

**NAGYHATÉKONYSÁGÚ SZERMARADÉK-VIZSGÁLAT:
ANTIBAKTERIÁLIS SZEREK MEGHATÁROZÁSA**



*A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Shutterstock*

Tölgyesi Ádám¹, Pálffi Éva¹, Horváth Tímea¹, Lipcsei Viktória¹

Érkezett: 2017. november – Elfogadva: 2018. március

Nagyhatékonyságú szermaradék-vizsgálat: antibakteriális szerek meghatározása élelmiszerekből folyadékkromatográfiás szűrő és megerősítő módszerekkel

Kulcsszavak: állatgyógyszer-maradékok vizsgálata, szűrőmódszer, megerősítő módszer, folyadékkromatográfia szulfonamidok, kimutatási képesség (CC β), döntési határ (CC α), trimetoprim (diaminopirimidin), béta-laktámok, makrolidok, tetraciklinek, kinolonok, linkomicin (linkózamid) griseofulvin, szulfadimetoxin, szulfadoxin, szulfakvinoxalin, szulfaklórpiridazin, szulfametazin, szulfametoxazol, szulfadiazin, szulfatiazol és trimetoprim, tilozin, tilmikozin, spiramicin, eritromicin, neomicin, dihidrosztreptomycin, sztreptomycin, apramicin, kanamicin, gentamicin és spektinomicin amoxicillin, ampicillin, penicillin G, penicillin V, oxacillin, nafcillin, kloxacillin, dikloxacillin, újgenerációs cefalosporinok (cefkvinom, ceftiofur, cefalónium, cefazolin, cefapirin, cefalexin, cefoperazon, klórtetraciklin, 4-epi-klórtetraciklin, oxitetraciklin, 4-epi-oxitetraciklin, tetraciklin, 4-epi-tetraciklin, doxiciklin, difloxacin, orbifloxacin, szarafxloacin, ofloxacin, marbofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, oxolinsav, nalidixsav, flumekvin, linkomicin,

1. Összefoglalás

Magyarországon a 10/2002 (I.23.) FVM rendelet írja elő és határozza meg az élelmiszer toxikológiai megfigyelő vizsgálatokat és ellenőrzéseket (monitoring vizsgálatok), azok menetét és az adott évi monitoringterv elkészítésének folyamatát. A monitoring-mérések hatékonyságát növeli, hogyha a hangsúlyt elsődlegesen a szűrővizsgálatokra (screening) helyezzük, és a kifogásolható minták elemzésére független megerősítő (konfirmációs) eljárásokat alkalmazunk. Ezáltal lehetőség nyílik egy egyszerűbb, gyorsabb és olcsóbb szűrő jellegű méréssel megkülönböztetni a negatív mintákat a szermaradék-tartalmúaktól, illetve nagyobb bizonyossággal lehet a mintákat minőségileg és mennyiségileg értékelni pozitivitás esetén.

Jelen közlemény célja antibakteriális szerekre kidolgozott vizsgálati koncepció bemutatása, amely magába foglal egy többkomponeses szűrőmódszert és ettől független megerősítő méréseket B1 típusú engedélyezett szerekre. A szűrőmódszer lehetővé tesz 54, szermaradék határértékkel rendelkező, komponens és a griseofulvin szimultán azonosítását és szemi-kvantitatív értékelését állati eredetű szövetekből (izom, máj és vese), tejből, tojásból és mézből folyadékkromatográfiás hármass kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometriai módszerrel.

A szűrőmódszerrel detektált célkomponenseket folyadékkromatográfiás megerősítő vizsgálatokkal azonosítjuk és optikai vagy tandem tömegspektrometriai detektálással értékeljük. A szűrőmódszerrel e közlemény benyújtásának időpontjáig közel 1800 mintát elemeztünk. Valamilyen szermaradék 24 monitoringmintában volt kimutatható. A szennyezések a megerősítő vizsgálatok során is detektálhatók voltak. Az így kialakított vizsgálati stratégia nemzetközi körvizsgálatban is többször igazolta hatékonyságát.

¹ Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság, Élelmiszer Toxikológiai Nemzeti Referencia Laboratórium, 1095 Budapest, Mester utca 81.

Előszó

Domány Gábor a NÉBIH ÉTbI Élelmiszer Toxikológiai NRL laboratóriumvetetője volt. A közleményben bemutatott vizsgálati koncepciót az ő szakmai támogatásával is alakítottuk az elmúlt évek során. Jelen közleménnyel Gáborra szeretnénk emlékezni.

2. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben az analitikai kémia fejlesztési irányai olyan irányba tolódtak el, hogy minél több komponens lehessen minél rövidebb idő alatt meghatározni. A folyadékkromatográfiás (Liquid Chromatography – LC) mérések során ezek a követelmények úgy valósultak meg, hogy az ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (Ultra High Performance Liquid Chromatography – UHPLC) módszerekkel percek alatt lehet gyógyszerkészítmények hatóanyagait és szennyezéseit meghatározni [1]. Az összetettebb minták vizsgálata során pedig az LC-hez kapcsolt tömegspektrometriai detektorokkal, mint a folyadékkromatográfiás hármass kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometria (liquid chromatography – tandem mass spectrometry – LC-MS/MS), lehet nagyszámú célkomponens mellett meghatározni viszonylag rövid idő alatt [2].

2007-ben az Európai Unió (EU) Átmeneti Támogatású projekt (Transition Facility) keretében a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság (NÉBIH ÉTbI), Élelmiszer Toxikológiai Nemzeti Referencia Laboratóriumába került LC-MS/MS készülékkel elkezdődhetett az állatgyógyászati szerek monitoringvizsgálatainak kiterjesztése az addig még nem vizsgált célkomponensekre. Az LC-MS/MS méréseket kiegészítve optikai elven alapuló detektálású eljárásokkal, mint HPLC-DAD (diódasoros ultraviola detektálás) és HPLC-FLD (fluoreszcenciás detektálás) az engedélyezett szerek hét fő csoportjára és a griseofulvinnal (grizin) dolgoztunk ki megerősítő eljárásokat. A fő vizsgálati irányok magukba foglalják a szulfonamidok, a trimetoprim (diaminopirimidin), a béta-laktámok, a makrolidok, a tetraciklinek, a kinolonok, a linkomicin (linkozamid) és a griseofulvin meghatározásait (1. táblázat). Az EU-n belül megkülönböztetünk „A” és „B” csoportos komponenseket. Az „A” csoportos vegyületek tiltott szerek, megengedhető szermaradék határértékkel (Maximum Residue Limit – MRL) nem rendelkeznek. A „B” csoportban található az MRL-lel rendelkező engedélyezett komponensek, ezen belül a „B1” csoportba tartoznak az antibakteriális szerek, amelyeket antibiotikum csoportonként további csoportokba soroltak [3]. A monitoring vizsgálatokra vonatkozó rendelet lehetővé teszi a B1 csoportba tartozó összes komponens egy mintából történő meghatározását [4].

2016-ra a megerősítő mérések mellé kifejlesztettünk egy többkomponens LC-MS/MS alapú screening módszert, ami lehetővé teszi a fent felsorolt kompo-

nensek egyidejű meghatározását élelmiszerekből. A szűrőrendszer lényege a célkomponensek azonosítása a mintákban és azok szemi-quantitatív értékelése. Amely mintákban kimutatható a célkomponens jelenléte, a megerősítő elemzés a screening módszertől különálló konfirmációs módszerrel történik. Korábban a megerősítő módszereket alkalmaztuk a monitoring mérések során, viszont ezeket az eljárásokat csak egy antibiotikum-csoportra dolgozták ki, így szűrőmódszerként nem annyira hatékonyak, mint egy többkomponenses eljárás, amely több csoport szimultán vizsgálatát biztosítja, így növeli a hatékonyságot. A többkomponenses LC-MS/MS szűrőmódszer előnye más screening vizsgálatokhoz képest, mint például az immunanalitikai eljárások, hogy a mérendő komponensek száma kiterjeszhető, a szelektivitás és az azonosítás az MS/MS detektálás révén biztosított, és jóval egyszerűbb minta-előkészítést igényel. Ugyanakkor az LC-MS/MS screening vizsgálat során a nagyszámú és eltérő szerkezetű molekulák szimultán vizsgálatából kifolyólag nem lehet olyan eljárást kidolgozni (ez nem is feltétlenül cél), amely minden komponensre optimális. Így sem az extrakció határfoka, sem a kromatográfiás felbontás nem lesz minden komponensre kielégítő. A mintatisztítás (pl.: folyadék – folyadék extrakciós vagy szilárd fázisú extrakciós) kivitelezését is nehezítik a célkomponensek eltérő fizikai-kémiai tulajdonságai, ezért sokszor LC-MS/MS screening során nem is alkalmazunk minta-tisztítást (clean-up), hanem az ún. „dilute-and-shoot” eljárást követve a mintát csak extraháljuk és az extraktumot hígítást és fecskendőszűrést követően injektáljuk az LC-MS/MS-be [5]. A mintatisztítás elhagyásával ugyanakkor a háttér mátrixvegyületek száma és koncentrációja nem csökkenthető a műszeres mérést megelőzően, ami növeli a mátrixhatást (ion elnyomás/erősítés) az MS/MS készülék ionforrásában, ezzel lényegesen befolyásolja a mennyiségi értékelést. Ez is az oka annak, hogy a „dilute-and-shoot” eljárások csak szűrővizsgálatra alkalmazhatók, kivéve, ha a mátrixhatás kompenzálására izotóphígítást tudunk alkalmazni [6].

