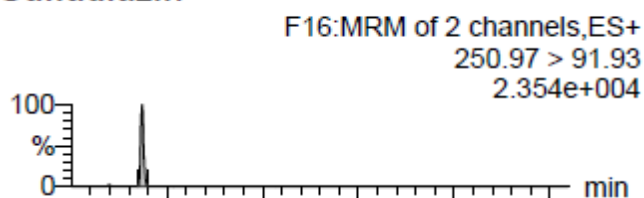
Oxytetracyclin



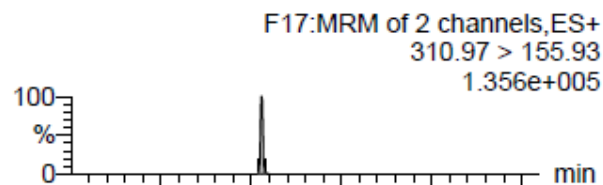
Sulfachloropyridazin

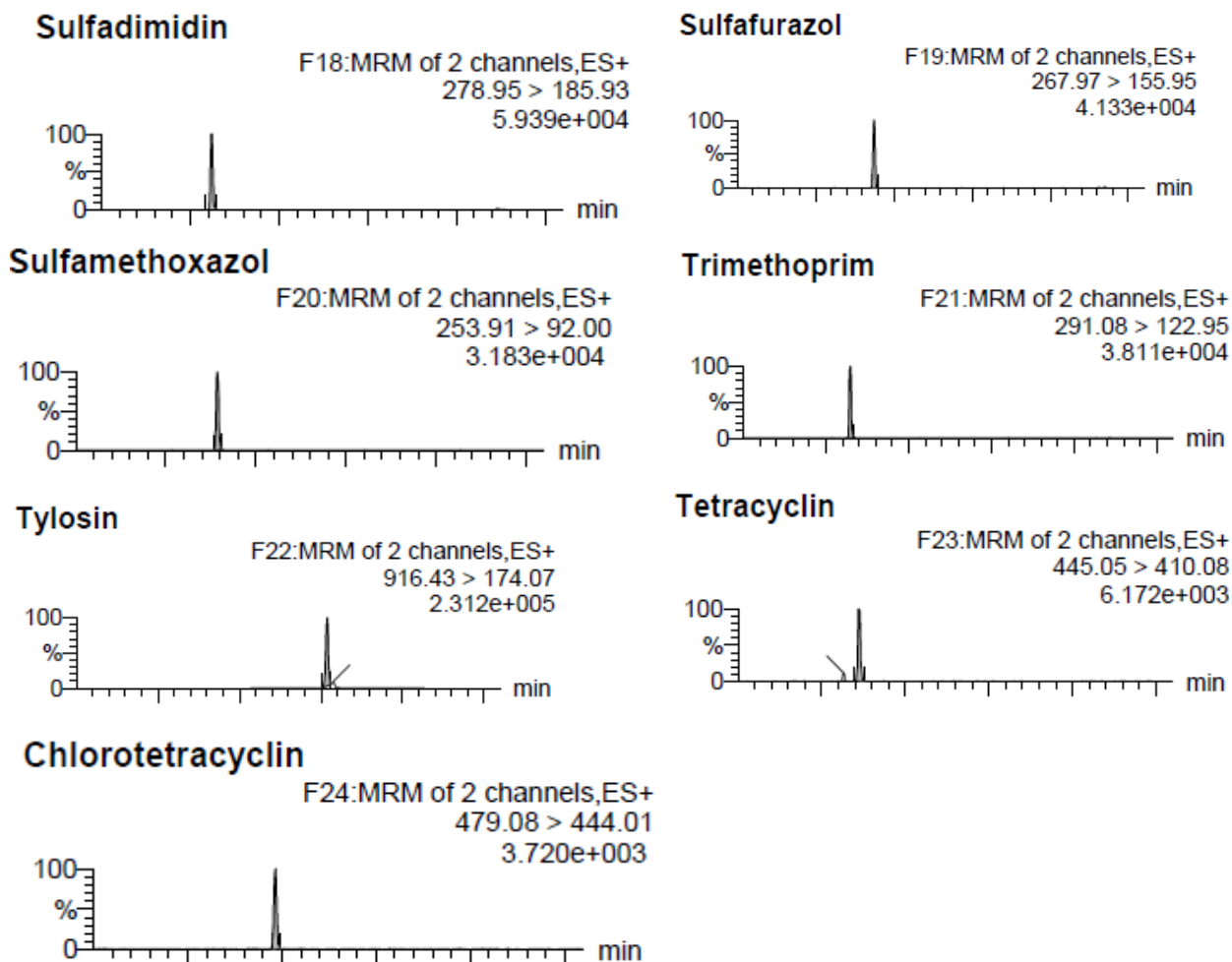


Sulfadiazin



Sulfadimetoxin





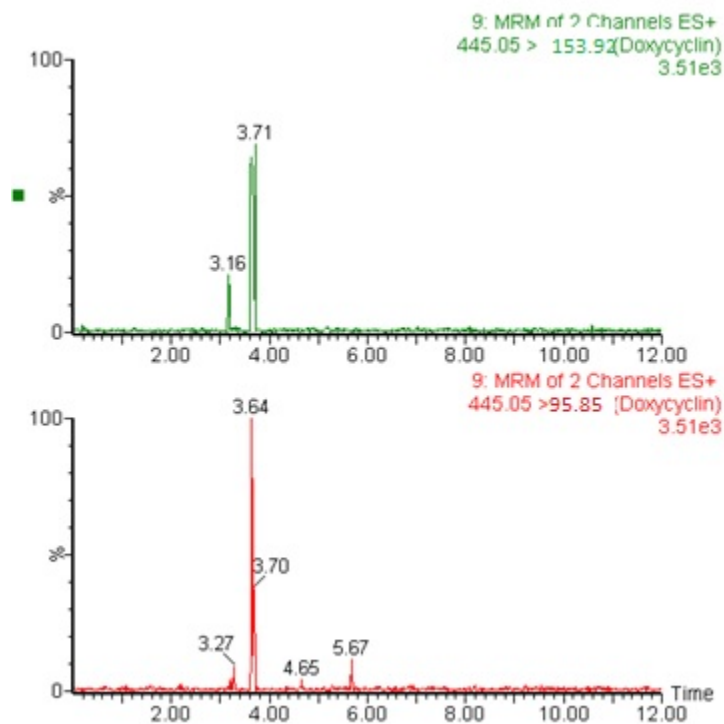
5.4 Анализа на примероци

Во ова истражување беа анализирани вкупно 400 примероци од сурово млеко и тоа 240 примероци кравјо млеко, 98 примероци овчо и 62 примероци козјо млеко, во периодот 2017-2019 година. Примероците беа складирани во пластични чашки и беа чувани на температура од -20 °C се до нивното анализирање. Антибиотици беа детектирани во вкупно 21 примероци, односно во 5.25 % од вкупно анализираниите примероци. Во Табела 15 се прикажани вкупниот број на примероци, позитивните примероци, детектираните антибиотици, концентрациското ниво на кое се детектирани, а за подобра прегледност се прикажани и вредностите за LOQ и MRL.

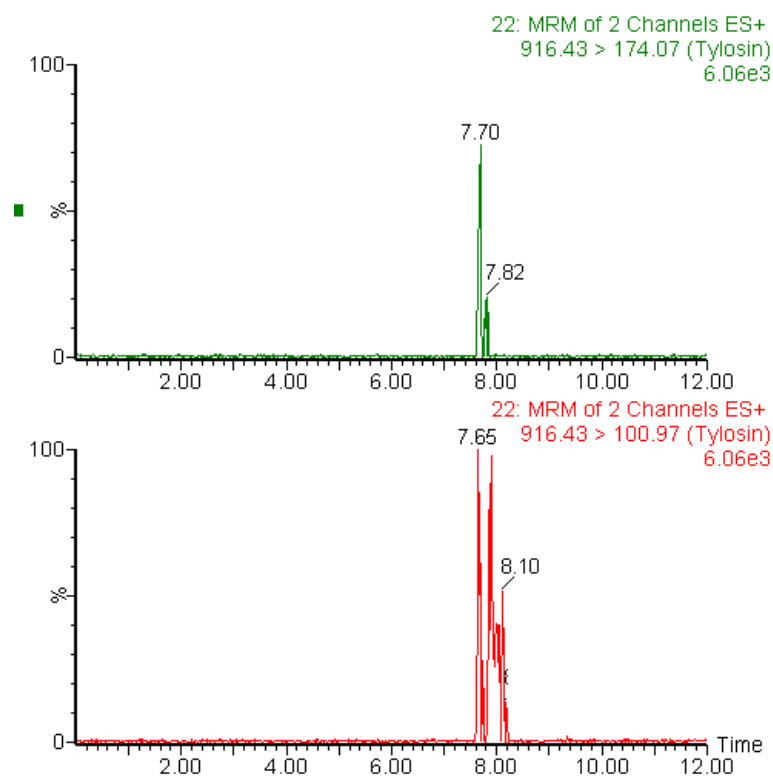
Табела 15. Резултатите од анализираните примероци млеко

