

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MITJA BUKOVEC

**RAZVOJ POTRDITVENE METODE ZA DOLOČANJE
OSTANKOV SEDATIVOV V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA
S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE
ZMOGLJIVOSTI, SKLOPLJENO Z MASNO
SPEKTROMETRIJO**

**THE DEVELOPMENT OF CONFIRMATORY METHOD BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS
SPECTROMETRY FOR IDENTIFICATION OF SEDATIVE
RESIDUE IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN**

Študijski program INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, september 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje, Enota za varno hrano, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani, kjer sem pod mentorstvom izr. prof. dr. Anamarije Zega in somentorstvom asist. dr. Zlatke Bajc opravil vse v nalogi opisane meritve.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Anamariji Zega, somentorici asist. dr. Zlatki Bajc za pregled in strokovno pomoč pri pisanju magistrske naloge. Posebno se zahvaljujem neuradnemu delavnemu mentorju Tomažu Pezdirju, za vse napotke in podporo pri izvedbi eksperimentov in pisanju naloge. Zahvala gre tudi Tanji Knific za pomoč pri prevajanju ter celotnemu kolektivu Inštituta za varno hrano, krmo in okolje, Enote za varno hrano, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Srčno se zahvaljujem očetu Marku Bukovcu, za pomoč pri ilustracijah ter celotni družini in vsem bližnjim, ki so me podpirali tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Anamarije Zega in somentorstvom asist. dr. Zlatke Bajc. Pri izdelavi naloge sem upošteval avtorske pravice uporabljenih virov, ki so vsi pravilno navedeni v seznamu literature.

Mitja Bukovec

POVZETEK

Ključne besede: veterinarska pomirjevala, LC-MS/MS, masna spektrometrija

Razvoj novih analiznih metod, za odkrivanje ostankov veterinarskih zdravil v čim nižjih koncentracijah je izrednega pomena, zaradi možnih resnih neželenih učinkov po zaužitju živil zdravljenih živali. Tekom izdelave magistrske naloge smo razvili analizno metodo za določevanje ostankov azaperola, azaperona, karazolola, klorpromazina, propiopromazina, acepromazina, ksilazina in haloperidola v mleku, urinu, jajcih in ledvicah. Spojine je pred samo meritvijo potrebno ekstrahirati iz matrice, kar smo izvedli z acetonitrilom. Dobljeni ekstrakt smo dodatno očistili s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi in sicer s kolonami Evolute CX. Očiščene vzorce smo nato analizirali na tekočinskem kromatografu visoke ločljivosti sklopljenim z masno spektrometrijo. Za kromatografsko ločbo smo uporabili dve različni analitski koloni. Kot boljša se je izkazala analizna kolona Zorbax Eclipse Plus C18, dimenzije $2,1 \times 50$ mm, z $1,8 \mu\text{m}$ delci. Razvoj instrumentalne metode je bil razmeroma težak glede na samo kemijsko in strukturno podobnost spojin. Tekom razvoja smo pri pretoku mobilne faze $0,3 \text{ ml/min}$ testirali različne gradientne mešanja mobilnih faz. Najprimernejši gradient je imel začetno razmerje mobilnih faz 70 vol. % pretežno vodne (5 vol. % raztopina acetonitrila v prečiščeni vodi Milli-Q z dodatkom 3,5 vol. % 32 % raztopine amonijaka) in 30 vol. % organske faze (acetonitril z dodatkom 3,5 vol. % 32 % raztopine amonijaka). Gradient je skrajno sestavo dosegel pri 5 minuti in sicer 10 vol. % pretežno vodne in 90 vol. % organske faze. Razviti analizni metodi smo z validacijo določili njeno ustreznost. Validacijo smo izvedli za vse omenjene spojine v matrici mleka različnih živalskih vrst skladno z direktivo evropske komisije 2002/657/EC. Za validacijo smo izbrali tri koncentracijske nivoje in sicer 0,5, 1,0 in $1,5 \mu\text{g/kg}$ surovega mleka. Validacija je pokazala, da je razvita analizna metoda primerna za določanje ostankov sedativov v surovem mleku nad koncentracijo $0,5 \mu\text{g/kg}$.

ABSTRACT

Keywords: Veterinary sedatives, LC-MS/MS, Mass Spectrometry

The development of new analytical methods for residue determination of veterinary drugs at concentrations as low as possible is extremely important, since even low concentrations of veterinary drugs in food of animal origin may have harmful effect on human health. In this thesis, we developed an analytical method for the confirmation of azaperol, azaperone, carazolol, chlorpromazine, propionylpromazine, acepromazine, xylazine and haloperidol in milk, urine, eggs and kidney with LC-MS/MS. Before we can determine the presence and concentrations of our targeted compounds in the sample, we have to extract those compounds from matrices. In our case, we used acetonitrile as extraction medium and Evolute CX solid phase extraction columns for additional purification. Extracts were then analysed by high performance liquid chromatography coupled with triple quad mass spectrometry analyser. The chromatographic separation was performed using two different columns. The Zorbax Eclipse Plus C18 analytical column with dimensions of 2.1×50 mm and $1.8 \mu\text{m}$ particles has proven to be better. The development of a method was relatively difficult due to the chemical and structural similarities between targeted compounds. During the research, different gradients of the mixing of mobile phases were tested at a flow rate of 0.3 ml/min. The most suitable gradient initially consisted of 70 % mostly aqueous (5 vol. % acetonitrile in high-purity water – Milli-Q with addition of 3,5 vol. % 32 % ammonium hydroxide solution) and 30 % organic (acetonitrile with addition of 3,5 vol. % 32 % ammonium hydroxide solution) mobile phase. The gradient reached the highest extremity at 5 minutes when the mobile phase reached 10 % mostly aqueous and 90 % organic composition. The optimized method was validated for qualitative and quantitative analysis of all targeted compounds in milk of different animal species in accordance with Commission Decision 2002/657/EC on a matrix-comprehensive in-house validation. Validation was performed at three concentration levels: 0.5, 1.0 and 1.5 $\mu\text{g/kg}$ of raw milk. Validation has shown that the developed analytical method is suitable for the determination and quantification of targeted sedatives in raw milk above the concentration of 0.5 $\mu\text{g/kg}$.

KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. Predstavitev analitov	3
1.1.1. Azaperon in azaperol.....	3
1.1.2. Karazolol	4
1.1.3. Klorpromazin	5
1.1.4. Propiopromazin	6
1.1.5. Acepromazin	7
1.1.6. Ksilazin.....	8
1.1.7. Haloperidol.....	9
1.2. Analizne metode za določanje ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora	10
1.2.1. Masna spektrometrija	10
1.2.2. Validacija analizne metode za določanje ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora.....	13
1.3. Literaturni pregled metod za določanje sedativov	14
2. NAMEN DELA.....	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. Standardi	18
3.2. Reagenti	18
3.3. Naprave in pribor	19
3.4. Biološki material.....	20
3.5. Osnovne standardne raztopine	20
3.6. Delovne standardne raztopine.....	20
3.7. Mobilne faze in ostale raztopine za delo.....	21
3.8. Vzorčenje, priprava in čiščenje vzorcev	22
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1. Razvoj analizne metode z LC-MS/MS	24
4.2. Validacija analizne metode	43
4.2.1. Ponovljivost sistema.....	43
4.2.2. Ponovljivost metode.....	44
4.2.3. Obnovljivost znotraj laboratorija	46

4.2.4.	Izkoristek metode	48
4.2.5.	Linearnost.....	50
4.2.6.	Selektivnost	51
4.2.7.	Test filtrov za filtracijo vzorcev	52
4.2.8.	Robustnost.....	52
4.2.9.	Validacijski kriteriji in povzetek rezultatov	53
5.	SKLEP	60
6.	LITERATURA	61
Priloga 1: Izvorni podatki za ponovljivost metode		64

KAZALO SLIK

Slika 1:	Strukturna formula azaperona in shema transformacij.....	3
Slika 2:	Strukturna formula azaperola.	3
Slika 3:	Strukturna formula karazolola.	4
Slika 4:	Strukturna formula klorpromazina.	5
Slika 5:	Strukturna formula propiopromazina.	6
Slika 6:	Strukturna formula acepromazina.	7
Slika 7:	Strukturna formula ksilazina.	8
Slika 8:	Strukturna formula haloperidola.....	9
Slika 9:	Shematski prikaz tekočinskega kromatografa sklopljenega z masnim spektrometrom, ki vsebuje tri kvadrupole.....	12
Slika 10:	Interakcije molekule AP s stacionarno fazo na koloni Biotage: Evolute® CX-50.	23
Slika 11:	Shematski prikaz procesa čiščenja vzorcev.....	24
Slika 12:	Shematski prikaz dela LC-MS/MS, ki prikazuje potek dovajanja standarda.	25
Slika 13:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi1.	28
Slika 14:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi2.	30
Slika 15:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi3.	32
Slika 16:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi3 na kromatografski koloni Acquity UPLC® BEH C18, dimenzij 2,1 × 50 mm z 1,7 µm delci proizvajalca Waters.	34
Slika 17:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi3 na novi kromatografski koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm delci proizvajalca Agilent.	36
Slika 18:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca kokošjih jajc z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.....	38
Slika 19:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca govejih ledvic z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.....	38
Slika 20:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca surovega kravjega mleka z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.	39
Slika 21:	Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca govejega urina z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.....	40

Slika 22: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju raztopine HAL-D4 z metodo Sedativi3	43
Slika 23: Kromatogrami dobljeni z injiciranjem raztopine IS posneti po metodi Sedativi3.	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Pregled najpomembnejših objav za razvoj naše metode.	15
Preglednica 2:	Masni prehodi in nastavitev masnega spektrometra za iskane spojine.	25
Preglednica 3:	Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih pri analizni metodi <i>Sedativi</i>	26
Preglednica 4:	Sestava gradienta metode <i>Sedativi1</i>	27
Preglednica 5:	Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi <i>Sedativi1</i>	27
Preglednica 6:	Sestava gradienta metode <i>Sedativi2</i>	29
Preglednica 7:	Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi <i>Sedativi2</i>	31
Preglednica 8:	Sestava gradienta metode <i>Sedativi3</i>	31
Preglednica 9:	Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi <i>Sedativi3</i>	33
Preglednica 10:	Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi <i>Sedativi3</i> , na kromatografski koloni Acquity UPLC® BEH C18, dimenzij 2,1 × 50 mm z 1,7 µm delci proizvajalca Waters.	35
Preglednica 11:	Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi <i>Sedativi3</i> , na novi kromatografski koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm delci proizvajalca Agilent.	35
Preglednica 12:	Masni prehodi in nastavitve masnega spektrometra za interni standard.	41
Preglednica 13:	Ugotovljene koncentracije posamezne iskane spojine z in brez uporabe IS, po injiciranju raztopin s koncentracijo 1 µg/kg.	42
Preglednica 14:	Ugotovljene koncentracije iskanih spojin pri testiranju ponovljivosti sistema, po injiciranju raztopin s koncentracijo 1 µg/kg.	44
Preglednica 15:	Povprečne vrednosti Φ , s_r in C_v posamezne iskane spojine na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg na kg surovega mleka.	45
Preglednica 16:	Povprečne vrednosti Φ , s_r in C_v posamezne iskane spojine na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg na kg surovega mleka.	45
Preglednica 17:	Povprečne vrednosti Φ , s_r in C_v posamezne iskane spojine na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg na kg surovega mleka.	45
Preglednica 18:	Povprečne vrednosti koeficienta variance, ugotovljenih vsebnosti posameznih iskanih spojin in relativne razlike med analitikoma za nivo 0,5 µg/kg.	47
Preglednica 19:	Povprečne vrednosti koeficienta variance, ugotovljenih vsebnosti posameznih iskanih spojin in relativne razlike med analitikoma za nivo 1,0 µg/kg.	47
Preglednica 20:	Povprečne vrednosti koeficienta variance, ugotovljenih vsebnosti posameznih iskanih spojin in relativne razlike med analitikoma za nivo 1,5 µg/kg.	48
Preglednica 21:	Faktor obnovljivosti znotraj laboratorija.	48
Preglednica 22:	Povprečen izkoristek ekstrakcije šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezno iskano spojino za nivo 0,5 µg/kg.	49

Preglednica 23: Povprečen izkoristek ekstrakcije šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezno iskano spojino za nivo 1,0 µg/kg.	49
Preglednica 24: Povprečen izkoristek ekstrakcije šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezno iskano spojino za nivo 1,5 µg/kg.	50
Preglednica 25: Determinacijski koeficienti premic za ugotavljanje linearnosti metode.	50
Preglednica 26: Povprečne vrednosti ugotovljenih koncentracij posameznih iskanih spojin za filtrirane in nefiltrirane vzorce ter njihova relativna razlika, po injiciranju raztopin s koncentracijo 1 µg/kg.	52
Preglednica 27: Parametri, kriteriji in rezultati validacije metode.	53
Preglednica 28: Vrednosti CCα validirane analizne metode <i>Sedativi3</i> za posamezne iskane spojine.	59
Preglednica 29: Ugotovljene koncentracije KP na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg KP na kg surovega mleka.	64
Preglednica 30: Ugotovljene koncentracije KP na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg KP na kg surovega mleka.	64
Preglednica 31: Ugotovljene koncentracije KP na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg KP na kg surovega mleka.	65
Preglednica 32: Ugotovljene koncentracije PP na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg PP na kg surovega mleka.	65
Preglednica 33: Ugotovljene koncentracije PP na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg PP na kg surovega mleka.	66
Preglednica 34: Ugotovljene koncentracije PP na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg PP na kg surovega mleka.	66
Preglednica 35: Ugotovljene koncentracije AP na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg AP na kg surovega mleka.	67
Preglednica 36: Ugotovljene koncentracije AP na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg AP na kg surovega mleka.	67
Preglednica 37: Ugotovljene koncentracije AP na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg AP na kg surovega mleka.	68
Preglednica 38: Ugotovljene koncentracije HAL na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg HAL na kg surovega mleka.	68
Preglednica 39: Ugotovljene koncentracije HAL na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg HAL na kg surovega mleka.	69
Preglednica 40: Ugotovljene koncentracije HAL na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg HAL na kg surovega mleka.	69
Preglednica 41: Ugotovljene koncentracije AZN na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg AZN na kg surovega mleka.	70
Preglednica 42: Ugotovljene koncentracije AZN na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg AZN na kg surovega mleka.	70

Preglednica 43: Ugotovljene koncentracije AZN na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg AZN na kg surovega mleka.	71
Preglednica 44: Ugotovljene koncentracije CZL na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg CZL na kg surovega mleka.	71
Preglednica 45: Ugotovljene koncentracije CZL na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg CZL na kg surovega mleka.	72
Preglednica 46: Ugotovljene koncentracije CZL na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg CZL na kg surovega mleka.	72
Preglednica 47: Ugotovljene koncentracije AZL na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg AZL na kg surovega mleka.	73
Preglednica 48: Ugotovljene koncentracije AZL na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg AZL na kg surovega mleka.	73
Preglednica 49: Ugotovljene koncentracije AZL na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg AZL na kg surovega mleka.	74
Preglednica 50: Ugotovljene koncentracije KSI na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg KSI na kg surovega mleka.	74
Preglednica 51: Ugotovljene koncentracije KSI na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg KSI na kg surovega mleka.	75
Preglednica 52: Ugotovljene koncentracije KSI na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg KSI na kg surovega mleka.	75

SEZNAM UPORABLJENIH SIMBOLOV IN OKRAJŠAV

AP	acepromazin
AZL	azaperol
AZL-D ₄	devteriran azaperol
AZN	azaperon
CC α	meja odločitve
C _v	koeficient variacije
CVMP	Odbor za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (<i>angl. Committee for Medical Products for Veterinary Use</i>)
CZL	karazolol
CŽS	centralni živčni sistem
DAD	detekcija z diodnim nizom (<i>angl. Diode-Array Detection</i>)
d _i	notranji premer (<i>angl. Inner Diameter</i>)
ELISA	encimska imunoadsorpcijska preiskava (<i>angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EMA	Evropska agencija za zdravila (<i>angl. European Medicines Agency</i>)
ESI	Ionizacija z razprševanjem v električnem polju (<i>angl. Electrospray ionization</i>)
FLD	detekcija s fluorescenčnim detektorjem (<i>angl. Fluorescent Light Detection</i>)
GC	plinska kromatografija (<i>angl. Gas Chromatography</i>)
GC-MS	plinski kromatograf sklopljen z masno spektrometrijo (<i>angl. Gas Chromatograph coupled with Mass Spectrometer</i>)
HAL	haloperidol
HAL-D ₄	devteriran haloperidol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>angl. High Performance Liquid Chromatography</i>)
IS	interni standard
KP	klorpromazin
KP-D ₆	devteriran klorpromazin
KSI-D ₆	devteriran ksilazin
CZL-D ₇	devteriran karazolol
LC	tekočinska kromatografija (<i>angl. Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	tekočinski kromatograf sklopljen z masnim spektrometrom (<i>angl. Liquid Chromatograph coupled with Mass Spectrometer</i>)
LC-MS/MS	tekočinski kromatograf sklopljen s tandemskim masnim spektrometrom (<i>angl. Liquid Chromatograph coupled with tandem Mass Spectrometer</i>)
MRL	najvišja dopustna vrednost (<i>angl. Maximum Residue Level</i>)
MRM	spremljanje več reakcij hkrati (<i>angl. Multiple Reaction Monitoring</i>)
MRPL	najnižja vrednost, ki jo mora analizna metoda zaznati (<i>angl. Minimum Required performance Limit</i>)
MS	masna spektrometrija (<i>angl. Mass Spectrometry</i>)
PP	propiopromazin
ppb	delcev na milijardo (<i>angl. Parts per Billion</i>)
PTFE	politetrafluoroetilen (<i>angl. Polytetrafluoroethylene</i>)

QTOF	masni spektrometer z zaporedno vezanim kvadrupolom in "time of flight" detektorjem (<i>angl. Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometer</i>)
R^2	determinacijski koeficient
R_s	ločljivost (<i>angl. Resolution</i>)
s	standardni odklon
s_{dj}^2	standardni odklon za metodo j in laboratorij d
s_{ij}	povprečna standardni odklon posamezne spojine na posameznem nivoju
s_L^2	varianca znotraj laboratorija
s_r^2	faktor ponovljivosti
s_R^2	faktor obnovljivosti
SRM	spremljanje posamezne reakcije (<i>angl. Selected Reaction Monitoring</i>)
TIC	kromatogram s seštevkom odzivov, ki pripadajo posamezni spojini (<i>angl. Total Ion Chromatogram</i>)
TOF	masni analizator na osnovi časa preleta ionov (<i>angl. Time-of-flight Mass Spectrometer</i>)
t_R	zadrževalni (retencijski) čas (<i>angl. Retention Time</i>)
UV	ultravijolična spektroskopija (<i>angl. Ultraviolet Spectroscopy</i>)
UVHVVR	Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
UZ	ultrazvočna kopel
W_b	širina vrha na bazni liniji
$\bar{y}_{ij}$	povprečna vrednost rezultatov posameznega eksperimenta za posamezno spojino na enem od nivojev
$\bar{\bar{y}}_j$	povprečna vrednost rezultatov vseh eksperimentov za posamezno spojino na enem od nivojev
Δ_a	relativna razlika med analitikoma
Δ_f	relativna razlika za test filtrov
Φ	povprečna vrednost

1. UVOD

Zaradi rasti svetovne populacije ljudi, je potreba po hrani vedno večja, zato se masovno proizvaja vse več klavnih živali. Rezultat tega so vse slabši pogoji življenja teh živali. Veliko število živali je zaprtih v majhnih prostorih, kar predstavlja potencial za razvoj različnih bolezni. Bolne živali nato zdravijo s protibakterijskimi in številnimi drugimi zdravili, ali pa zdravila dodajajo hrani za preventivo pred razvojem bolezni, lahko pa celo kot promotorje rasti (1).

V veterini se pomirjevala pri rejnih živalih pogosto uporabljajo. Predvsem pogosta je njihova uporaba pri prašičih, ki so posebno dovzetni za stresne situacije, kot je prevoz do klavnice. Stres živali lahko vodi do nastanka manj kvalitetnega, bledega in trdega mesa in celo do nenadnega pogina živali. Poleg tega sedativi zmanjšujejo agresijo živali na farmah in povečujejo njihovo telesno maso (2,3). V preteklih letih so se v ta namen uporabljali derivati fenotiazina, kot so acepromazin (AP), propionilpromazin (PP) in klorpromazin (KP), ki jih sedaj ni dovoljeno uporabljati, zaradi možnih resnih neželenih učinkov po zaužitju mesa zdravljenih živali. Od navedenih spojin je KP izrecno prepovedan. Trenutno se na seznamu dovoljenih sedativov nahajajo azaperon (AZN), karazolol (CZL) in ksilazin (KSI). Kljub temu, da je te učinkovine dovoljeno uporabljati, njihova koncentracija v prehrani namenjenih delih živali ne sme biti višja od najvišje dopustne vrednosti (*angl. Maximum Residue Level (MRL)*) vrednosti. KSI je izjema in nima predpisane MRL vrednost, saj so tekom različnih študij ugotovili, da ga je varno uporabljati, razen v primerih, ko bi ga želeli uporabiti na živalih, katerih mleko je namenjeno za humano uporabo. Uporaba KSI je v slednjem primeru nedovoljena. Za določitev, koliko zdravilne učinkovine je lahko prisotne v hrani, je potrebno upoštevati tako toksičnost zdravilne učinkovine, kakor tudi možne scenarije izpostavljenosti zdravilni učinkovini. MRL je torej potrebno postaviti s poznavanjem teh faktorjev. Navadno so MRL vrednosti podane v mikrogramih na kilogram tkiva ali v ppb (*angl. parts per billion* – delci na milijardo). Za nekatere spojine, ki so nedovoljene ali izrecno prepovedane za uporabo v veterinarstvu, so regulatorni organi postavili zahtevo za najmanjšo koncentracijo spojin, katero mora analizna metoda še zaznati (*angl. Minimum Required Performance Limit (MRPL)*). Na področju Evropske unije, MRL in MRPL vrednosti postavi Evropska agencija za zdravila (*angl. European Medicines Agency (EMA)*) (4).

Vse večja uporaba zdravil pri rejnih živalih, predstavlja vse večjo možnost, da najdemo ostanke veterinarskih zdravil. Količina zaostalih veterinarskih zdravil v delih živali, ki so namenjene prehrani je odvisna od absorpcije, distribucije, biotransformacije in izločanja zdravil. Absorpcija je proces, opisuje stopnjo in hitrost, s katero zdravilna učinkovina vstopi v telo in je odvisna od zdravilne učinkovine, načina aplikacije in vrste živali. Najpogostejša mesta aplikacije zdravila v veterinarstvu predstavljajo intravenska, intramuskularna, subkutana, peroralna in rektalna pot. Redkeje zdravilo aplicirajo direktno v organ, na primer intramamarna injekcija. Distribucija zdravilne učinkovine v organu po določenem času od aplikacije je odvisna od polarnosti zdravilne učinkovine, velikosti in strukture molekule, količine vezave na proteine itd. Ne smemo pozabiti tudi na biotransformacijo, ki navadno zdravilno učinkovino deaktivira, v primeru predzdravil, jo aktivira, lahko pa pride do nastanka metabolitov, ki imajo fiziološki učinek. Poznamo več vrst biotransformacij. Prva biotransformacija je znana kot faza I, ta predstavlja predsistemski metabolizem, ki navadno poteka v jetrih, lahko pa tudi v drugih tkivih. Pri fazi I gre največkrat za reakcije oksidacije ter hidrolize, ki zdravilno učinkovino pretvorijo v bolj hidrofilno, kar omogoči hitrejšo izločanje le-te iz sistema. V reakcijah faze II, pa se substrati konjugirajo preko OH, NH ali SH skupin z glukuronsko kislino, sulfatom, acetatom ali aminokislinami. Slednje privede do še večjega povečanja hidrofilnosti in hkrati do zmanjševanja afinitete za vezavo spojine na farmakološke receptorje. Ekskrecija ali eliminacija zdravilne učinkovine po navadi poteka po urinarni poti in preko žolča (1).

Hitrost in obseg zgoraj navedenih procesov sta odvisna od kemijske strukture in koncentracije zdravilnih učinkovin, v različnih tkivih ob določenem času po aplikaciji zdravila. Z namenom zmanjšanja količine in števila primerov, pri katerih odkrijemo prevelike količine rezidualnih zdravil, je poznavanje časa eliminacije zdravilnih učinkovin in njenih metabolitov iz delov živali, ki so namenjeni prehrani, izrednega pomena (1).

Ostanki zdravil so v delih živali namenjenih prehrani lahko prisotni v primerih, ko pride do:

- Neupoštevanja navodil za uporabo zdravila in časa eliminacije zdravilne učinkovine.
- Slabega čiščenja opreme za hranjenje živali.
- Odstopanja časa eliminacije zdravilne učinkovine od povprečnega, ki je naveden v navodilih za uporabo zdravila, na primer zaradi starosti ali hude obolevnosti zdravljenih živali.

- Uporabe v veterinarstvu nedovoljenih spojin – zdravil.