A közleményünk célja a NÉBIH ÉTbI Élelmiszer Toxikológiai Nemzeti Referencia Laboratóriumában újonnan bevezetett, antibakteriális szermaradékokra vonatkozó vizsgálati gyakorlat bemutatása reprezentatív számú mintaszám elemzését követően. A többkomponenses LC-MS/MS szűrővizsgálat monitoringmérésekben történő alkalmazása óta (2017. április) közel 1800 mintát elemeztünk a közlemény benyújtásának időpontjáig. Dolgozatunkban csak vázlatosan részletezzük a mérési eljárásokat, a módszerek teljes leírását a hivatkozások tartalmazzák, célunk inkább a vizsgálati koncepció ismertetése és az ezzel elért eredmények közzétevése.

3. Vizsgálati módszerek

A többkomponenses antibiotikum módszer kidolgozásánál a legnagyobb nehézséget a célvegyületek eltérő polaritása (hidrofobicitása) jelenti. Amíg pél-

dául az aminoglükózid típusú molekulák hidrophil, vízoldható komponensek, addig egyes antibiotikumok hidrofób, apoláris jellegű vegyületek és/vagy vizes közegben instabilak (pl.: makrolidok, béta-laktámok). További komplikációt jelent a közeg kémhatására való érzékenység, szintén az aminoglükózidok és a makrolid/béta-laktám csoportok egymástól eltérő jellege miatt. Az előbbi csoport erősebb savas pH-n (<1) extrahálható jól, ezzel szemben az utóbbi ket-tő érzékeny az alacsony pH-értékű közegre. Az extrakciós közeg összetételét ebből következően olyan kompromisszummal kell kidolgozni, amely a veszteségek ellenére is lehetővé teszi, a szermaradékok fél MRL értéken vagy az alatti reprodukálható kimutatását. Továbbá, a mintaelőkészítést követő folyadék-kromatográfiás elválasztás során a mozgófázishoz olyan módosító komponenst (ionpároképző reagenst) kell adagolni, amely lehetővé teszi a hidrophil komponensek visszatartását fordított fázisú elválasztás során és így a többkomponenses szűrővizsgálati eljárás egy injektálással kivitelezhető [2].

A megerősítő módszerek már csoportspecifikusak, így a célkomponensek kinyerése és a minták tisztítása már illeszkedik a feladathoz („fit for purpose”), a műszeres meghatározás a vegyületcsoportra optimálható, ezáltal a vizsgálatok szelektívek, pontosak és reprodukálhatók lesznek, és kielégítik a konfirmációs mérésekre vonatkozó követelményeket [7]. A megerősítő módszerek esetén érdemes megemlíteni, hogy az optikai detektorok, akár az UV (UV-VIS spektrofotometriás detektor) vagy az FLD (fluoreszcenciás detektor) alkalmazhatók engedélyezett szerek vizsgálata során [7]. Az optikai detektorok használata nem egy esetben jobbnak bizonyul a tömegspektrometriai detektáláshoz képest, mert a mennyiségi értékeléshez az optikai detektorok nem igényelnek izotópjelölt belső standardokat (internal standard – ISTD) [8]. Bár az izotóphígításos tömegspektrometria (isotope dilution mass spectrometry - IDMS) az egyik legjobb kvantitatív értékelési forma, mégis kevés vegyület esetén érhető el stabil izotópjelzett analóg, amely a célkomponenst ért mátrixhatásokat hivatott kompenzálni az MS detektálás során, így javítva a mennyi-

ségi meghatározást [2]. Konkrét példaként említhető a tetraciklinek meghatározása élelmiszerekből az EU által előírt 100 µg/kg (izom, tej), illetve 600 µg/kg-os (vese) szinten. A tetraciklinek UV detektor alkalmazásával nagyobb, szelektívebb hullámhosszon (365 nm) mérhető, de MS/MS készülékkel is vizsgálható. Az utóbbi esetén izotópjelölt ISTD nem érhető el kereskedelmi forgalomban mindegyik komponensre, de költséghatékonyság szempontjából használatuk indokolatlan lenne. A mennyiségi értékeléshez ezért LC-MS/MS alkalmazása esetén mátrixra illesztett kalibráció szükséges, hogy az ionforrás válaszeljének változását kompenzálhassuk. Viszont a mátrixra illesztett kalibrációval nem minden esetben lehetséges teljes mértékben kompenzálni a mintában lévő mátrixhatást, főképp az összetettebb mintákban, pl. májban, így az optikai detektálás, amely során mátrix nélküli oldószerből vesszük fel a kalibrációt, megfelelőbbnek bizonyul [8].

3.1 Többkomponenses LC-MS/MS szűrő módszer

A mintaelőkészítés és az analízis ellenőrzésére ötkomponenses (szulfapiridin, trimetoprim-d9, roxitromicin, penicillin-G-d7 és metaciklin) kísérő standard keverékkel adalékoljuk a mintákat az extrakciót megelőzően. A kísérő standardok visszanyerése a mintákból igazolja a mérés jóságát. A szövet- és tojásmintákat (2,0 g) acetonitril – 0,01 M oxálsavat tartalmazó víz (25/75, v/v) eleggyel (10 mL) extraháljuk, és a tiszta felülúszót fecskendőszűrővel HPLC vial-ba szűrjük. A tejmintákat (5,0 g) McIlwain pufferrel hígítjuk (5,0 mL) és centrifugálást követően szilárd fázisú extrakcióval (solid phase extraction - SPE) tisztítjuk és dúsítjuk. A méz mintákat (5,0 g) 0,1% (v/v) heptafluoro-vajsavat (heptafluorobutiric acid – HFBA) tartalmazó vízben (10 mL) oldjuk és hidrolizáljuk, majd SPE-vel tisztítjuk és dúsítjuk. Az SPE során nagy szemcseátmérőjű fordított fázisú kopolimer patronokat (pl.: Strata-XL, 100 µm), és ionpároképző reagensként 0,1% (v/v) HFBA oldatot alkalmazunk. Az ionpároképző szer a poláris aminoglükózidok visszatartása érdekében szükséges.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo:Shutterstock

Az így előkészített mintákban a célkomponenseket héjszerkezetű C18-as HPLC oszlopon választjuk el ionpár-kromatográfiát alkalmazva (1. ábra). A mozgófázis 0,1% (v/v) HFBA-t tartalmazó víz – acetonitril (90/10 v/v) elegye lineáris gradiens elúcióval. A célvegyületeket elektroporlasztásos ionizációt (electrospray ionisation – ESI) követően MS/MS készülékkel detektáljuk (2. táblázat) pozitív ionmódban (ESI+) és MRM (Multiple Reaction Monitoring) pásztázási móddal. A 2. táblázatban szereplő ionátmeneteket a csoport specifikus megerősítő módszerekben is alkalmazzuk.

3.2 Megerősítő mérések

3.2.1 Szulfonamidok és a trimetoprim meghatározása

Vizsgált komponensek: szulfadimetoxin, szulfadoxin, szulfakvinoxalin, szulfaklórpiridazin, szulfametazin, szulfametoxazol, szulfadiazin, szulfatiazol és trimetoprim. Mivel a szulfapiridint nem alkalmazzák állatterápiában, kísérő standardként alkalmazhatjuk, hiszen ez a komponens nagy valószínűséggel nem szennyezi az állati eredetű élelmiszereket. A mintákat (5,0 g), a méz kivételével, diklór-metánnal extraháljuk és normál fázisú, szilikagél SPE-vel tisztítjuk. A vizes eluátumot etil-acetáttal folyadék-folyadék fázisban extraháljuk, és a szerves fázist gyűjtjük. Egy oldószercserét követően HPLC-DAD-dal ($\lambda = 267$ nm) határozzuk meg a szulfonamidokat. A mézmintákat (5,0 g) hangyasavas vagy ecetsavas (5%, v/v) víz-