Отатоци од антибиотици и сулфонамидиди	Број на позитивни примероци	% позитивни примероци	Концентрација ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	MRL ($\mu\text{g/L}$)
Кравјо млеко (n=240)					
Окситетрациклин	1	0.42	20.06	17.54	100
Цефтиофур	1	0.42	23.55	14.72	100
Ципрофлоксацин	1	0.42	15.38	13.23	100
Сулфаметоксазол	1	0.42	21.67	14.05	100
Тетрациклин	2	0.83	15.90–28.01	13.60	100
Доксициклин	2	0.83	24.14–48.86	18.18	100
Тилозин	2	0.83	18.09–45.02	8.48	50
Сулфадиметоксин	4	1.67	34.96–36.22	19.55	100
Вкупно	14	5.83	/	/	/
Овчо млеко (n=98)					
Сулфадимидин	2	2.04	24.76–46.01	22.71	100
Сулфадиазин	3	3.06	19.86–51.99	18.31	100
Сулфадиметоксин	1	1.02	35.11	19.55	100
Вкупно	6	6.12	/	/	/
Козјо млеко (n=62)					
Сулфадиметоксин	1	1.61	34.96	19.55	100
Вкупно	1	1.61	/	/	/
Вкупно позитивни примероци (n=400)					
Вкупно	21	5.25	/	/	/

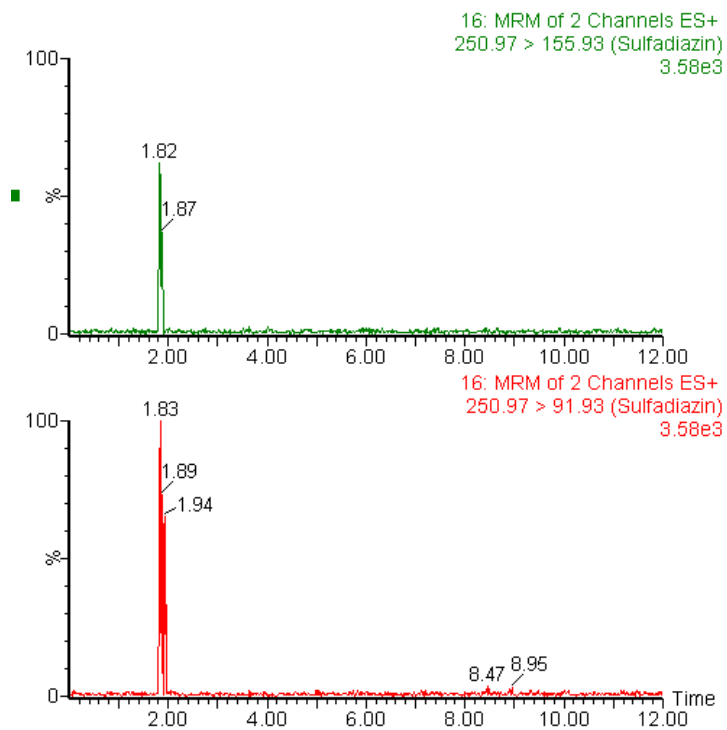
Од добиените резултати може да се забележи дека во 0.42 % од примероците од кравјо млеко се детектирани окситетрациклин, цефтиофлур, ципрофлоксацин и сулфаметоксазол. Тетрациклинот, доксициклинот и тилозинот се детектирани во 0.83 % од примероците, додека во 1.67 % од примероците кравјо млеко е детектиран сулфадиметоксинот. Во примероците од овчо млеко детектирани се антибиотици во 6 примероци, односно 6.12 % од вкупниот број на примероци. Кај 3 примероци овчо млеко, односно 3.06 % е детектиран сулфадиазин, кај 2 примероци или 2.04 % е детектира сулфадимин и кај 1 примерок (1.02 %) е детектиран сулфадиметоксин. Во примероците козјо млеко детектиран е сулфадиметоксин во 1 примерок (1.61 %). Сите овие антибиотици се детектирани во концентрации над лимитот на квантификација, додека во ниту еден примерок не е детектиран антибиотик над MRL вредноста. На слика 14, 15 и 16 се прикажани хроматограми од позитивни примероци млеко.



Слика 14. Позитивен примерок кравјо млеко - доксициклин



Слика 15. Позитивен примерок кравјо млеко – тилозин



Слика 16. Позитивен примерок овчо млеко – сулфадиазин

6. ДИСКУСИЈА

6.1 Оптимизација на LC-MS/MS методот

Оптимизацијата на MS/MS методот во оваа истражување беше направена преку инјектирање на стандардите со концентрација од 1 $\mu\text{g/mL}$ во MS/MS детекторот и скенирање на масениот спектар на овие аналити во ESI+ (електроспреј позитивна јонизација) со масен опсег m/z од 50-1000. За следење на главните-прекурсор јони (precursor ions), како и продукт јоните (daughter ions) на целните аналити се користеше MRM (multiple reaction monitoring) модул. Од истражувањето може да се заклучи дека сите 23 аналити покажаа типична фрагментација, при што беа добиени целосни масени спектри за сите антибиотици и сулфонамиди, но беа следени само главниот-прекурсор јони и два продукт јони согласно критериумите во Одлуката на Комисијата 2002/657/EC.

Според оваа Одлука за потврда на супстанциите од група Б од Директивата 96/23/EC потребни се најмалку 3 точки за идентификација. При тоа со утврдување на главниот-прекурсор јони и два продукт јони се добиваат 4 точки за идентификација (1 точка за прекурсор јон и 1.5 за секој продукт јон), со што се исполнува овој критериум. Продукт јоните беа одбрани врз основа на интензитетот, односно оние 2 јони кои што имаат најсилен интензитет при што продукт јонот со најсилен интензитет се користи како јон за квантификација на аналитот, а вториот продукт јон се користи за потврдување на аналитот. Од добиените резултати, прикажани во Табела 10, може да се забележи дека два антибиотици од групата на тетрациклините, тетрациклин и доксициклин, имаат иста моларна маса и главен јон, но овие соединенија лесно може да се разликуваат врз основа на времето на задржување и според продукт јоните Тетрациклинот се јавува 4.29 мин., додека доксициклинот на 3.31 мин. Продукт јоните за тетрациклинот се 410.08 и 97.92, додека за доксициклинот продукт јоните се 153.92 и 95.85.

Добиените резултати за главен јон и продукт јони кои се добиени за антибиотиците во сурово млеко кореспондираат со литературните податоци од Martins и соp., 2016; Han и соp., 2007; Freitas и соp., 2013; Schwaiger и соp., 2018; Amatya, 2010; Dasenaki и Thomaidis, 2010 и истите се претставени во Табела 16.

Табела 16. Споредба на главен јон и продукт јоните на антибиотиците од различни автори

Антибиотик	Главен јон	Продукт јони Alija, 2019	Продукт јони Martins и соп., 2016	Продукт јони Nap и соп., 2007	Продукт јони Freitas и соп., 2016	Продукт јони, Schwaiger и соп., 2018	Продукт јони, Amatya, 2010	Продукт јони, Dasenaki и соп. 2010
Амоксицилин	367.07	159.96 90.89	на*	114 208	на	208 114	208 114	349 114
Ампицилин	350.05	105.98159 .96	на	106 174	на	192 174	106 192	106 160
Бензилпеницилин	334.99	90.96 80.94	на	160 176	на	176 160	176 160	на
Клоксацилин	435.94	159.97 276.96	на	160 277	на	160 277	160 277	на
Оксацилин	402.05	159.96 243.01	на	160 243	на	на	160 243	на
Цефалексин	347.99	157.89 173.95	на	158 140	на	на	158 140	на
Цефтиофур	523.96	241.00125 .17	на	241 285	на	241 126	на	на
Цефапирин	423.99	291.99 151.97	на	292 152	на	на	292 181	на
Ципрофлоксацин	332.01	245.05 230.94	288.2 314.0	314 288	288.2	245 314	на	288 314
Енрофлоксацин	360.05	245.09 72.02	245.2 316.2	316 342	316.3	245 342	316 342	245 317
Доксициклин	445.05	153.92 95.85	428.2 153.9	428 321	428.2	428 154	на	427 267
Тетрациклин	445.05	410.08 97.92	410.2 153.9	410 427	410.3	410 427	на	410 426
Хлортетрациклин	479.1	444.00 462.00	153.9 97.60	154 462	444.2	444 462	на	444 462
Окситетрациклин	462.01	97.92 153.98	426.2 444.2	на	426.3	426 443	на	426 443
Сулфаклоропиридазин	284.90	155.93 91.93	107.8 107.8	156 108	92.3	на	на	156 92
Сулфадиазин	250.97	91.93 155.93	108.0 108.0	156 108	156.2	92 156	на	92 156
Сулфадиметоксин	310.97	155.93 91.93	140.0 140.0	156 108	156.2	156 108	на	156 108
Сулфадимидин	278.95	185.93 91.93	123.8 123.8	186 156	156.3	186 156	на	186 124
Сулфафуразол	267.97	155.95 112.95	156.0 156.0	на	156.2	на	на	156 92
Сулфаметоксазол	253.91	92.00 155.94	155.9 155.9	на	156.4	92 156	на	156 108
Триметоприм	291.08	122.95 230.06	275.2 230.2	230 261	на	261 230	на	123 230

Тилозин	916.43	174.07 100.97	на	174 101	174.3	174 101	на	174 772
Линкомицин	407.09	126.02 41.79	на	126 359	на	126 359	на	на

*на – не е анализиран

Хроматографската сепарација во оваа истражување се изврши со користење на C18 колона за течна хроматографија со димензи 50 mm (должина) x 2.1 mm (внатрешен дијаметар) и големина на честиците од 1.7 μ m. При анализа на антимикробните лекови со LC-MS/MS метод, најчесто користена колона за раздвојување е C18 колона, при што разликата од едно до друго истражување е во димензиите на колоната, што може да се заклучи од истражувањата спроведени од повеќе автори: Stolker и сор., 2008 како и Han и сор., 2015 кои користат ист тип C18 колона но, со различни димензии 150 x 2.1 mm, 1.7 μ m, Gaugain-Juhel и сор., 2009 користат C18 колона со димензии 150 mm x 3.9 mm, 5 μ m, Schwaiger и сор., 2018 користат C18 колона со димензии 100 mm x 2.1 mm, 1.8 μ m, Ortelli и сор., 2009 користат C18 колона со димензии 100 mm x 2.1 mm, 1.7 μ m и Martins и сор., 2016 користат C18 колона со димензии 75 mm x 4.6 mm, 3.5 μ m.

