



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Identifikace a kvantitativní stanovení vybraných
antimikrobik metodou kapalinové chromatografie
s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením
v prostředí drůbežích chovů**

**Ing. Michaela Charvátová, Ph.D.
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.**



Uplatněná certifikovaná metodika

č. CM 150/2024

(ISBN 978-80-7672-057-2)

Identifikace a kvantitativní stanovení vybraných antimikrobik metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v prostředí drůbežích chovů.

Autor:

Ing. Michaela Charvátová, Ph.D.

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu č. **QK22020066** („Opatření na snižování spotřeby a racionální užití antibiotik ve výkrmu brojlerů v České republice“) programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ČR na období 2022-2024.

Brno 2024

Brno, 11. 11. 2024



Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv
Hudcova 232/56a, 621 00 Brno

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

ÚSKVBL/16842/2024/RED

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Identifikace a kvantitativní stanovení vybraných antimikrobik metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v prostředí drůbežích chovů**

Autor / autoři: **Ing. Michaela Charvátová, Ph.D. a Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.**

Název organizace/cí: **VÚVeL v.v.i. Brno**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2024**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace č. **QK22020066 NAZV**

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

MVDr. Jiří Bureš

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitel

V Brně

dne 18. 12. 2024

MVDr. Jiří
Bureš

Digitálně podepsal
MVDr. Jiří Bureš
Datum: 2024.12.18
09:52:13 +01'00'

Podpis/elektronický podpis zástupce
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe:

V dne

Mgr. Jan Radoš

Digitální podpis:
20.12.2024 09:50

Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru precizního
zemědělství, výzkumu a vzdělávání



Uplatněná certifikovaná metodika

Identifikace a kvantitativní stanovení vybraných antimikrobik metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v prostředí drůbežích chovů.

Obsah:

Předmluva	 3
I. Cíl metodiky	 4
II. Vlastní popis metodiky	 5
III. Srovnání „novosti postupů“	 30
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky	 30
V. Ekonomické aspekty	 31
VI. Seznam použité literatury	 33
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	 34
Přílohy	 35

Oponentní posudky zpracovali:

1. Mgr. Martina Rejtharová – Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno
2. Mgr. Kateřina Kobelková, Ph.D. – Veterinární univerzita Brno

Certifikovanou metodu vypracovali: Ing. Michaela Charvátová, Ph.D.

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.



Předmluva

Antimikrobika hrají v humánní i veterinární medicíně nezastupitelnou roli v léčbě bakteriálních infekcí a v současné době nejsou k dispozici žádná alternativní léčiva, která by antimikrobika v plném rozsahu nahradila. V posledních dekádách, konkrétně od roku 1990, navíc došlo k výraznému poklesu objevů a zavádění nových molekul antimikrobik do klinické praxe. Z těchto důvodů je klíčovým úkolem současné medicíny zachovat účinnost stávajících antimikrobik, jejichž efektivita je však vážně ohrožena zvyšující se prevalencí rezistence mikroorganismů k nim. Rezistence k antimikrobiálním látkám ve veterinární medicíně není problémem jen z hlediska zdraví zvířat a konsekvencně i z hlediska ekonomického, primárně je však zdůrazňován možný dopad do veřejného zdraví. Přenos bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám či přenos rezistence z bakterií, jejichž zdrojem jsou zvířata, či jimi produkovány potraviny jsou dlouhodobě velmi diskutované. Dalším významným rizikem je přenos rezistentních bakterií či rezistencí prostřednictvím životního prostředí, ve kterém jako jeden z faktorů působících selekční tlak fungují rezidua veterinárních léčiv (především těch podávaných perorálně v napájecí vodě) ze zemědělských chovů, které se mohou dostávat do odpadních vod a následně do veřejných kanalizací a povrchových vod, kde způsobují nekontrolovaný rozvoj bakteriálních rezistencí, ko-rezistencí a zkřížených rezistencí.

Existují dvě hlavní cesty vstupu veterinárních léčiv do životního prostředí, a to prostřednictvím používání statkových hnojiv, kdy se rezidua léčivých látek či jejich metabolitů (včetně antibiotik) dostávají do půdy a následně jsou v různé míře vyluhovány do podzemních a povrchových vod a odtud se mohou dostat až do zdrojů pitné vody. Druhá cesta je přímo přes vodní hospodářství farmy, kdy prostřednictvím odpadních vod ze zemědělských chovů léčiva vstupují do komunálních čistíček odpadních vod a odtud do říčních toků a případně opět do pitné vody. Koncentrace antibiotik a jejich metabolitů se tak v povrchových vodách obecně pohybuje v řádech ng až $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nelze však jednoznačně určit zdroj znečištění a studií, které uvádějí přímou souvislost mezi veterinárními antimikrobiky používanými v živočišné výrobě a životním prostředím je stále nedostatek. Obecně se předpokládá, že koncentrace antibiotik a jejich metabolitů jsou v půdách a dalších organických matricích obecně nižší, např. konkrétně v půdě z důvodu jejich vazby na organický materiál nebo schopnosti některých mikroorganismů tyto látky metabolizovat a tím snižovat jejich koncentrace. To však nesnižuje jejich potenciál pro vznik antibiotické rezistence. Nicméně studií, které se tímto tématem a analýzami reálných vzorků pocházejících z prostředí potravinových zvířat v České republice blíže zabývají, je stále nedostatek pro přijetí jakýchkoli věrohodných závěrů.

K výše popsaným aspektům užívání veterinárních antimikrobik v chovech potravinových zvířat přistupuje ještě jeden významný prvek, který souvisí s principy EU politiky, obecně nazývané jako „Zelená dohoda pro Evropu“ (Green deal), a to Environmental, Social, and Governance reporting (ESG). ESG reporting se především zabývá poskytováním informací o environmentálních, sociálních a správních aspektech každého podnikání, včetně udržitelnosti 11. Přechod na udržitelné modely v zemědělství se tak rychle přesouvá z nadšeneckých iniciativ pro eko-zemědělství, do roviny nutné povinnosti, a to nejen z regulatorního pohledu, ale i z pohledu obchodního, ekonomického a odpovědného podnikání vůči životnímu prostředí. Naše práce v této metodice byla tedy zaměřená,



mimo jiné, na vypracování vhodných analytických nástrojů a bilančních výpočtů pro budoucí povinné reportování úrovně vlivu používání antimikrobik na produkčních drůbežích farmách a velkochovech brojlerů s přímými dopady na životní prostředí. Dále, metodika je rovněž koncipována tak, aby mohla sloužit i jako rozhodčí metodika pro posouzení optimálního užívání veterinárních léčiv v drůbežích chovech z pohledu ústředních kontrolních orgánů.

I. Cíl metodiky

Cílem uplatněné metodiky je analytická identifikace, monitorování a kvantitativní stanovení analytů vybraných antimikrobik (případně jejich metabolitů) v prostředí drůbežích produkčních chovů metodou LC-MS/MS(HR). Vyvinutá analytická metodika na bázi kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením je orientována na antimikrobika veterinárních léčivých přípravků registrovaných pro drůbež určenou k produkci masa. Metodika slouží především pro potřeby drůbežích chovů v oblasti monitoringu a mapování zátěží životního prostředí rezidui těchto veterinárních léčiv pocházejících z produkčních chovů drůbeže v rámci udržitelného zemědělství. Metodika může být využita rovněž pro úřední kontrolu účelného a optimálního užívání antimikrobik v produkčních chovech drůbeže na farmách.

Tato analytická metodika, která byla vyvinutá v rámci projektu č. QK22020066 („Opatření na snižování spotřeby a racionální užití antibiotik ve výkrmu brojlerů v České republice“), je rychlá, přesná a vysoce citlivá a jednoznačně identifikuje a kvantifikuje přítomnost těchto nejužívanějších antimikrobik: enrofloxacin, ciprofloxacin, sulfametoxazol, trimethoprim, amoxicilin a doxycyklin v napájecí vodě, odpadních vodách a v podestýlkách v drůbežích chovech. Pro tyto cílové analyty je metodika plně validovaná dle VICH-2 (1).

Metodika je dále schopna jednoznačně identifikovat a monitorovat na základě charakteristických RT a přesných molekulových hmot AM celou řadu dalších antimikrobik, která jsou registrována jako hromadně vyráběná veterinární léčiva pro drůbež, např. analyty: tetracyklin, oxytetracyklin, chlortetracyklin, florfenicol, ampicilin, oxacilin, procain penicilin, cefalexin, ceftiofur, sulfadimidine, sulfadimethoxin, sulfadoxin, sulfadiazin, erythromycin, tylosin, tylvalosin, tilmikosin, gamithromicin, linkomycin, gentamicin, neomycin, marbofloxacin, kolistin, tiamulin a valnemulin. Celá metodika je navržena tak, aby v případě potřeby mohly být přidávány další cílené analyty antimikrobik, které budou monitorovány a validovány.



II. Vlastní popis metodiky

1. Část informativní

1.1 Název metody

Identifikace a kvantitativní stanovení vybraných antimikrobik metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v prostředí drůbežích chovů.

1.2 Princip metody

Princip použité metody je založen na analytické separaci vzorků na chromatografické koloně pomocí kapalně mobilní fáze (kapalinová chromatografie, LC) a následné identifikaci a kvantifikaci jednotlivých látek pomocí hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) s vysokým rozlišením (HR). Tato fyzikálně-chemická metoda slouží pro určování hmot molekul (m/z) a jejich částí, jež je třeba k tomu účelu převést na kladné nebo záporné ionty a následně tyto ionty rozlišit podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a záznamu relativních intenzit těchto iontů. MS je mimořádně citlivá, destruktivní analytická metoda, která při minimální spotřebě vzorku určuje molekulární hmotnost (MW) a další strukturální informace analyzované organické látky.

1.3 Analyty

Amoxicillin trihydrate (CAS 61336-70-7), Ciprofloxacin (CAS 85721-33-1), Doxycycline hyclate (CAS 24390-14-5), Enrofloxacin (CAS 93106-60-6), Sulfamethoxazole (CAS 723-46-6), Trimethoprim (CAS 738-70-5).

1.4 Rozsah a použitelnost metodiky

Metodika je použitelná pro stanovení antimikrobik: amoxicillinu (AMX), ciprofloxacinu (CIP), enrofloxacinu (ENR), sulfamethoxazolu (SMX) a trimethoprimu (TMP) ve vzorcích napájecí a odpadní vody v koncentračním rozsahu $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ – $500 \mu\text{g.l}^{-1}$ a ve vzorcích stájové podestýlky v koncentračním rozsahu $0,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ – $250 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

1.5 Analyticko-statistická charakteristika metody

Identifikace a prokazování měřeného analytu ve vzorcích je založeno na měření přesných hmot (mass accuracy) odpovídajících kladných iontů prekurzorů a produktových iontů s využitím kritéria pro Správnost ($\Delta\text{ppm} \leq 5$). Kvantifikace analytu je založena na základě matricové kalibrační křivky s následujícími vypočtenými kritickými body citlivosti: LOD a LOQ (více viz kapitola – Validace metody).



1.6 Interference metody

Stanovení sledovaných látek analytickou metodou LC- MS/MS s vysokým rozlišením je za daných podmínek vysoce specifické a při měřeních nebyly pozorovány žádné interference v oblasti výskytu odezvy analytů pro zvolené matrice voda a podestýlka.

1.7 Interní kontrola metody

Jako interní standardy (IS) byly použity izotopicky značený Enrofloxacin – D5 – hydrochloride (ENR-D5; Sigma-Aldrich, Německo) a Amoxicillin – D4 (AMX-D4; Toronto Research Chemicals, Kanada).

Všechny vzorky byly na začátku zpracování fortifikovány roztokem obou interních standardů na výslednou koncentraci $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ u vzorků vody a na koncentraci $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ u vzorků podestýlky.

1.8 Externí kontrola metody

Plánovaná účast v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách.

