

Farmakopejske in sodobne analizne metode za proučevanje antibiotikov in njihovih zaostankov v bioloških vzorcih

Pharmacopeial and modern analytical methods for investigation of antibiotics and their residues in biological samples

Sabina Devjak Novak

Povzetek: Evropska in Ameriška farmakopeja v svojih monografijah za antibiotike predpisujeta relativno preproste analizne metode, ki pa ne morejo zadostiti ostrim kriterijem regulatornih organov glede prisotnosti antibiotikov in njihovih zaostankov, predvsem v živilih živalskega izvora. Zato se številni znanstveniki in znanstvene skupine v zadnjem desetletju intenzivno ukvarjajo z razvojem in proučevanjem analiznih tehnik, ki bi omogočale hkratno določevanje in identifikacijo večkomponentnih mešanic z zelo nizkimi koncentracijami antibiotikov in njihovih zaostankov.

Ključne besede: največji dovoljeni zaostanki (MRL), LC-MS/MS, 2002/657/EC, Evropska farmakopeja, Ameriška farmakopeja

Abstract: The European Pharmacopeia and The United States Pharmacopeia prescribe relatively simple analytical methods in their monographs for antibiotics which can not satisfy strict criteria of regulatory bodies regarding either the presence or residues of antibiotics mainly in food products of animal origin. For this reason in a last decade many scientists and research groups took a part in a rigorous study and development of analytical techniques which would allow the simultaneous determination and identification multicomponent mixtures with very low concentrations of antibiotics and their residuals.

Key words: maximum residue limits (MRL), LC-MS/MS, 2002/657/EC, The European Pharmacopeia, The United States Pharmacopeia

1 Uvod

Na področju živinoreje se antibiotiki pogosto nelegalno uporabljajo kot pospeševalci rasti (*growth promoters*), zato sta učinkovita nadzor in kontrola nad zaostanki v živilih živalskega izvora nujna (1, 2). Članice EU, ZDA, Kitajska, Japonska in številne druge države so natančno določile dovoljene zaostanke (MRL – *maximum residue limits*), ki jih pristojne ustanove tudi dosledno nadzirajo (3). Sodobne analizne metode se v kontrolnih laboratorijih uporabljajo predvsem za določevanje zaostankov v živilih živalskega izvora, zlasti makrolidnih in aminoglikozidnih antibiotikov ter kloramfenikola, saj se te učinkovine v živinoreji uporabljajo najpogostejše (1, 2, 3, 4, 5). Za vse skupine antibiotikov se še vedno največkrat uporablja določevanje mikrobiološke vsebnosti, ker je metoda cenovno ugodna, vendar pa je nespecifična in potrebuje potrditev z bolj selektivnimi in občutljivimi metodami, kot so kemična, fizikalna ali spektroskopska (6).

V prispevku bo na kratko predstavljena veljavna regulativa na območju EU, klasične farmakopejske metode za določevanje različnih skupin antibiotikov, sodobne analizne tehnike, s katerimi lahko v kratkem času analiziramo veliko število vzorcev, ter omejitve in težave, s katerimi se

srečujejo znanstveniki in znanstvene skupine pri razvoju in validacijah sodobnih analiznih metod.

2 Regulativa na področju EU

EU je izdala specifično direktivo 2002/657/EC, ki opisuje izvedbo metod, interpretacijo rezultatov, uradno kontrolo nad zaostanki v živilih živalskega izvora, in navaja tudi validacijske parametre: selektivnost, linearnost, natančnost, preciznost in mejo detekcije (7, 8). Sistem HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) je preventivni sistem, ki omogoča prepoznavanje, oceno, ukrepanje in nadzor nad morebitno prisotnimi dejavniki tveganja v živilih, ki lahko ogrožajo zdravje človeka. Sistem je osredinjen na izvedbo analize tveganja za posamezno živilo ali skupino živil, na določitev kritičnih kontrolnih točk v procesu, na določitev mejnih vrednosti kritičnih kontrolnih točk ter na določevanje ukrepov v primeru odstopanj od mejnih vrednosti (9). Glavni namen tako direktive 2002/657/EC, kakor tudi sistema HACCP je zagotoviti varna živila za potrošnika in s tem visoko stopnjo zaščite potrošnikovega zdravja. Članice EU so dolžne dosledno izvajati kontrolo nad zaostanki in zagotavljati, da kritične koncentracije niso

presežene in da prepovedane učinkovine niso prisotne v živilih živalskega izvora.

Zaradi zelo strogih zahtev imajo kontrolni laboratoriji dnevno v analizi veliko število vzorcev, ki morajo biti analizirani v zelo kratkem času, kar posledično narekuje razvoj analiznih metod, ki so hkrati sposobne analizirati velike količine vzorcev z več različnimi učinkovinami, poleg tega pa morajo biti tudi preproste, specifične, hitre, ustrezno občutljive in dovolj robustne (5).

3 Hkratno določevanje različnih antibiotikov v bioloških vzorcih

Tekočinska kromatografija, povezana z masno spektrometrijo (LC-MS) oziroma s tandem masno spektrometrijo (LC-MS/MS) je postala najbolj uporabna tehnika za določevanje zaostankov antibiotikov v živilih živalskega izvora. LC-MS/MS ustreza pomembnim zahtevam, ki so določene v direktivi 2002/657/EC. To so zahteve in postopki za ustrezno validacijo analiznih metod za zagotavljanje kakovosti (linearnost, natančnost, selektivnost, robustnost, meja detekcije in meja kvantifikacije) (6, 10). V. Carretero in sodelavci so s tehnikami visokotlačne ekstrakcije tekočin (PLE) in LC-MS/MS razvili analizo metodo, s katero so v mesu določili zaostanke v sledovih 31 protimikrobnih učinkovin, ki pripadajo sedmim različnim kemičnim skupinam (β -laktami, linkozamidi, nitroimidazoli, makrolidi, kinoloni, sulfonamidi, tetraciklini in trimetoprim) (6). J. Chico s sodelavci je določil zaostanke 39 protimikrobnih učinkovin (tetraciklini, kinoloni, penicilini, sulfonamidi in makrolidi) v živilih živalskega izvora z uporabo tekočinske kromatografije ultravioleke ločljivosti, povezane s tandem masno spektrometrijo (UHPLC-MS/MS), ki za ionizacijo vzorcev uporablja elektrosprej metodo (ESI). Metoda je ustrezno validirana v skladu z direktivo 2002/657/EC (2).

4 Določevanje antibiotikov in njihovih zaostankov, ki se najpogosteje uporabljajo v veterinarski medicini

4.1 Makrolidni antibiotiki

Makrolidni antibiotiki so učinkoviti proti grampozitivnim in nekaterim gramnegativnim bakterijam. Pogosto jih uporabljamo tako v humani kot v veterinarski medicini. So grenkega okusa in v vodi zelo težko topni. Reverzibilno se vežejo na 50 S ribosomsko podenoto, s tem zavirajo delovanje translokaze in delujejo bakteriostatično (1, 11, 12, 13, 14). Najbolj znani antibiotiki v tej skupini so eritromicin, klaritromicin in azitromicin. Evropska in Ameriška farmakopeja za vse tri predstavnike predpisujeta identifikacijo z IR absorpcijsko spektrofotometrijo, merjenje specifičnega optičnega zasuka, določevanje sorodnih substanc in vsebnosti z metodo HPLC, določevanje vode, sulfatnega pepela in težkih kovin. V Ameriški in Evropski monografiji za eritromicin, ki je zmes več makrolidnih antibiotikov (eritromicin A, eritromicin B in eritromicin C), najdemo še limitno določevanje tiocianata (max. 0,3 %), ki se pojavi v procesih biosinteze in izolacije (12, 13).

Literatura navaja določevanje makrolidov v plazmi, živalskih tkivih, krvi in zemlji z uporabo tekočinske kromatografije (LC) z ultravijolično (UV)

ali fluorimetrično detekcijo, LC-MS in LC-MS-MS (1, 4, 7). Prav tako so uspešno določili makrolide v živalskih jetrih in ledvicah z uporabo tekočinske kromatografije z dioda array detektorjem (LC-DAD), pri čemer so potrdili rezultate, dobljene z masno spektrometrijo (MS) (7). H. Berrada in sodelavci so za določevanje zaostankov makrolidov v različnih vzorcih mesa in rib uporabili visokotlačno ekstrakcijo tekočin, pri čemer so pokazali, da je metoda robustna, preprosta, praktična in hitra, saj so naenkrat določevali prisotnost sedmih različnih makrolidov (1).

Nepravilna in prekomerna uporaba v veterini ima posledice v obliki zaostankov antibiotikov in njihovih metabolitov v živilih živalskega izvora, kar lahko vodi do neželenih učinkov pri uporabnikih in do bakterijske odpornosti na antibiotike. Uporaba nekaterih makrolidov je v veterinarski medicini zelo omejena, saj imajo točno določen zaostanek MRL. Tako je tudi njihova uporaba regulirana z direktivama 2377/90/EC in 70/524/EC, ki natančno predpisujeta vrednosti zaostankov antibiotikov v živilih živalskega izvora (1, 7). Eritromicin, spiramicin, tilmikozin in tilozin so vključeni v aneks 1 kot učinkovine z MRL vrednostjo. Josamicin je vključen v aneks 3 kot učinkovina z začasno MRL vrednostjo, medtem ko roksitromicin in troleandomicin nimata dovoljene uporabe za uporabo v živinoreji v EU in zato tudi nimata MRL vrednosti (1).

4.2 Aminoglikozidni antibiotiki

Aminoglikozidni antibiotiki so širokospektralni antibiotiki, ki imajo baktericidno delovanje tako na grampozitivne, kakor tudi na gramnegativne bakterije. Sestavljeni so iz monosaharida, aminosladkorja in bazično substituiranih cikličnih gradnikov (cikloheksanski derivati z najmanj tremi hidroksi skupinami), ki so med seboj povezani z glikozidno vezjo (15).

V to skupino uvrščamo antibiotike, kot so streptomycin, neomicin, dihidroestreptomicin, gentamicin in kanamicin, ki jih tako v Evropski kot Ameriški farmakopeji najdemo v obliki soli z žveplovo (VI) kislino. Posledično obe farmakopeji med identifikacijskimi preizkusi predpisujeta dokazno reakcijo na sulfat. Ostali preizkusi, ki jih obe farmakopeji predpisujeta za aminoglikozidne antibiotike, so še merjenje pH vrednosti in preizkus izgube mase pri sušenju (12, 13).

Terapevtsko uporaben streptomycinjev sulfat (sestavljen iz streptidina, L-streptoze in N-metil-L-glukozamina) je bel, higroskopen prašek, skoraj brez vonja, grenkega okusa, zelo lahko topen v vodi, skoraj netopen v etanolu, kloroformu in dietiletru (11, 12, 13). Po Ameriški in Evropski farmakopeji streptozni delež dokazujemo z reakcijo preko maltola, s hidrolizo v bazičnem. Po dodatku kisle raztopine železovega (III) klorida, dobimo vijolično obarvan kelat, ki mu izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 525 nm (6, 11, 12, 13). V Evropski farmakopeji najdemo preizkus identifikacije s tankoplastno kromatografijo in še dve barvni reakciji. Prva poteka z α -naftolom in koncentriranim natrijevim hipokloritom, pri čemer dobimo rdeče obarvanje, saj gre za premeščanje iz 1-sulfata. To je Sakaguchi reakcija, ki je značilna za gvanidinsko strukturo (11, 12). Pri drugi metodi pa učinkovini v vodi in klorovodikovi kislini dodamo α -naftol in natrijev hidroksid, pri čemer dobimo blede rumeno obarvanje. Evropska farmakopeja predpisuje določevanje mikrobiološke vsebnosti, medtem ko Ameriška farmakopeja predpisuje določitev vsebnosti z metodo HPLC z elektrokemičnim detektorjem (12, 13).

Kanamicinjev sulfat je bel kristaliničen prašek, topen v vodi, netopen v acetonu in kloroformu. Ima štiri amino skupine in naslednje pKs

vrednosti: $pK_{S1} = 6,4$; $pK_{S2} = 7,55$; $pK_{S3} = 8,4$; $pK_{S4} = 9,4$ (11, 12, 13). Obe farmakopeji med identifikacijskimi preizkusi navajata barvno reakcijo z ninhidrinom v butanolu z dodatkom piridina, kjer se razvije temno vijolična barva, s čimer dokažemo primarne amine v sladkorjem in streptaminskem delu (11, 12, 13). Preizkusa, ki ju najdemo še v Evropski farmakopeji, sta merjenje specifičnega optičnega zasuka in preizkus, pri katerem učinkovini v vodi dodamo pikrinsko kislino in zberemo kristale, ki se talijo pri približno 235 °C (11).

Gentamicin je zmes 16 sorodnih antimikrobnih substanc. Farmacevtsko se uporabljajo Gentamicin C_1 , C_{1a} , C_2 in majhna količina C_{2a} . V Evropski in Ameriški farmakopeji ga najdemo v obliki sulfata. Obe farmakopeji navajata merjenje specifičnega optičnega zasuka in določitev limita metanola s plinsko kromatografijo. Prav tako tudi obe predpisujeta določevanje vsebnosti, in sicer Evropska farmakopeja mikrobiološko, Ameriška farmakopeja pa z metodo HPLC (5, 6). V Evropski farmakopeji najdemo identifikacijski preizkus s snemanjem spektra v območju med 240 nm in 330 nm, kjer raztopina učinkovine ne izkazuje absorpcijskega maksimuma, ter identifikacijo s tankoplastno kromatografijo (12). V Ameriški farmakopeji pa najdemo identifikacijo z IR absorpcijsko spektrofotometrijo (13).

Neomicin je zmes treh učinkovitih antibiotičnih substanc: neomicin A, neomicin B in neomicin C (10). V Evropski in Ameriški farmakopeji ga najdemo v obliki sulfata (12, 13). Ameriška farmakopeja navaja tankoplastno kromatografijo in dokazno reakcijo s 15M- žveplovo kislino s segrevanjem (100 minut) pri 100 °C, čemur sledi ekstrakcija s ksilolom. Pri tej reakciji gre za pretvorbo riboze v furfural. Po dodatku 4-bromoanilina pa dobimo resonančno stabiliziran rožnat cianin z absorpcijskim maksimumom pri 552 nm, kjer gre za dokaz riboze v neomicinski strukturi (11, 13). Evropska farmakopeja predpisuje še merjenje specifičnega optičnega zasuka in določitev sorodnih substanc z metodo HPLC. Obe farmakopeji pa predpisujeta mikrobiološko določitev vsebnosti (12, 13).

Tudi aminoglikozidni antibiotiki se v živinoreji pogosto uporabljajo za zdravljenje bakterijskih okužb in kot pospeševalci rasti, zato je v skladu z direktivo 2002/657/EC nujno treba kontrolirati njihove zaostanke v živilih živalskega izvora (4). Njihova značilnost je, da se ne metabolizirajo, v majhnem obsegu pa se vežejo na plazemske proteine, tako da velika količina substance nespremenjena zapusti organizem z urinom ali s fecesom. Tako se ostanki aminoglikozidov kopičijo tudi vsepovsod v okolju. Prekomerni odmerki aminoglikozidov pa povzročajo tudi neželene učinke, kot sta ototoksičnost in nevrotoksičnost (3, 16, 17).

Metode za določevanje aminoglikozidov so mikrobiološke, encimske in kromatografske. Kot že omenjeno v uvodu, so mikrobiološke metode sicer preproste in cenovno ugodne, vendar časovno dolge in nespecifične (2, 16). Kromatografske metode so tankoplastna kromatografija (TLC), plinska kromatografija (GC), LC in LC-MS. Slednji sta zaradi njune zmogljivosti separacije, identifikacije in kvantifikacije glavni analizni metodi za določevanje aminoglikozidov (16, 17). W. Zhu s sodelavci je razvil metodo LC-MS/MS za hkratno določevanje več aminoglikozidnih zaostankov v živilih živalskega izvora, ki se je izkazala za zanesljivo in primerno za vsakodnevno rutinsko uporabo (3). HPLC metoda je močno povezana s kemijsko strukturo aminoglikozidov, saj so te spojine zelo polarne in imajo majhno tendenco zadrževanja na nepolarnih reverznofaznih kolonah, prav tako pa v njihovi strukturi niso prisotni kromofori ali ionofori za ustrezno detekcijo. Tako ji v zadnjem

času močno alternativo predstavlja kapilarna elektroforeza (CE), ki je tudi visoko zmogljiva, hitra in učinkovita separacijska tehnika, odlikuje pa se tudi po minimalni porabi reagentov (16).

4.3 Kloramfenikol

Kloramfenikol je rumenkasto bel kristaliničen prašek, močno grenkega okusa. V vodi in dietiletru je težko topen, v etanolu in propilenglikolu pa lahko topen. Ima dva kiralna centra, oba v (R) konfiguraciji, njegovi strukturni značilnosti pa sta aromatska nitro skupina in dva klorova atoma (11, 12, 13). Z NMR so dokazali, da je od številnih možnih izomernih oblik antibiotično učinkovita D-threo-oblika, ki je sterični analog nukleotida uridin-5'-fosfata, kar dokazuje, da kloramfenikol deluje kot inhibitor sinteze proteinov (11).

