

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

2. Šifra projekta:

V4-0320

3. Naslov projekta:

Uvedba in validacija metod določanja ostankov nekaterih veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Uvedba in validacija metod določanja ostankov nekaterih veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Introduction and validation of some methods for the detection of certain veterinary drugs in food of animal origin

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Veterinarska zdravila, živila živalskega izvora, ostanki, validacija, LC-MS/MS, mikrobiološka metoda

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Veterinary drugs, food of animal origin, residues, validation, LC-MS/MS, microbiological methods

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Ljubljani (Veterinarska fakulteta)

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

6. Sofinancer/sofinancerji:

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

8110

Dr. Ksenija Šinigoj Gačnik

Datum: 12.3.2008

Podpis vodje projekta:

Dr. Ksenija Šinigoj Gačnik

K.Šinigoj



Podpis in žig izvajalca:

Doktorica Ksenija Šinigoj Gačnik
to kopiranje
Dejan P. dr. Miroslav Prajčič

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

a) v celoti

b) delno

c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

a) da

b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

Določanje nitroimidazolov v jaci

Odločili smo se za validacijo HPLC-DAD metode kot kvantitativne metode in ne LC-MS/MS metode, ker smo imeli težave pri dokončni postavitvi kromatografskih pogojev za LC-MS/MS. Kvantitativno vrednotenje nameravamo izvajati z metodo HPLC-DAD.

Določanje polietrskih antibiotikov z LC-MS/MS

Poleg najavljenih lasalocida, monensina, salinomicina in narasina smo v postopek vključili še maduramicin.

Presejalna mikrobiološka metoda ugotavljanja tetraciklinov v mleku

Namesto validacije v mesu smo opravili validacijo v mleku, ker se srečujemo predvsem s pozitivnimi vzorci mleka, ki vsebujejo tetracikline.

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Določanje polietrskih antibiotikov z LC-MS/MS

Uvedli smo LC-MS/MS metodo za določanje polietrskih ionofornih antibiotikov v jajcih in jetrih. Kromatografska ločba in MS/MS detekcija sta za vzorce jajc in jeter enaki, različna sta postopka ekstrakcije in čiščenja ekstraktov. V metodo smo vključili poleg salinomicina, monensina, lasalocina in narasina tudi maduramicin, ki ga rejci prav tako uporabljajo za preprečevanje kokcidioze in spada med polietrske antibiotike. Kot interni standard uporabljamo nigericin.

Kromatografsko ločbo omenjenih substanc smo poskušali doseči z uporabo različnih kolon (dve proizvajalca Phenomenex: Luna C₁₈, 2,5 µm, 100 x 2 mm I.D. ter Luna C₁₈, 5 µm, 150 x 3 mm I.D. in eno proizvajalca Waters: Xterra C₁₈, 5 µm, 100 x 2.1 mm). Najboljšo ločbo smo dosegli z uporabo Waters-ove kolone Xterra C₁₈ 5 µm 100 x 2.1 mm I.D.

Mobilna faza je acetonitril in voda z dodatkom 0,1 % mravljične kisline. Ločba poteka 20 minut pri pretoku 0,3 mL/min. Injekcijski volumen je 10 µL. Kromatografijo začnemo s 100 % vodne faze, po 7 minutah preidemo na 100 % organske faze in pri 16 minutah ponovno vzpostavimo začetno stanje.

Osnovni pogoji na masnem detektorju so: ionizacija ESI+, kapilarna napetost 3,2 kV, temperatura izvora 120 ° C, desolvacijska temperatura 350 ° C, plin na stožcu 100 L/uro, desolvacijski plin 800 L/uro, CID plin je argon 3,2 x 10⁻³ barr. Mase in ostali pogoji so podani v Tabeli 1.