2. Pracovní postup metodiky

2.1 Chemikálie, standardy

Pro vývoj analytické metody a k tomu se vztahujícím analýzám byly použity analytické standardy antimikrobiotických látek Amoxicillin trihydrate (CAS 61336-70-7), Ciprofloxacin (CAS 85721-33-1), Doxycycline hyclate (CAS 24390-14-5), Enrofloxacin (CAS 93106-60-6), Sulfamethoxazole (CAS 723-46-6), Trimethoprim (CAS 738-70-5). Jako interní standardy IS byly použity izotopicky značený Enrofloxacin – D5 – hydrochloride (Sigma-Aldrich, Německo) a Amoxicillin – D4 (Toronto Research Chemicals, Kanada). Kalibrační roztoky pro mass accuracy – Pierce ESI Positive/Negative Ion Calibration Solution byly pořízeny od dodavatele Thermo-Fisher Scientific CZ. Chemikálie metanol, voda (v čistotě pro HPLC/MS) a kyselina mravenčí byly nakoupeny u dodavatele Sigma-Aldrich CZ. Kapalný dusík v kvalitě 5.0 byl dodán firmou Messer CZ.

2.2 Příprava kalibračních roztoků a kontrolních vzorků (QC)

Zásobní roztok standardů byl připraven o koncentraci 1 g.l^{-1} (1 mg standardu byl rozpuštěn v 1,0 ml 100% metanolu; AMX a AMX-D4 v 50% roztoku metanolu). Pracovní roztoky standardů byly připraveny o potřebné koncentraci odpovídajícím naředěním zásobního roztoku přídavkem 50% metanolu.

Pracovní roztoky byly použity pro přípravu matricové kalibrační křivky v koncentračních hladinách 0,5; 2,5; 5,0; 10; 50; 100; 250 a $500 \mu\text{g.l}^{-1}$ v případě vody a 0,5; 2,5; 5,0; 10; 50; 100; 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ v případě podestýlky. Každý vzorek byl fortifikován roztoky obou IS ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$ vzorky vody a $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vzorky podestýlky).



Jako kontrolní vzorky (Quality Control, QC) byly použity roztoky o koncentraci 0,5; 50 a 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ v případě vody a 0,5; 50 a 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ v případě podestýlky.

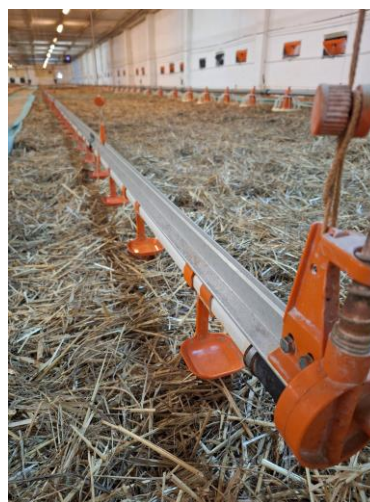
Všechny roztoky byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazicím boxu. Zásobní roztoky standardů jsou stabilní maximálně 1 rok, pracovní roztoky jsou stabilní minimálně 1 měsíc.

2.2 Analytické zařízení

Analytická metoda byla vyvinuta na chromatografickém systému Vanquish Horizon spojeném s hybridním tandemovým hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (High Resolution, HR) na bázi orbitrapu označeném QExactive s H-ESI ionizačním zdrojem (obojí Thermo Fisher Scientific, USA). Pro softwarové řízení hmotnostního spektrometru byl použit program Xcalibur v. 3.1 (Thermo Fischer Scientific, USA). Měření bylo provedeno v analytické laboratoři vybavené klimatizací udržující teplotu v rozmezí $21 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3 Vzorkování

Vzorky napájecí vody byly odebrány v hale z napájecího systému (Obrázek 1 a, b). Vzorky odpadních vod byly odebrány z jímky odpadních vod v drůbežářském podniku a případně z nádrží čistírny odpadních vod (Obrázek 1 c, d). Vody byly odebrány do skleněné lahve typu Duran se šroubovacím uzávěrem o objemu 1 l a byly řádně označeny. Do zpracování (max. 48 hod) byly uchovávány v lednici při $5 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Podestýlka byla odebrána v drůbežářské hale před a po ukončení turnusu (Obrázek 1 e, f). Odběr byl proveden do odběrových sáčků, sáčky byly popsány a do zpracování (max. 48 hod) byly uchovávány v lednici při $5 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorkování v případě potřeby může být rozšířeno o stěry prachových vrstev kritických míst v halách – větráky, teplomety, různá technologická zařízení (Obrázek 1 g, h, ch).

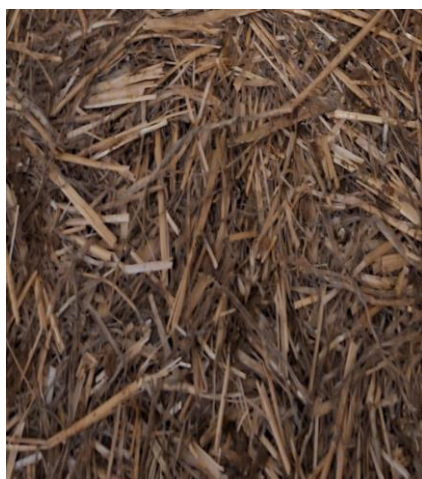


Obrázek 1a,1 b – Fotografie pítka (detail) a napájecího systému v hale

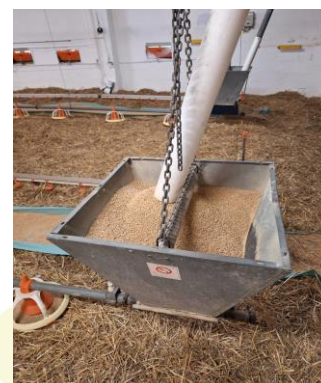
CM 150/



Obrázek 1c, 1d – Fotografie odpadní jímky a kořenové čistírny odpadních vod



Obrázek 1e, 1f – Fotografie podestýlky v hale před a po ukončení turnusu



Obrázek 1g, 1h, 1ch – Fotografie větráku a technologických zařízení v halách



2.4 Pracovní postup přípravy vzorků

2.4.1 Voda (napájecí a odpadní)

1. Odebrat 4990 μl vody do 5 ml centrifugační zkumavky.
2. Přidat interní standardy: 5 μl AMX-D4 ($c = 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 5 μl ENR-D5 ($c = 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Krátce promíchat pomocí vortexu.
3. Odstředit na centrifuze (10 min, 4 °C, 11 000 rpm).
4. Čirý supernatant odebrat do skleněné Kimbel baňky.
5. Odpařit na termovapu pod mírným proudem dusíku při 50 °C.
6. Odparek rozpustit ve 200 μl směsi metanolu a vody (50:50).
7. Vzorek převést do centrifugační zkumavky a centrifugovat (10 min, 4 °C, 14 500 rpm).
8. Odebrat čirý supernatant do insertu vloženého do vialky.
9. Do analýzy byly vzorky uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

2.4.2 Podestýlka

1. Do 15 ml centrifugační zkumavky navážit 1 g zhomogenizované podestýlky.
2. Přidat 2 ml metanolu (100%).
3. Přidat interní standardy: 5 μl AMX-D4 ($c = 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 5 μl ENR-D5 ($c = 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Krátce promíchat pomocí vortexu.
4. Třepat 20 min na multispeedvortexu (cca 1500 rpm).
5. Odstředit na centrifuze (10 min, 4 °C, 11 000 rpm).
6. Čirý supernatant odebrat do skleněné Kimbel baňky.
7. Odpařit na termovapu pod mírným proudem dusíku při 35 °C.
8. Odparek rozpustit ve 200 μl směsi metanolu a vody (50:50).
9. Vzorek převést do centrifugační zkumavky a centrifugovat (10 min, 4 °C, 14 500 rpm).
10. Odebrat čirý supernatant do insertu vloženého do vialky.
11. Do analýzy byly vzorky uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

2.5 Analytická metoda měření

2.5.1 Chromatografická separace pro kvantifikaci

Vzorky připravené pro cílenou analýzu byly přímo nastříknuty do chromatografického systému Vanquish Horizon spojeného s hmotnostním spektrometrem. K chromatografické separaci byla použita kolona Luna® Omega C18 (100 × 2,1 mm; 1,6 μm) a předkolona UHPLC C18 (10 mm × 2.1 mm, 3 μm) obojí od Phenomenex® (USA). Analytická kolona byla temperovaná na 40 °C a průtok kolonou byl konstantně nastaven na 200 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. Nastříkovaný objem vzorku byl 10 μl . Mobilní fáze byla složena z 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí a 5 % roztoku metanolu ve vodě (A) a 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí a 5 % vody v metanolu (B). Použitý gradient mobilní fáze je uveden v Tabulce 1, doba analýzy vzorku byla 10 minut.



Tabulka 1 - Gradient mobilní fáze

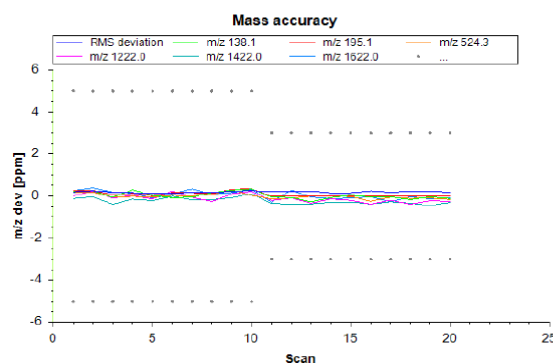
Číslo	Čas (min)	Průtok (μl/min)	A (%)	B (%)
1	0,0	200	90	10
2	0,5	200	90	10
3	5,5	200	45	55
4	8,0	200	0	100
5	8,5	200	90	10
6	10,0	200	0	100

2.5.2 Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci

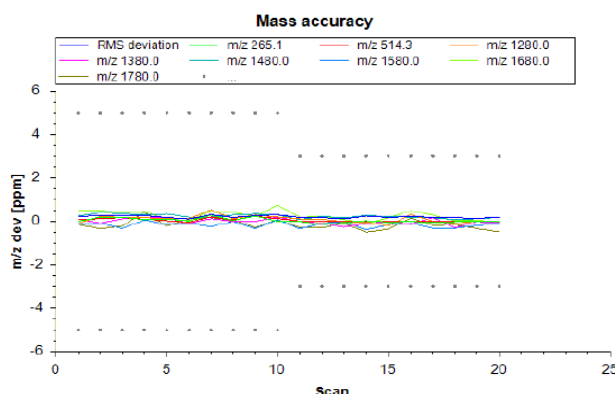
Tandemový hybridní hmotnostní spektrometr typu orbitrap QExactive měří v pozitivním modu s vyhřívaným elektro sprej ionizačním zdrojem (ESI+). Pro cílenou analýzu detektor pracuje v nastaveném modu Paraller Reaction Monitoring (PRM) s vysokým rozlišením, rozlišovací schopnost (Resolving Power, RP) = 17.500 FWHM pro kvantifikaci a 140.000 FWHM pro identifikaci. Nastavení hmotnostního spektrometru je následující: Sheath gas flow rate 10 (unit), Aux gas flow rate 1 (unit), Spray voltage 3.9 (kV), Capillary temp. 320 (°C), Heater temp. 200 (°C), S-lens RF level 50, AGC target 5.e⁶ a Maximal inject time 50 (ms). Externí kalibrace hmotnostního analyzátoru Q-Orbitrap byla prováděna po 48 hodinách pomocí Pierce LTQ ESI kalibračních roztoků (Thermo Fisher Scientific, USA). Celý LC-(HR)MS systém je řízen a naměřená data jsou ukládána a procesována pomocí softwaru Excaliber 3.10, data pro identifikaci jsou vyhodnocována pomocí expertního softwaru Mass Frontier v.7.0.

2.6 Kalibrace hmotnostního spektrometru na přesnou hmotu (mass accuracy)

Kalibrace MS spektrometru na přesnou hmotu byla prováděna externě na základě kalibračních roztoků Positive Ion Calibration Solution a Pierce ESI Negative Ion Calibration Solition. Výsledek externí kalibrace je uveden na následujících obrázcích (Obrázek 2, 3). Povolená chyba měření (správnost) je **≤ 3 ppm** pro použitý hmotnostní spektrometr QExactive. Interní kalibrace byla nastavena na přesnou hmotu aduktů iontu acetonitrilu MW [M+Na]⁺ = 64.01577, MW [M₂+H]⁺ = 83.06037 a probíhala kontinuálně v nastaveném modu mass-lock.