Specifični optični zasuk je praviloma odvisen od topila in od koncentracije preiskovanega topila. Od običajnih topil je etanol edini, v katerem specifični optični zasuk ni odvisen od koncentracije in znaša med +18,5° in +20,5°. Ker je kloramfenikol zelo grenkega okusa, so znani njegovi po okusu nevtralni estri, predvsem s palmitinsko in stearinsko kislino (11, 12, 13). V Evropski in Ameriški farmakopeji pod identifikacijskimi preizkusi najdemo določevanje temperature tališča, določevanje identifikacije z IR absorpcijsko spektroskopijo in tankoplastno kromatografijo, merjenje specifičnega optičnega zasuka in določevanje vsebnosti: po Evropski farmakopeji z UV/VIS spektrofotometrijo in po Ameriški farmakopeji z metodo HPLC (12, 13). Zaradi številnih funkcionalnih skupin, prisotnih v kloramfenikolu, v literaturi najdemo celo vrsto identifikacijskih barvnih reakcij (11). Eno izmed njih najdemo tudi v Evropski farmakopeji, in sicer titracijo z benzoilkloridom in železovim kloridom v kloroformu, pri čemer v vodni plasti pride do škrlatno rdeče barve. Evropska farmakopeja predpisuje še dokazno reakcijo na kloride, medtem ko v literaturi najdemo še dokazno reakcijo po Kunzu, s katero dokažemo, da sta v molekuli kloramfenikola dve prosti hidroksi skupini (11, 12). Ostali preizkusi, ki jih najdemo v Evropski farmakopeji, so določevanje sorodnih substanc s tankoplastno kromatografijo, določevanje limita kloridov, izgube mase pri sušenju in sulfatnega pepela (12). V Ameriški farmakopeji pa najdemo določevanje pH vrednosti in določevanje kromatografske čistote s tankoplastno kromatografijo (13).

V nevtralnih in kislih medijih je kloramfenikol relativno stabilen, v alkalnih pa je nestabilen. Alkalna hidroliza pri višjih temperaturah zelo hitro poteče, kar dokazuje nastanek rumene barve. Knabe in Kräuter sta izolirala zmes devetih azoproduktov alkalne hidrolize. Prevladujoča je bila 4,4'-azobenzojska kislina. Izolirala sta tudi azofenole, azoaldehide in azoalkohole (11).

Zaradi njegovih toksičnih učinkov (najbolj nevarna pri ljudeh je aplastična anemija) je uporaba kloramfenikola v živinoreji prepovedana v številnih državah, vključno z državami EU, zato je vključen v aneks IV direktive 2077/90 in se zanj zahteva ničelna toleranca v živilih živalskega izvora. Da lahko spremljamo tako nizke koncentracije kloramfenikola, potrebujemo občutljive, zanesljive in robustne analizne metode. Danes so najbolj občutljive metode za določevanje kloramfenikola GC, HPLC, TLC, imunološke in mikrobiološke metode, ena izmed najbolj zanesljivih pa je LC-MS/MS (18, 19, 20, 21). H. T. R nning in sodelavci so v skladu z direktivo 2002/657/EC razvili LC-MS/MS metodo za identifikacijo in kvantifikacijo kloramfenikola v številnih živilih živalskega izvora: mesu, jajcih, medu, mleku, plazmi in urinu (18).

5 Težave in omejitve sodobnih instrumentalnih analiznih tehnik

Živalska tkiva, v katerih največkrat določujemo zaostanke antibiotikov (ledvice, jetra, jajca, mleko in med), so kompleksni biološki sistemi, saj vsebujejo visoke vrednosti proteinov in maščob, ki pogosto motijo analize postopke (2, 10). Po navadi v omenjenih surovih tkivih srednja vrednost proteinov znaša okoli 20 %, skupna vsebnost lipidov pa okoli 5 %, kar pomeni, da je izolacija antibiotikov iz bioloških vzorcev zapletena in težavna. Ekstrakcija zaostankov antibiotikov iz živalskih tkiv je namreč eden najtežjih korakov v celotnem procesu, tudi zaradi izjemno nizkih koncentracij zaostankov (po navadi v območju od nanogramskih do mikrogramskih koncentracij) (7, 22). V literaturi tako zasledimo tekoče ekstrakcije, vodne ekstrakcije s pomočjo EDTA-McIlvain pufrom ali s prisotnostjo EDTA in citronske kisline (postopek se je izkazal za zelo uporabnega pri ekstrakciji tetraciklinov), kot učinkovita ekstrakcijska tehnika pa se je izkazala tudi uporaba mešanice voda/metanol (2, 7, 8). Ena najbolj popularnih ekstrakcijskih metod v zadnjem času pa je metoda ekstrakcije na trdni fazi (SPE – solid phase extraction), ki je hitra, zanesljiva in enostavna (21).