Tabela 1:

Analit	R _t	Prekurzor (m/z)	Hčerinski ion (m/z)	Napetost na stožcu (V)	Kolizijska energija (eV)
Salinomicin-Na	11,34	773	431	60	52
		773	531	60	46
Monensin-Na	11,38	693	675	60	40
		693	461	60	55
Narasin-Na	11,69	787	431	60	52
		787	531	60	46
Maduramicin-NH ₄	11,90	934	629	28	28
		934	647	28	22
Nigericin-Na interni standard	12,21	747	729	50	55
Lasalocid-Na	12,96	613	377	60	40
		613	595	60	30

Za ekstrakcijo in čiščenje vzorcev smo želeli vpeljati hitro metodo z minimalno porabo organskih topil, zato smo se odločili, da bomo sledili postopku, ki ga uporabljajo v Centralnem referenčnem laboratoriju za ostanke veterinarski zdravil v Berlinu (EU

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

Reference Laboratory for Residue of Veterinary Drugs). Omenjeni postopek smo prilagodili opremljenosti našega laboratorija in uvedli nekatere spremembe.

Postopek čiščenja za jajca

Odtehtamo 2 g jajc in dodamo interni standard (nigericin-Na). Kokcidiostatike iz jajc ekstrahiramo s 5 mL acetonitrila. Uporabljamo električni stresalnik, ekstrakcija pa poteka 15 minut pri sobni temperaturi. Ekstrakt od vzorca ločimo s pomočjo centrifugiranja (10 min, 3000 rpm). Ekstrakt posušimo pod tokom dušika do suhega. Suhi ostanek raztopimo v deionizirani vodi (5 mL) in ga očistimo z uporabo 60 mg polimerne Strata-X SPE kolone (Strata-X, 33 μ m, Polymeric Reversed Phase 60 mg/3 mL, Phenomenex). Pred uporabo kolono pripravimo s 3 mL metanola in nato še s 3 mL deionizirane vode, šele nato na kolono naneseemo vodno raztopino. Kolono speremo s 3 mL vode in jo nato posušimo do suhega s pomočjo vakuuma. Kokcidiostatike eluiramo iz kolone z metanolom (5 mL). Eluat posušimo pod tokom dušika do suhega in ostanek raztopimo v 0,5 mL mešanice acetonitrila in vode (50/50).

Postopek čiščenja za jetra

Odtehtamo 2 g jeter in dodamo interni standard (nigericin-Na). Dodamo še 4 mL acetonitrila in vzorec homogeniziramo z Ultra-turraxom (1 min). Sledi centrifugiranje (10 min, 3000 rpm, 4 ° C). Ekstrakt prelijemo v drugo epruveto, ostanku pa ponovno dodamo 2 mL acetonitrila in 15 min stresamo s stresalnikom. Ponovno centrifugiramo in oddekanirana ekstrakta združimo. Dodamo 0,5 mL raztopine polietilenglikolov in ekstrakt posušimo pod tokom dušika do 0,5 mL. Ostanku dodamo 5 mL deionizirane vode in nadaljujemo s čiščenjem na polimerni Strata-X koloni enako kot pri jajcih.

Koncentracijo kokcidiostatikov v vzorcu določimo s pomočjo umeritvene krivulje v matriksu. Pri umeritvenih krivuljah za jajca so korelacijski koeficienti (r) za vse testirane polietske antibiotike večji od 0,99 v koncentracijskem območju od 1 do 80 μ g/kg. Meje zaznav metode za vzorce jajc so 10 μ g/kg za lasalocid, 5 μ g/kg za maduramicin in 3 μ g/kg za salinomicin, narasin in monensin. Meje zaznav za vzorce jeter pa so za lasalocid, monensin, salinomicin in narasin 10 μ g/kg, za maduramicin pa 25 μ g/kg.

Meje vrednotenja metode za vzorce jajc pa 20 μ g/kg za lasalocid, 10 μ g/kg za maduramicin in 5 μ g/kg za salinomicin, narasin in monensin. Meje vrednotenja za vzorce jeter so za lasalocid, monensin, salinomicin in narasin 20 μ g/kg, za maduramicin pa 50 μ g/kg.

Izkoristki ekstrakcij so različni za različne polietske antibiotike in se giblje med 50 in 80 % pri vzorcih jajc. Pri vzorcih jeter so doseženi izkoristki nekoliko slabši, okoli 40 % za vse testirane polietske antibiotike.