V sredini dvajsetega stoletja je bilo veliko število vzorcev, ki so jih testirali na prisotnost ostankov zdravil, pozitivnih. Število pozitivnih vzorcev se v zadnjih letih zmanjšuje, zaradi vse večje ozaveščenosti, višje izobrazbe prebivalstva in kontroli živil živalskega izvora (1).

1.1. Predstavitev analitov

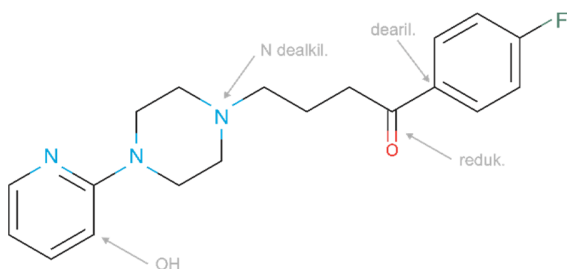
1.1.1. Azaperon in azaperol

Kemijsko ime: 1-(4-fluorofenil)-4-(4-piridin-2-ilpiperazin-1-il)butan-1-on

Molekulska formula: $C_{19}H_{22}FN_3O$

Povprečna molekulska masa: 327,40 g/mol

Monoizotopska molekulska masa: 327,1747 g/mol



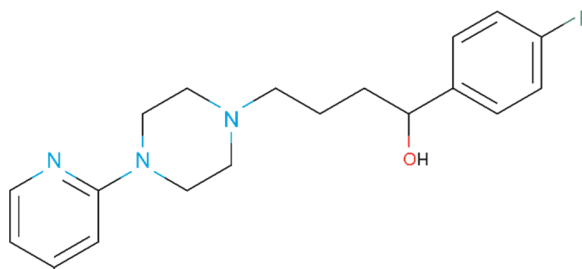
Slika 1: Strukturna formula azaperona in shema transformacij.

Kemijsko ime: 1-(4-fluorofenil)-4-(4-piridin-2-ilpiperazin-1-il)butan-1-ol

Molekulska formula: $C_{19}H_{24}FN_3O$

Povprečna molekulska masa: 329,41 g/mol

Monoizotopska molekulska masa: 329,1903 g/mol



Slika 2: Strukturna formula azaperola.

Azaperon (AZN) spada med derivate butirofenona. Njegova strukturna formula je prikazana na sliki 1. Deluje predvsem kot antagonist dopaminskih receptorjev. V veterinarski medicini se uporablja pri prašičih kot nevroleptični sedativ. Aplicirajo ga intramuskularno, z namenom zmanjšanja agresije živali na farmah ali pred prevozom živali v klavnico, z namenom zmanjšanja s transportom povezanega stresa živali (2). Azaperon se po intramuskularni aplikaciji hitro absorbira v centralni krvni obtok. Najvišjo plazemsko koncentracijo pa doseže po približno eni uri. Razpolovna doba eliminacije azaperona znaša približno štiri ure (2,3). Metabolizem azaperona v prašičih poteka po štirih glavnih poteh. In sicer z redukcijo butanona, s hidroksilacijo piridinske skupine, z oksidativno N-dealkilacijo in z oksidativno dearilacijo. Metabolizem je na sliki 1 nakazan s sivimi puščicami. Najpomembnejši metabolit azaperona je azaperol (AZL) s strukturno

formulo, ki je prikazana na sliki 2. Azaperol je tudi edini metabolit, ki je nevroleptično aktiven (2,3). Raziskava na miših je pokazala, da ima azaperon od štiri do tridesetkrat večjo jakost delovanja kot azaperol (2). Različna kratkotrajna in dolgotrajna testiranja na živalih (2,3,5,6) in klinična raziskava na 20 bolnikih, ki so trpeli za psihozami (3), so pokazali, da do neželenih učinkov prihaja izključno pri visokih apliciranih koncentracijah zdravilne učinkovine. Sedacija je pri ljudeh nastopila pri odmerkih večjih od 2,5 mg, pri odmerkih nad 20 mg so ljudje občutili omotico. Na podlagi raziskav, je Odbor za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (*angl. Committee for Medical Products for Veterinary Use (CVMP)*), ki deluje v sklopu Evropske agencije za zdravila EMA, postavil MRL vrednosti v koži, maščobi, jetrih in ledvicah prašičev. Prisotna koncentracija ne sme presegati vrednosti 100 µg za seštevke koncentracije azaperona in azaperola na kg posameznega testiranega tkiva (4).

1.1.2. Karazolol

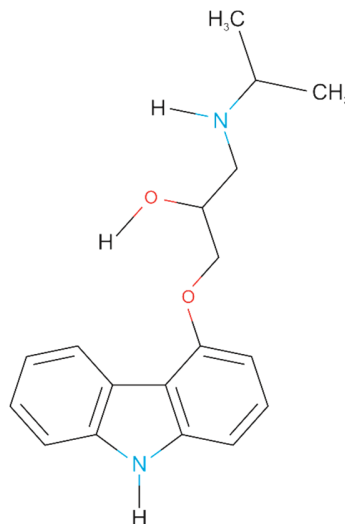
Kemijsko ime: 1-(9H-karbazol-4-iloksil)-3-

(propan-2-ilamino)propan-2-ol

Molekulska formula: C₁₈H₂₂N₂O₂

Povprečna molekulska masa: 298,34 g/mol

Monoizotopska molekulska masa: 298,1681 g/mol



Slika 3: Strukturna formula karazolola.

Karazolol (CZL) spada v skupino beta blokatorjev, ki z vezavo na adrenergične receptorje preprečijo – blokirajo vezavo adrenalina in noradrenalina. Uporablja se kot sedativ, za preprečevanje stresa pri ljudeh in živalih. V veterini se najpogosteje uporablja pri prašičih za preprečevanje stresa pri prevozu živali. Pri prašičih ženskega spola ga uporabljajo tudi za zniževanje stresa pri kotitvi, pri prašičih moškega spola pa za preprečevanje blaznosti med parjenjem. Manj pogosto karazolol uporabljajo pri kravah mlekaricah za preprečevanje

reproduktivnega stresa, pri telitvi in za povečanje uspešnosti osemenitve. Karazolol aplicirajo intramuskularno. Učinkovina začne delovati po 20 – 30 minutah od aplikacije. Učinek pri prašičih traja od 8 do 12 ur, pri govedu pa približno 4 ure (2).

Karazolol se v ljudeh in prašičih metabolizira do farmakološko inertnih produktov (laktata, acetata in glukuronida). MRL vrednosti se v tem primeru nanašajo na karazolol (2). Pri govedu MRL vrednost v mleku znaša 1 µg/kg, v mišičnini in maščobi 5 µg/kg, ter 15 µg/kg v jetrih in ledvicah. MRL vrednost v jetrih in ledvicah prašičev je nekoliko višja in znaša 25 µg/kg, v mišičnini, koži in maščobnem tkivu pa je enaka kot pri govedu in znaša 5 µg/kg (4).

1.1.3. Klorpromazin

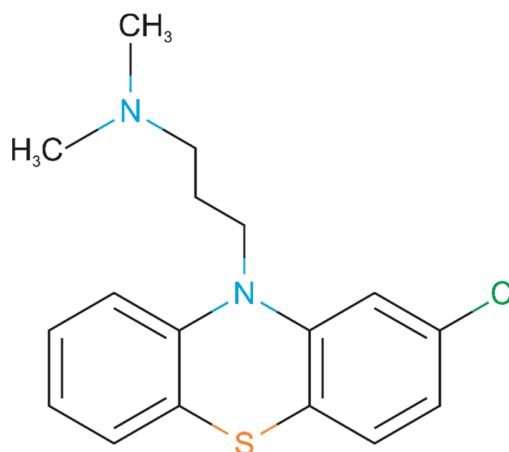
Kemijsko ime: 3-(2-klorofenotiazin-10-il)-

N,N-dimetil-propan-1-amin

Molekulska formula: C₁₇H₁₉ClN₂S

Povprečna molekulska masa: 318,86 g/mol

Monoizotopska molekulska masa: 318,0957 g/mol



Slika 4: Strukturna formula klorpromazina.

Klorpromazin (KP) spada med derivate fenotiazina in deluje predvsem kot blokator dopaminskih receptorjev v sinapsah. Njegova strukturna formula je prikazana na sliki 4. Na trg je prišel leta 1952 v Franciji, kar je revolucionarno spremenilo zdravljenje duševno motenih oseb. Bil je namreč bistveno bolj učinkovit od do tedaj uporabljenih aktivnih spojin morfija in skopolamina v različnih kombinacijah. Klorpromazin se je izkazal kot izredno učinkovito sredstvo za zmanjševanje vznemirjenja, agresije in celo psihotičnih simptomov, kot so halucinacije in blodnje (7). Klorpromazin, ki se uporablja še danes je tako postal prvo antipsihotično sredstvo, ki je na seznamu esencialnih zdravil svetovne zdravstvene organizacije (*angl. World Health Organization (WHO)*) (8).

Neželeni učinki klorpromazina so lahko suha usta, zaspanost, povečanje apetita, nekontrolirano trzanje mišic – spazmi, epileptični napadi, hemolitične anemije, trombocitopenija, sedacija, ki jo izkoriščajo v veterini, nekroza mišic ob intramuskularni aplikaciji in nekateri drugi. Večina neželenih učinkov se pojavi šele po dolgotrajnem jemanju nizkih koncentracij zdravila (9–11). Kontraindikacije prepovedujejo jemanje klorpromazina z zdravili, ki delujejo na CŽS (centralni živčni sistem), z alkoholom ali z drogami. Klorpromazin namreč lahko podaljša in ojača delovanje omenjenih spojin (11).

V veterini se klorpromazin uporablja kot sedativ in sredstvo za preprečevanje bruhanja pri gastrointestinalnih boleznih in zastrupitvah živali s toksini ali zdravili (12). Njegova uporaba je pri živalih, ki so namenjene za proizvodnjo hrane, izrecno prepovedana (4) zaradi možnih resnih neželenih učinkov, do katerih bi lahko prišlo ob daljšem uživanju hrane z vsebnostjo klorpromazina (9,10). V tem primeru, regulativa s področja varne hrane, namesto MRL vrednosti določi najmanjšo vrednost, ki jo mora neka analizna metoda zaznati - MRPL (*angl. Minimum Required Performance Limits*), da je primerna za analizo vzorcev na potencialno prisotnost nedovoljene spojine. Za klorpromazin MRPL vrednost znaša 10 ppb (13).

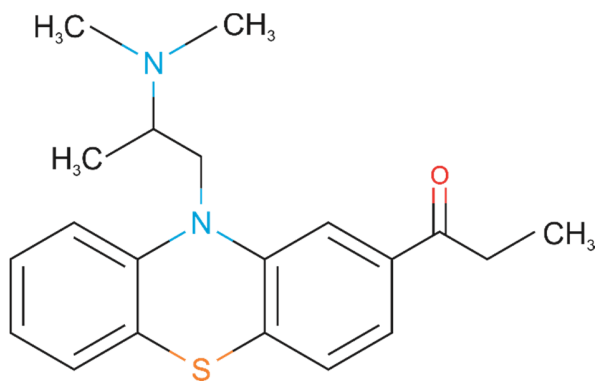
1.1.4. Propiopromazin

Kemijsko ime: 1-(10-(3-(dimetilamino)propil)fenotiazin-2-il)propan-1-on

Molekulska formula: $C_{20}H_{24}N_2OS$

Povprečna molekulska masa: 340,48 g/mol

Monoizotopska molekulska masa: 340,1609 g/mol



Slika 5: Strukturna formula propiopromazina.

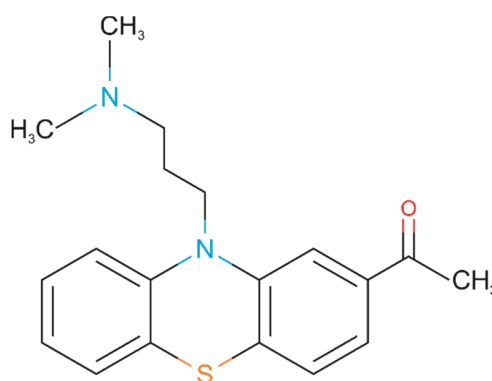
Tako kot klorpromazin tudi propiopromazin (PP) spada med derivate fenotiazina. Strukturna formula PP je prikazana na sliki 5. Klinično se spojin razlikujeta le po učinkovitosti. Propiopromazin ima štirikrat večjo jakost delovanja kot klorpromazin (3). PP je bil v petdesetih in šestdesetih letih dvajsetega stoletja pogosto predpisano zdravilo v veterinarski medicini. Uporabljal se je kot sredstvo za preprečevanje izgube teže, zmanjševanje stresa in agresije živali

med prevozom do klavnice ter neposredno pred samim zakolom živali. PP so uporabljali tudi pri tekmovalnih konjih z namenom izboljšanja zmogljivosti. Kasneje so odkrili, da aplikacija PP pri žrebcih povzroča ireverzibilno erektilno disfunkcijo (3).

Danes je uporaba PP v veterinarski medicini omejena na živali, ki jih ne redijo za hrano. Uporablja se kot antiemetik, sedativ pri rokovanju z agresivnimi živalmi in pred manjšimi operacijami (12). Uporaba PP pri klavnih živalih ni dovoljena, MRPL vrednost znaša 50 ppb (13).

1.1.5. Acepromazin

Kemijsko ime: 1-(10-(3-(dimetilamino)propil)fenotiazin-2-il)etanon
Molekulska formula: $C_{19}H_{22}N_2OS$
Povprečna molekulska masa: 326,46 g/mol
Monoizotopska molekulska masa: 326,1453 g/mol



Slika 6: Strukturna formula acepromazina.

Tudi acepromazin (AP) spada med derivate fenotiazina. Njegova strukturna formula je predstavljena na sliki 6. AP se je brez večjega uspeha v petdesetih letih dvajsetega stoletja pri ljudeh uporabljal za zdravljenje psihoz. Klinična študija na psihiatričnih bolnikih iz leta 1985 ni pokazala značilnih razlik v izboljšanju psihičnega zdravja med skupino bolnikov zdravljenih z AP v primerjavi s skupino, ki je prejela placebo. Tekom študije so ugotovili, da AP poseduje vazodilatatorno delovanje, zaradi česar je pri bolnikih prihajalo do razvoja hipotenzije (14,15).

V veterinarski medicini se AP uporablja kot trankvilant, sedativ, antiemetik in pred anestetik (12). Njegova uporaba pri klavnih živalih, zaradi možne akutne in kronične toksičnosti, ni dovoljena. MRPL vrednost za AP znaša 50 ppb (13).

1.1.6. Ksilazin

Kemijsko ime: *N*-(2,6-dimetilfenil)-5,6-

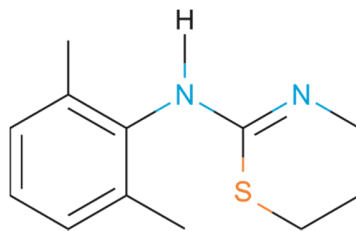
dihidro-4*H*-1,3-tiazin-2-amin

Molekulska formula: C₁₂H₁₆N₂S

Povprečna molekulska masa: 220,33 g/mol

Monoizotopska molekulska masa: 220,1034

g/mol



Slika 7: Strukturna formula ksilazina.

Strukturna formula ksilazina (KSI) je predstavljena na sliki 7. Gre za analog klonidina, ki ga je leta 1962 lansiralo podjetje Bayer, pod imenom Rompun® (16). Zdravilo je bilo registrirano kot veterinarsko, v obliki injekcij ksilazinijevega klorida za intramuskulatno in intravensko aplikacijo, pri konjih in govedu. Uporablja se za sproščanje mišic, sedacijo in analgezijo živali. Učinke KSI je moč pripisati agonističnemu delovanju na adrenergične α_2 receptorje. Zdravilo pri intramuskularni aplikaciji začne učinkovati po 10 do 15 minutah, pri intravenski pa med 3 in 5 minutami. Moč sedacije je odvisna od apliciranega odmerka in navadno traja od 1 do 2 uri, analgezija pa traja med 15 in 30 minutami. Tekom sedacije je opaziti tudi upočasnjeno dihanje, podobno kot pri spanju (17). KSI se uporablja tudi pri ovcah, kozah, lamah in jelenih. Priporočeni odmerek znaša med 0,016 in 8 mg/kg telesne teže. Odmerek je odvisen od živalske vrste, pri čemer je najbolj občutljiva živalska vrsta govedo. KSI, kljub uporabi v priporočenih odmerkih izkazuje različne stranske učinke, kot je midriaza, oslABLJena termoregulacija, depresija dihanja, hiperglikemija. Že en sam odmerek lahko povzroči kratkotrajno povišanje arterijskega tlaka, ki mu sledi daljša hipotenzija (znižanje arterijskega tlaka pod 90/60 mm Hg) in bradikardija (upočasnen srčni utrip pod 60 udarcev na minuto) (16).

Različne študije, ki jih je EMA povzela v preglednem poročilu leta 1999 (16) so pokazale, da se približno 70 % KSI izloči preko ledvic, ter 30 % s fecesom. Razpolovna doba eliminacije pri intravenski in intramuskularni aplikaciji je kratka in znaša med 20 in 60 min, kar so pripisali hitremu metabolizmu. Ena od opisanih študij jo pokazala, da se KSI v 24 urah metabolizira do desetih metabolitov. Po 24 urah so s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (*angl. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*) v urinu v največji meri zaznali prisotnost 2-(3-in/ali 4-hidroksi-2,6-dimetilanilino)-4-okso-5,6-dihidro-1,3-tiazin. Prisotnost nemetaboliziranega KSI in 2,6-ksilidina pa so ovrgli. V drugi študiji so z metodo LC-MS/MS ovrgli prisotnost 2,6-

ksilidina v tkivu goveda po 4 in 24 urah od aplikacije KSI. Dokazana odsotnost morebitnega metabolita 2,6-ksilidina v urinu in tkivu je velikega pomena, kajti omenjena spojina je potencialno genotoksična in kancerogena. Nobena od opisanih študij ni določala metabolitov v kravjem mleku. Vrednosti LD₅₀ za intravensko aplikacijo KSI mišim, podganam, psom in mačkam znaša med 22 in 43 mg/kg, intramuskularno približno 47 mg/kg in peroralno med 130 in 240 mg/kg. Na podlagi omenjenih študij se je CVMP odločil, da MRL vrednosti za KSI ni potrebno postaviti. Prav tako so sklenili, da se KSI ne sme uporabljati pri živalih, katerih mleko je namenjeno humani uporabi (16).

1.1.7. Haloperidol

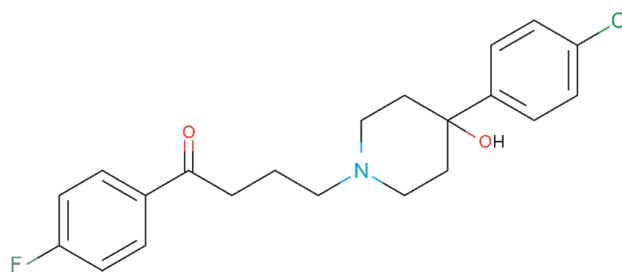
Kemijsko ime: 4-[4-(4-kloro fenil)-4-hidroksi

piperidin-1-il]-1-(4-fluorofenil)butan-1-on

Molekulska formula: C₂₁H₂₃ClFNO₂

Povprečna molekulska masa: 375,9 g/mol

Monoizotopska molekulska masa: 375,1401 g/mol



Slika 8: Strukturna formula haloperidola.

Haloperidol (HAL) spada med derivate butirofenona. Njegova strukturna formula je prikazana na sliki 8. Začetki HAL segajo v leto 1958, ko je Bert Hermans v Jenssenovih laboratorijih, prvič sintetiziral omenjeno učinkovino. HAL deluje kot antagonist dopaminskih D₂ receptorjev. Izkazuje podobne farmakološke učinke kot KP, vendar pri bistveno nižjih odmerkih (18). V humani medicini se uporablja za zdravljenje shizofrenije, bipolarne motnje, delirija, vznemirjenosti, akutnih psihoz in podobno. Med pogostimi neželenimi učinki, ki prizadenejo najmanj enega od desetih bolnikov je agitacija, nespečnost, hiperkinezija in glavobol. Med pogostimi neželenimi učinki, ki prizadenejo med enega na deset in enega na sto pacientov, se nahaja anoreksija, depresija, psihotične motnje, motnje vida, različne bolezni živčevja, kot je tremor ter omotica, lahko se pojavi zaprtost, bruhanje. Med občasnimi, redkimi in zelo redkimi neželenimi učinki, ki prizadenejo enega na 1000, 10.000 in več kot 10.000, pa najdemo levkopenijo, zmedenost, vrtoglavico, tahikardijo, hipertenzija, akutna jetrna odpoved in celo nenadno smrt (19).

HAL se v veterinarski medicini ne uporablja, zaradi česar tudi ni predpisane MRL vrednost. HAL smo vključili v magistrsko delo, ker je relativno poceni sredstvo za doseg sedacije, zaradi česar bi lahko prišlo do njegove zlorabe.

1.2. Analizne metode za določanje ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora

Potencialna nevarnost ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora in njihova prisotnost v izredno nizkih koncentracijah predstavlja velik analitični izziv. Z namenom, da bi zagotovili varno hrano, se poslužujemo različnih analitskih tehnik, s katerimi smo sposobni kvalitativno in/ali kvantitativno ovrednotiti količino rezidualnih zdravil, v različnih zahtevnih matricah.

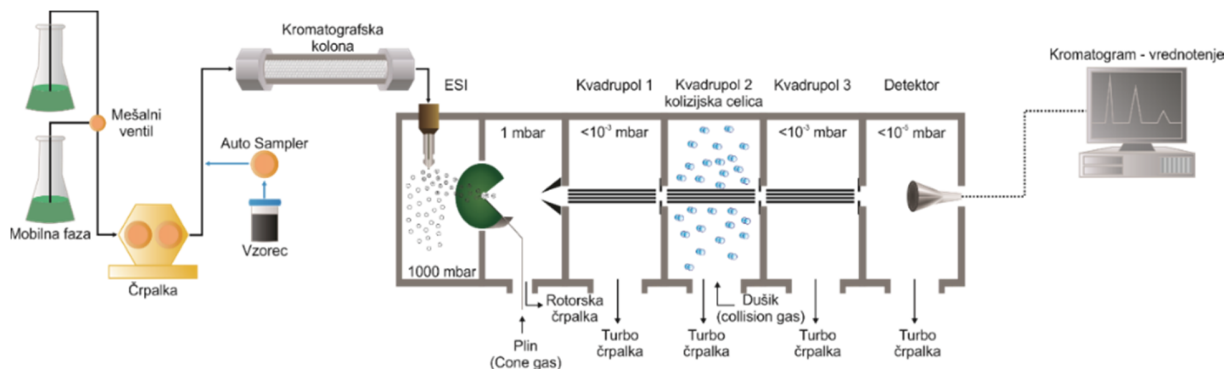
Analizne metode različni viri delijo v različne skupine. EMA analizne metode deli na presejalne in potrditvene (20). Presejalne metode so hitre, njihov namen pa je ločiti sumljive vzorce, ki bi lahko vsebovali iskana rezidualna zdravila v določenih koncentracijah v preiskovani matrici, od negativnih vzorcev. Potrditvene metode so navadno bolj kompleksne in dražje od presejalnih. Kot pove že samo ime, se uporabljajo za nedvoumno potrditev identitete preiskovane spojine. Zaradi svoje občutljivosti in specifičnosti se v ta namen veliko uporablja masna spektrometrija (1).

Podatek o ustreznosti določene metode dobimo s pomočjo validacije metode, ki je proces, pri katerem želimo dokumentirati podatke o natančnosti, točnosti, specifičnosti, občutljivosti in praktičnosti postopka ali procesa (1). V našem primeru smo z validacijo želeli pokazati, da je razvita analizna metoda primerna za kvalitativno in kvantitativno določanje ostankov KP, PP, AP, HAL, AZN, CZL, AZL in KSI v živilih živalskega izvora.