Obrázek 2 – Pozitivní externí kalibrace (Procedure result: rms = 0,20/0,19 ppm)



Obrázek 3 – Negativní externí kalibrace (Procedure result: rms = 0,18/0,25 ppm)

2.7 Standardy analytů pro identifikaci, prokazování a kvantifikaci

U standardů analytů byla změřena hmotnostní spektra MS^1 ve vysokém rozlišení ($RP = 140.000$) a následně charakteristická produktová (fragmentační) spektra MS^2 ($RP = 17.500$). Z naměřených dat byly vypočteny velikosti povolených odchylek od teoretické přesné hmoty (Správnost, Mass accuracy) pro odpovídající ionty prekurzorů a fragmentů (produktových iontů) standardů. Vypočtené odchylky musí pro správnou identifikaci analytu odpovídat kritériu **MA $\leq 5 \Delta$ ppm**. Výsledky měření jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulka 2 a 3) a příklady naměřených hmotnostních spekter jsou uvedeny na následujících obrázcích (Obrázek 4a, b; 5a, b; 6a, b; 7a, b; 8a, b; 9a, b; 10a, b; 11 a, b). Parametry nastavení hmotnostního spektrometru pro získání maximálních intenzit odezev pro standardy byly využity pro nastavení hmotnostního detektoru pro následné měření všech vzorků.

Tabulka 2 – Mass accuracy (správnost) pro prekurzorové ionty standardů (MS^1) v modu Fullscan

Analyt	Elementární formula	Experimentální molekulová hmotnost (m/z)	Teoretická molekulová hmotnost (m/z)	Správnost (Δ ppm)
Amoxicillin	$[C_{16}H_{26}N_3O_8S]^+$	366,11185	366,11182	0,08194
Ciprofloxacin	$[C_{17}H_{19}FN_3O_3]^+$	332,14035	332,14050	-0,46564
Doxycycline	$[C_{22}H_{25}N_2O_8]^+$	445,16043	445,16054	-0,24710
Enrofloxacin	$[C_{19}H_{23}FN_3O_3]^+$	360,17273	360,17180	2,58210
Sulfamethoxazole	$[C_{10}H_{12}N_3O_3S]^+$	254,06010	254,05939	2,79462
Trimethoprim	$[C_{14}H_{19}N_4O_3]^+$	291,14514	291,14517	-0,10304
Amoxicillin - D4	$[C_{16}D_4H_{15}N_3O_5S]^+$	370,13690	370,13693	-0,05403
Enrofloxacin - D5	$[C_{19}D_5H_{18}FN_3O_3]^+$	365,20297	365,20318	-0,57502

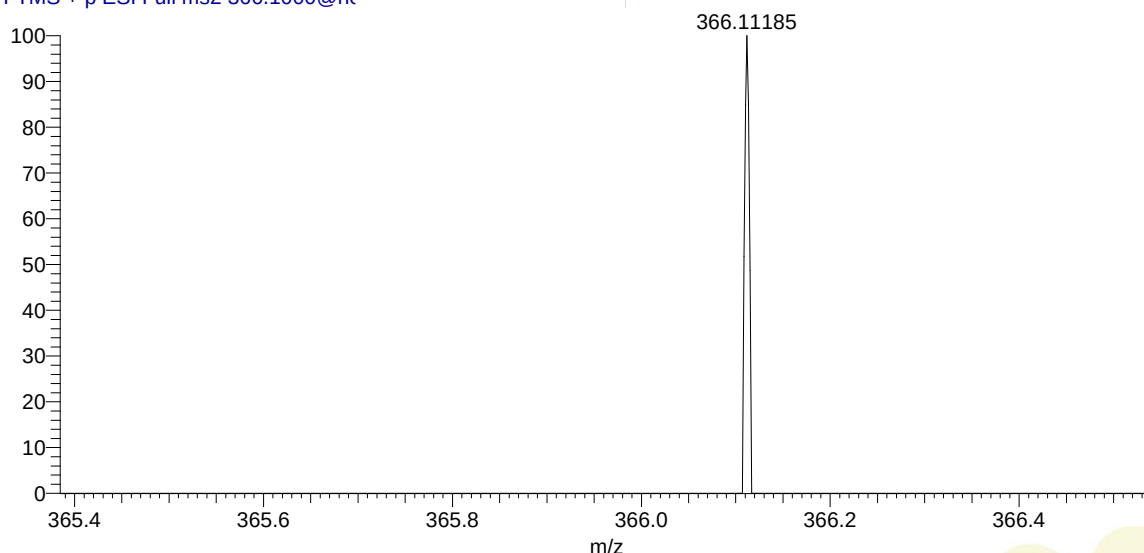
Pozn.: **Správnost (Mass Accuracy)** - relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou m/z a teoreticky vypočtenou m/z iontu vztaženou k teoretické hodnotě m/z ($\cdot 10^6$) vyjádřeno v Δ ppm.



Tabulka 3 – Naměřené prekurzorové a produktové (fragmentační) ionty analytů v modu Targeted-MS² a odpovídající interní standardy (IS) k jednotlivým analytům

Analyt	Prekurzor iont (m/z)	Produkt iont pro kvantifikaci (m/z)	Další produkt iont pro identifikaci (m/z)	IS	Kolizní energie (eV)
Amoxicillin	366,11185	349,08600	208,04298	Amoxicillin - D4	17
Ciprofloxacin	332,14035	231,05659	249,06729	Enrofloxacin - D5	60
Doxycycline	445,16043	428,13428	321,07578	Enrofloxacin - D5	40
Enrofloxacin	360,17273	84,08147	286,09900	Enrofloxacin - D5	60
Sulfamethoxazole	254,06010	92,05028	156,01189	Enrofloxacin - D5	35
Trimethoprim	291,14514	230,11591	261,09787	Enrofloxacin - D5	45
Amoxicillin - D4	370,13690	353,1108	212,06763	-	17
Enrofloxacin - D5	365,20297	89,11281	288,11157	-	60

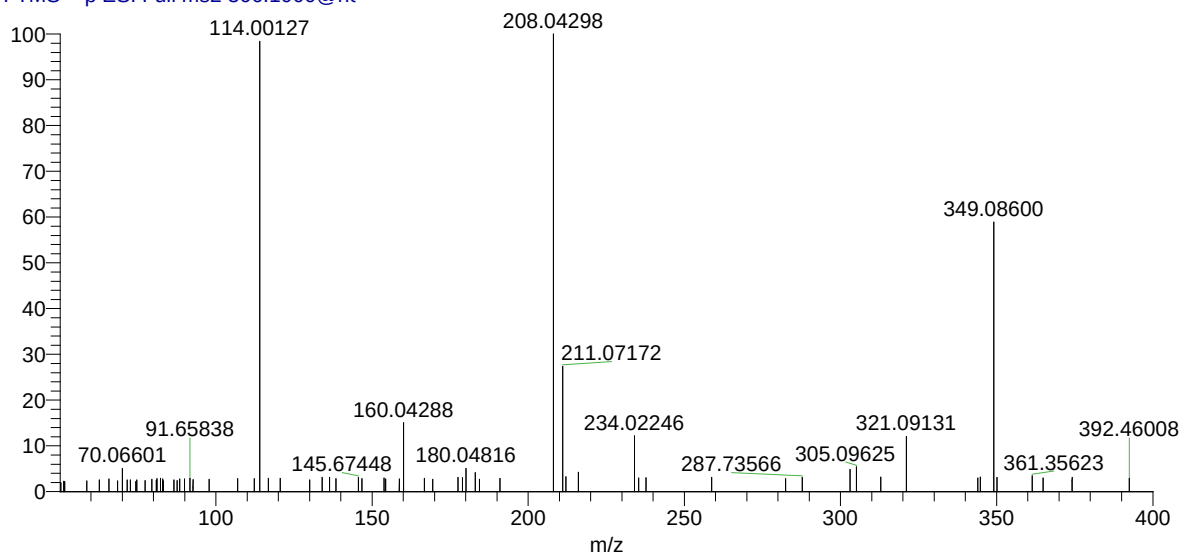
AMX_FullMS_positive_01 #14 RT: 0.06 AV: 1 NL: 2.86E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 366.1000@hc



Obrázek 4a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS¹ pro standard amoxicillin - prekurzorový iont = 366,11185 (m/z)

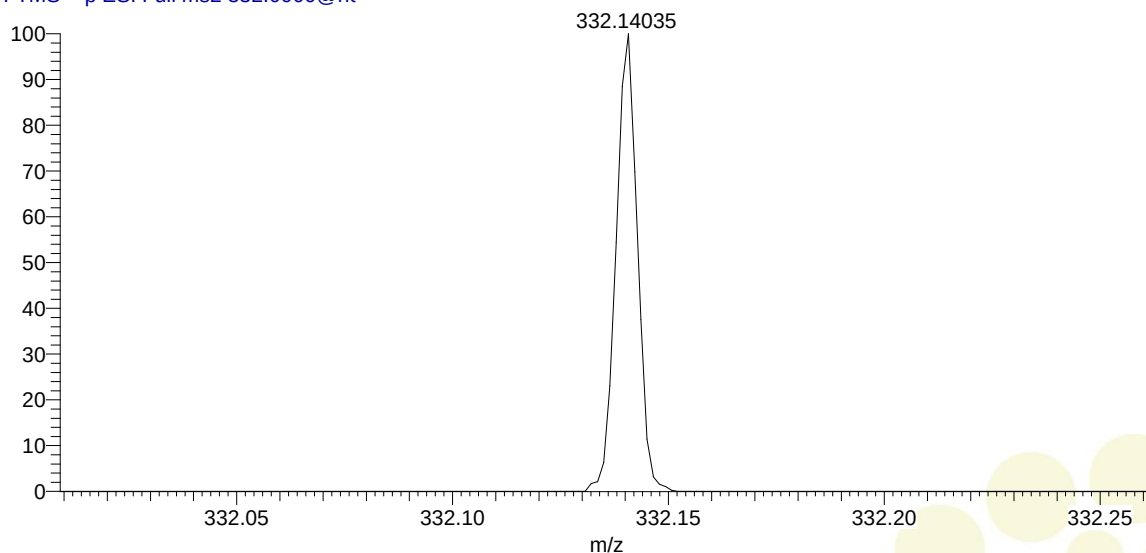


AMX_MSMS_17NCE_positive_01 #11 RT: 0.05 AV: 1 NL: 9.77E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 366.1000@hc



Obrázek 4b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS²) pro standard amoxicillin při 17eV HCD - produktové ionty 349,08600 a 208,04298 (m/z)

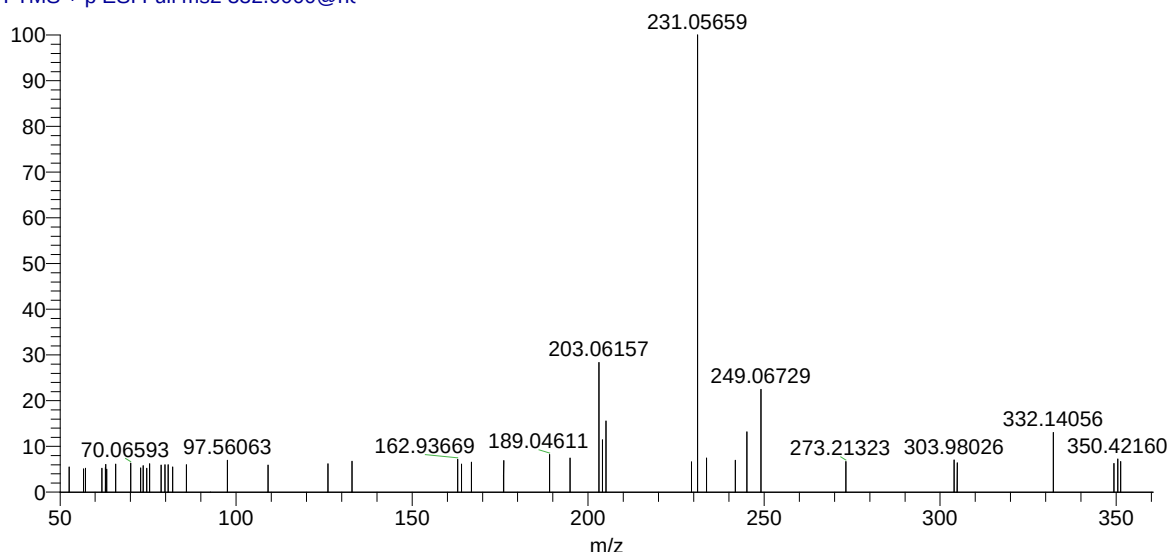
CIP_100ngml_FullMS_positive_01 #32 RT: 0.14 AV: 1 NL: 2.21E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 332.0000@hc