Pravilnost postopka smo preverili s sodelovanjem v medlaboratorijski preiskovalni shemi (FAPAS, Proficiency Test 0286 in Proficiency Test 02103), saj za tovrstne substance nimamo certificiranih referenčnih materialov. Na žalost matriks ni bil jajce oz. jetra ampak meso pri obeh medlaboratorijskih shemah, tako da dobljeni rezultati za našo metodo služijo predvsem preverjanju glede pravilnosti identifikacije posameznega analita in principa vrednotenja. Rezultati so bili dobri, saj smo v obeh primerih izmed petih možnosti pravilno identificirali prisotne analite; v vzorcu 0286 lasalocid in salinomicin, v vzorcu 02103 pa narasin in nkarbazin. V vzorcu 0286 smo identificirali salinomicin v koncentraciji 29 μ g/kg (prava vsebnost 31,6 μ g/kg) z z-skorom -0,4 in lasalocid. Zaradi bimodelne porazdelitve rezultatov pri lasalocidu, nimamo podatkov o pravi vsebnosti letega. V vzorcu 02103 pa smo identificirali narasin v koncentraciji 46 μ g/kg (prava vsebnost 56,6 μ g/kg) z z-skorom -0,9 in ncarbazin v koncentraciji 200 μ g/kg (prava vsebnost 203 μ g/kg) z z-skorom -0,1.

Določanje nitroimidazolov v jajcih

Nitroimidazole določamo v našem laboratoriju s HPLC-DAD metodo. Odločili smo se za validacijo že obstoječe metode in za vpeljavo potrditvene metode na LC-MS/MS. Glede priprave vzorcev, ekstrakcije analitov iz vzorcev in čiščenja ekstraktov, smo sledili članku Sams-a s sodelavci (Sams in sod. Analyst, 1998), kromatografsko ločbo pa smo optimizirali.

Vpeljava LC-MS/MS

Preverili smo ali je postopek čiščenja, ki ga uporabljamo za določanje nitroimidazolov s HPLC-DAD metodo, primeren tudi za potrditveno metodo z LC-MS/MS in ugotovili da je. Uvedli smo LC-MS/MS metodo za potrditev nitroimidazolov v jajcih. Najboljšo kromatografsko ločbo smo dosegli z uporabo kolone Waters (Xterra C₁₈, 5 µm 100 x 2.1mm I.D.). Kot mobilno fazo smo uporabljali acetonitril in deionizirano vodo z 0,1 % mravljične kisline. Pretok je 0,3 mL/min, injekcijski volumen 10 µL.

Detekcija poteka z masnim spektrometrom pod sledečimi pogoji: ionizacija ESI+, kapilarna napetost 4,0 kV, temperatura izvora 120 ° C, desolvacijska temperatura 350 ° C, plin na stožcu 100 L/uro, desolvacijski plin 800 L/uro, CID plin je argon 3,2 x 10⁻³ barr.

Kot interni standard uporabljamo dimetridazol-d₃ in ronidazol-d₃.

Mase so sledeče: za dimetridazol (DMZ) je prekursor 142, dva hčerinska iona pa 96 in 81, za ronidazol (RNZ) 201 in 140 ter 110, za metronidazol (MNZ) 172 ter 128 in 82, za hidroksimetronidazol (MNZ-OH) 188 in 144 ter 126, za hidroksidimetridazol (DMZ-OH), ki je skupen metabolit DMZ in RNZ, 158 ter 140 in 110, za dimetridazol-d₃ je prekursor 145 in hčerinski ion 99 ter za ronidazol-d₃ 204 in hčerinski ion 143.

Validacija HPLC-DAD metode

Kratek opis postopka priprave vzorcev: ekstrakcija z acetonitrilom, čiščenje ekstrakta na koloni polnjeni z močnim kationskim izmenjevalcem, koncentriranje na 0,4 mL pod tokom dušika. Kromatografska ločba poteka na C-18 analitski koloni Synergi 4 µ Hydro-RP 80A (Phenomenex, 4µm, 250 x 4,6 mm I.D.) uporabljena predkolona je polnjena s C-18 polnilom (Phenomenex, 4,0 x 3,0 mm I.D.). Mobilna faza je mešanica acetonitrila z acetatnim pufrom pH 4,3. Pretok mobilne faze je 1 mL/min, injekcijski volumen vzorca je 100 µL.

Parametri dobljeni pri validaciji so

Umeritvene krivulje standardnih raztopin so v območju od 6,25 ng/mL do 150 ng/mL linearne s korelacijskimi koeficienti 0,99995 za MNZ-OH, 0,99999 za DMZ-OH, 0,99999 za MNZ, 0,99999 za RNZ in 0,99997 za DMZ.