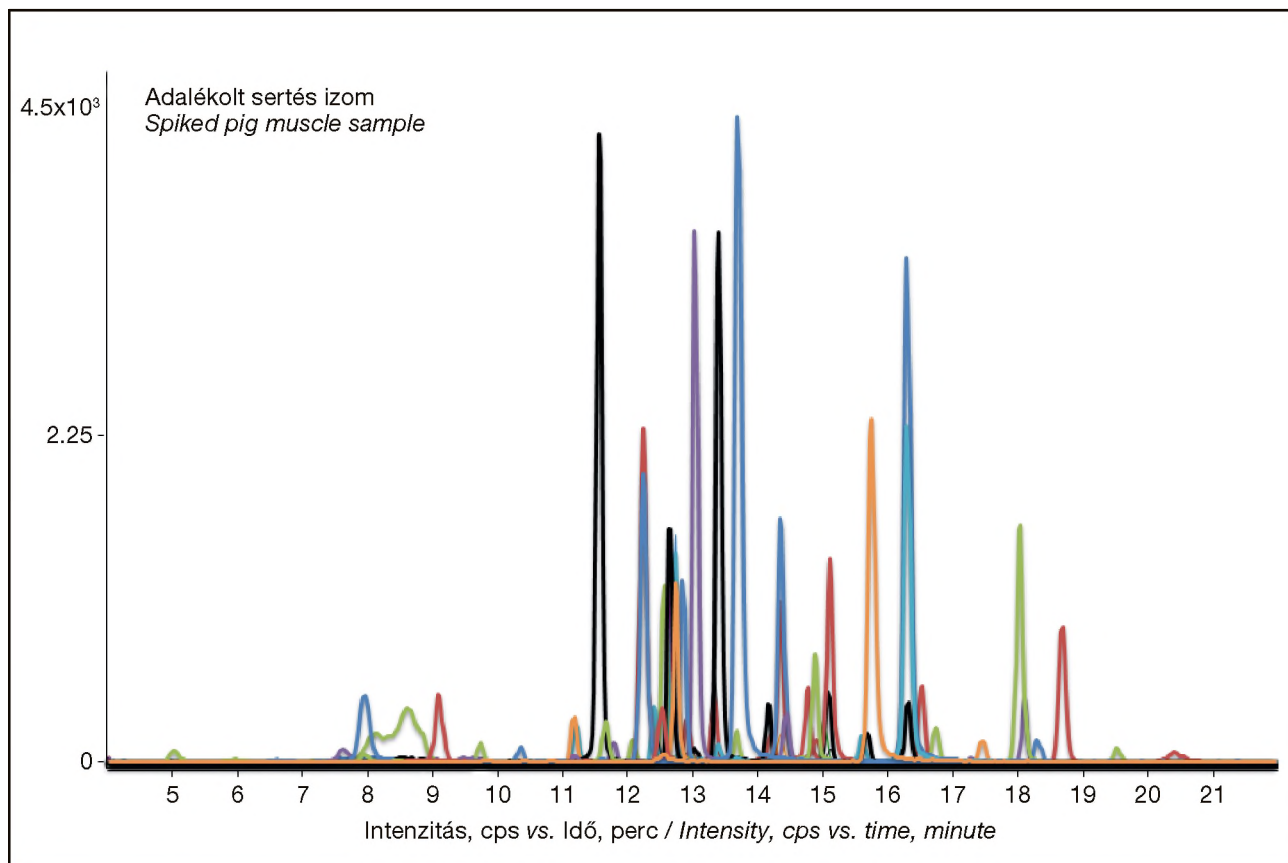
ben oldjuk és hidrolizáljuk, majd kopolimer SPE-vel tisztítjuk. A vizsgálatokhoz HPLC-FLD-t ($\lambda_{ex} = 420$ nm, $\lambda_{em} = 480$ nm) vagy LC-ESI(+)-MS/MS-t alkalmazunk. Az LC-MS/MS lehetővé teszi a szulfonamidok és a trimetoprim szimultán meghatározását. Amennyiben a tesztminta nem méz, LC-MS/MS rendszerrel vizsgálva a mintát elegendő (2,0 g) acetonitrillel extrahálni. Oldószercserét követően az extraktum az LC-MS/MS rendszerbe injektálható. A trimetoprim meghatározásához izotóphígításos tömegspektrometriát (IDMS) alkalmazunk, a mintát trimetoprim-d9 ISTD-vel adalékoljuk [9].

3.2.2 Makrolidok meghatározása

Vizsgált komponensek: tilozin, tilmikozin, spiramicin és eritromicin. A mintákat vizes TRIS pufferrel (0,1 M, pH = 10) extraháljuk és az extraktumot kopolimer SPE-vel tisztítjuk. A mintákat LC-ESI(+)-MS/MS-sel vizsgáljuk savas kémhatású eluenssel C18-as állófázison [10].

3.2.3 Aminoglikozidok meghatározása

Vizsgált komponensek: neomicin, dihidrosztreptomycin, sztreptomycin, apramicin, kanamicin, gentamicin és spektinomicin. A mintákat (2,0 g) vizes triklór-ecetsavval (5%, m/m, pH=1) extraháljuk, majd közvetlenül injektálhatjuk az LC-ESI(+)-MS/MS készülékbe. Minta-tisztítás esetén alkalmazhatunk kopolimer SPE oszlopot és ionpár-képzőként HFBA-t. A HPLC elválasztás is ionpár-kromatográfiával történik, az eluens



1. ábra: Adalékolt ($\leq 0,5 \times$ MRL) sertés izom minta LC-MS/MS szűrő módszerrel felvett kromatogramja.
Figure 1: Chromatogram of a spiked ($\leq 0.5 \times$ MRL) pig muscle sample recorded by an LC-MS/MS screening method

0,1% (v/v) HFBA-t tartalmazó víz – acetonitril (90/10 v/v) lineáris gradiens elúcióval, az állófázis fordított fázisú C18-as [11].

3.2.4 Béta-laktámok meghatározása

A béta-laktámok vizsgálata magába foglalja a klasszikus penicillinek (amoxicillin, ampicillin, penicillin G, penicillin V, oxacillin, nafcillin, kloxacillin és dikloxacillin) és az újgenerációs cefalosporinok (cefkinom, ceftiofur, cefalónium, cefazolin, cefapirin, cefalexin és cefoperazon) együttes mérését élelmiszerekből. A mintákat (2,0 g), tej kivételével, foszfát pufferrel (pH=6 vagy 8) vagy acetonitril – víz (50/50 v/v) eleggyel extraháljuk. Utóbbival a cefalosporinok jobban kinyerhetők a mintából. A mintákat SPE-vel tisztíthatjuk vagy közvetlenül injektálhatjuk az LC-ESI(+)-MS/MS rendszerbe. A tejmintákat (5,0 g) vízzel hígítjuk (1:1 v/v), centrifugáljuk és utána kopolimer SPE-vel tisztítjuk és koncentrálljuk. A penicillin G meghatározása IDMS-sel történik a minta penicillin G-d7 ISTD-vel történő hígítása után [12]. Az elválasztást savas kémhatású eluenssel C18-as állófázison végezzük.

3.2.5 Tetraciklinek meghatározása

Vizsgált komponensek: klórtetraciklin, 4-epi-klórtetraciklin, oxitetraciklin, 4-epi-oxitetraciklin, tetraciklin, 4-epi-tetraciklin és doxiciklin. A mintákat (5,0 g) McIlwain pufferrel (pH = 4) extraháljuk és az extraktumot fordított fázisú (C-18 vagy kopolimer) SPE-vel tisztítjuk. Az így előkészített mintákat HPLC-DAD-dal ($\lambda = 365$ nm) vagy LC-ESI(+)-MS/MS-sel határozzuk meg savas kémhatású eluenssel és héjszerkezetű C-18-as HPLC oszlopot alkalmazva [8]. UV detektálás esetén terner mozgófázis (metanol/acetonitril/vizes oxálsav) alkalmazása szükséges a megfelelő kromatográfiás felbontás eléréséhez.

3.2.6 Kinolonok meghatározása

Vizsgált komponensek: difloxacin, orbifloxacin, szarafxacin, ofloxacin, marbofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, oxolin-sav, nalidixsav és flumekvin. A mintákat (5,0 g) foszfát pufferrel extraháljuk és az extraktumot C18-as SPE oszlopon tisztítjuk, majd HPLC-FLD-vel ($\lambda_{\text{ex}} = 260/280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 366/450$ nm) C18 fordított fázison határozzuk meg a célkomponenseket [13]. Annak ellenére, hogy a kinolonokat LC-MS/MS rendszerrel nagy szelektivitás és érzékenység mellett lehet mérni, ezt az elválasztástechnikát mégsem tekinthetjük a legalkalmasabbnak, mert a mennyiségi értékelést a mátrixhatás nagymértékben befolyásolta az IDMS (isotope dilution mass spectrometry - IDMS) alkalmazása nélkül.

3.2.7 A linkomicin meghatározása

A linkomicin a linkozamidok csoportjába tartozik. Jól extrahálható tiszta acetonitrilrel a tesztmintából, majd egy oldószercserét követően vizes ecetsav oldatban

(pH = 4,7) tisztítható kationcserélő SPE oszlopon. A linkomicint LC-ESI(+)-MS/MS-sel izokratikusan választjuk el héjszerkezetű C18 HPLC kolonnán savas pH-értékű eluens alkalmazásával [14].

3.2.8 A griseofulvin meghatározása

A grizin is extrahálható acetonitrilrel, majd közvetlenül tisztítható C18-as SPE oszlopon. Mennyiségileg HPLC-DAD-dal ($\lambda = 290$ nm) vizsgáljuk C18-as HPLC oszlopon savas kémhatású eluenssel.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A módszerek validálása

Az állatgyógyászati szerek vizsgálatára irányuló szűrőmódszerek validálására az Európai Unió Referencia Laboratóriumai (European Union Reference Laboratory – EU-RL) 2010-ben adtak ki egy egységes eljárást [15]. Ennek első melléklete szerint a szermaradékok vizsgálati módszereit az alábbiak szerint is validálhatjuk: válasszunk ki húsz különböző vak mintát (pl.: húsz különböző mézmintát) és elemezzük őket párhuzamosan: adalékolással (spike) és adalékolás nélkül is. Az adalékolás szintje az MRL érték fele, vagy annál kevesebb legyen. Amennyiben a húsz, adalékolt mintában detektált jel tartománya (komponensenként) nincs átfedésben a 20 db vak mintákban detektált jel tartományával adott célvegyület retenciós időablakában, úgy az adott komponensre a módszer validáltnak tekinthető. A küszöbértéket (cut-off) az adalékolt minták legkisebb válaszjeleként komponensenként adhatjuk meg. Az analitikai válaszjel dimenziója általában abszorbancia vagy beütésszám lehet. A kimutatási képesség (detection capability – CC β) ez esetben pedig a validálás során beállított adalékolási szinttel ($\leq 0,5 \times$ MRL) egyenlő. A CC β -nak több definíciója is ismert; szűrőmódszer esetén a CC β a mintában a célkomponens azon koncentrációja, amely β hiba mellett mutatható ki az adott vizsgálati módszerrel. B csoportos vegyületekre a megengedett hiba screening eljárások esetén 5%, tehát $\beta=5$. A kimutatási képesség számolását az EU 2002/657/EC rendelete a megerősítő módszerek esetén is előírja [7]. Ugyanakkor a konfirmációs módszerekre vonatkozó képlettel számolható CC β mindig magasabb, mint a megerősítő módszer döntési határa (decision limit – CC α), ami elvileg hibás, mert a CC β -nak kisebbnek kell lennie az MRL értékénél. A CC α határértékkel rendelkező komponensek esetén mindig magasabb az MRL-nél: $CC\alpha = MRL + 1,64 \times S_{MRL}$, ahol S_{MRL} az MRL értékre adalékolt 20 db minta szórása a validálás során. A rendelet felülvizsgálata során a megerősítő módszerek esetén a CC β értékelését felfüggesztik, és a konfirmációs eljárásoknál csak a CC α értékének megadása lesz kötelező. Az 1. táblázat a többkomponenses LC-MS/MS szűrőmódszer kimutatási képességeit mutatja különböző mátrixokban komponensenként. A validálás minden komponensre teljesült, viszont a neomicin és a gentamicin kinyerése alacsonynak bizonyult, aminek oka a gyengébb savas extrakciós közeg.