Obrázek 5a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS¹ pro standard ciprofloxacin - prekurzorový iont = 332.14035 (m/z)

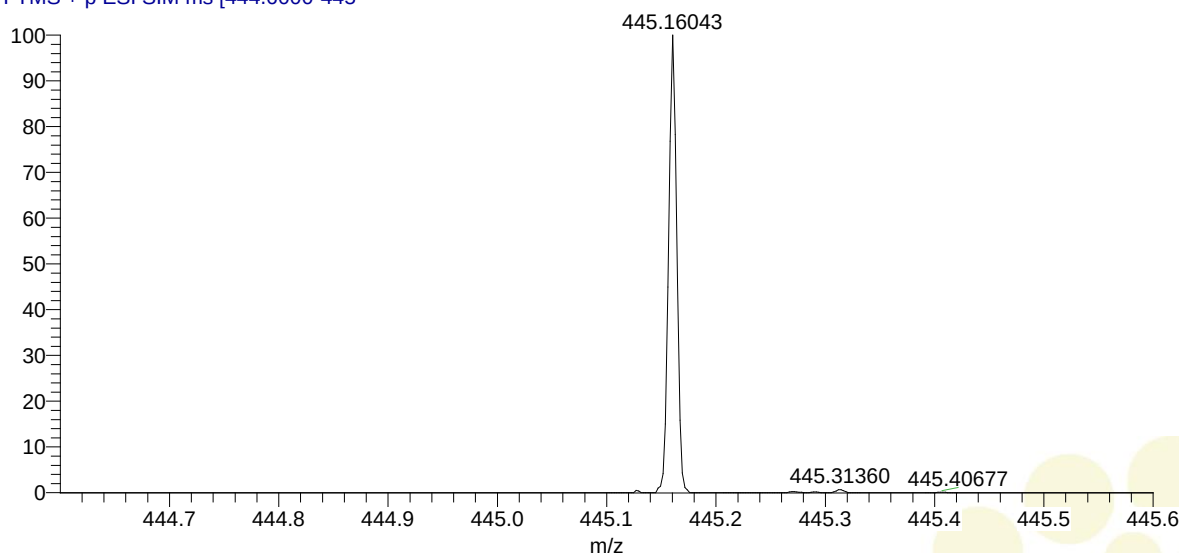


CIP_100ngml_MSMS_60NCE_positive_01 #25 RT: 0.11 AV: 1 NL: 5.92E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 332.0000@hc



Obrázek 5b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard ciprofloxacin při 60eV HCD - produktové ionty 231,05655 a 249,06729 (m/z)

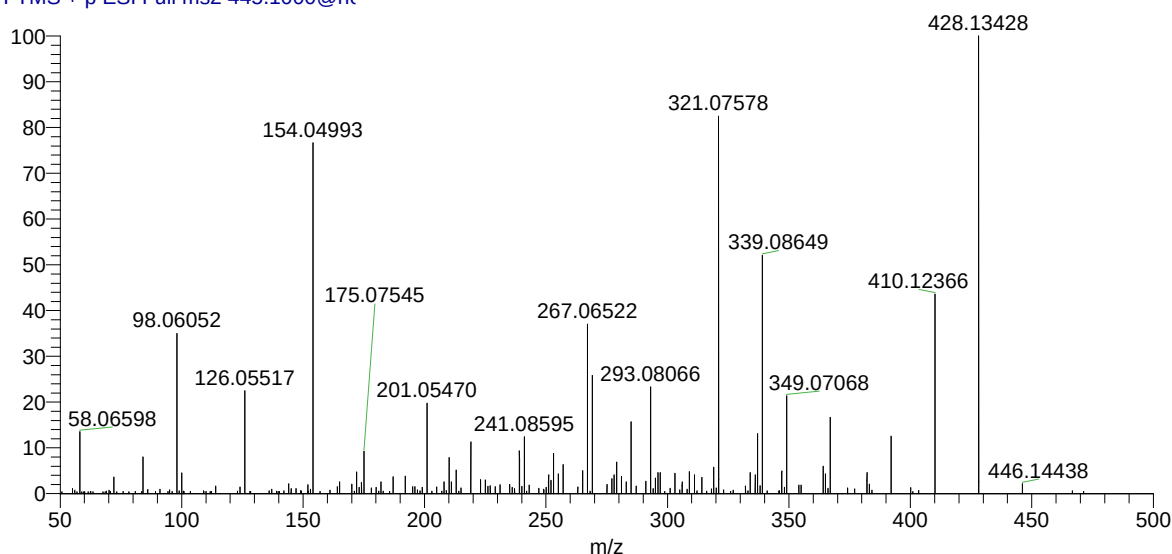
DOX_FullMS_positive_01 #76 RT: 0.34 AV: 1 NL: 3.98E6
T: FTMS + p ESI SIM ms [444.6000-445]



Obrázek 6a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS^1 pro standard doxycycline - prekurzorový iont = 445,16043 (m/z)

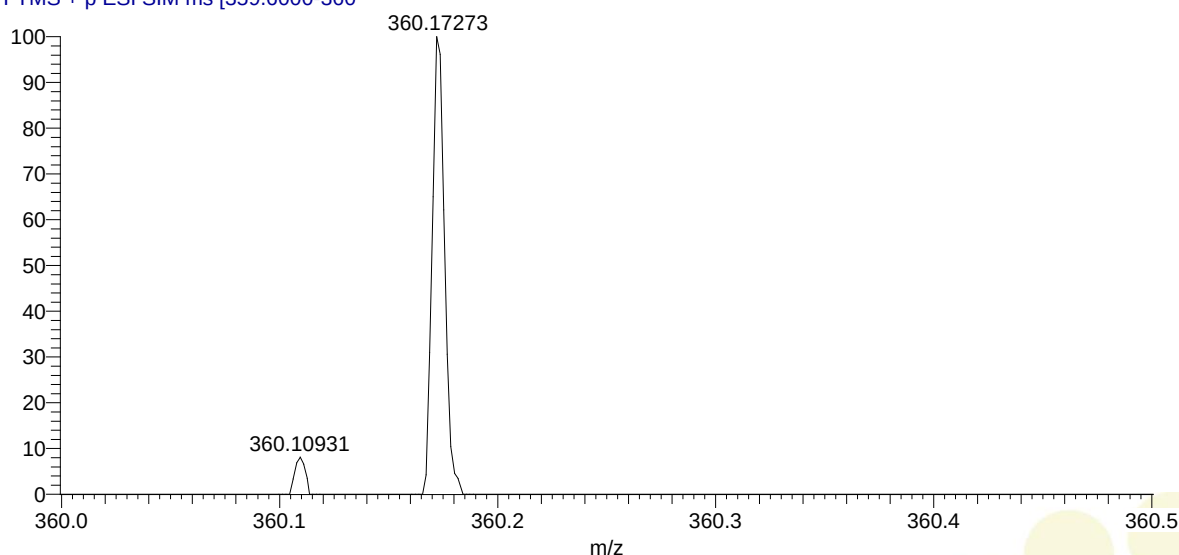


DOX_MSMS_NCE40_positive_01 #26 RT: 0.12 AV: 1 NL: 1.05E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 445.1000@hc



Obrázek 6b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard doxycycline při 40eV HCD - produktové ionty 428,13428 a 321,07578 (m/z)

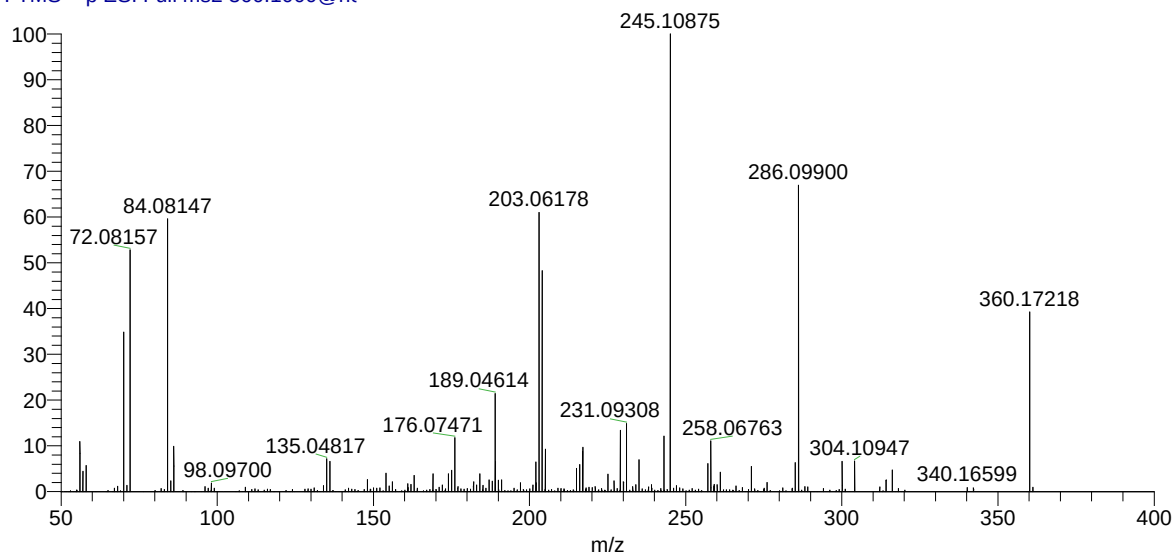
ENR_FullMS_positive_001 #12 RT: 0.05 AV: 1 NL: 2.42E4
T: FTMS + p ESI SIM ms [359.6000-360]



Obrázek 7a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS^1 pro standard enrofloxacin - prekurzorový iont = 360,17273 (m/z)

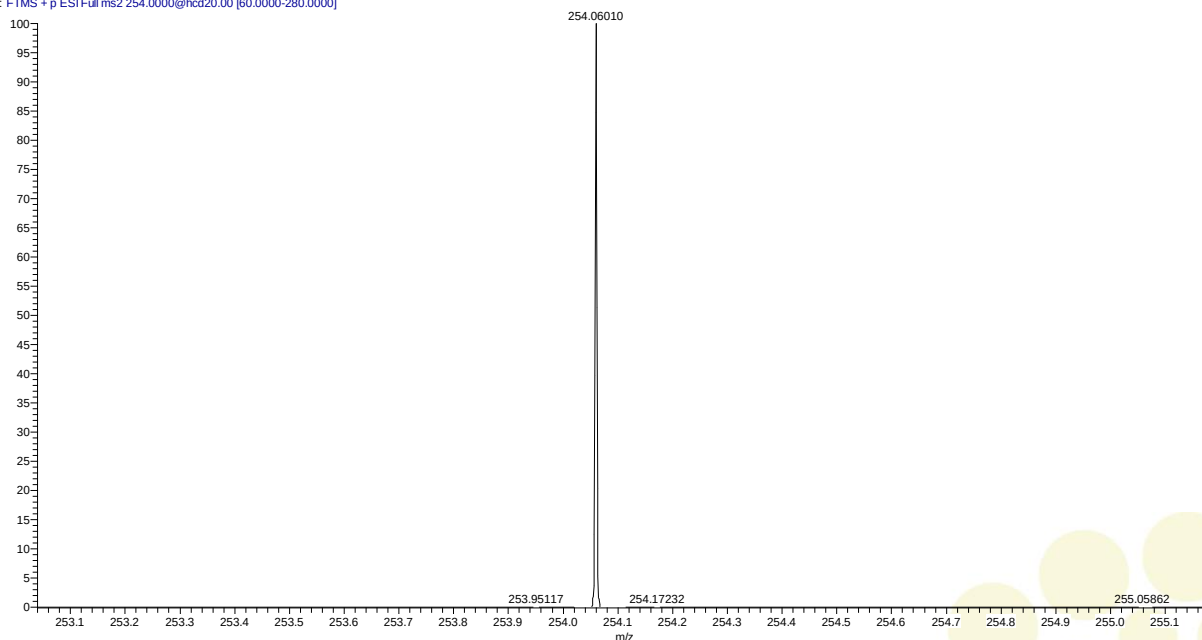


ENR_MSMS_NCE60_positive_01 #18 RT: 0.08 AV: 1 NL: 9.66E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 360.1000@hc



Obrázek 7b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard enrofloxacin při 60eV HCD - produktové ionty 84,08147 a 286,09900 (m/z)