ЛС градиентот беше воспоставен од две мобилни фази: мобилна фаза А е вода (LC-MS чистота) со 0.1 % мравска киселина, а мобилна фаза Б е ацетонитрил со 0.1 % мравска киселина. Употребената мобилна фаза покажува максимална чувствителност и резолуција, како и задоволително раздвојување на сите аналити. Додавањето на 0.1 % мравја киселина овозможува најдобра сензитивност на методот при позитивна јонизација (Zhan и сор., 2012). Од литературните податоци може да заклучи дека при анализа на овие супстанции најчесто се користат следните мобилни фази: вода со 0.1 % мравја киселина и ацетонитрил со 0.1% мравја киселина (Stolker и сор., 2008, Ortelli и сор., 2009, Martins и сор., 2016), вода со 0.1 % мравја киселина и ацетонитрил, проток од 0.3 mL/min (Han и сор., 2015), пентафлуоропроионска киселина и ацетонитрил (Gaugain-Juhel и сор., 2009), амониум формијат и ацетонитрил, проток од 0.25 mL/min (Schwaiger и сор., 2018), амониум формијат и метанол, проток од 0.30 mL/min (Jank и сор., 2015). Cheng и сор., 1997 како мобилни фази користеле едноставен испарлив раствор кој содржи 0,1% TFA, 2% метанол и 7% ацетонитрил во вода, со роток 0.9 mL/min. и добиле добро раздвојување на тетрациклините во серум со HPLC метод.

Исто така, беа оптимизирани протокот на мобилната фаза, како и температурата на колоната. При тоа беше тестиран проток од 0.2, 0.3, 0.4, 0.45 и 0.5 mL/min, како и

температура на колона од 35°C и 40°C. Од добиените резултати се заклучи дека оптимални услови се постигнати при проток од 0.4 mL/min и температура на колоната од 40°C, поради тоа што при овие услови се обезбеди задоволителна резолуција, најдобра сепарација со време на задржување помеѓу 1.71 минута за сулфадијазин и 6.68 минута за клоксацилин и вкупното време за анализа од 13 минути.

6.2 Оптимизација за подготовка на примерокот од сурово млеко

Во оваа истражување беше оптимизиран LC-MS/MS метод за истовремено определување на остатоци од повеќе различни класи на антибиотици и сулфонамиди во примероци од сурово млеко, вклучувајќи β -лактами (пеницилини и цефалоспорини), сулфонамиди, тетрациклини, макролиди, хинолони, триметоприм и линкомицин.

Оптимизацијата на подготовката на примерокот е најкритичен дел од методот, особено во случаи кога се работи за мултикласен метод, односно метод кој опфаќа антибиотици од повеќе класи, поради различните физичко-хемиските својства на соединенијата, како на пример поларност и pKa, а кои треба истовремено да се изолираат на ниво на интерес.

β -лактамите припаѓаат на групата биполарни компоненти. Овие антибиотици се нестабилни и термолабилни. Четиричлениот β -лактамски прстен овозможува лесна деградација на овие соединенија од различни растворувачи и топлината. Затоа, температурата и pH вредноста при подготовката на примерокот игра важна улога за стабилноста на овие антибиотици. Во повеќето од објавените методи, во врска со определување на беталактами, користени се колони за цврсто-фазна екстракција за екстракција на овие антибиотици од матриксите (Jank и сор., 2012; Santos и Ramos 2016).

Тетрациклините формираат хелатски комплекси. Тие се растворливи во поларни органски растворувачи, киселини и бази, но не се раствораат во заситени јаглевородороди кои се силни агенси за хелација, бидејќи хелацијата на двовалентен јон на металите е неопходна за нивната антимикуробна активност. Овие карактеристики ја отежнуваат екстракцијата на аналитите од матриксот, односно тоа е главната причина која може да доведе до загуба на аналитите при екстракција. Аналитичките проблеми можат да се надминат со користење на воден растворувач како примарен систем за екстракција за тетрациклините (Anderson и сор., 2005).

Макролидите и линкозамидите се растворливи во метанол и со изолирани или конјугирани двојни врски, покажуваат хидрофобен профил. Тие се нестабилни во киселина и обично се екстрахираат од алкализирани матрици. Двете класи на соединенија се изолираат со употреба на мешавини од органски растворувач и воден пуфер. Конвенционалните процедури за екстракција на остатоците од хинолони се со кисели, водени или поларни органски растворувачи (метанол или ацетонитрил). Сулфонамидите се слабо растворливи во вода и неполярни растворувачи, но лесно растворливи во поларни органски растворувачи заради амфотерични молекули кои содржат различни вредности на pK_a . Во текот на процесот за екстракцијата важно е да се прилагоди pH на водената фаза за да се добијат повисоки вредности на аналитичкиот принос. Ова се должи на јонската природа на сулфонамидите, што е предизвикано од индуктивниот ефект на SO_2 групата (Kinsella и сора., 2009).

Од горенаведените причини може да се заклучи дека подготовката на примерокот пред хроматографската сепарација е клучна постапка во современата инструментална анализа и вклучува голем број чекори: растворање на аналитот во соодветен растворувач, екстракција на аналитот од примерокот, отстранување на повеќе интерференции и концентрирање на аналитот (Wang и сора., 2012, Alija и сора., 2020).

Во оваа истражување беа развиени и користени пет различни протоколи за подготовка на примероци и тоа течно-течна екстракција (раствор од 10 ml ацетонитрил и 2 ml 5% трихлорооцетна киселина), екстракција со ацетонитрил, екстракција со метанол, екстракција со метанол и ацетонитрил во сооднос 1:1 и екстракција со 20 % трихлорооцетна киселина и MClvaine пуфер. Во последните 4 случаи беше користена и цврсто-фазна екстракција.

Првиот метод вклучуваше течно-течна екстракција. Екстракцијата на остатоците од примероците со течно-течната екстракција зависи од природата на примероците (т.е. течна или цврста) и физичко-хемиските својства на остатоците (поларитет и pK_a). Предностите на течно-течната екстракција се лесна и едноставна употреба, кратко време за екстракција и ниска цена. Недостатоци на течно-течната екстракција е тоа што не е погодна за многу поларни соединенија, има мала селективност, се користи голема количина на растворувач, формирање на емулзија која влијае на одвојувањето на соединенијата. Во оваа истражување користено е ацетонитрил и 5% трихлорооцетна киселина како растворувач за течно-течна екстракција. Добиените резултати не беа задоволителни за определување на антибиотици

во сурово млеко, бидејќи тетрациклините како и ампицилинот и бензилпеницилинот кои припаѓаат во групата на бета-лактамите воопшто не беа екстрахирани, додека останатите антибиотици од групата на бета-лактамите имаа многу низок аналитичкиот принос. Со оваа екстракција беа екстрахирани само сулфонамидите, макролидите, триметопримот и линкомицинот. Според Kinsella и *сop.*, 2009, ацетонитрилот не ги екстрахира високополарните компоненти, како што се бета-лактамите, бидејќи овие соединенија се нестабилни во овој растворувач и лесно се деградираат под одредени услови на температура и pH. Во 1992 година, Tyszkowaska и *сop.* објавил студија дека пеницилините се деградираат за време на изложеноста на хемикалии и растворувачи при подготовката на примероци. Во многу литературни податоци е наведено дека трихлорооцетната киселина е често употребуван растворувач за екстракција, бидејќи има улога во отстранување на протеините, но од друга страна врши инхибиција на јонизациската ефикасност на аналитите. Иако во овој случај се користеше 5% трихлорооцетна киселина, тетрациклините не беа екстрахирани. Тетрациклините формираат хелатски комплекс со бивалентни катјони, и се врзуваат со протеини. Нарушувањето на овие интеракции најчесто се постигнува преку додавање на EDTA во растворот за екстракција (Anderson и *сop.*, 2005).