Umeritvene krivulje v matriksu v koncentracijskem območju od 2 do 12 µg/kg so linearne s korelacijskimi koeficienti 0,9998 za MNZ-OH, 0,9989 za DMZ-OH, 0,9962 za MNZ, 0,9988 za RNZ in 0,9943 za DMZ.

Validacijo smo opravili po zahtevah Evropske direktive 2002/657/EC na treh koncentracijskih nivojih, z uporabo metode s standardnimi dodatki 2, 4 in 6 µg/kg posameznega nitroimidazola v jajcu. Dobljene podatke smo obdelali z uporabo statistične metode opisane v ISO 5725-2:1994.

Izkoristki postopka, standardne deviacije ponovljivosti (s) in standardne deviacije obnovljivosti (s_w), meje ponovljivosti (r) in meje znotrajlaboratorijske obnovljivosti (R_w) So prikazane v tabelah od 2 do 4 za posamezni koncentracijski nivo.

Merilne negotovosti pri konc. 2 µg/kg so ±1,4 µg/kg za MNZ-OH, ±0,8 µg/kg za DMZ-OH, ±0,6 µg/kg za MNZ, ±1,1 µg/kg za RNZ in ±0,6 µg/kg za DMZ.

Tabela 2: Validacijski parametri za koncentracijo 2 µg/kg

Nitroimidazol	Izkoristek %	s	r	s _w	R _w
MNZ-OH	58,97	0,08	0,22	0,23	0,62
DMZ-OH	62,83	0,11	0,31	0,15	0,41
MNZ	67,33	0,11	0,31	0,14	0,39
RNZ	59,87	0,11	0,31	0,12	0,33
DMZ	61,33	0,11	0,29	0,18	0,50

Tabela 3: Validacijski parametri za koncentracijo 4 µg/kg

Nitroimidazol	Izkoristek %	s	r	s _w	R _w
MNZ-OH	65,67	0,36	0,99	0,70	1,94
DMZ-OH	62,77	0,13	0,36	0,15	0,41
MNZ	72,17	0,19	0,54	0,25	0,69
RNZ	67,80	0,35	0,97	0,45	1,25
DMZ	53,77	0,27	0,74	0,31	0,85

Tabela 4: Validacijski parametri za koncentracijo 6 µg/kg

Nitroimidazol	Izkoristek %	s	r	s _w	R _w
MNZ-OH	55,33	0,20	0,54	0,30	0,85
DMZ-OH	58,17	0,18	0,49	0,43	1,21
MNZ	63,50	0,16	0,45	0,61	1,68
RNZ	61,70	0,47	1,29	0,55	1,51
DMZ	50,53	0,29	0,80	0,49	1,35

Pravilnost postopka smo preverili s sodelovanjem v medlaboratorijski preiskovalni shemi (FAPAS, Proficiency Test 0296), saj za tovrstne substance nimamo certificiranih referenčnih materialov. Identificirati in kvantitativno določiti je bilo potrebno nitroimidazole (DMZ, RNZ, MNZ in metabolita DMZ-OH in MNZ-OH) v vzorcu jajc. Vpeljana metoda se je izkazala kot primerna za pravilno identifikacijo prisotnih nitroimidazolov, kvantitativno pa smo vsebnost ovrednotili z metodo HPLC-DAD. V vzorcu smo identificirali DMZ v koncentraciji 2,1 µg/kg (prava vsebnost 2,64 µg/kg) z z-skorom - 0,9, RNZ v koncentraciji 15,7 µg/kg (prava vsebnost 13,9 µg/kg) z z-skorom 0,6 in njun metabolit DMZ-OH v koncentraciji 15,8 µg/kg (prava vsebnost 14,7 µg/kg) z z-skorom 0,3.

Literatura:

Sams MJ, Strutt PR, Barnes KA, Damant AP, Rose MD (1998) Determination of dimetridazole, ronidazole and their common metabolite in poultry muscle and eggs by high performance liquid chromatography with UV detection and confirmatory analysis by atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Analyst*, 123, 2545-2549.