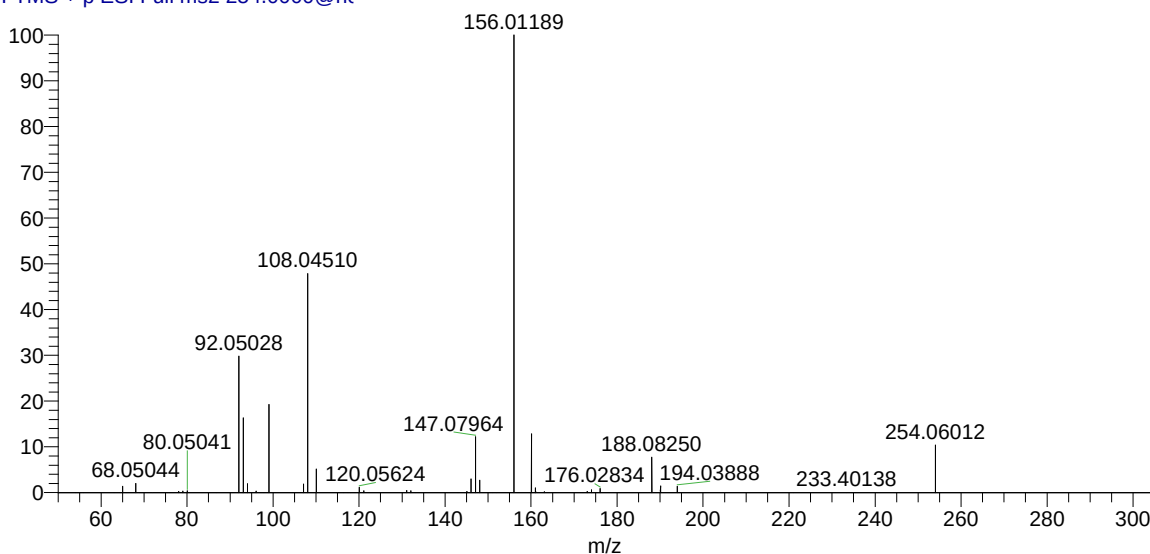
SMX_100ng/ml_FullMS_positive_02 #32 RT: 0.14 AV: 1 NL: 6.24E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 254.0000@hcd20.00 [60.0000-280.0000]



Obrázek 8a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS^1 pro standard sulfamethoxazol - prekurzorový iont = 254,06010 (m/z)

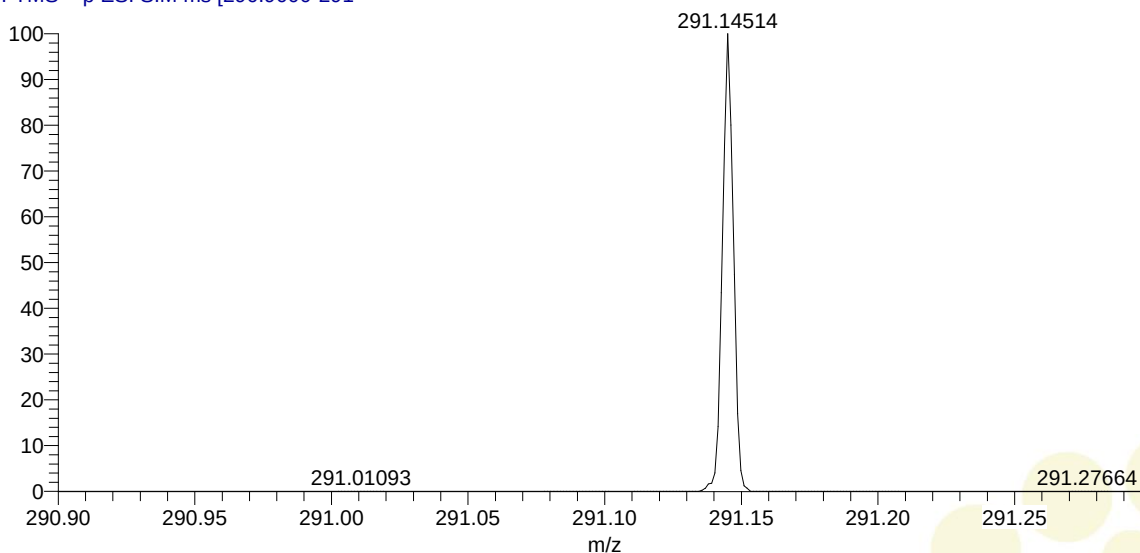


SMX_MSMS_NCE35_positive_01 #16 RT: 0.07 AV: 1 NL: 7.15E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 254.0000@hc



Obrázek 8b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard sulfamethoxazol při 35eV HCD - produktové ionty 92,05028 a 156,01189 (m/z)

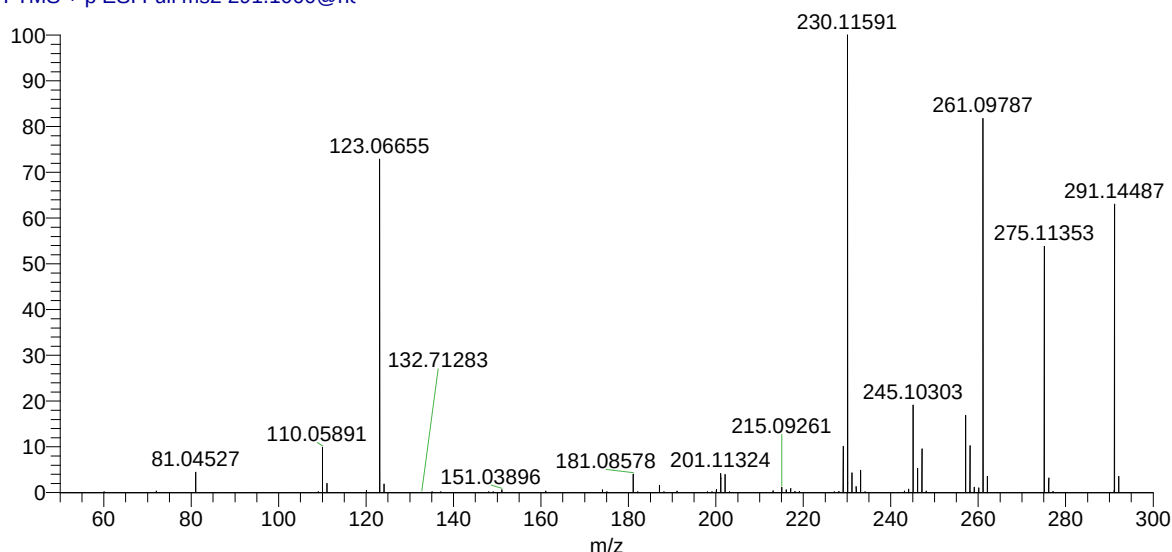
TMP_FullMS_positive_001 #7 RT: 0.03 AV: 1 NL: 2.57E7
T: FTMS + p ESI SIM ms [290.9000-291



Obrázek 9a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS^1 pro standard trimethoprim - prekurzorový iont = 291,14514 (m/z)

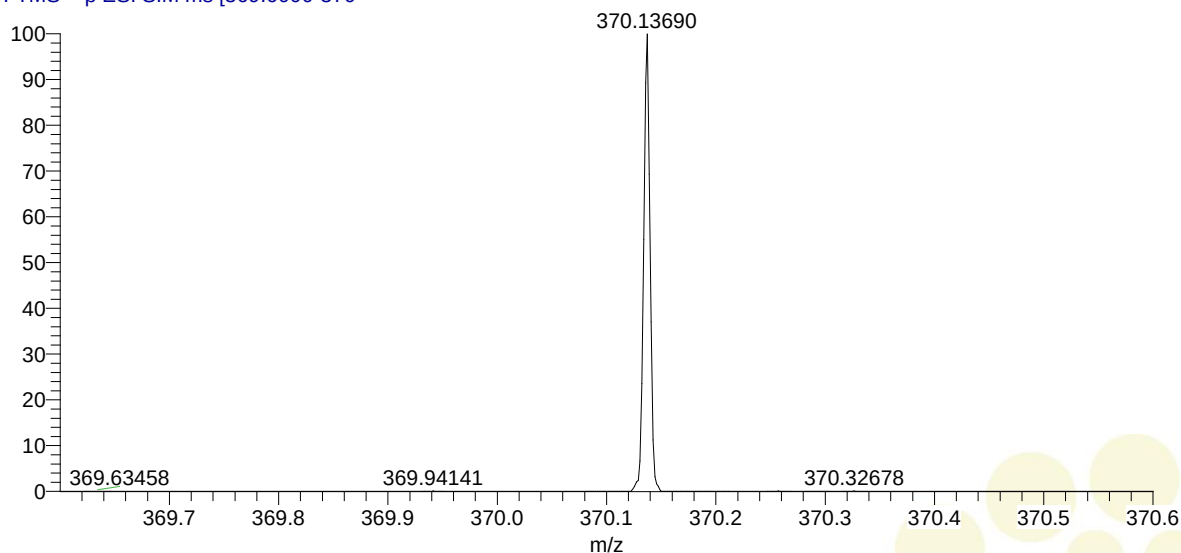


TM_MSMS_NCE45_positive_01 #30 RT: 0.13 AV: 1 NL: 3.75E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 291.1000@hc



Obrázek 9b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard trimethoprim při 45eV HCD - produktové ionty 230,11591 a 261,09787 (m/z)

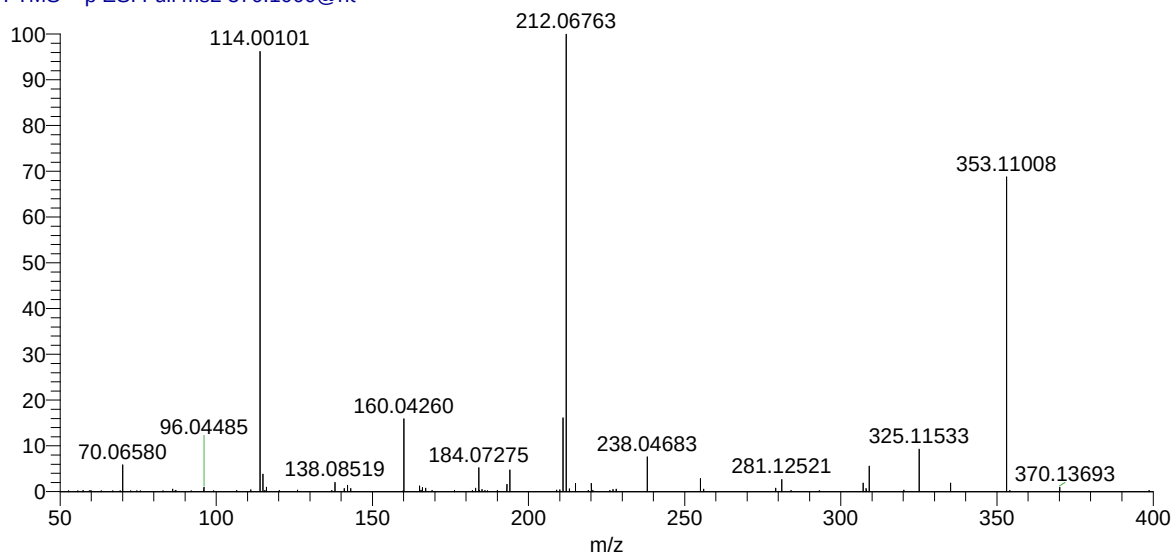
AMX_D4_FullMS_positive_01 #34 RT: 0.15 AV: 1 NL: 1.32E7
T: FTMS + p ESI SIM ms [369.6000-370



Obrázek 10a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS^1 pro standard amoxicillin – D4 (interní standard) - prekurzorový iont = 370,13690 (m/z)