A mézminták validálását a méhek kezelésére alkalmas állatgyógyszerekre (tetraciklinek, szulfonamidok, aminoglükozidok közül főképpen a sztreptomycin) végeztük el a linkomicin és a griseofulvin meghatározásával kiegészítve. Az első három csoportra az EU-RL (ANSES, Fougères, Franciaország) ajánlott értékeket határozott meg mézben 20 µg/kg és 50 µg/kg között [16]. Az antibiotikumok a mézelő méhek nyúlós költésrohadása (American vagy European foulbrood) ellen lehetnek hatásos szerek, azonban az Európai Unió területén használatukat egyelőre nem engedélyezik [17], így mézre vonatkozóan nem rendelkeznek rendelkezésben előírt határértékkel. A mézek állatgyógyszer-tartalmának szabályozása ügyében előrelépést jelenthet a 2013-ban megjelent Codex ajánlás MRL felállítására mézben [18]. Az EU-RL által ajánlott 20 µg/kg érték a makrolid csoportra, eritromicinre és tilozinra is vonatkozik. Ugyanakkor ezek a komponensek a legújabb tanulmányok szerint a mézben gyorsan metabolizálódnak, és így csak a bomlástermékeik (anhidroeritromicin, eritromicin-enol-éter és desmizozin) mutathatók ki [19], [20], amelyekre viszont egyelőre nem létezik ajánlott érték. E metabolitok vizsgálatára méréseinket még nem terjesztettük ki.

A megerősítő módszerek validálása a fent említett 2002/657/EC rendelet alapján történik [6]. Ez esetben lényegesen több analitikai teljesítményjellemzőt kell meghatározni, mint például szelektivitás, azonosítás, pontosság, reprodukálhatóság, linearitás, $CC\alpha$ stb. Új paraméterként jelenik meg az útmutató felülvizsgálatakor a mátrixhatás értékelése, ami tömegspektrometriás detektálás esetén lesz szükséges. Közleményünkben a megerősítő módszerek döntési határait ($CC\alpha$) adtuk meg komponensenként mátrixtól függően. Azokra az új komponensekre, melyek validálás előtt állnak, a meghatározási határt (Limit of Quantification – LOQ) közöltük (1. táblázat).

4.2 Nemzetközi körvizsgálat

Az élelmiszer antibiotikum vizsgálatok EU-RL szerepéről az EU-RL (Fougères, Franciaország) laboratórium tölti be. Az általuk szervezett körvizsgálatokban (Proficiency Test – PT), amelyekben a részvétel kötelező a tagállamok nemzeti referencialaboratóriumainak (National Reference Laboratory – NRL), a minták szűrő és megerősítő méréseit külön kell választani, értékelni és közölni. A hatósági laboratóriumoknak korábban csoport-specifikus körvizsgálatokat kellett végezniük (pl. tetraciklinek kimutatása sertés izomban, vagy béta-laktámok meghatározása tejben), napjainkban viszont olyan minták elemzése szükséges, amelyek eltérő antibiotikum-csoportba tartozó antibakteriális szerekkel szennyezettek (pl.: B1-es antibiotikumok vizsgálata tojásban vagy izomban). A 2016-os és a 2017-es jártassági tesztekben már a többkomponens LC-MS/MS módszert alkalmaztuk a minták szűrővizsgálataihoz.

A 2016-os jártassági vizsgálatokban négy méz minta antibiotikum-tartalmát kellett meghatározni, ame-

lyek közül egy volt negatív. A többi három mintában különböző állatgyógyszer maradékokat detektáltunk. Az első mintában szulfatiazolt, a másodikban tetraciklint és 4-epi-teraciklint, míg a harmadik mintában sztreptomocint mutattunk ki. A szűrő módszerrel a komponensek azonosítása megfelelő volt, az LC-MS/MS alapú megerősítő mérésekkel azonos komponenseket lehetett kimutatni, míg a vak minta nem tartalmazott antibiotikumot a megerősítő mérések során (3. táblázat). A konfirmációs mérésekkel detektált koncentrációk megfelelőek voltak. A szulfatiazol esetén az LC-MS/MS méréssel kapott 4,76 µg/kg-os értéket közöltük, a HPLC-FLD detektálással mért 6,0 µg/kg-os értéket nem tudtuk megadni. Ugyanakkor az optikai detektorral kapott magasabb érték bizonyult jobbnak a jártassági tesztet szervezők jelentése alapján. A szulfatiazol értékelése LC-MS/MS mérés esetén IDMS nélkül, mátrixra illesztett kalibrációs módszerrel történt. A detektált kisebb érték a mátrixra illesztett kalibrációs minták és a körvizsgálati mintában lévő eltérő mátrixhatással magyarázható: amennyiben a tesztmintában nagyobb az ionnyomás (mátrixhatás), mint a kalibrációs mintákban, akkor az a teszt minta szennyezőinek alulméréséhez vezet. IDMS hiányában a kalibrációval nem tudtuk kompenzálni a mennyiségi értékelést döntően befolyásoló mátrixhatást, ami a készülék ionforrásában lép fel a háttér komponensek hatására. Ezt a feltételezést támaszthatja alá, az hogy az optikai (FLD) detektálás esetén sikerült az elfogadhatósági tartományon (5,7 µg/kg – 14,7 µg/kg) belüli értéket kapni.

Az optikai detektálást ugyanis nem befolyásolják a háttér mátrixok, amennyiben nincs fluoreszcens jelük azokon hullámhosszakon, amelyeken a célkomponenseket detektáljuk.

A 2017-es körvizsgálat során feladatunk édesvízi halakban található antibakteriális szerek vizsgálata volt B1 csoportos komponensekre. Az LC-MS/MS screening vizsgálat során négy kiadott minta közül az egyes sorszámú mintában nem detektáltunk célvegyületet. A többi minta viszont szennyezett volt: a második mintában oxitetraciklint és 4-epi-oxitetraciklint mutattunk ki, a harmadik mintában szulfadiazint és trimetoprimet detektáltunk, és az utolsó minta pedig oxolinsavat tartalmazott. Az oxitetraciklin megerősítésére HPLC-DAD módszert alkalmaztunk, míg az oxolinsav kimutatására HPLC-FLD technikát. A szulfadiazin és a trimetoprim konfirmációs vizsgálathoz LC-MS/MS-t használtunk (3. táblázat). A körvizsgálat értékelése még folyamatban van.

A tetraciklinek és kinolonok mérése során az optikai detektálást részesítettük előnyben [7], mert így nem volt szükség IDMS-re a pontos koncentráció meghatározásához. Az eredmények benyújtását követően az oxitetraciklinnel szennyezett és az oxolinsavat tartalmazó mintákat LC-MS/MS-sel is vizsgáltuk. Az oxitetraciklin mérése során a HPLC-DAD és az LC-MS/MS technikával folytatott mérések mintaelőkészítési lépései teljesen megegyeztek, a mintákat mátrixra illesztett kalibrációval értékeltük.

A kalibrációt pontyból származó mátrixszal vetjük fel, a körvizsgálati minta típusa ismeretlen volt. A HPLC-DAD technikával detektált értékek: 33,6 µg/kg 4-epi-oxitetraciklin és 81,8 µg/kg oxitetraciklin. A két párhuzamos mintával LC-MS/MS vizsgálathoz előkészített mintákban a 4-epi-oxitetraciklin 30,6 µg/kg-nak és 36,9 µg/kg-nak adódott, míg az oxitetraciklin koncentrációja 132 µg/kg és 232 µg/kg volt. A 4-epi-oxitetraciklin és az oxitetraciklin retenció ideje között (5,8 perc és 6,5 perc) 0,7 perc van (**2. ábra**). Az epimer elúciós időablakában lévő háttér nem befolyásolta negatívan a komponens mennyiségi meghatározását, ugyanakkor az anyavegyülettel (oxitetraciklin) együtt a készülék ionforrásába érkező mátrixok már lényegesen és reprodukálhatatlanul befolyásolták az oxitetraciklin jelét. A mátrixra illesztett kalibrációval nem tudtuk kompenzálni a tesztmintában előálló mátrixhatást, ami kisebb ionelnyomást mutatott a kalibrációs mintákban tapasztalt mátrixhatáshoz képest, így a jártassági tesztmintában detektált koncentrációt magasabbnak találtuk. Ezen felül a tesztmintában lévő mátrixhatás a párhuzamos mintákban nem volt ismételtető, így a későbbiekben további minta-tisztítási lépés vagy IDMS használata lehet szükséges az LC-MS/MS technika alkalmazása során. A HPLC-DAD-dal detektált értékre számolt Z-score-érték -1,3-nak adódott, tehát a megfelelő tartományba esett.

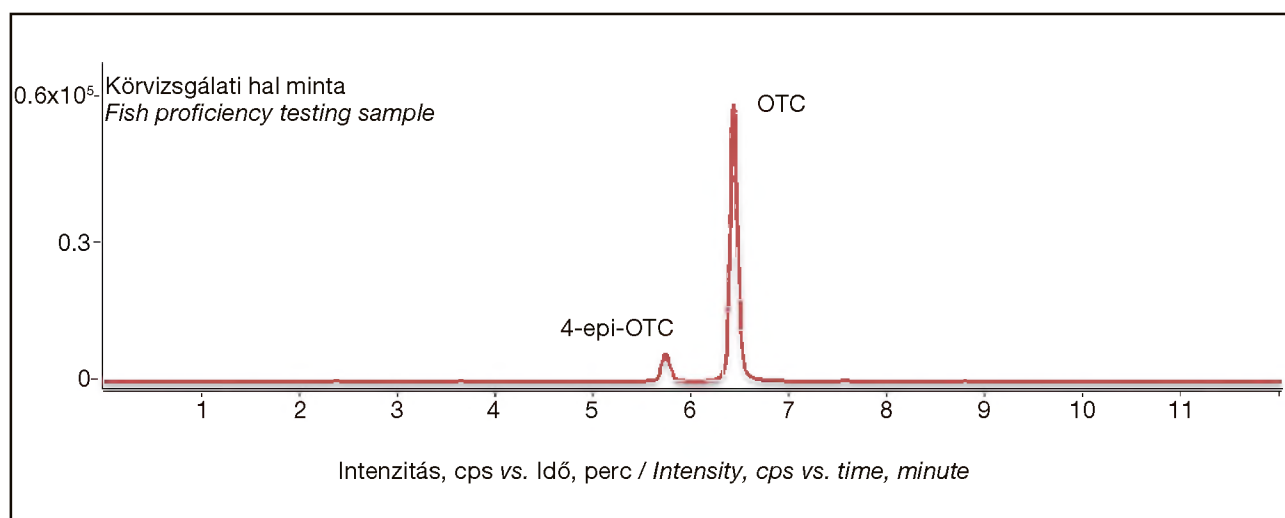
Az oxolinsavat tartalmazó mintát LC-MS/MS rendszerrel vizsgálva a koncentráció 2,5-szer nagyobb-nak adódott az FLD detektálással kapott értékhez képest. A fluoreszcenciás detektorral mért 105 µg/kg-os érték a valószínűbb, mert az optikai detektálást interferencia nem befolyásolta, így a mennyiségi értékelés pontosságát elégségesnek tekintettük. A 105 µg/kg-os értékre számolt Z-score-érték -0,9 lett, így az oxalinsavval szennyezett minta vizsgálati eredményének értékelése is megfelelő volt. IDMS hiányában az oxolinsav kimutatása MS/MS

detektálással erős ionerősítést mutatott, ami következtében a mért koncentráció a hozzárendelt érték többszörösének adódott.

4.3 Monitoringvizsgálat

A vizsgálati módszerek alkalmazhatóságát mindig a valódi minták (incurred) vizsgálata igazolhatja, ugyanis a validálások során többségében adalékolt és nem kezelt állatoktól származó mintákat elemzünk. A valódi minták esetén a célkomponensek a sejtek közti pórusokban vagy intracellulárisan helyezkednek el, ezzel szemben az adalékolt minták a felületükön hordozhatják a célvegyületeket. Ez jelentős különbségeket okozhat a komponensek kinyerését illetően. A monitoringvizsgálatok során valódi szennyezést tartalmazó vagy vak mintákat elemzünk. A monitoringminták döntően állati eredetű szövetek (izom, máj és vese), illetve tej, tojás és méz. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető kontrollminták is általában kezelt állatoktól származnak, ezek közül szulfakvinoxalinnal és szulfatiazollal szennyezett mézmintát elemeztünk a többkomponenses LC-MS/MS rendszer alkalmazásával (**3. táblázat**). A célkomponensek kimutathatók voltak és megerősítő vizsgálatuk is megfelelőnek bizonyult [9].

Az LC-MS/MS technika alkalmazásával a szűrőmódszer monitoring vizsgálatokba való bevezetése óta (2017. április) vizsgált közel 1800 minta elemzésének eredményei azt mutatják, hogy a leggyakoribb állatgyógyszer maradékok a tetraciklinek csoportjába tartoznak. A négy, jogszabályban határértékkel rendelkező tetraciklinszármazék közül az összes kimutatható volt különböző mintákban (**3. táblázat**). A szennyezett minták között sertés- és szarvasmarhaszövetek (izom, máj és vese) voltak, valamint egy libából származó izom. Egy tetraciklinnel kezelt szarvasmarha vizeletében egy kortikoszteroid típusú vegyületet, a dexametazont is ki lehetett mutatni egy



2. ábra: Oxitetraciklint (OTC) és 4-epi-oxitetraciklint (4-epi-OTC) tartalmazó körvizsgálati hal minta LC-MS/MS megerősítő módszerrel felvett kromatogramja.
Figure 2: Chromatogram of a fish proficiency testing sample containing oxytetracycline (OTC) and 4-epi-oxytetracycline (4-epi-OTC) recorded by an LC-MS/MS confirmation method

másik LC-MS/MS technikával [21]. Valószínű, hogy kombinált, több hatóanyagot tartalmazó gyógyszerrel kezelhették az állatot. A többi, szennyezett minta különböző antibakteriális szereket tartalmazott. A csirkeizomban enrofloxacin és ciprofloxacint (kinolon típusú antibiotikumok) mutattunk ki. Mézben pedig szulfadimetoxint (szulfonamid) és trimetoprimet (diaminopirimidin) detektáltunk egyidejűleg. A trimetoprim szerepe a készítményben a szulfonamid hatásának erősítése, így a trimetoprim maradékának vizsgálata mindenképpen szükséges a szulfonamidok mellett.

Ezt mutatja egy olyan szarvasmarhavesé elemzése is, amely szulfadiazint és mellette trimetoprimet is tartalmazott (3. táblázat). A béta-laktámok közül szarvasmarhavesében a penicillin G-t (benzilpenicillin) mutattunk ki. Az állati szövetmintákban a penicillinek még -20°C -on is instabilak [22]. A minta tíz nappal későbbi, újbóli mérése során a célkomponens már csak a fele mennyiségben volt kimutatható a -18°C -os tárolás ellenére is. A béta-laktám típusú állatgyógyszerekkel szennyezett mintákat pH=6-os közegben -70°C -on célszerű tárolni a hosszabb eltarthatóság érdekében [21].

Szarvasmarhatej-mintákban cefalóniumot, vagyis cefalosporint detektáltunk, amely a béta-laktámok közé tartozik. Ezen kívül tejben más antibakteriális szert nem találtunk. A vizsgált monitoringminták közül tojásban nem detektáltunk még szennyezést, illetve a célvegyületek közül makrolidot, linkomicint és griseofulvint nem azonosítottunk még mintában. Egy évvel a többkomponenses szűrő módszer bevezetése óta elmondható, hogy a kimutatható szennyezést tartalmazó minták száma az elmúlt évekhez képest számottevően nőtt.

Ennek fő oka, hogy a mérések nem antibiotikum-csoport-specifikusak (pl.: béta-laktám vagy kinolon, stb.), hanem egy sok komponenses szűrővizsgálat következtében a B1 csoportba tartozó szerek nagy része egy vizsgálattal lefedhető. A módszer további előnye, hogy minimális az anyagköltsége, mert az előkészítés során csak extraháljuk a mintákat, és tisztítási lépés nélkül elemezzük azokat, így nincs

szükség például szilárd fázisú extrakcióra, ami lényegesen növelné az előkészítés idejét és költségeit. A költségek csökkentése mellett sikeresen növeltük a vizsgálatok hatékonyságát a többkomponenses szűrő módszerrel.

5. A módszerek adaptációja

A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal és a Shahid Beheshti Orvosi Egyetem (Teherán, Irán) között fennálló együttműködés keretében 2017 májusában öt iráni szakember érkezett a NÉBIH ÉTbI-be, hogy egy LC-MS/MS tréning keretében sajátítsák el a többkomponenses szűrő módszert. Az egyhetes képzés során sikerült az eljárást laboratóriumunkban teljes mértékben bemutatni és az iráni kollégáknak kipróbálni/átvenni. A tréning második fele Teheránban lesz, amelynek célja a módszer teljes bevezetése az iráni NRL-ben. A képzés ezután a megerősítő mérések ismertetésével folytatódik, amelyek közül már két módszert (tetraciklinek és szulfonamidok) sikerült az első tréning alkalmával kipróbálni Budapesten.

A többkomponenses módszer adaptációját egyhetes tréning keretében a törökországi NRL-ben (National Reference Laboratory) is sikerrel próbáltuk ki. Twinning projekt keretén belül 2018 májusában egy újabb tréninget terveztünk, amelynek folytatásaként a török kollégák a módszer validálását tervezik a közel jövőben.

6. Következtetések

A közleményben bemutatott állatgyógyszer-maradék vizsgálati koncepció hozzávetőlegesen 1800 minta vizsgálata után már bizonyította hatékonyságát. Egy évvel a többkomponenses szűrő módszer bevezetése óta lényegesen növekedett a monitoring vizsgálatok hatékonysága, az előző évekhez képest többféle szennyezést tudtunk kimutatni. A szűrő módszerrel detektált célkomponensek megerősítése független konfirmációs eljárással történik. A szermaradékot tartalmazó minták megerősítő vizsgálatai minden esetben igazolták a szűrő módszer által kimutatott célvegyület jelenlétét a mintában.



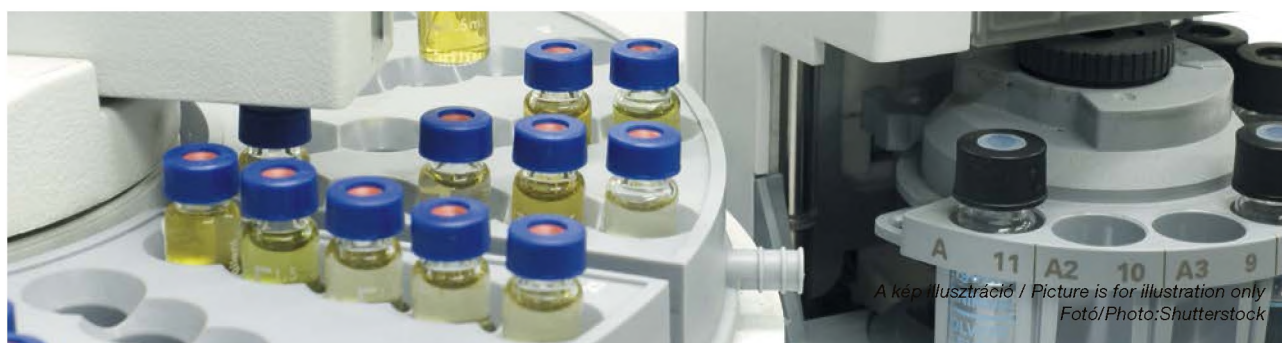
A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Shutterstock

1. Táblázat: A vizsgált antibakteriális szerek és csoportosításuk. Az LC-MS/MS szűrő módszer kimutatási képessége (CC β) komponensenként, a meghatározási határ (LOQ) és a megerősítő eljárások döntési határai (CC α).

Table 1: The antibacterial agents investigated and their grouping. The detection capability (CC β) of the LC-MS/MS screening method for each component, the limit of quantification (LOQ) and the decision limits of the confirmation procedures (CC α)

		Szűrő módszer / Screening method					Megerősítő módszer Confirmation method
Antibiotikum csoport Antibiotic group	Komponens Component	CC β (μg/kg) szövet CC β (μg/kg) tissue	CC β (μg/kg) tej CC β (μg/kg) milk	CC β (μg/kg) tojás CC β (μg/kg) eggs	CC β (μg/kg) méz CC β (μg/kg) honey	LOQ (μg/kg) márixtól függően LOQ (μg/kg) depending on the matrix	CC α (μg/kg) márixtól függően CC α (μg/kg) depending on the matrix
Sulfonamid + trimetoprim Sulfonamide + trimethoprim	Szulfadimetoxin Sulfadimethoxine	50	50	50	10	1-10	1-101
	Szulfadoxin Sulfadoxine	50	50	50	10	1-10	1-102
	Szulfakvinoxalin Sulfaquinoxaline	50	50	50	10	1-10	1-101
	Szulfaklórpiridazin Sulfachloropyridazine	50	50	50	10	1-10	1-102
	Szulfametazin Sulfamethazine	50	50	50	10	1-10	1-101
	Szulfametoxazol Sulfamethoxazole	50	50	50	10	1-10	1-101
	Szulfadiazin Sulfadiazine	50	50	50	10	1-10	1-102
	Szulfatiazol Sulfathiazole	50	50	50	10	1-10	1-101
	Trimetoprim Trimethoprim	25	25	25	5	1-10	0.1-58.3
Makrolid Macrolide	Tilozin Tylosin	50	25	10	-	10	62-141
	Tilmikozin Tilmicosin	25	25	10	-	10	LOQ = 10
	Spiramicin Spiramycin	50	100	100	-	10	260-382
	Eritromicin Erythromycin	50	20	20	-	10-20	55-253
Aminoglikozid Aminoglycoside	Neomicin Neomycin	250	750	250	150	250	1875-7095
	Dihidrosztreptomycin Dihydrostreptomycin	250	100	100	20	100-250	260-1454
	Sztreptomycin Streptomycin	250	100	100	20	100-250	262-1405
	Apramicin Apramycin	250	100	100	20	100-500	172
	Kanamicin Kanamycin	50	75	75	15	50-75	218-3848
	Gentamicin Gentamicin	50	50	50	20	50	122-1002
	Spektinomycin Spectinomycin	150	100	100	20	100-150	268-7898

		Szűrő módszer / Screening method					Megerősítő módszer Confirmation method
Béta-laktám <i>Beta-lactam</i>	Amoxicillin <i>Amoxicillin</i>	25	2	2	-	2-10	4.8-66
	Ampicillin <i>Ampicillin</i>	25	2	2	-	2-10	5.8-62
	Penicillin G <i>Penicillin G</i>	25	2	2	-	2-10	5.4-64
	Penicillin V <i>Penicillin V</i>	12.5	2	2	-	2-10	23-35
	Oxacillin <i>Oxacillin</i>	75	15	15	-	10-15	41-404
	Nafcillin <i>Nafcillin</i>	75	15	15	-	10-15	37-102
	Kloxacillin <i>Cloxacillin</i>	75	15	15	-	10-15	38-140
	Dikloxacillin <i>Dicloxacillin</i>	75	15	15	-	10-15	39-97
	Cefkinom <i>Cefquinome</i>	75	10	10	-	10	LOQ = 10
	Ceftiofur <i>Ceftiofur</i>	75	50	50	-	10-50	28-1252
	Cefalónium <i>Cefalonium</i>	75	10	10	-	10	29-60
	Cefazolin <i>Cefazolin</i>	75	25	25	-	10-25	25-82
	Cefapirin <i>Cefapirin</i>	25	30	30	-	10-30	25-74
	Cefalexin <i>Cefalexin</i>	75	50	50	-	10-50	25-66
	Cefaperazon <i>Cefaperazone</i>	75	25	25	-	10-25	34-73
Tetraciklin <i>Tetracycline</i>	Klórtetraciklin <i>Chlortetracycline</i>	50	50	50	10	1-10	0.5-610
	4-epi-klórtetraciklin <i>4-epi-Chlortetracycline</i>	50	50	50	10	1-10	LOQ = 5
	Oxitetraciklin <i>Oxytetracycline</i>	50	50	50	10	1-10	0.5-605
	4-epi-oxitetraciklin <i>4-epi-Oxytetracycline</i>	50	50	50	10	1-10	LOQ = 5
	Tetraciklin <i>Tetracycline</i>	50	50	50	10	1-10	0.5-628
	4-epi-tetraciklin <i>4-epi-Tetracycline</i>	50	50	50	10	1-10	LOQ = 5
	Doxiciklin <i>Doxycycline</i>	50	50	50	10	1-10	0.5-601



A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Shutterstock

		Szűrő módszer / Screening method					Megerősítő módszer Confirmation method
Kinolon Quinolone	Difloxacin <i>Difloxacin</i>	50	50	50	10	1-10	LOQ = 10
	Orbifloxacin <i>Orbifloxacin</i>	50	50	50	10	1-10	LOQ = 10
	Szarafloxacin <i>Sarafloxacin</i>	50	50	50	10	1-10	LOQ = 10
	Ofloxacin <i>Ofloxacin</i>	50	50	50	10	1-10	LOQ = 10
	Marbofloxacin <i>Marbofloxacin</i>	50	37.5	37.5	7.5	1-10	LOQ = 10
	Enrofloxacin <i>Enrofloxacin</i>	50	50	50	10	1-10	1.1-217
	Ciprofloxacin <i>Ciprofloxacin</i>	50	50	50	10	1-10	1-213
	Danofloxacin <i>Danofloxacin</i>	50	15	15	3	1-10	LOQ = 10
	Norfloxacin <i>Norfloxacin</i>	50	50	50	10	1-10	1.5-230
	Oxolinsav <i>Oxolinic acid</i>	50	50	50	10	1-10	0.1-165
	Nalidixsav <i>Nalidixic acid</i>	50	50	50	10	1-10	166-200
	Flumekvin <i>Flumequine</i>	50	25	25	5	1-10	0.3-913
Linkó- zamid <i>Lincosamide</i>	Lincomicin <i>Lincomycin</i>	50	75	25	15	1-10	0.05-161
	Griseofulvin <i>Griseofulvin</i>	250	250	250	50	1-10	LOQ = 333



A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo:Shutterstock

2. Táblázat: A vizsgált antibakteriális szerek MRM beállításai és retenciójuk az LC-MS/MS szűrő módszerben.
Table 2: MRM settings and retentions of the antibacterial agents investigated in the LC-MS/MS screening method.

Antibiotikum csoport <i>Antibiotic group</i>	Komponens <i>Component</i>	Célkomponens/ kísérő standard <i>Target component/ surrogate standard</i>	Retenció idő (perc) <i>Retention time (min)</i>	Anyai ion (m/z) <i>Parent ion (m/z)</i>	Leányionok (m/z) <i>Daughter ions (m/z)</i>	Fragmentor feszültség (V) <i>Fragmentor voltage (V)</i>	Ütközési energia (V) <i>Collision energy (V)</i>
Szulfonamid + trimetoprim <i>Sulfonamide + trimethoprim</i>	Szulfadiazin <i>Sulfadiazine</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	5.0	251.1	156.1 92.1	100	15 30
	Szulfatiazol <i>Sulfathiazole</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	7.7	256.1	156.1 92.1	100	10 30
	Szulfapiridin <i>Sulfapyridine</i>	Kísérő standard <i>Surrogate standard</i>	8.0	250.1	156.1	100	15
	Szulfametazin <i>Sulfamethazine</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	9.9	279.2	156.1 124.2	100	15 30
	Szulfaklórpiridazin <i>Sulfachloropyridazine</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	11.1	285.2	156.1 92.1	100	10 30
	Szulfadoxin <i>Sulfadoxine</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.2	311.1	156.1 92.1	100	15 30
	Szulfametoxazol <i>Sulfamethoxazole</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.4	254.1	156.1 92.1	100	15 30
	Szulfadimetoxin <i>Sulfadimethoxine</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	14.2	311.1	156.1 92.1	100	20 30
	Szulfakvinoxalin <i>Sulfaquinoxaline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	14.4	301.1	156.1 108.0	100	15 25
	Trimetoprim <i>Trimethoprim</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.6	291.2	230.4 123.0	100	25 25
	Trimetoprim-d9 <i>Trimethoprim-d9</i>	Kísérő standard <i>Surrogate standard</i>	12.6	300.3	234.2	100	25
Makrolid <i>Macrolide</i>	Spiramicin <i>Spiramycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	15.1	843.7	174.2 142.4	90	40 30
	Tilmikozin <i>Tilmicosin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	16.3	869.8	696.4 174.2	140	45 50
	Eritromicin <i>Erythromycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	16.3	734.7	576.4 158.3	150	25 25
	Tilozin <i>Tylosin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	16.6	916.6	174.2 145.4	90	35 35
	Roxitromicin <i>Roxithromicine</i>	Kísérő standard <i>Surrogate standard</i>	18.1	837.7	679.7	120	20
Aminoglükozid <i>Aminoglycoside</i>	Spektinomycin <i>Spectinomycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	10.3	351.2	333.2 207.3	150	25 20
	Sztreptomycin <i>Streptomycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	11.7	582.4	263.4 246.2	150	35 35
	Dihidro-sztreptomycin <i>Dihydrostreptomycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	11.7	584.4	263.4 246.2	150	35 35
	Kanamycin <i>Kanamycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.7	485.3	324.5 163.0	150	15 25
	Apramicin <i>Apramycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	13.6	540.3	378.1 217.1	150	12 25
	Gentamicin <i>Gentamicin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	14.1	478.4	160.2 157.3	150	20 20
	Neomicin <i>Neomycin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	14.2	615.6	293.0 160.7	150	35 35

Antibiotikum csoport Antibiotic group	Komponens Component	Célkomponens/ kísérő standard Target component/ surrogate standard	Retenciósi idő (perc) Retention time (min)	Anyaiion (m/z) Parent ion (m/z)	Leányionok (m/z) Daughter ions (m/z)	Fragmentor feszültség (V) Fragmentor voltage (V)	Ütközési energia (V) Collision energy (V)
Béta-laktám Beta-lactam	Amoxicillin <i>Amoxicillin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	10.3	366.2	349.1 208.1	100	5 10
	Ampicillin <i>Ampicillin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.5	348.2	304.2 207.2	90	0 0
	Penicillin G <i>Penicillin G</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	15.9	335.1	176.1 160.1	100	10 10
	Penicillin G-d7 <i>Penicillin G-d7</i>	Kísérő standard <i>Surrogate standard</i>	15.9	342.2	183.3	100	10
	Penicillin V <i>Penicillin V</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	17.0	351.1	160.1 114.1	100	10 10
	Oxacillin <i>Oxacillin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	17.7	402.2	243.1 160.1	100	10 10
	Kloxacillin <i>Cloxacillin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	18.6	436.1	277.1 160.1	100	10 10
	Nafcillin <i>Nafcillin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	19.0	415.2	199.2 171.1	100	10 45
	Dikloxacillin <i>Dicloxacillin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	19.5	470.1	311.1 160.1	100	10 10
	Cefazolin <i>Cefazolin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	11.1	454.8	322.9 155.9	100	10 10
	Cefapirin <i>Cefapirin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	11.1	424.1	292.1 152.0	100	15 25
	Cefalónium <i>Cefalonium</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	11.2	459.1	337.0 152.0	100	5 15
	Cefalexin <i>Cefalexin</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.5	348.1	173.9 158.0	100	10 0
	Cefkvinom <i>Cefquinome</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.1	529.3	396.0 134.2	100	10 15
	Cefaperazon <i>Cefoperazone</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.8	668.2	526.1 164.9	100	15 25
Ceftiofur <i>Ceftiofur</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	15.1	524.1	240.9 126.0	100	15 25	
Tetraciklin Tetracycline	Oxitetraciklin <i>Oxytetracycline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.2	461.3	443.2 426.2	100	10 20
	4-epi-oxitetraciklin <i>4-epi-Oxytetracycline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.2	461.3	443.2 426.2	100	10 20
	4-epi-tetraciklin <i>4-epi-Tetracycline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.4	445.2	409.8 154.1	100	20 30
	Metaciklin <i>Metacycline</i>	Kísérő standard <i>Surrogate standard</i>	12.6	443.1	426.0	120	20
	Tetraciklin <i>Tetracycline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	12.7	445.2	409.8 154.1	100	20 30
	4-epi-klórtetraciklin <i>4-epi-Chlortetracycline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	14.2	479.2	444.1 154.1	100	20 30
	Klórtetraciklin <i>Chlortetracycline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	14.7	479.2	444.1 154.1	100	20 30
	Doxiciklin <i>Doxycycline</i>	Célkomponens <i>Target component</i>	15.6	445.2	428.1 154.1	100	15 30

Antibiotikum csoport Antibiotic group	Komponens Component	Célkomponens/ kísérő standard Target component/ surrogate standard	Retenciósi idő (perc) Retention time (min)	Anyaiion (m/z) Parent ion (m/z)	Leányionok (m/z) Daughter ions (m/z)	Fragmentor feszültség (V) Fragmentor voltage (V)	Ütközési energia (V) Collision energy (V)
Kinolon Quinolone	Norfloxacín Norfloxacin	Célkomponens Target component	12.5	320.2	302.1 231.1	100	20 45
	Marbofloxacín Marbofloxacin	Célkomponens Target component	12.5	363.2	345.1 320.1	100	20 15
	Ofloxacín Ofloxacin	Célkomponens Target component	12.6	362.2	344.2 318.2	100	20 20
	Ciprofloxacín Ciprofloxacin	Célkomponens Target component	12.7	332.2	314.1 231.1	100	20 45
	Danofloxacín Danofloxacin	Célkomponens Target component	13.4	358.2	340.1 255.2	100	25 40
	Enrofloxacín Enrofloxacin	Célkomponens Target component	13.6	360.2	342.2 286.1	100	25 40
	Oxolininsav Oxolinic acid	Célkomponens Target component	13.6	262.2	244.1 216.1	100	20 40
	Orbifloxacín Orbifloxacin	Célkomponens Target component	13.6	396.2	352.3 295.2	100	20 25
	Szarafloxacín Sarafloxacin	Célkomponens Target component	13.8	386.2	348.0 368.1	100	35 20
	Difloxacín Difloxacin	Célkomponens Target component	14.2	400.2	382.1 306.1	100	25 45
	Nalidixsav Nalidixic acid	Célkomponens Target component	15.6	233.1	187.1 215.1	100	25 15
	Flumekvin Flumequine	Célkomponens Target component	16.1	262.1	202.1 244.1	100	35 20
Linkóزامid Lincosamide	Lincomicin Lincomycin	Célkomponens Target component	10.8	407.2	359.3 126.2	70	20 30
	Griseofulvin Griseofulvin	Célkomponens Target component	17.2	353.1	165.2 215.1	100	20 20

3. Táblázat: A szűrő- és megerősítő módszerekkel valódi mintákban (körvizsgálati, monitoring, kontroll minták) detektált szermaradékok.

Table 3: Antibiotic residues detected in real samples (proficiency testing, monitoring, control samples) by the screening and confirmation methods.

Minta Sample	Azonosított komponens Identified component	Antibiotikum csoport Antibiotic group	LC-MS/MS szűrő módszer LC-MS/MS screening method	Megerősítő módszer Confirmation method	Megjegyzés Comment
Csirke izom Chicken muscle	Enrofloxacín és ciprofloxacín Enrofloxacin és ciprofloxacin	Kinolon Quinolone	> CC β	Σ 862 μ g/kg (HPLC-FLD)	MRL = Σ 100 μ g/kg
Csirke izom Chicken muscle	Enrofloxacín Enrofloxacin	Kinolon Quinolone	> CC β	128 μ g/kg (HPLC-FLD)	MRL = Σ 100 μ g/kg
Csirke izom Chicken muscle	Doxiciklin Doxycycline	Tetraciklin Tetracycline	> CC β	254 μ g/kg (HPLC-DAD)	MRL = 100 μ g/kg
Hal Fish	Oxitetraciklin és 4-epi-oxitetraciklin Oxytetracycline and 4-epi-Oxytetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CC β	Σ 115 μ g/kg (HPLC-DAD)	Körvizsgálati EU-RL minta, Z-score = -1,3 Proficiency testing EU-RL sample, Z-score = -1.3