Presejalna mikrobiološka metoda ugotavljanja tetraciklinov v mleku

Na podlagi literaturnih podatkov, informacij o registriranih in najpogosteje uporabljenih antibiotikih pri nas ter poskusov v našem laboratoriju smo izbrali reprezentativne predstavnike skupine tetraciklinov: tetraciklin, oksitetraciklin in klortetraciklin. Določili

smo občutljive in rezistentne seve bakterij, ki se pri nas uporabljajo za mikrobiološko presejalno metodo ugotavljanja antibiotikov v živilih živalskega izvora. Najobčutljivejši mikroorganizem na tetracikline je *Bacillus cereus* ATCC 11778, rezistentni pa so *Kocuria rhizophilla* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 in *Escherichia coli* ATCC 10536. Optimizirali smo tudi pripravo gojišč. Izbrali smo Antibiotic agar No. 1 in 2, s pH 6 in 8, proizvajalca Merck, uvedli postopek priprave testnih sevov mikroorganizmov in kontrolo rasti.

Nadalje smo s poskusi ugotavljali vpliv pH-ja analiziranega vzorca, priprave vzorca in matriksa samega na velikost con zavirane rasti mikroorganizmov. Lažne pozitivne rezultate smo preprečili s segrevanjem vzorca na 80 °C za 5 minut.

Testirali smo odzivnost metode pri MRL-vrednosti, to je pri koncentraciji 100 µg/L, klortetraciklina, tetraciklina in oksitetraciklina v mleku (10 ponovitev). Pri vseh treh tetraciklinih in pri vseh vzorcih smo lahko izmerili velikosti con zavrtja rasti mikroorganizmov, vrednosti RSD so znašale za tetraciklin 2,0 %, za klortetraciklin 7,7 % in za oksitetraciklin 5,3 %. Ugotovili smo, da za klortetraciklin dosežemo bistveno manjšo mejo zaznave od ostalih tetraciklinov in sicer 20 µg/L z vrednostjo RSD 3,0 %.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) spadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvo, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Z vpeljanimi postopki določanja polietrskih antibiotikov v jajcih in jetrih smo omogočili izvajanje monitoringa na le-te z uporabo okolju bolj prijaznih kemikalij, volumni uporabljenih organskih topil so manjši, kar vse vpliva na zmanjšanje onesnaževanja okolja. Poleg tega postopek omogoča obdelavo večjega števila vzorcev istočasno in s tem lahko hitreje opravljamo preiskave za potrebe nadzora ostankov veterinarsko-medicinskih pripravkov v živilih živalskega izvora. Istočasno pa so meje zaznav nižje, s tem smo povečali sposobnost ugotovitve nizkih količin ostankov polietrskih antibiotikov predvsem v jajcih in tako lahko pozitivno vplivamo na zagotavljanje zdravstvene neoporečnosti zadevnih živil. Postopek je sedaj pripravljen za validacijo.

Z validacijo HPLC-DAD postopka določanja nitroimidazolov v jajcih po Odločbi 2002/657/EC smo izpolnili zahteve za izvajanje tovrstnih preiskav, postopek je pripravljen za akreditacijo. Istočasno smo tudi vpeljali potrditveno metodo na LC-MS/MS, saj je potrđitev z masno detekcijo za substance iz Aneksa IV Evropske direktive 2377/90, kamor so uvrščeni nitroimidazoli, nujna in predpisana z Odločbo 2002/657/EC.

Validirali smo mikrobiološko presejalno preiskavo določanja tetraciklinov v mleku in tako izpolnili zahteve za izvajanje tovrstnih preiskav za potrebe monitoringa nad ostanki veterinarsko-medicinskih pripravkov v živilih.

Z vpeljanimi metodami je izboljšán nadzor nad ostanki zadevnih substanc v živilih in s tem na neoporečnost živil živalskega izvora.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Z omenjenimi postopki bomo lažje izpolnjevali zahteve postavljene za opravljanje preiskav za potrebe monitoringa nad veterinarsko-medicinskimi pripravki v živilih živalskega izvora. Postopki so tudi uporabni pri študijah kopičenja in izločanja zadevnih učinkovin v različnih tkivih pri živalih, katerim smo učinkovino aplicirali. Metode lahko tudi uporabljamo za študije obstojnosti ostankov v tkivih teh živali.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

3.7. Število diplomantov, magistrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

--

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

--

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

--

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

Postopek Določanje nitroimidazolov s HPLC-DAD je bil v letu 2007 presojan s strani Slovenske akreditacije in je trenutno v postopku pridobitve fleksibilne akreditacije za krvno plazmo. S tem so postavljeni pogoji za širitev akreditacije tudi na jajca.

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije. Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.

Uvedba in validacija metod določanja ostankov nekaterih veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora

Določanje polietrskih antibiotikov z LC-MS/MS

Uvedli smo LC-MS/MS metodo določanja polietrskih antibiotikov salinomicina, monensina, lasalocina, narasina in dodatno maduramicina za jajca in jetra. Ekstrakcijo in čiščenje ekstraktov, smo povzeli po postopku, ki ga uporabljajo v CRL v Berlinu (EU Reference Laboratory for Residue of Veterinary Drugs), ter jo nekoliko modificirali. Kot interni standard smo uporabili nigericin. Spojine smo iz vzorca ekstrahirali z acetonitrilom in ekstrakt očistili na polimerni Strata-X SPE koloni. Kromatografsko ločbo smo izvedli na Waters-ovi koloni Xterra C₁₈ 5 µm 100 x 2.1 mm I.D., z uporabo gradientne mobilne faze sestavljene iz acetonitrila in vode z 0,1 % mravljične kisline. Meritve so potekale na masnem spektrometru z elektrosprej pozitivno ionizacijo. Pri vsaki spojini smo merili dva karakteristična ionska prehoda. Vsebnosti smo določali z umeritvenimi krivuljami v matriksu, ki so bile vse linearne ($r > 0,99$) v območju od 1 do 80 µg/kg. Meje zaznav in vrednotenj za jajca so bile 10 in 20 µg/kg za lasalocid, 5 in 10 µg/kg za maduramicin in 3 ter 5 µg/kg za salinomicin, narasin in monensin, za jetra pa za lasalocid, monensin, salinomicin in narasin 10 ter 20 µg/kg, za maduramicin pa 25 ter 50 µg/kg. Izkoristki so se gibali med 50 in 80 % pri jajcih, za jetra pa okoli 40 %. Pravilnost postopka smo preverili s sodelovanjem v medlaboratorijski preiskovalni shemi FAPAS.

Določanje nitroimidazolov v jaci

Validirali smo postopek določanja nitroimidazolov (dimetridazola - DMZ, ronidazola - RNZ, metronidazola - MNZ, hidroksidimetridazola – DMZOH in hidroksimetronidazola - MNZOH) v jaci s HPLC-DAD metodo po zahtevah Evropske direktive 2002/657/EC na treh koncentracijskih nivojih (2, 4 in 6 µg/kg). Dobljene podatke smo obdelali z uporabo statistične metode po ISO 5725-2:1994. Ekstrakcijo in čiščenje smo izvedli po članku Sams-a s sodelavci (Sams in sod. 1998, Analyst, 123, 2545-2549.) ter optimizirali kromatografsko ločbo. Analite smo ekstrahirali iz vzorca z acetonitrilom, očistili ekstrakt na koloni z močnim kationskim izmenjevalcem Strata 8B in uparili eluat na manjši volumen. Za kromatografsko ločbo smo uporabili analitsko kolono Synergi 4 µ Hydro-RP 80A, mobilna faza je bila mešanica acetonitrila in acetatnega pufra. Umeritvene krivulje standardnih raztopin in umeritvene krivulje v matriksu so bile vse linearne ($r > 0,99$) v območju od 2 do 12 µg/kg . Merilne negotovosti pri konc. 2 µg/kg so bile od ±0,6 do ±1,4 µg/kg, izkoristki metode od 50,5 do 72,2 %. Za potrditev smo uvedli LC-MS/MS metodo na analitski koloni Waters (Xterra C₁₈, 5 µm 100 x 2.1mm I.D.), z mobilno fazo acetonitril in deionizirano vodo z 0,1 % mravljične kisline. Potrditev je potekala na masnem spektrometru z elektrosprej pozitivno ionizacijo. Kot interna standarda smo uporabili dimetridazol-d₃ in ronidazol-d₃. Pravilnost postopka smo preverili s sodelovanjem v medlaboratorijski preiskovalni shemi FAPAS.

Presejalna mikrobiološka metoda ugotavljanja tetraciklinov v mleku

Validirali smo metod s tetraciklinom, oksitetraciklinom in klortetraciklinom. Testirali smo odzivnost metode pri MRL-vrednosti, to je pri koncentraciji 100 µg/L v mleku. Pri vseh treh tetraciklinih smo pri tej koncentraciji lahko izmerili zavorne cone rasti mikroorganizmov, vrednosti RSD so za tetraciklin 2,0 %, za klortetraciklin 7,7 % in za oksitetraciklin 5,3 %. Klortetraciklin doseže bistveno manjšo mejo zaznave od ostalih tetraciklinov in sicer 20 µg/L z vrednostjo RSD 3,0 %.

Introduction and validation of some methods for the detection of certain veterinary drugs in food of animal origin

Determination of polyether antibiotics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

A liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry (MS-MS) method for determination of polyether antibiotics salinomycin, monensin, lasalocid, narasin and maduramicin for eggs and liver was introduced. The extraction and clean up followed the procedure used in EU Reference Laboratory for Residue of Veterinary Drugs in Berlin, with some modifications. The used internal standard was nigericin. After the extraction with acetonitrile clean up on polymer Strata-X SPE cartridge followed. Chromatography was performed on Waters analytical column Xterra C₁₈ 5 µm 100 x 2.1 mm I.D., the mobile phase was acetonitrile and water with 0.1 % formic acid, using gradient mode. Measurements were done with electrospray ionization MS-MS in positive ion mode optimized for the five compounds, monitoring two characteristic mass transitions simultaneously for each analyte. Quantification was done using calibration curves in matrix, all were linear ($r > 0,99$) from 1 to 80 µg/kg. Limits of detection and of quantification for eggs were 10 and 20 µg/kg for lasalocid, 5 and 10 µg/kg for maduramicin and 3 and 5 for salinomycin, narasin and monensin, for liver were for lasalocid, monensin, salinomycin and narasin 10 and 20 µg/kg, for maduramicin 25 and 50 µg/kg. Recoveries ranged from 50 to 80 % for eggs, and for liver around 40 %. Trueness of the procedure was checked by participation in the proficiency ring test FAPAS.

Determination of nitroimidazoles in eggs

The HPLC-DAD method for nitroimidazoles (dimetridazole - DMZ, ronidazole - RNZ, metronidazole - MNZ, hidroksidimetridazole - DMZOH and hidroksimetronidazole - MNZOH) determination in eggs was validated following Commission Decision 2002/657/EC at three concentration levels (2, 4 in 6 µg/kg). The achieved data were calculated using the statistical tools ISO 5725-2:1994. Extraction and clean up followed the article of Sams with co workers (Sams and all. 1998, Analyst, 123, 2545-2549.) and the chromatography separation was optimised. Analytes were extracted with acetonitrile, clean up was done on a cation-exchange cartridge Strata 8B, and evaporation followed. Analytical column Synergi 4 µ Hydro-RP 80A was used for chromatographic separation with acetonitrile and acetic buffer as mobile phase. All calibration curves of standard solutions and in matrix were linear ($r > 0,99$) in conc. range from 2 to 12 µg/kg in eggs. Measurement uncertainty at 2 µg/kg were from ±0,6 to ±1,4 µg/kg, recoveries from 50.53 to 72.17 %. For confirmation liquid chromatography with electrospray ionization MS-MS in positive ion mode on analytical column Waters (Xterra C₁₈, 5 µm 100 x 2.1mm I.D.), using acetonitrile and water with 0.1 % formic acid as mobile phase was developed. The conditions were optimized for the five compounds, monitoring two characteristic mass transitions simultaneously for each analyte. As internal standards dimetridazole-d₃ and ronidazol-d₃ were used. Trueness of the procedure was checked by participation in the proficiency ring test FAPAS.

Microbiological screening assay for tetracyclines determination in milk

The method was validated with tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline. The method was tested at MRL-level, at 100 µg/L in milk. For all tested tetracyclines the inhibition zones could be measured with RSD for tetracycline being 2.0 %, for chlortetracycline 7.7 % and for oxytetracycline 5.3 %. Essential lower detection limit was observed for chlortetracycline in milk, 20 µg/L with RSD 3.0 %.