Во многу студии ацетонитрилот и метанолот се широко користени растворувачи за екстракција бидејќи ги отстрануваат интерференциите и со нив може да се екстрахираат повеќе аналити. Berendesen (2013) во своето истражување наведува дека метанолот и ацетонитрилот се најкористени органски расворувач за екстракција на остатоците од антимикробните лекови во млеко. Метанолот екстрахира многу соединенија од примероците, но не се добива чист екстракт. Од друга страна ацетонитрилот не ги екстрахира воопшто или доволно поларните аналити и комплексно формираните соединенија. Поради овие причини потребно е да се користи комбинација од повеќе растворувачи (Martins и *сop.*, 2016; Salih, 2006; McGrane, 2000).

Freitas и *сop.*, (2013) со својата студија користеле ацетонитрил како растворувач за течно-течна екстракција за определување на 33 антибиотици во млеко од 5 различни класи на соединенија (хинолони, сулфонамиди, тетрациклини, макролиди и хлорамфеникол). Сепак, ацетонитрилот не ги екстрахирал доволно биполарните соединенија заради висока содржина на протеини во млекото и деградацијата.

Gaugain-Juhel и сор., (2009) претставиле два паралелни методи на екстракција на антибиотици и сулфонамиди при анализата на млеко. Ацетонитрилот се користел за екстракција на бета-лактами, макролиди и сулфонамиди, додека 5% трихлорооцетна киселина се користела за екстракција на тетрациклини, аминогликозиди, линкозамиди и хинолони. Добиените резултатите при споредување на различните растворувачи за екстракција на 58 антимикуробни средства не биле секогаш во целосна согласност со очекуваните резултати земајќи ги предвид физичко-хемиските својства на различните аналити. Jank и сор., (2015) во своето истражување за екстракција користеле ацетонитрил со 0.1% мравја киселина при што успеале да ги екстрахираат биполарните соединенија бета-лактамите, макролидите и хинолоните, додека не ги екстрахирале комплексно формираните соединенија - тетрациклините. Присуството на две кетонски групи во тетрациклините ги прави овие молекули способни да страдаат од хелација од метални јони.

Различен пристап во однос на екстракција е претставен од страна на Martins и сор., (2016) за определување на 25 антимикуробни соединенија, кои припаѓаат на различни класи (хинолони, сулфонамиди, макролиди, тетрациклини) во примероци од млеко. Тие користеле три методи за екстракција. Во првиот, за екстракција на хинолоните се користело закиселен ацетонитрил со 0,1% мравја киселина. Во вториот метод за екстракција на сулфонамидите и триметопримот се користел закиселен етанол (етанол: оцетна киселина) (96:4). Во третиот метод за екстракција на тетрациклините се користела иста постапка како и за сулфонамидите, со таа разлика што бил додаден и EDTA. Аналитичкиот принос се движел во опсегот од 62 до 108%, а коефициент на варијација е понизок од 15% на ниво на збогатување од 0.25 MRL до 2 MRL.

Покрај точно-течната екстракција за оптимизација на постапката на екстракција беа проучени и други растворувачи или комбинација од нив, како што се екстракцијата со ацетонитрил, метанол, ацетонитрил:метанол (50:50) и екстракција со 20 % трихлорооцетна киселина и McIlvaine пуфер, при што после првичната екстракција се користеше цврсто-фазна екстракција со Oasis HLB колони за пречистување.

Комбинацијата од Na₂EDTA- McIlvaine пуфер со трихлорооцетна киселина ја подобрува екстракцијата на тетрациклините од млекото, дава подобри перформанси, бидејќи оваа комбинација овозможува протеинска преципитација и намалување на загубата на аналититот за време на екстракцијата. EDTA има поголем афинитет кон катјоните отколку

тетрациклините, предизвикувајќи подобри аналитички приноси на тетрациклините кога е додаден во растворот за екстракција (Anderson и соработници, 2005; Pena и соработници, 2003).

Напредокот во технологијата со цврсто-фазна екстракција (SPE) овозможува подготовката на примерокот да се изврши побрзо, полесно, поефикасно и поекономично. При SPE аналитот се задржува на цврстата фаза, додека примерокот поминува преку неа, односно со селективна елуција на аналитот и со соодветен растворувач SPE може да се смета како едноставен тип на екстракција кој е погоден за хроматографска анализа (Berendsen, 2013).

Во оваа истражување за цврсто-фазна екстракција користени се Oasis HLB колони (хидрофилно-липофилно-урамнотежен реверзно--фазен сорбент) за пречистување кои имаат многу широка селективност за поларните соединенија и доведуваат до намалување на ефектите од јонската супресија предизвикани од интерференции од матриксот. Исто така тие не содржат слободни силаноли за кои целните соединенија може да се врзат директно или преку метални јонски комплекси. (Bitas и соработници, 2018).

При употребата на овие протоколи аналитичкиот принос се движи од 71.96 до 108.74 % при употреба на 20% трихлорооцетна киселина и Na₂EDTA- McIlvaine пуфер, од 14.36 до 105.25 % при употреба на ацетонитрил, од 12.36 до 89.78 % метанол, а додека при употреба на ацетонитрил:метанол (50:50) аналитичкиот принос се движеше од 20.78 до 108.15 %. Од оваа истражување може да заклучиме дека ацетонитрилот е поефикасен за поголем број на соединенија со висок поларитет во споредба со метанол или комбинацијата на двата растворувачи, додека додавањето на хелатно средство (EDTA) дава подобри перформанси за тетрациклините, соединенија кои формираат комплекси со поливалентни катјони присутни во растворот за екстракција на примерокот каде доаѓа до губење на соединенијата. Според добиените резултати, пропишаните критериуми за аналитичкиот принос во Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС ги исполнува единствено методот за екстракција во кој се употребува 20% трихлорооцетна киселина и Na₂EDTA- McIlvaine пуфер. Поради тоа овој метод беше одбран како соодветен метод за екстракција на повеќе класи на антибиотици од сурово млеко.

6.3 Линеарност на методот

Линеарноста на метод за определување на остатоци од антибиотици во млеко со LC-MS/MS метод е утврдена според коефициентот на корелација (r^2) добиен преку конструирање на калибрациона крива од 6 точки, со шест повторувања, со стандарди во матрикс млеко (калибрација во матрикс). Поради различните MRL концентрации калибрационите криви за стандардите припремени во сурово млеко се во различен опсег и тоа 0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 * MRL (Табела 12). Вредноста на коефициентот на корелација (r^2) се движеше во границите од 0,9800 (оксицилин) до 0,9991 (тилозин и сулфафуразол). Критериумот за прифатливост на линеарноста претставува вредноста, односно добиениот резултат, за коефициентот на корелација. За да се задоволи критериумот за прифатливост на линеарноста за многу ниски концентрации вредноста на r^2 треба да биде ≥ 0.98 (Schwaiger и сор., 2018, Marilena, 2015, Stolker и сор., 2008). Од резултатите прикажани во табела 12 може да се заклучи дека добиените вредности за коефициентот на корелација за сите стандарди е задоволителен, што практично значи дека методот е линеарен, односно дека постои линеарна зависност помеѓу површината на пиковите и концентрацијата на стандардите.

6.4 Селективност/специфичност

Специфичноста и селективноста на методот се утврдени преку анализа на серија од 20 негативни примероци на млеко и анализа на серија од 20 примероци млеко кои се збогатени со стандарди од антибиотици. Доколку се споредат хроматограмите од негативните и збогатените примероци може да се заклучи дека негативните примероци не покажале присуство на антибиотици и други интерферирачки компоненти. За разлика од нив, кај збогатените примероци може да утврди дека пиковите за сите детектирани антибиотици во млекото се добро раздвоени и не се преклопуваат. Исто така во подрачјето на ретенционите времиња на целните компоненти, не се појавуваат други интерферирачки компоненти од матриксот, од што може да се заклучи дека методот е специфичен и селективен и ги исполнува критериумите за овие параметри од 2002/657/ЕС. Тоа всушност значи дека методот овозможува идентификација, квантификација и детекција на аналитите од интерес

– антибиотиците во млеко во присуство на други слични компоненти, како што се метаболити, продукти на деградација, изомери, матрикс ефект и сл.

6.5 LOD, LOQ, $CC\alpha$ и $CC\beta$

Резултатите за LOD и LOQ се прикажани во табела 12, при што може да се забележи дека резултатите за LOD се во опсег од 0.17 $\mu\text{g/L}$ за бензилпеницилин до 6.94 $\mu\text{g/L}$ за сулфадимидин, додека резултатите за LOQ се движат во опсег од 0.50 $\mu\text{g/L}$ за бензилпеницилин до 22.71 $\mu\text{g/L}$ за сулфадимидин. Според добиените резултати за LOD и LOQ може да се заклучи дека антибиотиците во сурово млеко може да се детектираат во значително ниски концентрациски нивоа, односно добиените вредности на LOD и LOQ се соодветни за намената со оглед на тоа што се значително пониски од MRL вредноста. Оттука произлегува дека применетиот метод има соодветна осетливост за квантитативно и квалитативно определување на антибиотици во примероци од сурово млеко. Добиените резултати се во согласност со истражувањето објавено од Нап и сор., (2015) каде што вредностите за LOD и LOQ за определување на 38 антибиотици во сурово млеко со LC-MS/MS метод се движат од 0,01-5 $\mu\text{g/kg}$ и 0,03-10 $\mu\text{g/kg}$, соодветно и истражувањето на Freitas и сор., 2013 каде што лимитот на детекција на методот се движи од 0,010 $\mu\text{g/kg}$ до 3,7 $\mu\text{g/kg}$.

Резултатите за $CC\alpha$ и $CC\beta$ се прикажани во табела 13. $CC\alpha$ е критичниот параметар на методот во однос на кој се проценува дека примерок не одговара со ниво на веројатност на грешка $\alpha=5\%$. Вредностите за $CC\alpha$ во сурово млеко се во граница од 4.43 $\mu\text{g/L}$ (амоксицилин) до 151.74 $\mu\text{g/L}$ (линкомицин), додека вредностите за $CC\beta$ се во опсег од 4.88 $\mu\text{g/L}$ (амоксицилин) до 178.33 $\mu\text{g/L}$ (линкомицин).

Вредностите за $CC\alpha$ за пеницилините за кој MRL е 4 $\mu\text{g/L}$ (амоксицилин, ампицилин, бензилпеницилин) се движат 4.43-4.58 $\mu\text{g/L}$, додека вредностите за $CC\beta$ се движат 4.88-5.10 $\mu\text{g/L}$. За флоксацилин и оксацилин MRL е 30 $\mu\text{g/L}$, а вредностите за $CC\alpha$ се 32.31 и 33.77 $\mu\text{g/L}$, и за $CC\beta$ 35.58 и 36.83 $\mu\text{g/L}$, соодветно. MRL за цефалексин и цефтиофлур е 100 $\mu\text{g/L}$, $CC\alpha$ изнесува 109.83 и 111.28 $\mu\text{g/L}$, додека $CC\beta$ изнесува 123.86 и 125.88 $\mu\text{g/L}$, соодветно. За цефапирин за кој MRL изнесува 60 $\mu\text{g/L}$, вредностите за $CC\alpha$ и $CC\beta$ се 68.73 $\mu\text{g/L}$ и 75.78 $\mu\text{g/L}$.

За триметоприм и тилозин MRL е 50 µg/L , а вредностите за ССа се 54.45 и 54.97 µg/L и и ССβ се 59.63 и 61.70 µg/L, соодветно.

Резултатите за ССа и ССβ кај тетрациклини (тетрациклин, окситетрациклин, хлоротетрациклин, доксициклин) се во границите од 106.14 до 122.33 µg/L и од 109.44 до 139.78 µg/L, соодветно и кај хинолоните (ципрофлоксацин и енрофлоксацин) ССа изнесува 107.12 и 113.17 µg/L, додека ССβ изнесува 111.35 и 121.50 µg/L. И за двете групи MRL изнесува 100 µg/L . За линкомицин пак MRL изнесува 150 µg/L, а добиени вредности за ССа и ССβ се 151.74 µg/L и 178.33 µg/L. MRL за сулфонамиди е 100 µg/L, а добиени вредности за ССа и ССβ се движат од 104.13 до 117.38 µg/L и од 108.22 до 134.66 µg/L, соодветно.

Добиените вредности за валидациските параметри ССа и ССβ се во согласност со критериумите утврдени во Одлуката на Комисијата 2002/657/EC со што може да се потврди дека методот е соодветен за намената. Резултати се во согласност и со податоците од истражувањето на други автори. Во истражувањето на Schwaiger и сор., 2018 утврдените вредности за ССа кај млеко се движат од 5 до 162 µg/kg, а вредностите за ССβ се движат во граница од 7 до 175 µg/kg, додека Amatya во 2010 година за определување на 19 антибиотици (кинолони и β-лактами) во сурово млеко утврдил вредности за ССа во граница од 4,6 до 112 µg/kg, додека за ССβ вредностите се движеле од 5.3-124 µg/kg.

Во истражувањето на Martins и сор., 2016 година при валидација на метод за анализа на 28 антибиотици во млеко, утврдените вредности за ССа се движат во граница од 54.3 µg/L до 119.9 µg/L , додека за ССβ вредностите се движат од 58.7 µg/L до 139.8 µg/L .

6.6 Точност и прецизност на методот

Точноста и прецизноста на аналитичкиот метод се утврдени со збогатување на примероците со стандарди на антибиотици на три концентрациски нивоа (0.5, 1.0, 1.5 * MRL). Точноста е определена преку аналитичкиот принос, додека прецизноста е определена преку повторливоста и репродукцибилноста во текот на 3 различни дена и истата е изразена преку коефициентот на варијација за повторливост (во еден ден) (CVr, %) и коефициент на варијација за репродукцибилност (во 3 различни дена) (CVR, %).

Критериумите за точност и прецизност се пропишани во Одлуката на Комисијата 2002/657/EC, а се претставени во Табела 17 и Табела 18.

Табела 17. Критериуми за точност за квантитативни методи (2002/657/EC)

Концентрација	Опсег
$\leq 1.0 \mu\text{g/kg}$	од -50 % до +20 %
$> 1.0 - 10.0 \mu\text{g/kg}$	од -30 % до +10 %
$\geq 10.0 \mu\text{g/kg}$	од -20 % до +10 %

Во оваа истражување се користени концентрациски нивоа на збогатени примероци $> 1.0 \mu\text{g/kg}$. Според горенаведените критериуми аналитичкиот принос за концентрациски нивоа $> 1.0 - 10.0 \mu\text{g/kg}$ треба да биде во границите од 70-110 %, додека за концентрациски нивоа $\geq 10.0 \mu\text{g/kg}$, аналитичкиот принос треба да изнесува од 80-100 %. Од резултатите за точност, прикажани во Табела 13, може да се забележи дека аналитичкиот принос за присуство на антибиотици во сурово млеко се движи во граници од 71.96 % (бензилпеницилин, концентрациско ниво од $2.0 \mu\text{g/L}$) до 108.70% (сулфаклоропиридазин, концентрациско ниво од $50.0 \mu\text{g/L}$). Подетално, за концентрациски нивоа $> 1.0 - 10.0 \mu\text{g/kg}$ се движи во граници од 71.96 % (бензилпеницилин, концентрациско ниво од $2.0 \mu\text{g/L}$) до 94.50 $\mu\text{g/L}$ (ампицилин, концентрациско ниво од $2.0 \mu\text{g/L}$), додека за концентрациски нивоа $\geq 10.0 \mu\text{g/kg}$ изнесува од 80.36 % (оксацилин, концентрациско ниво $45 \mu\text{g/L}$) до 108.74% (сулфадимидин, концентрациско ниво од $100.0 \mu\text{g/L}$). Од добиените резултати може да се заклучи дека методот ги исполнува критериумите за точност пропишани во 2002/657/EC. Слични истражувања се направени од неколку автори дадени подолу. Сличноста е во тоа што сите истражувања се однесуваат на анализа на антибиотици во млеко, а разликата е во тоа што од едно во друго истражување станува збор за различни класи на антибиотици, различен број на аналити и различни методи на екстракција. Amatya во 2010 година при валидација на методот за анализа на 19 антибиотици (кинолони и бета лактами) во сурово млеко, со употреба на LC-MS/MS метод добил аналитички принос од 65-117%, освен за амоксицилинот, каде што аналитичкиот принос бил 35 %. Со употреба на UPLC-MS/MS метод аналитичкиот принос бил околу 70 %, со исклучок на амоксицилинот (48%). За екстракција, при ова истражување, се користел фосфатен пуфер, а исто така била користена цврсто-фазна екстракција со Oasis HLB колони. Šorík и сop., 2016 при анализа на остатоци од тетрациклините во млеко, добиле аналитички принос од 80.2 до 93.8%%, на ниво на збогатување од 25 - 500 $\mu\text{g/L}$. Во студијата на Martins и сop. (2016), за анализа на 28

антимикробни лекови од 6 различни групи соединенија аналитичките приноси се движеле во опсегот од 62 до 108 %, на ниво на збогатување од 0.25 MRL до 2 MRL. Nan и сор. (2015) при валидација на методот за определување на 38 антибиотици од 6 различни класи соединенија (хинолони, сулфонамиди, тетрациклини, макролиди, беталактами и линкосамиди) во сурово млеко добиле аналитичкиот принос од 68 до 118 %, на ниво на збогатување од 0.01 µg/kg до 30 µg/kg. Stolker и сор.(2008) при валидација на методот за анализа на 100 антибиотици со UPLC–ToF-MS од различни групи соединенија (хинолони, бета-лактами, бензимидазоли, мацролиди, сулфонамиди, пиримидини, тетрациклини, нитроимидазоли, транкуилизанти, амфениколет и NSAIDs агенти) од сурово млеко, добиле аналитичкиот принос во опсег 70-120%, на ниво на збогатување од 1–150 µg/L. Коефициентот на варијација (CV_r , %) за повторливоста и за репродуцибилноста (CV_R , %) не треба да биде повисок од препорачаната максимална вредност за прецизноста која се определува според равенката на Horwitz (Табела 18).