Minta Sample	Azonosított komponens Identified component	Antibiotikum csoport Antibiotic group	LC-MS/MS szűrő módszer LC-MS/MS screening method	Megerősítő módszer Confirmation method	Megjegyzés Comment
Hal Fish	Szulfadiazin és trimetoprim Sulfadiazine and trimethoprim	Szulfonamid és diaminopirimidin Sulfonamide and diamino- pyrimidine	> CCβ	31.7 µg/kg és/ and 23.9 µg/kg (LC-MS/MS)	Körvizsgálati EU-RL minta, Z-score = -1,1 és -0,3 Proficiency testing EU-RL sample, Z-score = -1.1 and -0.3
Hal Fish	Oxolinsav Oxolinic acid	Kinolon Quinolone	> CCβ	105 µg/kg (HPLC-FLD)	Körvizsgálati EU-RL minta, Z-score = -0,9 Proficiency testing EU-RL sample, Z-score = -0.9
Hal Fish	-	-	< CCβ	Negatív Negative (LC-MS/MS)	Körvizsgálati EU-RL minta, Z-score = értékelés alatt Proficiency testing EU-RL sample, Z-score = under evaluation
Liba izom Goose muscle	Doxiciklin Doxycycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	333 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 100 µg/kg
Méz Honey	Szulfadimetoxin és trimetoprim Sulfadimethoxine and trimethoprim	Szulfonamid és diaminopirimidin Sulfonamide and diamino- pyrimidine	> CCβ	15.4 µg/kg és/ and 2.71 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL nincs meghatározva MRL not determined
Méz Honey	Szulfatiazol Sulfathiazole	Szulfonamid Sulfonamide	> CCβ	4.76 µg/kg (LC-MS/MS)	Körvizsgálati EU-RL minta, Z-score = -2,4 Proficiency testing EU-RL sample, Z-score = -2.4
Méz Honey	Tetraciklin és 4-epi-tetraciklin Tetracycline and 4-epi-Tetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	Σ12.6 µg/kg (LC-MS/MS)	Körvizsgálati EU-RL minta, Z-score = -0,7 Proficiency testing EU-RL sample, Z-score = -0.7
Méz Honey	Sztreptomycin Streptomycin	Aminoglükozid Aminoglycoside	> CCβ	43.3 µg/kg (LC-MS/MS)	Körvizsgálati EU-RL minta, Z-score = 0,3 Proficiency testing EU-RL sample, Z-score = 0.3
Méz Honey	-	-	< CCβ	Negatív Negative (LC-MS/MS)	Körvizsgálati EU-RL minta Proficiency testing EU-RL sample
Méz Honey	Szulfakvinoxalin és szulfatiazol Sulfaquinoxaline and sulfathiazole	Szulfonamid Sulfonamide	> CCβ	123 µg/kg és/ and 107 µg/kg (HPLC-FLD)	Kontroll minta Control sample
Sertés vese Pig kidney	Doxiciklin Doxycycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	63.3 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 600 µg/kg
Sertés vese Pig kidney	Doxiciklin Doxycycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	81.8 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 600 µg/kg
Sertés vese Pig kidney	Doxiciklin Doxycycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	32.1 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 600 µg/kg
Sertés vese Pig kidney	Doxiciklin és oxitet- raciklin Doxycycline and Oxytetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	105 µg/kg és/ and 54.2 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 600 µg/kg
Sertés vese Pig kidney	Doxiciklin és oxitet- raciklin Doxycycline and Oxytetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	5375 µg/kg és/ and 308 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 600 µg/kg
Sertés vese Pig kidney	Doxiciklin Doxycycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	54.8 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 600 µg/kg
Sertés vese Pig kidney	Doxiciklin Doxycycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	34.7 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 600 µg/kg

Minta Sample	Azonosított komponens Identified component	Antibiotikum csoport Antibiotic group	LC-MS/MS szűrő módszer LC-MS/MS screening method	Megerősítő módszer Confirmation method	Megjegyzés Comment
Sertés vese Pig kidney	Klórtetraciklin Chlortetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	270 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 600 µg/kg
Szarvasmarha izom Bovine muscle	Oxitetra-ciklin Oxytetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	1444 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 100 µg/kg
Szarvasmarha izom Bovine muscle	Tetraciklin Tetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	126 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 100 µg/kg A vizelet 12,6 µg/kg dexame- tazont tartalmazott. MRL = 100 µg/kg The urine contained 12.6 µg/kg dexamethasone.
Szarvasmarha máj Bovine liver	Tetraciklin Tetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	239 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 300 µg/kg A vizelet 12,6 µg/kg dexame- tazont tartalmazott. MRL = 300 µg/kg The urine contained 12.6 µg/kg dexamethasone.
Szarvasmarha vese Bovine kidney	Tetraciklin Tetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	1506 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 600 µg/kg A vizelet 12,6 µg/kg dexame- tazont tartalmazott. MRL = 600 µg/kg The urine contained 12.6 µg/kg dexamethasone.
Szarvasmarha vese Bovine kidney	Oxitetra-ciklin Oxytetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	677 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 600 µg/kg
Szarvasmarha vese Bovine kidney	Penicillin G Penicillin G	Béta-laktám Beta-lactam	> CCβ	158 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 50 µg/kg
Szarvasmarha vese Bovine kidney	Szulfadiazin és trimetoprim Sulfadiazine and trimethoprim	Szulfonamid és diaminopirimidin Sulfonamide and diamino- pyrimidine	> CCβ	247 µg/kg és/ and 198 µg/kg (HPLC-FLD és/ and LC-MS/MS)	MRL = 100 µg/kg és 50 µg/kg MRL = 100 µg/kg and 50 µg/kg
Szarvasmarha tej Cow's milk	Ampicillin Ampicillin	Béta-laktám Beta-lactam	> CCβ	1.12 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 4 µg/kg
Szarvasmarha tej Cow's milk	Cafalónium Cefalonium	Béta-laktám Beta-lactam	> CCβ	3.07 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 20 µg/kg
Szarvasmarha tej Cow's milk	Cafalónium Cefalonium	Béta-laktám Beta-lactam	> CCβ	2.85 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 20 µg/kg
Szarvasmarha tej Cow's milk	Cafalónium Cefalonium	Béta-laktám Beta-lactam	> CCβ	129 µg/kg (LC-MS/MS)	MRL = 20 µg/kg
Szarvasmarha tej Cow's milk	Tetraciklin Tetracycline	Tetraciklin Tetracycline	> CCβ	38.1 µg/kg (HPLC-DAD)	MRL = 100 µg/kg

7. Irodalom

- [1] Fekete, J., Kormány, R., Fekete, Sz. (2017): Modern folyadékkromatográfia, KromKorm Kft., Budapest, Magyarország
- [2] Tölgyesi, Á., Fekete, J. (2017): Folyadékkromatográfiai hármas kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometriai módszerek a gyakorlatban: példák élelmiszer- és bioana-

litikai alkalmazásokra, Kromatográfus különszám, Gen-lab Kft., Budapest, Magyarorszá

- [3] Commission Regulation (EU) 37/2010 (2010): Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, Off. J. EU. Legis L 15/1.

- [4] Vidékfejlesztési Minisztérium- 10/2002. (I.23.) FVM rendelete. https://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=a0200010.fvm (Hozzáférés: 2017.09.21.)
- [5] Malachova, A., Sulyok, M., Beltran, E., Bertiiller, F., Krska, R. (2015): Multi-Toxin Determination in Food – The Power of “Dilute and Shoot” Approaches in LC–MS–MS, *LCGC Europe* 28 p. 542-555
- [6] Breidbach, A., Ulberth, F. (2015): Two-dimensional heart-cut LC-LC improves accuracy of exact-matching double isotope dilution mass spectrometry measurements of aflatoxin B1 in cereal-based baby food, maize, and maize-based feed, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 p. 3159-3167
- [7] Commission Decision 2002/657/EC (2002): Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun.* L221/8.
- [8] Tölgyesi, Á., Tölgyesi, L., Békési, K., Sharma, V.K., Fekete, J. (2014): Determination of tetracyclines in pig and othermeat samples using liquid chromatography coupled with diode array and tandem mass spectrometric detectors. *Meat Sci.* 96. p. 1332– 1339
- [9] Tölgyesi, Á., Berky, R., Békési, K., Fekete, Sz., Fekete, J., Sharma, V.K. (2012): Quantitative analysis of sulfonamide residues in real honey using high performance liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometric detection, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 36 p. 1-21
- [10] Dubois, M., Fluchard, D., Sior, E., Delahaut, P. (2001): Identification of quantification of five macrolide antibiotic in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 753 p. 189-202
- [11] Zhu, W.X., Yang, J.Z., Wei, W., Liu, Y.F., Zhang, S.S. (2008): Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps, *J. Chromatogr. A* 1207 p. 29-37
- [12] Di Rocco, M., Moloney, M., O’Beirne, T., Earley, S., Berendsen, B., Furey, A., Danaher, M. (2017): Development and validation of a quantitative confirmatory method for 30 β -lactam antibiotics in bovine muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1500 p. 121–135
- [13] Rose, M.D., Bygrave, J., Stubbings, G.W.F. (1998): Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in food, *Analyst* 123 p. 2789-2796
- [14] Tölgyesi, Á., Fekete, Sz., Békési, K., Tóth, E., Sharma, V.K., Fekete, J. (2012): Fast analysis of lincomycin in honey, muscle, milk, and egg using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 50 p. 190-198
- [15] CRLs (2010): Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Initial validation and transfer). Community Reference Laboratories 20/1/2010. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf (Hozzáférés: 2017.09.21.)
- [16] CRL Guidance Paper (2007): CRLs view on State of the art analytical methods for national residue control plans, RIVM-NL http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/EURL_Empfehlungen_Konzentrationsauswahl_Methodenvalierungen.pdf?__blob=publicationFile (Hozzáférés: 2017.09.21.)
- [17] Hawari, K.E., Mokh, S., Doumyati, S., Iskandarani, M.A., Verdon, E. (2017): Development and validation of a multiclass method for the determination of antibiotic residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam. Part A* 34 p. 582-597
- [18] JECFA (2013): Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives. Seventy-eighth meeting (Residues of veterinary drugs); 2013 Nov 5–14; Geneva. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/JECFA_78_Summary_report_Version_final.pdf (Hozzáférés: 2017.09.21.)
- [19] Forsgren, E. (2010): European foulbrood in honey bees, *J. Invertebr. Pathol.* 103 p. S5–S9
- [20] Genersch, E. (2010): American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*, *J. Invertebr. Pathol.* 103 p. S10–S19
- [21] Tölgyesi, Á., Sharma, V.K. (2017): Szteroid származék LC-MS/MS módszerű analízise: szelektív minta-előkészítési eljárások kevert módú szilárd fázisú extrakció és pH-kontroll alkalmazásával, *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 63 p. 1377-1389
- [22] Berendsen, B.J.A., Elbers, I.J.W., Stolker, A.A.M. (2011): Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection, *Food Addit. Contam.* 28 p. 1657–1666