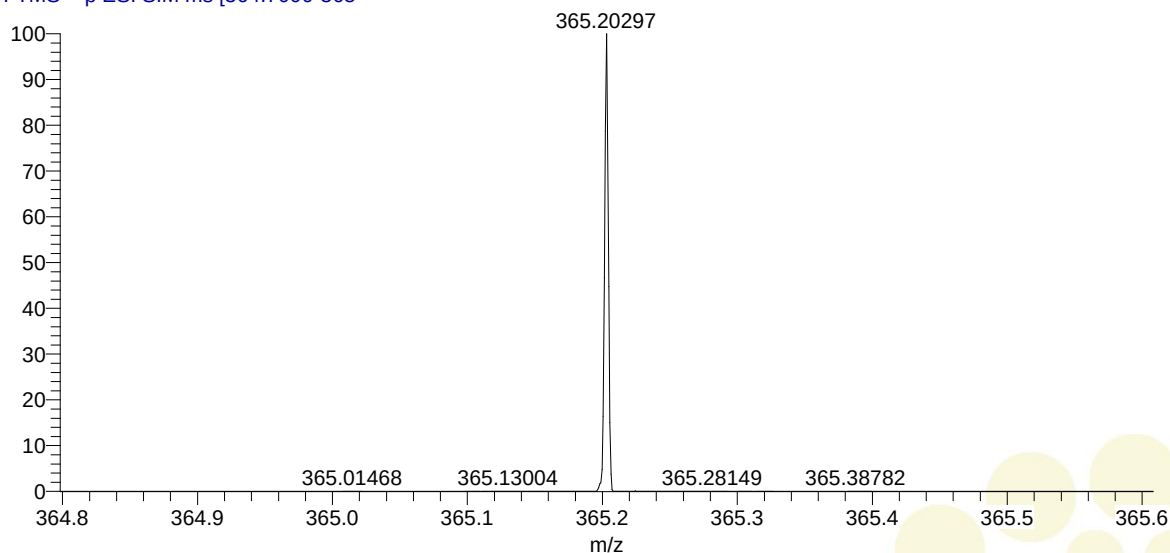


AMX_D4_MSMS_17NCE_positive_01 #40 RT: 0.18 AV: 1 NL: 2.00E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 370.1000@hc



Obrázek 10b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard amoxicillin – D4 (interní standard) při 17eV HCD - produktové ionty 212,06763 a 353,11008 (m/z)

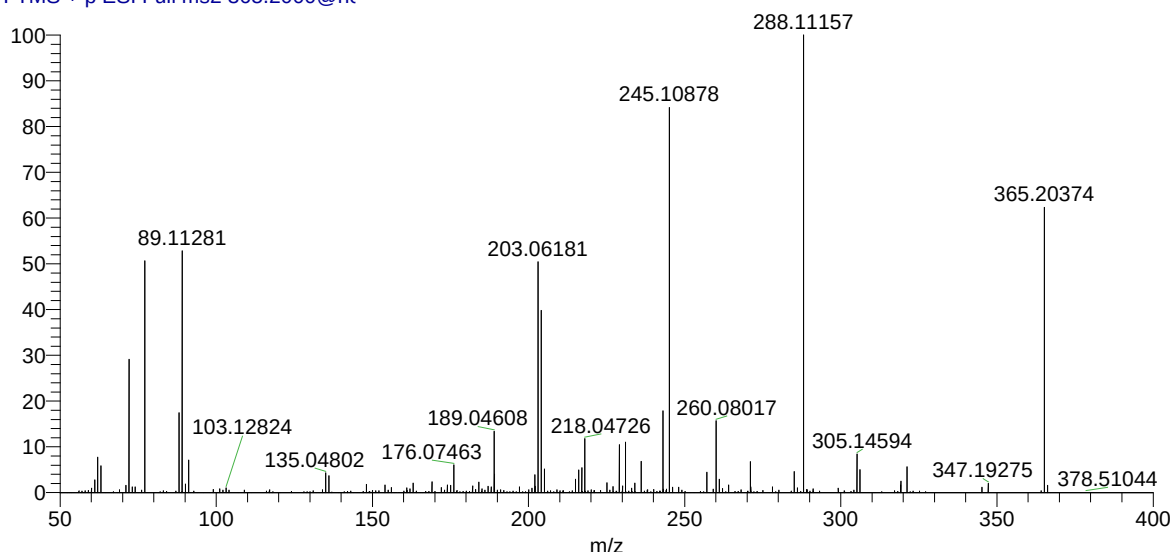
ENR_D5_FullMS_positive_001 #71 RT: 0.63 AV: 1 NL: 5.24E8
T: FTMS + p ESI SIM ms [364.7000-365



Obrázek 11a – Příklad pozitivního (ESI+) hmotnostního spektra MS^1 pro standard enrofloxacin – D5 (interní standard) - prekurzorový iont = 365,20297 (m/z)



ENR_D5_MSMS_NCE60_positive_01 #20 RT: 0.18 AV: 1 NL: 4.74E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 365.2000@hc



Obrázek 11b – Příklad pozitivního (ESI+) produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard enrofloxacin – D5 (interní standard při 45eV HCD - produktové ionty 89,11281 a 288,1157 (m/z))

2.8 Kalibrace a standardizace

Pro kvantifikace byla použita metoda „přídavku interního standardu“, každý vzorek byl fortifikován roztoky obou interních standardů IS ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$ vzorky vody a $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vzorky podestýlky).

2.9 Management kvality výsledků měření

Do každé sekvence na začátek a konec měření byly zařazeny QC vzorky, připravené z matric, u kterých byla dříve prokázána nepřítomnost analytů. QC vzorky byly fortifikovány roztoky standardů stanovených analytů na hladinu koncentrace $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ u vzorků vod a $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ u vzorků podestýlky. Do každého vzorku byly přidány také oba IS. Odezvy monitorovaných vzorků se porovnávají s odezvami kontrolních vzorků (QC).

2.10 Kvantifikace

Při konfirmačním stanovení se kvantifikace „pozitivních“ vzorků provede výpočtem z maticové kalibrační křivky, která byla naměřena s přídavkem interního standardu. Jako nezávisle proměnná X je zvolena koncentrace analytu a závisle proměnná Y je dána poměrem ploch standardu/internímu standardu.



2.11 Určení nejistoty (chyby) výsledků měření

Nejistota měření byla stanovena dle postupu uvedeného v dokumentu GUM:1995 (Pokyn ISO/IEC 98-3) na základě vyhodnocení dat získaných v průběhu validace metody s využitím standardní směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti ($RSD_{v-l \text{ rep.}}$).

2.12 Uvádění výsledků měření

Výsledek je uváděn ve tvaru: $x \pm U$ ($\mu\text{g.l}^{-1}$; $\mu\text{g.kg}^{-1}$)

x naměřená hodnota

U je rozšířená nejistota vypočtená jako $U = 2 * RSD_{v-l \text{ rep.}}$

V případě, že naměřená hodnota je menší než limit detekce LOD, pak se výsledek uvede jako **N.D.** („Nedetkováno“ nebo „Not detected“).



3. Validace metodiky

Validace metody byla provedena na základě dokumentu VICH Topic GL2 - Validation Methodology (1998).

3.1. Popis provedení validace

Pro stanovení parametrů kalibrační křivky (linearita), limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byl použit koncentrační rozsah všech analytů $0,5 - 500 \mu\text{g.l}^{-1}$ pro vodu a $0,5 - 250 \mu\text{g.kg}^{-1}$ v případě podestýlky. Oba dva IS byly použity v koncentraci $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ u vody a $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ u podestýlky. Pro každou koncentrační hladinu byly připraveny 3 vzorky a každý vzorek byl změřen dvakrát. Kalibrační křivky byly změřeny ve 3 různých dnech.

Pro stanovení přesnosti vyjádřené jako RSD (relativní směrodatná odchylka) byla měření opakována s koncentracemi $0,5$ a $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ u vody a $0,5$ a $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ u podestýlky ve 3 měřeních ve 3 různé dny.

Příklady zjištěných reálných koncentrací pro enrofloxacin, ciprofloxacin ve vybraných matricích v drůbežích produkčních halách a v bezprostředním okolí těchto hal po podání registrovaného veterinárního léčivého přípravku s obsahem enrofloxacinu jsou následující:

Uvedené koncentrační hladiny vycházejí z vlastních měření vzorků odebraných v produkčních drůbežářských halách a v jejich bezprostředním souvisejícím okolí a byly porovnány s publikovanými koncentračními hladinami v ČR a EU.

Produkční haly

Koncentrace enrofloxacinu (ENR) a jeho metabolitu ciprofloxacinu (CIP) ve vzorcích odebraných v prostorách produkčních hal před zahájením a po ukončení výkrmového turnusu se pohybovaly v rozmezí od 0 ($< \text{LOD}$) až do 10 ng.ml^{-1} (ng.g^{-1} v podestýlkách). Nejvyšší hodnoty byly opakovaně naměřeny v napájecích vodách v rozmezí $200 - 350 \text{ ng.ml}^{-1}$.

Studie v Polsku v drůbežích farmách, kdy „prokazatelně“ nebyla aplikována hromadná medikace ve vodě, uvádí koncentrace 2 až $1670 \mu\text{g.l}^{-1}$ ENR v napájecích vodách (Gbylik-Sikorska M. et al., 2015). Jediná publikovaná studie z ČR uvádí 20600 ng.g^{-1} , 38800 ng.g^{-1} a 51100 ng.g^{-1} ENR v podestýlce v 1., 3. a 7. dnu hromadné aplikace ENR (Fučík J. et al., 2024).

Životní prostředí v okolí produkčních hal

Koncentrace enrofloxacinu (ENR) a jeho metabolitu ciprofloxacinu (CIP) ve vzorcích odebraných v bezprostředním okolí hal byly nejvyšší v odpadních jímkách, které se pohybovaly v rozmezí $600 - 800 \text{ ng.ml}^{-1}$ pro jednotlivé analyty. Koncentrace v odpadní vodě místní kořenové ČOV byly naměřeny jen pro CIP opakovaně okolo hodnot 430 ng.ml^{-1} , pro analyt ENR byly naměřeny hodnoty koncentrací $< \text{LOD}$.

Studie publikovaná v roce 2016 provedená v Severní Francii; Nord-Pas-de-Calais uvádí naměřené koncentrace $33 \mu\text{g.l}^{-1}$ v řekách a $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ v laguně pro ENR a $162 - 182 \mu\text{g.l}^{-1}$ v řekách a $129 \mu\text{g.l}^{-1}$ v laguně celkových fluorochinolonů (FQ) v životním prostředí souvisejícím z farmovou produkcí drůbežích potravin (Tlili I. et al., 2016).



3.2. Validační parametry

3.2.1 Selektivita/specifita

Použitá analytická metoda měření LC-MS/MS s vysokým rozlišením v módu PRM (MS^2) je vysoce selektivní a nevznikají žádné interference mezi analytem a použitou maticí, viz. chromatogramy cílených analytů a čistých matic (Přílohová část). Selektivita byla prokázána pomocí 6 jednotlivých zdrojů příslušné slepé matrice (napájecí vody a podestýlky z různých hal odebraných v různých termínech), které byly individuálně analyzovány a vyhodnoceny na interferenci.

3.2.2 Linearita

Kromě slepých blank vzorků (zpracovaný vzorek matrice bez analytu a bez IS) a nulových vzorků (zpracovaná matrice pouze s IS) bylo použito šest úrovní kalibrační koncentrace. Každý kalibrační standard byl analyzován v duplikátech. Matricové kalibrační křivky pro napájecí vody a podestýlky byly vyhodnoceny na základě lineární regrese: $Y = a + b \cdot X$. V tabulkách 4 a 5 jsou uvedeny parametry matricových kalibračních křivek změřených pro vodu a podestýlku.

Tabulka 4 - Parametry kalibračních přímek ($Y = a + b \cdot X$) – matrice voda

Analyt	Den kalibrace	a	b	R ²
Amoxicillin	1.	0,0103	0,0067	0,9942
	2.	0,0171	0,0070	0,9914
	3.	- 0,0094	0,0083	0,9953
Ciprofloxacin	1.	0,0039	0,0022	0,9910
	2.	0,0035	0,0021	0,9913
	3.	-0,0023	0,0003	0,9904
Enrofloxacin	1.	- 0,0028	0,0007	0,9935
	2.	0,0002	0,0007	0,9914
	3.	-0,0003	0,0004	0,9960
Sulfamethoxazole	1.	0,0383	0,0068	0,9903
	2.	0,0302	0,0073	0,9954
	3.	-0,0070	0,0023	0,9944
Trimethoprim	1.	0,0202	0,0068	0,993
	2.	0,0050	0,0042	0,9983
	3.	0,0277	0,0041	0,9913



Tabulka 5 - Parametry kalibračních přímk (Y= a + b·X) – matrice podestýlka

Analyt	Den kalibrace	a	b	R ²
Amoxicillin	1.	-0,00005	0,0008	0,9948
	2.	-0,0007	0,0008	0,9937
	3.	0,0018	0,0011	0,9951
Ciprofloxacin	1.	-0,0114	0,0118	0,9995
	2.	0,0177	0,0073	0,9933
	3.	0,0227	0,0098	0,9952
Enrofloxacin	1.	0,0246	0,0045	0,9951
	2.	0,0322	0,0044	0,9923
	3.	0,0176	0,0034	0,9934
Sulfamethoxazole	1.	0,2406	0,0361	0,9902
	2.	0,1980	0,0420	0,9930
	3.	0,2475	0,0504	0,9954
Trimethoprim	1.	0,4291	0,0755	0,9921
	2.	0,4182	0,0764	0,9928
	3.	0,5852	0,0828	0,9903

3.2.3 Rozsah

Metoda je lineární v koncentračním rozsahu 0,5 µg.l⁻¹ – 500 µg.l⁻¹ ve vzorcích napájecí a odpadní vody a v koncentračním rozsahu 0,5 µg.kg⁻¹ – 250 µg.kg⁻¹ ve vzorcích stájové podestýlky.