6 Zaključek

Prispevek dokazuje, da je dogajanje na področju analitike antibiotikov zelo pestro predvsem zaradi čedalje strožjih zahtev in nadzora pristojnih organov nad zaostanki v živilih živalskega izvora, saj kritične vrednosti ne smejo biti dosežene, prepovedane substance pa v živilih ne smejo biti prisotne. V zadnjih letih je zaradi vse večjih okoljevarstvenih problemov in zavedanja le-teh opazen tudi naraščajoč trend določevanja razpadnih produktov in zaostankov učinkovin predvsem v vodah (5, 17, 23, 24, 25, 26, 27). V zadnjem desetletju je tako v laboratorijih nepogrešljiva tekočinska kromatografija, povezana z masno spektrometrijo (LC-MS/MS), katere pomembna lastnost je, da hkratno uspešno ločuje med učinkovinami z zelo podobnimi fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi (22, 28). Zaradi nizkih koncentracij preiskovanih analitov, kompleksnosti bioloških vzorcev in raznolikih fizikalnih in kemijskih lastnosti antibiotikov je njihovo določevanje izjemno težko. Poleg vseh naštetih ovir pa je eden od problemov tudi ta, da je ustrezna analizna oprema izredno draga.

7 Literatura

- Berrada H, Borrull F, Font G, Marce R M. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008; 1208: 83–89
- Chico J, Rubies A, Centrich F, Companyo R, Prat M D, Granados M. High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008; 1213: 18–199
- Zhu W, Yang J, Wei W, Liu Y, Zhang S. 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. *Journal of Chromatography A* 2008; 1207: 29–37
- Yang Z Y, Wang L, Tang X. Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009; 49: 811–815
- Ibanez M, Guerrero C, Sancho J V, Hernandez F. Screeneng of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 2529–2539
- Carretero V, Blasco C, Pico V. Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008; 1209: 162–173
- Berrada H, Borrull F, Font G, Molto J C, Marce R.M. Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A* 2007; 1157: 281–288
- Andreu V, Blasco C, Pico Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and environment. *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 26, No. 6, 2007
- <http://www.zzv-nm.si>
- <http://ec.europa.eu>
- Eger K, Trosch tz R, Roth H J. *Arzneistoffanalyse*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 1999, 4. Auflage
- The European Pharmacopeia, Ph. Eur. 6th Edition. Council of Europe, Strasbourg, 2008
- The United States Pharmacopeia, USP 32
- Williams D A, Lemke T L. *Foye's principles of Medicinal Chemistry*, 5th edition, 2002
- Auterhoff H, Knabe J, H Itje H. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1999, 14. Auflage
- Yu C, He Y, Fu G, Xie H, Gan W. Determination of Kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 2009; 877: 333–338
- Serrano J M, Silva M. Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A* 2006; 1117: 176–183
- R nning H T, Einarsen K, Asp T N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A* 2006; 1118: 226–233
- Guy P A, Royer D, Mottier P, Gremaud E, Perisset A, Stadler R H. Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004; 1054: 365–371
- Zhang S, Liu Z, Guo X, Cheng L, Wang Z, Shen J. Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2008; 875: 399–404
- Boyd B, Björk H, Billing J, Shimelis O, Axelsson S, Leonora M, Yilmaz E. Development of an improved method for trace analysis of chloramfenicol using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A* 2007; 1174: 63–71
- Tsai W H, Huang TC, Huang J J, Hsue Y H, Chuang H Y. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 2263–2269
- Kosjek T, Heath E. Applications of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 10, 2008
- Kosjek T, Heath E, Krbavčič A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International* 2005; 31: 679–685
- Kraigher B, Kosjek T, Heath E, Kompore B, Mandic-Mulec I. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water research* 2008; 42: 4578–4588
- Kosjek T, Žigon D, Kralj B, Heath E. The use of quadrupole-time-of-flight mass spectrometer for the elucidation of diclofenac biotransformation-products in wastewater. *Journal of Chromatography A* 2008; 1215: 57–63
- Kosjek T, Heath E, Perez S, Petrovi M, Barcelo D. Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hydrology* 2009; 372: 109–117
- Diaz-Cruz M S, Barcelo D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 26, No. 6, 2007