Табела 18. Критериуми за прецизност на методот (2002/657/EC)

Концентрација	Репродуцибилност, CV (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg (1 mg/kg)	16
За масените фракции пониски од 100 µg/kg, примената на равенката на Horwitz дава неприфатливо високи вредности. Затоа CV за концентрации помали од 100 µg/kg треба да биде колку што е можно понизок.	

За концентрациските нивоа во оваа истражување, за концентрации ≥ 100 µg/kg, CV треба да изнесува максимум 23 %, додека за пониските концентрации оваа равенка не е применлива, па вредноста за CV треба да биде колку што е можно пониска.

Коефициентот на варијација за повторливоста на методот се движи во опсег од 1,08 % (тилозин во концентрација од 50 µg/L и линкомицин во концентрација од 100 µg/L) до 20.28% (амоксицилин во концентрација од 2.0 µg/L), додека коефициентот на варијација за репродуцибилноста на методот се движи во граница од 3,14.% (линкомицин во концентрација од 100 µg/L) до 22.88% (окситетрациклин при концентрација од 50 µg/L). Резултатите за коефициентот на варијација не ги надминуваат прифатливите вредности

пропишани во 2002/657/ЕС, што всушност значи дека истите се во согласност со пропишаните критериуми. Резултатите се споредливи со истражувањата објавени од други автори, а се однесуваат на детекција на антибиотици од различни класи и употреба на различни методи за екстракција. Во истражувањето на Amatyа во 2010, коефициентот на варијација е помал од 15 %, а додека во истражувањето спроведено од Šorík и sor., 2016 коефициентот на варијација е помал од 7.3 % за концентрација од 100 µg/L. Во опсег од 4.4 до 18 % се движи коефициентот на варијација во истражувањето од Dasenaki и Thomaidis, 2015. Во студијата на Martins и sor 2016, коефициентот на варијација за повторливоста се движи од 3.8-15%, додека коефициентот на варијација за репродукцибилноста се движи од 0.8-17.3%.

Добиените резултати од валидацијата на методот, која ги опфаќа параметрите: линеарност, специфичност/селективност, LOD, LOQ, ССа, ССβ, точност и прецизност на методот во целост ги исполнуваат критериумите за точност и прецизност пропишани во 2002/657/ЕС, што значи дека методот е соодветен за неговата намена и може да се користи при рутинска анализа на антибиотици во млеко.

6.7 Анализа на примероци

Во ова истражување во периодот од 2017 до 2019 година вкупно беа анализирани 400 примероци од сурово млеко и тоа 240 примероци кравјо млеко, 98 примероци овчо и 62 примероци козјо млеко. Сите примероци беа анализирани после оптимизација и валидација на LC-MS/MS методот со цел да се добијат точни и прецизни резултати. Антибиотици беа детектирани во вкупно 21 примероци, односно во 5.25 % од вкупно анализираниите примероци. Нивото на концентрација на детектираните остатоци од антибиотици беше над LOQ но, под максималното дозволено ниво на остатоци утврдени од ЕУ.

Резултатите од анализираниите примероци покажуваат дека нема потенцијално несообразен примерок, односно во ниту еден од примероците не беа детектирани остатоци од антибиотици на ниво на концентрации над утврдените ССа вредности и над MRL вредноста.

Добиените резултати од анализираниите примероци во оваа истражување се споредливи со резултатите добиени од мониторингот на антибактериски средства кој, меѓу другото,

вклучува бета-лактами, тетрациклини, макролиди, аминогликозиди, сулфонамиди и хинолони (B1 група) во ЕУ во периодот од 2016-2018 година (Табела 19).

Табела 19. Анализирани и несообразни примероци од антибиотици во ЕУ во 2016, 2017 и 2018 година

Соедине- нија	Анализирани примероци	Несообразни примероци	Несообразни примероци %	Година
B1	10.415	4	0.04	2018
B1	10.634	19	0.18	2017
B1	11.929	7	0.06	2016

Овие податоци за присуството на остатоци од ветеринарно-медицински производи и одредени супстанции кај живи животни и производи од животинско потекло во Европската Унија детално се објавени во извештаите на European Food Safety Authority (EFSA). Од извештаите на EFSA може да се анализираат голем број на податоци, како што се на пример бројот на анализирани и бројот на несообразни примероци по години, број на примероци по држави, видови на детектирани антибиотици по држави итн. Во 2018 анализирани се вкупно 10415 примероци, во 2017 анализирани се вкупно 10634 примероци, а во 2016 година анализирани се вкупно 11929 примероци. Во 2018 година антибиотиците биле детектирани во 4 примероци (0.04%) и тоа окситетрациклин, амоксицилин, клоксацилин и аминосидин (EFSA, 2020), во 2017 година, антибиотиците биле детектирани во 20 примероци (0.18 %) (EFSA, 2019) и тоа во 5 примероци флуорфеникол, во 2 примероци биле детектирани бензилпеницилин и доксициклин, а во другите примероци биле детектирани окситетрациклин, тетрациклин, триметоприм, тулатромицин, клоксацилин, цiproфлосацилин, ампицилин и цефалониум (EFSA, 2016). Најголем број несообразни примероци во овој период бил детектиран во Велика Британија и тоа во 8 примероци, потоа во Португалија и Италија во 5 примероци, во 4 примероци во Шпанија, 2 примероци во Хрватска, а по 1 примерок во Грција, Германија, Австрија и Кипар. Janč и сор., во 2012 во Бразил детектирале антимицробните средства во 13 примероци (0.34%), а вкупниот број на анализирани примероци бил 3833. Највисоката концентрација

која е детектирана е 847.7 $\mu\text{g/kg}$ за доксициклин во говедско месо, на која MRL изнесува 100 $\mu\text{g/kg}$. Тилмикозин, флоксацилин и цефтиофур исто така биле детектирани во сурово млеко во концентрациите над MRL (MRL=100 $\mu\text{g/kg}$).

Amatya во 2010 во Шпанија анализираше вкупно 49 примероци од млеко. Открил дека 37% од примероци не биле на ниво на концентрации над утврдените ССВ вредности. Од сите анализирани примероци, 14% содржеле амоксицилин со висока концентрација од 42.3 $\mu\text{g/kg}$ и 16% од примероците содржеле бензилпеницилин со концентрација од 12.7 $\mu\text{g/kg}$.

Martins и сор., во 2016 во Бразил детектирале ципрофлоксацин во четири примероци млеко, односно окситетрациклин во шест примероци и во еден примерок тетрациклин. Во еден примерок концентрацијата на окситетрациклин била речиси 10 пати повисока MRL вредноста (981 $\mu\text{g/kg}$).

Од добиените резултати може да се заклучи дека во ниту еден примерок не е детектиран антибиотик во концентрација повисока од MRL вредноста, но од друга страна сепак антибиотиците во млеко се присутни, иако во ниски концентрации. Поради тоа контролата на антибиотиците во млекото, како и во другите видови храна од животинско потекло, мора да биде постојана практика, се со цел да се обезбеди храна која што ќе биде безбедна по здравјето на луѓето.

7. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на добиените резултати може да се донесат следните заклучоци:

- За оптимизација на аналитичкиот метод за екстракција на антибиотици од сурово млеко беа тестирани пет протоколи за екстракција, при што задоволувачки резултати се постигнаа при екстракција со 20 % трихлорооцетна киселина и McIlvaine пуфер проследена со цврсто-фазна екстракција со Oasis HLB колонки за прочистување. Добиениот елуат со овој протокол за екстракција ги содржеше сите целни аналити, интерференциите со матриксот беа отстранети, избегната е деградација на аналитите, екстрахирани се високополарни компоненти и аналити кои создаваат хелатни комплекси. Методот за екстракција е соодветен за екстракција на 23 антибиотици од различни класи од матрикс сурово млеко;
- Со оптимизација на хроматографските услови, како што се мобилната фаза, градиентот, протокот, типот на хроматографската колона и нејзина температура при анализа беше добиена максимална чувствителност и резолуција, задоволително раздвојување на сите антибиотиците вклучени во оваа истражување;
- Со оптимизација на MS/MS условите се добиени масените спектри на целните антибиотици, при што за докажување се користат два продукт јони, и тоа, јонот со најголем интензитет за квантификација, а вториот јон за идентификација на аналитот;
- Со оптимизација и валидација на методот, согласно критериумите пропишани во Одлуката на Комисијата 2002/657/EC добиен е селективен, точен, прецизен и потврден LC-MS/MS метод за истовремено определување на 23 антибиотици (ампицилин, амоксицилин, бензилпеницилин, цефалексин, цефтиофур, цефапирин, ципрофлоксацин, клоксацилин, хлортетрациклин, доксициклин, енрофлоксацин, линкомицин, оксацилин, окситетрациклин, сулфахлоропиридазин, сулфафуразол,

сулфадиазин, сулфадиметоксин, сулфадимидин, сулфаметоксазол, триметоприм, тилозин и тетрациклин) од повеќе класи во сурово млеко;

- Резултатите од валидирани параметри: линеарност, специфичност/селективност, определување на ССа и ССβ, точност, прецизност се во согласност со условите во Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС;
- Вкупното време за анализа на еден примерок (run time) на LC-MS/MS инструментот е доста кратко и изнесува 13 минути;
- Методот може да се користи за рутинска анализа за определување на антибиотици во сурово млеко;
- Од добиените резултати при рутинска анализа на примероци од млеко може да се заклучи дека не е детектиран антибиотик во концентрација повисока од MRL вредноста, иако истите се детектирани во ниски концентрации во 5.25 % од вкупно анализираните примероци;
- Контролата за присуство на антибиотици во сурово млеко мора да биде постојана, со цел да се заштити здравјето на луѓето и да се спречи појава на несакани ефекти.

8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Alija Gj., Hajrullai-Musliu Z., Uzunov R. 2020. Development and validation of confirmatory LC–MS/MS method for multi-residue analysis of antibiotic drugs in bovine milk. *SN Applied Sciences*, 2 (1563).
- Abebew D., Belihu K., Zewde G., 2014. Detection and determination of Oxytetracycline and Penicillin G antibiotic residue levels in bovine bulk milk from Nazareth dairy farms, Ethiopia. *Ethiop Vet J* 18(1): 1-15
- Adzitey F. 2015. Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. *World's Vet. J.* 5(3): 36-41
- Allen SJ, Wareham K, Wang D, et al. A high-dose preparation of lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated and *Clostridium difficile* diarrhoea in older people admitted to hospital: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel arm trial (PLACIDE). Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2013 Dec. (Health Technology Assessment, No. 17.57.) Appendix 7, Classification of antibiotics (according to British National Formulary 2012) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK261327/>
- Anderson R.C., Rupp S.H., Wu W.H, 2005. Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1075:23–32.
- Amatya R. 2010. MultiClass, Multi Residue Method for Determination of Penicillins, Cephalosporins and Quinolones in Cow Milk and Validation in Accordance with Commission Decision 2002/657/E C. European Masters in Quality in Analytical Laboratories
- Amol R. P., Malapure C.D., Vijay D. D., Bhupesh P. K. 2015. Occurrence, Public Health Implications and Detection of Antibacterial Drug Residues in Cow Milk *Environ. We Int. J. Sci. Tech.* (10) 7-28
- Asredie T. Engdaw T. A. 2015. Antimicrobial residues in cow milk and its public health significance. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 10 (2): 147-153.
- Bando E., Oliveira R.C., Ferreira G. M. Z., Machinski M. 2009 Occurrence of Antimicrobial Residues in Pasteurized Milk Commercialized in the State of Parana', *Brazil Journal of Food Protection*, Vol. 72, No. 4, 911–914
- Baynes R. E., Dedonder K., Kissell L., Mzyk D., Marmulak T., Smith G., Tell L., Gehring R., Davis J., Riviere J.E. 2016. Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food and Chemical Toxicology* 88 112-122
- Bayou K., Haile N. 2017 Review on Antibiotic Residues in Food of Animal Origin: Economic and Public Health Impacts. *Applied Journal of Hygiene* 6 (1): 01-08
- Berendsen B.J.A. 2013. LC-MS residue analysis of antibiotics, what selectivity is adequate? PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL
- Berruga, M.I., Molina, A., Althaus, R.L., Molina, M.P., 2016. Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goats milk. *Small Ruminant Research*
- Bitas D., Kabir A., Locatelli M., Samanidou V., 2018 Food sample preparation for the determination of sulfonamides by high-performance liquid chromatography: State-of-the-art. *Separations*, 5, 31;
- Botsoglou N. A., Fletouris D. J. 2001 Drug residues in foods, pharmacology, food safety and analysis. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.

- Brcina I., Gjorgjeska B. 2018. Development and validation of HPLC method for in vitro determination of dissolution of bromazepam in tablets. KNOWLEDGE – International Journal Vol. 23.2 Budva, Montenegro.
- Castanon J. I. R. 2005. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. Antibiotics in European Poultry Feeds
- Cheng YE, Phillips DJ, Neue U (1997) Simple and rugged SPE method for the determination of tetracycline antibiotics in serum by HPLC using a volatile mobile phase. Chromatographia 44(3/4):187–190
- Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results OJ L 221, 17.8.2002, p. 8–36
- Council Directive 96/23/EC European Council Directive 96/23/EC, on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC Off. J. Eur. Commun. L125 (1996) 10 – 32
- Council Regulation 2377/90/EEC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official Journal European Communities No. L224, (18.8.90).
- Commission regulation 37/2010/EC of 22 December 2009: on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union, 15/1
- Commission regulation 1831/2003 of the european parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union L 268/29
- Ćupić V., Turubatović L., Antonijević B., Velež R., Čelebićanin S., Ćupić D. 2011. Rational use of drugs in veterinary medicine and food safety. Journal of Hygienic Engineering and Design. Review paper UDC 636.087.8
- Daeseleire E., Van Pamel E., Van Poucke C., Croubels S. 2017. Chemical contaminants and residues in food (Second Edition), Chapter 6 - Veterinary Drug Residues in Foods. ISBN: 978-0-08-100674-0, pp. 117-141
- Dimitrieska-S. E., Hajrulai-Musliu Z., Stojanovska-Dimzoska B., Sekulovski P., Uzunov R., 2011. Screening of veterinary drug residues in milk from Macedonia Mac. Vet. Rev. 34 (1), 5 - 13,
- Doyle E. M. 2006. Veterinary Drug Residues in Processed Meats — Potential Health Risk FRI BRIEFINGS. VetDrgRes
- Dasenaki, M.E., Thomaidis N.S., 2015. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta ACA 233856
- EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Technical report of EFSA: Report for 2016 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publications 2018:EN-1150, pp69. Available online, <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1358>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Report for 2017 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2017:EN-NNNN. 93 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2017

- EFSA (European Food Safety Authority), 2020. Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2020:EN-1775. 74 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1775
- Emiri A. 2013 Studimi me metodën e kromatografisë të lëngët me performancë të lartë i nivelit të mbetjeve të sulfonamideve në produktet me origjinë shtazore të destinuara për konsum njerëzor Doktor I Shkencave Fakulteti I shkencave te Nayres Universiteti I Tiranës. Tirane
- Etebu E. Arikekpar I. 2016. Antibiotics: classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives IJAMBR (4) 90-101
- Falowo A.B., Akimoladun O.F. 2017 Veterinary Drug Residues in Meat and Meat Products: Occurrence, Detection and Implications DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.83616>
- Fangama M.I.M. 2019 Prevalence of Antibiotics Residues in Meat and Application of (HACCP) in Khartoum State. PhD thesis Department of Preventive Medicine and Public Health, College of Veterinary Medicine, Sudan University of Science and Technology. Sudan
- Freitas A. A. R. 2015. Development and Validation of Analytical Methodologies for the Determination of Antibiotics in Food of Animal Origin for Human Consumption PhD Thessis Universidade de Coimbra
- FreitasA., BarbosaJ., RamosF. 2013. Development and validation of a multiresidueand multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screeningof antibiotics in milk. International Dairy Journal. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.05.019.
- Furgasa W., Beyene T. 2018 Review on Antimicrobial Usage in Food Animals: Challenges in Ethiopia and its Future Perspectives. Sch. J. Agric. Vet. Sci., Sept. 5(9): 471-482
- Gaugain-Juhel M., Delépine B., Gautier S., Fourmond M.P., Gaudin V., Hurtaud-Pessel D., Verdon E. and Sanders P. 2009. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach, Food Additives & Contaminants, vol. 26, pp. 1459-1471
- Gaurav A., Gill J.P.S., Aulakh R.S., Bedi J.S. 2014. ELISA based monitoring and analysis of tetracycline residues in cattle milk in various districts of Punjab. Veterinary World, EISSN: 2231-0916
- Gonzalez C. A., Usher K. M. 2009. Determination of sulfonamides in milk using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry Agilent Technologies, Inc., USA
- Goul K. 2016. Antibiotics: from prehistory to the present day. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 572–575.
- Gustafson R.H., Bowen R.E. 1997. Antibiotic use in animal agriculture Journal of Applied Microbiology . 83, 531–541
- Goulette R.R., 2007. Investigation of Saf estigation of Safe-Level Testing for Beta-lactam, Sulfonamide, esting for Beta-lactam, Sulfonamide, and Tetracycline Residues in Commingled Bovine Milk, Salve's Dissertations and Theses. Salve Regina University. New Port USA
- Han R.W., Zheng N., Yu Z.N., Wang J., Xu X.M., Qu X.Y., Li S.L. , Zhang Y.D.,. Wang Q., 2015 Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS. Food Chemistry 181, 119–126.
- Heshmati A. 2015 Impact of Cooking Procedures on Antibacterial Drug Residues in Foods: A Review Journal of Food Quality and Hazards Control (2) 33-37

- Huet AC, Fodey T, Haughey SA, Weigel S, Elliott C, Delahaut P. 2010. Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 29, No. 11, , 1281-1294
- Ibrahim I.G., Amna E., , Yarsan E., Altintas L., Tumer I., 2016 Methods for Screening Veterinary Drug Residues in Animal Products: A review *Sudan J. Vet. Res.*, 31, 1-9
- Jank L., Martins M. T., Arsand J. B., Motta T. M. C., Hoff R. B., Barreto F., Pizzolato T. M. 2015. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). *Talanta* 144, 686-695
- Jank L., Hoff R.B., Tarouco P.C., Barreto F., Pizzolato T.M. 2012. β -lactam antibiotics residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid-liquid extraction method. *Food AdditContam: Part A* 29(4):497-507
- Jayalakshmi K., Paramasivam M., Sasikala M., Tamilam T.V. and Sumithra A. 2017. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 5(3): 1446-1451
- Jovanov P. 2014. Optimizacija metoda ekstrakcije i određivanja neonikotinoida tečnom hromatografijom u odabranim uzorcima, doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-Matematički Fakultet Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine
- Jušćáková D., Kožárová I. 2017. Determination of antibiotic residues in milk by microbial inhibitory test *FOLIA VETERINARIA*, 61, 3: 57—64.
- Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. 2011. Quantitative and confirmative performance of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry compared to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25, 979 – 992.
- Khan F. 2018. Antibiotics Classification and Visual Target Sites for Bacterial Inhibition. *Adv Pharmacol Clin Trials*. ISSN: 2474-9214
- Khaskheli M., Malik R.S., Arain M.A., Soomro A.H. and Arain H.H. 2008. Detection of β - Lactam antibiotic residues in market milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (5): 682-685
- Kinsella B., O'Mahony J., Malone E., Moloney M., Cantwell H., Furey A., Danaher M. 2009. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 13, 7977-8015
- Kumar M., Khan M. Sh., Zubair M., Sehgal Sh., Jaithliya T. Tiwari A. 2018. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC- MS). *EJBPS Volume 5, Issue 5* 941-947.
- Makovec S., Kos B., Šušćković J., Bilandžić N. 2014. Tetracycline antibiotics and determination of their residues in food: *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 9 (1-2) 7-16
- Makut M. D., Owolewa O. A. 2011 Antibiotic- producing fungi present in the soil environment of Keffi metropolis Nasarawa state, Nigeria. *Trakia Journal of Sciences*, 9, No 2, pp 33-39
- Martins-Júnior I H. A.; Kussumi I T. A.; Wang I I A. Y.; Lebre D. T.I. 2007 A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* vol.18 no.2
- Martins M.T., Barreto F., Hoff R.B., Jank L., Arsand J.B., Motta T.M.C., Schapoval E.E.S. (2016) Multiclass and multi-residue determination of antibiotics in bovine milk by liquid chromatography tandem mass

- spectrometry: Combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis. *International Dairy Journal*, 59, 44-51.
- Martnez-Huelamo M., Jimenez-Gamez E., Hermo M. P., Barron D., Barbosa J., 2009. Determination of penicillins in milk using LC-UV, LC-MS and LC-MS/MS. *J. Sep. Sci.*, 32, 2385 – 2393.
- Marilena D. 2015. Development of methods for the determination of veterinary drugs in food matrices by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. Doctoral thesis. National and Kapodistrian University of Athens, Greece
- McGrane M. 2000. Analysis of antibiotic drug residues in biological matrices, after evaluation of various extraction methodologies and determination procedures. Doctoral thesis. Dublin City University Castletown
- McGinnis J., Stern J., Carver J.S., 1950 The effect of different antibiotics on growth of turkey poult
- Nisha A.R.2008. Antibiotic Residues - A Global Health Hazard. *Veterinary World* 1(12): 375-377
- Oka H., Ito Y., Matsumoto H. 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A* 882:109–133.
- Ortelli D., Cognard E., Jan Ph., Edder P. 2009. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra- performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 2363–2374.
- Park E.K , Ryu Y.J., Cha Ch.N., Yoo Ch.Y., Kim S., Lee H.J. 2016. Analysis of antibiotic residues in milk from healthy dairy cows treated with bovine mastitis ointment using ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Korean J Vet Res.* 56(4) : 233~239
- Padol A. R., Malapure C. D., Dimple V. D., Kamdi B. P. 2015. Occurrence, public health implications and detection of antibacterial drug residues in cow milk. *Environ. We Int. J. Sci. Tech.* 10 7-28
- Pelvan M. 2011. Determination of antibiotics in raw and uht milk samples by the image forming method of biocrystallization. Master Thesis Food Engineering Izmir
- Pena L.P., Lino M.C., Silveira M.I.N. 2003. Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescence detection. *J AOAC Int* 86(5):925–929
- Pitt J. J. 2009. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 30(1): 19–34.
- Preston L.S., Pharm.D., George L. Drusano, M.D. Penicilins. Antimicrobe drugs. <http://www.antimicrobe.org/d24.asp#r10>
- Radišić M. 2013. Razvoj i primena metode tačne hromatografije–tandem masene spektrometrije za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu Tehnološko-Metalurški fakultet, Beograd, Srbija
- Reybroeck W. 2010. Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey. Doctoral thesis. Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Laboratory of Chemical Analysis
- Salih H.I.M. 2006. Residues of antibiotic in poultry meat. PhD thesis. Faculty of Veterinary Medicine, University of Khartoum.
- Sababya Sachi, Jannatul Ferdous, Mahmudul Hasan Sikder, S M Azizul Karim Hussani. 2019. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of advanced veterinary and animal research.* 6 (3), pp. 315–332

- Santos L., Ramos F. 2016. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: a review. *Trends Food Sci Technol* 52:16–30.
- Samanidou V., Nisyriou S. 2008. Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk. *J. Sep Sci.*;31(11):2068-90.
- Scheld M.W. 2003. Maintaining Fluoroquinolone Class Efficacy: Review of Influencing Factors. *Perspectives*, 9 (1), pp.1-9
- Schwaiger B., König J., Lesueur C. 2018. Development and Validation of a Multi-class UHPLC-MS/MS Method for Determination of Antibiotic Residues in Dairy Products. *Food Analytical Methods* 11, 1417–1434
- Schwarz S., Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research, BioMed Central*. 32 (3-4), pp.201-225
- Seri H. I. 2013. Introduction to Veterinary drug residues: Hazards and Risks. *Veterinary Drug Residues in Food Derived From animals*
- Shankar, B.P., Manjunatha Prabhu, B.H., Chandan, S., Ranjith, D., Shivakumar, V. 2010. Rapid Methods for detection of Veterinary Drug residues in Meat. *Veterinary World* Vol.3(5):241-246
- Šopík, T., Vydrová, L., Zálešáková, L., Buňka, F. 2016. Development of a method for analysis of tetracycline residues in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry IGA/FT/2016/003
- Stolker, A. A. M.; Rutgers, P.; Oosterink, E.; Lasaroms, J. J. P.; Peters, R. J. B.; Van Rhijn, J. A.; Nielen, M. W. F. (2008). Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Anal Bioanal Chem* 391, 2309 – 2322
- Sulejmani Z., Shehi A., Hajrulai- Musliu Z., Mata E. 2012. Abuse of Pharmaceutical Drugs-antibiotics in Dairy Cattle in Kosovo and Detection of their Residues in Milk. *J Ecosyst Ecogr*. 2:4
- Taćić A., Nikolić V., Nikolić L., Savić I. 2017. Antimicrobial sulfonamide drugs. *Advanced technologies* 6(1) 58-71
- Taverniers I., Loose M. D., Bockstaele E. V. 2004 Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, No. 8.
- Tyczkowska, K. L.; Voyksner, R. D.; Aronson, A. L. (1992). Solvent degradation of cloxacillin in vitro: Tentative identification of degradation products using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 594, 195 – 201.
- Ullah H., Ali S. 2017. Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions. *Antibacterial Agents*. Chapter 1.
- Virolainen N. 2012. Antimicrobial Detection Illuminated: Developing Bioluminescent Antibiotic Biosensors Based on Bacterial Gene Regulatory Elements. *ISSN 1459-2045*
- Yarsan E. 2012. Antibiotics in veterinary medicine: resistance to antibiotics and its multiple effects. *World Veterinary Day*. Ankara
- Yoneyama H., Katsumata R. 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *biosci. Biotech. and Biochem* 70 (5) 1060-1075
- Wang J., Macneil J., Kay J.F. 2012. Chemical analysis of antibiotic residues in food. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Canada

Zhan J., Yu X.J., Zhong Y.Y., Zai-ting Zhang, Cui X.M., Peng J.F., Feng R., Liuc X.T., Zhua Y. 2012. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 906:48–57.

Zhan G. G., Walkty A., Vercaigne L, Karlowsky J.A., Embil J., Gin A.S., Hoban D. J. 1999. The new fluoroquinolones: A critical review. *Can J Infect Dis.* 10(3):207-38.

Велев, Р.А. 2013 Фармакологија, Скопје

Правилник за начинот на вршење на мониторинг и контрола на присуството на резидуи и контаминенти во живите животни и храната од животинско потекло, начинот на вршење на официјалните контроли и постапките за мониторинг и контрола на резидуи и недозволен супстанции и мерките кои се преземаат во случај на сомнение и на позитивен наод на присуство на резидуи и недозволен супстанции, Службен весник на Република Македонија, број 80, 2011, стр. 38-54

Узунов Р. 2019. Мултирезидуална анализа на бета агонисти во биолошки матрикси со примена на LC-MS/MS метод. Докторска дисертација. Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје, Факултет за ветеринарна медицина – Скопје.