1.2.1. Masna spektrometrija

Masna spektrometrija (MS) je občutljiva in zmogljiva analizna metoda za identifikacijo in kvantifikacijo snovi na podlagi njihove molekulske mase. Masni spektrometer je lahko sklopljen s plinsko (GC-MS) ali tekočinsko (LC-MS) kromatografijo, kar poveča ločljivost in občutljivost metode. Pri našem delu smo uporabili masno spektrometrijo sklopljeno s tekočinskim kromatografom, zato se bomo v nadaljevanju osredotočili na slednjo. Metoda temelji na merjenju razmerja mase molekule proti naboju, zaradi česar je potrebno molekulo iskane spojine pred meritvijo ionizirati. Molekule lahko ioniziramo na različne načine, na primer s kemijsko ionizacijo,

ionizacijo z razprševanjem v električnem polju (ESI), induktivno sklopljeno plazmo in drugimi. Za generiranje ionov smo v našem primeru uporabili ESI metodo, ki deluje tako, da iskana spojina raztopljena v mobilni fazi potuje skozi jekleno kapilarno, ki je izpostavljena visoki napetosti. ESI lahko deluje v dveh načinih in sicer ES⁺ ter ES⁻. Način ES⁺ omogoča določitev protoniranih, ES⁻ pa deprotoniranih ionov. Ob izhodu kapilare se tekočina razprši in tvori majhne kapljice, ki nosijo naboj. Kapljice se nato uparijo in prenesejo naboj na molekule, ki svojo pot preko stožca izpostavljenega nizki napetosti nadaljujejo v masni analizator. Stožec omogoča vstop v analizator samo nabitim delcem. Pri tem lahko pride do razpada nabiti delcev na manjše. Le-ta je odvisen od napetosti na stožcu. Poznamo več vrst analizatorjev, kot so magnetni sektorski analizator, analizator na osnovi časa preleta ionov (*angl. time-of-flight (TOF)*), analizator na osnovi ionske pasti (*angl. ion-trap*), orbitrapTM in kvadrupolni analizator. Obstajajo tudi instrumenti, ki imajo zaporedno vezanih več analizatorjev na primer QTOF, ki ima zaporedno vezana kvadrupolni analizator in analizator na osnovi časa preleta ionov ter LC-MS/MS, ki ima zaporedno vezane tri kvadrupolne analizatorje. V tem magistrskem delu smo uporabil LC-MS/MS spektrometer, katerega shema je predstavljena na sliki 9. LC-MS/MS inštrument lahko deluje na dva načina in sicer v načinu spremljanja ene reakcije (*angl. Selected Reaction Monitoring (SRM)*) ali v načinu spremljanja več reakcij hkrati (*angl. Multiple Reaction Monitoring (MRM)*). V našem primeru smo uporabili način MRM, kjer prvi kvadrupol služi ločevanju ionizirane iskane spojine z določeno (izbrano) m/z od matrice. Izbrani pogoji omogočajo prehod v kolizijsko celico samo tistim protoniranim ali deprotoniranim molekulam, ki imajo določeno razmerje med maso in nabojem (m/z). V kolizijsko celico uvajamo plin, ki je bil v našem primeru argon. Argon služi kot medij za trk z ioni. Od moči trka ter napetosti, je odvisno ali in v kakšni meri izbrana protonirana ali deprotonirana spojina (*angl. Parent ion*) pri tem razpade na manjše ione. Nastalim nabitim delcem pravimo fragmenti ali hčerinski ioni (*angl. Daughter ion*). Razpad protonirana ali deprotonirana spojine lahko kontroliramo preko spremembe kolizijske energije. Protonirana ali deprotonirana spojina in njeni hčerinski ioni nato potujejo skozi tretji kvadrupol, ki prav tako kot prvi, pri določenih pogojih omogoča prehod iskanih ionov do detektorja. Ioni nato trčijo ob detektor, ki trke spremeni v signal. Tega programska oprema pretvori v kromatogram, ki predstavlja rezultat analize (21,22).



Slika 9: Shematski prikaz tekočinskega kromatografa sklopljenega z masnim spektrometrom, ki vsebuje tri kvadrupole.

Kromatogram je predstavljen v obliki grafa, ki prikazuje prisotnost iona z določeno maso proti naboju ob določenem času. Kromatograme v primeru MRM lahko vrednotimo kot vsak posamezni prehod ali pa kot seštevek vseh spremljanih prehodov (*angl. Total Ion Chromatogram (TIC)*). Pri inštrumentih proizvajalca Waters lahko kot TIC vrednotimo vse masne prehode za vse iskane spojine ali masne prehode, ki pripadajo posamezni iskani spojini. V našem delu smo kot posamezni TIC vrednotili seštevek masnih prehodov, ki pripadajo posamezni iskani spojini. Pojem masni prehod predstavlja prehod ionizirane iskane spojine v eno od hčerinskih molekul. Na primer masni prehod za AP predstavlja zapis $m/z\ 327,45 \rightarrow 86,00$. Za kvantitativno določitev iskane spojine uporabimo najstabilnejši masni prehod, ki mu pravimo tudi primarni masni prehod (21,22). Evropska zakonodaja opisana v direktivi 2002/657/EC določa, da je za potrditvene metode, ki temeljijo na masni spektrometriji s katero ne zajamemo celoten masni spekter potrebno doseči 4 tako imenovane identifikacijske točke. 1 točka je pridobljena za elucijo iskane spojine ob zadrževalnem času, ki ustreza zadrževalnemu času standarda in po 1,5 točke za vsak spremljan masni prehod (20). Da bi zadostili evropski zakonodaji smo v našem primeru za vsako posamezno iskano spojino poleg primarnega ionskega prehoda zajemali še dodaten sekundarni masni prehod.

V primeru kadar analiziramo biološke vzorce lahko pride do tako imenovanega efekta matrice. Prisotnost matrice lahko spremeni pridobljeni kromatogram na dva načina. Matrica lahko maskira prisotnost iskane spojine tako, da ga kljub njegovi prisotnosti na kromatogramu ne vidimo. Lahko pa se na mestu odziva iskane spojine pojavi odziv matrice. V slednjem primeru dobimo lažno pozitiven odziv ali v primeru ko je v vzorcu prisotna iskana spojina določimo višjo koncentracijo

iskane spojine kot je dejansko prisotna v vzorcu. Prisotnost efekta matrice je zato potrebno preveriti tekom razvoja ali validacije analizne metode (22).

1.2.2. Validacija analizne metode za določanje ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora

Analizne metode, ki jih želimo uporabljati za določanje ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora na območju evropske zakonodaje, je potrebno validirati po kriterijih, ki so opisani v direktivi evropske komisije 2002/657/EC (20). Tekom validacije je tako potrebno določiti linearnost, selektivnost, ponovljivost, obnovljivost, izkoristek in robustnost metode.

Linearnosti (*angl. linearity*) metode predstavlja določitev koncentracijskega območja v katerem analizna metoda izkazuje linearno odvisnost med dejansko koncentracijo iskane spojine v vzorcu in pridobljenim odzivom. Linearnost določimo tako, da skozi točke na grafu ugotovljene koncentracije posamezne iskane spojine v odvisnosti od dodatka načrtamo premico. Z metodo linearne regresije za dobljeno premico zapišemo enačbo premice, njeno korelacijo s točkami na grafu pa izrazimo kot determinacijski koeficient (23).

Selektivnost (*angl. selectivity*) metode ponazarja sposobnost razlikovanja metode med iskano spojino in drugimi spojinami, ki so tesno povezane, na primer izomeri, metaboliti, sestavinami matrice itd. Pri metodah, ki temeljijo na masni spektrometriji je potrebno pri določanju specifičnosti metode določiti učinek matrice in sposobnost razlikovanja med iskanimi spojinami in internimi standardi (20).

Ponovljivost (*angl. repeatability*) metode pomeni natančnost v pogojih ponovljivosti. Pogoji ponovljivosti pomenijo pogoje, kjer isti operater izvede analizo v istem laboratoriju in isti opremi ter se pri tem dobijo neodvisni preizkusni rezultati. Test ponovljivosti metode je po direktivi 2002/657/EC potrebno izvesti na najmanj šestih paralelkah na vsakem od koncentracijskih nivojev (20).

Obnovljivost (*angl. reproducibility*) metode pomeni natančnost pri pogojih obnovljivosti. Pogoji obnovljivosti pomenijo pogoje, kjer se preskusni rezultati pridobijo z isto metodo na enakih vzorcih (na primer razdeljeni vzorec tkiva) v različnih laboratorijih, z različnimi operaterji, ki uporabljajo različno opremo. V našem primeru smo izvedli interno laboratorijsko obnovljivost, ker smo obnovljivost testirali v istem laboratoriju (20).

Izkoristek (*angl. recovery*) metode je določen kot odstotek dejanske koncentracije snovi in koncentracije, ki se med analiznim postopkom pridobi nazaj. Po direktivi 2002/657/EC se izkoristek metode lahko uporablja pri izračunu vsebnosti iskane spojine v vzorcu samo takrat, ko je le-ta stalni. Kadar se izkoristek metode med vzorci spreminja, lahko za ničliranje izkoristka pri izračunu vsebnosti iskane spojine uporabimo metodo internega standarda (20,23).

Robustnost (*angl. ruggedness*) metode pomeni njeno občutljivost za spremembe v eksperimentalnih pogojih, ki se lahko izražajo na različne načine. Na primer spremembe pri pripravi mobilne faze, sprememba temperature kromatografske kolone, sprememba živalske vrste vzorca. V našem primeru smo robustnost metode testirali z izvedbo analize na vzorcih različnih živalskih vrst (20).

1.3. Literaturni pregled metod za določanje sedativov

Po pregledu literature smo opazili, da so različni avtorji za določanje spojin, ki so predmet moje magistrske naloge, uporabili različne analizne metode. V starejših virih se pojavlja Encimska imunoabsorpcijska preiskava (*angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)*) (24) in HPLC z ultravijolično/vidno detekcijo (*angl. Ultraviolet Spectroscopy (UV)*) in fluorescenčno detekcijo (*angl. Fluorescent Light Detection (FLD)*) (25–28), v novejših pa LC-MS/MS (29–33). Avtorji so v večini objavljenih metod kot medij za ekstrakcijo iskanih spojin iz matrice izbrali acetonitril. Yoichi Aoki (29) in Ney Carter Borges (30) s sodelavci sta se ekstrakcije lotila z dodatkom različnih organskih topil. Dodatkom organskega topila je sledilo mešanje ter centrifugiranje in ponovni dodatek organskega topila. Organske faze so združili in posušili pod tokom dušika ter rekonstituirali v acetonitrilu. Vzorčenje, pripravo in čiščenje vzorcev smo v večini povzeli po predhodnih diplomskih delih Eve Lipičar (25) in Žiga Zupaneka (26). Pri razvoju analizne metode, pa smo si pomagali s članki, kjer so za analizo ostankov sedativov v različnih matricah uporabili masno spektrometrijo (29,31,33). Pregled del je zbran v preglednici 1.

Preglednica 1: Pregled najpomembnejših objav za razvoj naše metode.

MATRICA	ISKANA SPOJINA	PRIPRAVA VZORCA		KROMATOGRAFSKI POGOJI				DETEKCIJA	MEJA ZAZNAVE	LITERATURA
		EKSTRAKCIJA	ČIŠČENJE EKSTRAKTA	MOBILNA FAZA	F [ml/min]	KROMATOGRAFSKA KOLONA	T _{kolone} [°C]			
Ledvica	KP AP PP CZL KSI AZL AZN	ekstr. z CH ₃ CN, UZ kopel, vorteks, centrifugiranje, supernatantu dodana voda	SPE kolone Strata-X-C (500 mg, 6 ml, Phenomenex), kondicioniranje z metanolom, spiranje z 0,1 M HCl in 0,1 M HCl v metanolu, elucija z amonijakom v metanolu, sušenje pod tokom N ₂ , rekonstitucija z mobilno fazo (A:B = 70:30 V/V), vorteks, UZ kopel, filtracija skozi 0,45 µm filter	Gradientna elucija Komponenta A: 0,01 M CH ₃ COONa pH= 4,6 Komponenta B: Acetonitril	0,8	HPLC Merck, Lichrospher 60 RP-Select B, 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm delci	40	DAD: λ = 240 nm λ = 245 nm λ = 256 nm FLD: λ _{eks} = 245 nm λ _{em} = 345 nm	5 µg/kg (KP) 5 µg/kg (AP) 5 µg/kg (PP) 5 µg/kg (CZL) 10 µg/kg (KSI) 5 µg/kg (AZL) 5 µg/kg (AZN)	E. Lipičar (25)
Jajca Ledvica Mleko Urin	KP AP PP CZL KSI AZL AZN	ekstr. z CH ₃ CN, UZ kopel, vorteks, centrifugiranje, supernatantu dodana 0,05 M raztopina CH ₃ COONH ₄ pH = 5,0	SPE kolone Evolute® CX-50 (200 mg, 6 ml, Biotage), spiranje z metanolom, elucija z amonijakom v metanolu, sušenje pod tokom N ₂ , rekonstitucija z mobilno fazo (A:B = 70:30 V/V), vorteks, UZ kopel, filtracija skozi 0,45 µm filter	Gradientna elucija Komponenta A: 0,01 M CH ₃ COONa pH= 4,6 Komponenta B: Acetonitril	0,7	HPLC Merck Millipore, Cromolith HighResolution RP-18 endcapped, 100 mm x 4,6 mm i.d., velikost makro por 1,15 µm, velikost mezo-por 15 nm	15	DAD: λ = 240 nm λ = 245 nm λ = 256 nm FLD: λ _{eks} = 245 nm λ _{em} = 345 nm	2 µg/kg v levicah in urinu, 1 µg/kg v mleku in jajcih (KP) 2 µg/kg v levicah in urinu, 1 µg/kg v mleku in jajcih (AP) 1 µg/kg (PP) 0,5 µg/kg (CZL) 4 µg/kg v ledvicah, 5 µg/kg v mleku in jajcih, 6 µg/kg v urinu (KSI) 1 µg/kg (AZL) 1 µg/kg (AZN)	Ž. Zupanek (26)

Mišičnina Maščoba Jetra Mleko Jajca	AZN AZL	dodatek 1 M NaOH, homogenizacija, dodatek vode, homogenizacija, dodatek NaCl in n-heksn-isoamilalkohol, stresanje, centrifugiranje, odstranitev organske faze, 2x ponovitev ekstrakcije z n-heksn-isoamilalkoholom	Sušenje združene organske komponente pri znižanem tlaku in temperaturi 45 °C, rekonstitucija z CH ₃ CN in 0,025 % dietilamina v vodi (2:3 V/V)	Izokratska elucija CH ₃ CN : 0,4 % fluoropentanojska kislina = 70:30 V/V	0,2	HPLC Wakosil-II 5C18 RS, 150 mm x 2,0 mm i.d., 5 µm delci	30	LC-MS/MS ESI+ F _{heat. gas} = 8 L/min P _{nebu.} = 15 psi P _{curt.} = 12 psi P _{coll.} = 6 psi T _{source} = 425 °C	25 µg/kg	Y. Aoki et. al. (29)
Mišičnina Maščoba Ledvica Jetra	KSI 2,6-ksilidin	dodatek brezvodnega Na ₂ SO ₄ , ekstr. z CH ₃ CN ali razt. amonijaka v CH ₃ CN (za maščobo), stresanja, centrifugiranje, ponovitev ekstr. z CH ₃ CN	Sušenje združenega ekstrakta skoraj do suhega pod tokom N ₂ , redčenje z CH ₃ CN, dodatek heksana, redčenje vodne plasti z vodo v razmerju 2:8 V/V, filtracija skozi 0,22 µm filter	Gradientna elucija Komponenta A: 0,1 % HCOOH Komponenta B: Acetonitril	0,3	HPLC Waters, Atlantis T3, 100 mm x 2,1 mm i.d., 3 µm delci	30	LC-MS/MS ESI+ U _{is} = 5500 V P _{nebu.} = 60 psi P _{nebu. aux.} = 70 psi P _{curt.} = 30 psi U _{coll.} = 5 V T _{source} = 500 °C	0,2 µg/kg (KSI) 5 µg/kg 2,6-ksilidin	X. Zheng et. al. (31)
Krma	KP 9 spojin iz skupine β-agonistov 5 spojin iz skupine psihotera pevtikov	ekstr. z CH ₃ CN, UZ kopel, centrifugiranje	SPE kolone MCX (60 mg, 3 ml), kondicioniranje z metanolom in vodo, spiranje z vodo in 10 % metanolom, elucija z 5 % raztopino amonijaka v metanolu, sušenje pod tokom N ₂ , rekonstitucija z acetonitrilom z 0,1 % HCOOH (20:80 = V/V), filtracija skozi 0,22 µm filter	Gradientna elucija Komponenta A: 0,1 % HCOOH Komponenta B: Acetonitril	0,2	HPLC Bonna-Agela China, Agela MP-C18, 150 mm x 2,1 mm i.d., 3,5 µm delci	25	LC-MS/MS ESI+ U _{is} = 4200 V T _{source} = 320 °C	1 µg/kg (KP)	D. C. Suo et. al. (33)

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je izdelati potrditveno analizno metodo za določevanje ostankov sedativov v živilih živalskega izvora, ki bo temeljila na masni spektrometriji. Razvoj novih analiznih metod za odkrivanje ostankov veterinarskih zdravil v čim nižjih koncentracijah je izrednega pomena zaradi možnih resnih neželenih učinkov po zaužitju živil zdravljenih živali. Sedativi se pri rejnih živalih pogosto uporabljajo. Predvsem pri prašičih, ki so posebno dovzetni za stresne situacije kot je prevoz do klavnice.

Za analizo bomo izbrali azaperon, njegov aktivni metabolit azaperol, karazolol, klorpromazin, propiopromazin, acepromazin, ksilazin in haloperidol. Izbiri konkretnih učinkovin je botrovala pretekla uporaba acepromazina, propiopromazina in klorpromazina v veterinarski medicini, ki jih sedaj ni več dovoljeno uporabljati. Od navedenih spojin je klorpromazin izrecno prepovedan. Trenutno se na seznamu dovoljenih sedativov nahajajo azaperon, karazolol in ksilazin. V nabor iskanih sedativov bomo dodali še edini aktivni metabolit azaperona – azaperol, ker se prisotnost azaperona vrednoti kot seštevek azaperona in azaperola na kg matrice. Haloperidol bomo dodali, ker je na tržišču relativno poceni sredstvo za dosego sedacije, zaradi česar bi lahko prišlo do njegove zlorabe.

Analizno metodo bomo validirali in tako potrditi njeno ustreznost z obstoječo evropsko zakonodajo. Ta je zajeta v direktivi evropske komisije 2002/657/EC (20) in se nanaša na ustreznost analiznih metod za določanje ostankov veterinarskih zdravil. Direktiva predpisuje, da je potrebno validacijo izvesti na treh nivojih, ki za spojine z MRL vrednostjo znašajo 50, 100 in 150 % MRL vrednosti. Za vse izbrane spojine, bomo v postopku validacije določili iste koncentracijske nivoje, ki smo jih postavili glede na najnižjo MRL vrednost izbranih spojin, katera pripada karazololu in znaša 1 µg/kg matrice.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Standardi

Acepromazin maleat 98,9 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, CAS No. 3598-37-6 (AP)

Azaperol 99,7 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 2804-05-9 (AZL)

Azaperon 98,5 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, CAS No. 1649-18-9 (AZN)

Azaperon-D₄ 99,8 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 1173021-72-1 (AZN-D)

Haloperidol ≥ 98 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 52-86-8 (HAL)

Haloperidol-D₄ $100 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 136765-35-0 (HAL-D)

Karazolol 99,0 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, CAS No. 57775-29-8 (CZL)

Karazolol-D₇ 99,5 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 1173021-02-7 (CZL-D)

Klorpromazin klorid 99,2 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, CAS No. 69-09-0 (KP)

Klorpromazin-D₆ klorid 99,6 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 1228182-46-4 (KP-D)

Ksilazin klorid 98,0 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, CAS No. 23076-35-9 (KSI)

Ksilazin-D₆ 99,9 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 1228182-53-3 (KSI-D)

Propiopromazin klorid 99,5 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 7681-67-6 (PP)

3.2. Reagenti

Acetonitril LC-MS 99,9 %, 34967, Fluka, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 75-05-8

Amonijak 32 %, A990.1, Carl Roth GmbH + Co KG, CAS No. 1336-21-6

Amonijev acetat 98 %, 32301, Sigma-Aldrich Corporation, CAS No. 631-61-8

Metanol (Ultra) Gradient HPLC grade 99,8 %, 8402, J. T. Baker, Avantor Performance Materials Inc., CAS No. 67-56-1

Prečiščena voda, Milli-Q, $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$, Millipore Corporation, Merck KGaA

3.3. Naprave in pribor

Analitska kolona, Zorbax Eclipse Plus C18, $2,1 \times 50$ mm, $1,8 \mu\text{m}$ delci, Lot: USWEX89468, Agilent

Analitska kolona, Zorbax Eclipse Plus C18, $2,1 \times 50$ mm, $1,8 \mu\text{m}$ delci, Lot: USDAY33385, Agilent

Analitska kolona, Acquity UPLC® BEH C18, $2,1 \times 50$ mm, $1,7 \mu\text{m}$ delci, Lot: 017830145256 12, Waters

SPE-kolone, Evolute® CX-50, 200 mg, 6 ml, Biotage, Sartorius AG

PTFE filter, PHENEX, velikost por $0,45 \mu\text{m}$, notranji premer 4 mm, Phenomenex Inc.

PTFE filter, Iso-Disc™, velikost por $0,45 \mu\text{m}$, premer 13 mm, Supelco

PTFE filter, Millipore, velikost por $0,45 \mu\text{m}$, premer 25 mm, Merck Millipore

Silanizirane vial, temno steklo, 1,5 ml, Agilent Technologies Inc.

Steklovina, plastične kapalke, nastavki za avtomatske pipete in ostal potrošni material.

Analitska tehtnica, Excellence Plus XP205 DeltaRange, $\Delta m = 0,01$ mg, Mettler-Toledo GmbH

Aparatura za SPE, Vacuum manifold, Supelco, Sigma-Aldrich Corporation

Rotor stator homogenizator, Ultra-Turrax® T25, IKA

Laboratorijski mlin, Grindomix GM200, Fisher Scientific

Avtomatska pipeta 10-100 μl , 8515296, BioHit

Avtomatska pipeta 100-1000 μl , 3557606, Eppendorf Research

Centrifuga s hlajenjem, Minifuge 3 S-R, Heraeus

Evaporator s prepihovanjem z dušikom, N-EVAP No. 111, Organomation

pH-meter, MeterLab PHM210, Radiometer analytical SAS

Precizna tehtnica, PB303-S, $\Delta m = 1 \text{ mg}$, Mettler-Toledo GmbH

Ultrazvočna kopel, Sonis 4, Iskra d.d.

Vorteks stresalnik, Multi Reax, Heidolph

Vorteks stresalnik, Vibromix 10, Tehnica, Domel d.o.o.

Tekočinski kromatograf sklopljen z masno spektrometrijo z ESI ionizacijo in MS/MS detekcijo, Xevo TQ MS, Waters

Programska oprema za upravljanje s tekočinskim kromatografom sklopljenim z masno spektrometrijo MassLynx različica 4.1

3.4. Biološki material

Uporabljeni biološki vzorci jajc, ledvic, mleka in urina različnih živalskih vrst so bili predmet uradnega nadzora živil živalskega izvora v Republiki Sloveniji. Vsi uporabljeni vzorci so bili predhodno analizirani po že uveljavljeni, akreditirani, presejalni metodi, ki je bila osnovana na podlagi diplomskih del Eve Lipičar (25) in Žiga Zupaneke (26). Omenjena presejalna metoda je uporabljene vzorce označila kot negativne na prisotnost acepromazina, azaperona, azaperola, klorpromazina, karazolola in propiopromazina.

3.5. Osnovne standardne raztopine

Osnovne raztopine standardov smo pripravili tako, da smo standarde pomirjeval raztopili v acetonitrilu in kvantitativno prenesli v temne, silanizirane bučke. Masna koncentracija AP je znašala približno 0,7 g/L, HAL-D₆ 0,1 g/L, vse ostale standardne raztopine pa so imele koncentracijo 1 g/L.

3.6. Delovne standardne raztopine

Iz osnovnih standardnih raztopin (OS) smo pripravili delovne standardne raztopine (RS) s koncentracijami 25 ng/mL, ki smo jih uporabili za nastavitev pogojev delovanja masnega spektrometra. In mešanice delovnih standardnih raztopin s koncentracijami med 1 in 25 ng/mL (1, 2, 3, 4, 6, 10, 20 in 25 ng/mL). Pripravili smo dve različni mešanici. Mešanico raztopin, ki je vsebovala AP, AZL, AZN, HAL, KP, CZL, PP in KSI, smo uporabili kot dodatek za obogatitev vzorcev. Mešanico raztopin, ki je vsebovala AZL-D₄, HAL-D₄, KP-D₆, CZL-D₇ in KSI-D₆, pa kot

interni standardni dodatek. Dodatek osnovne raztopine HAL-D₄ smo v nekaterih primerih izpustili. Delovne standardne raztopine smo pripravili v temnih silaniziranih bučkah tako, da smo vanje odpipetirali ustrezen volumen osnovne standardne raztopine in jih razredčili do oznake volumna z mešanico acetonitrila in vode v začetnem razmerju mobilnih faz. Z redčenjem smo nadaljevali po predhodnem postopku, dokler nismo dobili ustreznih koncentracij delovnih standardnih raztopin.

3.7. Mobilne faze in ostale raztopine za delo

0,05 M raztopina amonijevega acetata s pH vrednostjo 5,0:

Izračunano količino soli smo raztopili v približno 10 vol. % končnega volumna vode in kvantitativno prenesli v ustrezno merilno bučko. Raztopino smo razredčili do oznake volumna in z uporabo brezvodne očetne kisline uravnali pH vrednost na $5,0 \pm 0,05$. Tako pripravljeno raztopino smo do uporabe shranili v hladilniku.