3.2.4 Správnost

Z důvodu použití izotopicky značeného vnitřního standardu (IS) a matricové kalibrační křivky nebyla správnost stanovena (např. formou výtěžnosti). Správnost byla posouzena a kontrolována v průběhu validací pomocí vzorků obohacených známým množstvím analytu, vzorků pro kontrolu kvality (vzorky QC). Vzorky QC byly obohaceny nezávisle na kalibračních standardech za použití samostatně připravených zásobních roztoků. Vzorky QC zařazených do sekvencí (na začátku a na konci při validaci kalibračních křivek) se analyzovaly proti kalibrační křivce a získané koncentrace byly porovnány s nominální hodnotou. Vyhodnocený rozdíl byl u všech změřených QC vzorků menší než 15 % nominální hodnoty.



3.2.5 Přesnost (Precision)

Přesnost metody byla stanovena provedením opakovatelnosti (Tabulka 6 a 7) a mezilehlé přesnosti (Intermediate precision nebo taky vnitro-laboratorní reprodukovatelnost) v tabulkách 8 a 9.

Opakovatelnost

Tabulka 6 – Opakovatelnost - matrice voda

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)
Amoxicillin	0,5	1.	8,40	2.	11,90	3.	9,85
	100	1.	6,70	2.	4,95	3.	2,54
Ciprofloxacin	0,5	1.	13,30	2.	12,55	3.	10,54
	100	1.	2,31	2.	1,89	3.	1,52
Enrofloxacin	0,5	1.	8,41	2.	8,20	3.	6,91
	100	1.	3,89	2.	2,13	3.	3,51
Sulfamethoxazole	0,5	1.	2,57	2.	3,42	3.	2,92
	100	1.	5,04	2.	4,84	3.	3,22
Trimethoprim	0,5	1.	3,16	2.	2,43	3.	3,93
	100	1.	5,46	2.	2,73	3.	3,29

Tabulka 7 – Opakovatelnost - matrice podestýlka

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)
Amoxicillin	0,5	1.	10,97	2.	9,60	3.	9,87
	100	1.	2,44	2.	3,94	3.	1,63
Ciprofloxacin	0,5	1.	2,58	2.	3,10	3.	3,11
	100	1.	2,89	2.	2,27	3.	2,37
Enrofloxacin	0,5	1.	6,88	2.	7,07	3.	6,26
	100	1.	3,86	2.	4,86	3.	3,68
Sulfamethoxazole	0,5	1.	6,64	2.	9,74	3.	10,35
	100	1.	2,21	2.	2,61	3.	2,20
Trimethoprim	0,5	1.	4,81	2.	5,74	3.	5,16
	100	1.	5,18	2.	3,73	3.	3,35

Mezilehlá přesnost (Intermediate precision)



Mezilehlá přesnost byla vyjádřena jako vnitro-laboratorní reprodukovatelnost, měřená ve třech nezávislých časech.

Tabulka 8 – Mezilehlá přesnost - matrice voda

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	RSD _{v-l rep.} (%)
		Voda
Amoxicillin	0,5	10,05
	100	2,54
Ciprofloxacin	0,5	12,13
	100	1,52
Enrofloxacin	0,5	7,84
	100	3,51
Sulfamethoxazole	0,5	2,97
	100	3,22
Trimethoprim	0,5	3,17
	100	3,29

Tabulka 9 – Mezilehlá přesnost - matrice podestýlka

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	RSD _{v-l rep.} (%)
		Podestýlka
Amoxicillin	0,5	10,15
	100	2,67
Ciprofloxacin	0,5	2,93
	100	2,51
Enrofloxacin	0,5	6,74
	100	4,13
Sulfamethoxazole	0,5	8,91
	100	2,34
Trimethoprim	0,5	5,24
	100	4,09

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost nebyla zatím posouzena pomocí mezilaboratorního hodnocení.



3.2.6 Limit detekce a limit kvantifikace

Hodnoty LOD a LOQ byly stanoveny na základě matricové kalibrační křivky, metodou založenou na směrodatné odchylce signálu a směrnici kalibrační křivky.

Tabulka 10 – LOD a LOQ - matrice voda

Analyt	LOD ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
Amoxicillin	4,50	6,71
Ciprofloxacin	2,10	4,17
Enrofloxacin	1,98	3,93
Sulfamethoxazole	4,16	8,23
Trimethoprim	3,54	7,01

Tabulka 11 – LOD a LOQ - matrice podestýlka

Analyt	LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Amoxicillin	5,08	7,58
Ciprofloxacin	2,77	5,51
Enrofloxacin	1,62	3,22
Sulfamethoxazole	5,45	8,11
Trimethoprim	4,63	9,15

Pozn.: Hodnoty LOD a LOQ byly stanoveny metodou založenou na směrodatné odchylce signálu a směrnici kalibrační křivky dle směrnice VICH GL 2 a dle Přílohy 2 směrnice VICH GL49.

3.2.7 Robustnost

Nebyla stanovena.

3.2.8 Stabilita

Stabilita pro roztoky analytů: základní roztok: 12 měsíců při -20°C .

pracovní roztok: 4 týdny při 4°C .

Stabilita pro analyty v připraveném vzorku: maximálně 5 dnů při 4°C a

24 hod při běžné laboratorní teplotě



3.2.9 Nejistota měření

Postup stanovení rozšířené nejistoty měření byl stanoven dle dokumentu GUM:1995 (Pokyn ISO/IEC 98-3) (7). Rozšířená nejistota byla vypočtena jako $U = k \cdot RSD_{v-l \text{ rep}}$, kde koeficient rozšíření $k = 2$ což odpovídá přibližně 95% odhadu intervalu spolehlivosti pro normální rozdělení.

Tabulka 12 – Nejistota měření - matrice voda

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	U (%) Voda
Amoxicillin	0,5	20,10
	100	5,08
Ciprofloxacin	0,5	24,26
	100	3,04
Enrofloxacin	0,5	15,68
	100	7,02
Sulfamethoxazole	0,5	5,94
	100	6,44
Trimethoprim	0,5	6,34
	100	6,58

Tabulka 13 – Nejistota měření - matrice podestýlka

Analyt	Konc. hladina ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	U (%) Podestýlka
Amoxicillin	0,5	20,30
	100	5,34
Ciprofloxacin	0,5	5,86
	100	5,02
Enrofloxacin	0,5	13,48
	100	8,26
Sulfamethoxazole	0,5	17,82
	100	4,68
Trimethoprim	0,5	10,48
	100	8,18



3.3. Závěr validace

Validace analytické metody číslo **CM 150/2024** Identifikace a kvantitativní stanovení vybraných antimikrobik metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v prostředí drůbežích chovů (a jejich souvisejícím životním prostředím) potvrdila, že všechny dosažené validační parametry vyhovují koncentračním hladinám nálezů v reálných vzorcích odebíraných v produkčních halách a okolí drůbežích farem. Validace této metody byla provedena v předepsaném rozsahu dle doporučení EU směrnice VICH GL2 pro tyto analyty, těchto neužívanějších antimikrobik: enrofloxacin, ciprofloxacin, sulfamethoxazol, trimethoprim, amoxicillin a doxycyklin v matricích napájecí voda, odpadní voda a v podestýlkách v drůbežích chovech.

Metodika č. CM 150/2024 byla vyvinuta a optimalizována zejména pro monitoring residuí veterinárních antimikrobik nejčastěji používaných v drůbežích farmách v jejich prostředí a jejich souvisejícím bezprostředním okolí, zejména pak pro materiálové bilance zatížení životního prostředí chovy drůbeže. Pro bilanční výpočty zatížení životního prostředí antimikrobiky je stěžejní monitorovat napájecí, odpadní vody a podestýlky, pro tyto matrice byla metodika validována. V případě potřeby monitorovat i historii prostředí, je nutno vzorkovat i prachové usazeniny pomocí stěrů.



III. Srovnání „novosti postupů“

Byla vyvinutá, optimalizovaná a validovaná nová metodika pro identifikace, monitorování a kvantitativní stanovení residuí vybraných antimikrobik (případně jejich metabolitů) v prostředí drůbežích produkčních chovů instrumentální metodou na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)). Vyvinutá analytická metodika je orientována na antimikrobika veterinárních léčivých přípravků registrovaných pro drůbež určenou k produkci masa. Novost postupu je primárně ve výběru a postupech odběru vzorků z prostředí chovů drůbeže a souvisejícího životního prostředí. Dnes existuje velké množství různých odborných publikací o měření residuí v životním prostředí, jen minimum publikací však řeší přímou souvislost vztahu používání veterinárních antimikrobik, ale obecně i všech léčiv, v drůbežích chovech a odpovídajícího zatížení životního prostředí. Tato nová metodika je vyvinuta jako účinný nástroj pro monitoring zatížení životního prostředí v souvislosti s nejčastěji používanými veterinárními antimikrobiky v chovech drůbežích farem.

Rovněž navržené použití tandemového hybridního hmotnostního analyzátoru s vysokým rozlišením pro jednoznačnou identifikaci výše uvedených analytů antimikrobik a monitorování s využitím kritéria Mass Accuracy (MA), není ještě úplně běžné řešení v praxi.

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Certifikovaná metodika slouží především pro potřeby drůbežích chovů v oblasti monitoringu a mapování zátěží životního prostředí residui těchto veterinárních léčiv pocházejících z produkčních chovů drůbeže v rámci udržitelného zemědělství. Metodika může být využita rovněž pro úřední kontrolu účelného a optimálního užívání antimikrobik v produkčních chovech drůbeže na farmách. Tato nová metodika, díky vysoké citlivosti a jednoznačné identifikaci analyzovaných analytů může být použita, jako účinný nástroj ve všech situacích, kdy bude požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí, zda byly nebo nebyly při výkrmu drůbeže používány veterinární antimikrobika. Dále, tato metodika může být efektivně využita ke kvantitativnímu stanovení použití antimikrobik pro látkové bilance a výpočty odpovídajícího způsobeného zatížení životního prostředí v souvislosti s budoucí povinností podnikatelů sestavovat ESG reporty (Environmental, Social, and Governance reporting, v rámci „Zelené dohody pro Evropu“ Green deal).

V. Ekonomické aspekty



1. Náklady na zavedení metodiky do laboratoře

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře je možné rozdělit do dvou kategorií. V první kategorii jsou náklady nezbytné na pořízení spotřebního materiálu, standardů a chemikálií na přípravu vzorků a měření na LC-MS/MS. Další náklady souvisí s nákupem drobného hmotného majetku, který je nutný pro provádění metody (pipety, centrifuga, vortexy, odparky apod.). Náklady na analytické zařízení LC-MS/MS nejsou uváděny, neboť se předpokládá, že laboratoř využívající metodiku LC-MS je již tímto zařízením vybavena.

Náklady na vyšetření jednoho vzorku a vybavení specializované laboratoře jsou uvedeny v následujících tabulkách. Všechny ceny jsou aktuální k datu vydání metodiky a zahrnují DPH.

Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metodiky.