6 vol. % raztopina amonijaka v metanolu:

Ustrezno količino 32 % raztopine amonijaka smo odpipetirali v ustrezno količino metanola ter premešali z uporabo magnetnega mešala. Za vsakega od analiziranih vzorcev smo uporabili 4 ml raztopine, zato smo navadno pripravili približno 150 ml raztopine. Ker sta, tako amonijak kakor metanol, pri standardnih pogojih lahko hlapna, smo raztopino pripravili tik pred uporabo.

Mobilna faza A:

5 vol. % raztopina acetonitrila v prečiščeni vodi Milli-Q, ki smo ji naknadno dodal 3,5 vol. % 32 % raztopine amonijaka. Raztopino smo zmešali z uporabo magnetnega mešala in jo filtrirali skozi 0,45 µm politetrafluoroetilenski (PTFE) filter. Za vsako analizo smo pripravili svežo mobilno fazo.

Mobilna faza B:

Čistemu acetonitrilu smo dodali 3,5 vol. % 32 % raztopine amonijaka. Raztopino smo zmešali z uporabo magnetnega mešala in jo filtrirali skozi 0,45 µm PTFE filter. Za vsako analizo smo pripravili svežo mobilno fazo.

3.8. Vzorčenje, priprava in čiščenje vzorcev

Splošno znano dejstvo je, da je uporabnost rezultatov analiz ostankov veterinarskih zdravil v živilih zelo odvisna od samega vzorca. Vzorec je potrebno odvzeti tako, da predstavlja celoto – je reprezentativen. Pri vzorčenju živil lahko tu nastane velik problem, kajti nekaj zbranih vzorcev mora predstavljati celotno stanje kvalitete določenega živila na velikem geografskem področju. Nekaj odvzetih vzorcev govejega mesa iz različnih klavnic in trgovin bo predstavljalo kakovost mesa v celotni državi z obzirom na testirano spojino – v našem primeru količino prisotnih sedativov. V Sloveniji za pripravo načrta vzorčenja in samo odvzemanje vzorcev skrbi UVHVVR (Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin) (34). Zbrane vzorce nato prinesejo v naprej izbrane in imenovane akreditirane laboratorije, da ti izvedejo analize. Del tako pridobljenih vzorcev smo porabili za to magistrsko nalogo.

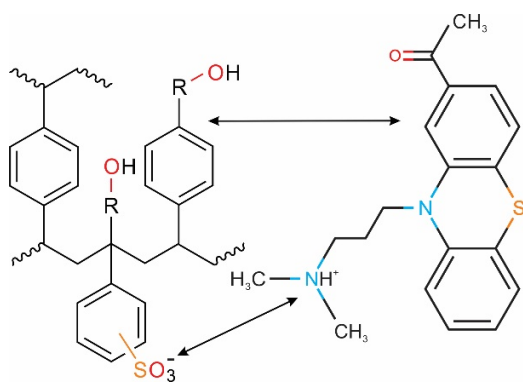
Vzorke ledvic smo homogenizirali z uporabo laboratorijskega mlina. Jajca smo pred izvedbo ekstrakcije pripravili z rotorstator homogenizatorjem. Vzorce mleka in urina smo ročno stresali v sami embalaži. Iz tako pripravljenih vzorcev smo nato po sledečem postopku čiščenja pripravili vzorce za injiciranje v LC-MS/MS.

Čiščenje vzorcev je v primerih, ko za analizo uporabljamo fizikalno kemijske tehnike, izrednega pomena. S čiščenjem vzorca želimo doseči dvoje. Iz vzorca želimo eliminirati makromolekule in druge snovi v matrici, ki bi lahko motile nadaljnje procese kot je kromatografija in detekcija iskane spojine. Hkrati si želimo v vzorcu morebitno prisotne iskane spojine skoncentrirati, kar nam omogoča doseganje nižje meje zaznave. Pri čiščenju vzorcev smo postopali podobno kot moj predhodnik Ž. Zupanek (26), z nekaj ključnimi spremembami.

Postopek čiščenja smo začeli s tehtanjem tako, da smo po $1 \pm 0,05$ g homogeniziranega vzorca natehtali v 15 ml centrifugirke. Delo smo izvajali v serijah. V vsaki seriji smo imeli negativne - slepe in serijo obogatenih vzorcev. Slepi in obogateni vzorci so služili kot kontrola ustreznosti čiščenja znotraj serije. Serija obogatenih vzorcev je predstavljala tudi umeritveno krivuljo v matrici. Kadar smo imeli v seriji različne matrice, smo za vsako pripravili slepi in serijo obogatenih vzorcev. Obogatene vzorce smo pripravili tako, da smo negativnemu vzorcu dodali ustrezno količino mešanice standardnih raztopin s koncentracijami od 1 do 3 ng/ml, ki je ustrezala 0,5, 1,0 in 1,5 µg iskane spojine na kilogram vzorca.

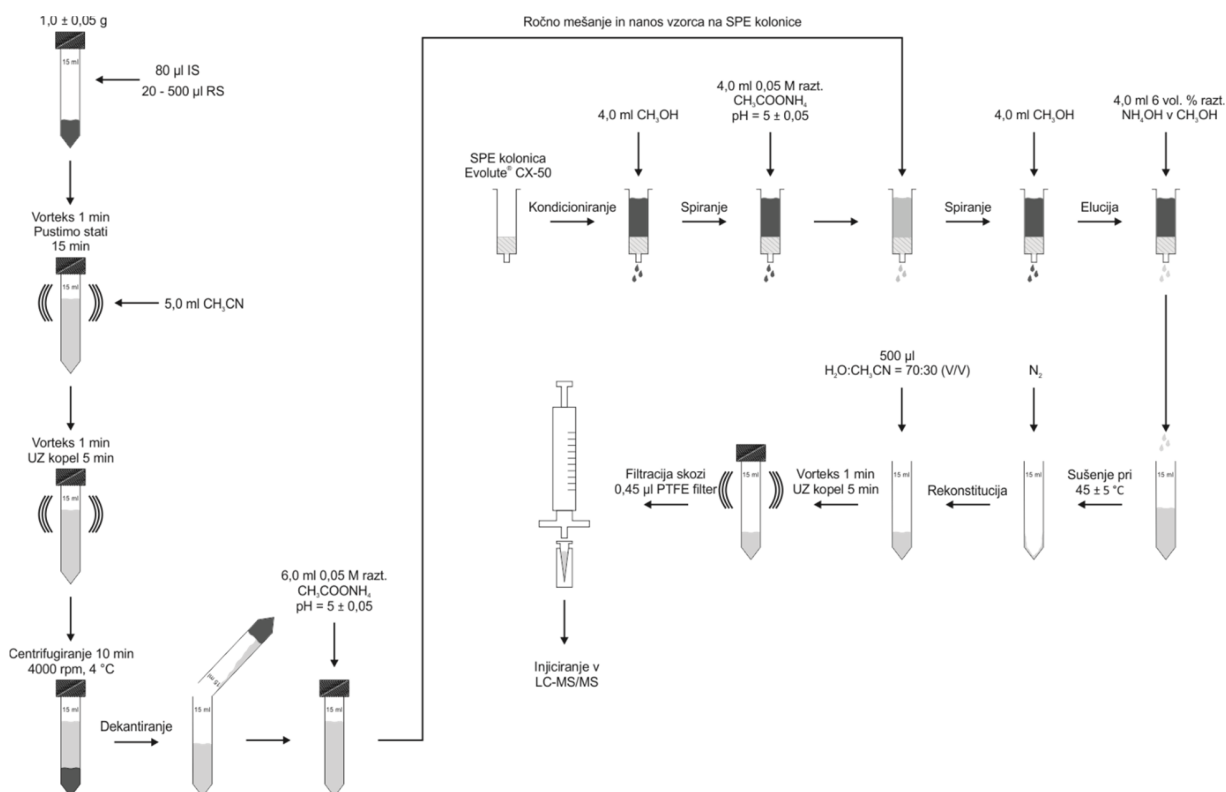
V primerih, ko smo uporabili interni standard, smo ga dodali vsem slepim in obogatenim vzorcem. Primeri bodo podani pri opisovanju razvoja LC-MS/MS metode, dodali 80 μ l mešanice raztopine internega standarda (IS) s koncentracijo 2 ng/ml, kar ustreza 2 μ g vsake od iskanih spojin na kilogram vzorca. Vzorce smo po dodatku standardov stresali na vorteksu 1 minuto. Tako stresene vzorce smo pustil stati 15 minut, da so se molekule iskanih spojin porazdelile po vzorcu, s čimer smo želeli simulirati vzorce, kjer je iskana spojina lahko prisotna v celicah in, ali je na njih vezan. Vzorcem smo nato dodali po 5,0 ml acetonitrila, ki služi kot sredstvo za obarjanje proteinov in medij za ekstrakcijo ostankov zdravil na trdni fazi. Vzorce smo ponovno stresali 1 minuto na vorteksu in 5 minut na ultrazvočni (UZ) kopeli. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje v predhodno ohlajeni centrifugi pri 4 °C in 4000 rpm ($r = 19,2$ cm). Supernatant smo oddekantirali v novo 15 ml centrifugirko, preostanek pa zavrgli. Supernatantu smo dodali 6,0 ml 0,05 M raztopine amonijevega acetata s pH vrednostjo $5 \pm 0,05$ in vzorce ročno pretresli.

S čiščenjem vzorcev smo nadaljevali na kolonah Biotage: Evolute® CX-50 za ekstrakcijo trdno tekoče, ki smo jih aktivirali z dodatkom 4,0 ml metanola in sprali z 4,0 ml 0,05 M raztopine amonijevega acetata s pH vrednostjo $5 \pm 0,05$. Na aktivirane in sprane kolone smo nanesti raztopine vzorcev in počakali, da je raztopina počasi kapljala skozi dno kolone s hitrostjo približno 1 do 2 kapljici na sekundo. Molekule iskane spojine so pri tem interagirale s stacionarno fazo na kolonah. Primer interakcije je shematsko prikazal na sliki 10. V prikazanem primeru gre za ionsko interakcijo med sulfonsko skupino stacionarne faze in aminske skupino AP ter hidrofobne interakcije med benzenovima obročema v stacionarni fazi in AP.



Slika 10: Interakcije molekule AP s stacionarno fazo na koloni Biotage: Evolute® CX-50.

Kolone smo sprali z dodatkom 4,0 ml metanola. Iskane spojine s kolon pa smo eluirali v 15 ml centrifugirke, z dodatkom 4,0 ml 6 vol. % raztopine amonijaka v metanolu. Eluat smo posušili do suhega pod tokom dušika pri temperaturi $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Suhi ostanek smo rekonstituirali z dodatkom 500 μl mešanice vode in acetonitrila v razmerju 70:30 V/V. Vzorce smo nato stresali 1 minuto z vorteksom in 5 minut v UZ kopeli, ter jih filtrirali skozi 0,45 μm PTFE filter v konusne vial. Celoten proces čiščenja vzorcev je shematsko prikazan na sliki 11.



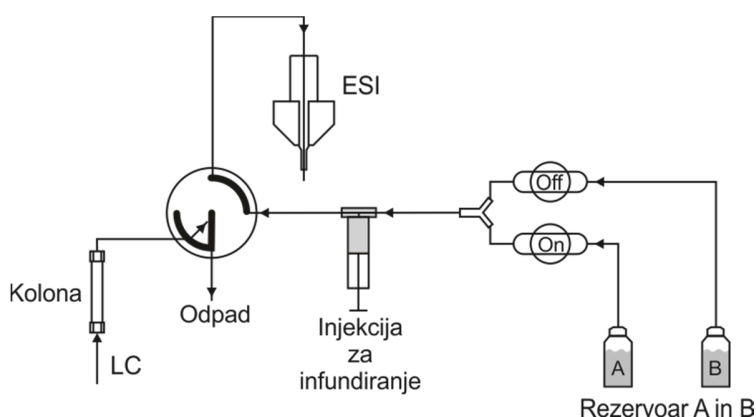
Slika 11: Shematski prikaz procesa čiščenja vzorcev.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Razvoj analizne metode z LC-MS/MS

Postavitev analizne metode za LC-MS/MS smo začeli s snemanjem masnih spektrov posameznih spojin tako, da smo vsako spojino posebej, s pomočjo polžne črpalke, dovajali direktno v ionski izvor na masnem spektrometru, kot je prikazano na sliki 12. Med dovajanjem iskanih spojin smo s pomočjo programske opreme avtomatsko poiskali primerne masne prehode. Za natančnejšo meritev smo nato napetost na stožcu in kolizijsko energijo spreminjali ročno, tako da smo dobili

ustrezne masne prehode, ki so skupaj z nastavitvami masnega spektrometra zbrane v preglednici 2. Masni prehodi, ki smo jih uporabili za kvantitativno določitev iskane spojine, so v preglednici označene z *, sekundarni uporabljeni masni prehodi pa z **. Nastavljeni parametri masnega spektrometra, ki jih tekom razvoja nismo spreminjali, so napetost na kapilari, ki je znašala 3,00 kV, desolvacijska temperatura 500 °C, temperatura ionskega izvora 150 °C, pretok desolvacijskega plina 500 l/h ter pretok plina na stožcu 20 l/h.



Slika 12: Shematski prikaz dela LC-MS/MS, ki prikazuje potek dovajanja standarda.

Preglednica 2: Masni prehodi in nastavitve masnega spektrometra za iskane spojine.

Iskana spojina	M _{mono.} [g/mol]	Št. prehoda	m/z Starševski	m/z Hčerinski	Napetost na stožcu	Kolizijska energija	Ionski način
acepromazin	326,1	1	327,45	86,00*	22	18	ES+
		2	327,45	57,92**	22	26	ES+
		3	327,45	254,19	22	22	ES+
azaperon	327,2	1	328,42	122,95*	22	36	ES+
		2	328,42	165,10**	22	20	ES+
		3	328,42	94,93	22	54	ES+
azaperol	329,2	1	330,42	121,06*	22	22	ES+
		2	330,42	149,07**	22	30	ES+
		3	330,42	109,00	22	46	ES+
aaloperidol	375,1	1	376,39	165,09**	24	24	ES+
		2	376,39	123,01*	24	36	ES+
		3	376,39	94,93	24	60	ES+
karazolol	298,2	1	299,42	116,04*	26	20	ES+
		2	299,42	222,15	26	20	ES+
		3	299,42	73,95**	26	26	ES+
klorpromazin	318,1	1	319,39	86,00*	22	18	ES+
		2	319,39	57,92**	22	28	ES+
		3	319,39	214,08	22	40	ES+

propiopromazin	340,2	1	341,42	86,00*	22	18	ES+
		2	341,42	57,92**	22	28	ES+
		3	341,42	268,27	22	24	ES+
ksilazin	220,1	1	221,26	89,98*	28	20	ES+
		2	221,26	164,11**	28	24	ES+
		3	221,26	72,05	28	32	ES+

* Masni prehod za določitev koncentracije iskane spojine

** Sekundarni masni prehod

Nadaljevali smo z izbiro mobilnih faz. Za mobilno fazo A smo izbrali 5 vol. % raztopino acetonitrila v vodi, ki smo ji dodali 3,5 vol. % amonijaka, za mobilno fazo B pa acetonitril s 3,5 vol. % amonijaka. Mobilni fazi smo pripravljali dnevno, po postopku opisanem pod točko 3.2. priprava raztopin, ker sta acetonitril in amonijak pri standardnih pogojih lahko hlapna. Separacijo iskanih spojin smo izvajali na analitski koloni Zorbax Eclipse Plus C18, dimenzij 2,1 × 50 mm z 1,8 µm delci proizvajalca Agilent. Sledila je sestava instrumentalne metode za tekočinski kromatograf, ki smo jo poimenovali *Sedativi*. Pretok mobilne faze smo nastavili na 0,3 ml/min, volumen injiciranja pa na celotno zanko (*angl. full loop*), ki je imela v našem primeru prostornino 10 µl. Temperaturo kolone smo nastavili na 50 °C, temperaturo avtomatskega vzorčevalnika pa na 20 °C. Ker so si molekule iskanih spojin zelo podobne, smo predvideli uporabo gradientne elucije. Za lažji začetek smo uporabili linearni gradient z začetkom na 100 vol. % mobilne faze A. Delež mobilne faze se je linearno spreminjal do 5 minute, kjer je dosegel 100 vol. % mobilne faze B. Pri izbranih pogojih smo injicirali vsako posamezno iskano spojino s koncentracijo 25 ng/ml. Zadrževalni (retencijski) časi nastalih vrhov (t_R) in ločljivosti (R_s) med njimi so zbrani v preglednici 3. Za izračun ločljivosti med sosednjimi vrhovi smo uporabili enačbo 1, kjer R_s predstavlja ločljivost med vrhovoma, t_R zadrževalni čas, W_b pa širino posameznega vrha na bazni liniji.

Enačba 1: Ločljivost med vrhovoma:
$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})/2}$$

Preglednica 3: Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih pri analizi metodi *Sedativi*.

Iskana spojina	Oznaka	Zadrževalni čas - t_R [min]	Ločljivost sosednjih vrhov - R_s
klorpromazin	KP	5,05	1,7
propiopromazin	PP	4,75	1,5
acepromazin	AP	4,49	3,2
haloperidol	HAL	3,85	0,9
azaperon	AZN	3,66	1,3

karazolol	CZL	3,43	0,3
azaperol	AZL	3,38	0,5
ksilazin	KSI	3,29	/

Kot je razvidno iz preglednice 3, se pri uporabi metode *Sedativi*, iskane spojine eluirajo zelo blizu ena drugi, kar je nezaželeno. Z istočasnim spremljanjem večjega števila različnih spojin z različnimi molskimi masami, namreč masni spektrometer spremlja določeno molsko maso manj časa, kot v primeru spremljanja le ene. Povečevanje števila različnih molskih mas, ki jih mora spremljati masni spektrometer privede do upada občutljivost instrumenta. Zato smo se odločili za spremembo gradienta opisanega v preglednici 4, ki smo ga nastavili v novi metodi z imenom *Sedativi1*.

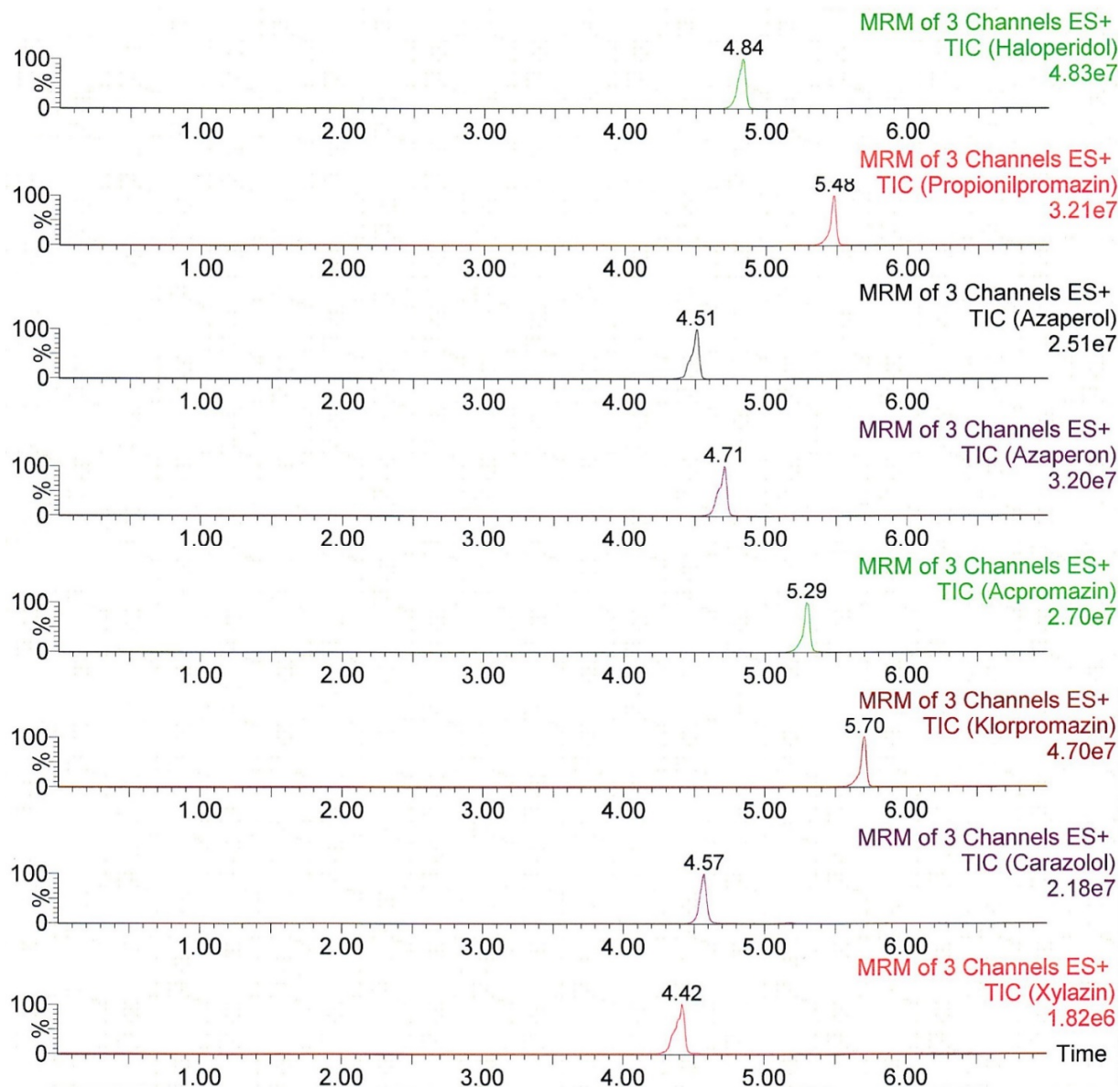
Preglednica 4: Sestava gradienta metode *Sedativi1*.

Čas [min]	Pretok [ml/min]	Delež mobilne faze A [%]	Delež mobilne faze B [%]
0	0,3	90,0	10,0
3	0,3	70,0	30,0
5	0,3	0,0	100,0
6	0,3	0,0	100,0
6,1	0,3	90,0	10,0
7	0,3	90,0	10,0

Za preverjanje uspešnosti pri izbiri gradienta opisanega v preglednici 4, smo injicirali mešanico raztopin vseh iskanih spojin, s koncentracijo posamezne spojine 25 ng/ml. Dobljeni kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini (TIC), so predstavljeni na sliki 13, zadrževalni časi pa v preglednici 5.

Preglednica 5: Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi *Sedativi1*.

Iskana spojina	Oznaka	Zadrževalni čas – t_R [min]	Ločljivost sosednjih vrhov - R_s
klorpromazin	KP	5,70	1,5
propiopromazin	PP	5,48	1,1
acepromazin	AP	5,29	2,3
haloperidol	HAL	4,84	0,6
azaperon	AZN	4,71	0,8
karazolol	CZL	4,57	0,4
azaperol	AZL	4,51	0,5
ksilazin	KSI	4,42	/



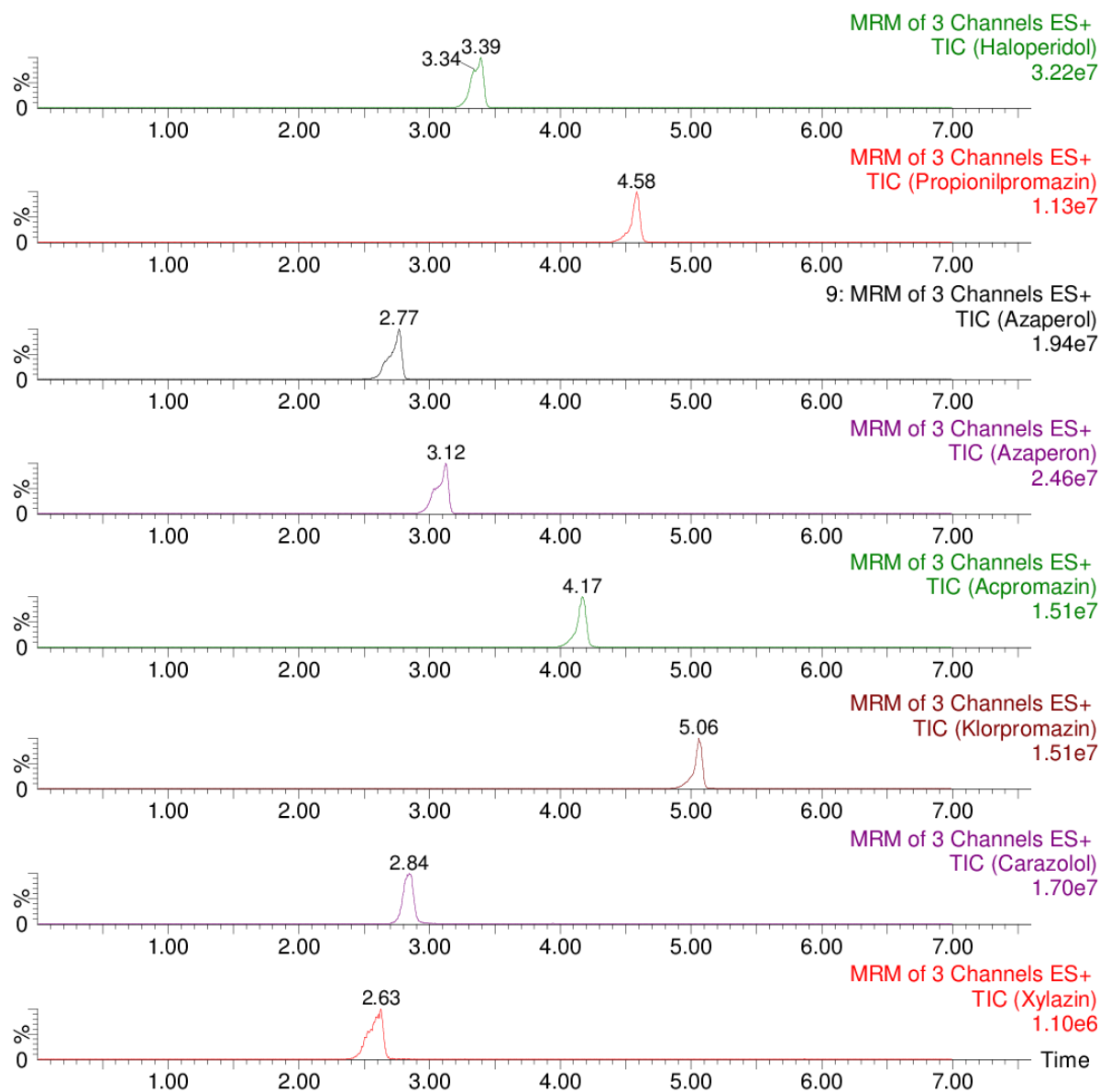
Slika 13: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi1.

Kot je razvidno iz preglednice 3 in preglednice 5, se ločljivost med posameznimi iskanimi spojinami s spremembo gradienta, ni bistveno spremenila. Zato smo v novi metodi *Sedativi2* prilagodili gradient opisan v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava gradienta metode *Sedativi2*.

Čas [min]	Pretok [ml/min]	Delež mobilne faze A [%]	Delež mobilne faze B [%]
0	0,3	80,0	20,0
3	0,3	35,0	65,0
5	0,3	10,0	90,0
6	0,3	10,0	90,0
6,1	0,3	80,0	20,0
7	0,3	80,0	20,0

Razvoj analizne metode nadaljujemo s preverjanjem odziva iskanih spojin z injiciranjem mešanice standardnih raztopin z metodo *Sedativi2*. Dobljeni kromatogrami TIC posameznih iskanih spojin so prikazani na sliki 14, zadrževalni časi in ločljivost med sosednjimi vrhovi pa zbrani v preglednici 7.



Slika 14: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi2.

Preglednica 7: Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi *Sedativi2*.

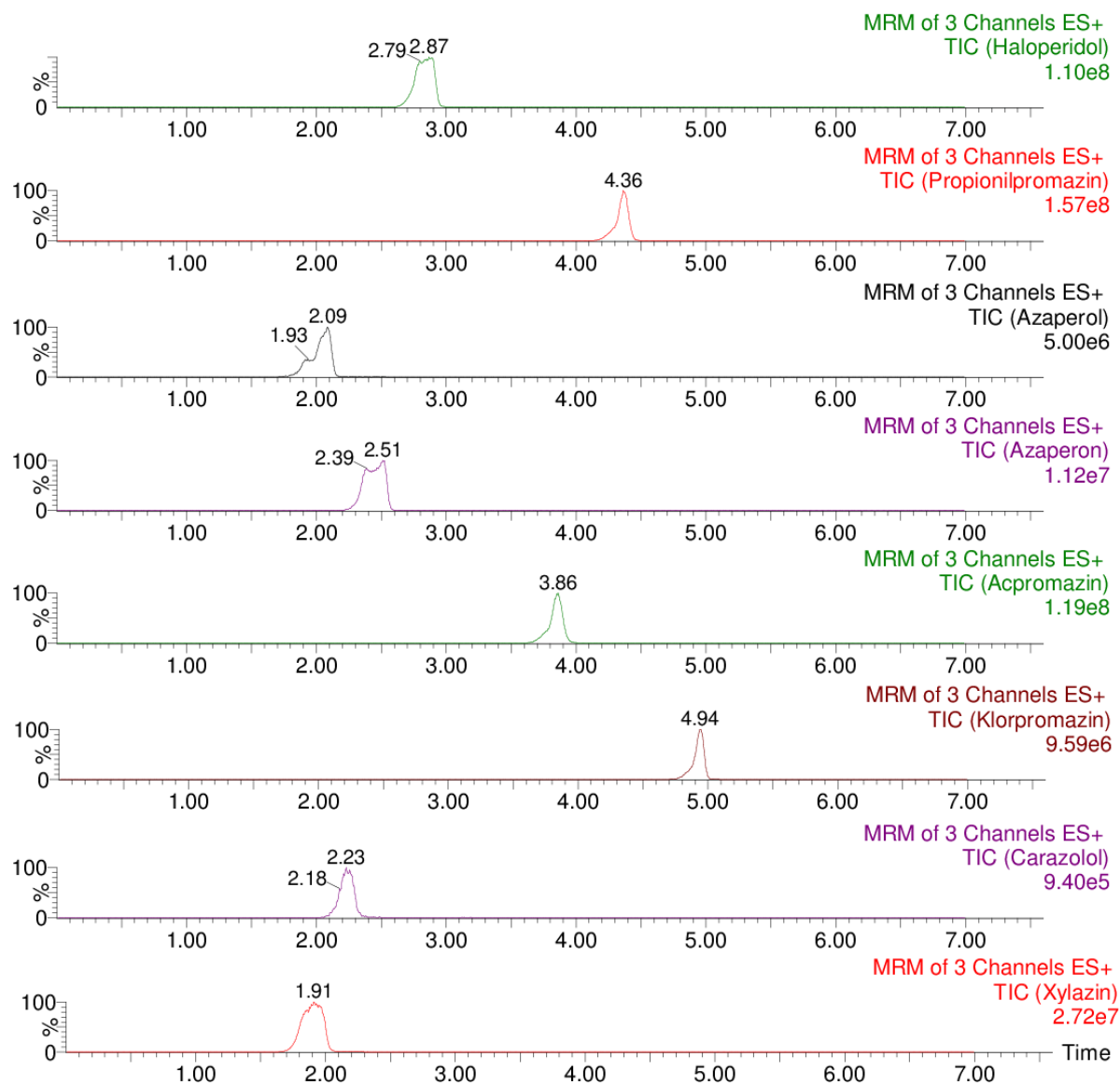
Iskana spojina	Oznaka	Zadrževalni čas - t _R [min]	Ločljivost sosednjih vrhov - R _s
klorpromazin	KP	5,06	1,9
propiopromazin	PP	4,58	1,7
acepromazin	AP	4,17	3,2
haloperidol	HAL	3,39	1,1
azaperon	AZN	3,12	1,1
karazolol	CZL	2,84	0,2
azaperol	AZL	2,77	0,5
ksilazin	KSI	2,63	/

S primerjavo ločljivosti sosednjih vrhov mešanice standardnih raztopin posnetih z metodo *Sedativi1* zbranimi v preglednici 5 in *Sedativi2* zbranimi v preglednici 7, je razvidno, da se je ločljivost med posameznimi iskanimi spojinami s spremembo gradienta nekoliko izboljša. Izboljšanje je najbolj opazno pri vrhovih iskanih spojin, ki se eluirajo pri daljših zadrževalnih časih, na primer KP in PP. Ločljivost med sosednjima vrhovoma AZL in CZL se je nekoliko poslabšala in je zgolj 0,2. Zato se odločimo za prilagojeno metodo, *Sedativi3* s spremembo gradienta, ki je opisana v preglednici 8.

Preglednica 8: Sestava gradienta metode *Sedativi3*.

Čas [min]	Pretok [ml/min]	Delež mobilne faze A [%]	Delež mobilne faze B [%]
0	0,3	70,0	30,0
3	0,3	35,0	65,0
5	0,3	10,0	90,0
6	0,3	10,0	90,0
6,1	0,3	70,0	30,0
7	0,3	70,0	30,0

Pri injiciranju mešanice standardnih raztopin s koncentracijo posamezne spojine 25 ng/ml smo dobili kromatograme, ki so prikazani na sliki 15. Zadrževalni časi in ločljivosti med posameznimi vrhovi iskanih spojin so zbrani v preglednici 9.



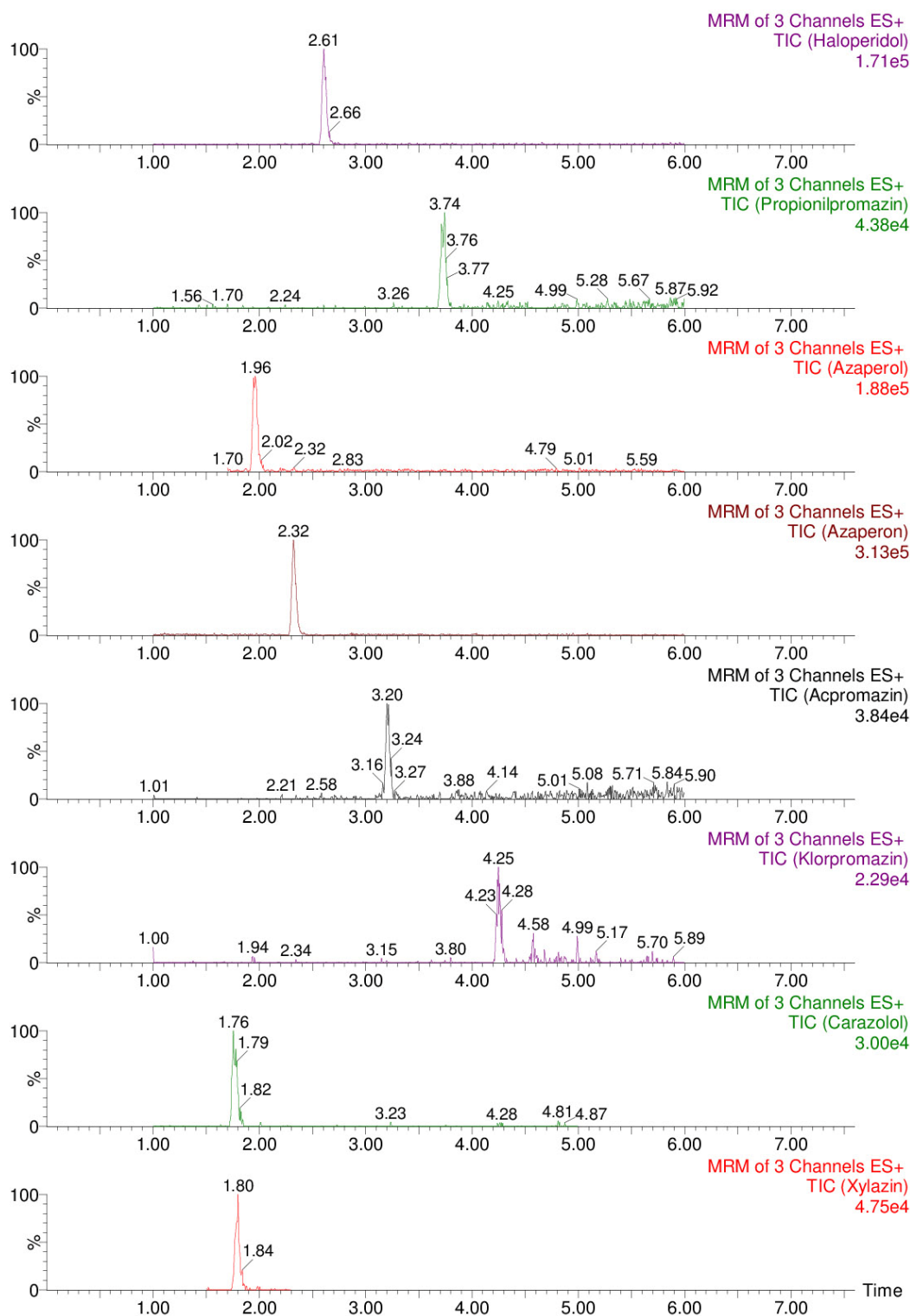
Slika 15: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi3.

Preglednica 9: Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi *Sedativi3*.

Iskana spojina	Oznaka	Zadrževalni čas [min]	Ločljivost sosednjih vrhov
Klorpromazin	KP	4,94	1,9
Propiopromazin	PP	4,36	2,3
Acepromazin	AP	3,86	3,6
Haloperidol	HAL	2,87	0,9
Azaperon	AZN	2,51	0,9
Karazolol	CZL	2,23	0,5
Azaperol	AZL	2,09	0,5
Ksilazin	KSI	1,91	/

Na kromatogramih na slikah 13 – 15 je moč videti razcepljene vrhove pri AZN, AZL in KSI, kar nakazuje na nasičenje kromatografske kolone. Vrhovi posameznih iskanih spojin so se pri vsakem nadaljnjem injiciranju bolj deformirali. Videti je tudi izrazito pojav fronte (*angl. fronting*) kromatografskih vrhov, ki skupaj z razcepljenimi vrhovi nakazuje na slabo stanje kromatografske kolone.

Odzive iskanih spojin smo nato preverili na kromatografski koloni Acquity UPLC® BEH C18, dimenzij $2,1 \times 50$ mm z $1,7 \mu\text{m}$ delci proizvajalca Waters. Zaradi možnosti prenasičenja kromatografske kolone smo volumen injiciranja zmanjšali na $7,5 \mu\text{l}$. Dobljeni kromatogrami so prikazani na sliki 16. Zadrževalni časi vrhov posameznih iskanih spojin ter ločljivost sosednjih vrhov pa povzeti v preglednici 10.



Slika 16: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi3 na kromatografski koloni Acquity UPLC® BEH C18, dimenzij 2,1 × 50 mm z 1,7 μm delci proizvajalca Waters.

Preglednica 10: Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi *Sedativi3*, na kromatografski koloni Acquity UPLC® BEH C18, dimenzij 2,1 × 50 mm z 1,7 µm delci proizvajalca Waters.

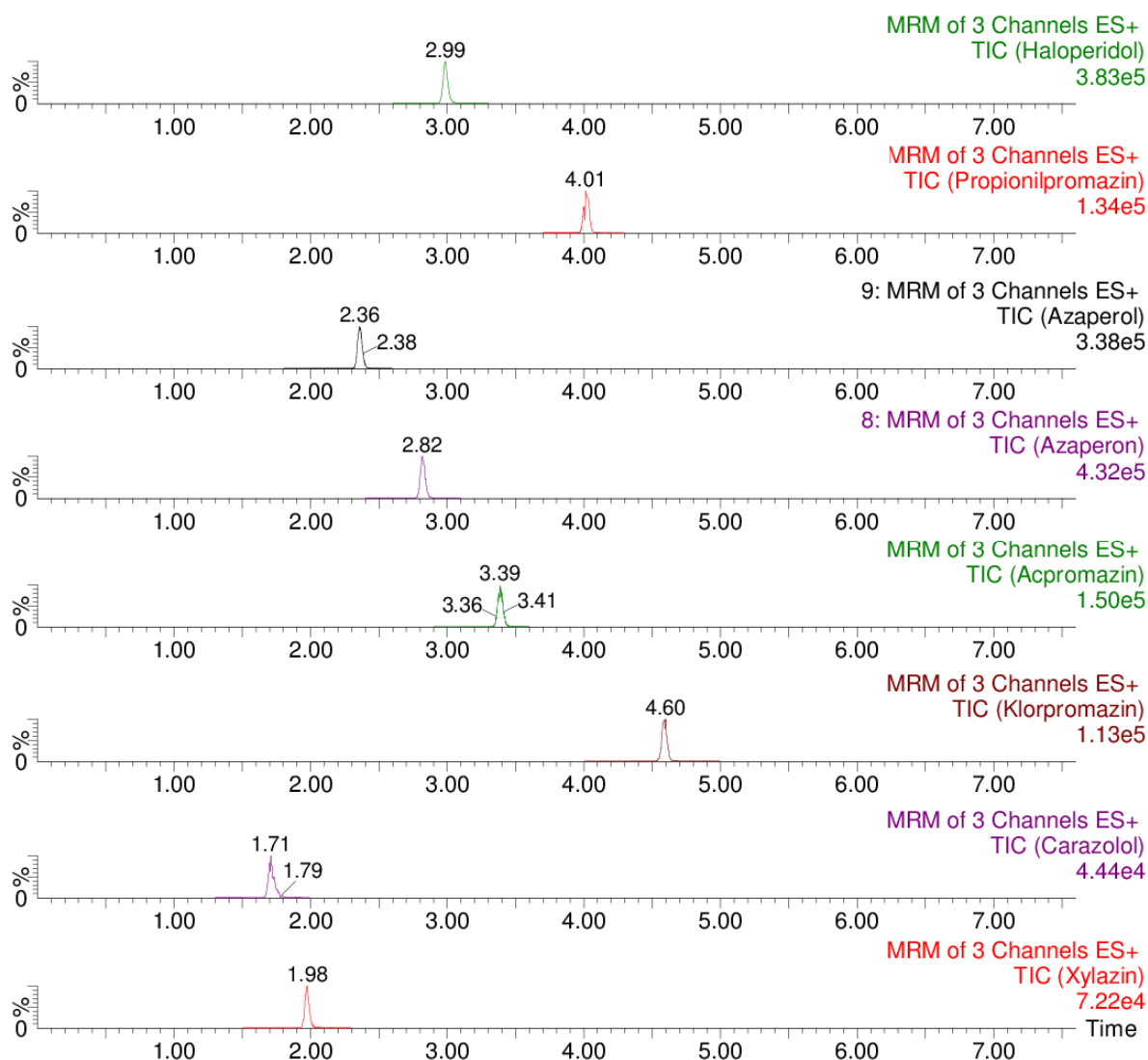
Iskana spojina	Oznaka	Zadrževalni čas - t _R [min]	Ločljivost sosednjih vrhov - R _s
klorpromazin	KP	4,25	4,3
propiopromazin	PP	3,74	3,7
acepromazin	AP	3,20	4,1
haloperidol	HAL	2,61	2,3
azaperon	AZN	2,32	2,8
azaperol	AZL	1,96	1,0
ksilazin	KSI	1,80	0,2
karazolol	CZL	1,76	/

Iz primerjave ločljivosti sosednjih vrhov zbranih v preglednicah 9 in 10 je moč razbrati, da zamenjava kromatografske kolone privede do boljše ločljivost. Kromatografski vrhovi posameznih spojin dobljenih na kromatografski koloni Acquity UPLC® BEH C18, ki so prikazani na sliki 16, so razcepljeni. Razcepljenost vrhov bi lahko nakazovala na prenasíčenje kromatografske kolone. Možnost prenasíčenja bi lahko preverili z injiciranjem manjšega volumna raztopine mešanice iskanih spojin, vendar se zaradi posledičnega zmanjšanja ponovljivosti injiciranja za to ne odločimo. Nadaljevali smo z zamenjavo kromatografske kolone z novo, še ne uporabljeno Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm delci. Kromatogrami mešanice standardnih raztopin injicirane po metodi *Sedativi3* na novi koloni Zorbax Eclipse so prikazani na sliki 17. Zadrževalni časi posameznih iskanih spojin in ločljivost med sosednjimi vrhovi pa so zbrani v preglednici 11. Odziv smo preverili pri volumnu injiciranja 7,5 µl ter 10 µl. Volumen injiciranja ni bistveno vplival na obliko vrhov in njihovo višino, zato smo se odločili, da razvoj nadaljujem z volumnom injiciranja 10 µl.

Preglednica 11: Zadrževalni časi in ločljivost iskanih spojin injiciranih po metodi *Sedativi3*, na novi kromatografski koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm delci proizvajalca Agilent.

Iskana spojina	Oznaka	Zadrževalni čas - t _R [min]	Ločljivost sosednjih vrhov - R _s
klorpromazin	KP	4,60	5,9
propiopromazin	PP	4,01	5,9
acepromazin	AP	3,39	1,7
haloperidol	HAL	2,99	0,8
azaperon	AZN	2,82	4,8
azaperol	AZL	2,36	4,5

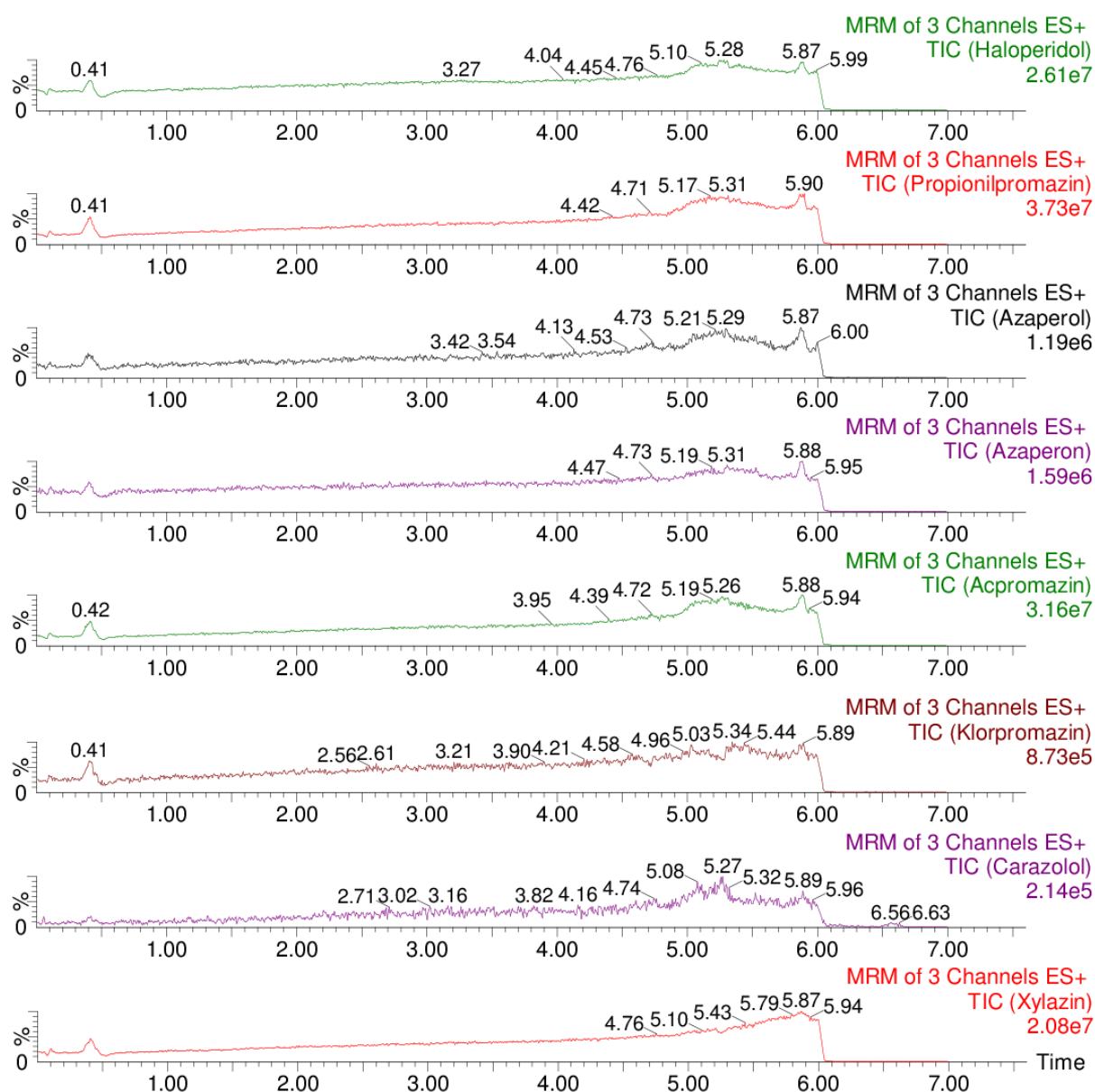
ksilazin	KSI	1,98	1,9
karazolol	CZL	1,71	/



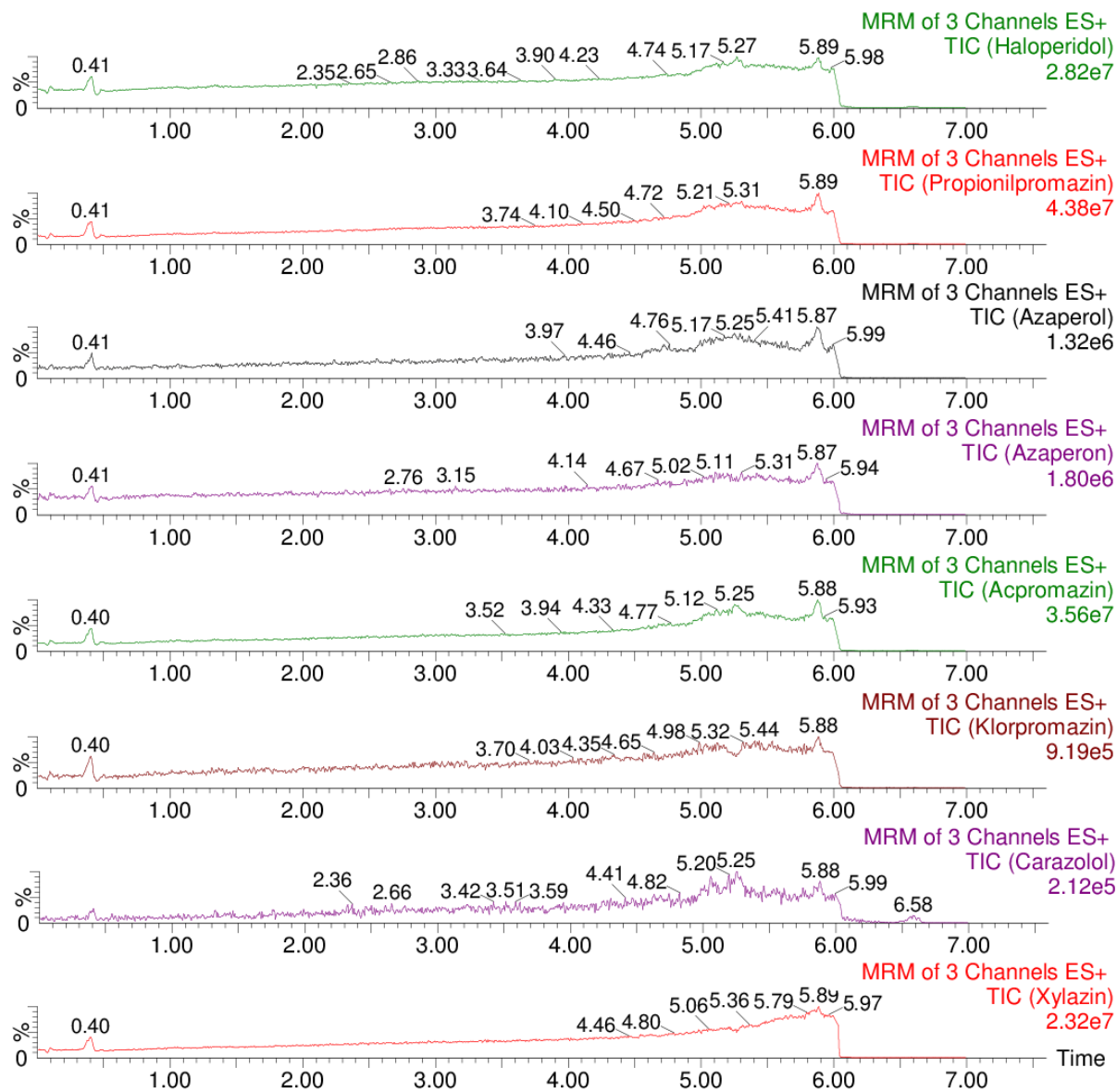
Slika 17: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti po metodi Sedativi3 na novi kromatografski koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm delci proizvajalca Agilent.

Iz primerjave ločljivosti vrhov zbranih v preglednicah 10 in 11 je razvidno, da zamenjava kolone privede do dosega bistveno boljše ločljivosti sosednjih vrhov posameznih iskanj. Prav tako smo potrdili, da je bila za slabšo ločbo, pojav fronte (*angl. fronting*) in razcepljene vrhove pri predhodnih injiciranjih kriva iztrošenost kolone. Razvoj smo nadaljevali s preverjanjem vpliva

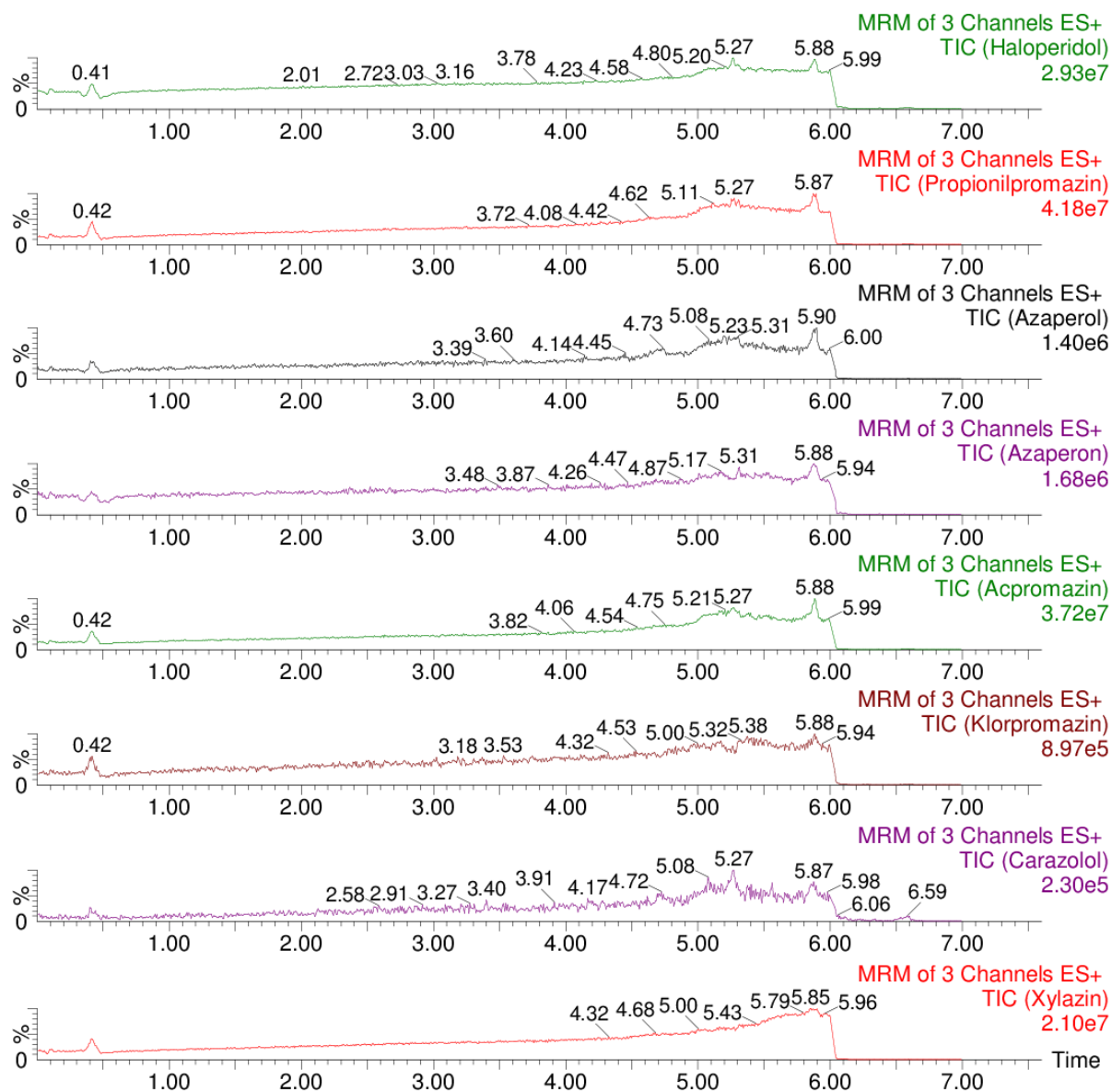
matrice. Preverjanje smo izvedeli tako, da smo ob sočasnem dovajanju mobilne faze in mešanice standardnih raztopin pri konstantnem pretoku injicirali tako imenovane slepe vzorce, ki smo jih pripravili, kot je opisano pod točko 3.8 *Vzorčenje, priprava in čiščenje vzorcev*. Vpliv matrice smo preverili za ekstrakte mleka, jajc, urina in ledvic. Dobljeni kromatogrami so prikazani na slikah od 18 do 21. Na dobljenih kromatogramih pri zadrževalnih časih iskanih spojin, zbranih v preglednici 11 nismo zaznali nenadnega zvišanja ali znižanja odziva, ki bi nakazoval na prisotnost efekta matrice. Iz česar zaključimo, da vpliva matrice nismo zaznali. Rahla sprememba bazne linije je zgolj posledica vpliva gradienta.



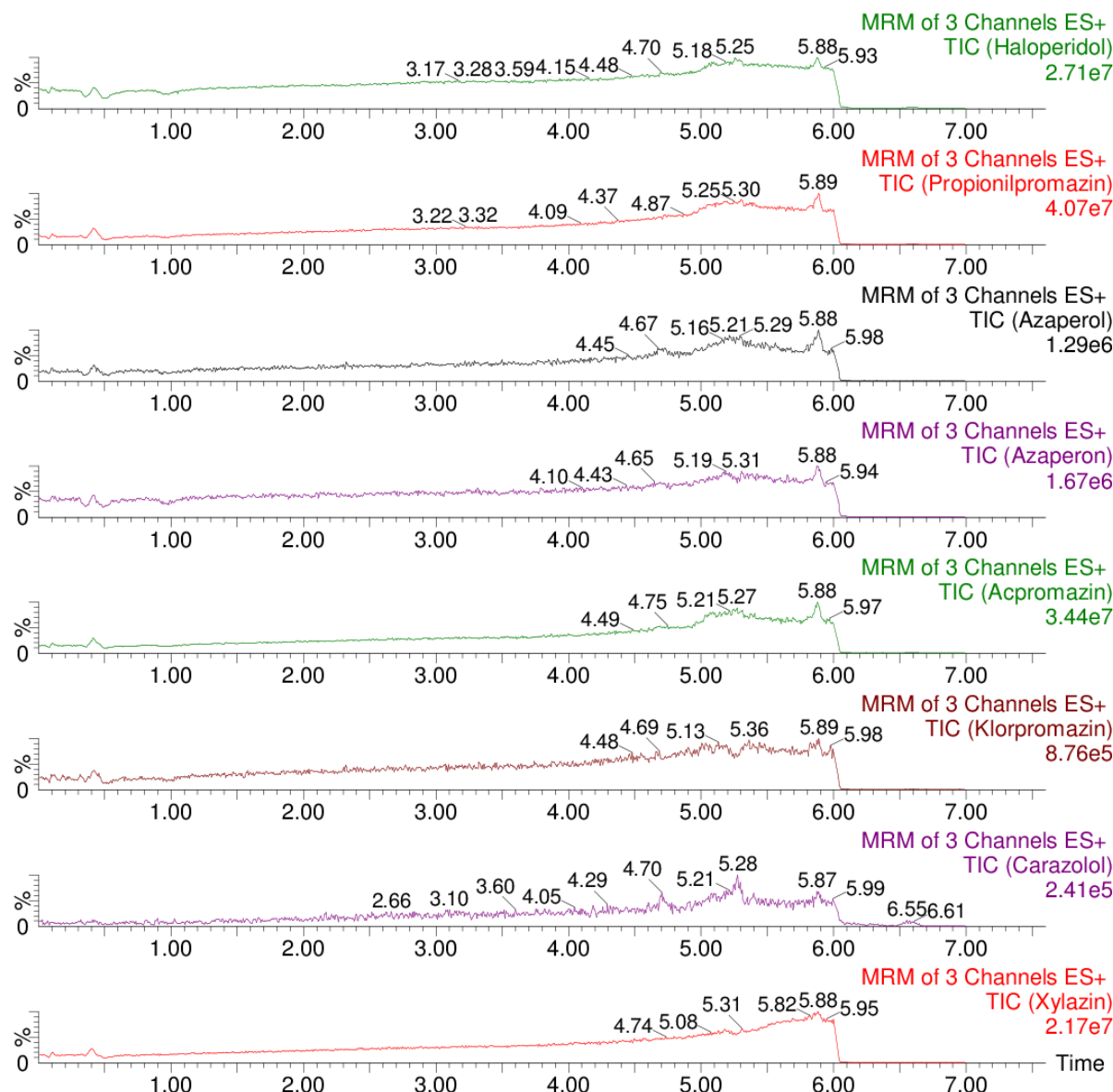
Slika 18: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca kokošjih jajc z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.



Slika 19: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca govejih ledvic z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.



Slika 20: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca surovega kravjega mleka z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.



Slika 21: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju slepega vzorca govejega urina z metodo Sedativi3 ob dovajanju mešanice standardnih raztopin s konstantnim pretokom.

Sledilo je preverjanje ponovljivosti injiciranja mešanice standardnih raztopin. Izvedli smo ga tako, da smo petkrat zaporedno injicirali mešanico standardnih raztopin s koncentracijo posamezne iskane spojine 1 $\mu\text{g/kg}$ ter štiri mešanice standardnih raztopin za pripravo umeritvene premice s koncentracijo 0,5, 1,5, 3 in 5 $\mu\text{g/kg}$. Koeficienti variance petih zaporednih injiciranj za posamezno iskano spojino so znašali med približno 22 in 60 %. Zaradi tako velikih odstopanj smo se odločili za vpeljavo metode internega standarda. Pri metodi internega standarda v vsakega od vzorcev,

slepo in vzorcev za izdelavo kalibracijske premice dodamo enako koncentracijo po fizikalnih lastnostih iskani spojini podobne spojine. Dodane spojine nam nato služijo kot interni standard (IS). Fizikalna podobnost IS in iskane spojine zagotavlja, da bosta tako iskana spojina kot IS ob dani situaciji reagirala podobno. Pri analiznih metodah, ki temeljijo na masni spektrometriji, se uporabljajo IS, ki se od iskane spojine razlikujejo le po masi molekule. Razliko v masi lahko dosežemo z zamenjavo nekaterih atomov v iskani spojini z njihovimi izotopi, ki so v naravi redkeje prisotni. Navadno se uporablja zamenjava vodikovega atoma z atomom devterija ali zamenjava ogljikovega atoma izotopa ^{12}C z izotopom ^{13}C . Za IS smo v našem primeru uporabili mešanico devteriranih standardnih raztopin s koncentracijo posamezne iskane spojine 2 $\mu\text{g/kg}$. Ker je koncentracija IS v vseh vzorcih enaka lahko preko priprave grafa, ki prikazuje odziv v odvisnosti od koncentracije iskane spojine ter spojine prisotne v IS določimo koncentracijo iskane spojine v neznanem vzorcu.

Masne prehode in nastavitve masnega spektrometra smo določili z dovajanjem IS neposredno v masni spektrometer, vrednosti so zabeležene v preglednici 12.

Ugotovljene vsebnosti posameznih iskanih spojin z uporabo IS in brez njega, ter koeficienti variance petih zaporednih injiciranj so prikazani v preglednici 13. Koeficient variance smo (C_v) za posamezno iskano spojino izračunan po enačbi 2. Kjer Φ predstavlja povprečno vrednost vsebnosti, s pa standardni odklon določenih vsebnosti posamezne iskane spojine.

Enačba 2: Koeficient variance: $C_v = \frac{s \cdot 100 \%}{\Phi}$

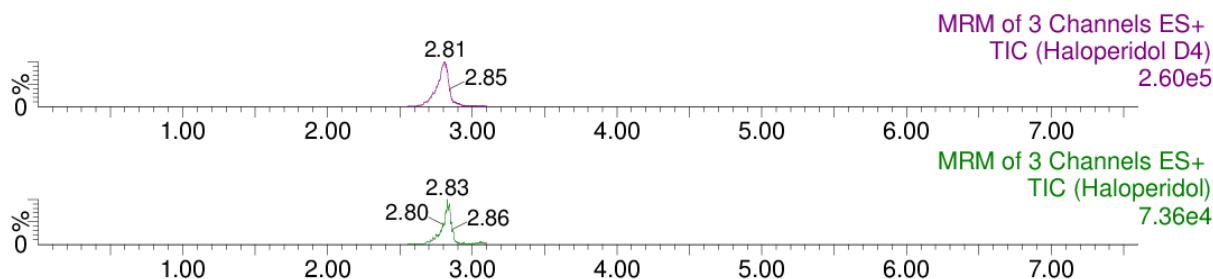
Preglednica 12: Masni prehodi in nastavitve masnega spektrometra za interni standard.

Interni standard	$M_{\text{mono.}}$ [g/mol]	Spojina za preračun	m/z Parent	m/z Daughter	Napetost na stožcu	Kolizijska energija	Ionski način
azaperon-D ₄	331,2	AZN, AZL	332,42	121,06	22	36	ES+
haloperidol-D ₄	379,1	HAL	380,39	165,09	24	24	ES+
karazolol-D ₇	305,2	CZL	306,42	123,08	26	20	ES+
klorpromazin-D ₆	324,1	KP, PP, AP	325,32	92,06	22	18	ES+
ksilazin-D ₆	226,1	KSI	227,32	89,98	28	20	ES+

Preglednica 13: Ugotovljene koncentracije posamezne iskane spojine z in brez uporabe IS, po injiciranju raztopin s koncentracijo 1 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Zaporedn o število injiciranja	Ugotovljena vsebnost brez uporabe IS [µg/kg]	Cv _(n=5) brez IS [%]	Ugotovljena vsebnost z uporabo IS [µg/kg]	Cv _(n=5) z IS [%]
KP	1	0,806	22,46	0,985	12,71
	2	1,287		0,922	
	3	0,862		0,987	
	4	1,043		1,259	
	5	0,769		1,107	
PP	1	0,938	25,63	0,958	5,76
	2	1,066		0,859	
	3	1,322		1,008	
	4	1,066		0,966	
	5	0,616		0,952	
AP	1	1,024	58,31	0,894	10,00
	2	0,997		0,990	
	3	2,808		1,086	
	4	1,129		0,920	
	5	0,928		1,123	
HAL	1	1,042	23,28	1,055	13,97
	2	0,923		0,853	
	3	1,357		1,107	
	4	1,344		0,825	
	5	0,787		0,866	
AZN	1	1,019	26,57	1,087	9,55
	2	1,346		1,008	
	3	1,142		1,097	
	4	0,628		0,861	
	5	1,309		0,974	
AZL	1	1,426	24,61	0,947	7,65
	2	0,852		1,079	
	3	1,218		1,003	
	4	1,024		0,886	
	5	0,795		0,932	
KSI	1	0,424	60,13	0,847	13,82
	2	0,536		1,041	
	3	0,503		0,979	
	4	0,856		0,739	
	5	1,554		0,822	
CZL	1	0,932	57,43	1,022	10,78
	2	0,314		1,039	
	3	0,778		1,063	
	4	1,436		0,908	
	5	0,425		0,816	

Koeficienti variance pri posameznih iskanih spojinah so v primerih, ko smo uporabili IS, bistveno nižji in znašajo med 5,76 in 13,97 %. Presenetile so nas površine pod krivuljo za HAL v primeru dodatka IS, ki so bile za približno 30 % višje v primerjavi z vrednostmi površin brez dodatka IS. Zaradi suma, da sta vrhova HAL-D₄ in HAL v kromatogramu prekrita, smo injicirali raztopino HAL-D₄, njen kromatogram je prikazan na sliki 22.



Slika 22: Kromatogrami seštevka odzivov, ki pripadajo posamezni iskani spojini posneti ob injiciranju raztopine HAL-D₄ z metodo Sedativi3.

Kot je razvidno iz kromatograma na sliki 22, raztopina HAL-D₄ daje odziv na mestu odziva HAL, zato raztopina HAL-D₄ ni primerna za interni standard. V nadaljevanju uporabimo interni standard, ki ne vsebuje HAL-D₄ in HAL vrednotimo brez internega standarda. S pridobitvijo podatka o selektivnosti, smo se odločili, da je metoda primerna za validacijo.

4.2. Validacija analizne metode

Validacijo razvite analizne metode smo izvedli za matrico mleka, ki nam je na Enoti za varno hrano Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani v preteklosti na predhodno vpeljani presejalni metodi predstavljala velik problem zaradi lažno pozitivnih vzorcev.

Za doseg ustrežne občutljivosti instrumenta, smo analize tekom validaciji izvajali s segmentnim zaznavanjem. Ob določenem času okrog zadrževalnega časa iskane spojine smo sočasno spremljali samo ionske prehode pričakovane iskane spojine.

4.2.1. Ponovljivost sistema

Ponovljivost sistema smo testirali s šestimi zaporednimi injiciranjem mešanice standardnih raztopin s koncentracijo posamezne učinkovine približno 1 µg/kg, kar predstavlja najnižjo MRL vrednosti za izbrane iskane spojine, ki pripada CZL. Kot pokazatelj ponovljivosti sistema smo izbrali koeficient variance.

Koncentracije posamezne iskane spojine smo vrednotili glede na pet točkovno umeritveno premico, kjer so koncentracije posamezne iskane spojine ustrezale 0,5, 1,0, 1,5, 3 in 5 µg/kg. Dobljeni rezultati so zbrani v preglednici 14.

Preglednica 14: Ugotovljene koncentracije iskanih spojin pri testiranju ponovljivosti sistema, po injiciranju raztopin s koncentracijo 1 µg/kg.

Število injiciranja (n)	Vsebnost KP [µg/kg]	Vsebnost PP [µg/kg]	Vsebnost AP [µg/kg]	Vsebnost HAL [µg/kg]	Vsebnost AZN [µg/kg]	Vsebnost CZL [µg/kg]	Vsebnost AZL [µg/kg]	Vsebnost KSI [µg/kg]
1	1,218	0,995	1,099	1,237	0,929	0,935	0,999	0,955
2	0,935	1,059	0,995	1,167	1,056	1,086	0,831	1,074
3	1,121	0,991	0,986	1,348	1,061	1,079	0,887	1,113
4	0,915	0,973	0,931	0,799	0,908	0,878	1,045	0,855
5	1,109	0,933	0,897	0,887	1,016	0,900	0,958	0,930
6	0,897	1,006	1,122	1,297	0,884	1,041	1,101	1,082
Φ µg/kg	1,033	0,993	1,005	1,123	0,976	0,987	0,970	1,002
s µg/kg	0,13	0,04	0,09	0,23	0,08	0,09	0,10	0,10
Cv %	12,98	4,16	8,91	20,18	8,01	9,44	10,31	10,27

4.2.2. Ponovljivost metode

Ponovljivost metode smo testirali v treh serijah z injiciranjem šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezen nivo od 0,5 do 1,5 µg/kg. Koncentracije posamezne iskane spojine smo ovrednotili glede na pet točkovno umeritveno premico obogatenih ekstraktov surovega mleka, s koncentracijo posamezne iskane spojine 0,5, 1,0, 1,5, 3 in 5 µg/kg. Kot pokazatelj ponovljivosti metode pa izbrali povprečno vrednost koeficienta variance (Cv) treh serij za posamezno iskano spojino na vsakem od nivojev ter faktorjem ponovljivosti, izračunanem po standardu ISO 5725 - enačba 3; p predstavlja število izdelanih eksperimentov, n_{ij} število analiziranih vzorcev za posamezni nivo, s_{ij} pa povprečni standardni odklon posamezne iskane spojine na posameznem nivoju. Povprečne vrednosti Φ, s_r in Cv so zbrane v preglednicah od 15 do 18. Dobljeni izvorni podatki so zbrani v prilogi 1 v preglednicah od 29 do 52.

$$\text{Enačba 3: Faktor ponovljivosti: } S_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij}-1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij}-1)}$$

Preglednica 15: Povprečne vrednosti Φ , s_r in C_v posamezne iskane spojine na treh serijah pri koncentraciji 0,5 μg na kg surovega mleka.

Iskana spojina	Φ [$\mu\text{g/kg}$]	s_r [$\mu\text{g/kg}$]	C_v [%]
klorpromazin	0,517	0,08	16,28
propiopromazin	0,508	0,09	17,91
acepromazin	0,502	0,05	10,48
haloperidol	0,501	0,14	27,00
azaperon	0,503	0,05	10,50
azaperol	0,494	0,13	26,00
ksilazin	0,496	0,04	8,41
karazolol	0,507	0,11	21,16

Preglednica 16: Povprečne vrednosti Φ , s_r in C_v posamezne iskane spojine na treh serijah pri koncentraciji 1,0 μg na kg surovega mleka.

Iskana spojina	Φ [$\mu\text{g/kg}$]	s_r [$\mu\text{g/kg}$]	C_v [%]
klorpromazin	0,935	0,13	14,01
propiopromazin	0,963	0,12	12,05
acepromazin	0,982	0,18	18,79
haloperidol	1,010	0,22	21,95
azaperon	0,987	0,10	10,14
azaperol	0,982	0,16	15,89
ksilazin	1,019	0,12	11,48
karazolol	0,985	0,17	17,61

Preglednica 17: Povprečne vrednosti Φ , s_r in C_v posamezne iskane spojine na treh serijah pri koncentraciji 1,5 μg na kg surovega mleka.

Iskana spojina	Φ [$\mu\text{g/kg}$]	s_r [$\mu\text{g/kg}$]	C_v [%]
klorpromazin	1,534	0,15	9,88
propiopromazin	1,494	0,19	12,91
acepromazin	1,479	0,19	12,65
haloperidol	1,465	0,27	18,33
azaperon	1,488	0,12	7,87
azaperol	1,490	0,20	13,46
ksilazin	1,444	0,16	11,39
karazolol	1,495	0,30	19,99

4.2.3. Obnovljivost znotraj laboratorija

Testiranje obnovljivosti znotraj laboratorija sva izvedla dva analitika. Kot analitik 1 sem pripravil tri sete po šest obogatenih vzorcev surovega kravjega mleka s koncentracijami posameznih iskanih spojin 0,5, 1,0 in 1,5 µg/kg. Enega od setov sem do dneva analize zamrznil v zamrzovalniku ter ga na dan analize predal analitiku 2.

Analize so bile izvedene znotraj istega laboratorija:

- izvedla sva ju dva analitika,
- ob različnih dnevih,
- z različnimi raztopinami za ekstrakcijo in kromatografijo,
- z različnimi serijskimi številkami kolon za ekstrakcijo na trdni fazi,
- ter z različnimi serijskimi številkami uporabljenih topil.

Kot pokazatelj obnovljivosti znotraj laboratorija smo izbrali relativno razliko povprečne ugotovljene vsebnosti posamezne iskane spojine (Δ_a), povprečno vrednost koeficienta variance (Cv) ter faktor obnovljivosti (s_R^2) za posamezno iskano spojino na vsakem od nivojev. Relativna razlika povprečne ugotovljene vsebnosti je izračunana po enačbi 4, kjer je Φ povprečna vsebnost. Faktor obnovljivosti je izračunan po ISO standardu 5725. Za izračun smo uporabili enačbe 5-8, kjer je s_L^2 varianca znotraj laboratorija, s_{dj}^2 standardni odklon za metodo j in laboratorij d, n_j število rezultatov pridobljenih v laboratoriju, s_r^2 faktor ponovljivosti, $\bar{y}_{ij}$ povprečna vrednost rezultatov posameznega eksperimenta za posamezno iskano spojino na enem od nivojev, $\bar{\bar{y}}_j$ povprečna vrednost rezultatov vseh eksperimentov za posamezno iskano spojino na enem od nivojev. Rezultati obnovljivosti znotraj laboratorija so zbrani v preglednicah od 18 do 21.

Enačba 4: Relativna razlika med analitikoma: $\Delta_a = \frac{\Phi_{(analitik\ 1)} - \Phi_{(analitik\ 2)}}{\Phi_{(teoretična)}} * 100\ %$

Enačba 5: Standardni odklon metode: $s_{dj}^2 = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{y}_{ij})^2 - (\bar{\bar{y}}_j)^2 \sum_{i=1}^p n_{ij} \right]$

Enačba 6: Število pridobljenih rezultatov: $n_j = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \right]$

Enačba 7: Varianca znotraj laboratorija: $s_L^2 = \frac{s_{dj}^2 - s_r^2}{n_j}$

Enačba 8: Obnovljivost: $s_R^2 = s_r^2 + |s_L^2|$

Preglednica 18: Povprečne vrednosti koeficienta variance, ugotovljenih vsebnosti posameznih iskanih spojin in relativne razlike med analitikoma za nivo 0,5 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Analitik 1			Analitik 2			Relativna razlika med analitikoma
	$\Phi_{(n=6)}$ µg/kg	$S_{(n=6)}$ µg/kg	$Cv_{(n=6)}$ %	$\Phi_{(n=6)}$ µg/kg	$S_{(n=6)}$ µg/kg	$Cv_{(n=6)}$ %	Δ_a %
KP	0,504	0,05	10,07	0,555	0,09	15,39	-10,2
PP	0,526	0,06	11,81	0,512	0,04	7,32	2,8
AP	0,514	0,04	8,22	0,513	0,07	12,97	0,2
HAL	0,531	0,11	20,58	0,438	0,06	13,34	18,6
AZN	0,506	0,05	10,76	0,479	0,06	12,44	5,4
CZL	0,484	0,17	34,16	0,505	0,05	10,76	-4,2
AZL	0,511	0,03	6,45	0,468	0,05	9,77	8,6
KSI	0,518	0,11	20,59	0,471	0,06	13,68	9,4

Preglednica 19: Povprečne vrednosti koeficienta variance, ugotovljenih vsebnosti posameznih iskanih spojin in relativne razlike med analitikoma za nivo 1,0 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Analitik 1			Analitik 2			Relativna razlika med analitikoma
	$\Phi_{(n=6)}$ µg/kg	$S_{(n=6)}$ µg/kg	$Cv_{(n=6)}$ %	$\Phi_{(n=6)}$ µg/kg	$S_{(n=6)}$ µg/kg	$Cv_{(n=6)}$ %	Δ_a %
KP	0,978	0,14	14,80	0,862	0,12	14,08	11,6
PP	0,945	0,12	12,99	0,982	0,13	13,13	-3,7
AP	0,968	0,14	14,97	0,988	0,25	24,97	-2,0
HAL	1,017	0,20	20,09	1,067	0,22	20,52	-5,0
AZN	0,986	0,10	10,56	1,012	0,12	12,17	-2,6
CZL	0,924	0,12	13,08	1,030	0,21	20,18	-10,6
AZL	0,973	0,15	14,96	1,068	0,12	10,99	-9,5
KSI	0,993	0,17	17,52	1,042	0,19	18,14	-4,9

Preglednica 20: Povprečne vrednosti koeficienta variance, ugotovljenih vsebnosti posameznih iskanih spojin in relativne razlike med analitikoma za nivo 1,5 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Analitik 1			Analitik 2			Relativna razlika med analitikoma
	$\Phi_{(n=6)}$ µg/kg	$S_{(n=6)}$ µg/kg	$Cv_{(n=6)}$ %	$\Phi_{(n=6)}$ µg/kg	$S_{(n=6)}$ µg/kg	$Cv_{(n=6)}$ %	Δ_a %
KP	1,518	0,14	9,28	1,503	0,08	5,47	1,0
PP	1,463	0,17	11,57	1,449	0,08	5,44	0,9
AP	1,426	0,16	10,93	1,420	0,08	5,64	0,4
HAL	1,296	0,24	18,63	1,679	0,13	7,80	-25,5
AZN	1,462	0,11	7,20	1,554	0,09	5,58	-6,1
CZL	1,607	0,26	16,24	1,388	0,21	14,96	14,6
AZL	1,444	0,09	6,21	1,489	0,18	12,38	-3,0
KSI	1,454	0,19	13,30	1,547	0,40	25,83	-6,2

Preglednica 21: Faktor obnovljivosti znotraj laboratorija.

Oznaka iskane spojine	sr^2 [µg ² /kg ²]		
	0,5 µg/kg	1,0 µg/kg	1,5 µg/kg
KP	0,007	0,018	0,025
PP	0,009	0,015	0,039
AP	0,003	0,039	0,038
HAL	0,018	0,054	0,098
AZN	0,003	0,011	0,015
CZL	0,019	0,026	0,046
AZL	0,002	0,041	0,030
KSI	0,012	0,031	0,102

4.2.4. Izkoristek metode

Izkoristek metode smo testirali z injiciranjem šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezen nivo od 0,5 do 1,5 µg/kg. Koncentracije posamezne iskane spojine smo vrednotili glede na pet točkovno umeritveno premico obogatenih ekstraktov surovega mleka, s koncentracijo posamezne iskane spojine 0,5, 1,0, 1,5, 3 in 5 µg/kg. Kot pokazatelj izkoristka metode smo izbrali povprečen izkoristek ekstrakcije šestih vzorcev za posamezno iskano spojino

na vsakem od nivojev. Izkoristek smo izračunali po enačbi 9. Dobljeni rezultati so zbrani v preglednicah od 22 do 24.

Enačba 9: Izkoristek metode: $W = \frac{\Phi_{\text{ugotovljena vsebnost}}}{\Phi_{\text{dodatek}}} * 100 \%$

Preglednica 22: Povprečen izkoristek ekstrakcije šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezno iskano spojino za nivo 0,5 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Dodatek [µg/kg]	Povprečna ugotovljena vsebnost [µg/kg]	Povprečen izkoristek W (%)
KP	0,500	0,504	100,8
PP	0,500	0,526	105,2
AP	0,500	0,514	102,8
HAL	0,500	0,531	106,2
AZN	0,500	0,506	101,2
CZL	0,500	0,484	96,8
AZL	0,500	0,511	102,2
KSI	0,500	0,518	103,6

Preglednica 23: Povprečen izkoristek ekstrakcije šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezno iskano spojino za nivo 1,0 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Dodatek [µg/kg]	Povprečna ugotovljena vsebnost [µg/kg]	Povprečen izkoristek W (%)
KP	1,000	0,978	97,8
PP	1,000	0,945	94,5
AP	1,000	0,968	96,8
HAL	1,000	1,017	101,7
AZN	1,000	0,986	98,6
CZL	1,000	0,924	92,4
AZL	1,000	0,973	97,3
KSI	1,000	0,993	99,3

Preglednica 24: Povprečen izkoristek ekstrakcije šestih obogatenih ekstraktov surovega kravjega mleka za posamezno iskano spojino za nivo 1,5 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Dodatek [µg/kg]	Povprečna ugotovljena vsebnost [µg/kg]	Povprečen izkoristek W (%)
KP	1,500	1,518	101,2
PP	1,500	1,463	97,5
AP	1,500	1,426	95,1
HAL	1,500	1,296	86,4
AZN	1,500	1,462	97,5
CZL	1,500	1,607	107,1
AZL	1,500	1,444	96,3
KSI	1,500	1,454	96,9

4.2.5. Linearnost

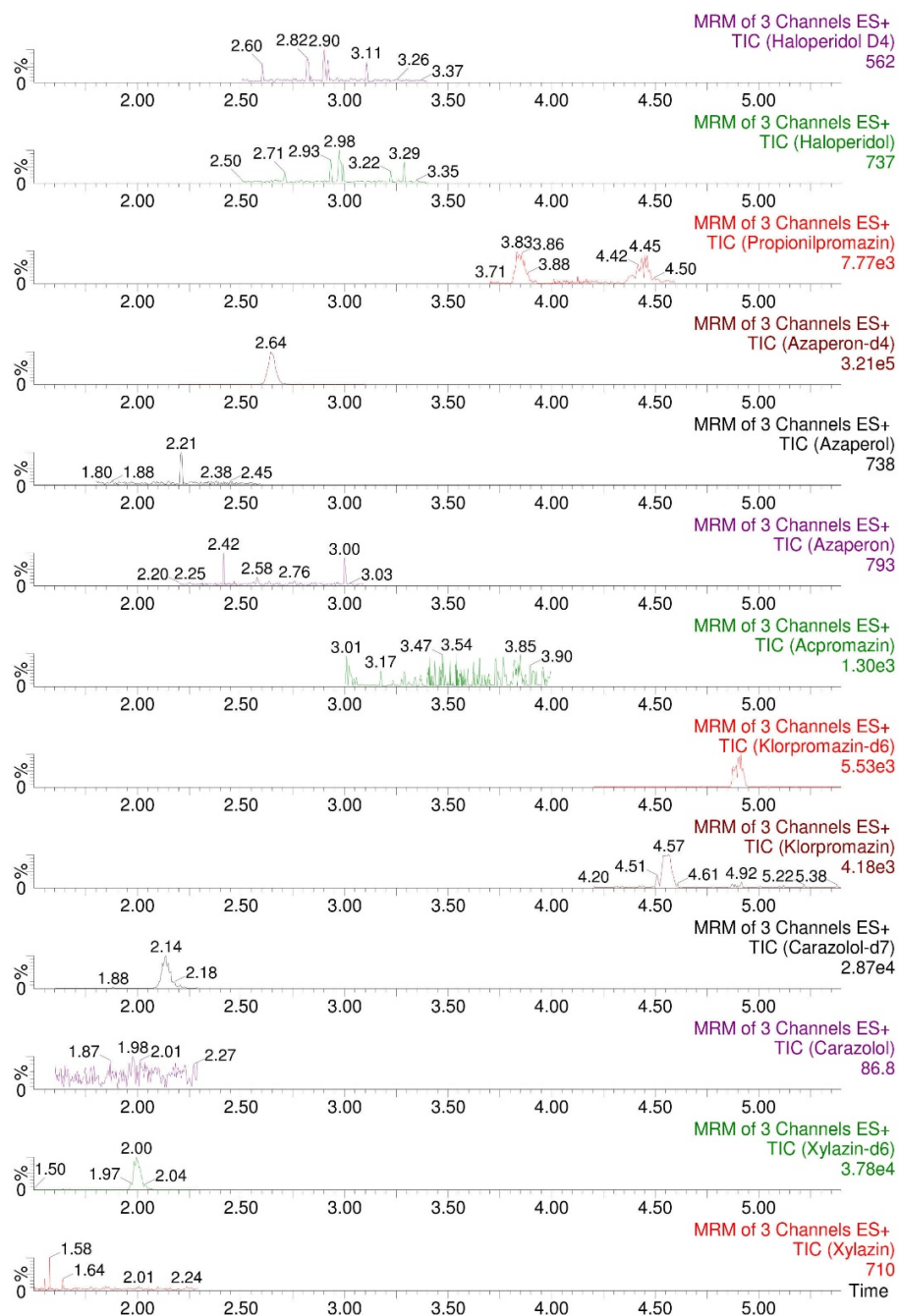
Linearnost med dodatkom mešanice standardnih raztopin in ugotovljeno vsebnostjo posameznih iskanih spojin smo preverili z injiciranjem obogatenih ekstraktov surovega mleka, s koncentracijo posamezne iskane spojine 0,5, 1,0, 1,5, 3 in 5 µg/kg. Kot pokazatelj linearne odvisnosti med dodano in ugotovljeno koncentracijo posamezne iskane spojine smo izbrali determinacijski koeficient (R^2) linearne premice skozi točke ugotovljene koncentracije posamezne iskane spojine v odvisnosti od dodatka. Dobljeni determinacijski koeficienti so zbrani v preglednici 25.

Preglednica 25: Determinacijski koeficienti premic za ugotavljanje linearosti metode.

Oznaka iskane spojine	R^2
KP	0,9862
PP	0,9944
AP	0,9906
HAL	0,8885
AZN	0,981
CZL	0,9544
AZL	0,9654
KSI	0,9848

4.2.6. Selektivnost

Selektivnost analizne metode smo dokazali z injiciranjem raztopine IS, ki je, kot že omenjeno, vsebovala devterirane molekule iskanih spojin, katerih molekulska masa se od molekulske mase iskanih spojin razlikuje le za nekaj g/mol. Na sliki 23 so prikazani kromatogrami raztopine IS.



Slika 23: Kromatogrami dobljeni z injiciranjem raztopine IS posneti po metodi Sedativi3.

4.2.7. Test filtrov za filtracijo vzorcev

Testiranje ustreznosti membranskih filtrov za končno filtracijo vzorcev smo izvedeli tako, da smo skozi 0,45 µm, PTFE, membranske filtre različnih dimenzij in proizvajalcev filtrirali mešanico standardnih raztopin ter IS s koncentracijo, ki je ustrezala 1 µg iskane spojine na kg surovega mleka. Prve 3 ml filtrata smo zavrgli in s filtracijo nadaljeval v konusno vialo. Kot pokazatelj ustreznosti membranskega filtra smo izbrali relativno razliko med povprečno ugotovljeno vrednostjo osemnajstih injiciranj filtriranega in nefiltriranega vzorca izračunano po enačbi 10. V enačbi 10 Φ predstavlja povprečno ugotovljeno vrednost iskane spojine osemnajstih injiciranj. Dobljene povprečne vrednosti nefiltriranega in filtriranih vzorcev ter relativne razlike (Δ_f) med njimi so prikazane v preglednici 26.

Enačba 10: Relativna razlika za test filtrov:
$$\Delta_f = \frac{\Phi_{(nefiltriran)} - \Phi_{(filtriran)}}{\Phi_{(nefiltriran)}} * 100 \%$$

Preglednica 26: Povprečne vrednosti ugotovljenih koncentracij posameznih iskanih spojin za filtrirane in nefiltrirane vzorce ter njihova relativna razlika, po injiciranju raztopin s koncentracijo 1 µg/kg.

Oznaka iskane spojine	Filter Phenex 0,45 µm, d _i = 4 mm			Filter Iso-Disc™ 0,45 µm, d _i = 13 mm			Filter Millipore 0,45 µm, d _i = 25 mm		
	Nefiltriran µg/kg	Filtriran µg/kg	Δ_f %	Nefiltriran µg/kg	Filtriran µg/kg	Δ_f %	Nefiltriran µg/kg	Filtriran µg/kg	Δ_f %
KP	0,995	1,032	3,72	0,995	0,999	0,40	0,995	0,907	8,84
PP	0,987	0,992	0,51	0,987	0,971	1,62	0,987	0,891	9,73
AP	1,006	1,011	0,50	1,006	0,973	3,28	1,006	0,943	6,26
HAL	1,021	0,984	3,62	1,021	0,997	2,35	1,021	1,001	1,96
AZN	0,956	0,990	3,56	0,956	0,989	3,45	0,956	0,894	6,49
CZL	0,972	0,935	3,81	0,972	1,018	4,73	0,972	0,940	3,29
AZL	0,988	0,979	0,91	0,988	0,953	3,54	0,988	0,885	10,43
KSI	0,991	0,973	1,82	0,991	0,975	1,61	0,991	0,793	19,98

4.2.8. Robustnost

Testiranje robustnosti smo izvedli tako, da smo pripravili serijo vzorcev surovega mleka različnih živalskih vrst ter vzorcev sterilnega in homogeniziranega kravjega mleka. Ekstrakcijo smo izvedli v paralelah, kjer je bil eden od vzorcev slep, drugi pa obogaten z mešanico standardnih raztopin, katere koncentracija je ustrezala 1 µg iskane spojine na kg mleka. Vsem vzorcem je bil dodan IS. Za pokazatelj ustrezne robustnosti metode smo izbrali povprečen izkoristek določitve treh

različnih vzorcev surovega ovčjega, kravjega in kozjega mleka ter alpskega kravjega mleka. Povprečni izkoristki določitve surovega mleka vseh živalskih vrst, za vse iskane spojine so bili v mejah med 90 in 110 %. Iz česar smo zaključili, da lahko iskane spojine morebitno prisotne v surovem mleku katere koli živalske vrste vrednotimo na isto umeritveno krivuljo. Povprečni izkoristki določitve alpskega mleka, za vse iskane spojine, so bili zelo različni z vrednostmi med 71 in 115 %. Iz česar smo zaključili, da je potrebno za količinsko vrednotenje posamezne iskane spojine morebitno prisotne v sterilnem in homogeniziranem mleku izdelati umeritveno krivuljo v matrici sterilnega in homogeniziranega mleka.

4.2.9. Validacijski kriteriji in povzetek rezultatov

Po pregledu validacijskih parametrov in doseženih rezultatov, zbranih v preglednici 27 smo zaključili, da je izdelana analizna metoda za določanje ostankov sedativov v surovem mleku z vidika evropske zakonodaje zajete v direktivi 657/2002/EC, **ustrezna**. Za končno filtracijo ekstraktov sta primerna dva od treh testiranih filtrov in sicer Phenex 0,45 µm, di = 4 mm in Iso-Disc™ 0,45 µm, di = 13 mm.

Preglednica 27: Parametri, kriteriji in rezultati validacije metode.

Parameter	Kriterij	Rezultat
Ponovljivost sistema	$C_v (n=6): \leq 20 \%^a$	$C_v (n=6)$: KP = 12,98 % PP = 4,16 % AP = 8,91 % HAL = 20,18 % AZN = 8,01 % CZL = 9,44 % AZL = 10,31 % KSI = 10,27 %
Ponovljivost metode	$C_v (n=18): \leq 45 \%^b$	$C_v (n=18)$ za nivo 0,5 µg/kg: KP = 16,28 % PP = 17,91 % AP = 10,43 % HAL = 27,00 % AZN = 10,50 % CZL = 26,00 % AZL = 8,41 % KSI = 21,16 %

		<i>C_v (n=18) za nivo 1,0 µg/kg:</i> KP = 14,01 % PP = 12,05 % AP = 18,79 % HAL = 21,95 % AZN = 10,14 % CZL = 15,89 % AZL = 11,48 % KSI = 17,61 %
		<i>C_v (n=18) za nivo 1,5 µg/kg:</i> KP = 9,88 % PP = 12,91 % AP = 12,65 % HAL = 18,33 % AZN = 7,87 % CZL = 13,46 % AZL = 11,39 % KSI = 19,99 %
	Faktor ponovljivosti s_r^2 : čim nižji ^a	<i>s_r^2 za nivo 0,5 µg/kg:</i> KP = 0,007 (µg/kg) ² PP = 0,008 (µg/kg) ² AP = 0,003 (µg/kg) ² HAL = 0,018 (µg/kg) ² AZN = 0,003 (µg/kg) ² CZL = 0,016 (µg/kg) ² AZL = 0,002 (µg/kg) ² KSI = 0,012 (µg/kg) ²
		<i>s_r^2 za nivo 1,0 µg/kg:</i> KP = 0,017 (µg/kg) ² PP = 0,013 (µg/kg) ² AP = 0,034 (µg/kg) ² HAL = 0,049 (µg/kg) ² AZN = 0,010 (µg/kg) ² CZL = 0,024 (µg/kg) ² AZL = 0,014 (µg/kg) ² KSI = 0,030 (µg/kg) ²
		<i>s_r^2 za nivo 1,5 µg/kg:</i> KP = 0,023 (µg/kg) ² PP = 0,037 (µg/kg) ² AP = 0,035 (µg/kg) ² HAL = 0,072 (µg/kg) ² AZN = 0,014 (µg/kg) ² CZL = 0,040 (µg/kg) ² AZL = 0,027 (µg/kg) ² KSI = 0,089 (µg/kg) ²
Obnovljivost	C _v (n=18): čim nižja ^b	<i>C_v (n=18) za nivo 0,5 µg/kg:</i>

		KP = 16,31 % PP = 18,94 % AP = 10,62 % HAL = 27,09 % AZN = 10,59 % CZL = 28,00 % AZL = 8,10 % KSI = 21,95 %
		<i>Cv (n=18) za nivo 1,0 µg/kg:</i> KP = 14,50 % PP = 12,87 % AP = 20,26 % HAL = 22,94 % AZN = 10,68 % CZL = 16,26 % AZL = 11,49 % KSI = 17,94 %
		<i>Cv (n=18) za nivo 1,5 µg/kg:</i> KP = 10,34 % PP = 13,22 % AP = 13,30 % HAL = 21,40 % AZN = 8,17 % CZL = 14,34 % AZL = 11,91 % KSI = 21,36 %
	Relativna razlika med analitikoma (Δ_a): čim nižja ^a	<i>Relativna razlika med analitikoma za nivo 0,5 µg/kg:</i> KP = -10,2 % PP = 2,8 % AP = 0,2 % HAL = 18,6 % AZN = 5,4 % CZL = -4,2 % AZL = 8,6 % KSI = 9,4 %
		<i>Relativna razlika med analitikoma za nivo 1,0 µg/kg:</i> KP = 11,6 % PP = -3,7 % AP = -2,0 % HAL = -5,0 % AZN = -2,6 % CZL = -10,6 % AZL = -9,5 % KSI = -4,9 %

		<i>Relativna razlika med analitikoma za nivo 1,5 µg/kg:</i> KP = 1,0 % PP = 0,9 % AP = 0,4 % HAL = -25,5 % AZN = -6,1 % CZL = 14,6 % AZL = -3,0 % KSI = -6,2 %
	Faktor obnovljivosti sr^2 : čim nižji ^a	<i>sr^2 za nivo 0,5 µg/kg:</i> KP = 0,007 (µg/kg) ² PP = 0,009 (µg/kg) ² AP = 0,003 (µg/kg) ² HAL = 0,018 (µg/kg) ² AZN = 0,0003 (µg/kg) ² CZL = 0,019 (µg/kg) ² AZL = 0,002 (µg/kg) ² KSI = 0,012 (µg/kg) ²
		<i>sr^2 za nivo 1,0 µg/kg:</i> KP = 0,018 (µg/kg) ² PP = 0,015 (µg/kg) ² AP = 0,039 (µg/kg) ² HAL = 0,054 (µg/kg) ² AZN = 0,011 (µg/kg) ² CZL = 0,026 (µg/kg) ² AZL = 0,041 (µg/kg) ² KSI = 0,031 (µg/kg) ²
		<i>sr^2 za nivo 1,5 µg/kg:</i> KP = 0,025 (µg/kg) ² PP = 0,039 (µg/kg) ² AP = 0,038 (µg/kg) ² HAL = 0,098 (µg/kg) ² AZN = 0,015 (µg/kg) ² CZL = 0,046 (µg/kg) ² AZL = 0,030 (µg/kg) ² KSI = 0,102 (µg/kg) ²
Izkoristek metode	50 – 120 % ^b	<i>Izkoristek za nivo 0,5 µg/kg:</i> KP = 100,8 % PP = 105,2 % AP = 102,8 % HAL = 106,2 % AZN = 101,2 % CZL = 96,8 % AZL = 102,2 % KSI = 103,6 %

		<i>Izkoristek za nivo 1,0 µg/kg:</i> KP = 97,8 % PP = 94,5 % AP = 96,8 % HAL = 101,7 % AZN = 98,6 % CZL = 92,4 % AZL = 97,3 % KSI = 99,3 %
		<i>Izkoristek za nivo 1,5 µg/kg:</i> KP = 101,2 % PP = 97,5 % AP = 95,1 % HAL = 86,4 % AZN = 97,5 % CZL = 107,1 % AZL = 96,3 % KSI = 96,9 %
Linearnost	$R^2: \geq 0,85^a$	<i>Determinacijski koeficienti R^2:</i> KP = 0,9862 PP = 0,9944 AP = 0,9906 HAL = 0,8885 AZN = 0,981 CZL = 0,9544 AZL = 0,9654 KSI = 0,9848
Selektivnost	Odzivi posameznih iskanih spojine ter interni standardi ne smejo interagirati z vrhovi iskanih spojine. ^b	Selektivnost potrjena
Test filtrov	Relativna razlika med filtriranim in nefiltriranim vzorcem (Δ_f): $\leq 5 \%$ ^a	<i>Filter Phenex 0,45 µm, di = 4 mm:</i> KP = 3,72 % PP = 0,51 % AP = 0,50 % HAL = 3,62 % AZN = 3,56 % CZL = 3,81 % AZL = 0,91 % KSI = 1,82 %
		<i>Filter Iso-DiscTM 0,45 µm, di = 13 mm:</i> KP = 0,40 % PP = 1,62 % AP = 3,28 % HAL = 2,35 %

		AZN = 3,45 % CZL = 4,73 % AZL = 3,54 % KSI = 1,61 %
		<i>Filter Millipore 0,45 µm, di = 25 mm:</i> KP = 8,84 % PP = 9,73 % AP = 6,26 % HAL = 1,96 % AZN = 6,49 % CZL = 3,29 % AZL = 10,43 % KSI = 19,98 %

^a – kriterij določen na osnovi izkušenj ^b – kriterij določen na osnovi direktive 2002/657/EC (20)

Za vsako analizno metodo je potrebno določiti njeno napako. Napaka meritve se pri potrditvenih analiznih metodah za določanje ostankov veterinarskih zdravil podaja kot vrednost $CC\alpha$ (meja odločitve). $CC\alpha$ je sestavljena iz mejne vrednosti in merilne negotovosti. Mejna vrednost (c) za dovoljene zdravilne učinkovine predstavlja vrednost MRL, za prepovedane, nedovoljene in neklasificirane zdravilne učinkovine pa meja zaznave iskane spojine v vzorcu. Merilna negotovost je sestavljena iz faktorja 1,64 in standardnega odklona obnovljivosti najmanj 18 vzorcev. Vrednosti $CC\alpha$ za izdelano metodo so izračunane po enačbi 10 in zbrane po posameznih iskanjih spojinah v preglednici 27. CZL ima v mleku MRL vrednost 1 µg/kg. Vse ostale iskane spojine pa so prepovedane ali pa njihova prisotnost v matrici mleka ni dovoljena (4). Vzorci analizirani po izdelani metodi, ki bi potencialno presegli vrednosti $CC\alpha$ za posamezno iskano spojino, so s pravnega stališča neskladni z zakonodajo.

Enačba 10: Izračun $CC\alpha$: $CC\alpha_{(n=18)} = C \text{ µg/kg} + 1,64 * S_{R(n=18)}$

Preglednica 28: Vrednosti $CC\alpha$ validirane analizne metode *Sedativi3* za posamezne iskane spojine.

Oznaka iskane spojine	$CC\alpha$ ($\mu\text{g/kg}$)
KP	1,16
PP	1,17
AP	1,31
HAL	1,39
AZN	1,16
CZL	1,24
AZL	1,21
KSI	1,27

5. SKLEP

Količina ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora in njihov potencialno škodljiv vpliv na zdravje ljudi je v zadnjih letih predmet številnih raziskav (35–38). Znanstveniki s področja zagotavljanja varne hrane se ne morejo poenotiti glede koncentracij, ki bi ogrožale zdravje ljudi, strinjajo pa se, da ostanki zdravil povzročajo alergijske reakcije in razvoj bakterijske odpornosti.

Tudi sedativi imajo tako kot vse druge zdravilne učinkovine, ki se uporabljajo v veterinarski medicini, veliko resnih in potencialno zdravje ogrožajočih neželenih učinkov. Zato je spremljanje živil živalskega izvora na prisotnost sedativov za zdravje potrošnikov velikega pomena. V ta namen smo razvili analizno metodo, ki nam v relativno kratkem času omogoča tako kvalitativno kot tudi kvantitativno določitev prisotnih ostankov sedativov, ki se v vzorcu surovega mleka nahajajo v koncentraciji nad 0,5 µg/kg. Tekom razvoja analizne metode, smo ugotovili, da je za kromatografsko ločbo najprimernejša analitska kolona Zorbax Eclipse Plus C18, dimenzij 2,1 × 50 mm z delci velikosti 1,8 µm. Testirali smo tudi večje število gradientov, kjer se je kot najprimernejši izkazal gradient shranjen v metodi *Sedativi3* z začetnim razmerjem mobilne faze 70 vol. % pretežno vodne faze (mobilna faza A) in 30 vol. % organske faze (mobilna faza B). Metoda je za razliko od predhodno uporabljene potrditvena, kar predstavlja veliko prednost, saj je število lažno pozitivnih vzorcev bistveno manjše. Analizno metodo smo tudi validirali, za analizo vzorcev surovega mleka različnih živalskih vrst. Razvita analizna metoda je kot taka za analizo sterilnega in homogeniziranega mleka neprimerna. Le-to bi najverjetneje lahko izvedli z uporabo nove umeritvene krivulje v matrici sterilnega in homogeniziranega mleka. Razvita metoda izkazuje velik potencial za analizo vzorcev tudi drugih matric, konkretno jajc, ledvic in urina. Vendar bi jo bilo potrebno za ta namen revalidirati. V kolikor bi revalidacija potrdila ustreznost razvite analizne metode za analizo tudi ostalih matric bi le ta prerasla v multimetodo, ki bi bila potencialno uporabna za sočasno analizo različnih matric.

V stroki se ugiba, da bo s poznavanjem neželenih učinkov vse večjega števila zdravilnih učinkovin, v prihodnosti za namen zagotavljanja varne hrane prihajalo do zniževanja MRL in MRPL vrednosti za vsebnost veterinarskih zdravil v vseh matricah. Da bomo v prihodnosti sposobni dosegati te zahteve, je razvoj in vpeljava novih analiznih metod, ki imajo čim nižje vrednosti določitve potencialno prisotnih ostankov zdravil, izrednega pomena.

6. LITERATURA

1. U.S. Food and Drug Administration: Analytical Procedures for Drug Residues in Food of Animal Origin, Truniseed SB, Long AR, [sTs], California, 1998: 1-7.
2. WHO, FAO: Residues of some veterinary drugs in animals and food, Food Nutr Pap 1994; 41/7: 1–13.
3. Thirty-eighth Meeting of Joint FAO/WHO Expert Committee on food Aditives (JECFA): Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO, Geneva, 1991; 29: 3–22, 166–215.
4. EMA: Commission Regulation (EU) No 37/2010, Off J Eur Union 2009; L 15/1-15/72.
5. Heykants J, Pardoel L, Janssen PAJ: On the distribution and metabolism of azaperone (R1929) in the rat and pig. Part I: Excretion and metabolism of azaperone in the Wistar rat. *Arzneimittelforschung* 1971; 982–984.
6. Heykants J, Lewi P, Janssen PAJ.: On the distribution and metabolism of azaperone (R1929) in the rat and pig. Part II: Pharmacokinetics of azaperone in the Wistar rat. *Arzneimittelforschung* 1971; 1263–1269.
7. Ban TA: Fifty years chlorpromazine: a historical perspective, *Neuropsychiatric Dis Treat* 2007; 3: 495–500.
8. WHO. Essential medicines and health products, 2015, <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>. Dostop: 11-08-2017.
9. Mariani PJ: Adverse reactions to chlorpromazine in the treatment of migraine, *Ann Emerg Med* 1988; 17: 380-381.
10. McEvoy: American Hospital Formulary Service-Drug Information. Gerald K., *Am J Hosp Pharm* 1998; 1860.
11. Toxnet HSDB: Chlorpromazine. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?db=hsdb:@term+@rn+50-53-3>. Dostop: 11-08-2017.
12. Papich MG: Saunders Handbook of Veterinary drugs: Small and Large animal 3rd ed. Elsevier Saunders, North Carolina 2011; 1, 2, 148, 149, 657.
13. Community Reference Laboratories: CRL Guidance Paper (7 December 2007). <http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>. Dostop: 11-08-2017.
14. Collard JF, Maggs R: Clinical Trial of Acepromazine Maleate in Chronic Schizophrenia, *Br Med J* 1958; 1: 1452-1454.
15. Algren DA, Ashworth A: Acute Acepromazine Overdose: Clinical Effects and Toxicokinetic Evaluation, *J Med Toxicol* 2015; 11: 121–123.
16. EMA, CVMP: Xylazine Hydrochloride summary report (1). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015345.pdf. 1999; 1–5.
17. Bayer: Rompun® SmPC, 1999; 1.
18. Debray Q: The discovery of haloperidol, *Encephale* 1999; 25: 59–66.
19. Krka d.d.: Haldol SmPC, 2016; 1–12.

20. European Commission: Directive 2002/657/EC, Commission Decision of 12 August 2002; L 221/8, 493-521.
21. Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S: A Global View of LC/MS How to solve your most challenging analytical problems 2nd ed. Global View Publishing 2002; 45-92.
22. Balogh MP: The Mass Spectrometry Primer, Waters Corporation 2009; 8-80.
23. Skoog DA, Holler JF, Crouch RS: Principles of Instrumental Analysis 6th ed. Thomson Brooks/Cole 2007; 18-22.
24. Cooper J, Delahaut P, Fodey TL, Elliott CT: Development of a rapid screening test for veterinary sedatives and the beta-blocker carazolol in porcine kidney by ELISA, Analyst, 2004; 129:169–174.
25. Lipičar E: Razvoj ekstrakcije in kromatografske metode za določanje pomirjeval v ledvicah klavnih živali, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2013; 1-64.
26. Zupanek Ž: Optimizacija ekstrakcije in kromatografske ločbe za določanje pomirjeval v različnih živalskih vzorcih. Ljubljana; Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2014; 1-61.
27. Kožuh-Eržen N: Analitska metoda za ugotavljanje zaostankov klorpromazina v mišičnem tkivu in urinu klavnih živali, Slov Vet Res 2001; 38: 305–312.
28. Cerkvenc-Flajs V: Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection, Anal Chim Acta 2007; 586: 374-382.
29. Aoki Y, Hakamata H, Igarashi Y, Uchida K, Kobayashi H, Hirayama N, et al.: Simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal tissues by HPLC with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry, J Chromatogr B 2009; 877: 166-172.
30. Borges NC, Rezende VM, Santana JM, Moreira RP, Moreira RF, Moreno P, Borges DC, Donato JL, Moreno RA: Chlorpromazine quantification in human plasma by UPLC–electrospray ionization tandem mass spectrometry. Application to a comparative pharmacokinetic study., J Chromatogr B 2011; 879: 3728–3734.
31. Zheng X, Mi X, Li S, Chen G: Determination of Xylazine and 2,6-Xylidine in Animal Tissues by Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry, J Food Sci 2013; 78: T955-T959.
32. Mata DC, Davis JF, Figueroa AK, Stanford MJ: Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry for the Quantitation of Seventeen Sedative Hypnotics in Six Common Toxicological Matrices, J Anal Toxicol 2016; 40: 58-63.
33. Suo DC, Zhao GL, Wang PL, Su XO: Simultaneous Determination of β -Agonists and Psychiatric Drugs in Feeds by LC–MS–MS, J Chromatogr Sci 2014, 52: 604-608.
34. UVHVVR. Naloge in cilji UVHVVR. http://www.uvhvvr.gov.si/si/o_uvhvvr/naloge_in_cilji/. Dostop: 11-08-2017.
35. McEvoy JDG: Emerging food safety issues: An EU perspective, Drug Test Anal 2016; 8: 511-520.

36. Matus JL, Boison JO: A multi-residue method for 17 anticoccidial drugs and ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry, *Drug Test Anal* 2016; 8: 465-476.
37. Cerniglia CE, Pineiro SA, Kotarski SF: An update discussion on the current assessment of the safety of veterinary antimicrobial drug residues in food with regard to their impact on the human intestinal microbiome, *Drug Test Anal* 2016; 8: 539–548.
38. Lin Z, Vahl CI, Riviere JE: Human Food Safety Implications of Variation in Food Animal Drug Metabolism, *Sci Rep* 2016; 6: 27907.

Priloga 1: Izvorni podatki za ponovljivost metode

Preglednica 29: Ugotovljene koncentracije KP na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg KP na kg surovega mleka.

Številna in (n) KP s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost KP [µg/kg]			
1	0,545	0,429	0,676	
2	0,562	0,439	0,459	
3	0,431	0,469	0,560	
4	0,480	0,704	0,501	
5	0,472	0,426	0,499	
6	0,534	0,480	0,636	
Φ µg/kg	0,504	0,491	0,555	0,517
Sr µg/kg	0,05	0,11	0,09	0,08
Cv %	10,07	21,69	15,39	16,28

Preglednica 30: Ugotovljene koncentracije KP na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg KP na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) KP s koncentracijo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost KP [µg/kg]			
1	0,890	0,931	0,754	
2	1,084	1,104	0,824	
3	0,876	1,009	0,750	
4	1,006	0,750	1,037	
5	1,197	0,937	0,818	
6	0,815	1,063	0,986	
Φ µg/kg	0,978	0,966	0,862	0,935
sr µg/kg	0,14	0,13	0,12	0,13
Cv %	14,80	13,02	14,08	14,01

Preglednica 31: Ugotovljene koncentracije KP na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg KP na kg surovega mleka.

Številga injekcij				
(n) KP s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost KP [µg/kg]			
1	1,442	1,632	1,485	Skupaj
2	1,464	1,389	1,489	
3	1,774	1,565	1,592	
4	1,403	1,902	1,597	
5	1,437	1,660	1,477	
6	1,590	1,331	1,377	
Φ µg/kg	1,518	1,580	1,503	1,534
sr µg/kg	0,14	0,21	0,08	0,15
Cv %	9,28	13,02	5,47	9,88

Preglednica 32: Ugotovljene koncentracije PP na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg PP na kg surovega mleka.

Številna analiza				
Število injiciranj (n) PP s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost PP [µg/kg]			
1	0,540	0,514	0,537	Skupaj
2	0,452	0,385	0,497	
3	0,573	0,515	0,509	
4	0,560	0,729	0,470	
5	0,445	0,325	0,573	
6	0,587	0,452	0,486	
Φ µg/kg	0,526	0,487	0,512	0,508
Sr µg/kg	0,06	0,14	0,04	0,09
Cv %	11,81	28,76	7,32	17,91

Preglednica 33: Ugotovljene koncentracije PP na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg PP na kg surovega mleka.

Številoma injiciranj (n) PP s koncentracijo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost PP [µg/kg]			
1	0,958	1,097	0,952	
2	0,909	0,923	0,889	
3	0,853	0,970	0,863	
4	0,925	0,838	1,172	
5	1,180	0,910	0,902	
6	0,846	1,037	1,112	
Φ µg/kg	0,945	0,963	0,982	0,963
Sr µg/kg	0,12	0,09	0,13	0,12
Cv %	12,99	9,69	13,13	12,05

Preglednica 34: Ugotovljene koncentracije PP na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg PP na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) PP s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost PP [µg/kg]			
1	1,458	1,422	1,412	
2	1,364	1,428	1,351	
3	1,420	1,451	1,419	
4	1,403	2,106	1,422	
5	1,335	1,630	1,543	
6	1,797	1,380	1,547	
Φ µg/kg	1,463	1,570	1,449	1,494
Sr µg/kg	0,17	0,28	0,08	0,19
Cv %	11,57	17,64	5,44	12,91

Preglednica 35: Ugotovljene koncentracije AP na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg AP na kg surovega mleka.

Številna in (n) AP s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost AP [µg/kg]			
1	0,497	0,495	0,564	
2	0,459	0,448	0,494	
3	0,492	0,431	0,509	
4	0,583	0,555	0,404	
5	0,519	0,498	0,598	
6	0,532	0,456	0,508	
Φ µg/kg	0,514	0,481	0,513	0,502
Sr µg/kg	0,04	0,05	0,07	0,05
Cv %	8,22	9,39	12,97	10,48

Preglednica 36: Ugotovljene koncentracije AP na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg AP na kg surovega mleka.

Številna in (n) AP s koncentracijo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost AP [µg/kg]		
1	0,787	1,128	0,905
2	0,988	1,112	0,858
3	0,923	1,045	0,789
4	0,992	0,754	1,414
5	1,221	0,896	0,808
6	0,896	1,015	1,152
Φ µg/kg	0,968	0,992	0,988
Sr µg/kg	0,14	0,14	0,25
Cv %	14,97	14,41	24,97

Preglednica 37: Ugotovljene koncentracije AP na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg AP na kg surovega mleka.

Številko injiciranj (n) AP s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost AP [µg/kg]			
1	1,251	1,366	1,477	
2	1,386	1,307	1,415	
3	1,477	1,461	1,279	
4	1,402	2,034	1,478	
5	1,335	1,633	1,486	
6	1,705	1,751	1,386	
Φ µg/kg	1,426	1,592	1,420	1,479
Sr µg/kg	0,16	0,27	0,08	0,19
Cv %	10,93	17,13	5,64	12,65

Preglednica 38: Ugotovljene koncentracije HAL na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg HAL na kg surovega mleka.

Število injiciranj (n) HAL s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost HAL [µg/kg]		
1	0,415	0,275	0,465
2	0,517	0,665	0,446
3	0,481	0,564	0,500
4	0,521	0,318	0,367
5	0,739	0,588	0,485
6	0,515	0,784	0,366
Φ µg/kg	0,531	0,532	0,438
Sr µg/kg	0,12	0,18	0,05
Cv %	22,49	33,28	10,68

Preglednica 39: Ugotovljene koncentracije HAL na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg HAL na kg surovega mleka.

Število injiciranj (n) HAL s koncentracijo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost HAL [µg/kg]		
1	0,814	0,700	1,158
2	1,343	0,792	1,143
3	1,033	0,830	1,072
4	1,097	1,123	0,711
5	0,784	1,342	1,361
6	1,028	0,891	0,956
Φ µg/kg	1,017	0,946	1,067
Sr µg/kg	0,20	0,24	0,22
Cv %	20,09	25,40	20,52

Preglednica 40: Ugotovljene koncentracije HAL na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg HAL na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) HAL s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost HAL [µg/kg]			
1	1,056	1,092	1,883	
2	1,510	1,263	1,703	
3	1,151	1,551	1,549	
4	1,429	1,396	1,769	
5	1,586	2,104	1,606	
6	1,041	1,124	1,564	
Φ µg/kg	1,296	1,422	1,679	1,465
Sr µg/kg	0,24	0,38	0,13	0,27
Cv %	18,63	26,42	7,80	18,33

Preglednica 41: Ugotovljene koncentracije AZN na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg AZN na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) AZN s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost AZN [µg/kg]			
1	0,493	0,560	0,499	
2	0,438	0,514	0,514	
3	0,564	0,560	0,560	
4	0,549	0,471	0,426	
5	0,447	0,562	0,476	
6	0,542	0,476	0,397	
Φ µg/kg	0,506	0,524	0,479	0,503
Sr µg/kg	0,05	0,04	0,06	0,05
Cv %	10,76	8,21	12,44	10,50

Preglednica 42: Ugotovljene koncentracije AZN na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg AZN na kg surovega mleka.

Števílo injiciranj (n) AZN s koncentracíjo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analíze			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost AZN [µg/kg]			
1	0,805	0,995	0,892	
2	0,952	1,016	1,160	
3	1,011	1,047	1,050	
4	1,095	0,912	1,143	
5	1,074	0,908	0,932	
6	0,978	0,901	0,892	
Φ µg/kg	0,986	0,963	1,012	0,987
Sr µg/kg	0,10	0,06	0,12	0,10
Cv %	10,56	6,63	12,17	10,14

Preglednica 43: Ugotovljene koncentracije AZN na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg AZN na kg surovega mleka.

Številna injiciranja (n) AZN s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost AZN [µg/kg]			
1	1,413	1,447	1,465	
2	1,435	1,374	1,671	
3	1,353	1,454	1,523	
4	1,408	1,404	1,471	
5	1,512	1,279	1,644	
6	1,649	1,725	1,548	
Φ µg/kg	1,462	1,447	1,554	1,488
Sr µg/kg	0,11	0,15	0,09	0,12
Cv %	7,20	10,38	5,58	7,87

Preglednica 44: Ugotovljene koncentracije CZL na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg CZL na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) CZL s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost CZL [µg/kg]		
1	0,264	0,301	0,476
2	0,476	0,594	0,496
3	0,441	0,590	0,586
4	0,374	0,331	0,490
5	0,699	0,597	0,434
6	0,652	0,540	0,550
Φ µg/kg	0,484	0,492	0,505
Sr µg/kg	0,17	0,14	0,05
Cv %	34,16	28,12	10,76

Preglednica 45: Ugotovljene koncentracije CZL na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg CZL na kg surovega mleka.

Število injiciranj (n) CZL s koncentracijo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost CZL [µg/kg]			
1	0,933	0,891	0,953	
2	1,089	1,192	1,317	
3	0,821	0,967	1,250	
4	1,043	0,942	0,995	
5	0,861	0,875	0,832	
6	0,794	1,090	0,833	
Φ µg/kg	0,924	0,993	1,030	0,982
sr µg/kg	0,12	0,12	0,21	0,16
Cv %	13,08	12,47	20,18	15,89

Preglednica 46: Ugotovljene koncentracije CZL na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg CZL na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) CZL s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost CZL [µg/kg]			
1	1,992	1,383	1,210	
2	1,725	1,462	1,743	
3	1,537	1,388	1,331	
4	1,661	1,475	1,528	
5	1,522	1,487	1,234	
6	1,203	1,651	1,282	
Φ µg/kg	1,607	1,474	1,388	1,490
Sr µg/kg	0,26	0,10	0,21	0,20
Cv %	16,24	6,60	14,96	13,46

Preglednica 47: Ugotovljene koncentracije AZL na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg AZL na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) AZL s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost AZL [µg/kg]		
1	0,474	0,468	0,494
2	0,479	0,498	0,462
3	0,501	0,456	0,474
4	0,530	0,519	0,414
5	0,519	0,575	0,539
6	0,561	0,543	0,426
Φ µg/kg	0,511	0,510	0,468
Sr µg/kg	0,03	0,05	0,05
Cv %	6,45	8,87	9,77

Preglednica 48: Ugotovljene koncentracije AZL na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg AZL na kg surovega mleka.

Število injiciranj (n) AZL s koncentracijo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost AZL [µg/kg]		
1	0,821	1,011	0,975
2	1,008	0,903	1,074
3	0,927	1,067	0,932
4	0,841	1,085	1,268
5	1,217	1,085	1,052
6	1,023	0,941	1,105
Φ µg/kg	0,973	1,015	1,068
Sr µg/kg	0,15	0,08	0,12
Cv %	14,96	7,70	10,99

Preglednica 49: Ugotovljene koncentracije AZL na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg AZL na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) AZL s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost AZL [µg/kg]		
1	1,395	1,107	1,175
2	1,399	1,213	1,467
3	1,492	1,572	1,499
4	1,314	1,498	1,673
5	1,511	1,422	1,676
6	1,554	1,588	1,445
Φ µg/kg	1,444	1,400	1,489
Sr µg/kg	0,09	0,20	0,18
Cv %	6,21	14,14	12,38

Preglednica 50: Ugotovljene koncentracije KSI na treh serijah pri koncentraciji 0,5 µg KSI na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) KSI s koncentracijo 0,5 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost KSI [µg/kg]			
1	0,495	0,376	0,451	
2	0,442	0,518	0,374	
3	0,370	0,791	0,455	
4	0,540	0,482	0,457	
5	0,596	0,519	0,550	
6	0,667	0,506	0,536	
Φ µg/kg	0,518	0,532	0,471	0,507
Sr µg/kg	0,11	0,14	0,06	0,11
Cv %	20,59	25,90	13,68	21,16

Preglednica 51: Ugotovljene koncentracije KSI na treh serijah pri koncentraciji 1,0 µg KSI na kg surovega mleka.

Število injiciranj (n) KSI s koncentracijo 1,0 µg/kg	Datum izvedbe analize			
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016	
	Ugotovljena vsebnost KSI [µg/kg]			
1	0,747	0,932	0,953	
2	0,918	1,155	0,940	
3	1,059	0,898	0,883	
4	0,938	0,698	1,401	
5	1,270	1,003	1,094	
6	1,028	0,827	0,982	
Φ µg/kg	0,993	0,919	1,042	0,985
sr µg/kg	0,17	0,16	0,19	0,17
Cv %	17,52	16,91	18,14	17,61

Preglednica 52: Ugotovljene koncentracije KSI na treh serijah pri koncentraciji 1,5 µg KSI na kg surovega mleka.

Številno injiciranj (n) KSI s koncentracijo 1,5 µg/kg	Datum izvedbe analize		
	05.09.2016	06.09.2016	06.09.2016
	Ugotovljena vsebnost KSI [µg/kg]		
1	1,554	1,343	1,223
2	1,674	1,382	1,662
3	1,485	1,228	1,110
4	1,359	1,991	1,977
5	1,535	1,466	2,030
6	1,119	1,483	1,280
Φ µg/kg	1,454	1,482	1,547
Sr µg/kg	0,19	0,27	0,40
Cv %	13,30	17,93	25,83