Položka	Obvyklá cena
Pipety 3 ks	25 000 Kč
Centrifuga	150 000 Kč
Thermovap	75 000 Kč
Vortex	10 000 Kč
Minifold s vakuovou pumpou	55 000 Kč
Celkem	315 000 Kč

Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku podle uvedené metodiky. Kalkulace zahrnuje i průměrné náklady na pozitivní a negativní kontroly na analytické standardy a IS. Kalkulace nezahrnuje náklady na mzdy odborných pracovníků (středoškolský a vysokoškolský pracovník) a náklady na amortizaci použitého analytického zařízení. Tyto náklady mohou být rozhodující pro celkové stanovení ceny za provedení analýzy jednoho vzorku.

Položka	Obvyklá cena
Extrakce vzorku	150 Kč
Interní standard	350 Kč
Standardy analytů	390 Kč
Spotřební materiál (špičky, zkumavky, rukavice a desinfekce)	110 Kč
Celkem	1000 Kč



2. Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomické přínosy pro uživatele lze rovněž rozdělit do dvou kategorií: přínosy pro uživatele vyvinuté metodiky z pohledu laboratoře, která bude tuto metodiku provádět, a pak přínosy z pohledu uživatele, tedy vlastního zákazníka v roli objednavatele (např. ÚKZÚZ, SVS, soukromí chovatelé drůbeže, atd.).

Ekonomické přínosy pro laboratoř, kde bude metodika zavedena:

- při běžné ceně 4.500,- až 7.500,- Kč za jednu analýzu biologických vzorků pomocí systémů LC-MS/MS (vysoké náklady na analytické zařízení, odpisy a mzdy vysoce kvalifikovaných pracovníků) se přínosy dají vyčíslit jednoduchým vynásobením počtem vzorků zpracovaných v laboratoři za určité časové období, například za 100 analyzovaných vzorků za rok by to byl přínos 450 tis. Kč,
- obecně ale platí, že ceny se tvoří „dohodou“ a v tomto případě platí, že cena za jednu analýzu se významně sníží, pokud bude objednávka smluvená na více vzorků, například cena pro významného zákazníka může být stanovena na 3.000,- Kč při zakázce 100 vzorků ročně, pak ekonomický přínos bude 300 tisíc za rok.

Budoucí ekonomické přínosy pro objednavatele:

- V současném čase se nedají ekonomické přínosy přesněji vyčíslit, protože metodika byla vyvinutá prioritně pro monitoring prostředí drůbežích farem a sestavování tzv. ESG reportů, které budou v krátké budoucnosti pro střední a velké chovatele povinností danou legislativou EU.
- Zavedení monitoringu reziduí antimikrobik v prostředí drůbeží farmy a vypracování ESG reportů ovlivní pozitivně v krátkém časové periodě možnosti získání výhodnějších podmínek pro provozní úvěry v bankách, lepší ekonomické podmínky pro pojištění, protože banky a pojišťovny již mají ESG reportování zavedeno a budou ho požadovat i po svých zákaznících.
- Tlak spotřebitelů na ekologické chovy: V případě deklarace chovu drůbeže „bez antimikrobik“, kdy tato deklarace bude objektivně podložena analytickým monitoringem residuí, bude uplatnění vyprodukovaného drůbežího masa u spotřebitelů ekonomicky významně zajímavější.

VI. Seznam použité literatury



1. VICH Topic GL2 (Validation Methodology): Guideline on validation of analytical procedures: Methodology. 1998 (CVMP/VICH/591/98-FINAL).
2. Guide for the expression of uncertainty in measurement. ISO Geneva 1993. (Reprinted 1995: Reissued as ISO Guide 98-3 (2008)). Český překlad: TNI 01 4109-3 Nejistoty měření - Část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995) a Pokyn ISO/IEC 98-3:2008 Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement.
3. VICH GL49 (EMA/CVMP/VICH/463202/2009) - Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion.
4. Mhuka V., Dube S., Nindi M. M.: Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in wastewater and receiving waters in South Africa using LC-Orbitrap™ MS. Emerging Contaminants 6 (2020) 250 - 258.
5. Huang W., Qui Q., Chen M., Shi J., Huang X., Kong Q., Long D., Chen Z., Yan S.: Determination of 18 antibiotics in urine using LC-QqQ-MS/MS. Journal of Chromatography B 1105 (2019) 176 - 183.
6. Gajd A., Nowacka-Kozak E., Gbylik-Sikorska M., Posyniak A.: Multi-residues UHPLC–MS/MS analysis of 53 antibacterial compounds in poultry feathers as an analytical tool in food safety assurance. Journal of Chromatography B 1104 (2019) 182 – 189.
7. Konak U. I., Certel M., Sik B., Tongur T.: Development of an analysis method for determination of sulfonamides and their five acetylated metabolites in baby foods by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (Orbitrap-MS). Journal of Chromatography B 1057 (2017) 81 - 91.
8. Cepurnieks G., Rjabova J., Zacs D., Bartkevics V.: The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole – Orbitrap mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 102 (2015) 184-192.
9. Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Sniegocki T., Zmudzki J.: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water supply systems in food-producing animal farms, Chemosphere 119 (2015) 8-15.
10. Fučík J., Amrichová A., Brabcová K., Karpíšková R., Kolářková I., Pokludová L., Poláková Š., Mravcová L.: Fate of fluoroquinolones in field soil environment after incorporation of poultry litter from a farm with enrofloxacin administration via drinking water. Environ Sci Pollut Res Int. 31:13 (2024) 20017-20032.
11. Tlili I., Caria G., Ouddane B., Ghorbel-Abid I., Ternane R., Trabelsi-Ayadi M., Net S.: Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application. Sci Total Envir 563-564 (2016) 424-433.



VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Metodika byla v rámci řešení projektu č. QK22020066 publikována v odborném časopise Veterinářství 10/2024.

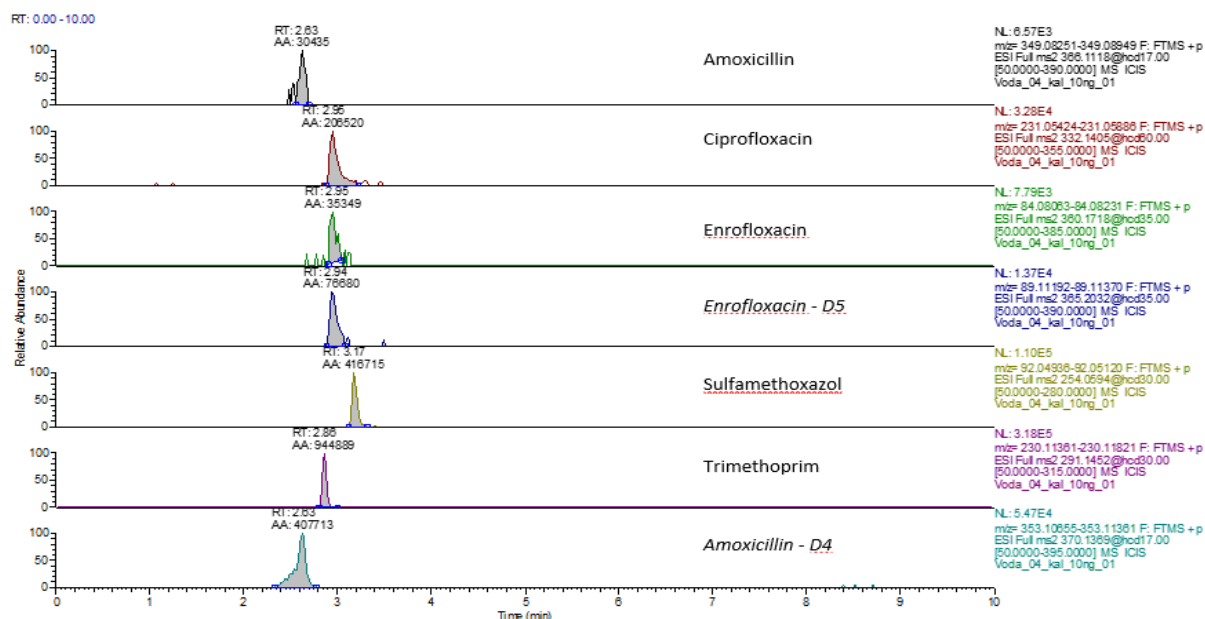
Metodika byla rovněž v rámci řešení projektu č. QK22020066 presentována odborné veřejnosti formou přednášky na VÚVeL Academy - Mikrobiom drůbeže v souvislostech dne 31. 10. 2024.

Putcova K., Nedbalcova K., Bartejsova I., Zouharova M., Matiaskova K., Stastny K.: Mass spectrometric identification and quantification of the antibiotic clavulanic acid in broiler chicken plasma and meat as a necessary analytical tool in finding ways to increase the effectiveness of currently used antibiotics in the treatment of broiler chickens. Analytical and Bioanalytical Chemistry 413:13 (2021) 3561-3571.

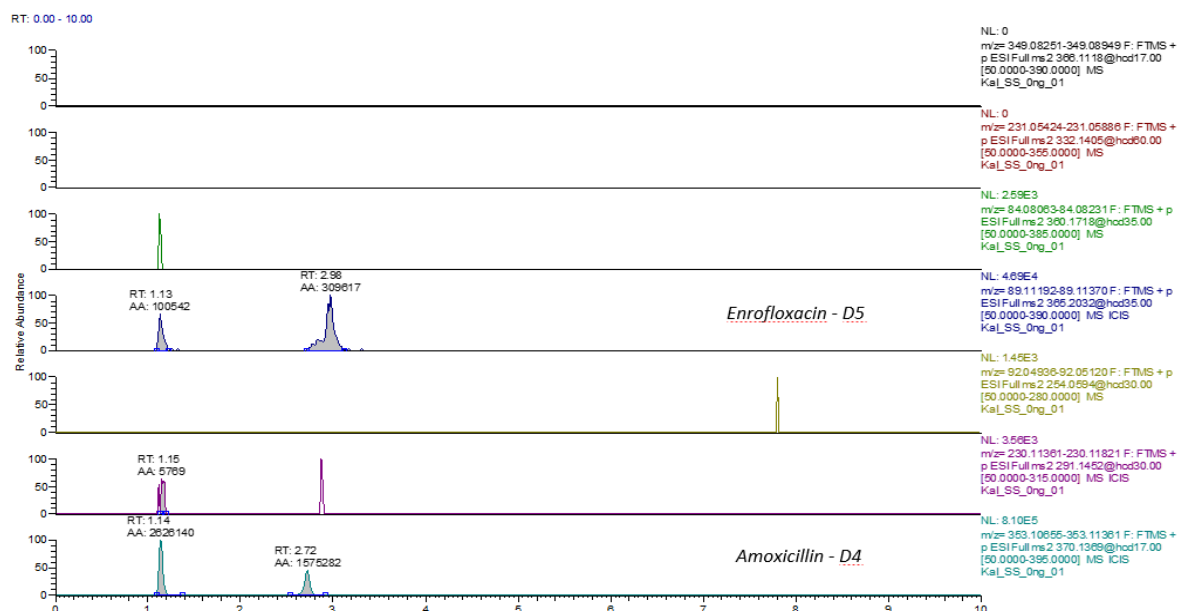
Putcova K., Nedbalcova K., Bartejsova I., Zouharova M., Matiaskova K., Jeklova E., Viskova M., Zouzelkova P., Stastny K.: The experimental determination of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of trimethoprim and sulfamethoxazole combination in blood serum of broiler chickens. Veterinární Medicína 66:6 (2021) 248-256.

Stastny K., Hodkovicova N., Jerabek M., Petren M., Viskova M., Papouskova, A., Bartejsova, I. Putcova-Tosnerova K., Charvatova M., Zouharova M. et al.: Dosage Optimisation of Trimethoprim and Sulfamethoxazole for the Treatment of an Avian Pathogenic Strain of Escherichia coli in Broiler Chickens. Antibiotics 13:1 (2024).

Přílohová část



Obrázek 12 – Chromatogram pozitivního (ESI+) vzorku s obsahem 10 µg.l⁻¹: amoxicillinu (RT = 2,63), ciprofloxacinu (RT = 2,96), enrofloxacinu (RT = 2,95), sulfamethoxazolu (RT = 3,17) a trimethoprimu (RT = 2,85); a s obsahem IS o koncentraci 1 µg.l⁻¹: enrofloxacinu – D5 (RT = 2,94) a amoxicillinu – D4 (RT = 2,63).



Obrázek 13 – Chromatogram negativního (ESI+) vzorku s obsahem pouze IS o koncentraci 1 µg.l⁻¹: enrofloxacinu – D5 (RT = 2,98) a amoxicillinu – D4 (RT = 2,72).



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz