

Određivanje ostataka nesteroidnih protuupalnih lijekova i in vitro procjena njihova ekotoksikološkoga učinka

Božić Luburić, Đurđica

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:409424>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Đurđica Božić Luburić

**ODREĐIVANJE OSTATAKA
NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH
LIJEKOVA I *IN VITRO* PROCJENA
NJIHOVA EKOTOKSIKOLOŠKOGA
UČINKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Đurđica Božić Luburić

**DETERMINATION OF NONSTEROIDAL
ANTI-INFLAMMATORY DRUG RESIDUES
AND *IN VITRO* ASSESSMENT OF THEIR
ECOTOXICOLOGICAL IMPACT**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Đurđica Božić Luburić

**ODREĐIVANJE OSTATAKA
NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH
LIJEKOVA I *IN VITRO* PROCJENA
NJIHOVA EKOTOKSIKOLOŠKOGA
UČINKA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

dr. sc. Nina Bilandžić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Đurđica Božić Luburić

**DETERMINATION OF NONSTEROIDAL
ANTI-INFLAMMATORY DRUG RESIDUES
AND *IN VITRO* ASSESSMENT OF THEIR
ECOTOXICOLOGICAL IMPACT**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full Professor

PhD Nina Bilandžić, Scientific Advisor

Zagreb, 2022

Tema doktorskog rada pod naslovom „Određivanje ostataka nesteroidnih protuupalnih lijekova i in vitro procjena njihova ekotoksikološkoga učinka“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanja mentora, prihvaćena je na 11. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu akademske godine 2014./2015. održanoj dana 25. rujna 2015. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 9. veljače 2016. godine na 7. sjednici u 347. akademskoj godini (2015./2016.).

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta pod mentorstvom dr. sc. Nine Bilandžić, znan. sav. u trajnom zvanju i u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
rad

Doktorski

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 543.544.5:574.64:615.276:628.3(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ODREĐIVANJE OSTATAKA NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA I *IN VITRO* PROCJENA NJIHOVA EKOTOKSIKOLOŠKOGA UČINKA

Durdica Božić Luburić, dipl.ing.biotechn.

Rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu i u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Mentori: prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković i dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj. u trajnom zvanju

Sažetak: U okviru doktorske disertacije razvijena je metoda za kvantitativno određivanje ostataka 27 nesteroidnih protuupalnih lijekova, kemijski različitih spojeva, tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti povezane s masenom spektrometrijom u uzorcima hrane životinjskog podrijetla (mlijeku, mišićnom tkivu) i uzorcima vode iz okoliša (otpadna voda). Optimiziran postupak ekstrakcije iz složenih matrica temelji se na enzimskoj hidrolizi koju slijedi ekstrakcija acetonitrilom, a dobiveni ekstrakt je pročišćen, uz istovremeno koncentriranje, ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Validacijom metode ispitane su zadane značajke učinkovitosti koje su zadovoljile zakonski postavljene kriterije prihvatljivosti. Istraživanje je obuhvatilo i analizu realnih uzoraka s područja Republike Hrvatske, 449 uzoraka hrane životinjskog podrijetla i 96 uzoraka otpadnih voda. Kako bi se dobile informacije o toksičnosti tih spojeva koji dospijevaju u okoliš, *in vitro* testom na staničnim linijama ribe i ljudi ispitan je njihov citotoksični učinak.

Broj stranica: 133

Broj slika: 24

Broj tablica: 18

Broj literaturnih navoda: 118

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nesteroidni protuupalni lijekovi, ostaci (rezidue), UHPLC-MS/MS, validacija, ekotoksikologija, hrana životinjskog podrijetla, otpadne vode

Datum obrane: 25. ožujka 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
2. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
3. Dr. sc. Ivana Varenina, znanstveni suradnik
4. Prof. dr. sc. Ivana Kmetič (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4 i Sveučilištu u Zagrebu, Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

PhD Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 543.544.5:574.64:615.276:628.3(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

DETERMINATION OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG RESIDUES AND *IN VITRO* ASSESSMENT OF THEIR ECOTOXICOLOGICAL IMPACT

Đurđica Božić Luburić, mag.eng.bioproces.

Thesis performed at Laboratory for residue control, Croatian Veterinary Institute, Zagreb and at Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations, Department of Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

Supervisors: PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full Professor and PhD Nina Bilandžić, Scientific Advisor

Abstract: In this dissertation, a method for the quantitative determination of 27 nonsteroidal anti-inflammatory drug residues by ultra high performance liquid chromatography – mass spectrometry in food of animal origin (milk, muscle) and environmental water (wastewater) was developed. Optimised sample processing consisted of enzymatic hydrolysis and acetonitrile extraction was followed by a clean-up of the extract by solid phase extraction. By validation of the method, verified performance characteristics complied with the legally set acceptability criteria. The study also included the analysis of the real samples from regions of the Republic of Croatia, 449 samples of food of animal origin and 96 samples of wastewater. In order to obtain information on the toxicity of these compounds that are released into the environment, their cytotoxic effect was examined using *in vitro* test on fish and human cell lines.

Number of pages: 133

Number of figures: 24

Number of tables: 18

Number of references: 118

Original in: Croatian

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, residues, UHPLC-MS/MS, validation, ecotoxicology, food of animal origin, wastewater

Date of the thesis defense: 25th March, 2022

Reviewers:

1. PhD Kristina Radošević, Assistant Professor
2. PhD Višnja Gaurina Srček, Full Professor
3. PhD Ivana Varenina, Scientific Associate
4. PhD Ivana Kmetič, Full Professor (substitute)

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23; National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4 and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Određivanje ostataka nesteroidnih protuupalnih lijekova i *in vitro* procjena njihova ekotoksikološkoga učinka

Sažetak

Intenzivni rast broja stanovništva kao i povećanje udjela starije populacije u istom, procesi urbanizacije i industrijalizacije te povećana potreba za proizvodnjom hrane, osobito one životinjskog podrijetla, doprinose globalnom trendu rasta upotrebe lijekova u humanoj i veterinarskoj medicini. Nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) skupina su lijekova s analgetskim, protuupalnim i antipiretskim djelovanjem, a ističu se širokom primjenom u suzbijanju boli i ostalih stanja povezanih s upalom i/ili oštećenjem tkiva, liječenju bolesti mišićno-koštanog sustava kao i u snižavanju povišene tjelesne temperature. Pored toga, imaju značajnu ulogu u komercijalnim sustavima uzgoja farmских životinja s ciljem zaštite dobrobiti životinja, kojoj se u današnje vrijeme pridaje sve veća pažnja. Primjena NSAID-ova u životinja namijenjenih za proizvodnju hrane može rezultirati pojavom njihovih ostataka u proizvodima životinjskog podrijetla i na taj način mogu predstavljati potencijalni rizik za ljudsko zdravlje. Međutim, pojava njihovih ostataka povezuje se i s onečišćenjem okoliša u koji, zbog sve učestalije primjene, mogu dospjeti na različite načine i gdje čine novu skupinu okolišnih zagađivala.

Kontrola ostataka NSAID-ova u hrani, kao i većine lijekova, strogo je regulirana u Europskoj uniji s aspekta sigurnosti hrane, no zadovoljavajuća zakonska regulativa o njihovoj pojavnosti i prisutnosti u okolišu još ne postoji. Iako je prisutnost NSAID-ova u površinskim vodama poznata, nepoznati su njihovi učinci u koncentracijama prisutnim u okolišu na ekosustav, ali i na zdravlje čovjeka, uslijed dugoročnog ispuštanja i izloženosti. Stoga je praćenje njihove pojavnosti i stvarne koncentracije u hrani životinjskog podrijetla i okolišnim uzorcima, brzim i visoko osjetljivim analitičkim metodama koje se primjenjuju u rutinskim analizama i kontroli tih spojeva, postalo vrlo važno područje znanstvenih istraživanja. Zbog kemijski raznolike prirode NSAID-ova i prisutnosti u vrlo niskim koncentracijama u kompleksnim biološkim uzorcima, postojeće metode razlikuju se s obzirom na njihova kiselo-bazna svojstva i vrlo su ograničene one koje uključuju obje skupine spojeva i različite matrice.

Cilj ovog rada bio je razvoj, optimizacija i validacija brze i pouzdane metode za istovremeno kvantitativno određivanje ostataka 27 odabranih NSAID-ova koji pripadaju kemijski različitim strukturnim grupama u složenim matricama. Metoda se temelji na tekućinskoj kromatografiji ultra visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom (engl. *Ultra*

high performance liquid chromatography – mass spectrometry, UHPLC-MS/MS). Detaljnom optimizacijom parametara izvora masenog spektrometra, kromatografskog odvajanja i postupka pripreme uzoraka postignut je optimalan ekstrakcijski postupak za pouzdanu detekciju i potvrdu ostataka NSAID-ova u uzorcima mišićnog tkiva i mlijeka (vode). Obrada uzorka sastojala se od enzimske hidrolize i ekstrakcije acetonitriplom, a pročišćavanje i koncentriranje ekstrakta provedeno je ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase extraction*, SPE). Predloženi analitički postupci validirani su pomoću validacijskog programa određivanjem preciznosti, osjetljivosti, granične koncentracije analita ($CC\alpha$), sposobnosti dokazivanja ($CC\beta$), točnosti (iskorištenja) i utjecaja matrice kako bi se zadovoljili zakonski postavljeni kriteriji prihvatljivosti. Iskorištenje metode za mlijeko bilo je u rasponu od 98,1 do 106,5%, a za mišićno tkivo od 98,8 % do 102,7 %, $CC\beta$, parametar orijentacijskog određivanja, bio je u rasponu od 0,07 do 65,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko te za mišićno tkivo od 1,19 do 542,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dok $CC\alpha$, parametar za potvrdno određivanje, kretao se od 0,11 do 56,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko i od 1,12 do 518,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mišićno tkivo.

Nadalje, kako bi se osigurao cjelovit koncept utvrđivanja pojavnosti NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla i u okolišnim uzorcima vode kao i procjena ekotoksikološkog rizika, potreban je integrirani pristup kemijskih i bioloških (*in vitro*) metoda. Pomoću razvijene UHPLC-MS/MS metode u ovom radu analizirano je 449 uzoraka hrane životinjskog podrijetla (mišićnog tkiva i mlijeka) i 96 uzoraka iz okoliša (otpadne vode). Ovisno o matrici, od 27 odabranih detektirano je i identificirano 11 NSAID-ova, a među najčešće kvantificiranim analitima bili su diklofenak, ketoprofen, ibuprofen, naproksen i salicilna kiselina. U svrhu procjene citotoksičnog učinka NSAID-ova proveden je *in vitro* test na staničnim linijama ribe i ljudi. Prikazani rezultati predstavljaju važan doprinos u području razvoja analitičkih metoda te u utvrđivanju pojavnosti i raspodjeli NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla i okolišnim uzorcima vode kao i procjene toksičnosti ispitivanih spojeva.

Ključne riječi: nesteroidni protuupalni lijekovi, ostaci (rezidue), UHPLC-MS/MS, validacija, ekotoksikologija, hrana životinjskog podrijetla, otpadne vode

Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drug residues and *in vitro* assessment of their ecotoxicological impact

Summary

Rapid population growth, as well as population ageing at the same time, urbanisation and industrialisation and increased demand for food production, especially of animal origin, contribute to the rising consumption of the pharmaceuticals in human and veterinary medicine on a global level. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of drugs with analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects, and are widely used in pain reduction and other conditions associated with inflammation and/or tissue damage, treatment of musculoskeletal diseases and as decrease of fever. In addition, they play a significant role in commercial farm animal husbandry systems with the aim of protecting animal welfare, to which more attention is being paid nowadays. The use of NSAIDs in food-producing animals may result in their residues in products of animal origin and may therefore pose a potential risk to human health. However, the occurrence of their residues is also associated with environmental pollution in which they can enter by different route. Because the administration of NSAIDs is so vast, they are also regarded as environmental contaminants.

From the aspect of food safety, the control of residues of NSAIDs in food, as well as most pharmaceuticals, is strictly regulated in the European Union, but satisfactory legislation on their occurrence and presence in the environment does not yet exist. Although the presence of NSAIDs in surface waters is known, their effects in concentrations present in the environment on the ecosystem, but also on human health, due to long-term exposure, are unknown. Therefore, monitoring their occurrence and real concentration in food of animal origin and environmental samples, by using rapid and highly sensitive analytical methods via routine and targeted surveillance, has become a very important area of scientific research. Due to the chemical variety of NSAIDs and their presence at very low concentrations in complex biological samples, existing methods for the determination of NSAIDs residues were using different sample preparation and analytical conditions regarding their acid-base properties. These challenges resulted in only a few methods that combine both groups and two or more different matrices.

The main aim of this work was to develop, optimize and validate a fast and reliable method for simultaneous analysis of 27 NSAIDs belonging to chemically different structural groups in complex matrices. The method is based on ultra high performance liquid chromatography - mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Detailed optimisation of mass

spectrometer source parameters, chromatographic separation and sample preparation process resulted in optimal extraction procedure for reliable detection and confirmation of residues of NSAIDs in samples of muscle tissue and milk (water). Sample processing consisted of enzymatic hydrolysis and acetonitrile extraction was followed by a clean-up of the extract by solid phase extraction (SPE). The in-house validation study covering trueness, precision, sensitivity, decision limit ($CC\alpha$), detection capability ($CC\beta$) and matrix effect, was designed and evaluated with help of validation software to meet the demands of regulatory compliance. The method recovery for milk and muscle matrix was in the range of 98.1% to 106.5% and 98.8% to 102.7%, whereas the $CC\beta$ as the parameter for screening analysis, ranged from 0.07 to 65.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 1.19 to 542.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and the $CC\alpha$, as the parameter for confirmatory analysis, from 0.11 to 56.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 1.12 to 518.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

Furthermore, in order to ensure a comprehensive concept of detecting the occurrence of NSAIDs in food of animal origin and in environmental samples of water, as well as an assessment of the ecotoxicological risk, an integrated approach to chemical and biological (in vitro) methods is required. Therefore, 449 samples of food of animal origin (muscle tissue and milk) and 96 samples from the environment (wastewater) were analysed by developed method. Depending on the matrix, 11 NSAIDs were detected and identified out of 27 selected, the most frequently quantified being diclofenac, ketoprofen, ibuprofen, naproxen and salicylic acid. In order to obtain information on the toxicity of these compounds that are released into the environment, their cytotoxic effect was examined using in vitro test on fish and human cell lines. The presented results represent an important contribution in the development of analytical methods and in the determination of the occurrence and distribution of NSAIDs in food of animal origin and environmental samples of water, as well as in the assessment of toxicity of analysed compounds.

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, residues, UHPLC-MS/MS, validation, ecotoxicology, food of animal origin, wastewater

Informacije o mentoru:

Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

ŽIVOTOPIS

Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković rođena je 01. listopada 1977. godine u Beogradu. Visokoškolsko obrazovanje iz područja biotehnologije završila je 2001. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorski studij na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu smjer Biotehnologija-bioproceno inženjerstvo upisala je 2003. godine. Akademski stupanj doktora znanosti stekla je obranom disertacije pod naslovom „Localization of aliphatic glucosinolate biosynthesis and their potential role in plant defence” 05. travnja 2007. godine. Trenutno radi kao redovit profesor u Laboratoriju za primjenu i tehnologiju stanica i biotransformacija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2003. sudjeluje u nastavi na dodiplomskim studijima na nekoliko kolegija, a od uvođenja Bolonjskog programa sudjeluje u nastavi kao suradnica i nositeljica na kolegijima preddiplomskih i diplomskih studija: „Biotehnologija 4”, „Tehnologija vitamina i hormona”, „Tehnologija životinjskih i biljnih stanica”, „Biološki aktivne komponente u hrani i mehanizmi djelovanja“, „HPLC niskomolekulskih spojeva“, „Fitoremedijacija“ i „Biotransformacije“. Na poslijediplomskom doktorskom studiju nositelj je dva modula „Biotehnologija biljaka“ i „Stereoselektivne biotransformacije“. Pod njezinim mentorstvom izrađeno je 33 diplomska rada, 18 završnih radova i 1 doktorski rad te je i objavila preko 10 radova u koautorstvu sa studentima.

Tijekom svog znanstveno-istraživačkog rada prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković objavila je preko 70 znanstvenih radova. Ukupna citiranost prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković iznosi prema Web of Science (All databases) 2539; prema Scopus bazi podataka 2776; prema Google Scholar 3854, a h-indeks iznosi 24 prema Web of Science, 24 prema Scopus bazi podataka i 27 prema Google Scholar. Osim značajnih znanstvenih publikacija, sudjelovala je i na 35 međunarodna i 3 domaća znanstvena skupa, a od toga je održala četiri pozivna predavanja i jedno plenarno predavanje. U okviru znanstveno-istraživačkog rada prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković aktivno je sudjelovala na 15 znanstvenih projekata od toga je bila voditeljica njih devet.

Recenzirala je preko 70 znanstvenih radova u međunarodnim časopisima i zbornicima radova. Također je bila angažirana kao recenzentica za preko 30 različitih međunarodnih znanstvenih projekata uključujući *Bio-Based Industries Joint Undertaking Call 2016., 2019. i 2020. European Commission*. Tajnica je Hrvatskog društva za biotehnologiju te je član Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista i European Biotechnology Thematic Network Association (EBTNA).

Dobitnica je nekoliko nagrada: Srebrna medalja za rad “Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova” na 18. međunarodnoj izložbi inovacija, novih ideja, proizvoda i tehnologija ARCA 2020, Nagrade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za ukupni znanstveni doprinos – za postignutu visoku kvalitetu u znanstvenom radu 2019., Međunarodne nagrade za inovativnost u zelenoj ekstrakciji prirodnih proizvoda za mlade znanstvenike, Nagrade GENP2018, potpore. Aktivno se služi engleskim i španjolskim jezikom.

Informacije o mentoru:

Dr. sc. Nina Bilandžić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

ŽIVOTOPIS

Dr. sc. Nina Bilandžić rođena je 08. lipnja 1969. godine u Ivanić Gradu. Diplomirala je 1993. na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 1999. obranila je magistarski rad pod nazivom „Određivanje klenbuterola-promotora rasta u urinu i jetri svinja-nazimica tijekom i nakon subakutnog tretmana“. Akademski stupanj doktora znanosti stekla je 2004 godine obranom doktorskog rada „Izazivanje imunosnog odgovora u sisavaca pomoću imidazotiazola – primjena bioanalitičkih metoda“ na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 1995. godine zaposlena je na Hrvatskom veterinarskom institutu, od 1995. do 2001. na Odjelu za kemiju kao asistent, od 2001. do 2005. u Laboratoriju za praćenje i dijagnostiku animalnih spongiformnih encefalopatija kao asistent. Od 2006. je voditeljica Laboratorija za određivanje rezidua, te od 2019. predstojnica Odjela za veterinarsko javno zdravstvo odnosno od 2021. je u zvanju znanstveni savjetnik u trajnom zvanju.

Sudjeluje u nastavi kao suradnica u dodiplomskoj ili ekstramuralnoj nastavi završnog semestra Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Suradnica je na predmetu „Ekotoksikologija i toksikologija hrane“ na poslijediplomskom doktorskome studiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

Pod njenim mentorstvom izrađeno je 8 doktorskih radova: 4 na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, 2 na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, jedan na Veterinarskom fakultetu i jedan na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Tijekom svog znanstveno-istraživačkog rada bila je suradnik na 4 nacionalna znanstveno-istraživačka projekta Ministarstva znanosti Republike Hrvatske te jednom kompetitivnom međunarodnom projektu. Bila je voditeljica dva projekta Hrvatske agencije za hranu iz Osijeka te sudjelovala u nekoliko drugih projekata.

Tijekom svog znanstveno-istraživačkog rada dr. sc. Nina Bilandžić objavila je 90 znanstvenih radova citiranih u Web of Science i preko 90 radova citiranih u drugim bazama. Ukupna citiranost dr. sc. Nina Bilandžić iznosi prema Web of Science (All databases) 1225, prema Scopus bazi podataka 1399, a h-indeks iznosi 20 prema Web of Science kao i prema Scopus bazi. Također je sudjelovala na 29 međunarodnih i 42 domaća znanstvena skupa, te održala jedno plenarno predavanje i 3 pozivna predavanja.

Recenzirala je preko 30 znanstvenih radova u međunarodnim časopisima. Članica je uređivačkog odbora časopisa Veterinarska stanica i Mljekarstvo.

Na početku želim zahvaliti svojim mentoricama koje su omogućile nastanak ovog rada. Prof. dr. sc. **Ivani Radojčić Redovniković**, koja me prati na mom putu stručnog usavršavanja još od studentskih dana, na stručnoj, ali i prijateljskoj podršci, motivaciji te korisnim savjetima u planiranju, izradi i pisanju rada. Dr. sc. **Nini Bilandžić**, znan. sav. u trajnom zvanju, na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i velikoj podršci u izradi ovog rada.

Od srca hvala izv. prof. dr. sc. **Kristini Radošević**, koja je sa mnom radila na procjeni citotoksičnosti NSAID-ova, na prenesenom znanju, strpljenju i prijateljskom pristupu. Bez njezine dragocjene pomoći dio ovog istraživanja ne bi bio moguć.

Zahvaljujem i kolegama Veterinarskog instituta Križevci i Vinkovci te Zagrebačkih otpadnih voda d.o.o, na susretljivosti i nesebičnoj pomoći u prikupljanju uzoraka vode iz okoliša.

Jedno veliko hvala mojim **Reziduicama** i ostatku ekipe Laboratorija za određivanje rezidua, koji su bilo -kako, -kada i -koliko bili uključeni u eksperimentalni rad ove disertacije, a ponajviše na prijateljskoj atmosferi u Labosu.

Zahvaljujem se članovima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na susretljivosti, znanstvenoj podršci i pomoći prilikom izrade ovog rada.

Jedna posebna zahvala ide mojoj obitelji i prijateljima što su i ovaj studij „odstudirali sa mnom“ ...

...prvenstveno mojoj **mami** i mom **tati** na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju, što su stalni i nesebični oslonac na mom životnom putu! Mojoj **sestri** hvala što je bila uz mene i vjerovala u moj uspjeh!

...na kraju veliko hvala mom **suprugu** i mojoj **Tei** i **Tinu** koji su izvor beskrajne ljubavi i radosti, bez njihove podrške i razumijevanja bi svi moji ciljevi bili znatno teže ostvareni.

Zbog vas i s vama započinju moji veliki snovi!

*„Ničega se u životu ne trebamo bojati. Samo trebamo razumjeti.“
Marie Skłodowska Curie*

*Ovaj rad posvećujem mojima najdražima:
Mami i tati
Marku, Tei i Tinu!*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1 Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID)	4
2.1.1 Razvoj i primjena NSAID-ova	4
2.1.2 Kemijska svojstva i farmakokinetika NSAID-ova.....	6
2.1.3 Mehanizam djelovanja NSAID-ova.....	10
2.1.3.1 Mehanizam djelovanja COX i značaj njihove uloge	11
2.1.4 Primjena NSAID-ova u farmaskih životinja	14
2.2 Pojavnost i praćenje prisutnosti ostataka NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla	16
2.2.1 Kontrola ostataka NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla.....	17
2.2.2 Najveće dopuštene količine ostataka (NDK).....	19
2.3 Analitičke metode određivanja ostataka NSAID-ova	22
2.3.1 Tekućinska kromatografija.....	22
2.3.2 Spektrometrija masa	23
2.3.3 Priprema uzoraka pri određivanju ostataka NSAID-ova u uzorcima životinjskog podrijetla	25
2.3.3.1 Utjecaj matrice.....	27
2.3.3.2 Metode određivanja ostataka NSAID-ova	27
2.3.4 Validacija analitičkih metoda	31
2.4 Ostaci lijekova u okolišu	32
2.4.1 Ekotoksikologija i primjena <i>in vitro</i> testova toksičnosti	34
2.4.1.1 NSAID-ovi u okolišu: ekotoksikološki profil	35
3. MATERIJALI I METODE	37
3.1 Standardi, kemikalije, pribor i instrumenti	37
3.1.1 Standardi za razvoj metode određivanja nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID)	37
3.1.2 Kemikalije.....	38
3.1.3 Laboratorijski pribor.....	40
3.1.4 Instrumenti	40
3.1.5 Programi za upravljanje instrumentima ili obradu podataka	42
3.1.6 Priprema radnih otopina i pufera	42
3.1.7 Stanične linije.....	44
3.2 Metode	44
3.2.1 Tekućinska kromatografija vezana s masenim spektrometrom	44
3.2.1.1 Postupak pripreme uzoraka mlijeka i vode	46
3.2.1.2 Postupak pripreme uzoraka mišićnog tkiva	47
3.2.2 Validacija razvijene UHPLC-MS/MS metode za određivanje NSAID-ova.....	47
3.2.2.1 Specifičnost/selektivnost	48
3.2.2.2 Linearnost	48
3.2.2.3 Preciznost, CC α , CC β , iskorištenje	49

3.2.2.4	Utjecaj matrice.....	50
3.2.3	Određivanje NSAID-ova u realnim uzorcima	50
3.2.4	Metode rada za određivanje <i>in vitro</i> toksičnosti NSAID-ova primjenom kultura životinjskih stanica.....	52
3.2.4.1	Uzgoj staničnih linija.....	52
3.2.4.2	Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	52
3.2.4.3	In vitro ispitivanje toksičnosti NSAID-ova.....	53
4.	REZULTATI.....	55
4.1	Razvoj i validacija UHPLC-MS/MS metode za određivanje ostataka NSAID-ova	55
4.1.1	Optimizacija instrumentalnih uvjeta	55
4.1.2	Optimizacija postupaka pripreme uzoraka	66
4.1.3	Validacija metode.....	72
4.1.3.1	Specifičnost/selektivnost	72
4.1.3.2	Linearnost	80
4.1.3.3	Preciznost, CC α , CC β , iskorištenje	81
4.1.3.4	Utjecaj matrice.....	83
4.2	Određivanje NSAID-ova u realnim uzorcima	87
4.3	Učinak NSAID-ova na preživljenje RTG-2 i HEK-293T stanica.....	94
5.	RASPRAVA	99
5.1	Razvoj i validacija UHPLC-MS/MS metode za određivanje ostataka NSAID-ova	100
5.1.1	Optimizacija instrumentalnih uvjeta	100
5.1.2	Optimizacija postupka pripreme uzorka	103
5.1.3	Validacija metode.....	105
5.2	Određivanje NSAID-ova u realnim uzorcima	108
5.3	Učinak NSAID-ova na preživljenje RTG-2 i HEK-293T stanica.....	112
6.	ZAKLJUČCI.....	118
7.	POPIS OZNAKA I KRATICA	121
8.	LITERATURA.....	123
9.	ŽIVOTOPIS.....	134

1. UVOD

Osiguranje uvjeta za proizvodnju i dostupnost sigurne i kvalitetne hrane jedni su od glavnih izazova ovog stoljeća. Veterinarsko-medicinski proizvodi (VMP) obuhvaćaju širok raspon kemijskih spojeva, a njihova primjena je neizbježna tijekom uzgoja životinja na farmama gdje se koriste u terapijske svrhe (liječenje bolesti), profilaksi (prevenciju bolesti), modificiranju fizioloških funkcija (npr. sredstva za smirenje), poboljšanje rasta i produktivnosti (promotori rasta).

U zadnjih nekoliko godina, kao posljedica sve veće svijesti o tome da životinje mogu trpjeti bol, liječenje boli pomoću nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *Nonsteroidal anti-inflammatory drug*, NSAID) postalo je uobičajena strategija za poboljšanje dobrobiti životinja (De Vito, 2015). NSAID-ovi su skupina lijekova koji izazivaju niz korisnih učinaka, primarno u liječenju bolesti koštano-mišićnog sustava, osobito boli izazvane upalnim procesom ili ozljedom tkiva, drugih kroničnih upalnih bolesti te pri smanjenju vrućice. Iako se njihova kemijska struktura, a time i fizikalno-kemijska svojstva razlikuju, svi NSAID-ovi imaju zajednički mehanizam djelovanja, inhibiciju enzima ciklooksigenaze (engl. *Cyclooxygenase*, COX). Ključnog enzima u biosintetskom putu prostaglandina, kemijskih posrednika (medijatora) uključenih u upalne procese, s važnom ulogom u kontroli mnogih fizioloških funkcija (Vane, 1971). Ovisno o selektivnosti prema pojedinom izoenzimu (COX-1 i COX-2), razlikujemo tradicionalne (neselektivne) i COX-2 selektivne NSAID-ove.

Porastom broja stanovnika i podizanjem svjetskog životnog standarda, raste globalni trend upotrebe lijekova, pa tako i NSAID-ova, u humanoj i u veterinarskoj medicini. Svaka primjena VMP-a pri uzgoju životinja, osobito ona nepravilna poput nepoštivanja preporučenih doza kao i vremena karencije nakon liječenja, može imati za posljedicu prisutnost ostataka (rezidua) farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla za koje je dokazano ili postoji sumnja da mogu biti škodljivi po ljudsko zdravlje. Prema dostupnim podacima, na razini Europske unije (EU), ostaci NSAID-ova, iako u relativno niskom postotku, pronađeni su u uzorcima raznih životinjskih vrsta (EFSA, 2020). S druge strane, eliminacijom iz organizma, putem otpadnih voda bilo industrijskog ili komunalnog porijekla i/ili nesavjesnim odlaganjem, većina farmaceutika završava u okolišu, od kuda vrlo lako dospiju u površinske i pitke vode, ali i u sediment i u tlo kao i u hranidbeni lanac, gdje čine novu skupinu okolišnih zagađivača, potencijalno negativnog djelovanja na ekosustav, a u konačnici i na čovjeka (Parolini i Binelli, 2012). Kako je pojavnost svakog lijeka povezana s intenzitetom njegove primjene, s godišnjom proizvodnjom od nekoliko kilotona, za očekivati je prisutnost NSAID-ova u okolišu (Parolini i

Binelli, 2012). Koncentracije ostataka NSAID-ova u okolišu su niske, ali to ne znači da rizik ne postoji, najbolji primjer za to je izumiranje ptica strvinara na Indijskom potkontinentu uslijed izloženosti diklofenaku (Kümmerer, 2010).

Identifikacija i praćenje pojavnosti NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla i u okolišu neki su od glavnih zadataka suvremene analitike hrane i okoliša koja privlači pažnju znanstvenog i javnog sektora. Razvoj metode za istovremeno određivanje velikog broja NSAID-ova još uvijek predstavlja izazov zbog njihove kemijski raznolike prirode, osobito kiselo-baznih svojstava, zbog čega se obično analiziraju pomoću zasebnih, a samim time dugotrajnijih i skupljih analitičkih metoda. U okviru sustavne kontrole prisutnosti NSAID-ova i njihovih metabolita te utvrđivanja sukladnosti s legislativom, potrebna je brza, osjetljiva i reproducibilna metoda za istovremeno određivanje širokog spektra različitih skupina spojeva prisutnih u vrlo niskim koncentracijama unutar složene matrice uzoraka. Priprema uzoraka je prvi i ključan korak u razvoju metode čiji je cilj učinkovitom ekstrakcijom analita iz uzorka i pročišćavanjem ukloniti interferirajuće spojeve i sastojke matrice uzorka koji bi tijekom instrumentalne analize naprednim analitičkim tehnikama visoke selektivnosti i specifičnosti, poput tekućinske kromatografije (ultra)visoke djelotvornosti povezane s masenom spektrometrijom (engl. *(Ultra)high performance liquid chromatography – mass spectrometry*, (U)HPLC-MS/MS), mogli dovesti do pogrešne kvantifikacije (Mainero Rocca i sur., 2017, van Pamel i Deseleire, 2015, Jedziniak i sur., 2015).

Nadalje, podaci o (eko)toksikološkom učinku okolišno relevantnih koncentracija NSAID-ova raznim modelnim sustavima *in vivo* i *in vitro*, neophodni su za predviđanje mogućeg učinka i procjenu rizika za okoliš. Iako su lijekovi u okolišu općenito prisutni u niskim koncentracijama, zbog svoje biološke aktivnosti, postojanosti u okolišu te mogućnosti bioakumulacije, često predstavljaju opasnost za neciljane organizme (Parolini i Binelli, 2012), stoga je ekotoksikologija lijekova i danas neiscrpan predmet znanstvenih interesa i istraživanja. Utjecaj NSAID-ova na okoliš nije u potpunosti istražen, a ispitivanja njihove toksičnosti u dosadašnjim istraživanjima obuhvaća akutnu i kroničnu toksičnost relativno malog broja NSAID-ova, uglavnom *in vivo* na raznim vodenim organizmima. Imajući na umu EU Uredbu (EZ) br. 1907/2006 REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical*) koja ističe važnost primjene *in vitro* modela određivanja toksičnosti, uvidom u dostupnu znanstvenu literaturu nisu nađeni podaci o određivanju *in vitro* toksičnosti NSAID-ova na staničnim linijama sisavaca i riba. Obzirom da takav pristup smanjuje primjenu laboratorijskih životinja u toksikološkim ispitivanjima te omogućuje ispitivanje većeg broja spojeva u kraćem vremenu, primijenjen je u ovom radu za procjenu ekotoksikološkog učinka NSAID-ova.

Cilj ovog rada bio je razvoj i validacija UHPLC-MS/MS metode za određivanje 27 odabranih NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla i u vodenom okolišu. Pomoću razvijene metode, provedeno je istraživanje pojavnosti NSAID-ova tijekom 2019. i 2020. godine u uzorcima mišićnog tkiva i mlijeka prikupljenih iz svih hrvatskih županija u skladu s Nacionalnim planom kontrole ostataka Republike Hrvatske (RH) te uzoraka vodenog okoliša iz područja kontinentalne RH. Nadalje, istražena je potencijalna citotoksičnost odabranih NSAID-ova na staničnu liniju riba (RTG-2) i ljudi (HEK-293T) kako bi se procijenili učinci NSAID-ova na rast stanica *in vitro* te na temelju izračunatih vrijednosti IC50, odredio slijed njihove citotoksičnosti s ciljem doprinosa sveobuhvatnoj procjeni rizika NSAID-ova za okoliš i ljude.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID)

Lijekovi protiv boli, nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *Nonsteroidal anti-inflammatory drug*, NSAID; skraćeno još nazivani NSPUL, NSAIL, NSAR) predstavljaju kemijski raznoliku skupinu lijekova sa zajedničkim analgetskim, antipiretskim, a u većim dozama i protuupalnim djelovanjem. Prvi su odabir u terapiji akutne i kronične boli povezane s upalom i/ili oštećenjem tkiva, reumatskih bolesti (tzv. antireumatici) i poremećajima mišićno-koštanog sustava kao i u stanjima povišene tjelesne temperature (djeluju na centar za regulaciju temperature u hipotalamusu) te svih ostalih bolnih stanja koja prati porast biosinteze prostaglandina (PG) (Pountos i sur., 2011). U sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih incidenata, zbog svog antiagregacijskog učinka, značajnu ulogu u niskim dozama ima acetilsalicilna kiselina (Mimica Matanović, 2014). Kako bi se razlikovali od kortikosteroida, snažnih protuupalnih lijekova, a koji imaju različiti mehanizam djelovanja i izazivaju brojne i ozbiljne nuspojave tijekom liječenja, koristi se pojam „nesteroidni“ (Rocca Mainero, 2017). Prema izvješćima Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), NSAID-ovi su jedni od najkorištenijih skupina lijekova u Republici Hrvatskoj (RH) već dulji niz godina, a sličan trend potrošnje prisutan je i u ostalim zemljama Europske unije (EU) i svijetu. S obzirom na dobra farmakološka svojstva i opće raširenom mišljenju kako se radi o sigurnim lijekovima, čemu doprinosi i činjenica da pojedini imaju status bezreceptnog lijeka, u terapiji s NSAID-ovima ipak je potreban oprez zbog neželjenih posljedica koje se mogu javiti tijekom dugotrajne primjene te u pacijenata s određenim faktorima rizika. Poznato je da su najčešće povezani s gastrointestinalnim (GI), kardiovaskularnim (KV) i bubrežnim nuspojavama.

2.1.1 Razvoj i primjena NSAID-ova

Primjena tvari s nesteroidnim analgetskim i protuupalnim učinkom datira još iz razdoblja prije nove ere, kada su se koristile određene biljke i njihovi ekstrakti, a među njima naročito kora vrbe (lat. *Salix*), za ublažavanje raznih bolnih i upalnih stanja. Sama djelatna tvar kore vrbe, salicin, povijesni medicinski lijek koji se metabolizira *in vivo* u salicilnu kiselinu s danas poznatim NSAID učincima, tada dakako nije bio poznat i izoliran je tek 1829. godine. Acetilsalicilna kiselina smatra se prvim laboratorijski sintetiziranim NSAID-om kojega je 1899. godine patentirala tvrtka Bayern pod nazivom Aspirin® (Altman i sur., 2015, Brune i Hinz,

2004). Kemijski napredak 19. i 20. stoljeća dovodi do razvoja mnogih tzv. tradicionalnih, klasičnih ili neselektivnih NSAID-ova diljem svijeta, a među prvima nakon aspirina otkriveni su fenilbutazon (1946.g.), indometacin (1964.g.), ketoprofen (1967.g.), zatim su u terapiju uvedeni ibuprofen (1969.g.), diklofenak (1973.g.), naproksen (1976.g.) i flurbiprofen (1977.g.), ali i selektivni nimesulid (1971.g.), što se tek kasnije utvrdilo (Rainsford, 2007).

Unatoč širokoj primjeni NSAID-ova tijekom prošlog stoljeća malo toga je bilo poznato o njihovom mehanizmu djelovanja. Zahvaljujući istraživačkom radu J. R. Vanea i njegovih suradnika na području PG-a i njemu srodnih spojeva, koji uzrokuju bol, oticanje, crvenilo te vrućicu, otkriveno je kako aspirin i njemu slični lijekovi djeluju analgetski, protuupalno i antipiretski. Godine 1971. Vane je predložio mehanizam djelovanja NSAID-ova kroz njihovo inhibitorno djelovanje na aktivnost enzima prostaglandin G/H endoperoksid sintaze, danas poznatijeg kao ciklooksigenaza (engl. *Cyclooxygenase*, COX), posljedica čega je blokada biosinteze PG iz arahidonske kiseline (engl. *Arachidonic acid*, AA) (Vane, 1971). Dvadeset godina kasnije, među značajnijim napretkom u razvoju ove skupine lijekova je otkriće o postojanju dva enzimska sustava COX tj. dvije izoforme COX-1 i COX-2. U kliničku praksu uveden je celekoksib, prvi selektivni NSAID koji je označio početak razvoja COX-2 inhibitora, a zatim i rofekoksib, poznati kao koksibi, uz pretpostavku da su sigurniji, jednake djelotvornosti i manjeg rizika od teških GI nuspojava u odnosu na tradicionalne, neselektivne NSAID-ove koji inhibiraju, uz različiti afinitet, obje izoforme enzima. S jedne strane koksibi su zadovoljili zahtjev za odsustvom GI i drugih nuspojava u odnosu na neselektivne NSAID-ove, dok s druge strane zbog povezanosti po život opasnim KV događajima, nakon rofekoksiba 2004. godine, još su neki povučeni s tržišta diljem svijeta (Rainsford, 2007).

Otkako su krajem 19. stoljeća sintetizirani prvi NSAID-ovi, njihov razvoj se kretao od neselektivnih prema selektivnim lijekovima, kako bi se rizici ove skupine sveli na najmanju moguću mjeru. Unapređivanje postojećih i otkrivanje novih struktura selektivnijih COX-2 inhibitora kako bi dobiveni derivati očuvali svoj protuupalni učinak, ali dobili i novi, otvorio je put za ciljanu terapiju boljeg sigurnosnog profila. Budući da ovisno o vrsti i primijenjenoj koncentraciji NSAID-a, tipu stanice te njezinom razvojnom stadiju i okruženju, mogu djelovati na razne signalne puteve i stanične procese, od stanične diobe do stanične smrti, mehanizmi njihovog djelovanja se i nadalje istražuju (Rainsford, 2007). Iako su počeli kao lijekovi za ublažavanje ili uklanjanje slabe do srednje jake boli, postupno im je primjena proširena na nove terapijske ciljeve, što je dovelo do širokog spektra njihove korisnosti, u humanoj i veterinarskoj medicini, od simptomatskog liječenja raznih kliničkih patologija od boli i upale do potencijalnih lijekova (naročito selektivni COX-2 inhibitori) u prevenciji i liječenju bolesti poput

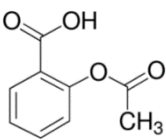
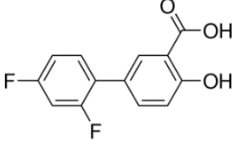
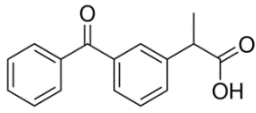
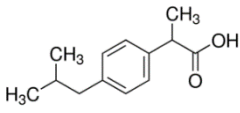
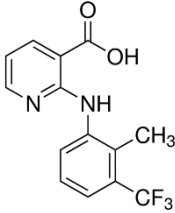
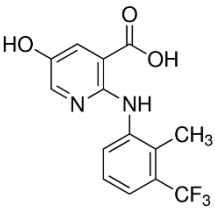
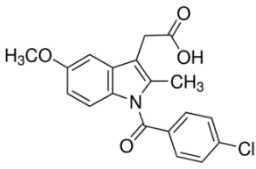
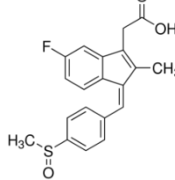
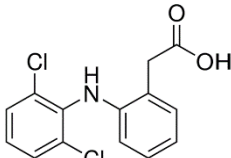
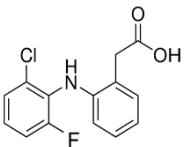
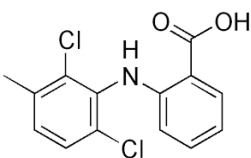
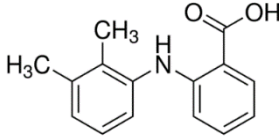
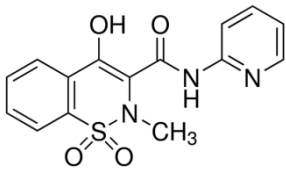
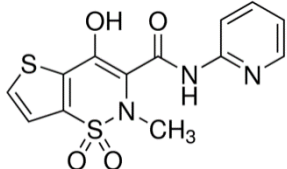
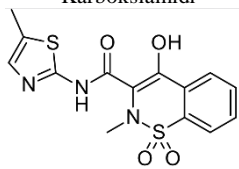
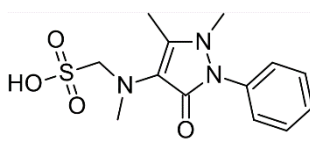
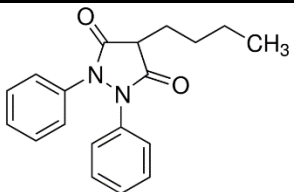
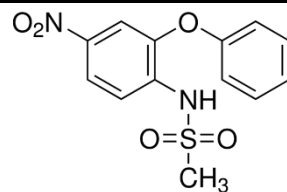
Alzheimerove i Parkinsonove kao i u smanjenju rizika za razvoj raka debelog crijeva, dojke, pluća, gušterače (Wong, 2019; Calatayud i Esplugues, 2016; Pountos i sur., 2011; Ćoso i sur., 2009; Rao i Knaus, 2008). NSAID-ovi se uglavnom primjenjuju oralno, iako je za pojedine dostupna i formulacija za supkutanu, intravensku, intramuskularnu, topikalnu ili rektalnu primjenu. Koriste se samostalno ili su dio multimodalne terapije.

Ovisno o kriterijima koji se gledaju, postoji više podjela NSAID-ova pri čemu se svaka zasniva na nekom važnom svojstvu ovih lijekova, uključujući kemijska svojstva, COX selektivnost ili biološki poluvijek (poluvrijeme) eliminacije samog lijeka.

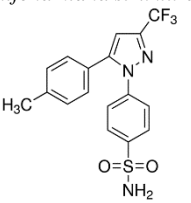
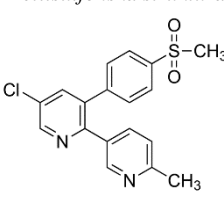
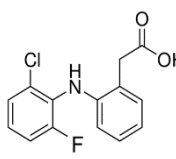
2.1.2 Kemijska svojstva i farmakokinetika NSAID-ova

NSAID-ovi čine farmakoterapijsku skupinu lijekova različite kemijske strukture prema kojoj su, s obzirom na izvornu ili „roditeljsku“ građu spoja, svrstani u podskupine (tablica 1). Kemijski gledajući, postoje dva glavna kriterija koja moraju biti ispunjena, kako bi određeni lijek djelovao kao NSAID inhibicijom izoenzima COX, a to su lipofilno svojstvo (omogućuje interakciju s fosfolipidima) i prisutnost kisele funkcionalne skupine (služi kao glavna vezna skupina s proteinima plazme i metaboličko mjesto za konjugaciju) (Boison i sur., 2016). Kemijska raznolikost NSAID-ova, osobito onih visoko kisele i lipofilne prirode, osigurava strukturalna svojstva kako bi oponašali kemiju prirodnog supstrata, AA (Mehanna, 2003), na aktivnom mjestu enzima COX te utječe na širok spektar njihovih farmakokinetičkih profila (Laufer, 2007). Posljedično, takvi se lijekovi (npr. derivati octene i propionske kiseline) nakupljaju u velikoj mjeri u upaljenim tkivima gdje ostvaruju stabilan i dugotrajan protuupalni učinak pri nižim dozama, što pridonosi manjem riziku od neželjenih učinaka (Bach-Rojecky, 2016). Paracetamol (acetaminofen), iako se često poistovjećuje s ovom skupinom lijekova jer posjeduje antipiretski i centralni analgetski učinak (inhibira COX samo u mozgu), zbog slabih kiselinskih svojstava i zanemarivog perifernog protuupalnog učinka ne pripada skupini NSAID-ova nego ostalih analgetika.

Tablica 1. Klasifikacija NSAID-ova po kemijskoj strukturi i selektivnosti (vlastita izrada prema podjeli Rainsford, 2007).

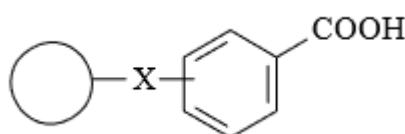
Karboksilne kiseline	
<p>Salicilati</p>  <p>Acetilsalicilna kiselina (Aspirin®, Andol)</p>  <p>Diflunisal (Dolobid®)</p>	<p>Derivati propionske kiseline („profeni“; osnovna struktura: 2-arylpropionska kiselina)</p>  <p>Ketoprofen (Knavon, Ketonal)</p>  <p>Ibuprofen (Advil, Dalsy, Motrin, Nuprin, Brufen, Neofen)</p> <p>Drugi profeni: deksibuprofen, deksketoprofen, karprofen, flurbiprofen, naproksen, vedaprofen, tiaprofenska kiselina</p>
<p>Derivati (amino)nikotinske kiseline</p>  <p>Flunixin (Banamine)</p>  <p>5-Hidroksiflunixin</p>	<p>Derivati heteroariloctene kiseline</p>  <p>Indometacin (indol acetati) (Indocin)</p>  <p>Sulindak (inden acetati) (Clinoril)</p>
<p>Fenilacetati (arylpropionski derivati)</p>  <p>Diklofenak (Diclorapid, Voltaren, Naklofen)</p>  <p>*Lumirakoksib** (Prexige)</p> <p>Drugi fenilacetati: etodolak, ketorolak</p>	<p>Fenemati (N,N-antranilna kiselina, osnovna struktura: 2-aminobenzojeva kiselina, 2-amino grupa se zamjenjuje aromatskim supstituentom)</p>  <p>Meklofenaminska kiselina (Meclomen)</p>  <p>Mefenaminska kiselina (Ponstel)</p> <p>Drugi fenemati: flufenaminska kiselina, tolfenaminska kiselina, nifluminska kiselina</p>
Karboksiamidi ili oksikami	
<p>Oksikami (osnovna struktura: 1,2-benzotiazin)</p>  <p>Piroksikam (Feldene)</p>  <p>Tenoksikam (Tilatil, Alganex)</p>	<p>Karboksiamidi</p>  <p>Meloksikam (Mobic)</p>
<p>Derivati pirazolona</p>  <p>Metamizol (Diprion) (Novalgín)</p>  <p>Fenilbutazon (Bute) (Butazolidine)</p> <p>Drugi pirazoloni: antipirin (fenazon), aminofenazon, azapropazon, oksifenbutazon, propifenazon, ramifenazon</p>	<p>Sulfonanilidi</p>  <p>Nimesulid (Sulide, Mesulid, Nimeside i dr.)</p>

Tablica 1. (nastavak)

Koksibi (diaril-supstituirani spojevi) (selektivni COX-2 inhibitori)		
<p><i>Sulfonamidna struktura</i></p>  <p>Celekoksib (Celebrex)</p>	<p><i>Metilsulfonska struktura</i></p>  <p>Etorikoksib (Ecox, Etocox)</p>	 <p><i>*Lumirakoksib**</i> (Prexige)</p>
<p>Drugi koksibi: parekoksib, rofekoksib**, valdekoksib**</p>		
<p>* opisan kao koksib, ali strukturno ne pripada toj podskupini **povučeni s tržišta</p>		

Selektivni COX-2 inhibitori

Većina NSAID-ova su slabe organske kiseline, zbog čega lako difundiraju u stanice epitela sluznice, s relativno niskom vrijednosti pKa (3-5), izuzetak čine derivati koksiba i pirazolona te tzv. prolijekovi (engl. *Prodrugs*), nabumeton i sulindak. Lumirakoksib, iako po nazivu svrstan u koksibe zapravo ne pripada toj podskupini koji su triciklički spojevi s visokom pKa vrijednosti (8-9), sadrži karboksilnu grupu, ima jednostavniju strukturu i može se smatrati analogom diklofenaka (tablica 1). Kako su neselektivni brojniji od selektivnih, osnovnu strukturu većine NSAID-ova (slika 1) čini kisela funkcionalna skupina (karboksilna kiselina ili enoli) vezana na planarnu, aromatsku skupinu uz dodatno središte lipofilnosti u obliku alkilnog lanca ili dodatnog aromatskog prstena (Lemke, 2013, DeRuiter, 2002). Za razliku od klasičnih NSAID-ova, selektivni inhibitori COX-2 (uz navedenu iznimku) nemaju karboksilnu skupinu nego npr. sulfonski, sulfonamidni prsten.



Slika 1. Osnovna struktura NSAID-a (preuzeto od DeRuiter, 2002).

Jednu od najvećih podskupina NSAID-ova čine derivati 2-arilpropionske kiseline ili tzv. profeni. Uvođenjem metilne skupine α -ugljikov atom postaje kiralni centar (Lemke i sur., 2013) ili centar asimetrije što je značajno jer ukoliko lijek posjeduje kiralni centar (ili više), postoji u dva (ili više) enantiomerna oblika. U živom organizmu enantiomeri (*R*- ili *S*-) mogu imati različita biološka svojstva što se očituje u njihovom farmakokinetičkom (putovanje lijeka kroz tijelo koje uključuje njegovo oslobađanje, apsorpciju, distribuciju, postojanost u ciljnim tkivima, metabolizam i izlučivanje), farmakodinamičkom (mehanizam djelovanja, terapijski učinci/nuspojave) i toksikološkom (akutnom ili kroničnom) djelovanju. Prema istraživanjima

in vivo ili *in vitro* COX testovima, samo jedan od enantiomera je farmakološki aktivan i NSAID enantiomer koji ima (*S*)-konfiguraciju posjeduje gotovo isključivu sposobnost inhibicije enzima COX. U organizmu derivati propionske kiseline (ibuprofen, ketoprofen) podliježu jednosmjernoj metaboličkoj biokonverziji inaktivnog (*R*)-enantiomera u aktivni (*S*)-enantiomer. Premda je djelovanje NSAID-ova enantioselektivno, većina ih je na tržištu prisutna kao racemične smjese izuzev naproksena koji dolazi kao jedan enantiomer, (*S*)-naproksen, i diklofenaka koji nema kiralni centar (DeRuiter, 2002).

Jednom kada se oslobodi iz ljekovite formulacije, farmakokinetika lijeka najviše je određena njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Unatoč toj raznolikosti, neka farmakokinetička svojstva zajednička su svim NSAID-ovima.

Ovi lijekovi, zbog svoje lipofilne prirode, apsorbiraju se gotovo u potpunosti iz GI trakta (pasivnom difuzijom), pokazuju dobru bioraspoloživost (80-100 %) iako postoje neke iznimke. Hrana može utjecati na njihovu apsorpciju, ali rijetko smanjuje bioraspoloživost. Obično se maksimalna (vršna) koncentracija u plazmi postiže unutar 2-3 sata nakon primjene ili u slučaju formulacija s brzim otpuštanjem kroz 30 minuta (Oertel i Lötsch, 2007). Zbog međusobne razlike u brzini apsorpcije (bitan parametar u odabiru svakog lijeka), NSAID-ovi s brзом apsorpcijom poželjni su za trenutačno olakšanje jake i akutne boli dok isti ne moraju biti učinkoviti za liječenje kronične boli (Brune i Patrignani, 2015). Kod lokalne (topikalne) primjene, izravan transport NSAID-a u upaljeno tkivo i zglobov je minimalan, dok koncentracije određenih lijekova u sinovijalnoj tekućini posljedica su dermalne apsorpcije i sustavne cirkulacije nakon ponavljane primjene (Calatayud i Esplugues, 2016).

Kako se najvećim dijelom radi o lijekovima s kiselom funkcionalnom skupinom, jednom kada dospiju u krvotok, NSAID-ovi se velikim afinitetom vežu za proteine plazme, pretežno za albumine (95-99 %) tako da je njihov volumen distribucije (odražava raspodjelu primijenjene doze lijeka unutar organizma) obično mali i približno jednak s koncentracijom u plazmi. Metabolizam NSAID-a (iz lipofilnog oblika koji se lakše apsorbira u hidrofilni oblik koji se lakše izlučuje) odvija se u jetri putem mikrosomalne obitelji izoenzima citokroma P450 kroz dvije faze biotransformacije. Većina ih se metabolizira reakcijama I. faze (oksidacija, redukcija, hidroliza) nakon koje slijedi II. faza (konjugacija-glukuronidacija), dok neki podliježu samo reakcijama II. faze (Mimica Matanović, 2014; Loetsch i Oertel, 2013). Uglavnom se metaboliziraju u neaktivne metabolite (iznimka prolijekovi nabumeton i sulindak). Izlučuju se uglavnom bubrezima, no gotovo svi podliježu djelomičnom izlučivanju i putem žuči, uz reapsorpciju u crijevu (Calatayud i Esplugues, 2016; Mimica Matanović, 2014).

Ovisno o brzine eliminacije, NSAID-ovi su skupina koja obuhvaća lijekove s različitim poluvijekom (poluvrijeme) eliminacije (tablica 2) te se mogu klasificirati na one s kratkim poluvijekom (npr. acetilsalicilna kiselina 0,25 sati) i one s dugim poluvijekom u slučaju oksikama (piroksikam 54 sati) o čemu ovisi doziranje lijeka: oni s kraćim npr. ibuprofen primjenjuju se svakih 6-8 sati, dok dugi poluvijek eliminacije omogućuje primjenu NSAID-a u jednoj dnevnoj dozi (Mimica Matanović, 2014). Selektivni COX-2 inhibitori predstavljaju lijekove sa srednjim poluvijekom eliminacije (Calatayud i Esplugues, 2016). U životinja, način eliminacije ovih lijekova izrazito je vrsno specifičan te ovisan o dobi i zdravstvenom stanju životinje (Boison i sur., 2016).

Tablica 2. Klasifikacija NSAID-ova prema poluvijeku eliminacije u plazmi (Rovensky i sur., 2009).

Vrijeme poluživota NSAID-a u plazmi (sati)			
Kratko do srednje < 6 h		Dugo > 10 h	
Acetilsalicilna kiselina (Aspirin®)	0.25	Fenbufen	10
Tolmetin	1.0	Celekoksib	11
Diklofenak	1.1	Diflunisal	13
Flufenaminska kiselina	1.4	Naproksen	14
Ketoprofen	1.8	Sulindak	14
Ibuprofen	2.1	Azapropazone	15
Fenprofen	2.5	Nabumetone	26
Etodolak	3.0	Piroksikam	54
Tiaprofenska kiselina	3.0	Tenoksikam	60
Flurbiprofen	3.8	Fenilbutazon	68
Indometacin	4.6		

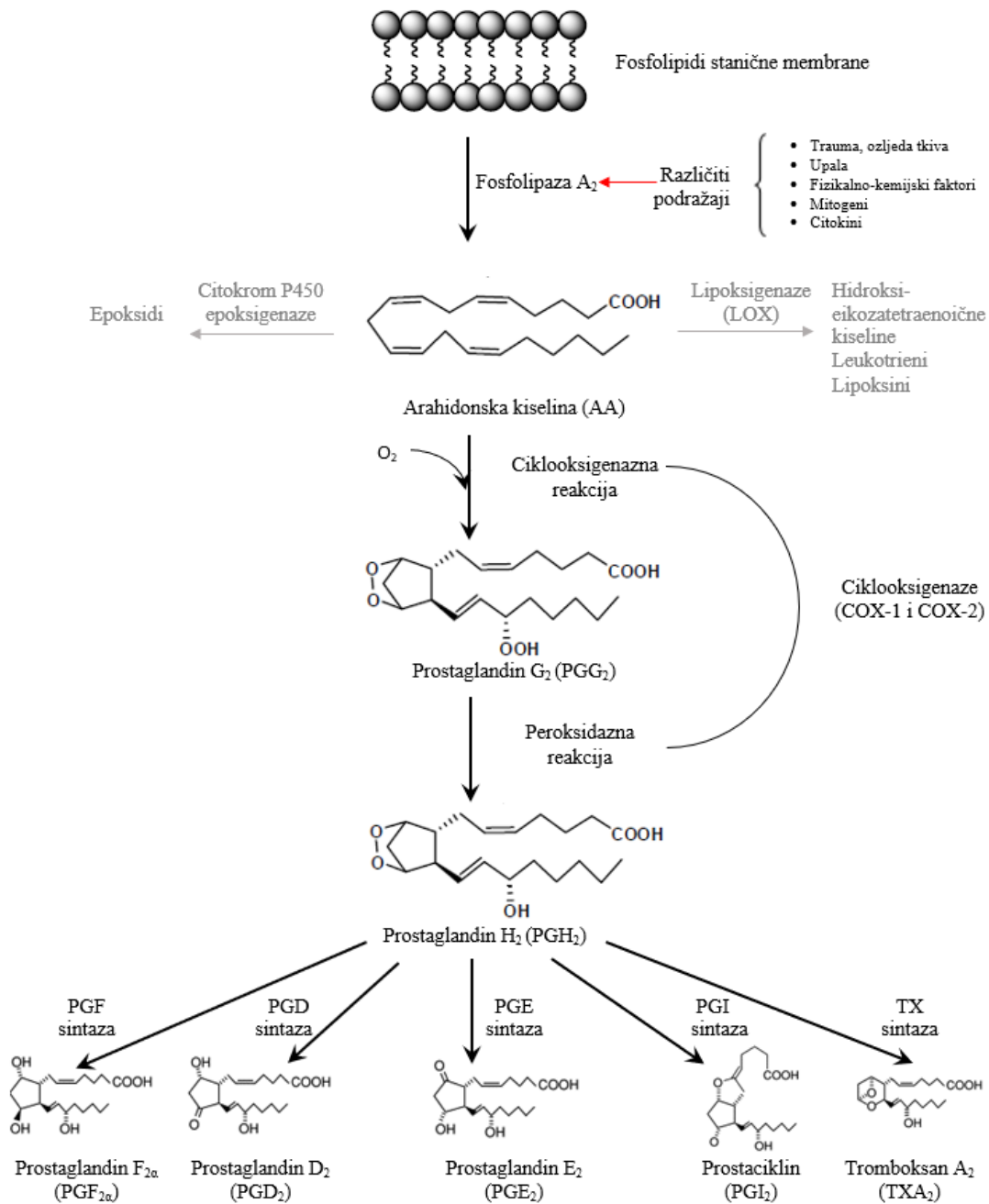
2.1.3 Mehanizam djelovanja NSAID-ova

Bol, upala i vrućica uobičajeni su biološki odgovori posredovani odgovarajućim medijatorima upale, od kojih su metaboliti AA (PG) odnosno enzim COX odgovoran za njihov nastanak glavna meta na koju je usmjereno djelovanje NSAID-ova. PG-i senzibiliziraju receptore za bol (nociceptore), nastaje bolni impuls i osjet boli te imaju središnju ulogu u perifernoj senzitivaciji. Inhibicijom aktivnosti enzima COX, posljedica čega je smanjena biosinteza prostanoida iz AA, glavni je mehanizam kojim NSAID-ovi postižu terapijski učinak odnosno djeluju protuupalno i analgetski (put AA je središnji za upalne odgovore) te antipiretski (djeluju na centar za regulaciju temperature u hipotalamusu). NSAID-ovi također imaju centralno djelovanje u leđnoj moždini i mozgu gdje blokiraju proizvodnju PG-a koji mogu uzorkovati centralnu senzitivaciju (Bach-Rojecky, 2016).

2.1.3.1 Mehanizam djelovanja COX i značaj njihove uloge

Katalitičko djelovanje enzima COX prvi je korak u ciklusu pretvorbe AA u prostanoide, spojeve koji, zajedno s leukotrienima i lipoksinima, pripadaju eikozanoidima, raznolikoj skupini biološki aktivnih tvari sa širokim spektrom djelovanja u normalnim fiziološkim uvjetima kao i u raznim patološkim stanjima. Glavni prekursor za njihovu sintezu je AA, nezasićena masna kiselina s 20 ugljikovih atoma, u esterificiranom obliku strukturni dio fosfolipida staničnih membrana iz kojih se kao signalna molekula, pod utjecajem brojnih podražaja, oslobađa djelovanjem fosfolipaze A₂. Ovisno o enzimima koji sudjeluju u reakciji, razlikujemo tri biosintetska puta AA: COX kataliziraju sintezu prostanoida, lipoksigenaze sintezu leukotriena, hidroksi-eikozatetraenoičnih kiselina i lipoksina, dok citokrom P450 epoksigenaza sintezu epoksida (slika 2) (Calatayud i Esplugues, 2016; Rao i Knaus, 2008).

COX vežu AA i prevode ju u prostaglandin H₂ (PGH₂) dvjema enzimskim reakcijama: ciklooksigenaznom reakcijom u prisutnosti kisika i hema oksidiraju AA u dva nestabilna intermedijera, prvo u ciklički endoperoksid prostaglandin G₂ (PGG₂) koji se zatim, kroz naknadnu peroksidaznu reakciju, reducira u PGH₂ (Calatayud i Esplugues, 2016). Djelovanjem specifičnih sintaza i izomeraza, ovisno o vrsti tkiva, fiziološkim uvjetima kao i aktivnoj COX izoformi, PGH₂ se prevodi u prostanoide kao što su prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaciklin (PGI₂) i tromboksan A₂ (TXA₂). Ti bioaktivni PG-i pokazuju različite stanično i tkivno specifične učinke, kao što su indukcija upalnog odgovora (preko PGE₂ i PGI₂, uključena COX-2), gastroprotekcija (preko PGE₂, uključena COX-1), agregacija trombocita (preko TXA₂, uključena COX-1), vazodilatacija i antiagregacijsko djelovanje (PGI₂, uključene COX-1 i COX-2), renalna regulacija krvnog tlaka (preko PGE₂, uključene COX-1 i COX-2) (Bach-Rojecky, 2016). Najvažniji PG koji sudjeluje u nastanku tipičnih upalnih simptoma kao što su crvenilo, toplina, bol, gubitak funkcije te pojačava sam osjet boli je PGE₂ (Ćoso i sur., 2009), ali i PGI₂.



Slika 2. Biosintetski putevi arahidonske kiseline i uloga ciklooksigenaza u proizvodnji prostanoida (vlastita izrada prema Rao i Knaus 2008).

COX je glikoprotein, bifunkcionalan enzim, izoliran 1976. godine tada kao jedinstveni enzim. Do danas su poznate i izolirane tri izoforme COX: COX-1, COX-2 i COX-3. Izoforme COX-1 i COX-2, proteinski produkti dva različita gena, iako pokazuju visok stupanj sličnosti i imaju isti zadatak u biosintezi PG-a, postoje male razlike u strukturi njihovih aktivnih mjesta i mehanizmu djelovanja zbog čega su im uloge, razina aktivnosti i afinitet za supstrat (AA) različiti. Identifikacijom treće izoforme COX enzima, koja zapravo varijanta produkta gena *COX-1* i nastaje kao posljedica alternativnog izrezivanja (Chandrasekharan i sur., 2002), postao

je jasniji mehanizam farmakološkog djelovanja paracetamola i ostalih antipiretika koji imaju blagi protuupalni učinak i slabi su inhibitori klasičnih izoformi COX, ali lako prodiru u središnji živčani sustav (SŽS).

COX-1 je konstitutivno prisutna u većini stanica i tkiva (primjerice, u endotelnim stanicama, trombocitima, GI traktu, glomerulima itd.) te se smatra „zaštitnim“ enzimom odgovornim u kontroli tjelesne homeostaze. Sudjeluje u biosintezi prostanoida koji reguliraju različite fiziološke procese kao što su održavanje normalne funkcije bubrega, zaštita sluznice GI trakta, diferencijacija makrofaga, agregacija trombocita (Osafo i sur., 2015). COX-2, s druge strane, je inducibilna izoforma, iako postoji određena konstitutivna ekspresija u SŽS, kostima, bubrezima, ženskom reproduktivnom sustavu i GI traktu. Nastaje kao odgovor na podražaj iz okoline, ima nisku bazalnu ekspresiju koja se može brzo inducirati, na onim mjestima u organizmu gdje je došlo do oštećenja tkiva i stvaranja upalne reakcije, boli kao i tumorigeneze različitim proupalnim faktorima (npr. citokini, faktori rasta itd.) (Rao i Knaus, 2008; Rouzer i Marnett, 2008; Vane i sur., 1998).

Vežanjem u aktivno mjesto NSAID-ovi ostvaruju svoju aktivnost odnosno inhibiraju biosintezu PG-a kako bi se spriječila upala (Lemke i sur., 2013; Vane i Botting, 1998). Ovom mehanizmu djelovanja dosljedni su svi lijekovi ove skupine. Iako se radi o izuzetno složenim procesima, upravo je inhibicija COX-2 odgovorna za protuupalnu i analgetsku aktivnost NSAID-ova, dok su neželjene nuspojave posljedica inhibicije COX-1, koja zapravo ima manju ulogu u ranoj, inicijalnoj fazi akutne upale.

Na temelju farmakodinamske selektivnosti inhibiranja pojedinih COX, razlikujemo neselektivne NSAID-ove i selektivne inhibitore COX-2 tzv. koksibi (celekoksib, firokoksib). Neselektivni NSAID-ovi podjednako inhibiraju obje izoforme COX, iako postoji određena selektivnost prema pojedinoj COX. Primjerice, ibuprofen i naproksen djeluju podjednako na obje izoforme, nešto veću selektivnost za COX-1 imaju ketoprofen i indometacin, dok meloksikam i diklofenak imaju nešto veću selektivnost prema COX-2 (Mimica Matanović, 2014). Većina NSAID-ova reverzibilno inhibira COX, iznimka je acetilsalicilna kiselina koja je jedini lijek iz ove skupine koji ireverzibilno inhibira COX-1 (značajno veća selektivnost pri niskim dozama) i sa slabijim učinkom COX-2, acetiliranjem aminokiseline serina na aktivnom mjestu enzima pri čemu enzim gubi svoju funkciju (Wong, 2019; Calatayud i Esplugues, 2016).

Uz navedeni, u literaturi se navode i drugi mehanizmi koji mogu doprinijeti, glavnom i najznačajnijem, protuupalnom djelovanju NSAID-ova, uključujući redukciju superoksidnih radikala, indukciju apoptoze, smanjenje sinteze dušikovog oksida kao i razine protuupalnih

citokina, modifikaciju aktivnosti limfocita i promjenu funkcije stanične membrane, ali kako izravno pomažu kliničkoj učinkovitosti NSAID-ova nije do kraja razjašnjeno (DeRuijter, 2002).

2.1.4 Primjena NSAID-ova u farmских životinja

Porastom broja stanovnika i podizanjem svjetskog životnog standarda povećavaju se potrebe za proizvodnjom hrane, a zbog svojih vrijednih prehrambeno-nutritivnih svojstava, ona životinjskog podrijetla zauzima važno mjesto u ljudskoj prehrani. Intenzivnim i optimiziranim proizvodnim sustavima za uzgoj životinja (uzgoj jedinki na relativno maloj površini, unutarnji mehanizirani okoliš, formulirana krmiva koja sadrže razne veterinarsko-medicinske proizvode (VMP)), višestruko je povećana njihova proizvodnost, ali su otvorene i brojne mogućnosti za narušavanje dobrobiti istih (Thronton, 2010). Svijest suvremenog potrošača o uvjetima uzgoja i podrijetlu hrane kao i bolje razumijevanje o važnosti liječenja boli posljednjih je godina u porastu, pri čemu nezaobilaznu ulogu imaju znanstvenici i stručnjaci koji se bave problematikom dobrobiti životinja. Kao jedna od mjera za prevenciju i liječenje boli, ali i kako bi se osigurala dobrobit životinja pri rutinskim postupcima uzgoja (kastracija, uklanjanje rogova), primjena je NSAID-ova (De Vito, 2015).

Bol je najstariji senzorni modalitet prisutan i kod najnižih životinjskih vrsta, informira mozak o štetnosti podražaja i potrebi za njegovim uklanjanjem. Subjektivan je osjećaj, što objašnjava kako bolni podražaj izaziva različito reagiranje od organizma do organizma. Životinje, iako su neverbalne, mogu osjećati bol što svojim ponašanjem jasno daju do znanja. Bol se pamti i rezultira naučenim izbjegavanjem. Aktivira brojne fiziološke reakcije koje često izazivaju negativne učinke na dobrobit i ponašanje kao i na opće tjelesne funkcije poput rasta (smanjen unos hrane) i reprodukciju životinja te je područje analgezije od posebnog interesa. Primjenom i utjecajem lijekova na pojedine patofiziološke i biokemijske mehanizme nastanka boli omogućuje se njihovo bolje funkcioniranje (Boison i sur., 2016; Guatteo i sur., 2012).

Dobrobit životinja tiče se društva, zakonodavstva i ekonomije (doprinosi povećanju proizvodnje). U svrhu poboljšanja dobrobiti farmских životinja, ulaskom RH u članstvo EU usklađeni su svi zakonodavni propisi, pa tako i područje zaštite životinja, koje je preuzeto kroz Zakon o zaštiti životinja, uključujući sve izmjene i dopune (NN 102/17).

U veterinarskoj medicini NSAID-ovi se najčešće koriste za simptomatsko liječenje akutnih i kroničnih mišićno-koštanih upalnih stanja, kontrolu groznice, zatim kao pomoćna terapija kod koliformnog mastitisa, respiratornih bolesti, dijareje, enteritisa gdje smanjuju ozbiljnost kliničkih znakova bolesti, ali i za ublažavanje boli i upale povezane s traumom i tijekom operativnih zahvata. Pokazalo se kako su djelotvorni i kod endotoksemije, a u novije

se vrijeme započelo s korištenjem NSAID-ova u liječenju pojedinih tumora (Boison i sur., 2016; De Vito, 2015; Scott, 2013). Druge primjene uključuju smanjenje stresa tijekom transporta ili prije klanja kako bi se spriječila agregacija trombocita te radi sekundarnih farmakoloških učinaka kako bi se poboljšale neke značajke kakvoće mesa. Smatraju se i potencijalnim dopingom u konjičkom sportu te borbi bikova s ciljem poboljšanja njihovih performansi i prikrivanja patoloških promjena lokomotornog sustava (Gallo i sur., 2006).

NSAID-ovi poput ketoprofena, karprofena, fluniksin meglumina (zajedno s tolfenaminskom kiselinom odobreni VMP-ovi u RH) i meloksikama (uz još firokoksib, mavakoksib, robenakoksib, tepoksalin i cimikoksib, centralno registriran VMP u EU) imaju dozvolu za primjenu i u preživača (goveda, ovce, koze itd.) i konja. Uz tolfenaminsku kiselinu i paracetamol, ketoprofen i fluniksin dozvoljeni su i u svinja, dok se kod preživača često koristi acetilsalicilna kiselina, a u konja vedaprofen i fenilbutazon. Pritom treba imati na umu da se neki ne smiju davati životinjama namijenjenim za proizvodnju hrane poput fenilbutazona i centralno odobrenih VMP-ova, izuzev meloksikama. Na temelju dostupnih podataka, primjena NSAID-ova nije uobičajena u industriji peradi (EZ, 2021; Boison i sur., 2016).

Zbog različite dostupnosti VMP-a u državama članicama EU i izvan nje, postoje slučajevi kada se u liječenju životinja, procjenom koristi i rizika doktora veterinarske medicine i u skladu sa propisanim pravilima, nedostatak određenog VMP-a nadomješta primjenom tzv. neodobrenog lijeka (engl. „*off (extra) label use*“). Kako se koriste na vrsti ili kategoriji životinja koje nisu navedene u odobrenju, u količini i na različit način od odobrene za indikaciju, za takve lijekove nisu provedena istraživanja neškodljivosti i učinkovitosti te nije poznata karencija za životinje za hranu kao ni moguće nuspojave (Terzić i sur., 2020). Prema istraživanju provedenom 1992. godine u SAD-u, fenilbutazon, odobren samo za liječenje upalnih procesa u pasa i konja te zabranjen u životinja za proizvodnju hrane, zlouporabljen je za liječenje krava i goveda (Gallo i sur., 2006), zbog čega je primjena takvih lijekova prepoznata kao potencijalni problem. Vrsna specifičnost NSAID-ova u pogledu enzimske specifičnosti, farmakoloških svojstava i sigurnosnog profila može se mijenjati od vrsta do vrsta i do sada je malo podataka o životinjskim vrstama za proizvodnju hranu. U slučaju kiralnih NSAID-ova, koji mogu rezultirati biološki različitim, ponekad i suprotnim učincima u organizmu, uz farmakokinetiku, farmakodinamiku i ostatke u tkivima, studije trebaju uključivati stereoselektivnu analizu (Boison i sur., 2016). Isto tako, podaci o stupnju selektivnosti NSAID-ova za COX izoforme u ljudi i životinja uvelike se razlikuju, stoga se ne mogu izravno ekstrapolirati. Gotovo sve nuspojave NSAID-ova povezuju se s dozom i trajanjem izloženosti. Zbog većih doza potrebnih za postizanje analgezije, neželjeni učinci, koji primarno pogađaju GI sustav, bubrege i jetru,

izraženiji su u životinja nego u ljudi te mnogi od njih nisu prikladni za primjenu u veterinarskih pacijenata. Zbog mogućih toksičnih učinaka treba ih izbjegavati kod krava u laktaciji i tijekom graviditeta zbog veće neonatalne smrtnosti (Boison i sur., 2016; De Vito, 2015; Scott, 2013).

2.2 Pojavnost i praćenje prisutnosti ostataka NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla

Svaki VMP, pa tako i NSAID, koji se daje životinjama čiji proizvodi završavaju u prehrambenom lancu može dovesti do pojave ostataka (rezidua) bilo roditeljske supstancije, njihovih metabolita i/ili razgradnih produkata lijeka u tim proizvodima. Lijekovi koji se primjenjuju u liječenju životinja zbog svoje biološke učinkovitosti već pri vrlo niskim dozama djeluju na mnoge stanične sastavine zbog čega mogu izazvati brojne nuspojave prilikom terapije. Potencijalno štetni zdravstveni učinci mogu biti u obliku alergijskih reakcija, otpornosti na antimikrobne lijekove i širenja rezistentnih bakterija, narušavanja homeostaze crijevne mikroflore ljudi, ali i toksičnih, kancerogenih i/ili teratogenih oštećenja (Mainero Rocca i sur., 2017). Ostaci NSAID-ova predstavljaju problem zbog mogućih nuspojava na GI i KV sustav te druge sustave organa i reakcija preosjetljivosti među kojima je anafilaktički šok najopasniji oblik (Pietruk i sur., 2021). Posebna je pažnja usmjerena na fenilbutazon, čija je upotreba kod ljudi povezana s kancerogenim i genotoksičnim učincima te idiosinkratskom krvnom diskrazijom. Iako dosadašnja saznanja ukazuju kako je rizik povezan s unosom ostataka NSAID-ova hranom (ukoliko se pravilno koriste poštujući propisane doze) vrlo nizak, moguća toksičnost neovisna o dozi kod nekih pojedinaca ne može se isključiti (Boison i sur., 2016). Radi zaštite potrošača, svaki posjednik životinja namijenjenih prehrani ljudi obvezan je prema Zakonu o veterinarstvu (NN 82/13, 148/13, 115/18, 52/21) voditi i čuvati (najmanje 5 godina) evidenciju o liječenju životinja (dijagnoza, lijek – aktivna tvar, način liječenja, duljina tretmana, karencija).

Prisutnost ostataka farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla može biti uzrokovana nepravilnim korištenjem lijeka u okviru veterinarske prakse i/ili nezakonite uporabe u životinja tijekom farmskog uzgoja, izloženosti životinja namjerno ili slučajno onečišćenoj hrani s lijekovima kao i kontaminacijom putem okoliša ili drugim načinima (npr. salicilna kiselina biljni fitohormon). Jedan od najvjerojatnijih i najvažnijih razloga pojavnosti ostataka VMP-a, uz pogrešno i nedopušteno liječenje, je nepoštivanje karencije lijeka, odnosno vremena koje treba proći od posljednje primjene lijeka kako bi se razgradio do dopuštene razine i/ili izlučio iz organizma liječenih životinja čiji proizvodi ulaze u prehrambeni lanac i kao takvi nisu štetni za konzumiranje. Radi se o bitnom parametru koji daje uvid u izlučivanje lijeka iz organizma. Raspodjela lijeka unutar i između različitih tkiva ovisi o svojstvima staničnih

membrana, karakteristikama domaćina (starost, vrsta, imunitet), mjestu i načinu primjene lijeka, a najviše o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka. Upravo zbog potencijalnih negativnih učinaka koje treba uzeti u obzir u cjelokupnom upravljanju upalnim procesom primjenom ove skupine lijekova, posebno je važno voditi računa o vremenu karencije, koje je poznato za mali broj NSAID-ova (tablica 3), a kako se često daju u kombinaciji s nekim antibiotikom, nerijetko se uzima njegovo vrijeme (Smith i sur., 2008). Primjerice, neki NSAID-ovi poput karprofena imaju zanemarivo izlučivanje kada se koriste u životinja u laktaciji, dok se neki poput meloksikama izlučuju u mlijeko u značajnim količinama zbog čega je važno uzeti u obzir vrijeme karencije (Boison i sur., 2016). Posebnu pažnju treba obratiti na osjetljive populacijske skupine kao što su djeca, kod kojih je rizik od izloženosti ostacima VMP-a veći (u odnosu na tjelesnu masu imaju veći unos hrane po jedinici težine) za razliku od izloženosti većine odraslih osoba (Mainero Rocca i sur., 2017).

Tablica 3. Preporuke od strane FARAD-a* za vrijeme karencije nekolicine NSAID-ova (Smith i sur., 2008).

NSAID	Način primjene	Vrijeme karencije (dani)	
		Meso	Mlijeko
Acetilsalicilna kiselina (Aspirin®)	Preko usta	1	1
Karprofen	IV ili SC	21	0
Fluniksin megalumin	IM	30	3
Ketoprofen	IV ili IM	7	1
Fenilbutazon	IM	55	isključivo goveda N/A
	Preko usta	50	
Tolfenaminska kiselina	IV (jedna doza)	7	1

*Kratice: FARAD, Food Animal Residue Avoidance Databank.

2.2.1 Kontrola ostataka NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla

Službene kontrole prisutnosti ostataka VMP-a imaju za cilj zaštitu zdravlja potrošača na način da se provjeri sadrži li proizvod životinjskog podrijetla u sebi ostatke farmakološki djelatnih tvari, njihovih metabolita i/ili produkata razgradnje koji mogu zaostati u hrani dobivenoj od životinje koja je dobila VMP, a za koje je dokazano ili postoji sumnja da su škodljivi po ljudsko zdravlje (EZ, 2009) sukladno važećoj pravnoj regulativi te da se procijeni izloženost potrošača i osiguraju uvjeti za nesmetanu trgovinu zdravstveno ispravne hrane. Osim što se dobiva informacija o ispravnoj primjeni određenog VMP-a odnosno koriste li se zabranjene tvari u liječenju životinja koje i/ili čiji se proizvodi koriste kao hrana kao i da li se u liječenju poštovala karencija, stječe se i uvid u kojoj mjeri ostaci VMP-a prelaze najveću dopuštenu količinu ostataka (NDK; engl. *Maximum residue limit*, MRL) za tvari koje mogu biti

dozvoljene u hrani životinjskog podrijetla i/ili referentne vrijednosti (granica) za poduzimanje mjera (engl. *Reference point for action*, RPA) za tvari koje su zabranjene ili trenutno nisu odobrene i na taj način predstavljaju zdravstveni rizik za potrošače (EZ, 2002).

Zakonodavstvo RH vezano za sigurnost hrane i kontrolu primjene VMP-a, pored nacionalnih propisa, preuzima relevantne europske propise (uredbe i direktive s izmjenama i dopunama) te osigurava izravnu provedbu istih. U skladu s Direktivom Vijeća br. 96/23/EZ (EZ, 1996) na razini pojedinih država članica EU provode se službene kontrole ispitivanja na prisutnost ostataka VMP-a u okviru nacionalnog programa praćenja odnosno Državnog programa monitoringa rezidua (DPMR). U navedenoj Direktivi tvari su podijeljene u dvije glavne skupine: prva skupina uključuje tvari koje imaju anabolički učinak i nedopuštene tvari, a druga skupina se odnosi na veterinarske lijekove i kontaminante (tablica 4). Kada je u pitanju hrana životinjskog podrijetla, Uredba (EZ) br. 470/2009 utvrđuje pravila i postupke za utvrđivanje NDK i/ili RPA vrijednosti (EZ, 2009). Uredbom (EZ) br. 37/2010 uspostavljena je visoka razina zaštite potrošača od izloženosti ostacima VMP-a, navodeći farmakološki djelatne tvari i klasificirane u odnosu na NDK u hrani životinjskog podrijetla (EZ, 2010).

Tablica 4. Tvari skupine A i B, prema Direktivi Vijeća 96/23/EZ (EC, 1996).

<u>Skupina A</u>	<u>Skupina B</u>
Tvari koje imaju anabolički učinak i nedopuštene tvari	Veterinarski lijekovi i kontaminanti
Stilbeni, derivati stilbena, njihove soli i esteri (A1)	Antibakterijske tvari, uključujući suflonamide i kinolone (B1)
Antitireoidne tvari (A2)	Drugi veterinarski lijekovi (B2):
Steroidi (A3)	Anthelmintici (B2a)
Laktoni rezorcilne kiseline uključujući zeranol (A4)	Antikokcidici, uključujući nitroimidazole (B2b)
β -agonisti (A5)	Karbamati i piretroidi (B2c)
Druge tvari uključene u Aneks IV Uredbe Vijeća 2377/90/EZ (nitroimidazoli, kloramfenikol, nitrofurani, dapson, klorpromazin) (A6)	Sedativi (B2d)
	Nesteroidni-protuupalni lijekovi (B2e)
	Druge farmakološki djelatne tvari (B2f)
	Druge tvari i zagađivači okoliša (B3):
	Organoklorni spojevi, uključujući PCB (B2a)
	Organofosforni spojevi (B3b)
	Kemijski elementi (B3c)
	Mikotoksini (B3d)
	Boje (B3e)
	Drugo (B3f)

S ciljem učinkovitije zaštite potrošača, Europska komisija u suradnji s referentnim laboratorijima EU (primjerice EURL-BVL u Berlinu odgovoran za NSAID-ove) usvaja i donosi koordinirane (više)godišnje programe na temelju kojih države članice pripremaju svoj DPMR. Sam program obuhvaća broj i vrstu uzoraka koji se uzorkuje, postupak uzorkovanja, supstancije

koje se analiziraju (identifikacija i određivanje razine njihovih ostataka), ali i precizne izvedbene kriterije metoda za provedbu analiza, tumačenje rezultata kao i mjere koje treba poduzeti u slučaju nesukladnog nalaza propisane, aktualnom, Uredbom 2021/808 (EZ, 2021).

U RH, nadležno tijelo u sustavu sigurnost hrane je Ministarstvo poljoprivrede koje je odgovorno za koordinaciju službenih kontrola, u suradnji s drugim ministarstvima, agencijama, zavodima, službenim laboratorijima i ostalima, te predstavlja kontakt točku prema Europskoj komisiji. Uzorkovanje provodi Uprava za veterinarsku inspekciju sukladno načelima i metodama uzorkovanja, a laboratorijsku analizu uzoraka u području VMP-a i kontaminanata obavlja Hrvatski veterinarski institut (HVI) primjenom prikladnih analitičkih metoda sukladno Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/05).

2.2.2 Najveće dopuštene količine ostataka (NDK)

NDK vrijednosti koje se propisuju za pojedini VMP zasnivaju se na znanstvenim istraživanjima o farmakološkim i toksikološkim svojstvima ispitivane tvari. U svrhu zaštite potrošača i s ciljem smanjenja rizika za svaku takvu tvar određuje se prihvatljiv dnevni unos (engl. *Acceptable daily intake*, ADI), a prema kojem se određuje, i ne smije ga prelaziti, NDK. To je količina tvari koja se kao sastavni dio namirnice može svakodnevno konzumirati čitav životni vijek bez ikakvog rizika po zdravlje. Izražava se u miligramima tvari po kilogramu tjelesne težine, a temelji se na rezultatima eksperimenata na pokusnim životinjama u kojima se utvrđuje količina tvari koja nema zapaženih toksikoloških učinaka (engl. *No observed effect level*, NOEL) tako da se dobivene vrijednosti umanjuju koristeći sigurnosni faktor od 100 do 1000 puta. Regulatorna tijela poput Odbora za veterinarsko-medicinske proizvode (engl. *Committee for Medical Products for Veterinary use*, CVMP) pri Europskoj agenciji za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), Codex Alimentarius komisija i drugi odgovorni su za utvrđivanje NDK vrijednosti, koje kada ih usvoji Europska komisija postaju pravno obvezujući standardi sigurnosti hrane, važan alat u upravljanju rizikom i za sigurnost potrošača i za olakšavanje međunarodne trgovine (Anonymous 1). Američka uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) ekvivalentno je regulatorno tijelo EMA-i, a NDK definira kao tolerancije (Boison i sur., 2016).

Hrana životinjskog podrijetla predstavlja učestalo konzumiranu vrstu hrane te je u cilju javnozdravstvenog interesa vrlo važno da ona bude što nižeg rizika za potrošača. U tom kontekstu, za neke od NSAID-ova postavljene su NDK vrijednosti (EC, 2010), a ovisno o ispitivanom analitu, vrsti životinja i ciljnom tkivu, iznosi od 0,1 do 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (tablica 5). Oni NSAID-ovi koji nisu navedeni Uredbom 37/2010/EZ smatraju se neodobrenim za liječenje

životinja za hranu i tretiraju se kao zabranjene tvari. U slučaju nekih neodobrenih NSAID-ova, postavljen je minimalni zahtjev učinkovitosti metode (engl. *Minimum method performance requirements*, MMPRs), predložen u EURL smjernicama, kako bi se poboljšala i uskladila analitička učinkovitost metoda za njihovo određivanje na razini EU (EURL, 2020). U svrhu službene kontrole, ciljna tkiva su mišić i mlijeko, a zatim slijede bubrezi, jetra i plazma. Može se primijetiti kako od koksiba, COX-2 selektivnih inhibitora, jedino je firokoksib dozvoljen za primjenu u EU i to u konja, dok određivanje metamizola kao izvornog spoja nije moguće budući da se isti vrlo brzo metabolizira te se prate njegovi metaboliti kao marker rezidua.

Tablica 5. Najveće dopuštene količine (NDK) i minimalni zahtjevi učinkovitosti metode (MMPR) NSAID-ova i odgovarajućih metabolita u hrani životinjskog porijekla u EU (EURL 2020; Uredba Komisije br. 37/2010).

Farmakološki aktivna tvar	Marker rezidua	Životinjska vrsta	NDK ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u matrici					MMPR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) Mišić, mlijeko
			Mišić	Masno tkivo	Jetra	Bubreg	Mlijeko	
Karprofen	Karprofen	Govedo, kopitari	500	1000	1000	1000	NDK nije utvrđen	
Diklofenak	Diklofenak	Govedo	5	1	5	10	0.1	
		Svinja	5	1	5	10	-	
Fluniksini	Fluniksini	Govedo	20	30	300	100	-	
		Svinja	50	10	200	30	-	
	5-hidroksi fluniksini	Kopitari	10	20	100	200	-	
		Govedo	-	-	-	-	40	
Firokoksib	Firokoksib	Kopitari	10	15	60	10	-	
Flufenaminska kiselina			-					10
Ibuprofen			-					10
Ketoprofen	Nije primjenjivo	Govedo, svinja, kopitari	NDK nije utvrđen					
Meklofenaminska kiselina			-					10
Meloksikam	Meloksikam	Govedo, koza, svinja, zečevi, kopitari	20	-	65	65	-	
		Govedo, koza	-	-	-	-	15	
Metamizol	4-metilaminoantipirin	Govedo, svinja, kopitari	100	100	100	100	-	
		Govedo	-	-	-	-	50	
Naproksen			-					10
Nifluminska kiselina			-					10
Fenilbutazon			-					5
Oksifenbutazon			-					5
Aluminij salicilat, bazni	Salicilna kiselina	Govedo, koza, kopitari	200	500	1500	1500	-	
		Govedo, koza kopitari	-	-	-	-	9	
Tolfenaminska kiselina	Tolfenaminska kiselina	Govedo, svinja	50	-	400	100	-	
		Govedo	-	-	-	-	50	
Vedaprofen	Vedaprofen	Kopitari	50	20	100	1000	-	

Prema EFSA-i (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA), koja u svojim godišnjim izvještajima objavljuje rezultate monitoringa ostataka VMP-a i drugih tvari u životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla za zemlje EU, u 2019. godini europski laboratoriji su analizirali 24 387 uzoraka na NSAID-ove (klasificirani kao skupina B, točnije B2e) od kojih se prema propisanim NDK vrijednostima 46 uzoraka (0,19 %) pokazalo nesukladnim. Slučajevi nesukladnosti potvrđeni su u tkivima goveda (0,27 %), peradi (0,09 %), konja (0,63 %), svinja (0,09 %), ovaca i koza (0,05 %) te u mlijeku (0,36 %) (EFSA, 2021). U razdoblju od 2006. do 2015. kao i 2018. godine, ukupan postotak nesukladnih uzoraka na NSAID-ove bio je relativno konstantan oko 0,1 – 0,2 %, dok je isti u 2016. i 2017. godini bio nešto viši (0,25 odnosno 0,27 %). U RH 2017. godine u koncentracijama višim od dozvoljenih uz ketoprofen u uzorku svinje i diklofenaka u uzorku mlijeka, NSAID salicilna kiselina u uzorcima mlijeka detektiran je u 35 od sveukupno 37 nesukladnih uzoraka na razini EU (EFSA, 2019).

Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i životinje (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), kao mrežni sustav koji uključuje države članice, Europsku komisiju i EFSA-u, predstavlja učinkovit alat službenih kontrola za brzu razmjenu informacija među nacionalnim tijelima o zdravstvenim rizicima povezanim s hranom i hranom za životinje kao i o mjerama koje su poduzete (npr. informiranje javnosti, povlačenje i opoziv nesukladnog proizvoda) kako bi se uklonila opasnost. Nacionalna kontakt točka za RH je Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede (Anonymous 2). Iz godine u godinu raste broj RASFF obavijesti što ukazuje kako se hrana i hrana za životinje sve više kontrolira. Tako je 2013. godinu obilježila jedna od poznatijih prehrambenih kriza u EU povezana s prijevarom poznatijom kao „skandal s konjskim mesom“. Naime, otkrivena je složena priroda globaliziranog lanca opskrbe hrane i namjernog krivotvorenja deklaracije proizvoda u EU i šire s ciljem ekonomske dobiti, kada je pronađeno konjsko meso u proizvodima označenih kao govedina (McEvoy, 2015; EFSA, 2013). Konjima koji nisu predodređeni za prehrambeni lanac, mogu se davati razni lijekovi, jer ne podliježu tako strogim kontrolama, uključujući i NSAID fenilbutazon. Zajednička izjava EFSA-e i EMA-e o prisutnosti ostataka fenilbutazona u spornim proizvodima dobivena od kopitara upitnog porijekla (EFSA, 2013), pokazuje kako se NSAID može primijeniti u uvjetima u kojima njegova upotreba nije dozvoljena i opravdano izaziva zabrinutost potrošača. Afera s konjskim mesom pokrenula je razne inicijative za poboljšanje cjelokupnog sustava kontrole u EU za otkrivanje i suzbijanje prevara u lancu opskrbe hranom, uključujući i mrežu EU za prijekare povezane s hranom (engl. *Food Fraud Network*, FNN) po uzoru na RASFF (McEvoy, 2015).

2.3 Analitičke metode određivanja ostataka NSAID-ova

Pouzdana identifikacija i kvantifikacija ostataka VMP-a u različitim vrstama uzoraka prvi je korak u službenim kontrolama njihove pojavnosti te utvrđivanja sukladnosti sa zakonskom regulativom. Pojavom mogućnosti analize širokog spektra kemijskih spojeva upotrebom visoko osjetljivih i selektivnih analitičkih tehnika postignut je veliki napredak u analitičkim metodama koje omogućuju detekciju iznimno niskih koncentracija analita.

Razvoj metode za istovremeno određivanje velikog broja NSAID-ova raznolike kemijske prirode (osobito kiselo-baznih svojstava) prisutnih u vrlo niskim (nanogramskim) koncentracijama u složenim biološkim uzorcima (i onima iz okoliša) još uvijek predstavlja izazov, zbog čega se obično analiziraju pomoću zasebnih, a samim time dugotrajnijih i skupljih analitičkih metoda (Božić Luburić i sur., 2021). Kada je u pitanju kontrola ostataka NSAID-ova, tekućinska kromatografija (ultra)visoke djelotvornosti povezane s masenom spektrometrijom (engl. *(Ultra)high performance liquid chromatography – mass spectrometry*, (U)HPLC-MS/MS)) je predvodnik u instrumentalnoj analizi bioloških uzoraka kao što je hrana životinjskog podrijetla (ali i uzorci iz okoliša). Unatoč brzom razvoju analitičke opreme i metoda, većina instrumenta nije u mogućnosti izravnom analizom detektirati vrlo niske koncentracije analita unutar tako složene matrice uzorka. Stoga se analiza NSAID-ova može podijeliti u nekoliko koraka: uzorkovanje, priprema uzoraka, instrumentalna analiza i na kraju obrada podataka. Priprema uzorka, postupak ekstrakcije odnosno izdvajanja analita iz matrice uzorka uz istovremeno uklanjanje interferirajućih spojeva, te koncentriranje ekstrakta kako bi se dobili što viši analitički prinosi, kritičan je i najzahtjevniji korak analitičkog postupka i preduvjet uspješne instrumentalne analize.

2.3.1 Tekućinska kromatografija

Područje rutinske i razvojne analitike primjenom kromatografskih metoda visokog kapaciteta značajno se promijenilo tijekom posljednjih godina. Ovisno o fazi i načinu razdvajanja postoji više različitih vrsta kromatografije. U analitici hrane, za odvajanje otopljenih, većinom polarnih, termički nestabilnih i nehlapljivih tvari, najčešće se koristi tekućinska kromatografija (engl. *Liquid chromatography*, LC). Tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom radi razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi među fazama ili veličini tvari koje se razdvajaju, te imaju različita vremena zadržavanja (vrijeme retencije) na kromatografskoj koloni (Cindrić i sur., 2009). Kao glavni trend u modernoj

analitičkoj kemiji su analize velikog broja uzoraka u što kraćem vremenu. UHPLC tehnologija, poboljšani oblik konvencionalne HPLC, omogućava rad pri znatno višim tlakovima (> 600 bara, za razliku od 400 bara kod HPLC-a). Punila UHPLC kolone sadrže čestice promjera manjeg od 2 μm čime se ostvaruje bolja rezolucija i osjetljivost. Kraće vrijeme trajanja i veća brzina analize, manja količina uzorka uz istovremeno smanjenje potrošnje otapala još su neke od prednosti UHPLC nad HPLC tehnikom, zbog čega se smatra optimalnim rješenjem za kromatografsko razdvajanje višekomponentne smjese (Stachniuk i Fornal, 2016). U današnjim analizama nisko molekularnih analita uglavnom prevladava kromatografija obrnutih faza (engl. *Reversed phase*, RP), sadrži nepolarnu nepokretnu fazu (kemijski modificiran silikagel) i polarnu pokretnu fazu (organska otapala: voda, acetonitril, metanol). Djeluje na principu hidrofobnih interakcija. S druge strane, kromatografija normalne faze (engl. *Normal phase*, NP) sadrži polarnu nepokretnu fazu (npr. silicijev dioksid) i nepolarnu pokretnu fazu (heksan ili heptan) (Stachniuk i Fornal, 2016). U analizi ostataka NSAID-ova obično se koristi RP-(U)HPLC budući da je površina njihovih punila hidrofobna te se NSAID-ovi uspješno zadržavaju i razdvajaju duž kolone. Nakon odvajanja analita na kromatografskoj koloni ovisno o svojstvima istog slijedi njegova detekcija pogodnim detektorom, primjerice apsorpcijskim (UV-Vis), s nizom fotoosjetljivih dioda (engl. *Dioda array detector*, DAD), fluorescentnim (engl. *Fluorescence detector*, FLD), indeksom loma (engl. *Refractive index detector*, RID), elektrokemijskim (engl. *Electrochemical detector*, ED) te u posljednje vrijeme najčešće spektrometrom masa (engl. *Mass spectrometry*, MS).

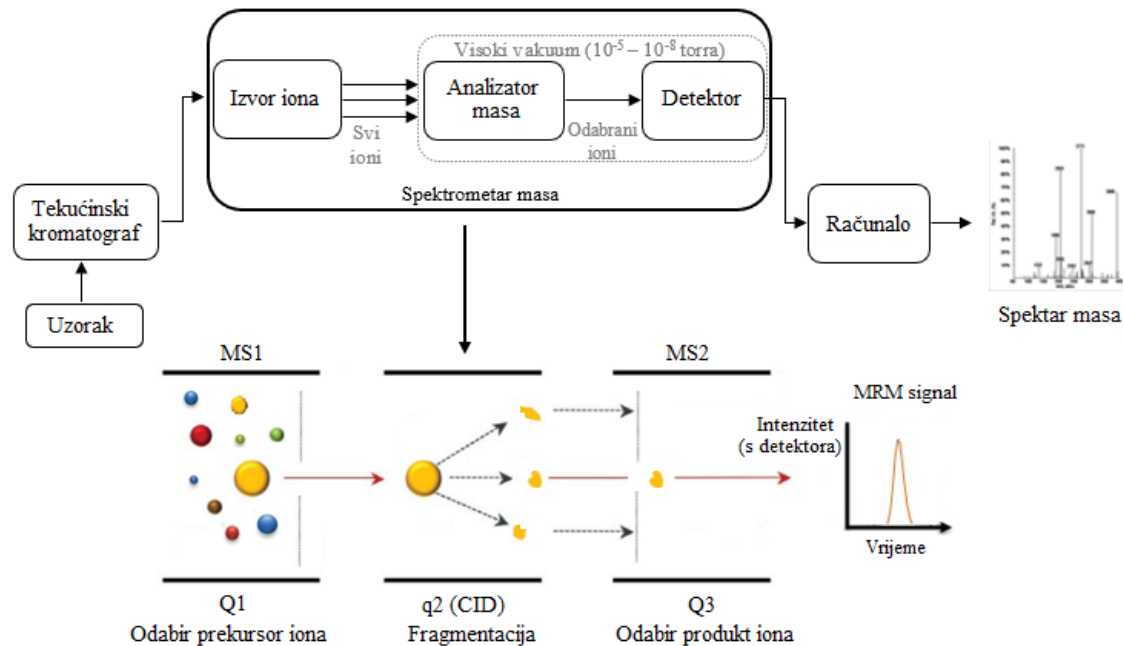
2.3.2 Spektrometrija masa

MS je nezaobilazan analitički alat koji se koristi za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju pozitivnih ili negativnih iona ovisno o njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Prvi korak analize podrazumijeva ionizaciju molekula analita u izvoru iona, nakon čega nastali ioni putuju u analizator masa gdje se odjeljuju prema svom omjeru m/z te dolaze do detektora koji pristigle ione pretvara u mjerljiv (električni) signal, grafički prikazan kao spektar masa. Intenzitet signala predstavlja zastupljenost određenog iona. MS je moguće povezati s drugim analitičkim instrumentima. Spajanjem HPLC-a i MS-a dobivena je moćna tehnika za analizu najrazličitijih spojeva, a povezani su međuspojem (engl. *Interface*) koji omogućuje otparavanje tekućine, ionizaciju neutralnih molekula analita i njihovo uvođenje u sam analizator masa.

Za prevođenje molekula analita u ionizirano stanje postoji nekoliko tehnika ionizacije, a odabir prikladnog ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima analita, strukturi i principu rada. Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ESI) je blaga (prenosi se relativno malo energije) vrsta ionizacije uzoraka izravno iz otopine pri atmosferskom tlaku, namijenjena

ionizaciji velikih, nehlapljivih spojeva poput proteina, kao i za ionizaciju malih polarnih molekula, kompleksa metalnih iona i drugih topljivih anorganskih spojeva, čije se mase kreću od 100 do 150 000 Da (Stachniuk i Fornal, 2016; Gross, 2011). ESI je jedna je od najkorištenijih metoda ionizacije molekula kod LC-MS vezanog sustava, a i u analizi ostataka NSAID-ova u biološkim uzorcima (Mainero Rocca i sur., 2017). Ionizirane molekule analita prenose se pod visokim vakuumom u analizator masa (Cindrić i sur., 2009).

Analizator masa ima ulogu razdvajanja iona različitog omjera m/z . Dok neki analizatori masa istovremeno analiziraju sve ione, poput analizatora masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of flight*, TOF) te orbitrap, drugi mogu propuštati ione tako da oni određenog omjera m/z dolaze na detektor u određeno vrijeme, kao što je kvadrupolni analizator masa (engl. *Quadrupole*, Q), daleko najzastupljeniji analizator. Sastoji se od četiri dijagonalno povezane elektrode, jedan par ima pozitivan, a drugi negativan polaritet, na koje se primjenjuje izmjenični ili istosmjerni napon. Ovi naponi proizvode oscilirajuće električno polje koje djeluje kao filter masa za prienos i stabilnu putanju iona s odabranom m/z vrijednosti, dok se ostali u doticaju s elektrodom neutraliziraju, ostaju raspršeni i ne dopiru do detektora (Stachniuk i Fornal, 2016; Cindrić i sur., 2009). Konfiguracija koja se sastoji od dva kvadrupola odijeljena kolizijskom ćelijom (q) naziva se trostruki kvadrupol (QqQ) i najpopularniji je analizator masa u vezanoj spektrometriji masa. U prvom kvadrupolu (Q1) na temelju određenog m/z odabire se i izdvaja najintenzivniji ion (prekursor ion), koji ulazi u drugi kvadrupol odnosno kolizijsku ćeliju (q2) gdje se zbog interakcije/sudara s inertnim plinom (najčešće dušikom) aktivira u procesu kolizijom inducirane disocijacije (engl. *Collision-induced dissociation*, CID) i podliježe fragmentaciji pri čemu nastaju produkt ioni ili neutralni fragmenti koji se analiziraju u trećem kvadrupolu (Q3). Svaki produkt ion nosi vrlo specifičnu strukturnu informaciju o pojedinom ionu, što omogućuje identifikaciju i strukturnu karakterizaciju spojeva. Ovisno o odabranoj metodi snimanja spektra mase, razlikujemo nekoliko načina rada MS-a, snimanje: (i) prekursor iona, (ii) produkt iona, (iii) neutralnih gubitaka, (iv) ukupne struje iona (engl. *Total ione current*, TIC) koja se naziva i cjelovitim skeniranjem, dobiva se puni maseni spektar prema zadanom rasponu m/z , koristi se u slučaju nepoznatih spojeva, (v) jednog iona (engl. *Selected/Single ion monitoring*, SIM) omogućava snimanje odabranih iona karakterističnih za odabrane spojeve, (vi) praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple reaction monitoring*, MRM) omogućava potvrdu prisutnosti fragmentiranih iona nastalih od određenog iona prekursora (slika 3). Visoka selektivnost MRM metode čini ju jednom od najpouzdanijih metoda za potvrdu prisutnosti određenog spoja u uzorku (Gross, 2017; Stachniuk i Fornal, 2016; Cindrić i sur., 2009).



Slika 3. Shematski prikaz vezanog sustava LC-MS/MS s detaljnijim prikazom snimanja višestrukih reakcija (MRM) (vlastita slika). Prvi kvadrupol Q1 (MS1) selektivno omogućuje ionima prelazak u drugi kvadrupol q2. U q2 dolazi do kontrolirane fragmentacije izabranog molekularnog (prekursor iona) iona kolizijski induciranom disocijacijom (CID). Dobiveni fragmenti (produkt ioni) ulaze u treći kvadrupol Q3 (MS2) te se samo oni značajnog intenziteta i mase propuštaju do detektora.

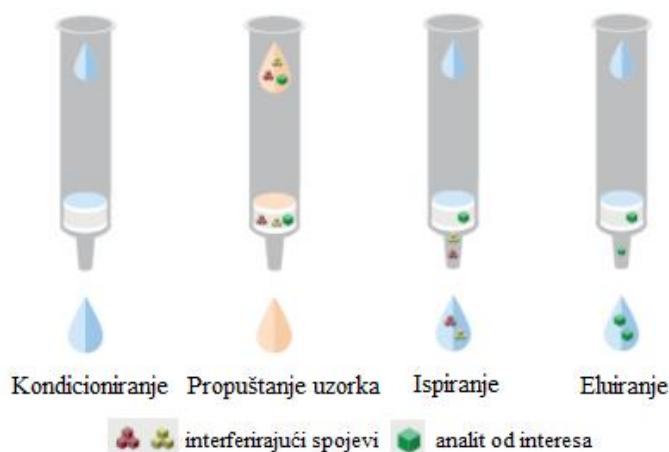
2.3.3 Priprema uzoraka pri određivanju ostataka NSAID-ova u uzorcima životinjskog podrijetla

Prvi korak u analizi je priprema uzorka, postupak koji podrazumijeva ekstrakciju analita od interesa iz uzorka uz što veće analitičke prinose te omogućuje uklanjanje sastojaka matrice koje često interferiraju s analitom kao i istovremeno koncentriranje samog analita.

Strukturna složenost, niske koncentracije te snažne nekovalentne interakcije s proteinima matrice, čine pripremu uzoraka NSAID-ova kritičnim korakom (Božić Luburić i sur., 2021; van Pamel i Daeseleire, 2015). Prema literaturnim podacima, za analize pojedinih ili određenih grupa NSAID-ova primjenjuju se različite metode pročišćavanja, poput ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase extraction*, SPE) kojoj prethodi ekstrakcija s organskim otapalom (Gentili i sur. 2012; Hu i sur. 2012; Jedziniak i sur. 2012; Dowling i sur. 2010) ili hidroliza (Kaufmann i sur., 2014; Jedziniak i sur., 2010; Chrusch i sur., 2008), disperzivna tekuća-tekuća mikroekstrakcija (engl. *Dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) (Alshana i sur. 2013), QuEChERS ekstrakcija (engl. *Quick, easy, effective, rugged, and safe*, QuEChERS) (Rúbies i sur., 2016) ili

ekstrakcija kruto-tekuće s podjelom pri niskoj temperaturi (engl. *Solid-liquid extraction followed by a low-temperature partitioning*, SLLE-LTP) (Castilhos i sur. 2016). Međutim, neki postupci koriste samo tekuću ekstrakciju (van Pamel i Daeseleire 2015, Dubreil-Chéneau i sur. 2011) s korakom uparivanja bez ikakvog daljnjeg pročišćavanja.

Od navedenih metoda ekstrakcije u analizi NSAID-ova se najčešće koristi SPE, kojoj prethodi ekstrakcija organskim otapalom ili hidroliza, bilo kemijska ili enzimska, za oslobađanje analita iz matrice kao korak deproteinizacije i/ili dekonjugacije. SPE postupak je učinkovit, selektivan, zahtjeva manju količinu organskog otapala, a pročišćavanje i koncentriranje se odvijaju istovremeno. Relativno je brza i jeftina tehnika u odnosu na druge, no problem su koelucije drugih neželjenih spojeva (interferencija) matrice kod uzoraka s visokim udjelom lipida (Mainero Rocca i sur., 2017). Odvajanje analita otopljenog u ekstraktu uzorka temelji na selektivnom vezanju analita na čvrsti sorbens koji se nakon koraka ispiranja eluiraju odgovarajućim otapalom (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz SPE ekstrakcije (prilagođeno prema <https://sampleprep.biotage.com/biofluidssampleprep>)

Kontrola pH ima važnu ulogu u SPE ekstrakciji jer utječe na disocijaciju ionizirajućih spojeva, njihovu hidrofobnost i interakciju sa sorbensom. Postoji širok raspon komercijalno dostupnih punila SPE kolona s različitim sorbensima (kemijski modificiran silikagel s različitim funkcionalnim grupama, ionsko-izmjenjivačke tvari, polimerni sorbensi s poboljšanim zadržavanjem polarnih spojeva) koji se koriste ovisno o kemijskoj prirodi analita i sastavu uzorka te otapalima. SPE ekstrakcija smatra se jednom od najučinkovitijih tehnika pročišćavanja uzoraka u slučaju utjecaja matrice (Mainero Rocca i sur., 2017).

2.3.3.1 Utjecaj matrice

Glavno ograničenje (U)HPLC-MS sustava je osjetljivost na prisutne interferirajuće sastojke matrice koji mogu eluirati s analitom te mogu dovesti do pogrešne kvantifikacije samog analita. Egzogene (iz postupka pročišćavanja) i/ili endogene (sastojci matrice) tvari prisutne u uzorku mogu ometati ionizaciju analita uzrokujući smanjenje, ili mnogo rjeđe, pojačavanje analitičkog signala, što naročito može biti značajno kod primjene ESI izvora iona. Zbog toga je moguće nepovoljno djelovanje na značajke metode uključujući preciznost i točnost rezultata, granicu detekcije i linearnost odziva. Utjecaj matrice znatno je izraženiji kod složenijih uzoraka. Postoji nekoliko načina za smanjenje ili uklanjanje utjecaja matrice poput primjene odgovarajućih kalibracijskih postupaka (kalibracija u matrici (engl. *Matrix-matched calibration*), dodatak standarda (engl. *Standard addition*) i/ili dodatak internog standarda (engl. *Internal standard addition*)), optimizacija pripreme uzorka, razrjeđivanje uzorka, modifikacija kromatografskih uvjeta te produljenje trajanja analize (Mainero Rocca i sur., 2017; Stachniuk i Fornal, 2016).

2.3.3.2 Metode određivanja ostataka NSAID-ova

Pregledom dostupne literature uočeno je kako su opisane brojne metode za određivanje pojedinačnih ili više NSAID-ova u različitim biološkim matricama, s različitim analitičkim tehnikama poput kapilarne elektroforeze (engl. *Capillary electrophoresis*, CE), biosenzora, plinske kromatografije (engl. *Gas chromatography*, GC) i (U)HPLC povezanih s različitim detektorima (tablica 6). No isto tako vrlo je ograničen broj radova koji opisuju metode za istovremeno određivanje kiselih i bazičnih (uglavnom metaboliti metamizola) NSAID-ova u različitim vrstama uzoraka (Božić Luburić i sur., 2021). Primjetno je kako je najčešća analitička tehnika za određivanje ostataka NSAID-ova (U)HPLC-MS/MS, budući da takve metode zbog svoje visoke selektivnosti i osjetljivosti omogućuju precizniju identifikaciju analita (na temelju vremena zadržavanja na kromatogramima i spektara masa specifičnih za svaku tvar, odnosno fragmentirani ion) u usporedbi s konvencionalnim detektorima, uz jednostavnije postupke pripreme uzoraka koji štede vrijeme i novac. Fizikalno-kemijska svojstva analita poput polarosti, nehlapljivosti kao i nestabilnost pri povišenim temperaturama ograničavaju primjenu GC povezanu s MS-om, za koju je analite potrebno i derivatizirati. Noviji je trend primjena MS visoke rezolucije (engl. *High-resolution MS*), kao što je Orbitrap ili Q-TOF.

Tablica 6. Pregled pripreme uzoraka i metoda analize u određivanju ostataka NSAID-ova u biološkim uzorcima.

Analit	Priprema uzoraka	Metoda	Vrsta uzorka	CC α /CC β / LOD/LOQ	Literatura
8 NSAID-ova (kiseli i bazični (1)) i CAP	ACN i ekstrakcija isoljavanjem	LC-MS/MS	Mlijeko (kravlje, ovčje)	CC α između 0,12 i 532 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 0,1 i 564 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ između 0,05 i 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Britzi i Schwartsburd, 2019)
14 NSAID-ova (kiseli i bazični (1))	ACN uz korak smrzavanja	LC-MS/MS	Mišić (govedo)	CC α između 5,7-56,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 6,4 i 62,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOD između 0,5-4 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ između 1,25 i 12,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Castilhos i sur., 2016)
10 NSAID-ova (kiseli)	ACN, QuEChERS	LC-MS/MS LC-Orbitrap	Mlijeko (kravlje)	CC α između 0,4 i 41,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 0,8 i 42,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Rubies i sur., 2016)
16 NSAID-ova (kiseli i bazični (4)) i 5 kortikosteroida	Hidroliza, ACN uz korak smrzavanja	LC-MS/MS	Mišić (govedo, svinja, konj)	CC α između 3,28 i 546 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 4,06 i 592 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ između 1,25 i 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Jedziniak i sur., 2015)
15 NSAID-ova (kiseli i bazični (1))	ACN	LC-MS/MS	Mišić, mlijeko (govedo)	CC α između 0,5 i 579 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mišić; CC β između 0,6 i 642 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mišić; CC α između 0,1 i 55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko; CC β između 0,1 i 61 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko	(van Pamel i Daeseleire, 2015)
2 NSAID-a (kiseli i bazični) te 14 kortikosteroida i anaboličkih steroida	Hidroliza, ACN, SPE (Oasis MCX)	LC-MS/MS	Mišić, mlijeko (govedo)	CC α između 28,3 i 116,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 32,2 i 160,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Kaufmann i sur., 2014)
5 NSAID-ova (kiseli)	Ekstrakcija isoljavanjem, DLLME-ACN i CF	DLLME-FASS-CE	Mlijeko (kravlje) i mliječni proizvodi	LOD između 4,8 i 12-13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko, između 3,0 i 9,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za jogurt i između 6,1 i 7,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za sir	(Alshana i sur., 2013)
2 NSAID-a (kiseli)	ACN, SPE (Bond Elut C ₁₈)	LC-MS/MS	Mišić (konj)	CC α 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β 2,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Blanca i sur., 2013)

Tablica 6. (nastavak)

Analit	Priprema uzoraka	Metoda	Vrsta uzorka	CC α /CC β / LOD/LOQ	Literatura
20 NSAID-ova (kiseli i bazični (1))	ACN-EtAC	UHPLC-MS/MS	Mlijeko i razni mliječni proizvodi	LOD između 0,03 i 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ između 0,17 i 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Peng i sur., 2013)
13 NSAID-ova (kiseli)	ACN, SPE (Oasis HLB)	LC-MS/MS	Mišić, mlijeko (govedo)	CC α između 0,1 i 56 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko i između 0,2 i 652 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mišić; CC β između 0,2 i 196 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko i između 0,5 i 796 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za mišić	(Gentili i sur., 2012)
30 NSAID-ova (kiseli i bazični (2))	ACN, SPE (Oasis HLB)	UHPLC-MS/MS	Mišić (svinja)	LOD između 0,4 i 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ između 1,0 i 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Hu i sur., 2012)
15 NSAID-ova (kiseli i bazični (1))	ACN, SPE (Sep-Pak NH ₂)	LC-MS/MS	Mlijeko (kravlje)	CC α između 0,1 i 55 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 0,2 i 65 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Jedziniak i sur., 2012)
120 veterinarskih lijekova uključujući 6 NSAID-ova (kiseli)	ACN/H ₂ O, d-SPE (C ₁₈)	LC-MS/MS	Bubreg (govedo)	LOD \leq 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za FLU, KTP i OPB; LOD \leq 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za DC, PBZ i TFA	(Schneider i Lehotay, 2012)
12 NSAID-ova (kiseli)	MeOH	LC-MS/MS	Mlijeko (kravlje)	CC α između 0,1 i 63 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 0,1 i 76 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Dubreil-Chéneau i sur., 2011)
10 NSAID-ova (kiseli)	Hidroliza, ACN, SPE (Evolute™ ABN)	LC-MS/MS	Mlijeko (kravlje)	CC α između 0,5 i 56 $\mu\text{g L}^{-1}$; CC β između 0,80 i 72 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Dowling i sur., 2010)
9 NSAID-ova (kiseli)	ACN, SPE (C ₁₈)	HPLC-FL	Mlijeko (kravlje)	LOQ između 0,3 i 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Gallo i sur., 2010)
10 NSAID-ova (kiseli)	ACN, SPE (C ₁₈)	LC-MS/MS	Mišić (govedo, svinja, konj, perad)	LOD između 0,3 i 1,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ između 0,7 i 3,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Jedziniak i sur., 2010)

Tablica 6. (nastavak)

Analit	Priprema uzoraka	Metoda	Vrsta uzorka	LOD/LOQ/CC α /CC β	Literatura
10 NSAID-ova (kiseli)	ACN, SPE (C ₁₈)	LC-MS/MS	Mišić (govedo, svinja, konj, perad)	LOD između 0,3 i 1,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ između 0,7 i 3,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Jedziniak i sur., 2010)
7 protuupalnih lijekova, uključujući 4 NSAID-a (kiseli i bazični (1))	ACN	LC-MS/MS	Mlijeko (kravlje)	CC α između 16 i 62 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CC β između 17 i 73 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Malone i sur., 2009)
150 veterinarskih lijekova i metabolita, uključujući 5 NSAID-ova (kiseli)	ACN + otopina za taloženje	UPLC-TOF	Mlijeko (kravlje)	CC α između 0,4 i 45 $\mu\text{g L}^{-1}$; CC β između 0,6 i 52 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Ortelli i sur., 2009)
10 NSAID-ova (kiseli) te 19 kortikosteroida i anaboličkih steroida	Hidroliza, izopropanol, SPE (Oasis MAX)	LC-MS/MS	Mišić, bubreg (govedo)	LOQ između 0,4 i 51 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Chrusch i sur., 2008)
4 NSAID-a (kiseli)	ACN, SPE (Isolute™ C ₁₈)	GC-MS/MS	Mlijeko (kravlje)	CC α između 0,6 i 2,7 $\mu\text{g L}^{-1}$; CC β između 1,0 i 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Dowling i sur., 2008)
16 NSAID-ova (kiseli)	ACN/MeOH, SPE (C ₁₈)	HPLC-DAD i LC-MS/MS	Mlijeko (kravlje)	LOQ između 2 i 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Gallo i sur., 2008)
13 NSAID-ova (kiseli)	Hidroliza, ASK, SPE (C ₁₈)	HPLC-DAD	Serum, plazma (govedo, svinja, konj)	LOD, LOQ, CC α ili CC β nisu navedeni	(Gallo i sur., 2006)
6 NSAID-ova (kiseli)	ACN, SPE (Oasis HLB)	LC-MS/MS	Mišić (govedo)	CC α između 21 i 59 $\mu\text{g/kg}$ i CC β između 21 i 68 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za FLU, MLX, SA i TFA; LOD \leq 100 i 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za KTP i PBZ	(Van Hoof i sur., 2004)

Kratice: ASK, askorbinska kiselina; CE, kapilarna elektroforeza; CF, kloroform; DC, diklofenak; DLLME, disperzivna tekuća-tekuća mikroekstrakcija; EtAc, etil acetat; FLU, flunixin; KTP, ketoprofen; OPB, oksifenbutazon; PBZ, fenilbutazon; TFA; tolfenaminska kiselina.

2.3.4 Validacija analitičkih metoda

Analitičke metode koje se koriste u službenim kontrolama, kako bi se procijenilo jesu li prikladne za rad te osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka, moraju biti validirane. Osim što je prema regulatornim zahtjevima validacija metode obvezna i važan dio analitičke laboratorijske prakse (sigurnost analitičara u vjerodostojnost njihovih rezultata), uz određivanje mjerne nesigurnosti, ona je i uvjet za akreditaciju metoda rutinskih laboratorija prema normi HRN EN ISO/IEC 17025 (HZN, 2017). Provodi se sukladno definiranom validacijskom protokolu ispitivanjem značajki učinkovitosti (parametri validacije) koje je po razvoju bilo kvalitativnih i/ili kvantitativnih metoda potrebno provjeriti, a u svrhu osiguranja kvalitete rada laboratorija. Kada se radi o VMP-a, značajke i kriterije prihvatljivost metoda za njihovo određivanje do nedavno je propisivala Odluka Komisije br. 2002/657/EZ, sada zamijenjena Provedbenom uredbom Komisije (EU) br. 2021/808 o provođenju analitičkih metoda za rezidue farmakološki djelatnih tvari koje se upotrebljavaju na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane i o tumačenju rezultata kao i o metodama koje treba primjenjivati za uzorkovanje te o stavljanju izvan snage odluka 2002/657/EZ i 98/179/EZ (EU, 2021; EZ, 2002). Različiti ciljevi kontrole zahtijevaju različite kategorije metoda. Ovisno o namjeni metode (orijentacijska ili potvrdna) koja se validira, potrebno je odrediti različite značajke učinkovitosti metode koji uključuju, graničnu koncentraciju analita ($CC\alpha$), sposobnost dokazivanja ($CC\beta$), selektivnost, preciznost, linearnost te robusnost metode.

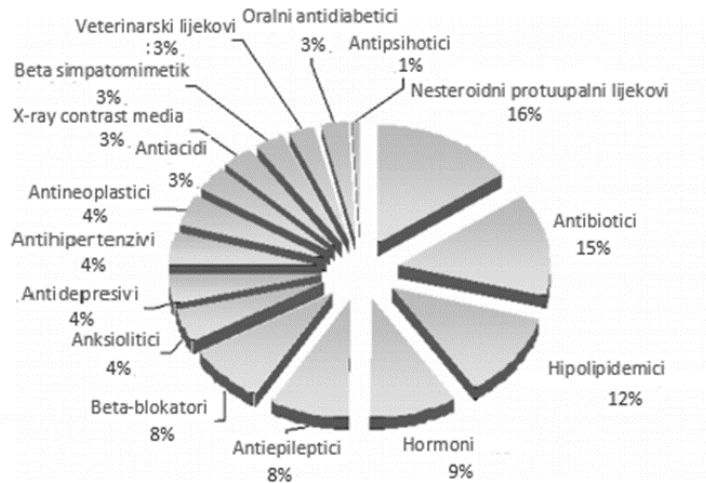
Iako nije zahtijevano, kada su u pitanju (U)HPLC-MS/MS analize, posebno u vezi sa službenom kontrolom ostataka, kao značajka učinkovitosti metode uzima se utjecaj matrice zbog presudnog značenja kako bi se validacija nadopunila i razumio stvarni utjecaj na konačne rezultate (Freitas i sur., 2020). Pri validaciji vodi se računa o troškovima te tehničkim mogućnostima nekog laboratorija, dok sam postupak, ovisno o analitu, metodi i matrici, obuhvaća: definiranje svrhe i opsega korištenja metode, definiranje značajki izvedbe metode i kriterija prihvatljivosti, provjeru validirane metode, kao i izjavu o valjanosti metode za namjeravanu svrhu (FDA, 2019; Gašljević, 2010).

Za validaciju pojedinih značajki metode u skladu s kriterijima navedenih odredbi koriste se slijepe probe, obogaćeni uzorci, certificirani (potvrđeni) referentni materijali. Pri izračunavanju analitičkih granica koje će odlučiti o sukladnosti rezultata, uzimaju se u obzir odgovarajuće najveće dopuštene količine ostataka (NDK), minimalni zahtjevi učinkovitosti metode (MMPR) kao i u slučaju kada nisu definirane regulatorne granice, najniža moguća koncentracija koja se može kvantitativno odrediti (engl. *Lowest calibrated level*, LCL).

2.4 Ostaci lijekova u okolišu

Humani i veterinarski lijekovi, njihovi metaboliti i razgradni produkti sve se učestalije pronalaze u okolišu. Njihova prisutnost u koncentracijama koje nisu nimalo zanemarive dokazana je u mnogim razvijenim zemljama. Eliminacijom iz organizma, sa životinjskih farmi i/ili nesavjesnim odlaganjem, većina lijekova završava u otpadnim vodama bilo industrijskog, bolničkog ili komunalnog porijekla gdje zbog nepotpunog uklanjanja iz otpadnih voda vrlo lako dospiju u površinske i pitke vode, ali i u sediment i u tlo, a otuda i u hranidbenu mrežu. Zbog postojanosti u okolišu, sposobnosti bioakumulacije, biološke aktivnosti, interakcije s drugim lijekovima kao i pojave sinergizma (povećanja toksičnosti u odnosu na zasebne spojeve) mogu imati različito djelovanje na sve organizme koji taj okoliš nastanjuju, uključujući i ljude, zbog čega čine novu skupinu okolišnih zagađivača. Vodeni okoliš kao glavni recipient, sve većeg broja lijekova koje čovječanstvo proizvodi i koristi u sve većim količinama, najizloženiji je tom negativnom utjecaju, dok je iznimno mali broj lijekova koji su detaljno (eko)toksikološki istraženi. Iako su koncentracije uglavnom niske, predstavljaju opasnost za neciljane vodene organizme uslijed trajne izloženosti tim spojevima (Kumirska, 2020; EMA, 2018; Mennilo i sur., 2018; Kümmer, 2010; Santos i sur., 2010; Fent i sur., 2006).

Kako bi se moglo provesti kvalitativno i kvantitativno određivanje velikog broja lijekova različitih strukturnih skupina u koncentracijama značajnim za okoliš i tako procijeniti rizik od njihova onečišćenja, jedan od osnovnih preduvjeta je dostupnost visoko osjetljivih analitičkih metoda. Prisutnost lijekova u okolišu prvi put je objavljena 1970-ih godina u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) gdje je otkrivena klofibrična kiselina u koncentracijama od $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ do $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Desetak godina kasnije utvrđena je prisutnost lijekova u rijekama Ujedinjenog Kraljevstva (UK), a ibuprofen i naproksen su otkriveni u otpadnim vodama u Kanadi (Santos i sur., 2010; Fent i sur., 2006). Zabrinutost zbog moguće opasnosti uslijed zagađenja voda lijekovima porasla je 90-ih godina prošlog stoljeća kada su znanstvenici otkrili masovnu feminizaciju riba mužjaka u područjima rijeka nizvodno od postrojenja za obradu otpadnih voda. Feminizacija je bila posljedica djelovanja $17\text{-}\alpha\text{-etinilestradiola}$ sintetskog estrogenog hormona, koji se koristi za kontracepciju, prisutnog u vodi (Vrček, 2016; Fent i sur., 2006). U posljednjih 30-ak godina objavljeno je više stotina znanstvenih radova koji upozoravaju na prisutnost lijekova i njihovih metabolita u vodama SAD-a, Kanade, UK, Njemačke, Italije, Japana i drugih (Vrček, 2016). U skupini najzastupljenijih lijekova u otpadnim vodama i rijekama nalaze se NSAID-ovi, antibiotici, hipolipidemi, hormoni, antiepileptici, β -blokatori (slika 5) (Santos i sur., 2010).



Slika 5. Skupine lijekova otkrivenih u okolišu (izraženo u % relativnom postotku). Podaci prikupljeni iz 134 znanstvena rada objavljenih u periodu od 1997. do 2009. godine (Santos i sur., 2010).

Svaka skupina lijekova koja nakon konzumacije završava u otpadnim vodama izaziva specifičan spektar poremećaja u prirodi. Tako je dokazano kako mnogi antibiotici, poput tetraciklina i sulfonamida, narušavaju biološku ravnotežu vodenih ekosustava, isto tako, uzrokuju razvoj rezistentnih bakterija uslijed stalnog izlaganja bakterija malim koncentracijama antibiotika, antidepresivi usporavaju razvoj vodenih organizama ili izazivaju malformacije kod nekih riba, beta-blokatori, poput propranolola, mogu inhibirati fotosintezu kod algi i drugog vodenog bilja, dok nesteroidni protuupalni lijekovi mogu uzrokovati poremećeni rast i razvoj brojnih vodenih organizama. Evidentno je, iako su koncentracije lijekova u vodama vrlo niske, dovoljne su za narušavanje ekološke ravnoteže, izazivanje pomora vodenih kukaca (npr. antiepileptik karbamazepin), riba (npr. sintetski estrogene) ili ptica (npr. NSAID diklofenak) (Vrček, 2017).

Prisutnost farmaceutika u okolišu te njihovo djelovanje predstavlja sve veći problem zbog čega se donose i stroži zakonski propisi. Okvirna direktiva o vodama br. 2000/60/EZ predstavlja najvažniji EU pravni dokument u području zaštite voda (EZ, 2000), uz još mnoge druge, od velikog značaja je i Odluka br. 2015/459/EZ na temelju koje je donesena tzv. „watch list“ dio koje je i NSAID diklofenak. Radi se o popisu od 10 tvari ili skupina tvari koje do sada nisu bile uključene u sustavni monitoring (lista prioritarnih tvari) stoga nisu bile predmet dosadašnjih propisa te o njihovoj prisutnosti i mogućem štetnom djelovanju u vodenom okolišu nema puno podataka (EZ, 2015). Stupanjem na snagu Uredbe (EZ) br. 1907/2006 o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija, poznatije kao REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical*) zahtijeva se od svih koji stavljaju kemikalije u promet

fizikalno-kemijske, toksikološke i ekotoksikološke informacije o toj tvari (EZ, 2006), kako bi se ispitao rizik za zdravlje ljudi i okoliša, što podrazumijeva testove toksičnosti.

Kako bi se poboljšalo stanje u okolišu te dobila sveobuhvatna procjena prisutnosti kao i detaljnije istražilo djelovanje odnosno toksičnost spojeva koji dospijevaju u njega, nužan je multidisciplinarni pristup poput biološkog tj. staničnog (*in vitro*) testiranja toksičnosti i analitičkog određivanja okolišno relevantnih koncentracija predmetnih spojeva.

2.4.1 Ekotoksikologija i primjena *in vitro* testova toksičnosti

Definiciju ekotoksikologije uveo je Truhaut 1977. godine opisujući je kao granu toksikologije koja se bavi istraživanjem učinaka nastalih kao posljedica prisutnosti prirodnih ili sintetsko stvorenih toksičnih štetnih tvari (toksikološki pristup) na sve žive organizme, tj. mikroorganizme, biljke, životinje, ljude i ostale sastavnice ekosustava (ekotoksikološki pristup). Ekotoksičnost štetnih tvari ovisi o izloženosti i biodostupnosti spojeva, unosu i metabolizmu, koncentraciji, mehanizmu toksičnog djelovanja te ravnoteži između toksičnih učinaka i zaštitnih odgovora stanice (Fent, 2001).

Testovima toksičnosti se određuju učinci novo sintetiziranih tvari ili onih već prisutnih u okolišu kroz akutno izlaganje (pojedinačna doza) ili višestruko izlaganje (višestruka doza) modelnih organizama ispitivanoj tvari. Za dobivanje toksikoloških informacija, posljednjih godina se intenzivno koriste stanične (*in vitro*) metode kao važna alternativa *in vivo* testovima, kako bi se smanjio broj pokusnih životinja potrebnih za njihovo provođenje. Kao nadopuna tom 3R pristupu (engl. *Replacement, Reduction, Refinement*) koriste se još i računalne (*in silico*) metode testiranja. *In vitro* testovi daju informacije o citotoksičnosti (utjecaju ispitivane tvari na stanice), staničnoj proliferaciji i diferencijaciji. Radi se o brzom i ekonomičnom metodi, visokog stupnja standardizacije i dobre ponovljivosti gdje u kratkom vremenu možemo ispitati veliki broj tvari u širokom rasponu koncentracija, a čiji rezultati mogu poslužiti kao preliminarni testovi za daljnja *in vivo* ispitivanja kao i za klasifikaciju toksičnosti kemikalija. Praćenje učinka ispitivane tvari i mehanizam djelovanja na razini stanice je glavno načelo na kojem se zasniva primjena *in vitro* kultura stanica. Naime, ukoliko se ustanovi štetan učinak na razini stanice može se zaključiti kako će on biti štetan i na višim razinama biološke organizacije (npr. razvojne abnormalnosti, smrt, histopatološke promjene i sl.) čemu ide u prilog značajna korelacija rezultata (80%) *in vitro* citotoksičnosti i *in vivo* akutne toksičnosti (Castaño i Gómez-Lechón, 2005; Fent, 2001). S druge strane, nedostaci *in vitro* metoda su mogućnost reakcije ispitivane tvari sa sastojcima medija za uzgoj te činjenica da kontinuirane stanične linije u *in vitro* uvjetima imaju izmijenjena svojstva i

metaboličku aktivnost zbog čega kemikalije u takvim sustavima mogu iskazati drugačije djelovanje nego u živom organizmu.

U *in vitro* testovima citotoksičnosti spojeva najčešće se koriste razne stanične linije sisavaca, uključujući ljudske, te stanične linije riba. Obzirom na uvjete uzgoja staničnih linija sisavaca i riba glavna razlika je u temperaturi uzgoja. Iako neke riblje stanice mogu rasti na temperaturi višoj od 30 °C, većina ih bolje raste na nešto nižim temperaturama, koje odgovaraju temperaturi okoliša u kojem ribe žive (Fent, 2001). Zbog mogućnosti inkubacije pri sobnoj temperaturi i prostornoj atmosferi, za uzgoj staničnih linija riba često nije potreban inkubator. Kada je u pitanju mehanizam djelovanja ispitivane tvari te usporedba citotoksičnosti ispitane na stanicama sisavaca odnosno riba utvrđena je dobra podudarnost rezultata (Castaño i Gómez-Lechón, 2005).

Iako su u primjeni mnoge metode za određivanje citotoksičnosti kemikalija i praćenje vijabilnosti i preživljenja stanica poput *Neutral red* (NR), metoda otpuštanja laktat dehidrogenaze (LDH), bojanja bojom kristal-ljubičasto, smanjenje razine ATP-a i test proliferacije stanica (Fent, 2011), jedna od najčešće primjenjivanih je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT). MTT je kolorimetrijska metoda kojom se određuje metabolička aktivnost mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan (Mosmann, 1983). Danas je u primjeni niz modifikacija klasičnog MTT testa, u kojima se kao supstrati koriste druge tetrazolijeve soli (npr. XTT, WST-1, MTS), a svima im je zajedničko to da je produkt formazana, koji nastaje, topljiv u mediju te prije mjerenja apsorbancije nije potreban korak otapanja kristala formazana, što takve testove čini jednostavnijima za primjenu.

2.4.1.1 NSAID-ovi u okolišu: ekotoksikološki profil

U vodenom okolišu, kao posljedica njihove široke primjene, NSAID-ovi su jedni od najčešće prisutnih lijekova. Otkriveni su u mnogim vodenim ekosustavima, u kanalizacijskim i otpadnim vodama, rijekama, jezerima, potocima, u moru i podzemnim vodama čak i u pitkoj vodi (Santos i sur, 2010; Fent i sur., 2006). Njihovu prisutnost u okolišu, uz količinu, određuje još nekoliko čimbenika poput biorazgradivosti, njihova fizikalno-kemijska svojstva te nepotpuno uklanjanje iz otpadnih voda (Parolini i sur., 2020). Poseban problem prisutnosti te skupine lijekova u okolišu predstavljaju reakcije pregrađivanja ili transformacija, čime se mijenja njihov biološki i ekotoksikološki učinak. Mnogi se lijekovi takvim kemijskim promjenama u okolišu pretvaraju u nove, biološki aktivnije ili ekotoksičnije produkte. Tako se na primjer pod utjecajem svjetla naproksen u okolišu pregrađuje u više različitih fotoprodukata, od kojih su neki mnogo

štetniji za okoliš od polazne tvari (Vrček 2016; Fent i sur., 2006). Paracetamol se tijekom kloriranja, redovitog postupka tehnološke obrade voda, pregrađuje u 1,4-benzokinon, koji je 60-ak puta (eko)toksičniji od početnog spoja te u još neke produkte nepoznatog ekotoksikološkog profila (Vrček, 2016; Santos i sur., 2010).

Iako su koncentracije prisutne u okolišu puno manje od onih koje se koriste za liječenje ljudi, kopneni i vodeni organizmi mogu biti izloženi puno većim koncentracijama zbog lake bioakumulacije tih spojeva. Najpoznatiji primjer neželjenih i nepredvidljivih posljedica je slučaj s diklofenakom koji je doveo do ekološke katastrofe 1990-ih godina kada je započeo nagli proces izumiranja supova na Indijskom potkontinentu. Naime, diklofenak se koristio kao protuupalno sredstvo kod domaće stoke čijim su se uginulim ostacima hranile ptice strvinari, što je rezultiralo zatajenjem bubrega i viscelarnim gihtom, te je time bio ugrožen opstanak te vrste (Fent i sur., 2006; Oaks i sur. 2004). Nadalje, kako je u ribi pronađen enzim COX sličan ljudskom COX-2, one time postaju potencijalnom metom uslijed kontaminacije vode NSAID-ovima (Santos i sur., 2010; Fent i sur., 2006). Nedavne studije ukazuju kako okolišno relevantne koncentracije NSAID-ova, primjerice ketoprofena i diklofenaka koji posjeduju najvišu razinu akutne toksičnosti (Sharma i sur., 2017), izazivaju i oštećenje DNA u monocitnim stanicama, sugerirajući njihovo imunosupresivno djelovanje i genotoksičnost u ribama (Ribas i sur., 2014), a također utječu i na reprodukciju i razvoj potomstva te preživljenje (Mennillo i sur., 2018). Navedene činjenice predstavljaju problem koji se ne smije zanemariti, pogotovo ako se ima u vidu kronični učinak na žive organizme. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjeli i procijenili rizici NSAID-ova za okoliš i žive organizme, obzirom da se može očekivati još veća i značajnija prisutnost te skupine lijekova u otpadnim vodama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Standardi, kemikalije, pribor i instrumenti

3.1.1 Standardi za razvoj metode određivanja nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID)

Tablica 7. Analitički i interni standardi NSAID-ova odabranih za analizu.

Redni broj	Analitički standardi	Kratica	Proizvođač
1.	4-acetilaminoantipirin ^a	4-AAA	Sigma Aldrich
2.	4-aminoantipirin ^a	4-AA	Sigma Aldrich
3.	4-dimetilaminoantipirin	4-DMAA	Sigma Aldrich
4.	4-formilaminoantipirin ^b	4-FAA	Vetranal
5.	4-hidroksiantipirin ^c	4-OH-A	Sigma Aldrich
6.	4-isopropilaminoantipirin	4-IPAA	Santa Cruz
7.	4-metilaminoantipirin ^a	4-MAA	Sigma Aldrich
8.	5-hidroksi fluniksin ^d	5-FLUOH	Vetranal
9.	Antipirin	A	Sigma Aldrich
10.	Diklofenak	DC	Sigma Aldrich
11.	Fenilbutazon	PBZ	Sigma Aldrich
12.	Firokoksib	FCX	Vetranal
13.	Flufenaminska kiselina	FFA	Sigma Aldrich
14.	Fluniksin	FLU	Vetranal
15.	Ibuprofen	IBP	LGC
16.	Karprofen	CPF	Vetranal
17.	Ketoprofen	KTP	Vetranal/LGC
18.	Mefenaminska kiselina	MFA	Sigma Aldrich
19.	Meklofenaminska kiselina	MCA	LGC
20.	Meloksikam	MLX	Sigma Aldrich
21.	Naproksen	NP	Vetranal
22.	Nifluminska kiselina	NFA	LGC
23.	Oksifenbutazon ^e	OPB	LGC
24.	Piroksikam	PRX	LGC
25.	Salicilna kiselina	SA	LGC
26.	Tolfenaminska kiselina	TFA	Vetranal
27.	Vedaprofen	VDP	Vetranal

Tablica 7. (nastavak)

Redni broj	Interni standard	Kratica	Proizvođač
28.	4-acetamido-d3-antipirin/acetilaminoantipirin-D3	4-AAA-D3	
29.	4-aminoantipirin-D3	4-AA-D3	
30.	4-isopropilaminoantipirin-D6	4-IPAA-D6	
31.	4-metilaminoantipirin-D3	4-MAA-D3	
32.	5-hidroksi fluniksin-D3	5-FLUOH-D3	
33.	Aminopirin[N,N-dimetil- ¹³ C ₂]	DMAA- ¹³ C ₂	
34.	Antipirin-D3	A-D3	
35.	Diklofenak- ¹³ C ₆	DC- ¹³ C ₆	
36.	Fenilbutazon- ¹³ C ₁₂	PBZ- ¹³ C ₁₂	
37.	Firokoksib-D6	FCX-D6	
38.	Flufenaminska kiselina- ¹³ C ₆	FFA- ¹³ C ₆	
39.	Fluniksin-D3	FLU-D3	EURL- BVL
40.	Ibuprofen-D3	IBP-D3	
41.	Karprofen-D3	CPF-D3	
42.	Ketoprofen-D3	KTP-D3	
43.	Mefenaminska kiselina- ¹³ C ₆	MFA- ¹³ C ₆	
44.	Meklofenaminska kiselina- ¹³ C ₆	MCA- ¹³ C ₆	
45.	Meloksikam-D3	MLX-D3	
46.	Naproksen-D3	NP-D3	
47.	Nifluminska kiselina- ¹³ C ₆	NFA- ¹³ C ₆	
48.	Piroksikam-D3	PRX-D3	
49.	Oksifenbutazon- ¹³ C ₆	OPB- ¹³ C ₆	
50.	Salicilna kiselina- ¹³ C ₆	SA- ¹³ C ₆	
51.	Tolfenaminska kiselina- ¹³ C ₆	TFA- ¹³ C ₆	
52.	Vedaprofen-D3	VDP-D3	

Metaboliti: ^ametamizola; ^b4-dimetilaminoantipirina (4-DMAA); ^cantipirina (A); ^dfluniksina (FLU); ^efenilbutazona (PBZ).

3.1.2 Kemikalije

- 0,25 % Tripsin-EDTA (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK)
- Acetonitril: HPLC čistoće (Honeywell Burdick Jackson, Michigan, SAD)
ULC-MS/MS čistoće (Biosolve Chimie, Dieuze, Francuska)
- Albumin iz goveđeg seruma, ≥98 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Amonijev formijat, 97 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Amonijev acetat, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

- β -glukuronidaza/arilsulfataza tip HP-2 iz *Helix pomatia* (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test) (Promega Corporation, Madison, WI, SAD)
- Dietil-eter, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, RH)
- DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- EMEM (engl. *Eagle's Minimum Essential Medium*) (Lonza Group Ltd, Basel, Švicarska)
- Etanol, 96 % (Kemika, Zagreb, RH)
- FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*) (GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, RH)
- Kalijev klorid (Kemika, Zagreb, RH)
- Klorovodična kiselina, min. 37 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- L-Askorbinska kiselina, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Metanol: HPLC čistoće (Honeywell Burdick Jackson, Michigan, SAD)
ULC-MS/MS čistoće (Biosolve Chimie, Dieuze, Francuska)
- Metanol (Kemika, Zagreb, RH)
- Mravlja kiselina, p.a. i LC-MS čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- n-heksan, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev acetat, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev klorid, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev klorid (Kemika, Zagreb, RH)
- Redestilirana voda, pročišćena do 18,2 M Ω /cm (Mili Q[®] sustav, Millipore[®], Bedford, USA)
- SPE kolonice
 - Discovery[®] DSC-18 (500 mg, 3 mL; Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, SAD)
 - Evolute[®] Express ABN (100 mg, 3 mL; Biotaga, Uppsala, Švedska)
- Stlačeni dušik 5,0 i 5,5 (SOL spa[®], Monza Italija)
- Tripan-plavo (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)

3.1.3 Laboratorijski pribor

- Adapteri za SPE kolonice
- Bočice (*viale*) za instrument, zatamnjene, kapaciteta 250 μ L i 2 mL i PTFE čepovi sa silikonskom septom (Chromacol - Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- Inzulinske igle i injekcije od 1 mL (Chirana T. Injecta, Stara Tura, Slovačka)
- Mikroeprovete sa poklopcem, stabilne pod silom centrifuge, model „safe-lock“, kapaciteta 2 mL (Eppendorf, Wesseling, Njemačka)
- Neubauerova komorica za brojanje stanica (Reichert Bright-Line, Buffalo, SAD)
- Petrijeve posude za kulture stanica (Thermo Scientific BioLite, SAD)
- Ploče s 6 i 96 jažica (Corning, SAD)
- Polipropilenske epruvete za uzorke, kapaciteta 15 i 50 mL (Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- Stakleno laboratorijsko posuđe
 - Odmjerene tikvice i menzure, klasa A (Isolab, Eschau, Njemačka)
 - Ostalo stakleno posuđe (Deltalab, Barcelona, Španjolska)

3.1.4 Instrumenti

- Analitička vaga, preciznosti $\pm 0,0001$ g (OHAUS, Parsippany, SAD)
- Automatske pipete za volumene od 10 μ L do 5 mL (Hirschmann, Eberstadt/Eppendorf, Wesseling, Njemačka)
- Centrifuga do 4 500 rpm s termostatom, model Rotanta 460R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- Centrifuga do 15 200 rpm s termostatom, model SL16R - ultracentrifuga (Thermo Fisher Scientific, Waltham Ma, SAD)
- Čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Mannedorf, Švicarska)
- Digestor
- Dyno-Eye digital camera (ANMO Electronics Corporation, Tajvan)
- Elektronska pipeta, model Multipette Xstream plus (Eppendorf, Wesseling, Njemačka)
- Generator dušika (Peak Scientific, North Billerica, SAD)
- Hladnjak (+2 do +8 °C i -20 °C) (LTH, Škofja Loka, Slovenija)
- Hladnjak (4 °C i -20 °C) (Gorenje, Slovenija)
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ (Kambič, Slovenija)

- Inverzni mikroskop (Carl Zeiss, Njemačka)
- Komora za sterilni rad (Iskra PIO, Slovenija)
- Kupka za degaziranje (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Laboratorijski blender, model 7011HS (Waring Commercial, Connecticut, SAD)
- Laboratorijska centrifuga, model ROTOFIX 32 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- Laboratorijski pH metar (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Sustav za uparivanja tekućim dušikom sa kupelji, N-EVAP™ model 112 (Orgamotion Associates Inc., Berlin MA, SAD)
- Svjetlosni mikroskop (Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka)
- Tehnička vaga, preciznosti $\pm 0,001$ g (OHAUS, Parsippany, SAD)
- UHPLC-MS/MS: UHPLC *Agilent Technology 1290 Infinity II* i *Triple Quad LC/MS 6470* spektrometar masa opremljen s *Jet Stream Technology* sustavom za ionizaciju (AJS ESI) (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
 - Predkolona: Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 12 mm, 5 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
 - Kromatografska kolona:
 - Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
 - Poroshell 120 SB-C18 (4,6 x 150 mm, 2,7 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
 - Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 1,8 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
 - Luna C8 (4,6 x 100 mm; 3 μ m; Phenomenex, Torrance, SAD)
 - Kinetex C8 (4,6 x 100 mm, 2,6 μ m; Phenomenex, Torrance, SAD)
 - XBridge BEH C18 (4,6 x 150 mm, 2,5 μ m; Waters, Mildford, SAD)
 - UPLC Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m; Waters, Mildford, SAD)
- Uređaj za vakuumsku filtraciju – SPE ekstrakciju u čvrstoj fazi od 24 mjesta s pipama kojima se zaustavlja protok i manometrom (Supelco Inc, Bellefonte, SAD)
- Vodena kupelj s tresilicom, model 1083 (GFL, Burgwedel, Njemačka)
- Vrtložna miješalica, model MS2 Minishaker (IKA®-WERKE, Staufen, Njemačka)

3.1.5 Programi za upravljanje instrumentima ili obradu podataka

- MassHunter Workstation 10.0 software (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- InterVAL[®] Plus software version 3.4.0.4 (QuoData GmbH, Dresden, Njemačka)
- Excel[®] for Microsoft 365 MSO version 2110 (Microsoft[®], Washington, SAD)

3.1.6 Priprema radnih otopina i pufera

Za pripremu standardnih otopina korišteni su referenti materijali NSAID-ova visoke analitičke čistoće poznatih proizvođača (tablica 7). Bazne otopine NSAID-ova masene koncentracije 1 mg mL⁻¹ pripremane su otapanjem točno poznate mase svakog NSAID-a u metanolu, a čuvane su 2 godine u zamrzivaču pri -18 °C. Također u metanolu, iz baznih otopina NSAID-ova pripremane su otopine radnih standarda. Zbog značajnih razlika odabranih analita u vrijednostima najvećih dopuštenih količina (NDK) kada su definirane regulatorne granice odnosno u vrijednostima minimalnih zahtjeva učinkovitosti metode (MMPR) kao i najnižih mogućih koncentracija koje se mogu kvantitativno odrediti (LCL) kada regulatorne granice nisu definirane, analiti su podijeljeni u odgovarajuće koncentracijske skupine kako bi se dobile prikladne otopine za analizu mišića (tablica 8a) te mlijeka i uzoraka iz vodenog okoliša (tablica 8b). Radne otopine (S1 i S2) su čuvane 1 godinu u zamrzivaču pri -18 °C, dok radne otopine (S3) 1, 3 ili 6 mjeseci na 2-8 °C ovisno o koncentraciji i stabilnosti analita.

Tablica 8. Koncentracije radnih otopina mješavina standarda NSAID-ova za metodu određivanja NSAID-ova u a) mišiću i b) mlijeku.

a)

Analiti	Radna otopina (S1)	Radna otopina (S2)
	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
4-MAA	10 000	2000
TFA, VDP	5000	1000
4-OH-A, 4-FAA, MCA, PRX, SA	4000	800
4-AA, MLX	2000	400
FCX, FLU, IPAA	1000	200
5-FLUOH, IBP, MFA, OPB, PBZ	600	120
DC	500	100
NP, NFA, CPF	400	80
A, 4-AAA, 4-DMAA, FFA, KTP	200	40

b)

Analiti	Radna otopina	Radna otopina	Radna otopina	
	(S1) $\mu\text{g L}^{-1}$	(S2) $\mu\text{g L}^{-1}$	(S3) $\mu\text{g L}^{-1}$	
4-AA, 4-OH-A, 4-MAA, TFA	50 000	5 000	2 500	
4-AAA, 5-FLUOH	40 000	4 000	2 000	
MLX, VDP	15 000	1 500	750	MIX1
FCX, IBP, NFA	10 000	1 000	500	
SA	9 000	900	450	
A, 4-DMAA, 4-FAA, FLU, KTP, PRX	10 000	200	100	
CPF, FFA, IPAA, MFA, OPB, PBZ, NP	10 000	200	100	MIX2
MCA	50 000	1 000	500	
DC	500	10	5	

Izotopno obilježeni unutarnji standardi (interni standardi, IS), pripremani su na jednak način kao i standardne otopine u koncentracijama relevantnim za analite. Koncentracija radne otopine internog standarda jednaka je za sve ispitivane vrste uzorka, osim za IS DC- $^{13}\text{C}_6$, čija se koncentracija razlikuje ovisno o analiziranom uzorku (mišić ili mlijeko/voda) (tablica 9). Radne otopine su čuvane 3 ili 6 mjeseci na 2-8 °C ovisno o koncentraciji i stabilnosti analita.

Tablica 9. Koncentracije radnih otopina mješavina internih standarda NSAID-ova za metodu mišić i mlijeko (voda).

Analiti	Radna otopina (IS1)	Radna otopina (IS2)
	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$
4-MAA-D3	25 000	2500
4-AAA-D3, MCA- $^{13}\text{C}_6$, MLX-D3, TFA- $^{13}\text{C}_6$, VDP-D3	10 000	1000
5-FLUOH-D3, FCX-D6, IBP-D3	5000	500
4-AA-D3, FLU-D3, IPAA-D6, MFA- $^{13}\text{C}_6$, NFA- $^{13}\text{C}_6$, NP-D3, OPB- $^{13}\text{C}_6$, PBZ- $^{13}\text{C}_{12}$, PRX-D3	2500	250
A-D3, CPF-D3, 4-DMAA- $^{13}\text{C}_2$, FFA- $^{13}\text{C}_6$, KTP-D3	1000	100
SA- $^{13}\text{C}_6$	100 000	450
DC- $^{13}\text{C}_6$ -mišić	10 000	250
DC- $^{13}\text{C}_6$ -mlijeko/voda	10 000	20

Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4):

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

- 0,4 % otopina tripan-plavo:

Boja tripan-plavo	0,08g
PBS pufer	20,00 mL

3.1.7 Stanične linije

Za istraživanja opisana u ovom radu korištene su dvije stanične linije, humana (normalna) stanična linija HEK-293T (engl. *Human embryonic kidney*) i riblja stanična linija RTG-2 (engl. *Rainbow trout gonades*) dobivene iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica.

HEK-293T (ATCC® broj: CRL-3216) stanična linija dobivena je transfekcijom HEK-293 stanične linije u laboratoriju na Stanfordu, a izvorno potječu iz humanih embrionalnih stanica bubrega. RTG-2 (ATCC® broj: CCL-55™) stanična linija dobivena je iz primarne kulture gonada juvenilne pastrve. Korištene stanične linije su morfološki epitelne stanice adherentnog tipa koje rastu u monosloju u plastičnim T-bocama ravnih stijenci ili u pločama s jažicama na čiju površinu se stanice prihvaćaju.

3.2 Metode

3.2.1 Tekućinska kromatografija vezana s masenim spektrometrom

Razvoj, optimizacija i validacija analitičkih metoda sastoji se od niza koraka koji su standardizirani. Kao prvi korak razvoja metode je postupak optimizacije uvjeta masenog spektrometra koji uključuje:

- Odabir i podešavanje najintenzivnijeg molekularnog (prekursor) iona i dva specifična produkt iona za svaki pojedini analit NSAID-a; napon fragmentora prekursor iona i energiju kolizije odabranih produkt iona.

- Injektiranje se provodilo uvođenjem otopine analitičkog standarda pojedinog analita u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ uz pomoć restriksijske kapilare direktno u sustav protokom od 0,15 mL min⁻¹ i volumenom injektiranja od 2 µL kao i preko kolone pri visokom postotku organske faze (barem 70 %), protoku 0,3 mL min⁻¹ i volumenu injektiranja od 10 µL. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) provedena je u pozitivnom i negativnom načinu rada s istovremenom promjenom polariteta (engl. *Polarity switching*).
- Postupak snimanja je sljedeći:
 - Snimanje prekursor iona, u raspon m/z od 50 do 500 (*MS2 Scan*)
 - Snimanje odabranog prekursor iona, sada u odgovarajućem pozitivnom ili negativnom načinu snimanja, uz optimizaciju napona fragmentora, u rasponu od 40 do 200 V (*MS2 SIM*)
 - Snimanje produkt iona odabranog prekursor iona pri 4 različite energije kolizije (0, 10, 20, 40 eV) – odabir dva najintenzivnija produkt iona (*Product ion*)
 - Optimizacija energije kolizije za pojedini produkt, u rasponu od 0 do 60 eV (MRM)
- Podešavanje temperature (150 – 350 °C) i protoka plina u izvoru (5 – 11 L min⁻¹), tlaka plina u raspršivaču (*nebulizer*) (20 – 50 psi), temperature (200 – 400 °C) i protoka plina u omotaču (*sheath*) (5,5 – 12 L min⁻¹), napona kapilare (2 – 5 kV), napona mlaznice (*nozzle*) (0 – 2000 V), za utvrđivanje optimalnih uvjeta pri kojima se postiže najjači odziv za sve analite od interesa.

Snimanje cjelokupnih i pojedinačnih spektara masa za identifikaciju ciljanih analita provedeno je na Agilent ESI-QqQ spektrometru masa vezanim s UHPLC Infinity sustavom u načinu dinamičkog praćenja višestrukih reakcija (dMRM) uz pozitivnu i negativnu ESI ionizaciju. dMRM grupira MRM-ove u vremenske okvire zadržavanja umjesto u vremenske segmente. Na taj način, ioni analita se prate samo kada se očekuje da će eluirati, čime se smanjuje broj istodobnih prijelaza iona, povećava vrijeme zadržavanja, a samim time poboljšava učinkovitost analize. Za razvoj dMRM metode, za svaki analit potrebna su dva specifična fragmenta tj. produkt iona, pri čemu je najintenzivniji korišten za kvantifikaciju (kvantifikator), a drugi kao dodatna kontrola za potvrdu (kvalifikator).

Za kromatografsko razdvajanje odabranih NSAID-ova korištena je UHPLC metoda, a obzirom na njihovu kemijsku raznolikost, ispitano je nekoliko kromatografskih kolona obrnute

faze C18 i C8 različitih proizvođača (Kromatografske kolone – Poglavlje 3.1.4. ovog rada). U procesu optimizacije, ispitan je utjecaj različitih pokretnih faza, koje su se sastojale od metanola ili acetonitrila kao organske faze te ultračiste vode kao vodene faze s različitim aditivima kao što su mravlja kiselina, octena kiselina, amonijev formijat ili acetat, kako bi se postigao optimalan signal i oblik pika. Drugi parametri poput brzine protoka, volumena injektiranja, temperature kolone također su optimizirani.

Za razvoj metode korišteni su uzorci homogeniziranog mišića i mlijeka, različitih životinjskih vrsta, za koje je potvrđeno da ne sadrže odabrane analite. U takve „slijepe“ uzorke odgovarajuće matrice dodan je standard smjese analita na samom početku pripreme uzoraka tj. prije samog postupka ekstrakcije koji se, zbog složenosti odabranih matrica uzorka, u pojedinim koracima malo razlikuje.

3.2.1.1 Postupak pripreme uzoraka mlijeka i vode

Za analizu mlijeka (vode), 2 g uzorka stavljeno je u Falcon epruvetu od 15 mL. U uzorak je zatim dodano 1 mL 0,01 M otopine askorbinske kiseline i 10 µL svježe pripremljene β-glukuronidaza/arilsulfataze za hidrolizu. Smjesa je potom dobro izmiješana i stavljena na inkubaciju u gibajuću vodenu kupelj pri 37 °C na laganoj brzini tijekom 60 minuta. Kako bi se zaustavila reakcija hidrolize, uzorci su stavljeni pod mlaz hladne vode. Za taloženje proteina i ekstrakciju spojeva od interesa, dodano je 3 mL acetonitrila i 0,5 mL otopine natrijevog klorida te je smjesa centrifugirana tijekom 10 minuta na 4 000 o/min pri 4 °C. U dobiveni supernatant, prethodno prebačen u novu Falcon epruvetu od 15 mL, dodano je 1 mL acetonitrila te je smjesa, nakon miješanja na vrtložnoj miješalici, ponovno centrifugirana (10 minuta, 4 000 o/min, 4 °C). Dobiveni supernatant prebačen je u Falcon epruvetu od 50 mL u koju je dodano 5 mL 0,01 M askorbinske kiseline, a vrijednost pH je pomoću 1 M klorovodične kiseline prilagođena na 3.

SPE kolona (Evolute® Express ABN, 100 mg, 3 mL) se najprije kondicionirala s 3 mL metanola, a zatim s 3 mL 0,01 M askorbinske kiseline, nakon čega je kroz nju propušten cijeli volumen uzorka. Kolone su isprane s 1 mL metanol:voda 1:9 (v/v) te osušene primjenom vakuuma kroz najmanje 15 minuta. Analiti su eluirani dva puta s 1,5 mL heksan:dietil-eter:acetonitril:metanol 45:45:7:3 (v/v) u Falcon epruvetu od 15 mL. Eluat je otparen pomoću blage struje dušika i pri 45 °C. Suhi ostatak otopljen je 150 µL pokretne faze A i 100 µL metanola. Nakon što je dobro promiješan na vrtložnoj miješalici, radi boljeg otapanja suhog ostatka, uzorak je stavljen kroz 5 minuta u ultrazvučnu kupelj. Potom je uzorak prebačen u mikroeprevete s poklopcem i centrifugiran pri 15 200 o/min, 10 minuta i 4 °C. Bistri supernatant prebačen je u bočice za instrument i podvrgnut daljnjoj analizi na UHPLC-MS sustavu.

3.2.1.2 Postupak pripreme uzoraka mišićnog tkiva

Za analizu mišića, 2 g homogeniziranog uzorka odvagano je u Falcon epruvetu od 50 mL. Hidroliza uzoraka, uz dodatak 6 mL pufera natrijeva acetata i 70 μ L otopine β -glukuronidaza/arilsulfataze, izvedena je u istim uvjetima kao i kod uzoraka mlijeka. Postupak ekstrakcije analita provoden je u tri koraka, na način da je u prvom koraku dodano 5 mL acetonitrila te nakon miješanja na vrtložnoj miješalici i centrifugiranja na 4 500 o/min, 10 min pri sobnoj temperaturi, dobiveni supernatant je prebačen u novu Falcon epruvetu od 50 mL. Druga dva koraka slijede istu proceduru, ali uz 5 mL acetonitrila na preostali ostatak uzorka dodan je i 1 mL natrijevog acetata, a dobiveni supernatant se prebaci u gore navedenu Falcon epruvetu. Za uklanjanje lipida, odmaščivanje supernatanta provedeno je dva puta dodavanjem 5 mL n-heksana, nakon čega je uslijedilo miješanje na rotirajućoj miješalici (10 minuta, F1 način rada, brzina 75) i centrifugiranje 3 000 o/min, 5 min pri sobnoj temperaturi. Sloj n-heksana je uklonjen, a tekući sloj ekstrakta uparen pomoću blage struje dušika pri 50 °C do volumena od 9 mL. Nakon što je dodano 5 mL 0,02 M askorbinske kiseline, pH je podešen na 2,9 pomoću 1 M kloridne kiseline.

Kroz SPE kolonu (Discovery[®] DSC-18, 500 mg, 3 mL), prethodno kondicioniranu s 2 mL 0,02 M askorbinske kiseline, propušten je cijeli ekstrakt uzorka. Kolona je isprana s 2 mL 0,02 M askorbinske kiseline i 2 mL vode te osušena primjenom vakuuma kroz najmanje 15 minuta. Analiti su eluirani s 2,5 mL heksan:dietil-eter 1:1 (v/v) i 5 mL acetonitril:metanol 9:1 (v/v). Eluat je otparen pomoću blage struje dušika pri 45 °C. Suhi ostatak otopljen je u 150 μ L pokretne faze A i 100 μ L metanola. Nakon što je dobro promiješan na vrtložnoj miješalici, radi boljeg otapanja suhog ostatka, uzorak je stavljen kroz 5 minuta u ultrazvučnu kupelj. Potom je uzorak prebačen u mikroeprevete s poklopcem i centrifugiran pri 15 200 o/min, 10 minuta i 4 °C. Bistri supernatant prebačen je u bočice za instrument i podvrgnut daljnjoj analizi na UHPLC-MS sustavu.

3.2.2 Validacija razvijene UHPLC-MS/MS metode za određivanje NSAID-ova

Razvijena metoda je validirana u skladu s Odlukom Komisije br. 2002/657/EZ uzimajući u obzir relevantne NDK vrijednosti ili validacijske razine (VR) (za analite s MMPR i LCL) (EZ, 2002). Značajke učinkovitosti ispitivane prilikom validacije metode su selektivnost, linearnost, granična koncentracija (količina) analita ($CC\alpha$), sposobnost dokazivanja ($CC\beta$), preciznosti (ponovljivost (RSD_F) i unutar-laboratorijska obnovljivost (RSD_{WR})), točnost (iskorištenje),

mjerna nesigurnost i utjecaj matrice. Iako validirana prije početka primjene aktualne Uredbe 2021/808, metoda odgovara zadanim zahtjevima (EZ, 2021).

Validacija metode provedena je pomoću alternativne tzv. matrica-sveobuhvatne interne validacije (engl. *In-house*) primjenom programskog paketa InterVAL[®] Plus, a prema zahtjevima Odluke Komisije br. 2002/657/EZ. Radi se o faktorskom dizajnu temeljenom na ortogonalnom eksperimentalnom planu koji omogućuje procjenu utjecaja nekoliko faktora s minimalnim brojem pokusa. Na temelju unesenih rezultata, program automatskim generiranim protokolom izračunava parametre validacije kao što su $CC\alpha$, $CC\beta$, preciznost, iskorištenje uz kalibracijsku krivulju i interval predviđanja. Osim navedenog, uz detalje o mjernoj nesigurnosti (engl. *Measurement uncertainty*, MU) i utjecaju pojedinih faktora, koji su izračunati za svaki analit kao funkcija koncentracije, dobivaju se potpune informacije i o robusnosti same metode.

3.2.2.1 Specifičnost/selektivnost

Specifičnost (jedan analit) odnosno selektivnost (više analita koji pri istovremenom određivanju ne smetaju jedan drugom) metode ispitana je analizom i usporedbom slijepih uzoraka mlijeka i mišića (20 slijepih uzoraka raznih životinjskih vrsta) s obogaćenim uzorcima matrice kako bi se provjerila prisutnost mogućih interferirajućih spojeva koji koeluiraju u istom vremenu zadržavanja kao i ciljani analiti (uvjet odstupanja $\pm 2,5$ %) (EZ, 2002).

3.2.2.2 Linearnost

Linearnost metode podrazumijeva mjerno područje unutar kojeg su rezultati (odziv detektora) izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Analizom standardnih otopina analita pri različitim koncentracijama (najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja) crta se kalibracijska krivulja (pravac), grafički prikaz ovisnosti analitičkog signala o koncentraciji analita. Kalibracijska krivulja u pet točaka (uzimajući u obzir NDK ili VR vrijednost kao centralnu točku, za svaki pojedini analit) pripremljena je dodatkom prikladnog volumena standarda u matricu koja ne sadrži NSAID-ove prije postupka ekstrakcije. Matematički se metodom linearne regresije, preko omjera površina kromatografskih pikova analita i internog standarda u ovisnosti o inicijalnoj masi injektiranog analita, izrazi jednadžba pravca ($y = ax + b$) i izračuna koeficijent determinacije (R^2), za koji je uobičajeno postavljen kriterij $\geq 0,99$. Nagib pravca (a) je parametar koji izravno ukazuje na osjetljivost metode, a odsječak pravca (b) može ukazivati na sustavnu pogrešku (Lazarić, 2012).

3.2.2.3 Preciznost, $CC\alpha$, $CC\beta$, iskorištenje

Kako bi se procijenila preciznost metode kao ponovljivost (RSD_r) i unutar-laboratorijska obnovljivost (RSD_{wr}), točnost (iskorištenje), $CC\alpha$ i $CC\beta$ pod propisanim uvjetima, slijepi uzorci matrice su obogaćeni na odgovarajuće koncentracijske razine: 0,5 NDK, 1 NDK i 1,5 NDK za odobrene tvari, te na 1 VR, 2 VR i 3 VR za MMPR i tvari za koje nisu definirane granice. Ponovljivost je preciznost pod uvjetima ponovljivosti - isti analitičar, uzorak i instrument, kratko vremensko razdoblje. Unutar-laboratorijska obnovljivost je preciznost koja se postiže unutar istog laboratorija u duljem vremenskom periodu uz očekivane promjene – različiti analitičari, oprema i uzorak. Prihvaćena vrijednost RSD-a je $\leq 20\%$.

$CC\alpha$ je definirana kao granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost α pogreške, da je uzorak nesukladan. α pogreška je vjerojatnost da su dobiveni lažno pozitivni rezultati te za zabranjene tvari ne smije prelaziti 1% dok za one kojima je određena najviša dopuštena koncentracija 5% (EZ, 2002).

$$CC\alpha = C_{NDK} + 1.64 \times SD_{NDK} \quad (3.1)$$

gdje je SD_{NDK} standardna devijacija reproducibilnosti pri NDK vrijednosti, ili

$$CC\alpha_{VR} = C_{VR} + 2,33 \times SD_{CVR} \quad (3.2)$$

gdje je SD_{CVR} standardna devijacija reproducibilnosti pri VR vrijednosti.

$CC\beta$ je najmanji mogući udio tvari koji se može dokazati, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost β pogreške. β pogreška je vjerojatnost da su dobiveni lažno negativni rezultati te je ograničena na 5%. Za tvari za koje nije određena dopuštena količina, $CC\beta$ je najniža koncentracija koja se može dokazati sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$ u uzorku. Za tvari kojima je određena dopuštena koncentracija/količina, $CC\beta$ je ona koncentracija pri kojoj se mogu detektirati koncentracije na dozvoljenoj granici, sa statističkom sigurnošću $1 - \beta$ (EZ, 2002).

$$CC\beta = CC_{\alpha,0} + 1.64 \times SD_{CC_{\alpha,0}} \quad (3.3)$$

gdje je $SD_{CC_{\alpha,0}}$ standardna devijacija unutar-laboratorijske obnovljivosti pri $CC_{\alpha,0}$.

Točnost metode može se opisati kao stupanj podudaranja između srednje vrijednosti dobivenih rezultata i općeprihvaćene referentne vrijednosti. Ispitana je na tri koncentracijske razine, minimalno 5 ponavljanja, u odnosu na referentnu vrijednost te izračunom iskorištenja. Ako je dostupan certificiran referentni materijal ili analizom slijepih uzoraka matrica koje su obogaćene određenom koncentracijom analita od interesa, odstupanje iskorištenja može biti u rasponu vrijednosti prikazanih u tablici 10.

Tablica 10. Prihvatljiv raspon iskorištenja ovisno o koncentraciji (Pravilnik, 2005).

Koncentracija	Interval
$\leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	50% do 120%
$> 1 \mu\text{g/kg}$ do $10 \mu\text{g kg}^{-1}$	70% do 110%
$\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	80% do 110%

3.2.2.4 Utjecaj matrice

Utjecaj matrice određen je usporedbom rezultata dobivenih analizom standardne otopine svih analita pripremljene u otapalu odnosno u slijepoj matrici uzorka obogaćenog na koncentraciju NDK/VR, kako bi se procijenio korak pripreme uzoraka te korak detekcije na instrumentu. U slijepe uzorke ispitivane matrice ekstrahirane prema postupku pripreme uzoraka opisanom u Poglavlju 3.2.1.1 i 3.2.1.2 dodana je standardna otopina analita neposredno prije UHPLC-MS/MS analize. Standardna otopina u istoj koncentraciji pripremljena je i u čistom otapalu te su zajedno analizirane. Utjecaj matrice (engl. *Matrix effect*, ME), u postotku, računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{ME (\%)} = (A_{\text{matrica}}/A_{\text{standard}}) \times 100 \quad (3.4)$$

gdje je A_{matrica} srednja površina analita u obogaćenom uzorku, a A_{standard} srednja površina analita u otapalu.

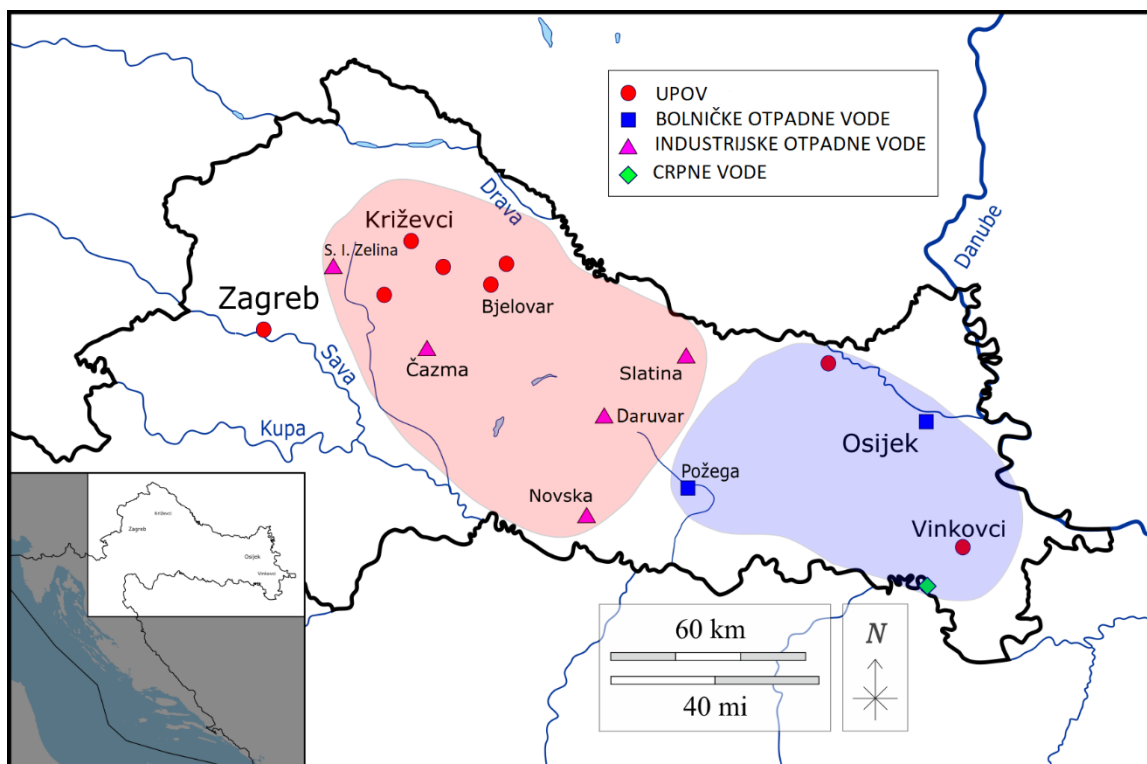
Smanjenje/pojačanje ionskog signala (engl. *Suppression/enhancement*, SSE), izraženo je razlikom između dobivenog ME i 100 % (vrijednost bez uočenog ME) (Freitas i sur., 2020) prema jednadžbi:

$$\text{SSE (\%)} = 100 - \text{ME} \quad (3.5)$$

3.2.3 Određivanje NSAID-ova u realnim uzorcima

Za određivanje pojavnosti 27 odabranih NSAID-ova u uzorcima mišićnoga tkiva i mlijeka te vodenog okoliša prikupljeni su uzorci tijekom 2019. i 2020. godine. U skladu s Nacionalnim planom kontrole ostataka Republike Hrvatske (RH), prikupljeno je ukupno 449 uzoraka mišića ($n = 181$) i mlijeka ($n = 268$) različitih životinjskih vrsta iz svih hrvatskih županija. Uzorci vodenog okoliša uzorkovani su na različitim lokacijama na području kontinentalne RH, uključujući komunalne uređaje za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) (Zagrebačke otpadne vode d.o.o. (ZOV), Vinkovački vodovod i kanalizacija, UPOV Križevci, Bjelovar, Vrbovec, Veliko Trojstvo i Sveti Ivan Žabno), industrijske otpadne vode (Čazma,

Daruvar, Novska, Slatina i Sveti Ivan Zelina), bolničke otpadne vode (Klinički bolnički centar (KBC) Osijek i Požega) kao i crpne vode (Županja), čija se izlazna otpadna voda ispušta u dvije najduže rijeke RH, Savu i Dravu, koje su sa svojim pritocima glavne odvodne rijeke u sjeverozapadnoj RH i obje pritoke Dunava (slika 6). Dio uzoraka pristigao je i početkom 2021. godine, a prikupljeno je ukupno 96 uzoraka vodenog okoliša. Uzorkovanje je provedeno od strane ovlaštenih veterinarskih inspektora i od strane ovlaštenog osoblja Zagrebačkih otpadnih voda u skladu sa svim zahtjevima i propisima uzorkovanja. Prikupljeni uzorci su dio rutinske kontrole prisutnosti veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP) u uzorcima hrane životinjskog podrijetla Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI) te biološke i kemijske kontrole uzoraka vode ZOV-a, Veterinarskog instituta Križevci (svijetlo crveno označeno područje na karti slike 6) i Veterinarskog instituta Vinkovci (plavo označeno područje na karti slike 6). Uzorci otpadnih voda uzorkovani su kao 24-satni kompozitni uzorci na ulazu i izlazu UPOV-a, dok su industrijske vode pojedinačno, trenutno uzorkovani uzorci. Po dolasku u laboratorij uzorci mlijeka, homogeniziranog mišića i filtrirani uzorci vode ili su analizirani odmah ili su čuvani u zamrzivaču na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.



Slika 6. Karta RH s mjestima uzorkovanja uzoraka iz okolišnih voda.

Prikupljeni uzorci su pripremljeni i analizirani prema prethodno opisanoj, razvijenoj i validiranoj metodi. Identifikacija i kvantifikacija analita provedena je u dMRM načinu rada (snimanjem jednog prekursor iona s dvije tranzicije) pri čemu su vremena zadržavanja analita u

uzorku morala odgovarati vremenima zadržavanja (tolerancija $\pm 2,5$ %) u otopini standarda te je omjer iona analita (kvantifikacijskog i potvrdnog iona) morao odgovarati iznosu ± 30 % omjera iona u standardu analita u istom mjerenju, kako bi se zadovoljili zahtjevi Odluke Komisije br. 2002/657/EZ. Za kvantitativnu procjenu potrebno je rezultate proračunati s kalibracijske krivulje matrice uzorka, čija primjena isključuje potrebu izražavanja rezultata uz korekciju iskorištenja. Kalibracijska krivulja je grafički prikaz odnosa relativnog odgovora (engl. *Relative response*) izmjerene površine analita i odgovarajućeg internog standarda i teoretske koncentracije kalibracijske točke. Za koncentracije analita izvan kalibracijskog područja potrebno je izvesti proširenje krivulje umjeravanja kako bi uvjeti lineariteta bili zadovoljeni ili razrijediti uzorak u zadano područje linearnosti. Kalibracijska krivulja uključuje i točku T(0,0). Program (*MassHunter Workstation 10.0*) preračunava koncentracije ispitivanih uzoraka prema dobivenoj krivulji.

Na temelju dobivenih rezultata, sukladnost analiziranih uzoraka provedena je usporedbom s NDK vrijednosti NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla u skladu Uredbom (EZ) br. 37/2010 odnosno dobivenoj CC α vrijednosti (EZ, 2010).

3.2.4 Metode rada za određivanje *in vitro* toksičnosti NSAID-ova primjenom kultura životinjskih stanica

3.2.4.1 Uzgoj staničnih linija

Uzgoj HEK-293T stanica proveden je u inkubatoru s reguliranom atmosferom (95 % zraka i 5% CO₂) uz optimalnu temperaturu za uzgoj od 37 °C. Za uzgoj ovih stanica korišten je medij DMEM uz dodatak 10 % (v/v) FBS. Za razliku od HEK-293T stanica, uzgoj RTG-2 stanica proveden je na sobnoj temperaturi (22 – 26 °C) u mediju EMEM uz dodatak 10 % (v/v) FBS. Stanice su održavane u T-bocama ili Petrijevim zdjelicama za uzgoj kultura stanica. Stanice su svakodnevno promatrane pod inverznim mikroskopom kako bi se pratila brojnost stanica, njihova morfologija i pričvršćenost za podlogu. Kada je prekrivenost podloge prešla otprilike 80%, stanice se precjepljuju kako ne bi došlo do inhibicije njihova rasta uslijed nedostatka površine za rast ili tzv. kontaktne inhibicije kao i kada se potroše hranjive tvari u mediju ili nakupe toksični metaboliti.

3.2.4.2 Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Za utvrđivanje broja živih stanica korištena je metoda tripan-plavo (0,4 % m/v). Iz Petrijeve zdjelice u kojoj je uzgajana i održavana biomasa stanica, uklonjen je hranjivi medij, a

površina za uzgoj isprana sterilnim PBS puferom. Nakon dodatka 1 mL tripsina, posuda sa stanicama je stavljena u inkubator na oko 5 minuta kako bi se djelovanjem tripsina stanice odvojile od površine za uzgoj. Uspješnost odvajanja stanica praćen je inverznim mikroskopom. Odvojenim stanicama dodan je 1 mL medija sa serumom za inaktivaciju tripsina. Nakon što su stanice resuspendirane, uzeto je 20 μL alikvota suspenzije stanica i 20 μL boje tripan-plavo. Zatim je 20 μL tako pripremljene suspenzije stanica nanoseno u Neubauerovu komoricu za brojanje. Mrtve stanice će se obojati u plavo zbog oštećene membrane koja je propusna te ih tako razlikujemo od živih stanica koje aktivno izbacuju boju iz stanice te ostaju neobojene. Komorica se dijeli na četiri velika kvadrata, a u svakom velikom kvadratu se nalazi 16 malih kvadratića. Za svaki uzorak izračunat je broj stanica po mL suspenzije prema jednadžbi:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \quad (3.6)$$

3.2.4.3 *In vitro* ispitivanje toksičnosti NSAID-ova

Nakon određivanja ukupnog broja stanica izračunat je potreban volumen za naciepljivanje stanica u ploču s 96 jažica za svaku staničnu liniju, pri čemu je njihova početna koncentracija iznosila oko 3×10^4 stanica mL^{-1} . U svaku jažicu naciepljeno je 100 μL suspenzije stanica, koje su dalje inkubirane 24 sata, a nakon toga tretirane NSAID-ovima u koncentracijama od 50 μM , 100 μM i 250 μM (minimalno 4 paralele u 3 ponavljanja). Nakon što su stanice inkubirane 72 sata, prema uputama proizvođača proveden je CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation test ili skraćeno MTS kolorimetrijska metoda za određivanje vijabilnosti stanica. Po isteku inkubacije, stanicama je uklonjen medij s NSAID-ovima te u je svaku jažicu dodan svježi medij s MTS reagensom (10 μL MTS reagensa u 100 μL medija za uzgoj) te su ponovno inkubirane 3 sata. Broj živih stanica proporcionalan je intenzitetu obojenja medija (što je obojenje jače, više je živih stanica). Intenzitet obojenja određuje se spektrofotometrijski primjenom čitača ploča pri 492 nm. Kontrolnim stanicama je dodan odgovarajući volumen metanola, budući da je to otapalo korišteno za pripremu standardnih otopina NSAID-ova. Postotak preživljenja stanica izračunat je kao omjer apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica prema jednadžbi:

$$\text{Preživljenje (\%)} = (A_{\text{uzorak}}/A_{\text{kontrola}}) \times 100 \quad (3.7)$$

Prikazani rezultati su srednje vrijednosti triju mjerenja iskazana zajedno sa standardnom devijacijom (\pm S.D.). Ako je u ispitivanom rasponu koncentracija, pri određivanju preživljenja

stanica, odnosno citotoksičnog učinka NSAID-ova postignuta 50 %-tna inhibicija rasta stanica, eksperimentalni podaci su aproksimirani krivuljom koja ih najbolje opisuje. Regresijskom analizom odabrana je ona krivulja koja najmanje odstupa od eksperimentalnih podataka tj. ona čija je vrijednost koeficijenta determinacije R^2 bliža 1. Rješavanjem pripadajuće jednačbe izračunata je IC_{50} vrijednost, koja definira onu koncentraciju ispitivane tvari koja inhibira rast 50 % stanica.

4. REZULTATI

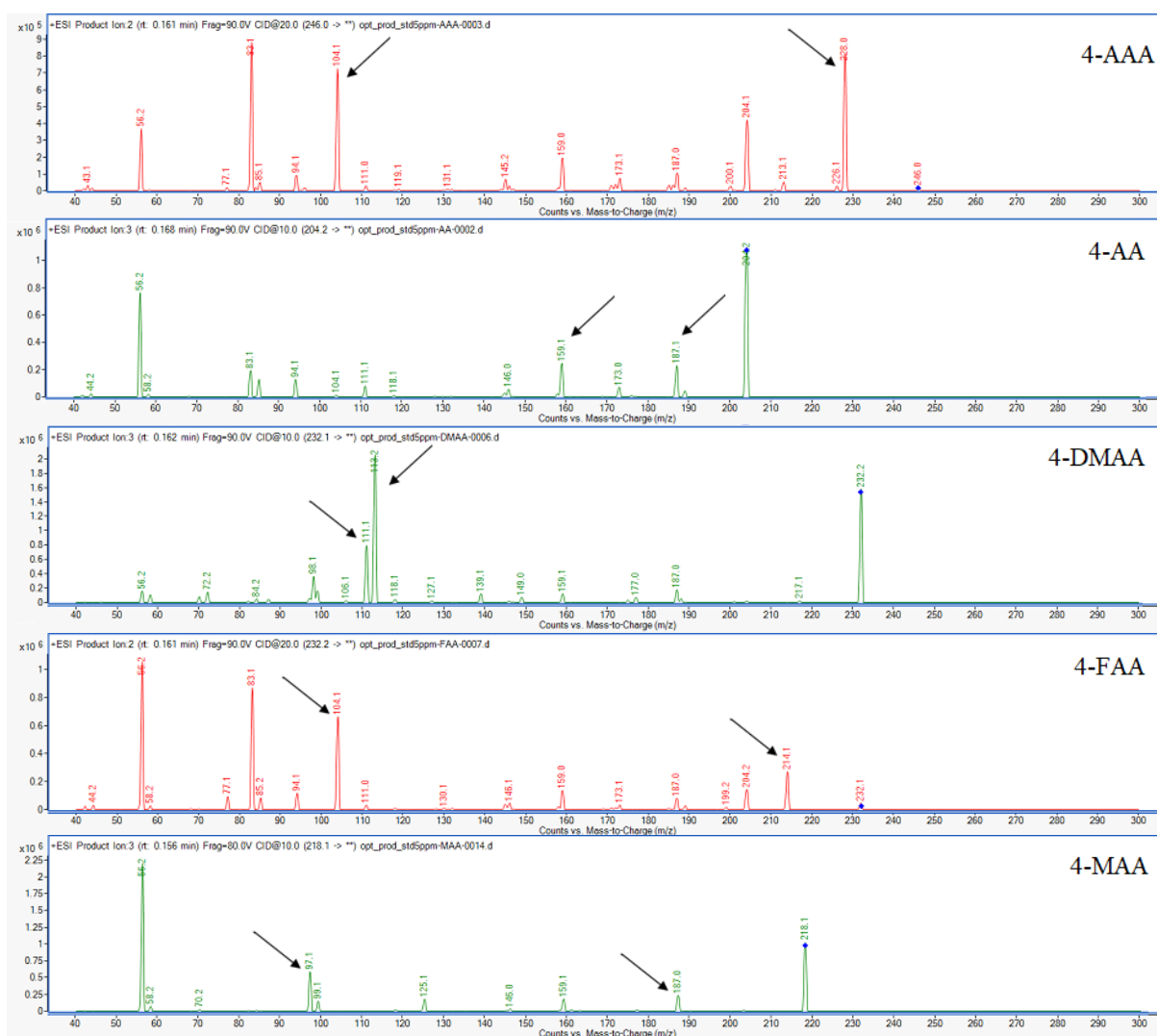
Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije prikazani su u tri dijela: (i) razvoj metode za određivanje 27 odabranih nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) primjenom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti povezane s masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS) u biološkim uzorcima i okolišnim uzorcima vode, postupak koji uz optimizaciju razvijene metode uključuje njezinu validaciju kako bi se dobili podaci o značajkama učinkovitosti metode, pri odabiru NSAID-ova vodilo se računa o trenutnim zahtjevima popisa „minimalno potrebnih“ kao i „preporučenih“ spojeva koje je izdao referentni laboratorij EURL-BVL, s uključenih nekoliko „neobveznih“ spojeva, te o fizikalno kemijskim svojstvima analita; (ii) primjena razvijene i validirane UHPLC-MS/MS metode za određivanje 27 NSAID-ova u realnim uzorcima životinjskog podrijetla (mišićno tkivo i mlijeko) te u uzorcima vode iz okoliša i analiza njihove pojavnosti tijekom 2019. i 2020. godine kao i procjena rizika od onečišćenja kopnenih voda; (iii) određivanje potencijalne citotoksičnosti odabranih NSAID-ova na staničnoj liniji ribe (RTG-2) i ljudi (HEK-293T) te procjena njihovog toksikološkog i ekotoksikološkog rizika kojeg predstavljaju za ekosustav i posljedično za ljude.

4.1 Razvoj i validacija UHPLC-MS/MS metode za određivanje ostataka NSAID-ova

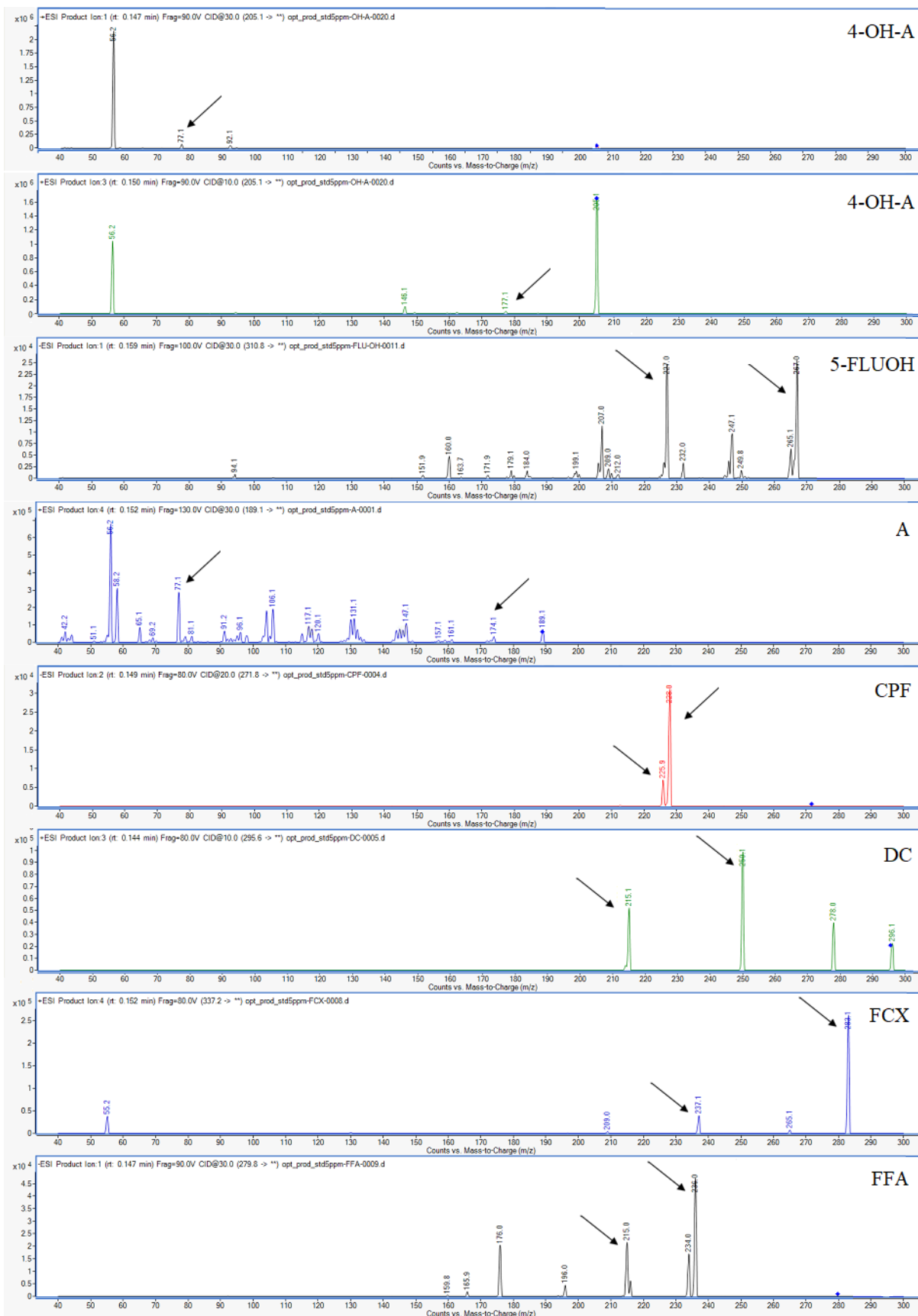
4.1.1 Optimizacija instrumentalnih uvjeta

S ciljem postizanja visoke selektivnosti i preciznosti UHPLC-MS/MS instrumenta za identifikaciju i kvantifikaciju odabranih 27 NSAID-ova provedeno je snimanje cjelokupnih spektara masa (*MS2 Scan*) pojedinog NSAID-a u pozitivnom i negativnom načinu rada (ionizacija elektroraspršenjem, ESI) kako bi se dobio najintenzivniji ion tj. molekularni (prekursor) ion traženog analita te njegov optimalni napon fragmentora (*MS2 SIM*). Daljnjom fragmentacijom prekursor iona na nekoliko produkt iona i snimanjem masenih fragmenata (*Product ion*) odabrana su dva najzastupljenija i najstabilnija produkt iona, jedan kao kvantifikacijski, a drugi manjeg odziva kao potvrdni (kvalifikacijski) ion, pri njihovim optimalnim energijama kolizije (praćenjem višestrukih reakcija, MRM). U pozitivnoj ESI ionizaciji u spektrima masa uglavnom se vide $[M+H]^+$ adukti, osim kod vedaprofena (VDP) gdje je prisutan amonijev adukt $[M+NH_4]^+$, dok se u negativnoj ESI ionizaciji ioni formiraju gubitkom jednog vodikovog atoma $[M-H]^-$. Za razvoj metode, na temelju dobivenih rezultata, za svaki analit osim za ibuprofen (IBP*), uz prekursor ion odabrane su dvije MRM tranzicije potrebne za kvantifikaciju, a snimanje je provedno u načinu dinamičkog praćenja višestrukih

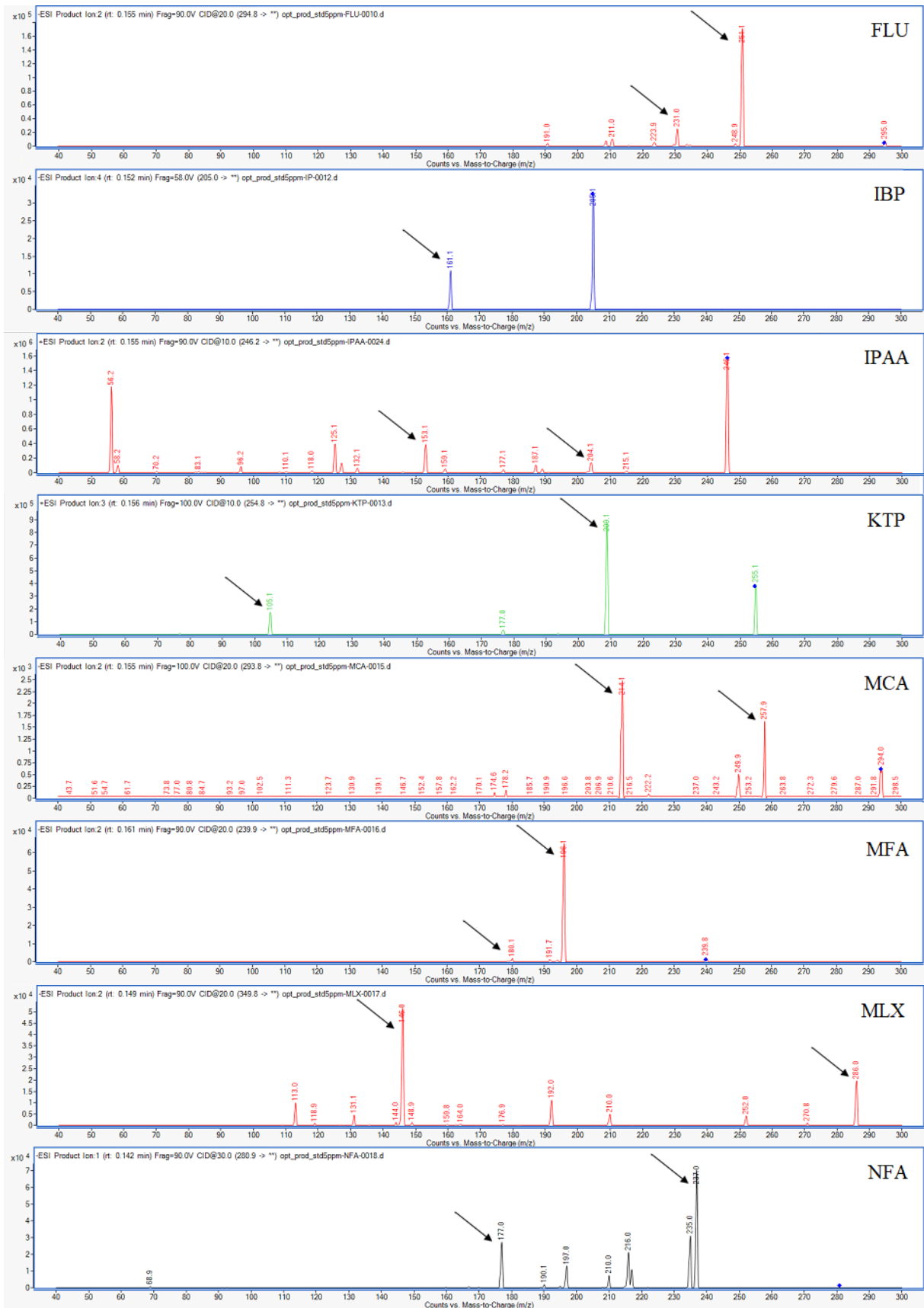
reakcija (dMRM). Uz optimizaciju parametara vezanih uz analit, kao što su napon fragmentora, energija kolizije, kako bi se povećala brzina kretanja iona u kolizijskoj ćeliji, optimiziran je i napon ubrzanja kolizijske (sudarne) ćelije (engl. *Cell acceleration voltage, CAV*) koji utječe na brzinu pomicanja dobivenog produkt iona iz kolizijske ćelije i na taj način sprječava „unakrsne“ sudare produkt iona. Kao kolizijski plin korišten je dušik. Maseni spektri odabranih NSAID-ova prikazani su na slici 7. MRM tranzicije za kvantifikaciju i potvrdu te optimizirani MS/MS parametri navedeni su u tablici 11.



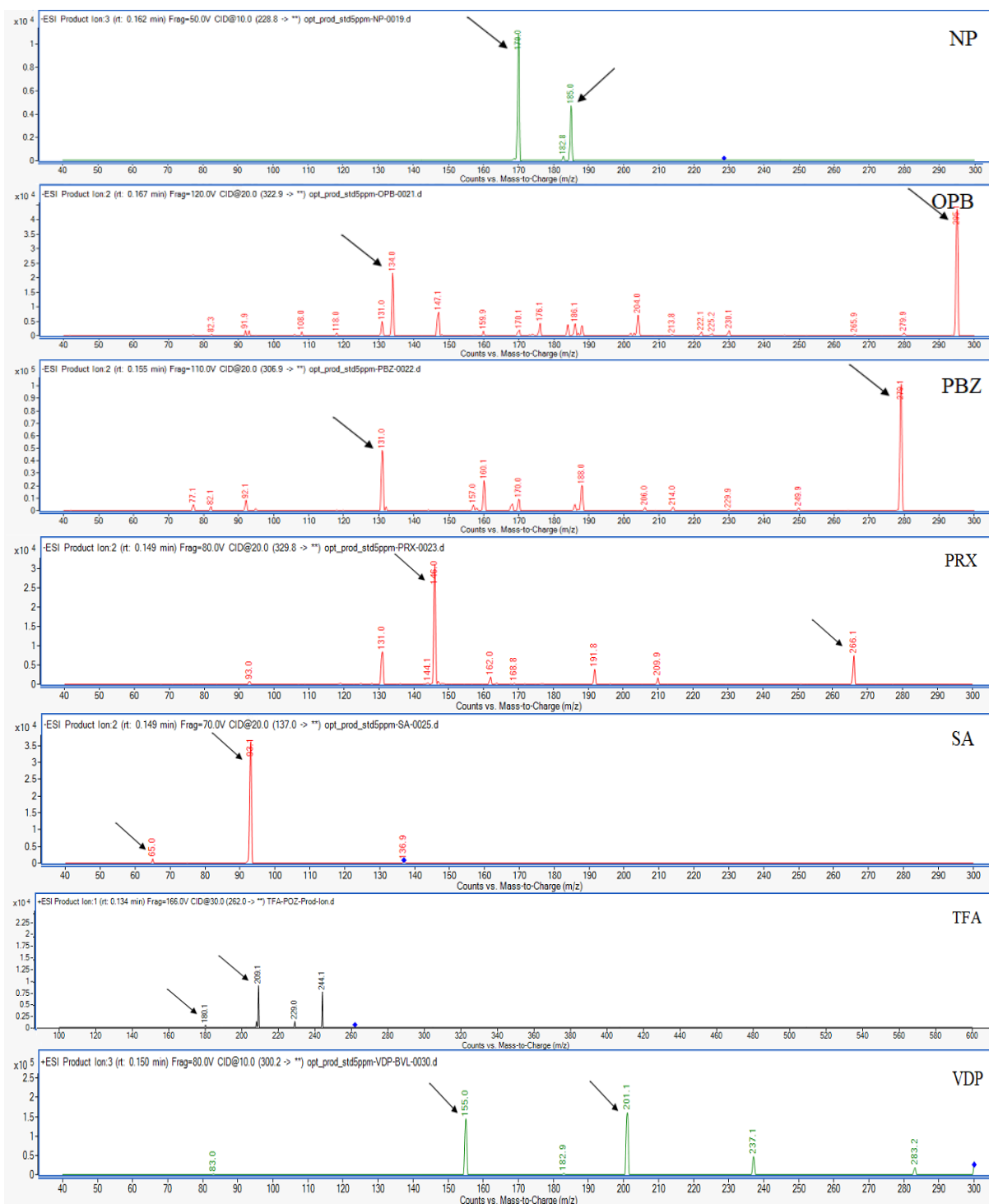
Slika 7. Spektri masa molekuskog (prekursor) iona (plavo označen) s produkt ionima (strelice) za analite 27 odabranih NSAID-ova.



Slika 7. (nastavak)



Slika 7. (nastavak)



Slika 7. (nastavak)

Tablica 11. Optimizirani MRM parametri za odabrane NSAID-ove. Produkt ion za kvantifikaciju je podcrtan.

NSAID	KRATICA	ISTD	RT (min)	Molekularna formula	Molekulska masa (g mol ⁻¹)	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Fragmentor (V)	Energija kolizije (eV)	CAV (V)	
<i>„BAZIČNI NSAID-ovi“</i>											
4-acetilaminoantipirin	4-AAA	4-AAA-D3	2,480	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245,2	[M+H] ⁺	246,0	<u>228,1/104,0</u>	90	12/24	5/5
4-aminoantipirin	4-AA	4-AA-D3	3,280	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	203,2	[M+H] ⁺	204,2	<u>187,1/159,1</u>	90	10/10	5/1
4-dimetilaminoantipirin	4-DMAA	DMAA- ¹³ C ₂	4,041	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O	231,3	[M+H] ⁺	232,1	<u>113,1/111,1</u>	90	12/14	5/1
4-formilaminoantipirin	4-FAA	4-AAA-D3	2,408	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	231,2	[M+H] ⁺	232,2	<u>214,2/104,1</u>	90	12/22	1/3
4-metilaminoantipirin	4-MAA	4-MAA-D3	3,580	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O	217,2	[M+H] ⁺	218,1	<u>187,0/97,1</u>	80	10/12	5/1
4-hidroksiantipirin	4-OH-A	A-D3	3,622	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,2	[M+H] ⁺	189,1	<u>177,1/77,1</u>	90	10/30	5/3
Antipirin	A	A-D3	3,101	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	188,2	[M+H] ⁺	205,1	<u>174,1/77,1</u>	130	20/52	5/3
Isopropilaminoantipirin	IPAA	IPAA-D6	4,577	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O	245,3	[M+H] ⁺	246,2	<u>204,1/153,1</u>	90	10/10	5/5
<i>„KISELI NSAID-ovi“</i>											
Diklofenak	DC	DC- ¹³ C ₆	6,689	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ₂	295,0	[M+H] ⁺	296,1	<u>250,0/215,0</u>	80	10/20	-3/-3
Fenilbutazon	PBZ	PBZ- ¹³ C ₁₂	6,187	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	308,3	[M-H] ⁻	306,9	<u>279,1/131,0</u>	110	-18/-24	3/1
Firokoksib	FCX	FCX-D6	5,219	C ₁₇ H ₂₀ O ₅ S	336,4	[M+H] ⁺	337,2	<u>283,1/237,1</u>	80	6/20	3/3
Flufenaminska kiselina	FFA	FFA- ¹³ C ₆	7,113	C ₁₄ H ₁₀ F ₃ N ₂ O ₂	281,2	[M-H] ⁻	280,0	<u>236,0/215,0</u>	90	-18/-34	-1/-1
Fluniksini	FLU	FLU-D3	5,961	C ₁₄ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂	296,2	[M-H] ⁻	295,0	<u>251,1/231,0</u>	90	-18/-26	-1/-1
5-hidroksi fluniksini	5-FLUOH	5-FLUOH-D3	5,396	C ₁₄ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₃	312,1	[M-H] ⁻	310,8	<u>267,0/227,0</u>	100	-16/-28	-5/-5
Ibuprofen	IBP*	IBP-D3	7,109	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,2	[M-H] ⁻	205,0	<u>161,1/159,0</u>	56	-2/-4	-3/-3
Karprofen	CPF	CPF-D3	6,738	C ₁₅ H ₁₂ ClNO ₂	273,7	[M-H] ⁻	271,8	<u>228,0/225,9</u>	80	-12/-32	3/3
Ketoprofen	KTP	KTP-D3	5,576	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,2	[M+H] ⁺	255,0	<u>209,1/105,1</u>	100	12/24	-3/-3
Mefenaminska kiselina	MFA	MFA- ¹³ C ₆	7,470	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₂	241,3	[M-H] ⁻	239,9	<u>196,1/180,1</u>	90	-16/-30	-1/-1
Meklofenaminska kiselina	MCA	MCA- ¹³ C ₆	7,291	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ₂	296,1	[M-H] ⁻	293,8	<u>257,9/214,0</u>	100	-12/-20	-7/-7
Meloksikam	MLX	MLX-D3	4,633	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂	351,4	[M-H] ⁻	349,8	<u>286,0/146,0</u>	90	-12/-20	-1/-3
Naproksen	NP	NP-D3	5,883	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,2	[M-H] ⁻	229,0	<u>185,0/170,0</u>	50	-2/-14	-5/-5
Nifluminska kiselina	NFA	NFA- ¹³ C ₆	5,962	C ₁₃ H ₉ F ₃ N ₂ O ₂	282,2	[M-H] ⁻	281,0	<u>237,0/177,0</u>	90	-16/-36	-5/-5
Oksifenbutazon	OPB	OPB- ¹³ C ₆	5,363	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃	324,3	[M-H] ⁻	322,9	<u>295,1/134,1</u>	120	-18/-26	-5/-5
Piroksikam	PRX	PRX-D3	4,634	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	331,3	[M-H] ⁻	329,8	<u>266,0/146,0</u>	80	-10/-20	-5/-5
Salicilna kiselina	SA	SA- ¹³ C ₆	1,922	C ₇ H ₆ O ₃	138,1	[M-H] ⁻	137,0	<u>93,0/65,0</u>	70	-16/-34	-1/-1
Tolfenaminska kiselina	TFA	TFA- ¹³ C ₆	7,596	C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₂	261,7	[M+H] ⁺	262,0	<u>209,1/180,0</u>	90	32/50	5/5
Vedaprofen	VDP	VDP-D3	8,103	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	282,4	[M+NH ₄] ⁺	300,2	<u>201,1/155,1</u>	80	8/20	3/3

Tablica 11. (nastavak)

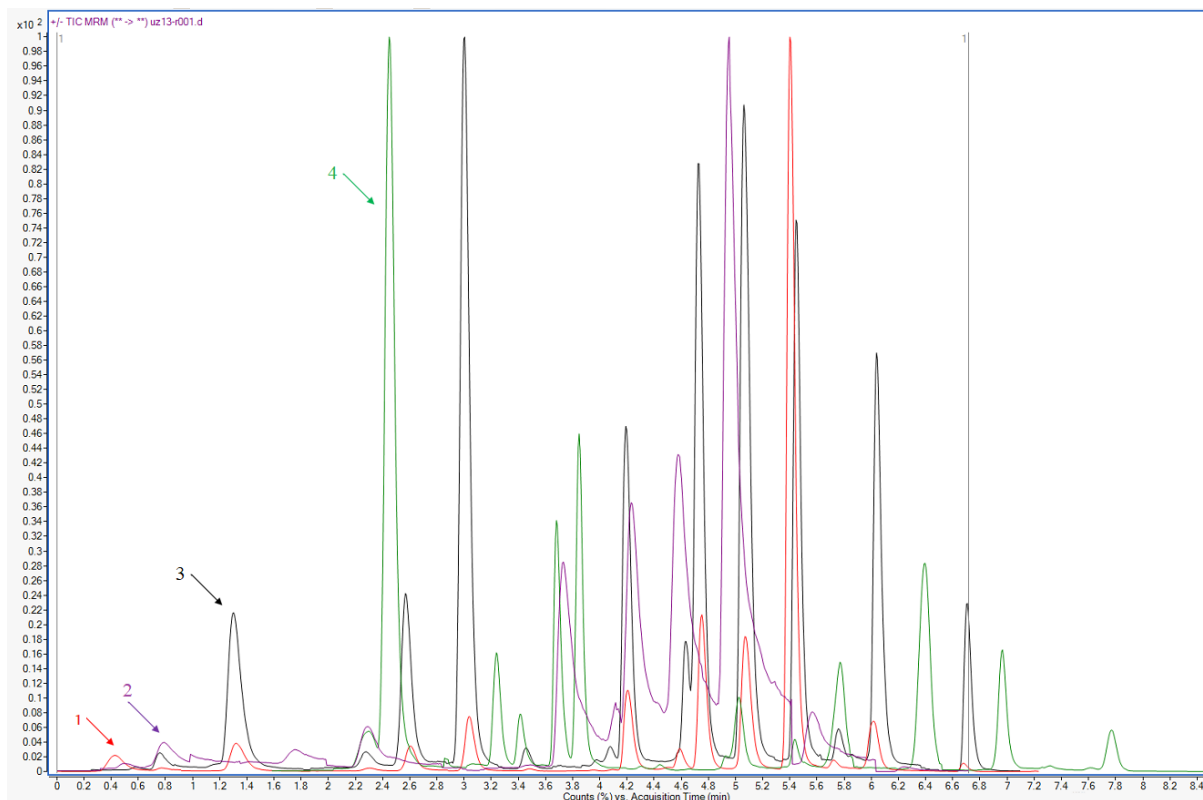
ISTD	RT (min)	Molekulska formula	Molekulska masa (g mol ⁻¹)	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Fragmentor (V)	Energija kolizije (eV)	CAV (V)
4-MAA-D3	3,63	C ₁₂ H ₁₂ D ₃ N ₃ O	220,2	[M+H] ⁺ 221,0	56,2	90	14	3
4-AA-D3	3,26	C ₁₁ H ₁₀ D ₃ N ₃ O	206,3	[M+H] ⁺ 207,1	58,2	90	20	3
4-AAA-D3	2,46	C ₁₃ D ₃ H ₁₂ N ₃ O	248,3	[M+H] ⁺ 249,1	231,1	90	8	5
DMAA- ¹³ C ₂	4,00	¹³ C ₂ C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O	233,3	[M+H] ⁺ 234,1	115,1	90	6	5
A-D3	3,08	C ₁₁ H ₁₂ D ₃ N ₂ O	191,2	[M+H] ⁺ 192,1	59,2	110	38	3
IPAA-D6	4,50	C ₁₄ H ₁₃ D ₆ N ₃ O	251,4	[M+H] ⁺ 251,9	56,0	110	14	3
CPF-D3	6,74	C ₁₅ D ₃ H ₉ ClNO ₂	276,7	[M-H] ⁻ 274,8	230,9	90	-4	-5
DC- ¹³ C ₆	6,70	¹³ C ₆ C ₈ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	301,1	[M+H] ⁺ 302,1	221,1	80	14	5
FCX-D6	5,12	C ₁₇ D ₆ H ₁₄ O ₅ S	342,4	[M+H] ⁺ 343,2	289,2	90	2	5
FFA- ¹³ C ₆	7,14	¹³ C ₆ C ₈ H ₁₀ F ₃ N ₂ O ₂	287,2	[M-H] ⁻ 285,9	220,9	100	-28	-5
FLU-D3	6,00	C ₁₄ H ₈ D ₃ F ₃ N ₂ O ₂	299,3	[M-H] ⁻ 297,9	253,9	100	-12	-5
5-FLUOH-D3	5,43	C ₁₄ H ₈ D ₃ F ₃ N ₂ O ₃	315,3	[M-H] ⁻ 313,9	269,9	100	-12	-5
IBP-D3	7,11	C ₁₃ D ₃ H ₁₅ O ₂	209,3	[M-H] ⁻ 208,0	163,9	70	-1	-5
KTP-D3	5,58	C ₁₆ D ₃ H ₁₁ O ₃	257,3	[M+H] ⁺ 257,8	211,9	110	8	5
MCA- ¹³ C ₆	7,31	¹³ C ₆ C ₈ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ₂	302,1	[M-H] ⁻ 299,8	263,7	110	-6	-5
MFA- ¹³ C ₆	7,47	¹³ C ₆ C ₉ H ₁₅ NO ₂	247,2	[M-H] ⁻ 245,9	202,0	100	-12	-5
MLX-D3	4,66	C ₁₄ H ₁₀ D ₃ N ₃ O ₄ S ₂	354,4	[M-H] ⁻ 352,9	288,9	100	-6	-7
NP-D3	5,87	C ₁₄ D ₃ H ₁₁ O ₃	233,3	[M-H] ⁻ 231,8	168,8	70	-28	-5
NFA- ¹³ C ₆	6,00	¹³ C ₆ C ₇ H ₉ F ₃ N ₂ O ₂	288,2	[M-H] ⁻ 286,9	243,0	100	-12	-5
OPB- ¹³ C ₆	5,38	¹³ C ₆ C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₃	330,4	[M-H] ⁻ 329,0	301,0	140	-14	-5
PBZ- ¹³ C ₁₂	6,20	¹³ C ₁₂ C ₇ H ₂₀ N ₂ O ₂	320,3	[M-H] ⁻ 319,0	291,0	130	-12	-5
PRX-D3	4,64	C ₁₅ H ₁₀ D ₃ N ₃ O ₄ S	334,4	[M-H] ⁻ 332,9	269,0	90	-4	-5
SA- ¹³ C ₆	1,93	¹³ C ₆ CH ₆ O ₃	144,1	[M-H] ⁻ 142,9	98,9	80	-14	-1
TFA- ¹³ C ₆	7,62	¹³ C ₆ C ₈ H ₁₂ ClNO ₂	267,7	[M+H] ⁺ 265,9	221,8	100	8	5
VDP-D3	8,10	C ₁₉ D ₃ H ₁₉ O ₂	285,4	[M+NH ₄] ⁺ 303,2	158,2	80	14	5

* za ibuprofen (IBP) metoda je prikladna samo za orijentacijsko određivanje (nema kvalifikacijski, potvrdni ion).

Kratice: ISTD, interni standard; RT, vrijeme zadržavanja; CAV, napon ubrzanja kolizijske ćelije.

Optimizacija parametara ionskog izvora (ESI) provedena je u pozitivnom i negativnom načinu rada. Usporedbom površina pikova pri različitim uvjetima odabrani su sljedeći optimizirani radni parametri spektrometra masa: napon kapilare 3,6 kV, napon mlaznice (*nozzle*) 0 V, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L min⁻¹, tlak plina u raspršivaču (*nebulizer*) 30 psi, temperatura plina u omotaču (*sheath*) 400 °C i protok plina u omotaču 11 L min⁻¹. Za detaljniju optimizaciju parametara MS-a, navedeni su parametri podešeni u prisustvu odgovarajuće pokretne faze. Za skupljanje i obradu podataka korišten je Agilent *MassHunter Workstation 10.0* program.

U procesu optimizacije kromatografskih uvjeta ispitan je i utjecaj različitih pokretnih faza, gradijent eluiranja analita, (U)HPLC kolone, temperatura kolone, brzina protoka te volumen injektiranja, na kromatografsko odvajanje i odziv analita kako bi se postigli najbolji instrumentalni uvjeti koji omogućuju jasnu identifikaciju analita odnosno njihovih ostataka u realnim uzorcima. Djelotvornost odvajanja odabranih NSAID-ova ispitana je korištenjem 7 različitih (U)HPLC kolona, stacionarnih faza modificiranih različitim organskim (C8 ili C18) grupama: Poroshell 120 SB-C18, Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 i Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Tech., Santa Clara, SAD), Luna C8 i Kinetex C8 (Phenomenex, Torrance, SAD) te XBridge BEH C18 i UPLC Acquity BEH C18 (Waters, Mildford, SAD) (za detalje o dimenzijama i čestica punila vidi Kromatografske kolone Poglavlja 3.1.4). Rezultati tih analiza pokazali su kako je u slučaju UHPLC kolona, Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 i UPLC Acquity BEH C18, postignuto optimalno razlučivanje pikova međutim zbog vrlo brze degradacije istih (visok tlak, promjena u vremenima zadržavanja analita) nakon samo nekoliko injektiranih uzoraka njihova primjena je bila napuštena. Sličan negativan trend uočen je i kod Poroshell 120 SB-C18 kolone. Prilikom korištenja ostalih HPLC kolona, optimalno razlučivanje NSAID-ova postignuto je na Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μm) koloni s Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 12 mm, 5 μm) pretkolonom uz 0,01 M amonijev formijat (NH₄Form.) (pH 5) u vodi (v/v) kao pokretnu fazu A i 0,05 % mravlju kiselinu (FA) u metanolu (MeOH) (v/v) kao pokretnu fazu B. Usporedba kromatograma ekstrakta NSAID-ova na četiri različite kolone prikazana je na slici 8, dok kromatogrami dobiveni na koloni Luna C8 i XBridge BEH C18 u ovom radu nisu prikazani budući da na njima nije postignuto zadovoljavajuće razlučivanje između pikova pojedinih analita te su zbog bolje preglednosti rezultata izostavljeni.



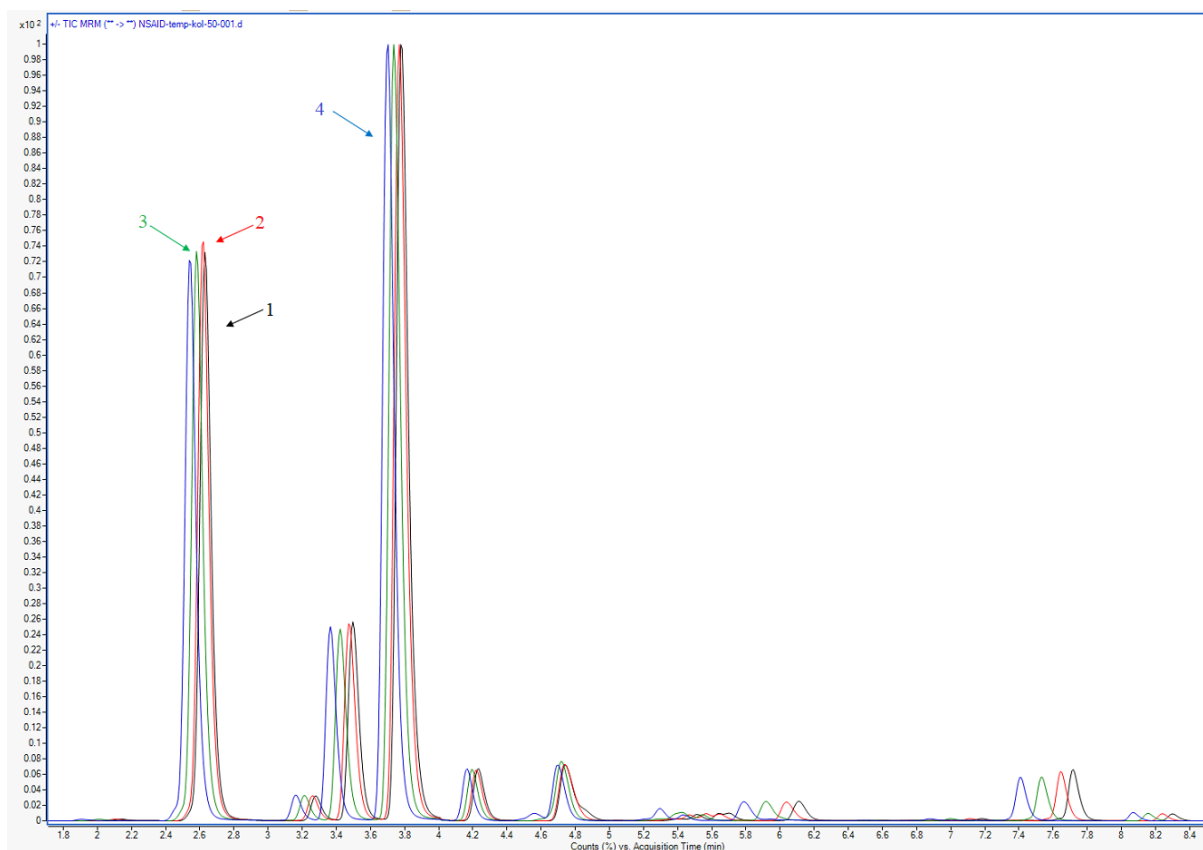
Slika 8. Usporedba UHPLC-MS/MS kromatograma 27 NSAID-ova dobivenih ispitivanjem obogaćenog uzorka mlijeka na NDK/VR vrijednost na različitim kolonama (1 – Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (crvena boja); 2 – Kinetex C8 (ljubičasta boja), 3 – UPLC Acquity BEH C18 (crna boja) i 4 – Poroshell 120 SC-C18 (zelena boja)).

Iako je utjecaj različitih pokretnih faza poput amonijevog acetata i amonijevog formijata kao pokretne faze A te acetonitrila i metanola kao pokretne faze B, uz dodatak octene ili mravlje kiseline, također ispitan, zbog boljeg odziva DC u pozitivnom načinu rada odlučeno je nastaviti razvoj metode s odabranim pokretnim fazama A (0,01 M NH_4Form , pH 5) i B (MeOH, 0,05% FA, v/v). Odabirom šire kolone, odabran je i veći protok te uvedene male promjene (0,8 – 0,9 – 1,0 – 1,1 mL min^{-1}) nisu značajno utjecale na vrijeme zadržavanja i simetriju pikova. Po uzoru na gradijent EURL-BVL metode, uvedene su manje izmjene kako bi se ispitalo optimalno razlučivanje. Niži udio pokretne faze B (10 %) na početku odvajanja rezultirao je produljenjem trajanja analize, dok pri višem udjelu (30 %) slabijim razlučivanjem. Uvjeti gradijentnog ispiranja primijenjeni za optimalno razdvajanje odabranih NSAID-ova kromatografijom obrnutih faza uz konstantan protok od 1 mL min^{-1} prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Gradijentni program ispiranja.

Vrijeme (minute)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	80	20
0,5	80	20
2	60	40
7	10	90
9,5	10	90
9,6	80	20
10	80	20

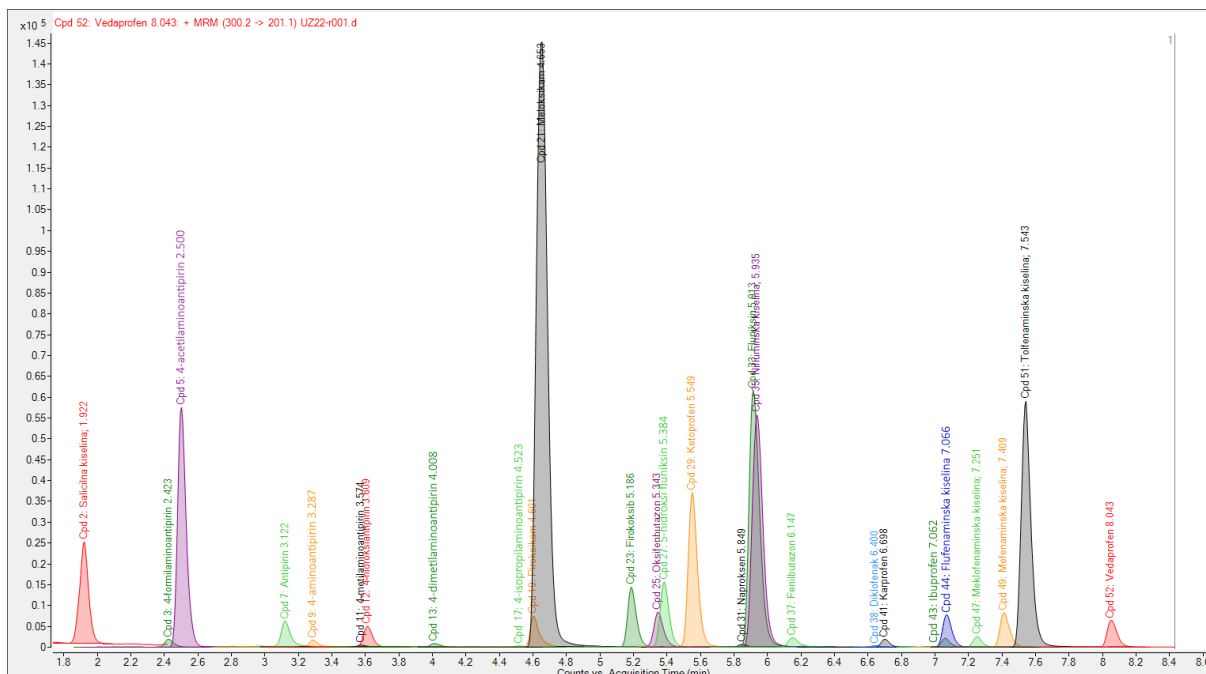
Utjecaj temperature također je ispitan u rasponu od 35 do 50 °C, a s povećanjem temperature vrijeme zadržavanja se smanjuje i bolje je razlučivanje pikova (slika 9). Zbog toga je izabrana temperatura kolone 50 °C. Injektirano je 12 µL uzorka, a u svrhu izbjegavanja kontaminacije, injektiranje se provodilo uz program ispiranja igle u otopini sljedećih volumnih udjela: 25 % vode, 25 % acetonitrila i 50 % metanola.



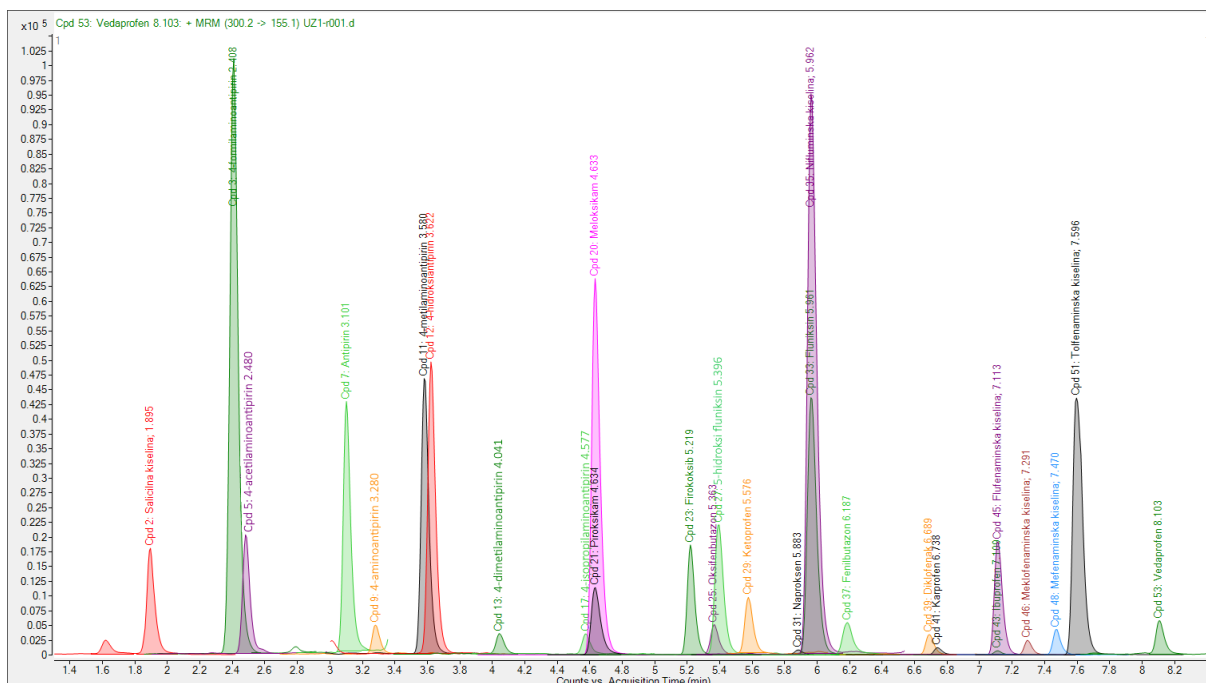
Slika 9. Usporedba UHPLC-MS/MS kromatograma 27 NSAID-ova dobivenih ispitivanjem obogaćenog uzorka mlijeka na NDK/VR vrijednost na odabranoj Zorbax Eclipse XDB C18 koloni pri različitim temperaturama (1 – temperatura kolone 35 °C (crna boja); 2 – temperatura kolone 40 °C (crvena boja), 3 – temperatura kolone 45 °C (zelena boja) i 4 – temperatura kolone 50 °C (plava boja)).

Reprezentativni kromatogrami 27 odabranih, kiselih i bazičnih, NSAID-ova u slijepim uzorcima mlijeka (krava) i mišićnog tkiva (konj) dobiveni razvijenom i optimiziranom UHPLC-MS-MS metodom prikazani su na slici 10 (a i b).

a)



b)

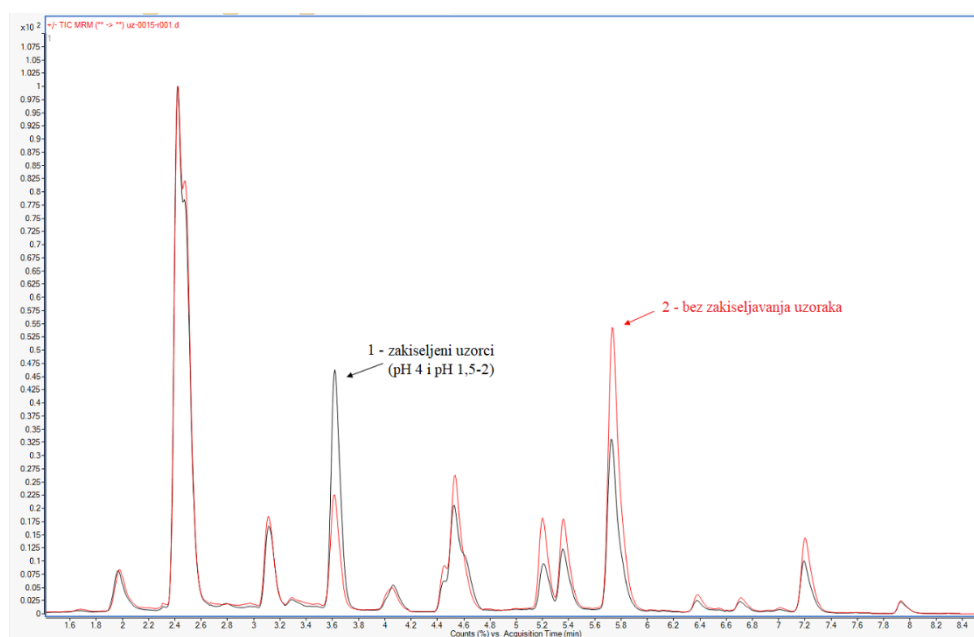


Slika 10. UHPLC-ESI-MS/MS kromatogrami za kisele i bazične NSAID-ove u slijepom uzorku a) mlijeka (krave) i b) mišićnom tkivu (konja) obogaćenom na NDK/VR vrijednost (SRM tranzicija kvantifikatora). Duž x-osi prikazano je vrijeme, a duž y-osi intenzitet odziva analita.

4.1.2 Optimizacija postupaka pripreme uzoraka

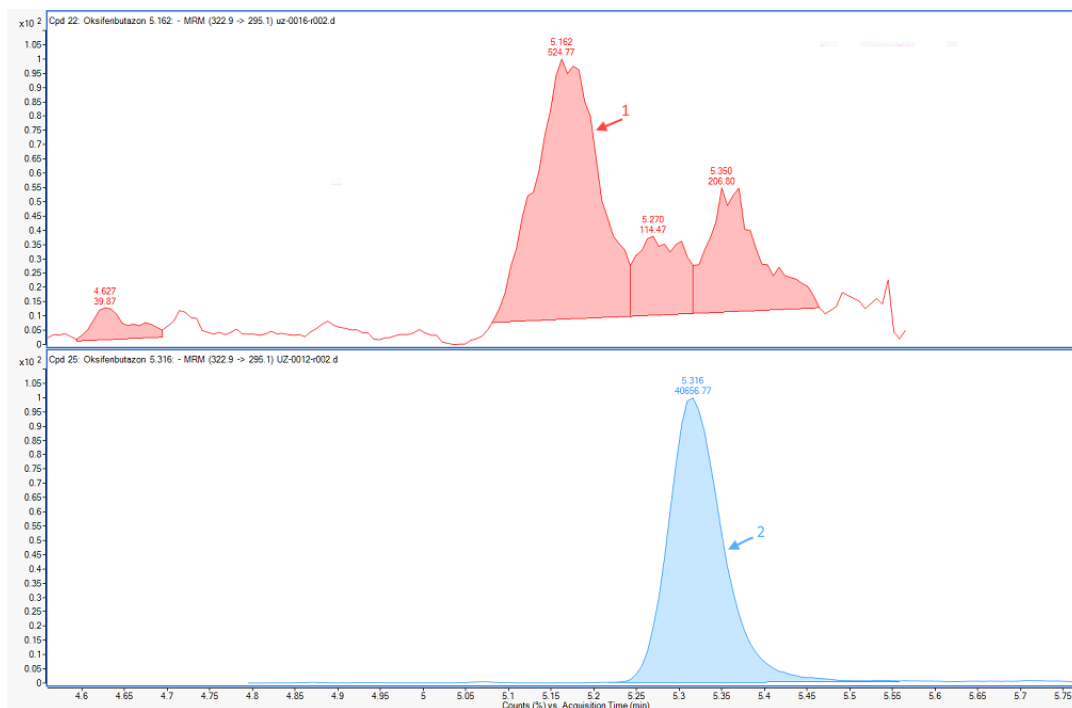
U ovom radu ispitani su optimalni uvjeti za istovremenu ekstrakciju odabranih 27 kiselih i bazičnih NSAID-ova u složenim biološkim matricama kao što je hrana životinjskog podrijetla kako bi se postigao visok analitički prinos metode. Metoda se temelji na analitičkom postupku određivanja 15 kiselih NSAID-ova u mlijeku (BVL, 2007) i 14 kiselih NSAID-ova u mišiću, jetri i bubrežima (Stoyke i Gowik, 2005) objavljenom od strane referentnog laboratorija, EURL-BVL. Metoda je modificirana (proširena i optimizirana) prema potrebama laboratorija za rutinski nadzor tih spojeva u mišićnom tkivu i mlijeku.

Iako se radi o složenoj prirodi uzoraka (mišićno tkivo, mlijeko, voda), metoda određivanja NSAID-ova može se podijeliti u nekoliko zajedničkih koraka (s odgovarajućim razlikama u samom postupku ovisno o matrici): (i) enzimaska hidroliza pomoću β -glukuronidaza/arilsulfataze iz *H. pomatia* (37° C, 1 sat); (ii) ekstrakcija željenih analita pomoću acetonitrila; (iii) pročišćavanje i koncentriranje ekstrakta ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) i (iv) UHPLC-MS/MS analiza. Istraženi su učinci zakiseljavanja uzoraka mišićnog tkiva prije (pH 4) i nakon (pH 1,5 – 2) enzimске hidrolize, predloženi u EURL-BVL metodi, korak koji u pripremi uzoraka mlijeka nije prisutan, a može utjecati na degradaciju pojedinih analita (PBZ i OPB) kao i dodatak L-askorbinske kiseline (L-ASK) na učinkovitost ekstrakcije kako bi se povećao analitički prinos ekstrakcije analita. Kako se učinkovitost ekstrakcije za ostale analite nije značajno razlikovala, navedeni koraci zakiseljavanja mišićnog tkiva su izostavljeni (slika 11).

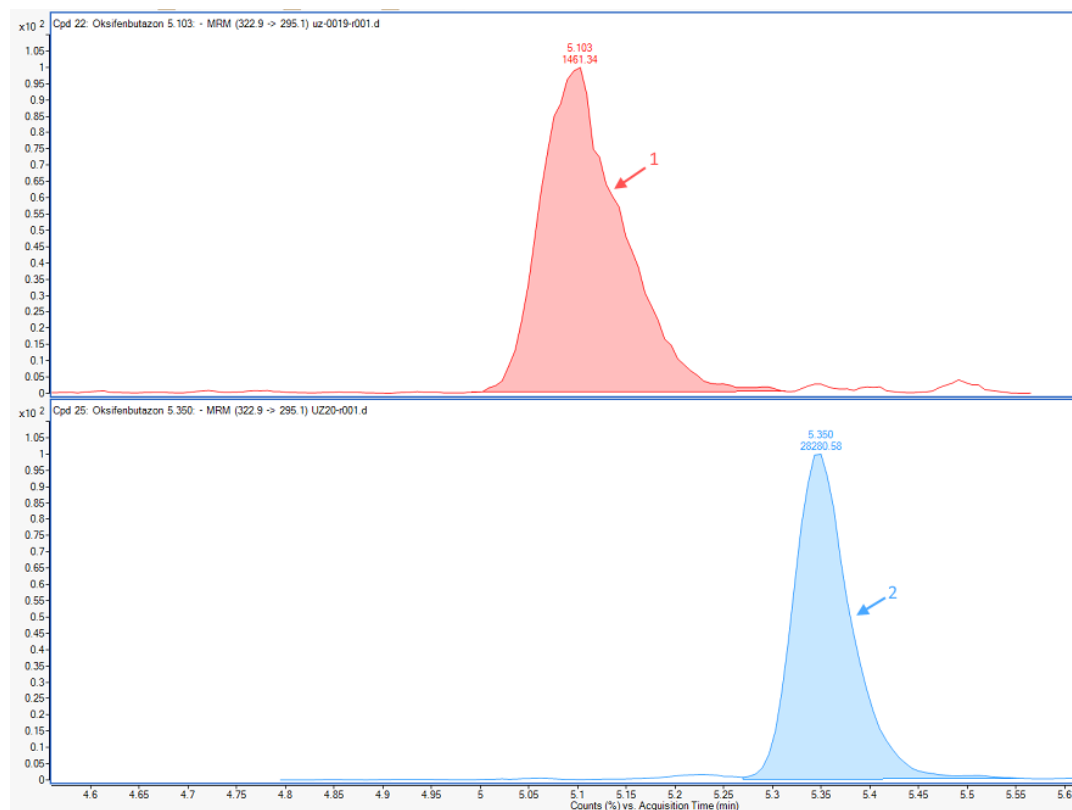


Slika 11. Usporedba UHPLC-MS/MS kromatograma 27 NSAID-ova obogaćenog uzorka mlijeka na NDK/VR vrijednost dobivenih zakiseljavanjem uzoraka na pH 4 i pH 1,5 – 2 (1 – crna boja) i bez zakiseljavanja uzoraka (2 – crvena boja).

a)



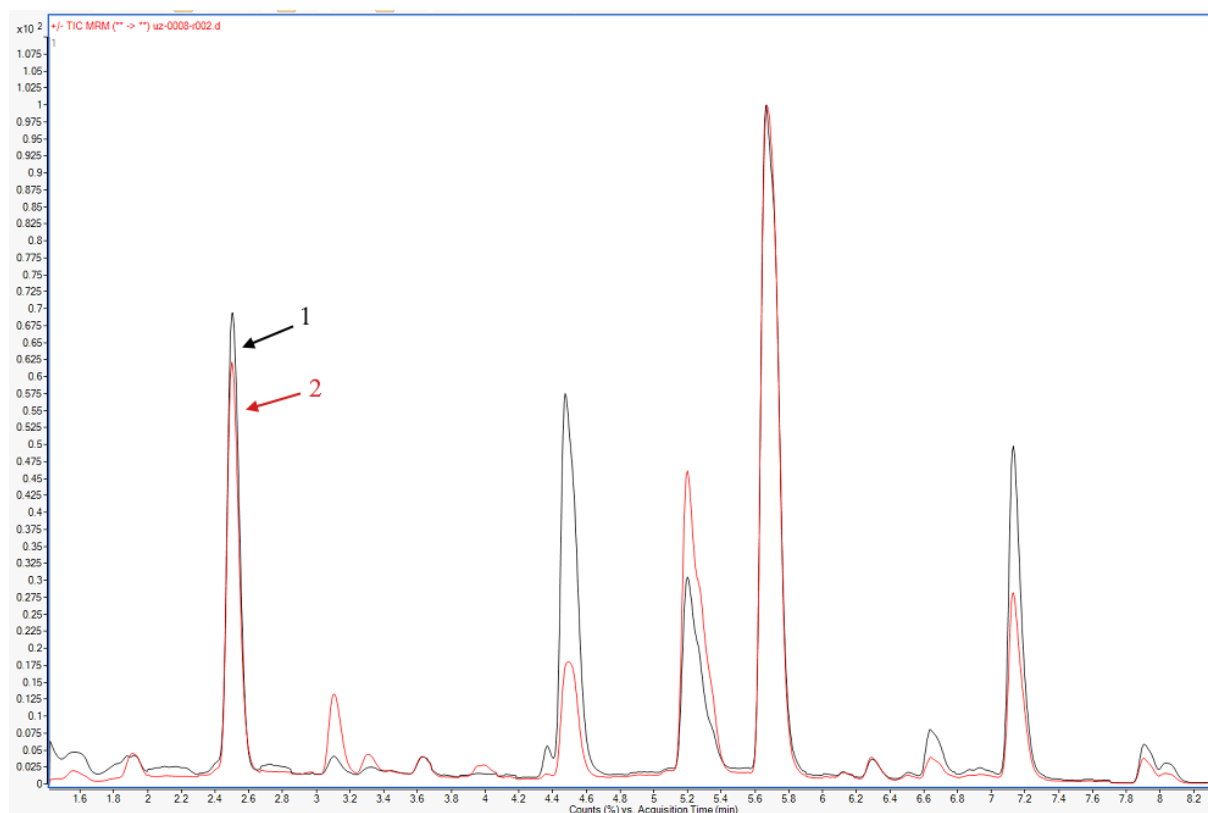
b)



Slika 12. Usporedba UHPLC-MS/MS kromatograma ekstrakta OPB u a) mlijeku i b) mišićnom tkivu bez dodatka L-askorbinske kiseline (1 – ružičasto obojen kromatogram) i s dodatkom L-askorbinske kiseline (2 – plavo obojen kromatogram) (SRM tranzicija kvantifikatora).

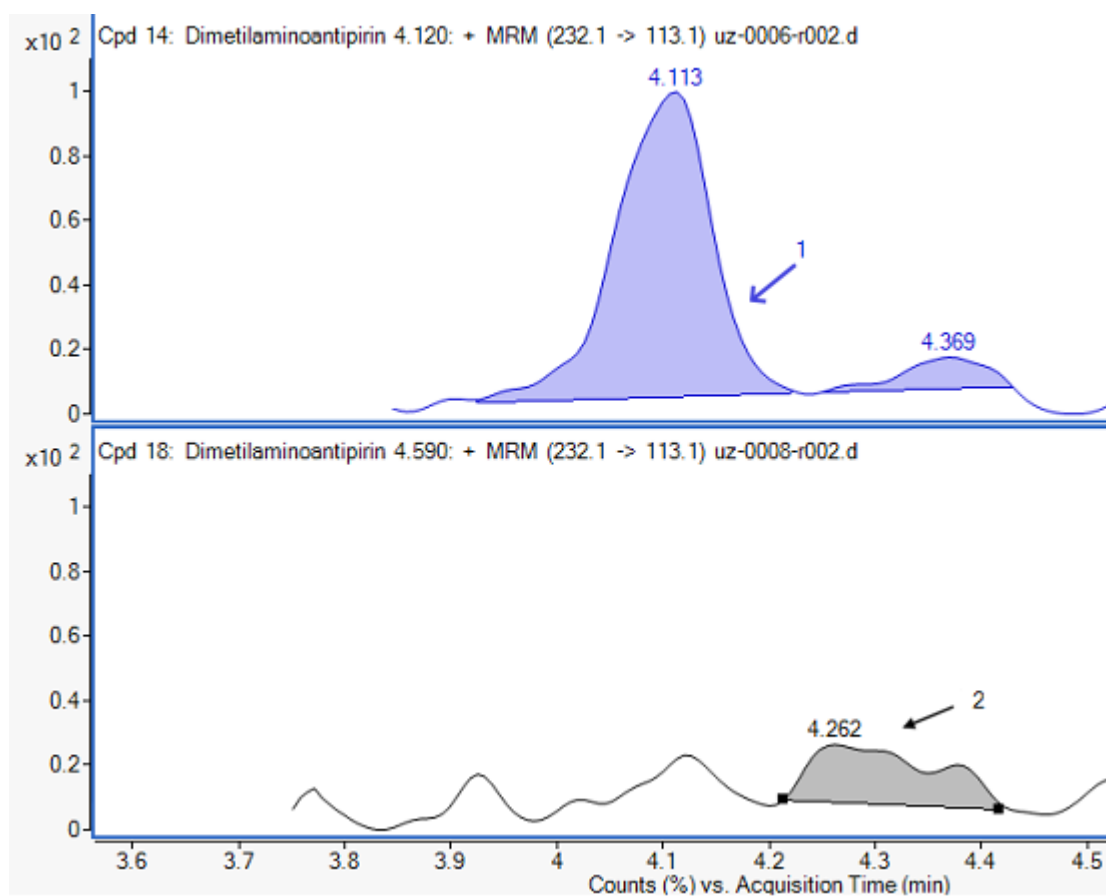
Za ekstrakcijsko otapalo odabran je acetonitril u obje matrice. Kako bi se uklonila voda i lakše izdvojila acetonitrilna faza u uzorke mlijeka dodana je sol natrijev klorid dok je kod mišićnog tkiva dodatak natrijevog acetata omogućio i puferiranje medija. Kako bi se smanjio sadržaj masti iz uzoraka mišićnog tkiva, uveden je korak odmašćivanja organskog sloja s n-heksanom. Podešavanjem uzoraka na pH 3 s 1 M klorovodičnom kiselinom, povećano je zadržavanje analita na punilu SPE kolone (sorbensu). Za pročišćavanje i uklanjanje potencijalnih interferencija odabrane su dvije polimerne SPE kolone s reverznom fazom i testirane na obje matrice, za uzorke mlijeka rezultati su ukazali bolji odziv sa SPE kolonama Evolute® Express ABN (100 mg, 3 mL), a za uzorke mišićnog tkiva SPE kolona Discovery® DSC-18 (500 mg, 3 mL) (slika 13, a, b, c i 14, a, b, c).

a)

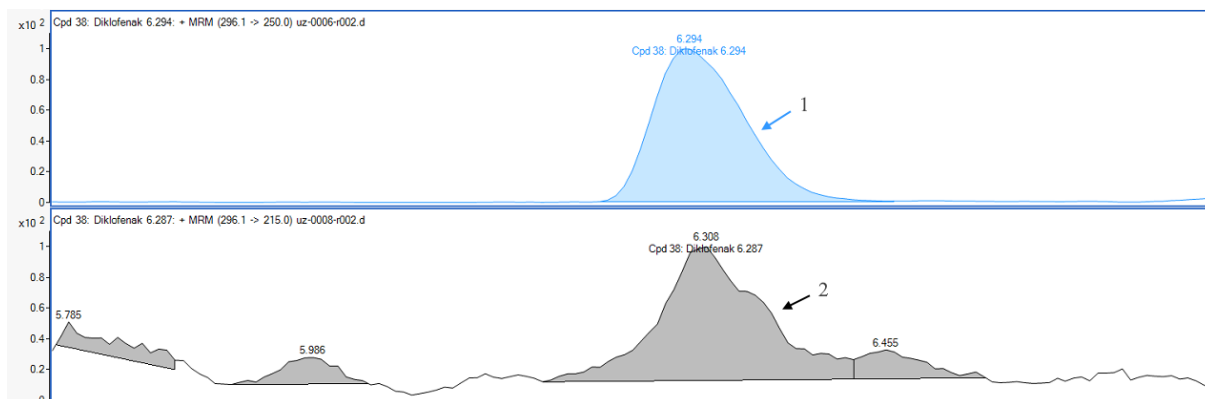


Slika 13. Usporedba a) TIC kromatograma ekstrakta uzorka mlijeka obogaćenog na NDK/VR razinu za sve analite te UHPLC-MS/MS kromatograma za analite b) 4-DMAA i c) DC dobivenih ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) na Evolute® Express ABN kolonama (1) i Discovery® DSC-18 kolonama (2) (SRM tranzicija kvantifikatora).

b)

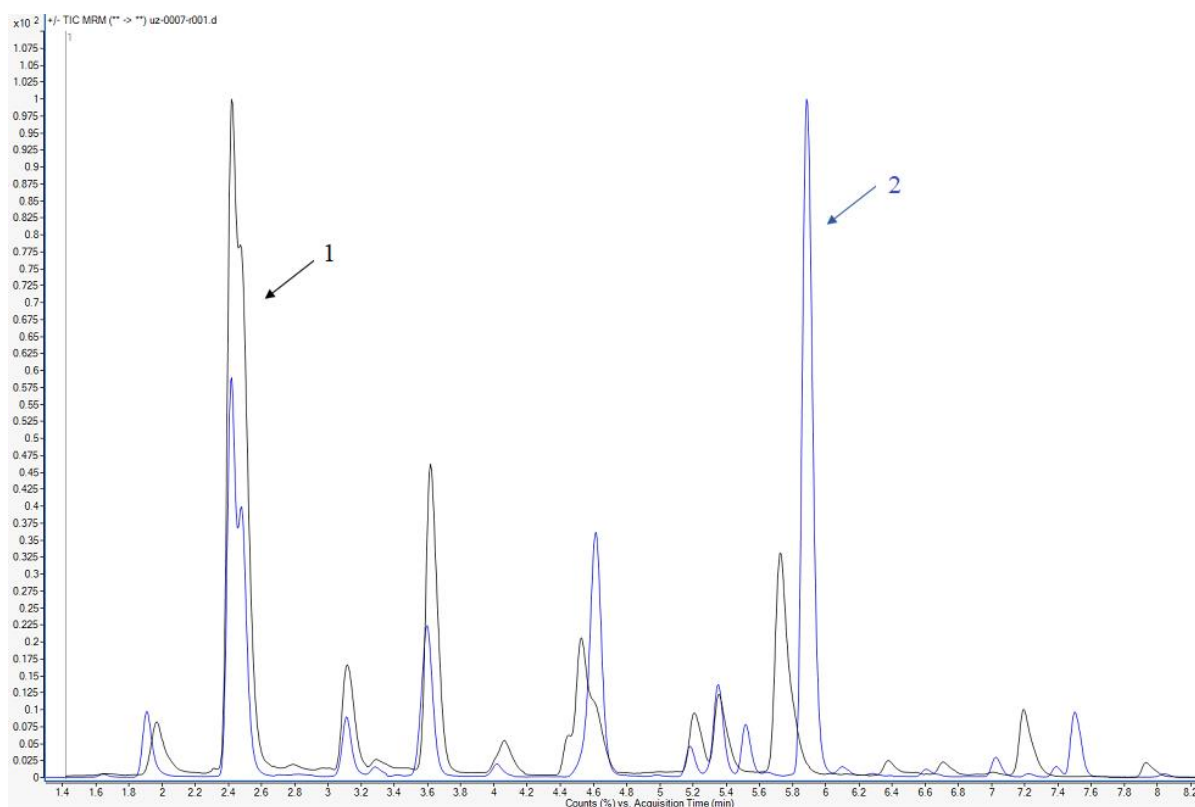


c)

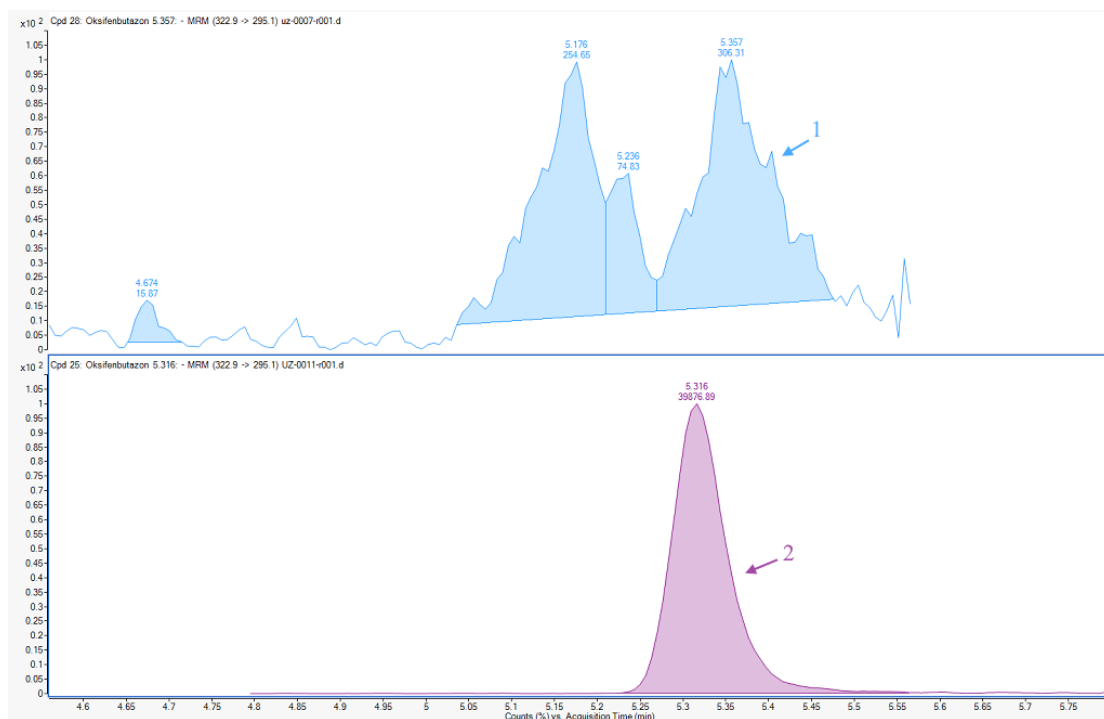


Slika 13. (nastavak)

a)

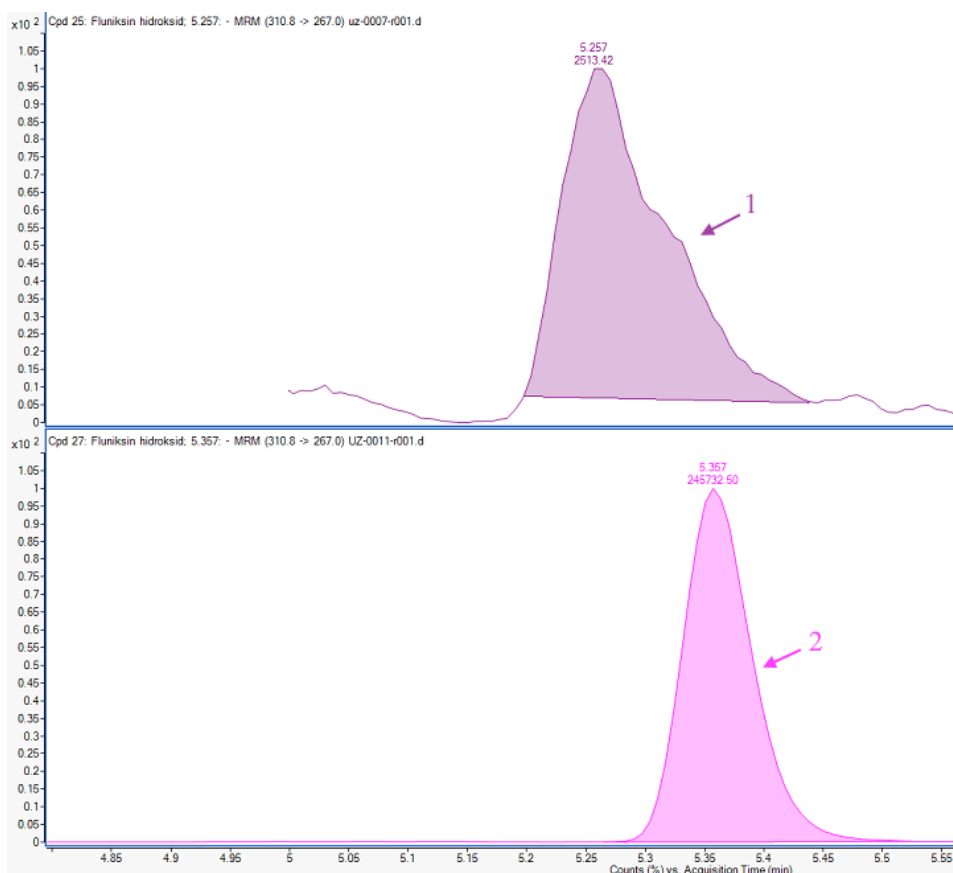


b)



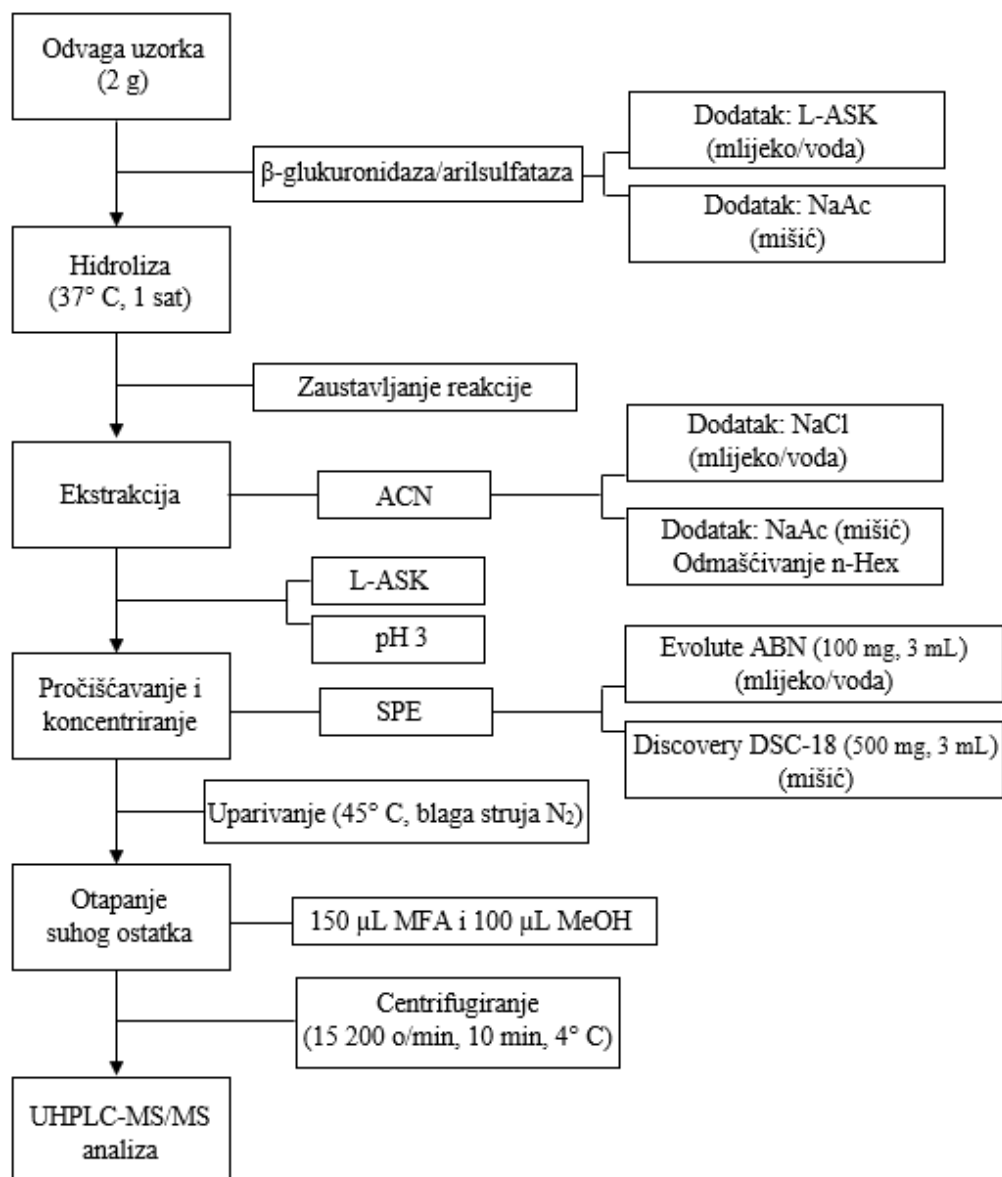
Slika 14. Usporedba a) TIC kromatograma ekstrakta uzorka mišićnog tkiva obogaćenog na NDK/VR razinu za sve analite te UHPLC-MS/MS kromatograma za analite b) OPB i c) 5-FLUOH dobivenih ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) na Evolute® Express ABN kolonama (1) i Discovery® DSC-18 kolonama (2) (SRM tranzicija kvantifikatora).

c)



Slika14. (nastavak)

Prema optimalnim uvjetima za svaku od SPE kolona i vrstu matrice, nakon kondicioniranja kolona s L-ASK-om i propuštanja dobivenog ekstrakta uzorka te ispiranja kolona i sušenja pod punim vakuumom najmanje 15 min, eluirani su analiti odgovarajućom smjesom heksan/dietil-eter/acetonitril/metanol. Ekstrakt je otparen u blagoj struji dušika pri temperaturi od 45 °C i otopljen u smjesi pokretne faze A i metanola. Svi spojevi ekstrahirani su u zadovoljavajućem rasponu iskorištenja 98,1 – 106,5 %, a relativna standardna devijacija (RSD) kretala se između 3,1 – 18,5 % u obje vrste matrica. Centrifugiranje uzoraka s velikom g silom (15 200 o/min, 4° C, 10 min) kao zamjenski korak filtracije uzoraka pomoću filtera korišten je kako bi se spriječio gubitak analita na filterima i smanjila eventualna zamućenost konačnog ekstrakta. Dobiveni bistri ekstrakti prikladni su za UHPLC-MS/MS analizu. Optimizirani postupci pripreme uzoraka mlijeka i mišićnog tkiva detaljno su opisani u Poglavlju 3.2.1.1 odnosno 3.2.1.2, a prikazani su slikom 15, uz jednake UHPLC-MS/MS uvjete opisanih u Poglavlju 4.1.1.

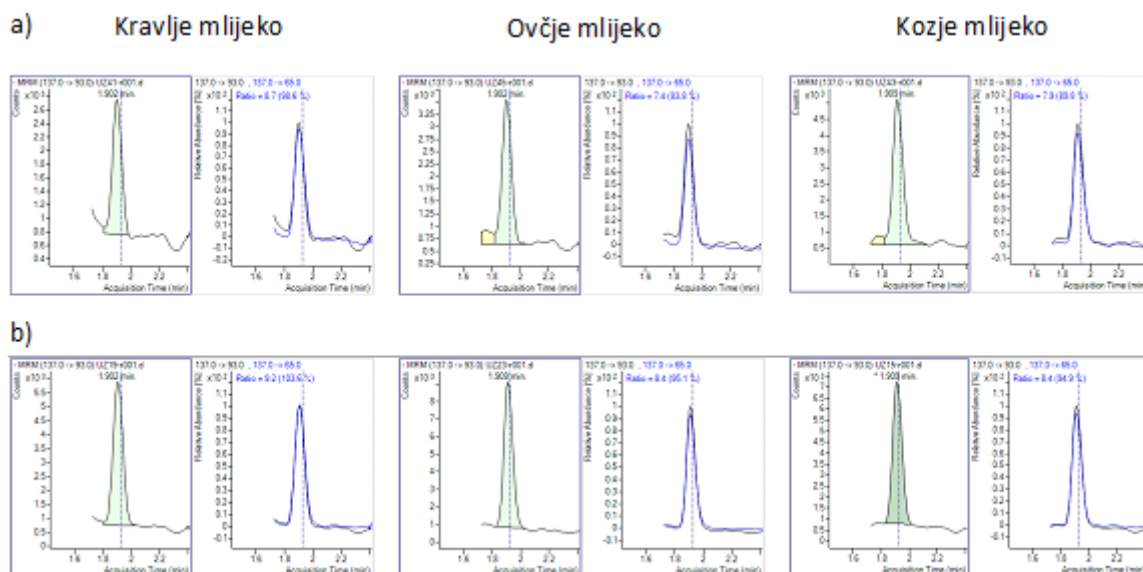


Slika 15. Shematski prikaz optimiziranog postupka pripreme uzoraka.

4.1.3 Validacija metode

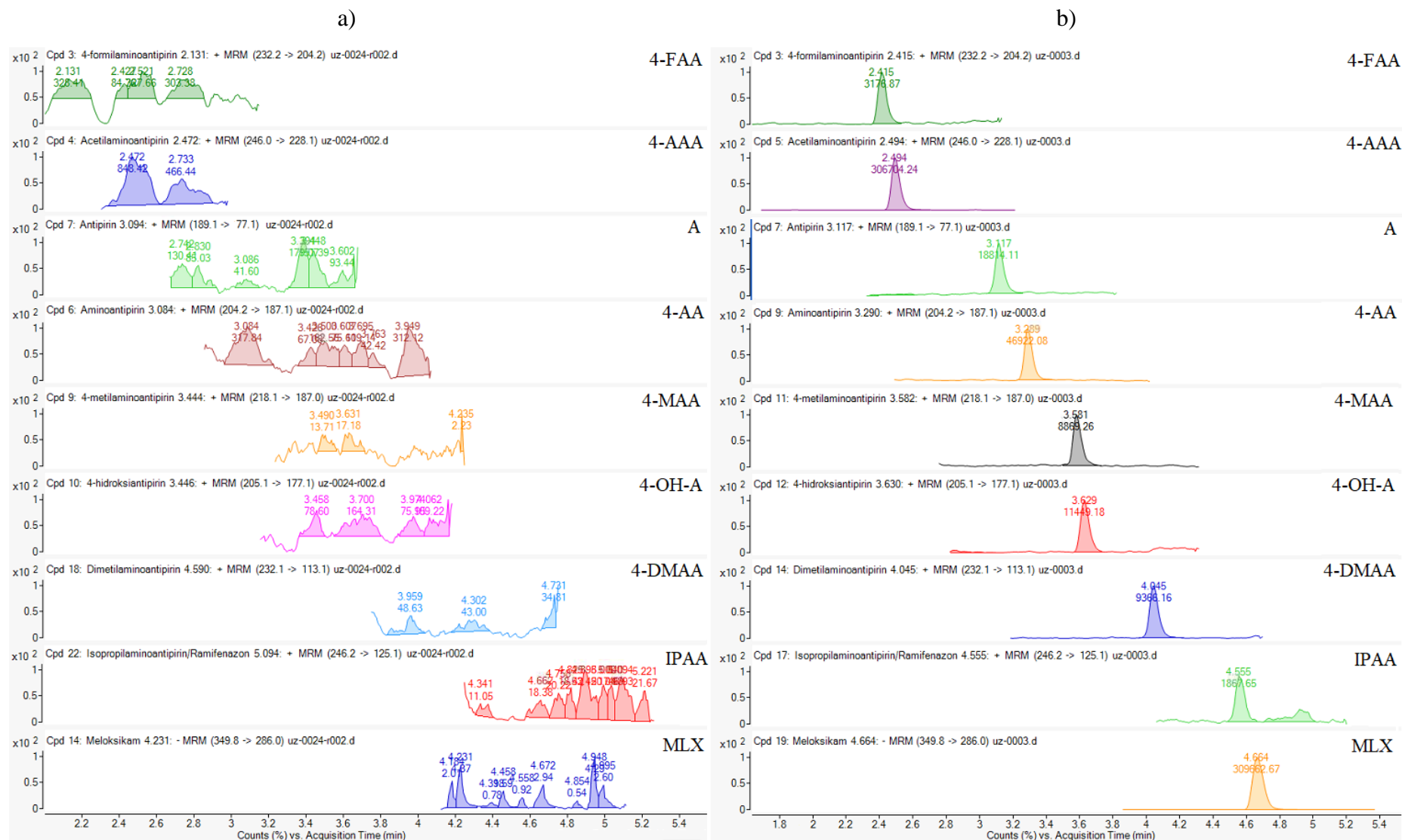
4.1.3.1 Specifičnost/selektivnost

Specifičnost odnosno selektivnost metode provjerena je usporedbom kromatograma slijepih uzoraka mlijeka i mišićnog tkiva s obogaćenim uzorcima odgovarajuće matrice. Izuzev kod salicilne kiseline, odsustvo koeluirajućih pikova u vremenu zadržavanja i zadanim tranzicijama (m/z) analiziranih NSAID-ova potvrđuje odsustvo interferencija i selektivnost razvijene metode. Prilikom analize salicilne kiseline slijepih i obogaćenih uzoraka mlijeka (svih odabranih životinjskih vrsta) uočena je interferencija signala između MRM tranzicija (slika 16).

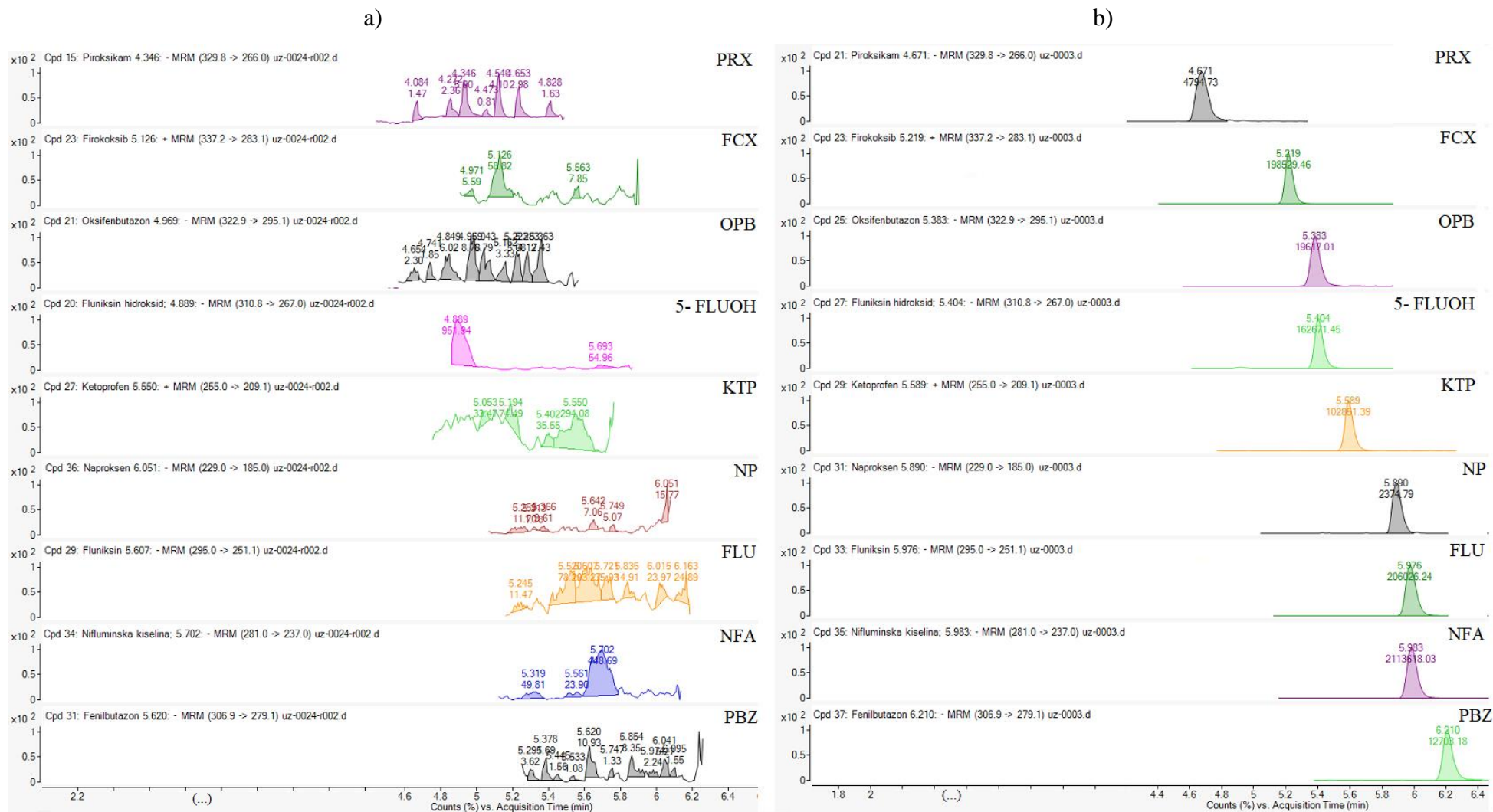


Slika 16. UHPLC-MS/MS kromatogrami za salicilnu kiselinu u a) slijepom uzorku mlijeka i b) uzorku mlijeka obogaćenom na NDK/VR razinu različitih životinjskih vrsta.

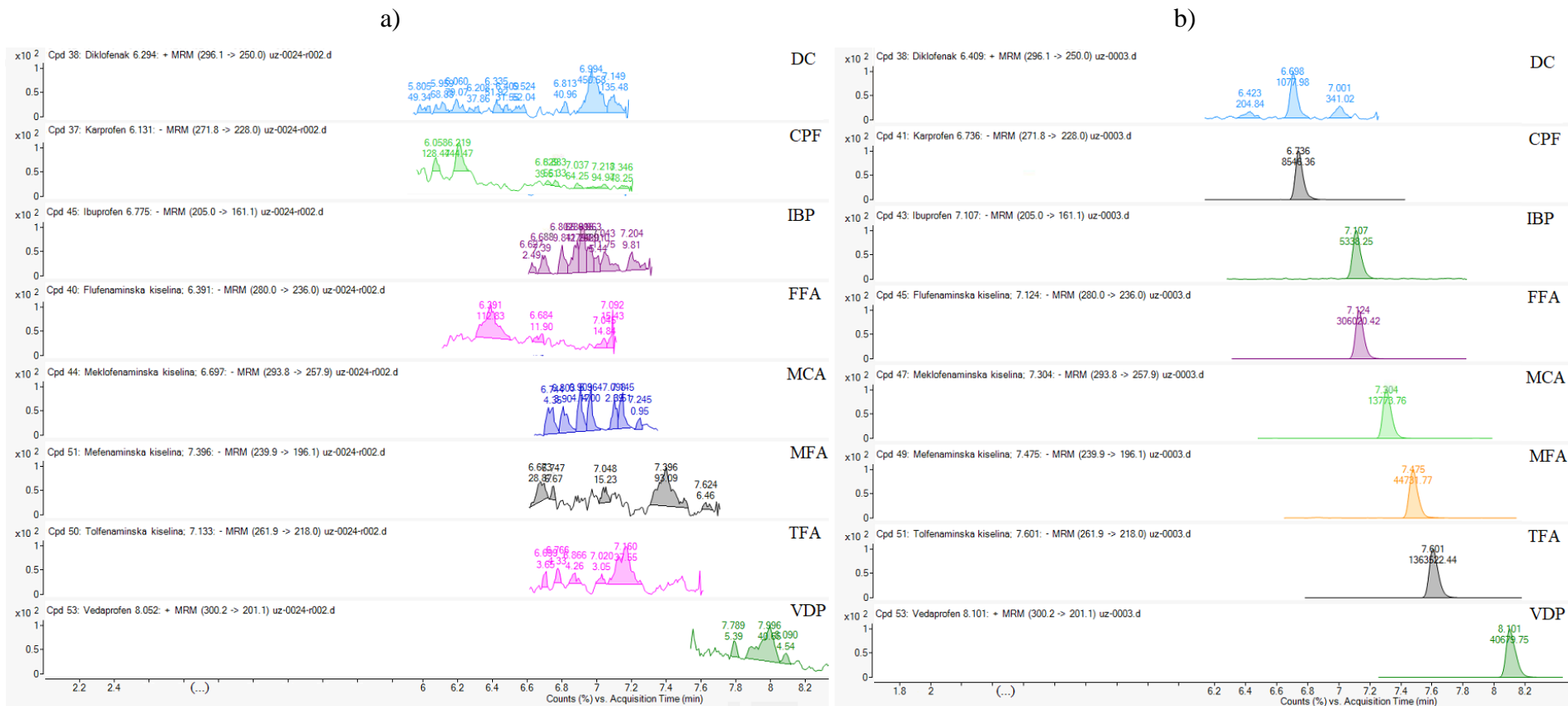
Kromatogrami dobiveni analizom slijepih uzoraka i obogaćenih uzoraka mlijeka i mišićnog tkiva prikazani su na slikama 17 (a i b) i 18 (a i b). Iako je na pojedinim kromatogramima prisutan pik šuma u vremenu zadržavanja analita od interesa, omjer signal-šum (S/N) kod svih je manji od 10 (granica kvantitativnog određivanja), a prema analitičkoj praksi laboratorija takvi se pikovi ne integriraju i ne utječu na rezultat.



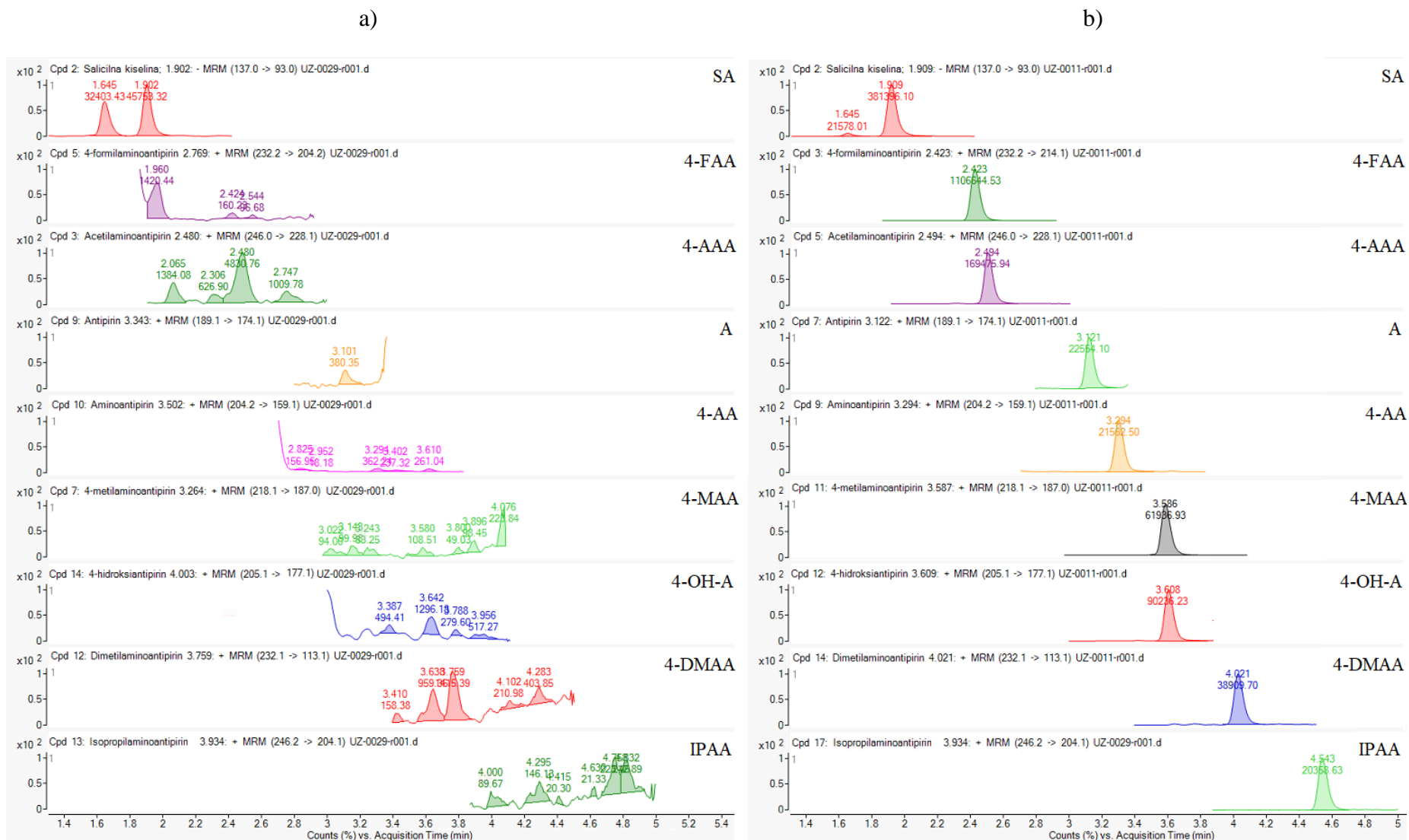
Slika 17. UHPLC-MS/MS kromatogrami za preostalih 26 odabranih NSAID-ova u a) slijepom uzorku mlijeka (krave) i b) uzorku mlijeka (krave) obogaćenom na NDK/VR razinu (SRM tranzicija kvantifikacijskog iona).



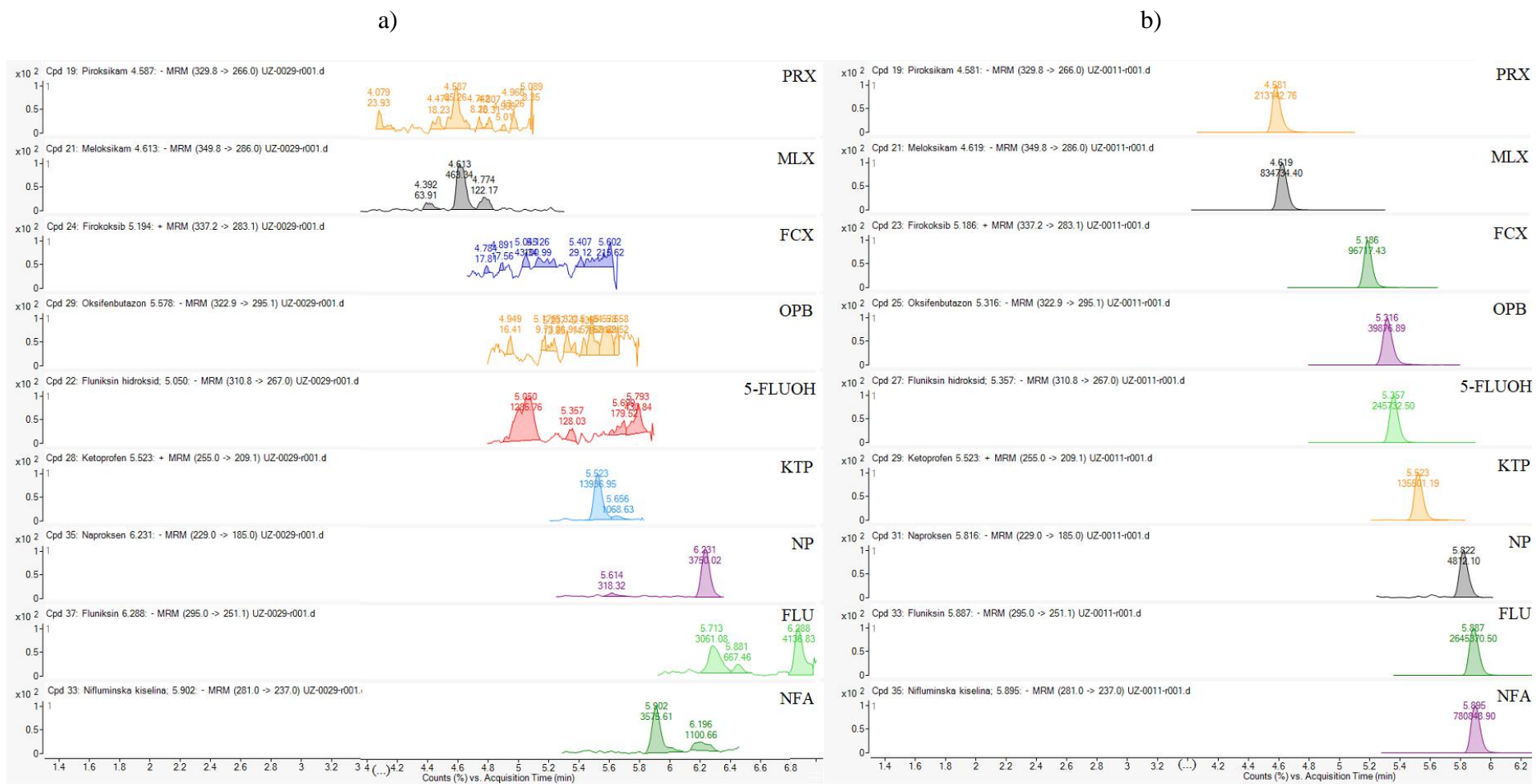
Slika 17. (nastavak)



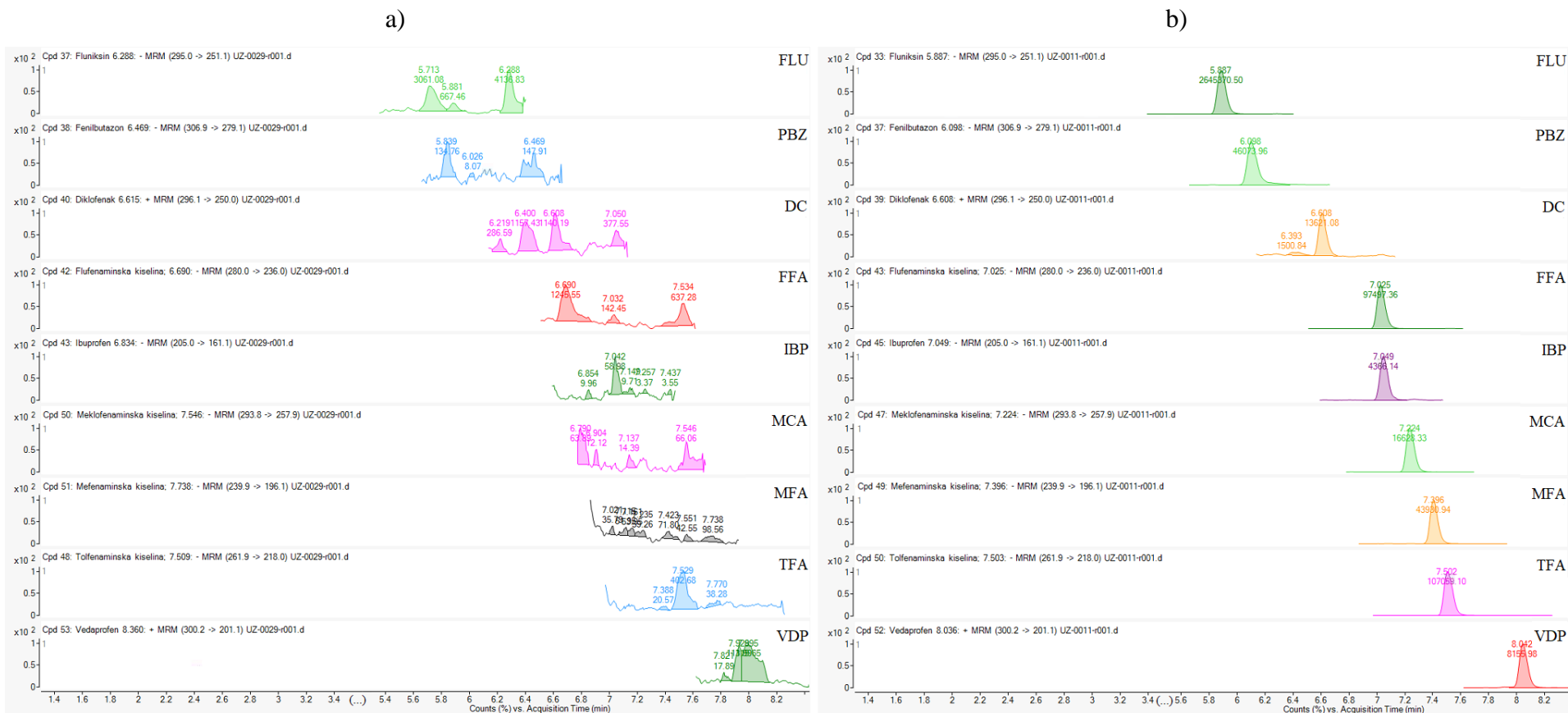
Slika 17. (nastavak)



Slika 18. UHPLC-MS/MS kromatogrami za kisele i bazične NSAID-ove u a) slijepom i b) obogaćenom uzorku mišićnog tkiva (krave) obogaćenom na NDK/VR razinu (SRM tranzicija kvantifikatora).



Slika 18. (nastavak)



Slika 18. (nastavak)

4.1.3.2 Linearnost

Linearnosti metode ispitana je u različitom rasponu masenih koncentracija u uzorku mišićnog tkiva i mlijeka za svaki pojedini NSAID, na način da su kreirane kalibracijske krivulje linearnom regresijom površine pika analita ($y - os$), uz korekciju odgovarajućim internim standardom, u odnosu na masenu koncentraciju analita ($x - os$). Koeficijent determinacije (R^2) za svaki analit izračunat je na temelju kalibracijske krivulje pripremljene u 5 točaka u odgovarajućoj vrsti matrice, mlijeku i mišiću, što je detaljnije prikazano u tablici 13. Svi analiti pokazali su zadovoljavajuću linearnost, u cijelom ispitivanom području masenih koncentracija, s R^2 višim od 0,990 u obje vrste matrica, osim za 4-DMAA, 4-FAA, 4-OH-A i SA (0,97 – 0,98) u mlijeku, odnosno za 4-AA, 4-DMAA, 4-OH-A, IPAA (0,97 – 0,98) u mišiću.

Tablica 13. Prikaz linearnosti metode za ispitivane NSAID-ove u mlijeku i mišićnom tkivu.

NSAID	VRSTA UZORKA			
	MLIJEKO		MIŠIĆNO TKIVO	
	R^2	Linearno područje ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R^2	Linearno područje ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
4-AA	0,996	12,5 – 100	0,978	5 – 60
4-AAA	0,999	10 – 80	0,998	0,5 – 6
4-DMAA	0,970	0,5 – 4	0,986	0,5 – 6
4-FAA	0,982	0,5 – 4	0,992	10 – 120
4-MAA	0,994	12,5 – 100	0,996	25 – 300
4-OH-A	0,972	12,5 – 100	0,974	10 – 120
5-FLUOH	0,991	10 – 80	0,997	1,5 – 18
A	0,997	0,5 – 4	0,996	0,5 – 6
CPF*	0,995	0,5 – 4	0,992	1 – 12 (125 – 1500)
DC	0,990	0,025 – 4	0,996	1,25 – 15
FCX	0,999	2,5 – 20	0,994	2,5 – 30
FFA	0,999	0,5 – 4	0,993	0,5 – 6
FLU*	0,999	0,5 – 4	0,994	2,5 – 30 (60)
IBP	0,991	2,5 – 20	0,998	1,5 – 18
IPAA	0,990	0,5 – 4	0,971	2,5 – 30
KTP	0,999	0,5 – 4	0,997	0,5 – 6
MCA	0,995	2,5 – 20	0,990	10 – 120
MFA	0,999	0,5 – 4	0,996	1,5 – 18
MLX	0,999	3,75 – 30	0,997	5 – 60
NFA	0,999	2,5 – 20	0,995	1 – 12
NP	0,993	0,5 – 4	0,990	1 – 12
OPB	0,990	0,5 – 4	0,996	1,5 – 18

Tablica 13. (nastavak)

NSAID	VRSTA UZORKA			
	MLIJEKO		MIŠIĆNO TKIVO	
	R ²	Linearno područje ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R ²	Linearno područje ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
PBZ	0,991	0,5 – 4	0,996	1,5 – 18
PRX	0,998	0,5 – 4	0,996	10 – 120
SA	0,981	2,25 – 18	0,998	10 – 120
TFA	0,999	12,5 – 100	0,997	12,5 – 150
VDP	0,991	3,75 – 30	0,992	12,5 - 150

* Flunixin ima za različite životinjske vrste različitu NDK vrijednost, dok kod karprofena samo govedo i konj imaju NDK vrijednost ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), stoga priprema kalibracijske krivulje odgovarajuće koncentracije ovisi vrsti životinje.

4.1.3.3 Preciznost, $CC\alpha$, $CC\beta$, iskorištenje

Preciznost, pod uvjetima ponovljivosti (RSD_r) i unutar-laboratorijske obnovljivost (RSD_{wR}), točnost (iskorištenje) analitičke metode pri $CC\alpha$ kao i $CC\alpha$ i $CC\beta$ ispitani su ponavljanjem obogaćenih uzoraka, na tri koncentracijske razine (ovisno o ispitivanom analitu odgovarajući NDK ili VR kao središnja točka obogaćenja, minimalno pet ponavljanja po razini), a rezultati izračunati InterVal[®]Plus programom prikazani su u tablici 14. Kod svih analita u obje vrste matrice zadovoljen je kriterij iskorištenja (80 – 110% za koncentracije $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i 70 – 110% za koncentracije $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$), između 98,1 i 106,5 % u mlijeku odnosno 98,8 i 102,7 % u mišiću, sa RSD_r manjim od 20 %, između 2,1 i 16,7% u mlijeku odnosno 2,3 i 10,9 % u mišiću.

Mjerna nesigurnost analitičkog rezultata izražena je preko $CC\alpha$ i $CC\beta$ jer uračunava standardnu devijaciju ponovljivosti i unutar-laboratorijske obnovljivosti metode određene u validaciji. Uz navedene značajke učinkovitosti, zahvaljujući eksperimentalnom dizajnu i mogućnosti procjene utjecaja odabranih faktora (ovisno o zahtjevima uzoraka i rutinskih potreba laboratorija) dobivaju se i informacije o robusnosti metode. Za većinu analita utjecaj odabranih faktora validacije (različiti tip i vrsta testiranih matrica, analitičar, SPE kolone, lotovi reagensa i UHPLC kolona te dani analize) bio je zanemariv. Ipak, tip matrice i životinjska vrsta mogu značajno doprinijeti ukupnoj mjernoj nesigurnosti. Međutim, s obzirom na odabrane faktore, metoda se pokazala robusnom.

Tablica 14. Pregled rezultata validacije, $CC\alpha$, $CC\beta$, RSD_r , RSD_{wR} i U, za mlijeko i mišićno tkivo.

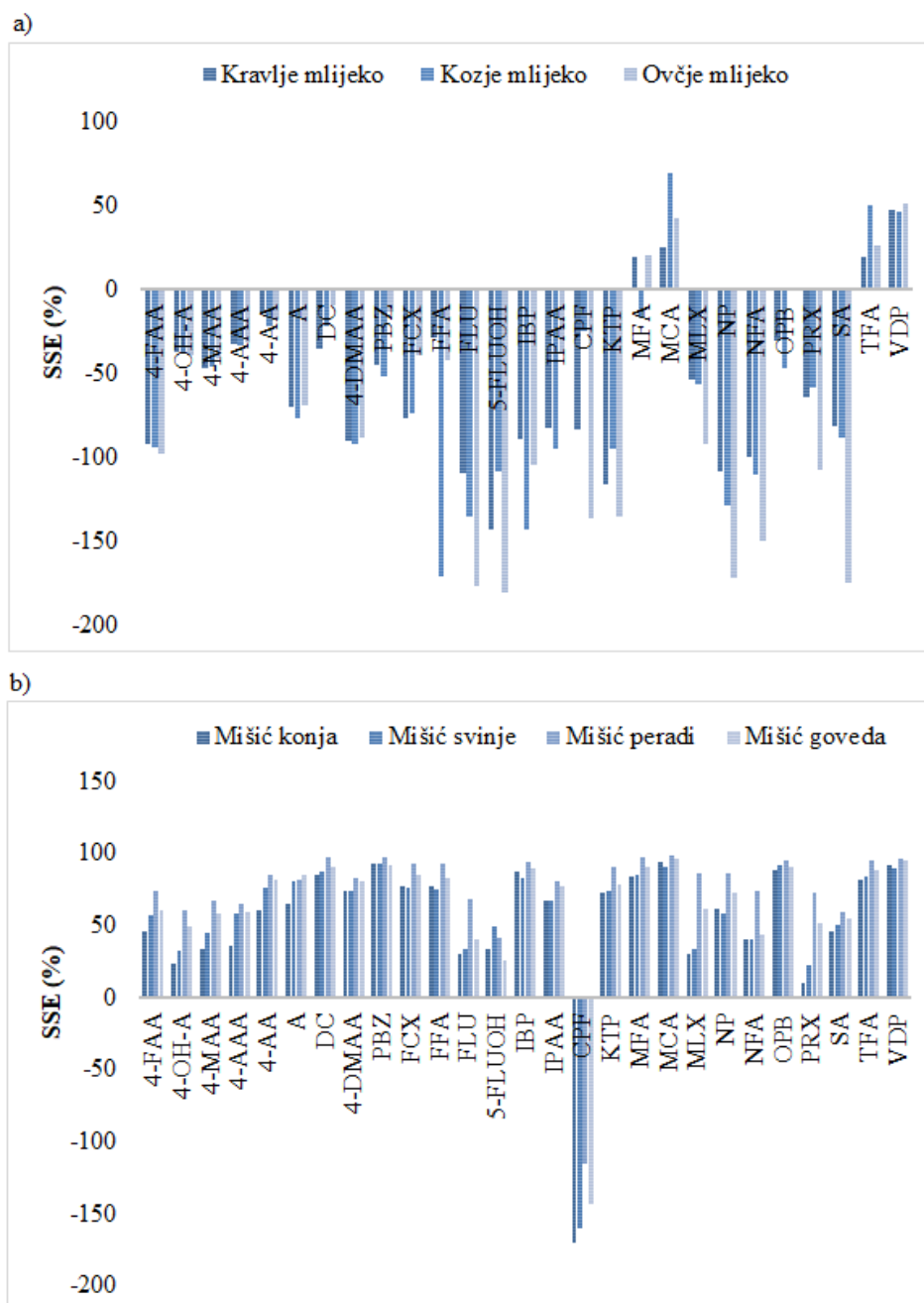
NSAID	Razina obogaćenja ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Iskorištenje (%)		RSD_r (%)		RSD_{wR} (%) pri		$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		U (%)	
	I	II	III	pri $CC\alpha$		pri $CC\alpha$		CC α							
	Mlijeko	Mišić		Mlijeko	Mišić	Mlijeko	Mišić	Mlijeko	Mišić	Mlijeko	Mišić	Mlijeko	Mišić	Mlijeko	Mišić
4-AA	25-50-75	10-20-30		99,8	101,4	3,2	5,4	5,7	7,4	28,5	12,1	31,9	13,6	11,4	15,2
4-AAA	20-40-60	1-2-3		100,6	100,8	3,4	2,7	5,9	7,3	23,1	1,2	25,5	1,35	12,1	14,8
4-FAA	1-2-3	20-40-60		102,2	99,9	15,2	4,3	16,0	8,4	1,39	24,7	1,94	27,9	32,6	17,4
4-OH-A	25-50-75	20-40-60		98,8	100,7	16,7	6,5	18,5	11,0	36,8	26,3	46,7	31,3	37,7	22,9
4-MAA	25-50-75	50-100-150		99,1	100,6	7,1	5,1	7,6	6,0	30,1*/56,7	61,1*/111,1	34,8*/65,2	69,7*/123,9	15,4	16,2
A	1-2-3	1-2-3		99,9	98,9	4,0	2,6	4,5	4,5	1,11	1,12	1,19	1,23	9,11	9,11
CPF	1-2-3	2-4-6-500		100,0	100,1	4,0	2,5	5,3	6,3	1,13	2,21*/518,6	1,24	2,38*/542,9	10,8	4,19
DC	0,05-0,1-0,15	2,5-5-7,5		99,9	100,0	3,8	3,5	4,7	4,2	0,06*/0,11	3,04*/5,39	0,07*/0,12	3,41*/5,79	9,52	8,68
4-DMAA	1-2-3	1-2-3		98,1	100,5	12,1	2,6	14,2	4,2	1,37	1,12	1,73	1,19	28,9	8,69
PBZ	1-2-3	3-6-9		100,7	99,9	3,7	2,7	5,3	3,6	1,14	3,3	1,24	3,54	10,8	7,36
FCX	5-10-15	5-10-15		100,4	99,8	2,4	3,1	3,7	3,8	5,48	5,92*/10,7	5,89	6,54	7,62	7,73
FFA	1-2-3	1-2-3		99,8	99,3	3,4	4,5	4,5	6,5	1,11	1,18	1,21	1,33	9,14	13,5
FLU	1-2-3	5-10-15		100,6	99,8	3,0	2,9	5,2	5,7	1,13	5,79*/10,6	1,24	6,38*/11,3	10,6	7,17
5-FLUOH	20-40-60	3-6-9		99,9	100,3	4,4	5,5	4,7	6,1	22,7*/43,2	3,52	24,9*/46,9	3,89	10,9	12,6
IBP*	5-10-15	3-6-9		101,1	99,7	3,3	3,3	4,9	6,1	5,64	3,52	6,19	3,88	10,0	12,7
IPAA	1-2-3	5-10-15		106,5	98,8	7,7	10,9	11,7	12,8	1,33	6,77	1,65	7,94	23,8	26,4
KTP	1-2-3	1-2-3		100,7	102,7	2,6	2,4	4,9	4,0	1,13	1,12	1,22	1,19	9,99	8,22
MFA	1-2-3	3-6-9		100,3	99,8	2,6	2,3	3,4	3,9	1,09	3,33	1,16	3,58	6,86	8,05
MCA	5-10-15	20-40-60		100,1	99,1	3,6	3,0	4,6	3,2	5,59	21,8	6,08	23,0	9,39	6,55
MLX	7,5-15-22,5	10-20-30		100,3	100,0	8,1	2,8	8,1	4,5	9,1*/17,1	12,1*/21,6	10,6*/19,9	13,6*/23,3	16,4	9,03
NP	1-2-3	2-4-6		101,2	99,7	2,7	3,1	4,2	4,1	1,11	2,23	1,2	2,40	8,59	8,53
NFA	5-10-15	2-4-6		100,6	99,6	3,5	7,3	5,9	8,9	5,77	2,49	6,37	2,81	12,1	18,2
OPB	1-2-3	3-6-9		101,6	102,6	6,3	6,5	7,2	15,2	1,19	4,3	1,34	5,01	14,7	30,6
PRX	1-2-3	20-40-60		100,8	99,0	2,1	4,4	3,2	7,0	1,08	23,8	1,15	26,7	6,43	14,2
SA	4,5-9-13,5	20-40-60-200		100,6	100,2	4,3	2,5	4,4	4,9	5,07*/9,72	23,3*/209,4	5,56*/10,5	26,2*/233,3	8,85	5,34
TFA	25-50-75	25-50-75		100,1	99,9	2,5	3,2	3,1	4,6	27,4*/52,7	29,8*/54,2	29,6*/55,7	33,4*/58,5	6,20	9,41
VDP	7,5-15-22,5	25-50-75		105,2	100,4	6,4	3,4	9,7	3,9	9,47	28,2*/53,5	10,9	30,8	19,6	7,81

Kratice: RSD_r , ponovljivosti; RSD_{wR} , unutar-laboratorijske obnovljivost; U, mjerna nesigurnost.

* $CC\alpha$ i $CC\beta$ pri najnižoj validacijskoj razini u testiranih vrsta za koje nije postavljena NDK vrijednost.

4.1.3.4 Utjecaj matrice

Utjecaj matrice ispitan je i izračunat prema postupku opisanom u Poglavlju 3.2.2.4, a dobiveni rezultati pokazali su snažan utjecaj matrice. Signal je potisnut ili pojačan ovisno o analitu i matrici. Niti jedan od ispitivanih NSAID-ova nije imao zanemariv utjecaj matrice u svim životinjskim vrstama analiziranih matrica. Uočeni su mali ($< \pm 20\%$), srednji (od $\pm 20\%$ do $\pm 50\%$) i jaki ($> \pm 50\%$) utjecaji matrice testiranih uzorka (slika 19, a i b).

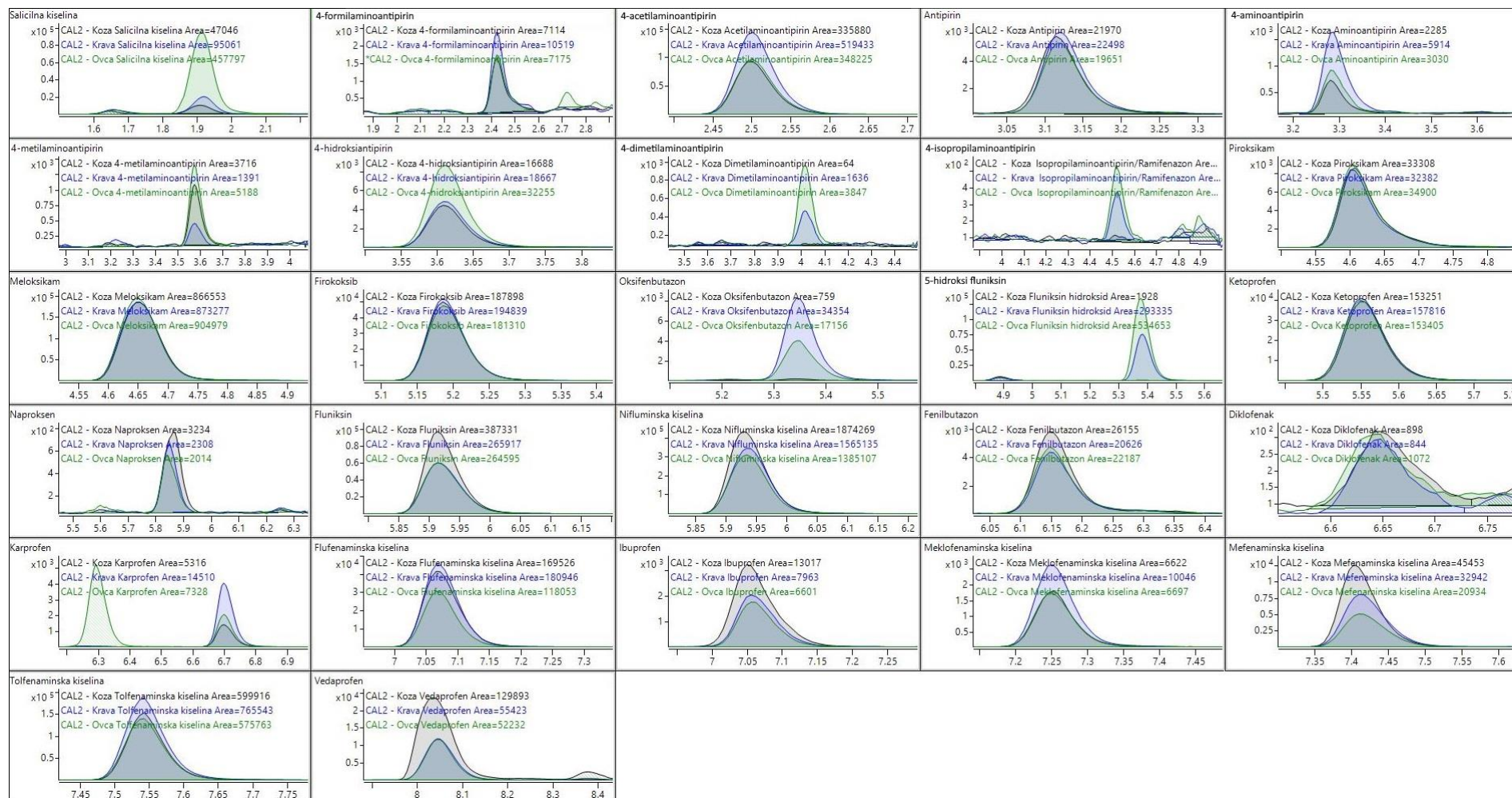


Slika 19. Utjecaj matrice u a) mlijeku i b) mišićnom tkivu različitih životinjskih vrsta na NSAID-ove.

U mlijeku, prema smanjenju/pojačanju ionskog signala (SSE vrijednosti) svih spojeva, u najvećoj mjeri signal analita je potisnut, osim kod MCA, TFA i VDP gdje je prisutno pojačanje signala analita. Povećan negativan trend utjecaja matrice uočen je za 15 analita u kravljem, 17 analita u ovčjem i 13 analita u kozjem mlijeku. Za isti analit, kao što su MFA i PBZ, u istoj matrici, ali različitim vrstama životinja, uočeni su različiti učinci. Mlijeko, kod svih životinjskih vrsta, imalo je najmanji utjecaj na analit 4-AA (SSE (srednja) vrijednost -18%). Iako je kod većine spojeva u uzorcima mišićnog tkiva zabilježeno pojačanje signala, CPF je bio pod negativnim utjecajem matrice. Najveće pojačanje signala zabilježeno je za analite u negativnoj ionizaciji, kao što su PBZ, FFA, IBP, MFA, OPB i VDP, ali i za DC i TFA koji su u pozitivnoj ionizaciji.

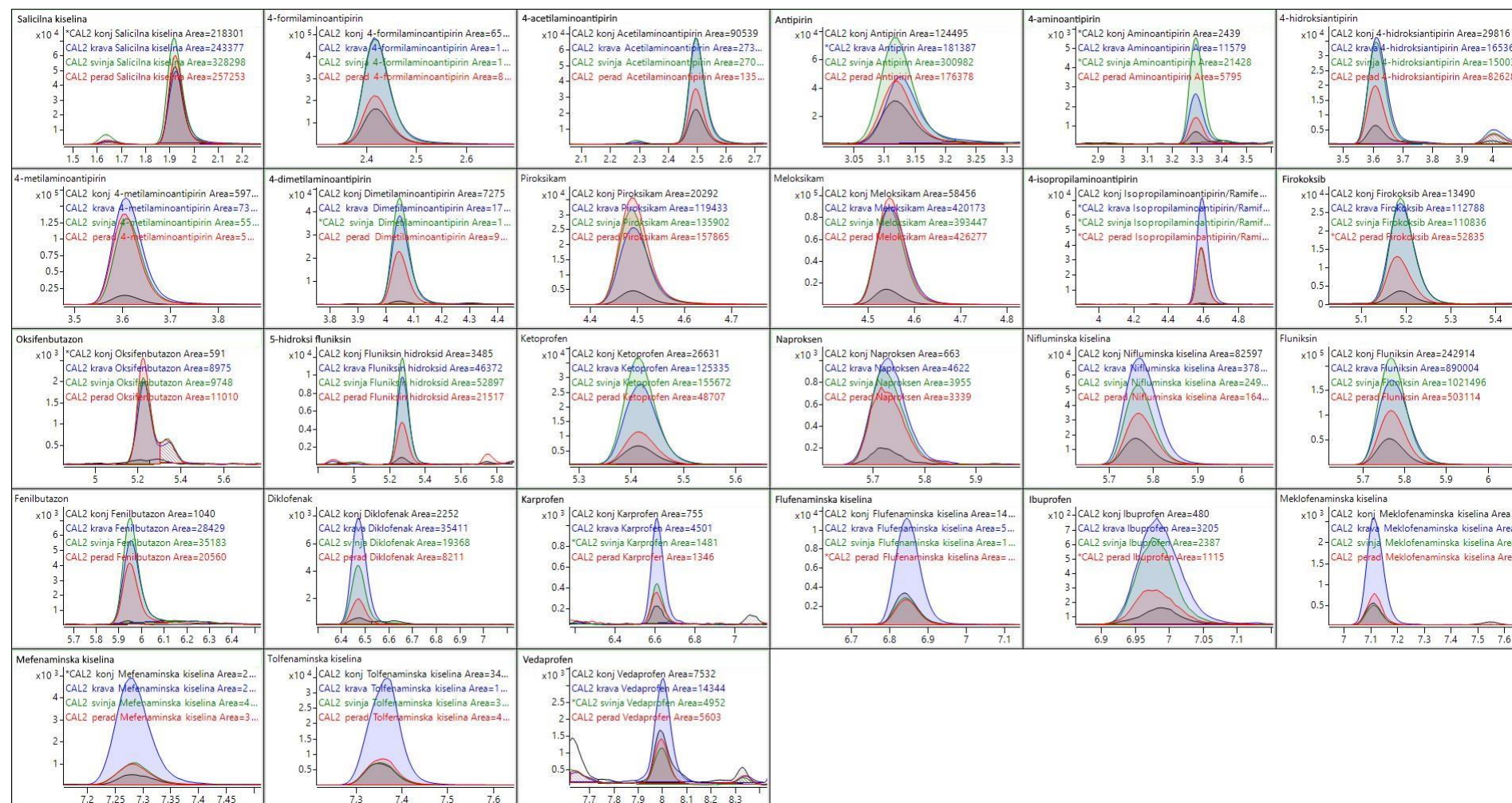
Nadalje, pri usporedbi obogaćenih uzoraka na NDK/VR vrijednost, uočen je različit odziv analita među pojedinim životinjskim vrstama testiranih matrica (slika 20, a i b).

a)



Slika 20. UHPLC-MS/MS kromatogrami bazičnih i kiselih NSAID-ova različitih životinjskih vrsta a) mlijeka i b) mišićnog tkiva, obogaćenih na NDK/VR vrijednost.

b)



Slika 20. (nastavak)

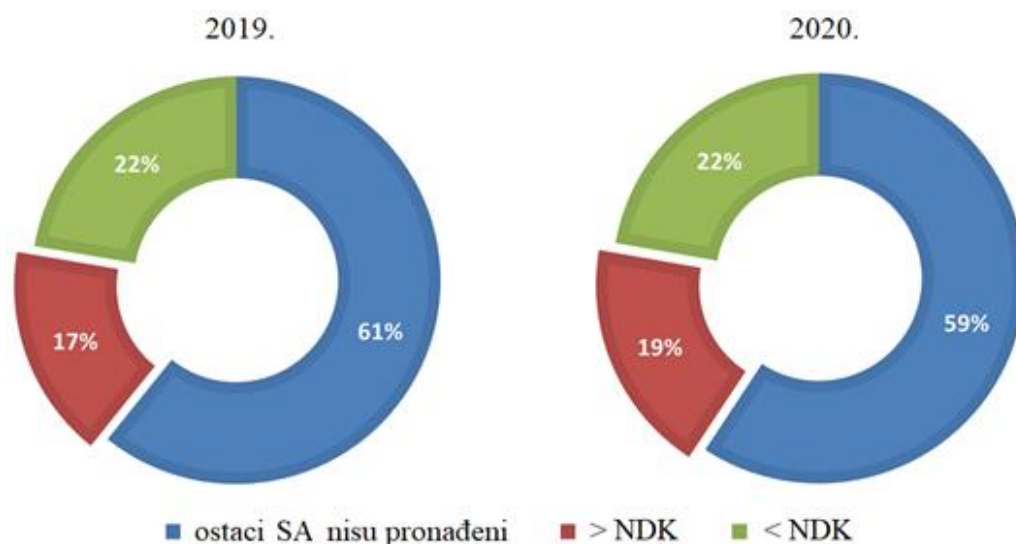
4.2 Određivanje NSAID-ova u realnim uzorcima

Predloženom metodom ispitano je prisustvo 27 NSAID-ova u 449 uzoraka hrane životinjskog podrijetla (mlijeko i mišićno tkivo) iz svih hrvatskih županija kao dio rutinske kontrole Državnog programa monitoringa rezidua (DPMR) te 96 uzoraka iz vodenog okoliša, točnije otpadnih voda, iz područja kontinentalne RH iz 2019. i 2020. godine. Ukupno tri uzorka mlijeka iz 2019. godine i tri uzorka mlijeka iz 2020. godine nije bilo sukladno prema propisanoj NDK vrijednosti (EZ, 2010), odnosno CC α vrijednosti u slučaju kada nisu definirane regulatorne granice te dva uzorka mišića iz 2019. godine. Najzastupljeniji NSAID u uzorcima mlijeka je diklofenak (85,7 %), a u uzorcima mišićnog tkiva ketoprofen (100 %). Nesukladni rezultati mlijeka i mišićnog tkiva prikazani su u tablici 15. Rezultati pojavnosti salicilne kiseline u uzorcima mlijeka i mišićnog tkiva prikazani su na slici 21.

Tablica 15. Nesukladni rezultati za uzorke mlijeka i mišića tijekom 2019. i 2020. godine.

Godina	Broj uzoraka (n)	Vrsta uzorka (n)	NSAID (n)	Životinjska vrsta (n)	\geq CC α Koncentracija sred. (min-maks) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Učestalost pojavnosti (%)
2019.	260	Mlijeko (135)	Diklofenak (3)	Krava (2)	0,188 (0,162-0,214)	2,22
				Koza (1)	0,122	
		Mišić (125)	Ketoprofen (2)	Govedo	59,5	1,60
				Svinja	3,12	
2020.	189	Mlijeko (133)	Diklofenak (3)	Krava (2)	1,21 (0,433-1,99)	2,26
			4-hidroksiantipirin	Koza (1)	0,167	0,752
				Krava	53,9	
		Mišić (56)		n.d.		

Kratice: n.d., nije detektiran.



Slika 21. Pojavnost salicilne kiseline u analiziranim uzorcima mlijeka i mišića tijekom 2019. i 2020. godine.

U ukupno 36 uzoraka mlijeka i 8 uzoraka mišićnog tkiva uzorkovanih tijekom 2019. godine te u 35 uzoraka mlijeka iz 2020. godine otkriveni su ostaci SA.

Rezultati mjerenja koncentracija NSAID-ova u uzorcima otpadnih voda prikazani su u tablici 16, dok se detaljniji prikaz rezultata ulaznih i izlaznih voda s komunalnih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) Zagrebačkih otpadnih voda d.o.o. (ZOV), Vinkovačkog vodovoda i kanalizacije te UPOV-a Križevci, Bjelovar, Vrbovec, Veliko Trojstvo i Sveti Ivan Žabno, nalazi u tablici 17.

Tablica 16. Pojavnost NSAID-ova u uzorcima otpadne vode.

Broj	Vrsta uzorka	Broj uzoraka	Raspon koncentracija kalibracije u matrici/LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	NSAID (n)	Koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
					Srednja	Min.	Maks.
1.	UPOV _{ul}	31	0,025-1/0,089	Diklofenak (28)	0,346	0,101	1,27
			2,5-20/1,92	Ibuprofen (27)	10,2	2,23	26,5
			0,5-20/0,394	Ketoprofen (27)	0,802	0,348	2,3
			0,5-20/0,295	Naproksen (22)	2,69	0,80	8,99
			0,5-20/0,409	4-formilaminoantipirin (10)	6,59	0,65	18,7
2.	UPOV _{iz}	33		Diklofenak (29)	0,261	0,033	1,41
				Ibuprofen (6)	23,5	5,79	59,1
				Ketoprofen (4)	1,04	0,568	1,46
				Naproksen (6)	5,19	1,25	14,5
				4-formilaminoantipirin (5)	0,747	0,625	1,03
3.	Bolnica _{ul}	4		Diklofenak (4)	1,4	0,317	2,97
				Ibuprofen (4)	24,0	4,84	38,5
				Ketoprofen (4)	6,99	2,24	16,4
				Naproksen (4)	13,1	1,83	18,8
				4-formilaminoantipirin (4)	3,17	0,828	6,5
			10-80/6,83	4-acetilaminoantipirin (2)	12,2	9,9	14,5
			12,5-100/8,74	4-aminoantipirin (1)	17,4	17,4	17,4
			0,5-20/0,354	Fenilbutazon (1)	0,747	0,747	0,747
0,5-20/0,044	Oksifenbutazon (1)	1,36	1,36	1,36			
4.	Bolnica _{iz}	4		Diklofenak (4)	1,53	0,808	2,4
				Ibuprofen (4)	29,7	15,0	60,8
				Ketoprofen (4)	6,45	3,43	9,0
				Naproksen (4)	19,2	12,8	36,6
				4-formilaminoantipirin (4)	3,57	1,91	7,42
				4-acetilaminoantipirin (2)	9,47	2,94	16,0
				4-aminoantipirin (1)	17,5	17,5	17,5
				Fenilbutazon (1)	0,683	0,683	0,683
5.	Bolnica	9		Oksifenbutazon (1)	1,33	1,33	1,33
				Diklofenak (8)	0,348	0,117	1,18
				Ibuprofen (5)	12,4	3,57	28,5
				Ketoprofen (6)	1,0	0,498	1,78
				Naproksen (6)	4,15	0,89	13,2
				4-formilaminoantipirin (8)	3,55	0,734	13,3
				4-acetilaminoantipirin (4)	17,4	4,79	36,0
			12,5-100/11,6	4-hidroksiantipirin (1)	13,5	13,5	13,5
	4-aminoantipirin (1)	18,0	18,0	18,0			
	2,5-90/1,364	Salicilna kiselina (2)	21,4	5,75	37,1		

Tablica 16. (nastavak)

Broj	Vrsta uzorka	Broj uzoraka	Raspon koncentracija kalibracije u matrici/LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	NSAID (n)	Koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
					Srednja	Min.	Maks.
6.	Industrijske vode	11		Diklofenak (7)	0,335	0,065	1,11
				Ibuprofen (6)	18,6	5,02	37,5
				Ketoprofen (4)	2,06	0,532	3,29
				Naproksen (4)	17,3	2,85	54,2
7.	Crpna sabirna stanica	4		Diklofenak (4)	0,966	0,670	1,47
				Ibuprofen (4)	16,2	8,82	26,5
				Ketoprofen (3)	2,24	1,21	4,3
				Naproksen (4)	2,35	0,722	5,93
				4-formilaminoantipirin (2)	0,755	0,646	0,864

Kratice: LOQ, limit kvantifikacije; UPOV_{ul}, ulazna otpadna voda na uređaj za pročišćavanja otpadnih voda; UPOV_{iz}, izlazna (pročišćena) otpadna voda s uređaja za pročišćavanja otpadnih voda; min., najniža zabilježena koncentracija; maks., najviša zabilježena koncentracija.

Tablica 17. Lokacije i koncentracije prisutnih ostataka NSAID-ova u uzorcima ulaznih i izlaznih voda s UPOV-a.

NSAID	Lokacija uzorkovanja (n)	Broj detektiranih spojeva (ul/iz)	Koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
			Ulaz			Izlaz		
			Srednja	Min.	Maks,	Srednja	Min.	Maks.
Diklofenak	Zagrebačke otpadne vode d.o.o. (n = 6)	6/4	0,124	0,101	0,172	0,078	0,054	0,107
	UPOV Križevci (n = 2)	1/1	0,303	0,303	0,303	0,290	0,290	0,290
	UPOV Bjelovar (n = 1)	1/1	0,607	0,607	0,607	0,721	0,721	0,721
	UPOV Vrbovec (n = 1) - izlaz	1	n.d.	n.d.	n.d.	0,047	0,047	0,047
	UPOV Veliko Trojstvo (n = 2)	2/2	0,155	0,109	0,2	0,093	0,033	0,154
	UPOV Sveti Ivan Žabno (n = 1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Vinkovački vodovod i kanalizacija:							
	Vinkovci (n = 6)	6/6	0,341	0,244	0,465	0,287	0,168	0,554
	Nuštar (n = 4)	4/4	0,621	0,240	0,973	0,964	0,394	1,41
	Cerna (n = 1)	1/1	1,26	1,26	1,26	0,929	0,929	0,929
	Otok (n = 2)	2/2	0,285	0,220	0,351	0,274	0,089	0,460
	Komunalac Županja (n = 6)	6/6	0,867	0,599	1,27	0,267	0,123	0,352
	Ibuprofen	Zagrebačke otpadne vode d.o.o.	6	3,22	2,23	4,10		n.d.
UPOV Križevci		2/2	3,21	0,538	5,89	32,5	5,79	59,1
UPOV Bjelovar		1/1	26,5	26,5	26,5	n.d.	n.d.	n.d.
UPOV Vrbovec		1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
UPOV Veliko Trojstvo		2/n.d.	18,0	14,1	22,0	n.d.	n.d.	n.d.
UPOV Sveti Ivan Žabno		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vinkovački vodovod i kanalizacija:								
Vinkovci		5/n.d.	7,38	5,47	10,8	n.d.	n.d.	n.d.
Nuštar		3/2	9,57	5,80	13,9	11,2	9,37	13,0
Cerna		1/n.d.	11,67	11,67	11,67	n.d.	n.d.	n.d.
Otok		2	3,41	3,41	3,41	2,50	2,50	2,50
Komunalac Županja		6/1	13,7	9,62	20,0	33,4	33,4	33,4

Tablica 17. (nastavak)

NSAID	Lokacija uzorkovanja (n)	Broj detektiranih spojeva (ul/iz)	Koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
			Ulaz			Izlaz			
			Srednja	Min.	Maks,	Srednja	Min.	Maks.	
Ketoprofen	Zagrebačke otpadne vode d.o.o.	5/n.d.	0,540	0,506	0,589	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Križevci	1/2	0,348	0,348	0,348	0,665	0,568	0,763	
	UPOV Bjelovar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Vrbovec	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Veliko Trojstvo	2/n.d.	0,751	0,590	0,912	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Sveti Ivan Žabno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Vinkovački vodovod i kanalizacija:								
	Vinkovci	6/n.d.	1,16	0,870	1,68	n.d.	n.d.	n.d.	
	Nuštar	4/2	1,28	0,627	2,15	1,40	1,35	1,46	
	Cerna	1	0,573	0,573	0,573	n.d.	n.d.	n.d.	
	Otok	2	0,552	0,552	0,552	n.d.	n.d.	n.d.	
	Komunalac Županja	6/n.d.	1,54	0,530	2,30	n.d.	n.d.	n.d.	
	Naproksen	Zagrebačke otpadne vode d.o.o.	3/n.d.	1,05	1,02	1,12	n.d.	n.d.	n.d.
UPOV Križevci		1/2	0,801	0,801	0,801	7,88	1,25	14,5	
UPOV Bjelovar		1/n.d.	8,99	8,99	8,99	n.d.	n.d.	n.d.	
UPOV Vrbovec		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
UPOV Veliko Trojstvo		1/n.d.	1,41	1,41	1,41	n.d.	n.d.	n.d.	
UPOV Sveti Ivan Žabno		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Vinkovački vodovod i kanalizacija:									
Vinkovci		6/n.d.	1,86	1,23	2,63	n.d.	n.d.	n.d.	
Nuštar		4/3	2,49	1,50	3,18	1,83	1,25	2,64	
Cerna		1/n.d.	4,44	4,44	4,44	n.d.	n.d.	n.d.	
Otok		2/1	3,84	2,44	5,24	4,56	4,56	4,56	
Komunalac Županja		6/n.d.	4,90	3,80	7,24	n.d.	n.d.	n.d.	

Tablica 17. (nastavak)

NSAID	Lokacija uzorkovanja (n)	Broj detektiranih spojeva (ul/iz)	Koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
			Ulaz			Izlaz				
			Srednja	Min.	Maks,	Srednja	Min.	Maks.		
4-formilaminoantipirin	Zagrebačke otpadne vode d.o.o.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Križevci	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Bjelovar	n.d./1	n.d.	n.d.	n.d.	0,564	0,564	0,564		
	UPOV Vrbovec	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Veliko Trojstvo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	UPOV Sveti Ivan Žabno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Vinkovački vodovod i kanalizacija:									
	Vinkovci	1/1	0,834	0,834	0,834	0,629	0,629	0,629		
	Nuštar	3/3	6,36	0,648	17,8	0,826	0,625	1,03		
	Cerna	1/1	0,750	0,750	0,750	0,629	0,629	0,629		
	Otok	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Komunalac Županja	4/n.d.	5,23	0,625	18,7	n.d.	n.d.	n.d.		

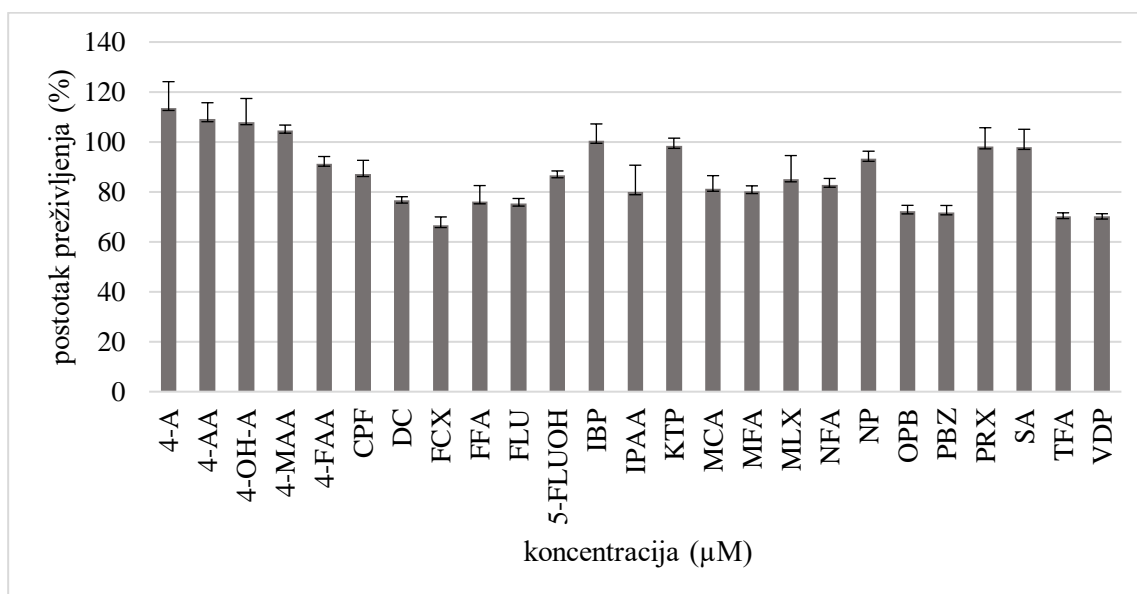
Kratice: n, broj analiziranih uzoraka; n.d., nije detektiran; ul, ulaz; iz, izlaz; maks., najviša zabilježena koncentracija; min., najmanja zabilježena koncentracija; UPOV, uređaj za pročišćavanje otpadnih voda;

U analiziranim uzorcima otpadnih voda pronađeni su ostaci ukupno 11 različitih NSAID-ova u koncentracijama iznad limita kvantifikacije (LOQ). Najčešće otkriveni NSAID-ovi su diklofenak u 84 (87,5 %), ibuprofen u 56 (58,3 %), ketoprofen u 52 (54,2 %) i naproksen u 50 (52,1 %) uzoraka u rasponu koncentracija od 0,033 $\mu\text{g L}^{-1}$ za diklofenak do 60,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ za ibuprofen. U bolničkim otpadnim vodama za diklofenak (2,97 $\mu\text{g L}^{-1}$) i ketoprofen (16,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) zabilježene su najveće koncentracije. Kod kompozitnih uzoraka otpadnih voda s ulaza i izlaza UPOV-a, najveće koncentracije su utvrđene za diklofenak (ulaz = 1,06 $\mu\text{g L}^{-1}$, izlaz = 1,27 $\mu\text{g L}^{-1}$) i ibuprofen (ulaz = 25,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, izlaz = 63,6 $\mu\text{g L}^{-1}$). U trenutno prikupljenim uzorcima industrijskih voda, najveće koncentracije su otkrivene kod ibuprofena (18,6 $\mu\text{g L}^{-1}$) i naproksena (17,3 $\mu\text{g L}^{-1}$).

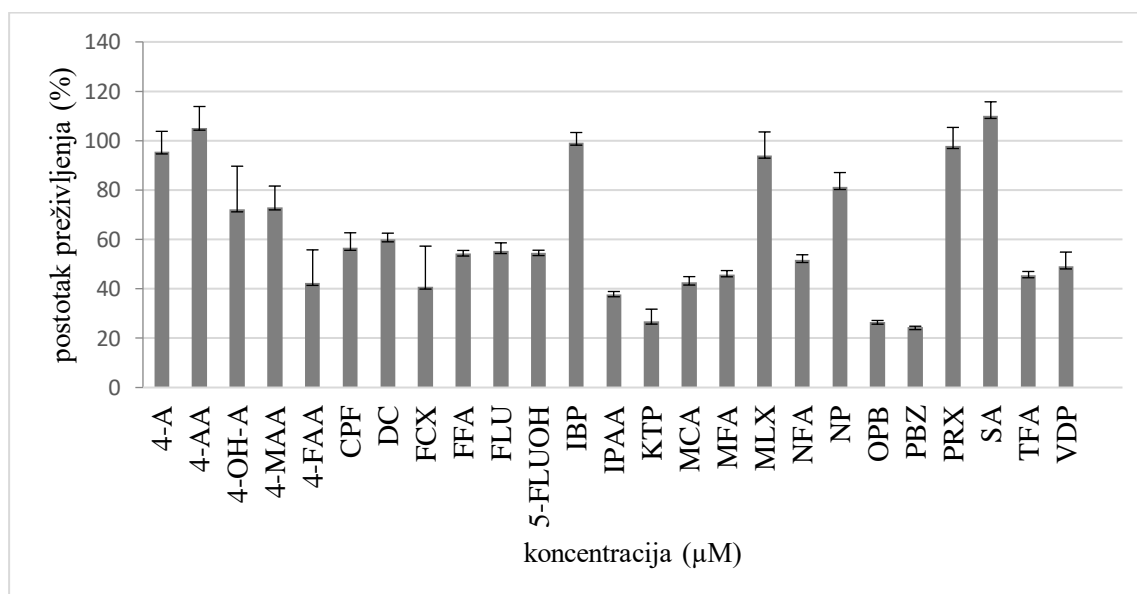
4.3 Učinak NSAID-ova na preživljenje RTG-2 i HEK-293T stanica

Učinak 25 NSAID-ova na preživljenje RTG-2 i HEK-293T stanica ispitan je nakon što su stanice naciyepljene u ploče s 96 jažica te nakon 24 sata inkubacije tretirane s određenim koncentracijama NSAID-ova (50 μM , 100 μM i 250 μM). Nakon 72 sata od tretmana vijabilnost stanica određena je MTS metodom. Iz očitanih apsorbancija za svaki uzorak izračunate su srednje vrijednosti te je određen postotak preživljenja u odnosu na kontrolne stanice. Grafički prikaz rezultata, kao ovisnost postotka preživljenja stanica o koncentraciji NSAID-ova kojim su tretirane, na slici 22 (a i b) opisuje učinak najveće testirane koncentracije ispitivanih NSAID-ova.

a)



b)

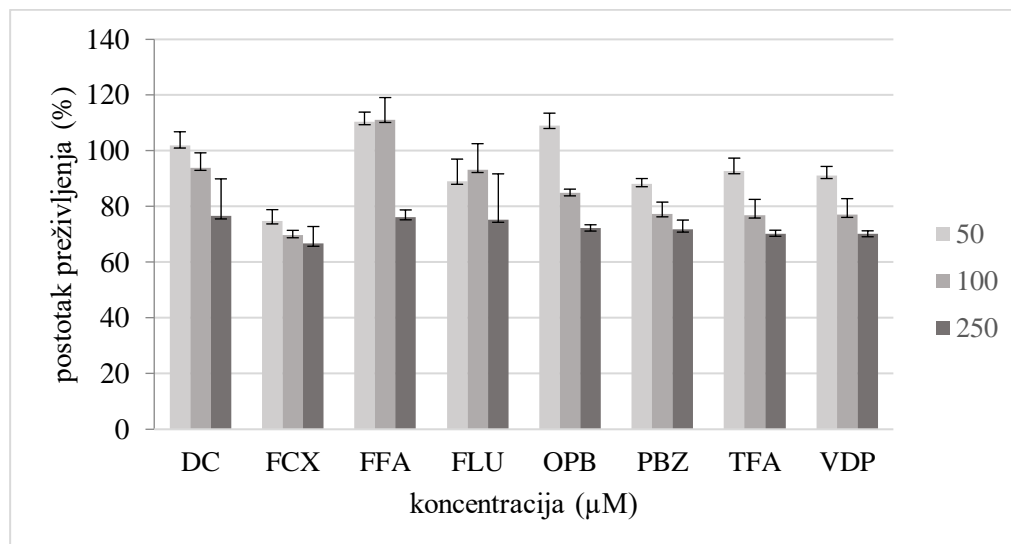


Slika 22. Učinci pojedinačnih NSAID-ova na preživljenje a) RTG-2 i b) HEK-293T stanica tretiranih najvećom testiranom koncentracijom (250 μ M) nakon 72 sata izloženosti korištenjem MTS testa. Podaci izraženi kao postotak neizloženih (kontrolnih) stanica \pm S.D.

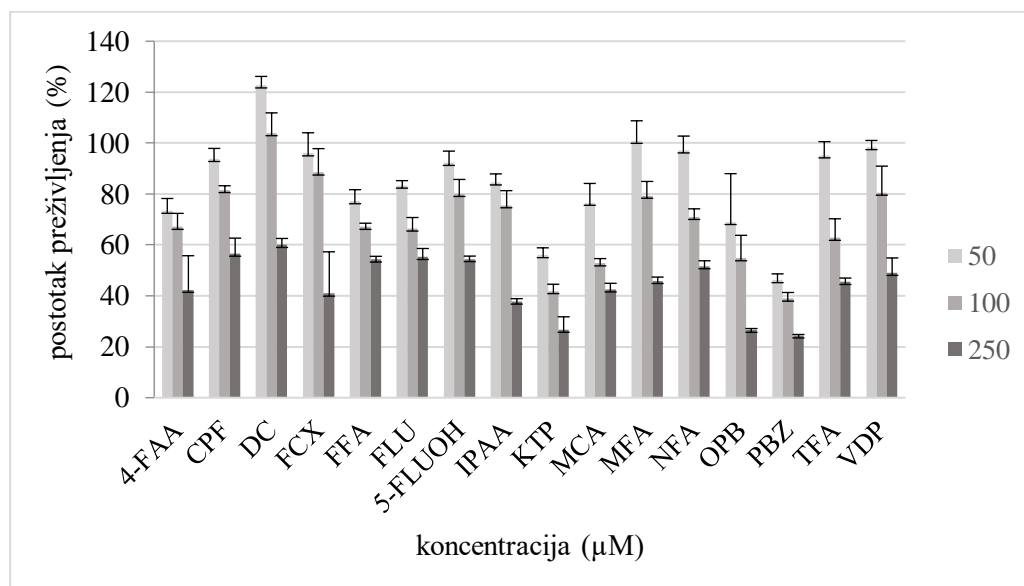
Na temelju dobivenih rezultata, izloženost RTG-2 stanica NSAID-ovima pokazala je blaži citotoksičan učinak (slika 22 a), dok je značajan citotoksični učinak NSAID-ova uočen na HEK-293T stanice (slika 22 b), posebno PBZ, OPB i KTP, a zatim IPAA, FCX, 4-FAA, MCA, MFA, TFA i VDP. Svi ispitivani NSAID-ovi testirani su u sve tri navedene koncentracije, međutim samo su za neke NSAID-ove, one koji su imali najizraženiji učinak pri najvećoj

ispitanoj koncentraciji, prikazani rezultati za sve tri koncentracije (slika 23, a i b) kako bi se vidjelo je li djelovanje ovisno o dozi .

a)



b)



Slika 23. Učinci odabranih NSAID-ova na preživljenje a) RTG-2 i b) HEK-293T stanica pri svim testiranim koncentracijama (50 µM, 100 µM, 250 µM) nakon 72 sata izloženosti korištenjem MTS testa. Podaci izraženi kao postotak neizloženih (kontrolnih) stanica ± S.D.

Postotak preživljenja linearno se smanjuje s povećanjem koncentracije određenog NSAID-a, odnosno učinak ispitivanih analita ovisan je o dozi. Na temelju rezultata prikazanih na slici 23 b dobivenih na stanicama HEK-293T izračunate su IC_{50} vrijednosti za one NSAID-ove koji su pokazali inhibiciju rasta stanica ≥ 50 %. IC_{50} vrijednosti izračunate su iz krivulja doza-

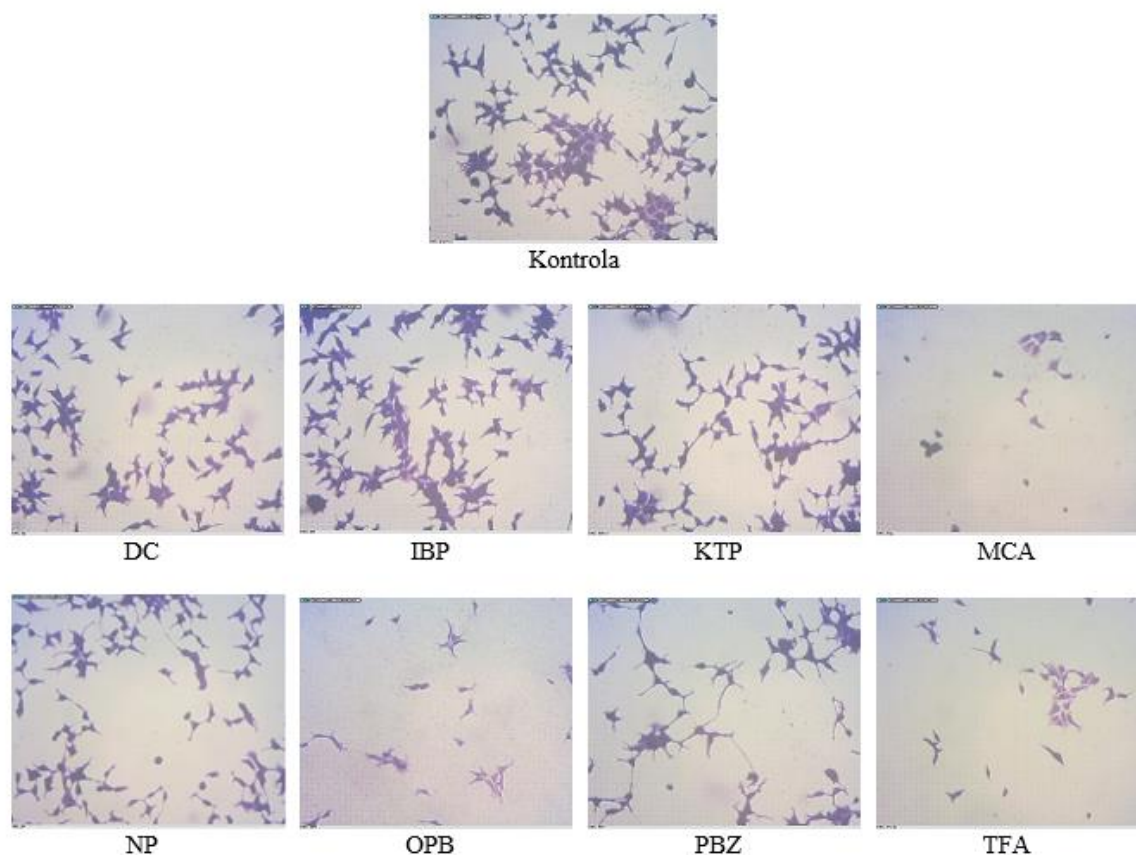
odgovor korištenjem pripadajućih jednadžbi, a prikazane su u tablici 18. Za RTG-2 stanice, IC_{50} vrijednosti nisu izračunate budući da niti jedan od ispitivanih NSAID-ova nije uzrokovao inhibiciju rasta stanica $\geq 50\%$.

Tablica 18. IC_{50} vrijednosti za HEK-293T stanice.

NSAID	IC_{50} (μM)	IC_{50} ($g L^{-1}$)
4-FAA	212.0	0.049
FCX	221.4	0.075
IPAA	200.3	0.049
KTP	71.0	0.018
MCA	106,5	0,032
MFA	229.7	0.055
OPB	134.1	0.044
PBZ	5.91	0.002
TFA	215.1	0.056
VDP	242.3	0.068

Manja IC_{50} vrijednost odgovara jačem citotoksičnom učinku ispitivanog spoja te prema izračunatim vrijednostima možemo zaključiti kako najjači citotoksični učinak na HEK-293T stanice ima PBZ ($IC_{50} = 5,91 \mu M$), a zatim slijede KTP ($IC_{50} = 71,0 \mu M$) i OPB ($IC_{50} = 134,1 \mu M$).

Tijekom tretmana RTG-2 i HEK-293T stanica izgled stanica praćen je svjetlosnim mikroskopom, a kako bi se utvrdile morfološke promjene izazivane djelovanjem NSAID-ova u odnosu na kontrolne stanice, dodatno je provedeno bojanje stanica s otopinom kristal-ljubičasto 72 sata nakon tretmana (slika 24).



Slika 24. Svjetlosna mikroskopija HEK-293T stanica obojane otopinom kristal-ljubičasto nakon 72 sata tretmana s diklofenakom (DC), ibuprofenom (IBP), ketoprofenom (KTP), meklofenaminskom kiselinom (MCA), naproksenom (NP), oksifenbutazonom (OPB), fenilbutazonom (PBZ) i tolfenaminskom kiselinom (TFA) u koncentraciji od 100 μM (povećanje 400 x).

Usporedbom kontrolnih i tretiranih stanica vidljive su promjene u gustoći i broju stanica, narušen je izgled staničnog monosloja i kontakti između stanica zbog čega se stanice zaokružuju i odvajaju od podloge za rast te su vidljive morfološke promjene u izgledu stanica tretiranih NSAID-ovima.

5. RASPRAVA

Prisutnost ostataka raznih veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP) u hrani životinjskog podrijetla i u okolišu danas su dobro poznati i zahtijevaju razvoj naprednih analitičkih metoda visoke osjetljivosti i selektivnosti kojima će se istovremeno određivati veliki broj kemijski različitih spojeva u kratkom vremenskom periodu bez kompleksnih postupaka pripreme uzoraka. Jedni od tih spojeva koji zauzimaju značajno mjesto u humanoj i veterinarskoj medicini, zbog sve učestalije primjene zahvaljujući svojem analgetskom, protuupalnom i antipiretskom djelovanju, su nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID). Njihova prisutnost u hrani životinjskog podrijetla može biti posljedica pogrešnog i nedopuštenog liječenja kao i nepoštivanja vremena karencije. Isto tako eliminacijom iz organizma, ispuštanjem iz farmaceutskih i bolničkih postrojenja ili nesavjesnim odlaganjem, dolaze u okoliš gdje čine bitnu skupinu okolišnih zagađivača, a kao njihov krajnji recipijent, vodeni okoliš i njegovi organizmi su najizloženiji tom negativnom utjecaju onečišćenja. Zbog činjenice da za velik broj lijekova još nisu poznate vrijednosti njihovih koncentracija kao ni sudbina ni moguće aktivnosti odnosno rizici za neciljane organizme u okolišu, predmet su brojnih istraživanja posljednjih godina. Stoga je praćenje njihove pojavnosti važno u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane kao i u procjeni onečišćenja okoliša. Kako bi se dobile informacije o toksičnosti tih spojeva koje dopijevaju u okoliš, potrebno je rješavanju tog problema pristupiti kombinacijom kemijskih i bioloških (*in vitro*) analiza. Glavna prepreka istovremenom određivanju kiselih i bazičnih NSAID-ova objedinjenom analitičkom metodom, umjesto dosadašnjih većinom odvojenih, upravo je ta njihova kemijska raznolikost. Ovim istraživanjem je po prvi puta učinjena analiza 27 NSAID-ova, kemijski raznolike prirode, u hrani životinjskog podrijetla i uzorcima vode (otpadne) iz okoliša, nakon što je razvijena, optimirana i validirana analitička metoda za istovremeno određivanje i kiselih i bazičnih NSAID-ova, kako bi se mogla pratiti njihova stvarna koncentracija u tim uzorcima. Također je ispitana citotoksičnost NSAID-ova na staničnoj liniji riba (RTG-2) i ljudi (HEK-293T) s ciljem procjene rizika za okoliš i ljude.

5.1 Razvoj i validacija UHPLC-MS/MS metode za određivanje ostataka NSAID-ova

5.1.1 Optimizacija instrumentalnih uvjeta

Za razdvajanje NSAID spojeva širokog spektra različitih skupina i različitih molekularnih masa te za pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju korišten je vezani sustav tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa (analizator masa trostruki kvadrupol, UHPLC-MS/MS), čime je stvoren preduvjet za određivanje njihovih ostataka u niskim koncentracijama i u složenim matricama.

Prvi korak razvoja metode uključivao je optimizaciju instrumentalnih parametara u svrhu postizanja visoke osjetljivosti (niske razine detekcije) i specifičnosti (selektivnosti) analitičke tehnike.

U masenom spektrometru (MS), ioni ispitivanih NSAID-ova odvajaju se prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Najprije, uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI) dolazi do protoniranja ili deprotoniranja, uglavnom njihovih karboksilnih nastavaka, pri čemu nastaju jednostruko pozitivno $[M+H]^+$ i negativno $[M-H]^-$ nabijeni molekularni NSAID ioni. U pozitivnoj ionizaciji uglavnom su izabrani $[M+H]^+$ oblici molekularnih iona, osim za vedaprofen koji je formirao ion s amonijevim aduktom $[M+NH_4]^+$ jačeg odziva od $[M+H]^+$, dok u negativnoj ionizaciji nastaju čisti molekularni ioni relativno malog intenziteta, a svi su prema svom specifičnom omjeru m/z izdvojeni u prvom kvadrupolu (Q1). Daljnjim postupkom, fragmentacijom se molekularni ion uslijed sudara s plinom dušikom u kolizijskoj ćeliji (q2) pretvara u produkt ion. Maseni spektri dva specifična i najintenzivnija produkt iona uz korištenje optimalne kolizijske energije odabrani su u trećem kvadrupolu (Q3) u načinu praćenja višestrukih reakcija (MRM) (slika 7 Poglavlja 4.1.1). Snimanje i obrada podataka provedeni su u *Agilent MassHunter Workstation 10.0* programu. Navedene MRM tranzicije (odabrani molekularni i produkt ioni) usporedive su s onima objavljenim u radu Jedziniak i sur. (2015) te onima iz metode referentnog laboratorija (EURL-BVL).

Kao jedan od zahtjeva za potvrdu identiteta spoja u matrici za koje je utvrđena najveća dopuštena količina ostataka (NDK), odobrena upotreba, potrebne su najmanje četiri identifikacijske točke. Za neodobrene ili zabranjene spojeve potrebno je pet identifikacijskih točaka, a jedna točka može potjecati iz kromatografske separacije (EU, 2021). U slučaju ibuprofena (IBP) metoda nije zadovoljila kriterije potvrde zbog nedovoljnog broja identifikacijskih točaka. Kao rezultat loše fragmentacije nisu se mogli dobiti stabilni produkt ioni iz njegovog deprotoniranog $[M-H]^-$ molekularnog iona (Božić Luburić i sur., 2021), što su također primijetili Britzi i Schwartsburd (2019). Stoga je za ibuprofen metoda bila prikladna

samo za potrebe orijentacijskog određivanja. Zajedno s identifikacijskim točkama, kako bi se zadovoljili drugi zahtjevi potvrdne metode, provjereno je vrijeme zadržavanja (engl. *Retention time*, RT) (tolerancija $\pm 2,5$ %) i omjeri iona (≤ 30 %) odabranih MRM tranzicija. Isto tako može se primijetiti kako pojedini spojevi kao što su 4-hidroksiantipirin/ibuprofen (4-OH-A/IBP) s m/z 205, 4-dimetilaminoantipirin/4-formilaminoantipirin (4-DMAA/4-FAA) s m/z 232 i 4-acetilaminoantipirin/isopropilaminoantipirin (4-AAA/IPAA) s m/z 246, imaju jednak omjer m/z molekularnog iona. Međutim, iako imaju isti m/z , potječu od strukturno različitih spojeva čijom fragmentacijom nastaju različiti produkt ioni koji osiguravaju njihovo lako odvajanje prema vremenu zadržavanja čime se postiže visoka specifičnost metode.

Parametri MS-a za metodu u načinu dinamičkog praćenja višestrukih reakcija (dMRM) rada podešeni su za svaki analit s ciljem dobivanja najvećeg odziva pojedinog MRM signala. dMRM način rada grupira MRM tranzicije u vremenske okvire zadržavanja umjesto u vremenske segmente zbog čega se ioni analita prate u kratkom vremenskom području oko vremena zadržavanja analita. Na taj način, dMRM povećava vrijeme zadržavanja onih analita koji se preklapaju, poboljšava odnos signal-šum (S/N), osigurava pravilnu integraciju, čime se poboljšava oblik pika i osjetljivost (Agilent, 2020). Optimizirane vrijednosti fragmentora kretale su se od 50 do 130 V. Optimizacija kolizijske energije provedena je u *Product Ion* načinu rada, tako da se pratio intenzitet nastalih produkt iona pri primijenjenoj energiji od 0, 10, 20 i 40 V. Za svaki analit, osim za spomenuti IBP, odabrana su dva stabilna produkt iona s najvećim odzivom, a za svaki od njih provedena je dodatna optimizacija kolizijske energije u MRM načinu rada kao i napona ubrzanja kolizijske (sudarne) ćelije (CAV) (tablica 11 Poglavlja 4.1.1). Budući da ostali parametri MS-a, kao što su temperatura i protok plina u izvoru, tlak plina u raspršivaču (*nebulizer*), temperatura i protok plina u omotaču (*sheath*), osim o prirodi spoja ovise i o UHPLC uvjetima (sastavu pokretne faze i protoku) isti su optimirani u prisustvu odabrane pokretne faze. Optimalna temperatura plina, protok plina na izvoru kao i tlak plina u raspršivaču za zadovoljavajuću ionizaciju svih spojeva iznosili su redom 300 °C, 9 L min^{-1} i 30 psi. Temperatura i protok plina u raspršivaču koji značajno utječu na osjetljivost metode iznosili su 400 °C i 11 L min^{-1} . Napon mlaznice, koji jako ovisi o strukturi i polarnosti spoja, iznosi 0 V, a napon kapilare, ovisan o molekularnoj masi spoja, 3,6 kV.

NSAID-ovi kao hidrofilni spojevi određuju se kromatografijom obrnutih faza. Najčešće korištene kolone kod LC-MS/MS analiza za određivanje NSAID-ova su C8 ili C18 kolone. Iako se prvo krenulo s ispitivanjem UHPLC kolona, poput Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, a zatim i UPLC Acquity BEH C18 (vidi Poglavlje 3.2.1.), kako bi se iskoristile sve prednosti UHPLC-MS/MS sustava, unatoč dobrom razdvajanju analita od interesa, ubrzo se ukazao problem brze

degradacije kolona uslijed porasta tlaka u koloni, nakon samo nekoliko injektiranja, koji bi kroz kratko vrijeme postigao svoj maksimum što bi rezultiralo prekidom analize te posljedičnim pomakom vremena zadržavanja analita, zbog čega je njihova primjena bila napuštena. Sličan problem, iako je nešto duže trajala od spomenutih UHPLC kolona, pojavio se i kod Poroshell SB-C18 kolone. Na Luna C8 i XBridge BEH C18 koloni nije postignuto zadovoljavajuće razlučivanje između pikova pojedinih analita. Na temelju dobivenih podataka (slika 8 Poglavlja 4.1.1), za kromatografsko odvajanje odabrana je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μm) uz korištenje pretkolone Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 12 mm, 5 μm), šira kolona s većom brzinom protoka (1 mL min^{-1}), zbog većeg područja robusnosti i zadovoljavajućeg razdvajanja ispitivanih NSAID-ova (slika 10, a i b, Poglavlja 4.1.1) pri nižem gradijntnom vremenu (tablica 12 Poglavlja 4.1.1). Trajnost odabrane kolona iznosila je preko 2000 injektiranja.

Ispitane su različite pokretne faze koje su sadržavale vodu, metanol i acetonitril bez ili s dodatkom (radi poboljšane učinkovitosti razdvajanja i oblika pika) kiseline (mravlja ili octena), soli (amonijeve) ili pufera (koncentracija do 10 mM). Prema metodi objavljenoj od strane referentnog laboratorija za NSAID-ove, EURL-BVL, razvoj metode je započeo s 0,01 M amonijevim acetatom u vodi kao pokretnoj fazi A i sa smjesom metanol:acetonitril 8:2 (v/v) kao pokretnoj fazi B. Međutim, zbog boljeg odziva diklofenaka u pozitivnom načinu rada odlučeno je koristiti pokretnu fazu koja sadrži amonijev formijat koji je općenito bolji za pozitivnu ionizaciju. Slično kao kod Jedziniaka i sur. (2015), primjena metanola pokazala se boljom za postizanje veće osjetljivosti u usporedbi s acetonitriplom. Najbolji kromatografski uvjeti za istovremeno određivanje bazičnih i kiselih NSAID-ova, a posebno diklofenaka koji ima najnižu NDK-a vrijednost, postignuti su uz korištenje 0,01 M amonijevog formijata (pH 5) u vodi (v/v) kao pokretne faze A te 0,05 % mravlje kiseline u metanolu (v/v) kao pokretne faze B. Dodatkom mravlje kiseline u pokretnu fazu B, čime se pospješuje pozitivna ionizacija (Rubies i sur., 2016), povećana je ukupna osjetljivost detekcije MS-a i poboljšana simetrija pikova (Božić Luburić i sur., 2021). S odabranom pokretnom fazom, ispitan je gradijnt eluiranja analita zajedno s temperaturom kolone. Budući da se radi o uzorcima životinjskog podrijetla koji su kompleksne prirode (visok udio masti, bjelančevina itd.), nužan je visok udio vodene faze i viša temperatura kako bi se eluirali svi analiti, stoga su razlike između testiranih gradijnta bile male. Gradijnt je optimiziran kako bi se brzim i pouzdanim odvajanjem postigla dobra simetrija pikova, uz temperaturu kolone od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ i volumenom injektiranja od $12 \mu\text{L}$, što je unatoč njihovoj kemijskoj različitosti omogućilo odvajanje 27 NSAID-ova unutar 12,5 minuta (slika 10, a i b).

Pregledom prethodnih radova vezanih za razvoj i validaciju metode za određivanje NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla, utvrđeno je kako većina autora za odvajanje analita koristila iste ili slične U(H)PLC kolone koje se navode u ovom radu. Kod nekih je kolona temperirana na 40 °C (Britzi i Schwartsburd, 2019; Castilhos i sur., 2016; Rúbies i sur., 2016; Peng i sur., 2013; Jedziniak i sur., 2012) ili niže 25 – 30 °C (Jedziniak i sur., 2015; Kaufmann i sur., 2014; Hu i sur., 2012), uz protok za UHPLC kolone 0,2 mL min⁻¹ te za HPLC kolone 0,4 – 0,8 mL min⁻¹, isto tako ovisno o koloni volumen injektiranja se kretao od 2 do čak 20 µL. Ukupno vrijeme trajanja analize bilo je u rasponu od 9 min (Rúbies i sur., 2016) za odvajanje 10 NSAID-ova do 25 min za odvajanje 16 NSAID-ova (Jedziniak i sur., 2015). Hu i sur. (2012) za svoj postupak UHPLC-MS/MS određivanja 30 NSAID-ova u mišićnom tkivu odabrali su Acquity UPLC BEH C18 kolonu (50 x 2,1 mm, 1,7 µL) s temperaturom kolone 30 °C, kao pokretna faza A korišten je 0,5 mM amonijev acetat s dodatkom 0,1% mravlje kiseline (v/v) i acetonitril kao pokretna faza B. Ukupno trajanje gradijenta bilo je 16 min uz protok 0,2 mL min⁻¹ i volumen injektiranja 10 µL.

5.1.2 Optimizacija postupka pripreme uzorka

Nakon odabira optimalnih uvjeta za razdvajanje i detekciju 27 NSAID-ova, odabran je i optimiziran postupak pripreme uzoraka. Hrana životinjskog podrijetla, kao što su mlijeko i mišićno tkivo, složene su matrice s visokim sadržajem proteina i masti koji mogu vezati NSAID-ove i na taj način ometati njihovu ekstrakciju i pročišćavanje. Poznato je da se radi o spojevima raznolike kemijske prirode zbog čega njihova priprema predstavlja veliki izazov u analizama (Božić Luburić i sur., 2021; van Pamel and Daeseleire 2015).

Budući da se nakon primjene pojedini NSAID-ovi mogu metabolizirati u glukuronidne konjugate, što je slučaj s karprofenom (CPF), gdje zbroj CPF i karprofen glukuronida predstavlja marker reziduu (ostatka) u mišićnom tkivu goveda, potrebno je provesti postupak hidrolize za njihovo oslobađanje. Iako neki autori koriste alkalnu (Kaufmann i sur., 2014) ili kiselu (Chrusch i sur., 2008) hidrolizu, u većini objavljenih metoda utvrđeno je kako je enzimska hidroliza selektivnija i osigurava blaže uvjete od kemijske hidrolize (Jedziniak i sur., 2015, 2010). U ovom postupku, odabrana je upravo enzimska hidroliza primjenom β-glukuronidaza/arilsulfataze tijekom 1 sata pri 37 °C. U literaturi je opisan postupak ekstrakcije fenilbutazona (PBZ) i oksifenbutazona (OPB) u kojem je izostavljen korak zakiseljavanja (pH 1,5 – 2) uzoraka mišićnog tkiva nakon enzimске hidrolize zbog mogućeg utjecaja na njihovu degradaciju (Blanca i sur., 2013). Iako je navedeni korak predložen u metodi referentnog laboratorija, EURL-BVL, rezultati su pokazali kako se učinkovitost ekstrakcije analita nije

značajno razlikovala izostavljanjem tog koraka. Ispitan je i učinak zakiseljavanja (pH 4) uzoraka mišića prije enzimske hidrolize, koji u pripremi uzoraka mlijeka nije prisutan. Nakon provedene analize dobiveni rezultati su bili jednaki te je i taj korak izostavljen (slika 11 Poglavlja 4.1.2). Dodatak niskih koncentracija L-askorbinske kiseline (L-ASK) poželjan je kako bi se spriječila oksidacija PBZ i OPB, ali i poboljšala ponovljivost i odziv PBZ, OPB i 4-metilaminoantipirina (4-MAA) (Britzi i Schwartsburd, 2019; Rúbies i sur., 2016; Dowling i sur., 2010). Dodatkom 5 mL 0,01 M L-ASK u uzorke mlijeka i 0,02 M L-ASK u uzorke mišićnog tkiva, prije pročišćavanja uzoraka ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE), a u slučaju mlijeka i na samom početku pripreme uzoraka, došlo je do povećanja analitičkog prinosa i odziva za analite 4-dimetilaminoantipirin (4-DMAA), 4-hidroksiantipirin (4-OH-A), 4-MAA, 5-hidroksi fluniksini (5-FLUOH), fluniksini (FLU), isopropilaminoantipirin (IPAA), OPB, PBZ i salicilnu kiselinu (SA) (slika 12 Poglavlja 4.1.2). Međutim, osjetljivost za analite CPF, diklofenak (DC), flufenaminsku kiselinu (FFA), meklofenaminsku kiselinu (MCA), mefenaminsku kiselinu (MFA), nifluminsku kiselinu (NFA), naprokseni (NP) i tolfenaminsku kiselinu (TFA) se smanjila iako su još uvijek detekirani u niskom rasponu. U ovom postupku koristi se L-ASK budući da su PBZ i OPB važni analiti za određivanje, osobito ako uzmemo u obzir slučajeve krivotvorenja hrane i neispravne deklaracije ilegalnog konjskog mesa kao teletine i činjenicu kako je PBZ zabranjen u životinja za proizvodnju hrane.

Većina opisanih metoda koristi acetonitril (ACN) (Hu i sur., 2012, Gentili i sur., 2012, Jedziniak i sur., 2012; Dowling i sur., 2010), metanol (MeOH) (Dubreil-Chéneau i sur., 2011), smjesu oba otapala (Gallo i sur., 2010) ili acetonitril/etilacetat (Peng i sur., 2013) kao ekstrakcijska otapala jer mogu istovremeno istaložiti proteine, denaturirati enzime i ekstrahirati analite od interesa. U ovom radu, kao ekstrakcijsko otapalo je odabran ACN kao najbolji kompromis između dobrog iskorištenja i oskudne ekstrakcije neželjenih spojeva (interferencija) iz uzorka (Berendsen i sur., 2013). Štoviše, poželjna je primjena ACN kako bi se izbjegla razgradnja 4-MAA (Castilhos i sur., 2016). Nakon ekstrakcije s ACN, kako bi se uklonila vodena faza i lakše ekstrahirala ACN faza, kod mlijeka je uslijedio korak dodatka soli s natrijevim kloridom, dok u pripremi mišićnog tkiva dodatak natrijevog acetata omogućuje i puferiranje medija. Kako bi se smanjio sadržaj masti iz uzoraka mišićnog tkiva i dobio bistriji ekstrakt, uveden je korak odmašćivanja organskog sloja s n-heksanom. Podešavanjem uzoraka na pH 3 s 1 M klorovodičnom kiselinom, povećano je zadržavanje analita na punilu kolone (sorbensu) za ekstrakciju na čvrstoj fazi.

U literaturi za pročišćavanje i koncentriranje NSAID-ova iz bioloških uzoraka najčešće se koriste polimerni polarni (hidrofilni) i nepolarni (lipofilni) sorbensi zbog njihove svestrane i

učinkovite ekstrakcije analita širokog polariteta u istom uzorku (Kaufmann i sur., 2014; Gentili i sur., 2012; Hu i sur., 2012; Dowling i sur., 2010; Gallo i sur., 2010). U SPE ekstrakciji kao polimerni sorbens reverzne faze koristili su se Evolute® Express ABN (100 mg, 3 mL) i Discovery® DSC-18 (500 mg, 3 mL), a za eluiranje se koristila otopina heksan/dietil-eter/MeOH/ACN. Za uzorke mlijeka rezultati su ukazali na bolji odziv sa SPE kolonama Evolute® Express ABN, a za uzorke mišićnog tkiva s Discovery® DSC-18 (slike 13 i 14 Poglavlja 4.1.2). Svi spojevi ekstrahirani su u zadovoljavajućem rasponu iskorištenja 98,1 – 106,5 %, a relativna standardna devijacija (RSD) kretala se između 3,1 – 18,5 % u obje vrste matrica, slično kao kod Gentili i sur. (2012) koji su koristili Oasis-HLB SPE kolone za ekstrakciju 13 kiselih NSAID-ova iz mlijeka i mišićnog tkiva goveda. Dobiveni eluat nakon što je uparen do suhoga u blagoj struji dušika, otopljen je u 150 µL pokretne faze A i 100 µL MeOH. Centrifugiranje uzoraka s velikom g silom (15 200 o/min, 4° C, 10 min) kao zamjenski korak filtracije uzoraka pomoću filtera korišten je kako bi se spriječio gubitak analita na filterima i smanjila eventualna zamućenost konačnog ekstrakta. Dobiveni bistri ekstrakti prikladni su za UHPLC-MS/MS analizu.

5.1.3 Validacija metode

Razvijena UHPLC-MS/MS metoda za određivanje ostataka NSAID-ova validirana je sukladno Odluci Komisije br. 2002/657/EZ (EZ, 2002), ali odgovara zahtjevima i trenutno aktualne Uredbe 2021/808/EZ (EZ, 2021) o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, uzimajući u obzir relevantne NDK vrijednosti te u slučaju kada nisu definirane regulatorne granice, validacijske razine (VR). Potpuni postupak analize, analiti od interesa, priprema uzoraka, koncentracijski raspon, reprezentativnost materijala moraju biti uključeni u provjeru valjanosti metode. Analiti NSAID-ova odabrani su u skladu s planom kontrole rezidua RH. Priprema eksperimentalnog dizajna validacije i izračun dobivenih rezultata provedeni su pomoću programskog paketa InterVAL® Plus (djelomičan faktorski dizajn temeljen na ortogonalnom eksperimentalnom planu), a prema zahtjevima Odluke Komisije br. 2002/657/EZ. Za potrebe tzv. matrica-sveobuhvatne interne validacije korištene su slijepa matrice mišićnog tkiva i mlijeka odabranih životinjskih vrsta za koje je predloženom metodom potvrđeno da ne sadrže ispitivane analite. U slijepu matricu dodani su analiti u odgovarajućim masenim koncentracijama prije početka postupka pripreme uzoraka, dok se dodatak odgovarajućeg internog standarda koristio kao korekcija iskorištenja, zbog eventualnih gubitaka tijekom pripreme uzoraka te utjecaja matrice.

Zahvaljujući eksperimentalnom dizajnu i mogućnosti procjene utjecaja odabranih faktora (ovisno o zahtjevima uzoraka i rutinskih potreba laboratorija), značajke učinkovitosti kao što su granična koncentracija analita ($CC\alpha$), sposobnost dokazivanja ($CC\beta$), preciznost, iskorištenje uz kalibracijsku krivulju i interval predviđanja, mjerna nesigurnost i utjecaj pojedinih faktora na temelju kojih se dobivaju i informacije o robusnosti metode, određuju se istovremeno te iako je smanjen broj pokusa, pouzdanost rezultata validacije je osigurana. Izračun značajki učinkovitosti odvija se generiranim protokolom, primjenom matematičko-statističkih metoda, te omogućuje brzu, jednostavnu i razumljivu obradu podataka u skladu s regulatornim zahtjevima.

Selektivnost metode provjerena je usporedbom snimljenih kromatograma slijepog i obogaćenog uzorka matrice. Pikovi su dobro odijeljeni i nema koeluirajućih pikova koji bi mogli interferirati u vremenu zadržavanja (poštujući uvjet odstupanja $\pm 2,5$ %) i zadanim tranzicijama (m/z) analiziranih NSAID-ova, osim u slučaju SA gdje je prisutna interferencija između MRM tranzicija (slike 16 – 18 Poglavlja 4.1.3.1), na što su također ukazali Van Pamel i Daeseleire (2015). Kao što je već navedeno, SA prisutna je endogeno i ima potencijal da potječe iz izvora koji nisu izravno povezani s upotrebom NSAID-a, što je vjerojatno i objašnjenje ovih rezultata.

Linearnost metode ispitana je pomoću pet kalibracijskih točaka u uzorku mlijeka i mišićnog tkiva za različita koncentracijska područja ovisno o propisanoj NDK odnosno određenoj VR vrijednosti pojedinog analita (tablica 13 Poglavlja 4.1.3.2). Dobiveni rezultati analizirani linearnom regresijom ukazuju na dobru linearnost u cijelom koncentracijskom području, s koeficijentom determinacije (R^2) višim od 0,990 u obje vrste matrica, osim za 4-DMAA, 4-FAA, 4-OH-A i SA (0,97 – 0,98) u mlijeku, odnosno za 4-AA, 4-DMAA, 4-OH-A, IPAA (0,97 – 0,98) u mišićnom tkivu.

U rutinskoj kontroli, određivanje $CC\alpha$ (za potvrdne metode) i $CC\beta$ (za orijentacijske metode) vrlo je važno budući da ukoliko je rezultat orijentacijske metode pozitivan treba provesti potvrdnu analizu, a rezultat se smatra nesukladnim ukoliko je koncentracija analita od interesa jednaka ili iznad $CC\alpha$ (EZ, 2002). Za NSAID-ove koji imaju zadanu NDK, najniže vrijednosti su postignute za DC u obje matrice, a najviše za 4-MAA u mlijeku odnosno CPF u mišićnom tkivu (tablica 14 Poglavlja 4.1.3.3). Može se primijetiti kako su $CC\alpha$ i $CC\beta$ izračunati pomoću InterVAL[®] Plus programa, zbog modela višestruke regresije koji uključuje sve faktore validacije, a ne samo koncentraciju kao faktor, u ovoj metodi nešto viši u usporedbi s drugim dostupnim metodama (tablica 6 Poglavlja 2.3.3.2). Međutim, ove dobivene vrijednosti su u

skladu sa zadanim NDK vrijednostima i prilično niske, čime se osigurava osjetljivost metode nužna za određivanje ostataka ovih spojeva u ispitivanim matricama.

Dobivene vrijednosti o preciznosti, pod uvjetima ponovljivosti (RSD_r) i unutar-laboratorijske obnovljivost (RSD_{WR}), točnost (iskorištenje) analitičke metode pri $CC\alpha$ kao i $CC\alpha$ i $CC\beta$ (tablica 14) nalaze se unutar prihvatljivih kriterija (EZ, 2002). Kod svih analita u obje vrste matrice zadovoljen je kriterij iskorištenja (80 – 110% za koncentracije $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i 70 – 110% za koncentracije $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$), između 98,1 i 106,5 % u mlijeku odnosno 98,8 i 102,7 % u mišićnom tkivu, sa RSD_r manjim od 20 %, između 2,1 i 16,7% u mlijeku odnosno 2,3 i 10,9 % u mišićnom tkivu. U usporedbi s drugim autorima koji su uključili u svojim metodama i kisele i bazične NSAID-ove, kao što su van Pamel i Daeseleire (2015), obuhvatili 15 NSAID-ova u mlijeku (iskorištenje od 81 do 114 %) i mišićnom tkivu goveda (iskorištenje 79-118%), Jedziniak i sur. (2015), obuhvatili 20 NSAID-ova u mišićnom tkivu goveda, svinje i konja (iskorištenje od 85,5 do 118 %, te za FFA 36,1 % i za NFA 61,1%) te Castilhos i sur. (2016), određivali 14 NSAID-ova u mišićnom tkivu svinje (iskorištenje od 100,1 do 108, 2 %), dobivene vrijednosti ovom UHPLC-MS/MS metodom ili su jednake ili bolje, ovisno o analitima i koncentraciji. Nisko iskorištenje određenih analita navedenih autora, uglavnom pri nižoj koncentracijskoj razini, koji nisu zadovoljili kriterije učinkovitosti, uvelike su poboljšani ovom metodom. Može se zaključiti kako metoda pri vrlo niskim masenim koncentracijama pokazuje visoku točnost rezultata.

Mjerna nesigurnost analitičkog rezultata izražena je preko $CC\alpha$ i $CC\beta$ jer uračunava standardnu devijaciju ponovljivosti i unutar-laboratorijske obnovljivosti metode određene u validaciji. Robusnost metode ispitana je procjenom utjecaja manjih varijacija odabranih faktora na odgovor metode. Slučajne i sustavne varijacije faktora razmatraju se na učinkovit način zbog eksperimentalnog dizajna validacije. Za većinu analita utjecaj odabranih faktora bio je zanemariv. Međutim, uočeno je kako matrica i životinjska vrsta mogu značajno doprinijeti ukupnoj mjernoj nesigurnosti. S obzirom na odabrane faktore, metoda se pokazala robusnom.

Kako bi se postigla precizna kvantifikacija analitičkih rezultata, procijenjen je utjecaj matrice (smanjenje/pojačanje ionskog signala, SSE) na temelju usporedbe dobivenih površina analita u kalibracijskoj krivulji standardnih otopina pripremljenih u čistom otapalu i u matrici uzoraka. Uočeni su mali ($< \pm 20 \%$), srednji (od $\pm 20 \%$ do $\pm 50 \%$) i jaki ($> \pm 50 \%$) utjecaji matrice tj. smanjenje/pojačanje ionskog signala uzorka (slika 19 Poglavlja 4.1.3.4). Za većinu NSAID-ova, kako u uzrocima mlijeka tako i u uzorcima mišićnog tkiva različitih životinjskih vrsta smanjenje ili pojačanje signala analita bio je veći od 50 %. Zanemarivog utjecaja nije bilo. Izrazito negativan trend utjecaja matrice pokazalo je 15 analita u kravljem, 17 analita u ovčjem

i 13 analita u kozjem mlijeku. Kod analita MCA, TFA i VDP prisutno je pojačanje signala. Za MFA i OPB uočen je varijabilan utjecaj matrice. U uzorcima mišićnog tkiva zabilježeno je u svim slučajevima, osim kod CPF, pojačanje signala. Najveće pojačanje signala zabilježeno je za analite u negativnoj ionizaciji, kao što su PBZ, FFA, IBP, MFA, OPB i VDP, ali i za DC i TFA koji su u pozitivnoj ionizaciji. U ovom istraživanju mali utjecaj matrice primijećen je kod 4-AA (- 18 %) i MFA (- 16 % odnosno 20 %), zatim slijede DC (- 21,9 %) i OPB (- 25,8 %) u svim analiziranim vrstama mlijeka te MCA (34,1 %) i FFA (35,5 %) ako se izuzme kozje mlijeko. U slučaju mišićnog tkiva, srednji utjecaj matrice primijećen je kod 5-FLUOH u svih životinjskih vrsta, zatim kod FLU, NFA i PRX osim kod peradi te kod 4-OH-A i MLX, osim kod peradi i goveda. Koliko će biti izražen utjecaj matrice ovisi o samoj vrsti matrice, fizikalno-kemijskim svojstvima analita, ali i o postupku pripreme uzoraka. Iako se u ovoj metodi postupak pročišćavanja provodi na SPE kolonama, utjecaj matrice je za određene analite nepovoljan. Stoga, zbog promjenjivog utjecaja matrice, za kompenzaciju smanjenja ili pojačanja odziva analita, koristi se kalibracija u matrici zajedno s internim standardima što je ujedno rezultiralo i poboljšanim iskorištenjem i ponovljivosti za nekoliko analita. Ovakav način korekcije koristili su i drugi autori (Jedziniak i sur., 2015; van Pamel i Daeseleire, 2015).

Nadalje, između ispitivanih životinjskih vrsta zbog njihove velike biološke varijabilnost, u obje matrice uočen je različit odziv analita (slika 20 Poglavlja 4.1.3.4). Zbog toga se u rutinskoj kontroli za potrebe orijentacijske analize jedna životinjska vrsta može koristiti za kalibraciju u matrici dok se za ostale vrste u analizi stavlja obogaćen uzorak te vrste, ovisno o analitu pri NDK ili VR razini, kao kontrola kvalitete. Međutim u slučaju pozitivnih uzoraka, za ispravnu kvantifikaciju mora se provesti zasebna kalibracija u matrici svake životinjske vrste.

5.2 Određivanje NSAID-ova u realnim uzorcima

Razvijenom UHPLC-MS/MS metodom ispitano je prisustvo 27 NSAID-ova u 449 uzoraka hrane životinjskog podrijetla i 96 uzoraka vode (otpadne) iz okoliša. Tijekom 2019. i 2020. godine kao dio rutinske kontrole rezidua Republike Hrvatske (RH) u hrani životinjskog podrijetla iz svih hrvatskih županija prikupljeno je 268 uzoraka mlijeka i 181 uzorak mišićnog tkiva različitih životinjskih vrsta te 96 uzoraka otpadne vode iz područja kontinentalne RH, uzorkovanih za potrebe biološke i kemijske kontrole vode.

U uzorcima životinjskog podrijetla, pronađeni NSAID-ovi kvantificirani su uz korištenje kalibracije u matrici, a dobiveni rezultati uspoređivali su se s postavljenim NDK vrijednostima propisanim Uredbom (EZ) br. 37/2010 (EZ, 2010) ili dobivenim $CC_{\alpha 0}$ za one

spojeve za koje nije određen NDK. Analizom svih uzoraka mlijeka, slučajevi nesukladnosti potvrđeni su za 3 uzorka mlijeka iz 2019. godine i 3 uzorka mlijeka iz 2020. godine. U koncentracijama višim od dozvoljenih najzastupljeniji je diklofenak (DC) (85,7 %), analit s najnižom NDK vrijednosti ($0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$), pronađen u 4 uzorka kravljeg mlijeka ($0,162 \mu\text{g kg}^{-1}$ – $1,99 \mu\text{g kg}^{-1}$) te u 2 uzorka kozjeg mlijeka ($0,122 \mu\text{g kg}^{-1}$ – $0,167 \mu\text{g kg}^{-1}$), 4-hidroksiantipirin pronađen je u uzorku kravljeg mlijeka u koncentraciji od $53,9 \mu\text{g kg}^{-1}$. Prosječna vrijednost svih pozitivnih uzoraka na prisutnost DC iznosila je $0,188 \mu\text{g kg}^{-1}$ u 2019. godini i $1,21 \mu\text{g kg}^{-1}$ u 2020. godini (tablica 15 Poglavlja 4.2). U 2 uzorka mišićnog tkiva iz 2019. godine pronađen je ketoprofen (KTP). Najveća koncentracija KTP od $59,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ zabilježena je u uzorku goveda, dok je u uzorku svinje iznosila $3,12 \mu\text{g kg}^{-1}$. Analizom uzoraka mišićnog tkiva tijekom 2020. godine, NSAID-ovi nisu detektirani niti u jednom uzorku.

Pietruk i sur. (2020) također su istraživali pojavnost NSAID-ova LC-MS/MS metodom u uzorcima mišićnog tkiva ($n = 406$) i mlijeka ($n = 67$) kao dio rutinske kontrole rezidua (ostataka) Poljske tijekom 2019. i 2020. godine. U 2019. godini pronađen je samo jedan nesukladan uzorak i to mlijeka na DC ($3,50 \mu\text{g kg}^{-1}$), dok je u 2020. godini pronađen nesukladan uzorak mišićnog tkiva na meloksikam (MLX) ($279 \mu\text{g kg}^{-1}$), što čini 0,42 % svih analiziranih uzoraka u dvije godine. Pugajeva i sur. (2019) ispitivali su 40 uzoraka mišićnog tkiva (goveda) s farmi koji su u neselektivnom kvalitativnom testu inhibitorских tvari pokazali pozitivne rezultate. Potvrдна LC-MS/MS metoda u 8 od 40 analiziranih uzoraka otkrila je prisutnost farmakološki aktivnih tvari među kojima su bili i NSAID-ovi, poput KTP ($1602 \mu\text{g kg}^{-1}$) i MLX ($734 \mu\text{g kg}^{-1}$), u koncentraciji iznad NDK vrijednosti utvrđene od strane EU ukazujući na nepoštivanje veterinarskih propisa. Što se tiče rutinske kontrole uzoraka mlijeka i mišićnog tkiva tijekom četiri godine LC-MS/MS metodom, istraživanje van Pamel i Daeseleire (2015) pokazuje na pojavnost sljedećih NSAID-ova u uzorcima mlijeka: fenilbutazon (PBZ) ($4 \mu\text{g kg}^{-1}$) u konjskom mlijeku, 5-hidroksi fluniksini ($3 \mu\text{g kg}^{-1}$) u kozjem mlijeku te DC ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$) u kravljem mlijeku. Za mišićno tkivo (govedo) dobiveni su nesukladni rezultati za fluniksini ($73 \mu\text{g kg}^{-1}$; $268 \mu\text{g kg}^{-1}$), MLX ($39 \mu\text{g kg}^{-1}$), mefenaminsku kiselinu ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$), tolfenaminsku kiselinu ($12,1 \mu\text{g kg}^{-1}$), DC ($6 \mu\text{g kg}^{-1}$) i PBZ ($16 \mu\text{g kg}^{-1}$; $10 \mu\text{g kg}^{-1}$). U konjskom mesu, nesukladni rezultati su dobiveni za oksifenbutazon ($3,3 \mu\text{g kg}^{-1}$; $4,6 \mu\text{g kg}^{-1}$) i PBZ ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$). U svinjskom mesu, flufenaminska kiselina pronađena je u koncentraciji od $18 \mu\text{g kg}^{-1}$ dok je 4-metilaminoantipirin pronađen u puretini ($61 \mu\text{g kg}^{-1}$), piletini ($12,5 \mu\text{g kg}^{-1}$; $11 \mu\text{g kg}^{-1}$) i zečetini ($3,7 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Prema EFSA-i (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA), koja u svojim godišnjim izvještajima objavljuje rezultate monitoringa ostataka VMP-a i drugih tvari u životinjama i

proizvodima životinjskog podrijetla za zemlje EU, u 2019. godini europski laboratoriji su analizirali 24 387 uzoraka na NSAID-ove (klasificirani kao skupina B, točnije B2e) od kojih se prema propisanim NDK vrijednostima 46 uzoraka (0,19 %) pokazalo nesukladnim. Slučajevi nesukladnosti potvrđeni su u tkivima goveda (0,27 %), peradi (0,09 %), konja (0,63 %), svinja (0,09 %), ovaca i koza (0,05 %) te u mlijeku (0,36 %) (EFSA, 2021). U RH 2017. godine u koncentracijama višim od dozvoljenih uz KTP u uzorku svinje i DC u uzorku mlijeka, NSAID salicilna kiselina (SA) u uzorcima mlijeka detektiran je u 35 od sveukupno 37 nesukladnih uzoraka na razini EU (EFSA, 2019).

Analiza mlijeka pokazala je učestalu prisutnost SA slično kao i kod van Pamel i Daeseleire (2015), analita koji je endogeno prisutan u prirodi. Naime, SA, metabolit acetilsalicilne kiseline, može se unijeti u prehrambeni lanac i biti prisutna u raznim vrstama matrica zbog svoje prirodne pojave u biljkama kao fitohormon. Međutim, iako se ostaci SA mogu pojaviti prirodno, vrlo visoke koncentracija SA u uzorcima hrane životinjskog podrijetla mogu biti rezultat moguće zlouporabe lijekova i/ili kontaminacije uslijed posebnih uvjeta hranjenja te posljedica aktivnih tvari u biocidnim proizvodima za dezinfekciju muznih krava (Božić Luburić i sur., 2021). U ukupno 36 uzoraka mlijeka i 8 uzoraka mišićnog tkiva 2019. godine te u 35 uzoraka mlijeka 2020. godine otkriveni su ostaci SA (slika 21 Poglavlja 4.2). Iako je najzastupljeniji NSAID u analiziranim uzorcima i obuhvaćen analizom, kako se trenutno ne nalazi na popisu „minimalno potrebnih“ ili „preporučenih“ spojeva koje je izdao EURL-BVL, već pripada „neobveznim“ spojevima, od 2018. godine uzorci s visokom koncentracijom SA više se ne prijavljuju kao nesukladni, što su također objavili i autori van Pamel i Daeseleire (2015).

U ovom istraživanju, zbog njihovog nepotpunog uklanjanja iz otpadnih voda otkriveno je 11 različitih NSAID-ova (tablica 16 Poglavlja 4.2) u analiziranim uzorcima otpadne vode različitog podrijetla. Iz prikazanih podataka vidljivo je kako su najčešće pronađeni DC u 84 (87,5 %), ibuprofen (IBP) u 56 (58,3 %), KTP u 52 (54,2 %) i naproksen (NP) u 50 (52,1 %) uzoraka u rasponu koncentracija od 0,033 $\mu\text{g L}^{-1}$ za DC do 60,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ za IBP. Varijacije u koncentracijama vjerojatno su posljedica učestalosti primjene NSAID-ova u području uzorkovanja kao i tehnologije obrade i karakteristika određenog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) koji utječu na učinkovitost uklanjanja NSAID-ova (Česen i sur., 2019). U bolničkim otpadnim vodama najveća koncentracija je zabilježena za DC (2,97 $\mu\text{g L}^{-1}$) te za KTP (16,4 $\mu\text{g L}^{-1}$). Procijenjeno je da su bolničke otpadne vode onečišćene između 5 do 15 puta više u usporedbi s drugim komunalnim otpadnim vodama (Emmanuel i sur., 2009). Kod kompozitnih uzoraka otpadnih voda s ulaza i izlaza UOPV-a (tablica 17 Poglavlja 4.2), najveće

koncentracije su utvrđene za DC (ulaz = 1,06 $\mu\text{g L}^{-1}$, izlaz = 1,27 $\mu\text{g L}^{-1}$) i IBP (ulaz = 25,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, izlaz = 63,6 $\mu\text{g L}^{-1}$). Također, očigledno je kako postoje velike razlike u područjima uzorkovanja i tehnologiji pročišćavanja. Primjerice, koncentracije DC, IBP, KTP i NP smanjile su se u otpadnoj vodi na izlazu UPOV u Zagrebu i Vinkovcima, dok su u uzorcima izlaznih otpadnih voda u Križevcima i bolničkim otpadnim vodama bile veće na izlazu nego na ulazu UPOV-a. Svi ti spojevi otkriveni u otpadnim vodama ispuštaju se u prirodne vodotoke, u ovom slučaju rijeku Savu i Dravu, koje su sa svojim pritocima glavne odvodne rijeke u sjeverozapadnoj RH i obje pritoke Dunava. Neki podaci ukazuju kako za pojedine spojeve ta razlika u koncentraciji na ulazu i izlazu iz UPOV-a može biti posljedica enzimskog cijepanja glukuronskih konjugata. Lijekovi se uglavnom izlučuju kao biološki aktivni metaboliti, koji potječu iz biokemijskih reakcija oksidacije i redukcije ili tvore konjugirane metabolite (Holčapek i sur., 2008). DC se izlučuje kao konjugat koji se tijekom pročišćavanja otpadnih voda dekonjugira nazad u ishodni spoj, što može objasniti njegove veće koncentracije u otpadnim vodama na izlazu iz UPOV-a (Ferrer i Thurman, 2010). U slučaju uzoraka iz Zagrebačkih otpadnih voda (ZOV) uočene su niže koncentracije pronađenih NSAID-ova (DC, IBP, KTP, NP) u usporedbi sa sustavom UPOV-a u području Križevaca i Vinkovaca. Razlika se može objasniti učinkovitijom naprednom biološkom (biofiltracijskom) tehnologijom koja se primjenjuje u ZOV (Česen i sur., 2019). Bazni NSAID-ovi, metaboliti metamizola: 4-formilaminoantipirin, 4-acetilaminoantipirin i 4-aminoantipirin, kao i kiseli NSAID-ovi PBZ, OPB i SA, zasad nisu tako učestalo otkriveni. U trenutno prikupljenim uzorcima industrijskih voda, najveće koncentracije su otkrivene kod IBP (18,6 $\mu\text{g L}^{-1}$) i NP (17,3 $\mu\text{g L}^{-1}$) na mjestu uzorkovanja gdje se otpadna voda ispušta u rijeku Česmu u Čazmi. Drugi analiti nisu pronađeni u analiziranim uzorcima.

Usporedbe s dostupnim podacima o pojavnosti i koncentraciji NSAID-ova u otpadnim vodama UPOV-a iz RH iz literature pokazuju kako su prosječne koncentracije IBP (24,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) i NP (2,41 $\mu\text{g L}^{-1}$) bile značajno veće, dok je DC pronađen u nižim koncentracijama u ovom istraživanju u usporedbi s onima autora Česen i sur. (2019) (IBP: 5,34 $\mu\text{g L}^{-1}$; NP: 0,966 $\mu\text{g L}^{-1}$; DC 0,48 $\mu\text{g L}^{-1}$), a za KTP vrijednosti su usporedive. Terzić i sur. (2008) proučavali su pojavnost novih onečišćujućih spojeva komunalnih otpadnih voda, ali i otpadnih voda nekih industrija, na području Bosne i Hercegovine, RH i Srbije. Rezultati su potvrdili raširenu pojavu raznih kemijskih spojeva (lijekova, proizvoda za osobnu njegu, površinski aktivnih tvari i dr.) usporedivu sa situacijom u zapadnoj Europi. Isto tako uočeno je kako je konvencionalno biološko pročišćavanje otpadnih voda aktivnim muljem relativno neučinkovito za uklanjanje nekih skupina spojeva koji se pojavljuju. Od pronađenih NSAID-ova, najzastupljeniji su bili

DC ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ – $4,20 \mu\text{g L}^{-1}$) i IBP ($11,9 \mu\text{g L}^{-1}$). Styszko i sur. (2021) pružili su pregled pojavnosti 68 odabranih onečišćujućih spojeva u ulaznim i izlaznim otpadnim vodama dvaju UPOV-a na području južne Poljske i dali ključne informacije o njihovoj učinkovitosti uklanjanja i riziku od bioakumulacije. Među NSAID-ovima, najveće koncentracije su pronađene u kanalizacijskim uzorcima UPOV-a, za NP (srednja vrijednosti ovisno o UPOV: $94,2 \pm 63,4 \mu\text{g L}^{-1}$ i $48,4 \pm 26,5 \mu\text{g L}^{-1}$), DC ($13,3 \pm 9,4 \mu\text{g L}^{-1}$ i $16,9 \pm 13,4 \mu\text{g L}^{-1}$), KTP ($10,7 \pm 7,3 \mu\text{g L}^{-1}$ i $8,1 \pm 0,8 \mu\text{g L}^{-1}$) te IBP ($5,2 \pm 3,2 \mu\text{g L}^{-1}$ i $9,5 \pm 1,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Veće koncentracije pojedinih analita autori pripisuju trendu povećanja godišnje upotrebe lijekova bez recepta i općenito činjenici kako je potrošnja lijekova u Poljskoj jedna od najvećih u EU. Ustanovili su da među spojevima s visokim potencijalom za bioakumulaciju ($\log K_{ow} > 4,5$) i kao takav visoko rizičan, je DC. Ovo istraživanje pokazuje kako su NSAID-ovi prisutni u otpadnim vodama na ulazu i izlazu iz UPOV i u bolničkim otpadnim vodama. Također su pronađeni i u trenutno prikupljenim uzorcima industrijskih voda i sabirno crpnih stanica. Pronađeni su i kvantificirani ishodni spojevi i njihovi metaboliti. Najzastupljeniji NSAID-ovi u većini uzoraka bili su DC, IBP, KTP i NP, posebno na ulazu u UPOV, tomu u prilog ide i njihova učestala potrošnja kao i dostupnost pojedinih bez liječničkog recepta. Ipak, kako bi se definirala jasnija i detaljnija pojavnost NSAID-ova u uzorcima iz okolišnih voda, kretanje njihovih koncentracija potrebno je u budućim istraživanjima provesti analizu na značajno većem uzorku voda. Poznato je kako je Okvirna direktiva o vodama EU, nedavno navela i DC na popis promatranja („*Watch list*“) spojeva koje treba pratiti u površinskim vodama EU i koji bi se mogli dodati na prioritetnu listu spojeva za koje se zna da predstavljaju rizik za sigurnost površinskih voda (EZ, 2015). Stoga se može očekivati kako će zbog sve strožih zakonskih regulativa za zaštitu okoliša, postojati potreba za poboljšanim, sustavnijim i opsežnijim praćenjem različitih spojeva u vodenom okolišu. Veća dostupnost informacija i povećanje svijesti o mogućem negativnom učinku tih spojeva, razlozi su zašto istraživanje njihove sudbine u okolišu su od osobitog znanstvenog interesa u posljednjih nekoliko desetljeća.

5.3 Učinak NSAID-ova na preživljenje RTG-2 i HEK-293T stanica

Literaturno dostupni podaci o akutnoj toksičnosti lijekova uključuju organizme na različitim razinama biološke organizacije od algi, žarnjaka, rakova, dagnji i riba (Parolini i sur., 2009), međutim još uvijek je nedovoljan broj studija koje bi potvrdile rizik koji predstavljaju kao i moguće dugoročne posljedice. Zbog toga odgovarajuća zakonska regulativa koja bi kontrolirala ispuštanje farmaceutskih proizvoda i proizvoda za osobnu njegu u okoliš još uvijek ne postoji. Iako je popis za praćenje prioritetnih spojeva u Okvirnoj direktivi o vodama EU (EZ,

2013) definiran, a smjernice Europske agencije za lijekove (EMA) zahtijevaju procjenu rizika i neškodljivosti za okoliš prije njihovog stavljanja u promet, još uvijek postoji potreba za toksikološkim ispitivanjima kratkotrajne i dugotrajne izloženosti tim spojevima, posebice NSAID-ovima koji se, među ostalima, učestalo otkrivaju u vodenom okolišu diljem svijeta. Budući da djelovanje ksenobiotka (tvar koja se u normalnim okolnostima ne nalazi u živome organizmu) na organizme započinje na razini stanice, primjena staničnih linija kao *in vitro* sustava za ispitivanje novih ili u okolišu već prisutnih tvari, osim preliminarnu procjenu toksičnosti, može pridonijeti i saznanjima o unutarstaničnim i molekularnim mehanizmima aktiviranim djelovanjem ispitivanog spoja (Kniewald i sur., 2005).

Akutna toksičnost najpoznatijih predstavnika NSAID-ova, DC, IBP i SA testirana je na neciljnim organizmima različitih trofičkih razina te je pokazano kako NSAID-ovi imaju nisku akutnu toksičnost na temelju učinkovite koncentracije (EC_{50}), u rasponu od 10 do 100 mg L⁻¹ (Mennillo i sur., 2018, Parolini i Binelli, 2012). SA djeluje na reproduktivan sustav *D. magna* i *D. longispina* u koncentracijama od 1,8 mg L⁻¹, DC je obično prisutan u otpadnoj vodi pri srednjoj koncentraciji od 0,81 µg L⁻¹, dok je maksimalna koncentracija u otpadnim i površinskim vodama do oko 2 µg L⁻¹. Studija Fent i sur. (2006) pokazala je kronične histopatološke učinke, zatajenje bubrega i promjene u škragama, u kalifornijskim pastrvama nakon 28 dana. Ipak, uzimajući u obzir kako su ove testirane učinkovite koncentracije znatno veće od onih trenutno prisutnih u okolišu, kronični učinci su ekološki svakako značajniji. Međutim, sve veći broj studija u kojima je ispitivan subletalni učinak induciran NSAID-ovima na neciljanim organizmima naglašava kako ti spojevi sami ili u smjesi mogu izazvati toksične učinke vezane uz oksidativan stres, reprodukciju, citogenotoksičnost i preživljenje (Mennillo i sur., 2018; Parolini i Binelli, 2012).

U ovom radu ispitivanja su provedena na staničnim linijama RTG-2 i HEK-293T koje bi zbog svoje jednostavnosti, pouzdanosti i brzine mogle pružiti osnovne informacije o citotoksičnosti širokog spektra NSAID spojeva. Stanična linija HEK-293T odabrana je zbog već poznatih nuspojava NSAID-ova kod sisavaca (npr. DC na bubrege), a RTG-2 riblja stanična linija odabrana je zbog kontinuirane izloženosti neciljanih organizama u vodenom okolišu kao i činjenice da su različite studije već izvijestile o toksičnim učincima NSAID-ova na ribe u okolišno relevantnim koncentracijama (Sharma i sur., 2017). Budući da su toksični učinci često specifični za vrstu, toksičnost prema ribama može se bolje proučavati na modelima specifičnim za ribe. Nadalje, korištenje ribljih staničnih linija, kao i staničnih linija općenito, društveno je prihvatljivo i pridonosi smanjenju broja životinja koje se koriste u toksikološkim ispitivanjima *in vivo*.

U svrhu određivanja učinaka NSAID-ova na rast stanične linije RTG-2 i HEK-293T, stanice su 24 sata nakon naciepljivanja tretirane različitim koncentracijama 25 odabranih NSAID-ova (50 μ M, 100 μ M i 250 μ M). Nakon 72 sata provedena je MTS metoda za određivanje vijabilnosti stanica. Iz prikazanih rezultata izloženost RTG-2 stanica NSAID-ovima pokazala je blaži citotoksičan učinak uz preživljenje stanica pri djelovanju svih 25 NSAID-ova veće od 50 % (slika 22 a Poglavlja 4.3), dok značajan citotoksični učinak NSAID-ova uočen je na HEK-293T stanice (slika 22 b Poglavlja 4.3), posebno PBZ (24,4%), OPB (26,7 %) i KTP (26,7 %), a zatim IPAA (37,7 %), FCX (40,9 %), 4-FAA (42,4 %), MCA (42,5 %), MFA (45,8 %), TFA (45,5 %) i VDP (49,0 %). Na slici 22 (a i b) prikazani su rezultati ispitivanih NSAID-ova samo pri najvišoj koncentraciji (250 μ M), iako su svi testirani u sve tri navedene koncentracije. Međutim, niže koncentracije nisu značajno utjecale na rast stanica štoviše neke su imale blago stimulirajuće djelovanje, zbog toga su prikazani rezultati pojedinačnih NSAID-ova koji su utjecali na preživljenje stanica pri najvišoj koncentraciji. Na slici 23 (a i b) (vidi Poglavlje 4.3) prikazan je učinak na preživljenje stanica ovisan o koncentraciji samo za odabrane NSAID-ove. Vidljivo je kako se postotak (%-tak) preživljenja stanica linearno smanjuje sa povećanjem koncentracije određenog NSAID-a, odnosno učinak ispitivanih analita ovisan je o dozi. Također, IC_{50} vrijednosti izračunate su iz krivulja doza-odgovor korištenjem pripadajućih jednadžbi samo za one NSAID-ove koji su pokazali inhibiciju rasta stanica ≥ 50 % (tablica 18 Poglavlja 4.3). Za RTG-2 stanice, IC_{50} vrijednosti nisu izračunate budući da niti jedan od ispitivanih NSAID-ova nije uzrokovao inhibiciju rasta stanica ≥ 50 %, stoga se IC_{50} može smatrati većom od 250 μ M. Budući da niže IC_{50} vrijednosti ukazuju na jači citotoksični učinak, odnosno veću osjetljivost spram djelovanja ispitivanih spojeva, može se zaključiti da je HEK-293T stanična linija osjetljivija na učinak NSAID-ova nego RTG-2 stanice.

Prilikom ispitivanja djelovanja NSAID-ova na RTG-2 i HEK-293T staničnim linijama se pratio izgled stanica pod inverznim mikroskopom, a promjene u morfologiji tretiranih stanica postale su vidljive nakon otprilike 48 sati. Morfologiju stanica tretiranih NSAID-ovima moguće je pratiti svjetlosnim mikroskopom ili fluorescentnim mikroskopom uz primjenu različitih boja (D'Herde i sur., 2003). U svrhu bolje vizualizacije nastalih morfoloških promjena stanice se boje kristal-ljubičasto (veže se na genomsku DNA i proteine stanica). U tretiranim HEK-293T stanicama nakon 72 sata od tretmana primjetne su određene morfološke promjene u pojedinim uzorcima (slika 24 Poglavlja 4.3). Kod kontrolnih stanica vidljiv je monosloj stanica karakteristične fibroblastne morfologije, dok su kod stanica tretiranih s NSAID-ovima vidljive

promjene poput narušene strukture monosloja stanica, zaokruživanje stanica te znatno manji broj stanica u odnosu na kontrolu.

Djelovanje NSAID-ova ispitano je na staničnoj liniji riba, RTG-2, i ljudi, HEK-293T, kako bi se usporedbom dobivenih rezultata utvrdilo razlikuje se toksičnosti testiranih NSAID-ova između navedenih staničnih linija. Može se primijetiti kako %-tak inhibicije nije isti, ali se uočava sličan trend i raspon citotoksičnosti zbog čega obje stanične linije mogu biti dobri modelni *in vitro* sustavi i važna alternativa *in vivo* testovima akutne smrtnosti riba, u predviđanju citotoksičnosti NSAID-ova i drugih „novih onečišćujućih spojeva“ u okolišu.

Kako rezultati brojnih objavljenih studija ukazuju na visoku korelaciju *in vitro* i *in vivo* toksičnosti te obzirom na činjenicu da se tvari prisutne u vodenom okolišu najčešće ispituju *in vivo* na raznim ribama i drugim vodenim organizmima, testovi citotoksičnosti sa staničnim linijama riba predstavljaju vrijedan alat za preliminarnu procjenu toksičnosti raznih kemikalija i uzoraka iz okoliša (Rehberger i sur., 2018; Bols i sur., 2005; Castaño i sur., 2003; Fent, 2001). Budući da se radi o relativno novim istraživanjima, u dostupnoj znanstvenoj literaturi pronađeno je vrlo malo podataka o ispitivanju ekotoksičnosti NSAID-ova primjenom RTG-2 stanične linije ribe. U preglednoj studiji Fent i sur. (2006) pružili su sveobuhvatan pregled *in vitro* citotoksičnosti najistaknutijih lijekova u okolišu, od kojih će se u ovom radu samo NSAID-ovi spomenuti. Na staničnoj liniji ribe PLHC-1 i primarnoj kulturi hepatocita kalifornijske pastrve ispitivana je citotoksičnost DC, a na staničnoj liniji BF-2 SA i paracetamola gdje je *in vitro* citotoksičnost bila nešto niža u usporedbi s *in vivo* studijama. Na primarnoj kulturi monocitnih stanica iz prednjeg bubrega ribe *Hoplais malabaricus* ispitivan je toksični učinak DC, acetilsalicilne kiseline i IBP. Dobiveni rezultati ukazuju kako navedeni NSAID-ovi smanjuju proizvodnju bazalnog dušikova oksida (NO) kao i lipopolisaharidima induciranu proizvodnju NO, potiču oštećenje DNA uključujući fragmentaciju DNA, apoptozu i strukturne promjene genoma te pokazuju potencijalno imunosupresivno djelovanje i genotoksičnost (Ribas i sur., 2014). U nedavnoj studiji Rodrigues i sur. (2020) odnos između podataka *in vivo* i *in vitro* ispitivanja, a koja uključuju i neke NSAID-ove (IBP, DC i KTP), izražen je kao omjer $LC_{50}(96h)/EC_{50}$ te je utvrđena podudarnost podataka od 66%. Na temelju toga, zaključeno je kako se *in vitro* testovi na stanicama mogu smatrati prikladnom alternativom *in vivo* testiranjima farmaceutskih proizvoda na ribama. Primjenom *in vitro* testova na kulturama stanica, nakon validacije, može se značajno smanjiti broj riba potrebnih za procjenu rizika za okoliš što je u skladu s 3R principom. Pri tome je nekoliko staničnih linija istaknuto i odabrano kao obećavajuće alternative, među kojima se H9c2(2-1), HepG2, PLHC-1 i RTG-2 stanice smatraju prikladnim staničnim linijama za daljnje studije, budući da su njihovom

primjenom dobiveni relevantni rezultati tijekom kratkog vremena izlaganja (Rodrigues i sur., 2020).

Također, važno je istaknuti kako su u vodenom okolišu najčešće prisutni razni spojevi stoga je bitno ispitati i učinak smjese spojeva. U studiji Bain i Kumar (2014) ispitivana je *in vitro* citotoksičnost binarnih smjesa različitih skupina lijekova, uključujući NSAID DC, primjenom stanične linije RTG-2. Za spojeve koji su pokazivali citotoksičnost (antidepresiv: fluoksetin, beta-blokator: propranolol te NSAID: DC) stanična linija je bila izložena njihovim binarnim smjesama, a dobiveni profil povezanosti koncentracije i odgovora uspoređivani su s odgovorima prediktivnog modela dodavanja koncentracija. Navedeni model dodavanja koncentracija koristio je Cleuvers (2003) pri ispitivanju toksičnog učinka DC i IBP, doduše na testu s algama, pri čemu su ispitivani NSAID-ovi djelovali nespecifično zbog nepolarne narkoze i slijedili su koncept dodavanja koncentracija. Ovim modelom moguće je predvidjeti toksičnost smjese inertnih kemikalija tj. kemikalija koje nisu reaktivne pri razmatranju ukupnih akutnih učinaka i koje ne reagiraju sa specifičnim receptorima u organizmu, tzv. početnu toksičnost ili narkozu. Mennillo i sur. (2018) pokazali su važnost kombiniranja akutnog i kroničnog biološkog testa s istraživanjem mehanizma detoksikacije na transkripcijskoj i funkcionalnoj razini. Ovim pristupom pruža se bolji pregled i razumijevanje toksikoloških svojstava lijekova koji se obično otkrivaju u okolišu. Ekotoksikološka baterija testova (bakterija, algi i planktonskih račića) korištena je za određivanje akutne i kronične toksičnosti racemičnog KTP i deksketoprofena te stanična linija PLHC-1 za određivanje citotoksičnosti i toksikoloških odgovora. Deksketoprofen je pokazao veće toksično djelovanje u usporedbi s racemičnim KTP na testiranoj bateriji testova, dok ispitivani NSAID-ovi nisu imali citotoksični učinak na staničnu liniju PLHC-1. Ipak, otkriveno je kako racemični KTP i deksketoprofen imaju različit toksičan učinak i mogu djelovati kroz različite mehanizme unutar stanice. I u ovoj studiji je zaključeno da su *in vitro* eksperimenti primjenom stanica korisni za prikupljanje informacija o početnoj, bazičnoj citotoksičnosti, dok će za određivanje štetnih učinaka na subakutnoj razini i nadalje biti potrebne i presudne *in vivo* studije na cijelim organizmima.

U studijama ekotoksičnosti i ispitivanja djelovanja NSAID-ova uglavnom se ispituje djelovanje u okolišu najčešće prisutnih NSAID-ova te onih prisutnih u najvišim koncentracijama, stoga su podaci o *in vitro* učinku 25 različitih NSAID-ova, prikazani u ovom radu, značajan doprinos ovom području, budući da za neke od ispitanih spojeva uopće nema dostupnih podataka o njihovom učinku na razini stanice. Nadalje, prema dosadašnjim saznanjima, pri koncentracijama koje su relevantne za okoliš (ng L^{-1} ili mg L^{-1}) (Fent i sur., 2006) akutni učinci na organizam su vrlo malo vjerojatni, no obzirom na činjenicu da su neki

od ispitanih NSAID-ova pokazali jače djelovanje na RTG-2 i HEK-293T stanicama nego DC, koji je prema Okvirnoj direktivi o vodama EU nedavno dodan na tzv. „*Watch list*“ spojeva koje treba pratiti u površinskim vodama EU, svakako je potrebno i nadalje pratiti sve navedene NSAID spojeve, njihovo djelovanje te prisutnost u raznim matricama i okolišu. Izračunate IC_{50} vrijednosti stoga su korisne za određivanje praga koncentracija za daljnje proučavanje subletalnih učinaka, kao i za preliminarni pregled pri procjeni rizika za okoliš, sukladno Direktivi Europskog vijeća 2001/83/EZ (EZ, 2001), budući da još uvijek nedostaje odgovarajući zakon kojim bi se kontroliralo ispuštanje farmaceutskih proizvoda i proizvoda za osobnu njegu u okoliš.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Razvijena je metoda za istovremeno kvalitativno i kvantitativno određivanje 27 odabranih nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s masenim spektrometrom (UHPLC-MS/MS) u uzorcima hrane životinjskog podrijetla (mlijeko i mišićno tkivo) i vode iz okoliša (otpadna voda).
2. Objedinjavanjem kiselih i bazičnih NSAID-ova u jednu metodu za više vrsta matrica poboljšana je operativna učinkovitost i smanjeni su troškovi (rutinska kontrola) u odnosu na postojeće (zasebne) metode iz literature.
3. Za optimalnu identifikaciju odabranih NSAID-ova, snimanje je provedeno u načinu dinamičkog praćenja višestrukih reakcija (dMRM) pri kojem se za svaki ciljni ion prate dva potvrdna iona, specifična za svaki spoj.
4. Najbolje kromatografsko razdvajanje svih 27 NSAID-ova postignuto je na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μ m) pri temperaturi od 50 °C uz korištenje pretkolone Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 12 mm, 5 μ m) uz 0,01 M amonijev formijat (pH 5) u vodi (v/v) kao pokretnu fazu A i 0,05 % mravlju kiselinu u metanolu (v/v) kao pokretnu fazu B, unutar 12,5 minuta gradijentnim eluiranjem pri protoku od 1 mL min⁻¹ i volumenu injektiranja 12 μ L.
5. Optimiran postupak ekstrakcije iz složenih matrica uključuje enzimsku hidrolizu praćenu ekstrakcijom acetonitrilom nakon koje se ekstrakt pročišćava, uz istovremeno koncentriranje, ekstrakcijom čvrstom fazom kako bi se dobili najveći analitički prinosi.
6. Validacijom razvijene UHPLC-MS/MS metode, u skladu s Odlukom Komisije br. 2002/657/EZ (EZ, 2002) o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata te uzimajući u obzir Uredbu (EZ) br. 37/2010, dokazana je prikladnost njezinog analitičkog postupka za namjenu.
7. Validacija je provedena pomoću alternativne tzv. matrica-sveobuhvatne interne validacije primjenom programskog paketa InterVAL[®] Plus. Niske NDK vrijednosti pojedinih analita zahtijevaju visoku selektivnost detekcije koja osigurava određivanje granične koncentracije analita (CC α) i sposobnosti dokazivanja (CC β), ključnih parametara za praćenje sukladnosti. Dobiveni rezultati validacijskih značajki učinkovitosti zadovoljili su zadane kriterije prihvatljivosti.

8. Procjena utjecaja matrice pokazala je kako uzorke treba kvantificirati pomoću kalibracije u matrici koristeći interne standarde što je osiguralo daljnje poboljšanje metode u pogledu ispravne kvantifikacije.
9. Analitička metoda primijenjena je u analizi 449 uzoraka hrane životinjskog podrijetla (mlijeka i mišićnog tkiva) i 96 uzoraka vode iz okoliša (otpadne vode) s područja Republike Hrvatske prikupljenih tijekom 2019. i 2020. godine s ciljem dobivanja informacija o njihovoj pojavnosti i praćenja stvarnih koncentracija i provjere sukladnosti.
10. Od 27 ispitivanih NSAID-ova analizom 268 uzoraka mlijeka, u koncentracijama višim od dozvoljenih najzastupljeniji je diklofenak (85,7 %), analit s najnižom NDK vrijednosti ($0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$), a pronađen je u 4 uzoraka kravljeg mlijeka ($0,162 - 1,99 \mu\text{g kg}^{-1}$) te u 2 uzorka kozjeg mlijeka ($0,122 - 0,167 \mu\text{g kg}^{-1}$). 4-hidroksiantipirin pronađen je u uzorku kravljeg mlijeka u koncentraciji od $53,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($\text{CC}\alpha = 36,8 \mu\text{g kg}^{-1}$). Analiza mlijeka pokazala je učestalu prisutnost salicilne kiseline, analita koji je endogeno prisutan u prirodi. Analizom 181 uzorka mišićnog tkiva, u 2 uzorka iz 2019. godine pronađen je ketoprofen s koncentracijom od $59,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ u uzorku goveda ($\text{CC}\alpha = 1,12 \mu\text{g kg}^{-1}$), dok je u uzorku svinje iznosila $3,12 \mu\text{g kg}^{-1}$.
11. U analiziranim uzorcima otpadnih voda od 27 ispitivanih NSAID-ova pronađeni su ostaci njih 11, a čija je pojavnost bila sljedeća: diklofenak 87,5 %, ibuprofen 58,3 %, ketoprofen 54,2 % i naproksen 52,1 %, u rasponu koncentracija od $0,033 \mu\text{g L}^{-1}$ za diklofenak do $60,8 \mu\text{g L}^{-1}$ za ibuprofen. U bolničkim otpadnim vodama za diklofenak ($2,97 \mu\text{g L}^{-1}$) i ketoprofen ($16,4 \mu\text{g L}^{-1}$) zabilježene su najveće koncentracije. Kod kompozitnih uzoraka otpadnih voda s ulaza i izlaza UOPV-a, najveće koncentracije su utvrđene za diklofenak (ulaz = $1,06 \mu\text{g L}^{-1}$, izlaz = $1,27 \mu\text{g L}^{-1}$) i ibuprofen (ulaz = $25,4 \mu\text{g L}^{-1}$, izlaz = $63,6 \mu\text{g L}^{-1}$). U trenutno prikupljenim uzorcima industrijskih voda, najveće koncentracije su otkrivene kod ibuprofena ($18,6 \mu\text{g L}^{-1}$) i naproksena ($17,3 \mu\text{g L}^{-1}$). Pronađeni NSAID-ovi i njihove koncentracije posljedica su učestalosti primjene NSAID-ova u području uzorkovanja kao i suvremenosti tehnologije uređaja za pročišćavanje otpadnih voda koja utječe na učinkovitost njihovog uklanjanja.
12. Procjenom citotoksičnog učinka NSAID-ova na stanične linije ribe (RTG-2) i ljudi (HEK-293T) uočen je jači citotoksični učinak na HEK-293T stanice, a posebno fenilbutazona, oksifenbutazona, ketoprofena.
13. Usporedbom izračunatih IC_{50} vrijednosti može se zaključiti da su HEK-293T stanice nešto osjetljivije na djelovanje NSAID-ova, no obje stanične linije pogodne su za preliminarna ispitivanja njihove citotoksičnosti.

14. U sklopu ove disertacije, nove spoznaje o pojavnosti i raspodjeli ispitivanih NSAID-ova u hrani životinjskog podrijetla i okolišnim uzorcima vode, prikupljeni razvijenom UHPLC-MS/MS metodom, kao i procjena njihove toksičnosti predstavljaju doprinos za buduća istraživanja. Prikazani rezultati pridonose sveukupnom znanju i omogućavaju procjenu potencijalnog rizika za ekosustav, a posljedično i zdravlje ljudi, osobito uz očekivanu dugotrajnu izloženost te mogući kronični učinak na žive organizme.

7. POPIS OZNAKA I KRATICA

4-AAA	4-acetilaminoantipirin
4-AA	4-aminoantipirin
4-DMAA	4-dimetilaminoantipirin
4-FAA	4-formilaminoantipirin
4-MAA	4-metilaminoantipirin
4-OH-A	4-hidroksiantipirin
5-FLUOH	5-hidroksi fluniksin
A	Antipirin
AA	engl. <i>Arachidonic acid</i> , arahidonska kiselina
ADI	engl. <i>Acceptable daily intake</i> , prihvatljiv dnevni unos
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
CAV	engl. <i>Cell acceleration voltage</i> , napon ubrzanja kolizijske (sudarne) ćelije
CE	engl. <i>Capillary electrophoresis</i> , kapilarna elektroforeza
CID	engl. <i>Collision-induced dissociation</i> , kolizijom inducirana disocijacija
COX	engl. <i>Cyclooxygenase</i> , ciklooksigenaza
CPF	Karprofen
CVMP	engl. <i>Committee for Medical Products for Veterinary use</i> , Odbor za veterinarsko-medicinske proizvode
DAD	engl. <i>Dioda array detector</i> , detektor s nizom fotoosjetljivih dioda
DC	Diklofenak
DLLME	engl. <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> , disperzivna tekuća-tekuća mikroekstrakcija
DPMR	Državni program monitoringa rezidua
EFSA	engl. <i>European Food Safety Authority</i> , Europska agencija za sigurnost hrane
EMA	engl. <i>European Medicines Agency</i> , Europska agencija za lijekove
ESI	engl. <i>Electrospray ionization</i> , ionizacija raspršenjem
FARAD	engl. <i>Food Animal Residue Avoidance Databank</i>
FCX	Firokoksib
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i> , Američka uprava za hranu i lijekove
FFA	Flufenaminska kiselina
FLU	Fluniksin
FLD	engl. <i>Fluorescence detector</i> , fluorescentni detektor
FNN	engl. <i>Food Fraud Network</i> , mreža za prijevare povezane s hranom
GC	engl. <i>Gas chromatography</i> , plinska kromatografija
GI	Gastrointestinalni
HALMED	Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode
IBP	Ibuprofen
IPAA	Ispropilaminoantipirin
KTP	Ketoprofen
KV	Kardiovaskularni
LC	engl. <i>Liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija
LCL	engl. <i>Lowest calibrated level</i> , najniža moguća koncentracija koja se može kvantitativno odrediti

MCA	Meklofenaminska kiselina
ME	engl. <i>Matrix effect</i> , utjecaj matrice
MFA	Mefenaminska kiselina
MLX	Meloksikam
MMPR	engl. <i>Minimum method performance requirements</i> , minimalni zahtjev učinkovitosti metode
MRL	engl. <i>Maximum residue limit</i> , najveća dopuštena količina ostataka
MRM	engl. <i>Multiple reaction monitoring</i> , snimanje višestrukih reakcija
MS	engl. <i>Mass spectrometry</i> , maseni spektrometar
MU	engl. <i>Measurement uncertainty</i> , mjerna nesigurnost
NDK	Najveće dopuštene količine ostataka
NFA	Nifluminska kiselina
NOEL	engl. <i>No observed effect level</i> , količina tvari pri kojoj nema zapaženih toksikoloških učinaka
NP	engl. <i>Normal phase</i> , kromatografija obrnutih faza
NSAID	engl. <i>Nonsteroidal anti-inflammatory drug</i> , nesteroidni protuupalni lijekovi
OPB	Oksifenbutazon
PG	Prostaglandin
PRX	Piroksikam
QuEChERS	engl. <i>Quick, easy, effective, rugged, and safe</i> , Brza, jednostavna, jeftina, efektivna, robusna i sigurna metoda ekstrakcije
3R	engl. <i>Replacement, Reduction, Refinement</i> , smanjenje, zamjena i poboljšanje uvjeta za životinje
RASFF	engl. <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> , Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i životinje
REACH	engl. <i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical</i> , Registracija, evaluacija, autorizacija i ograničavanje kemikalija
RP	engl. <i>Reversed phase</i> , kromatografija obrnutih faza
RPA	engl. <i>Reference point for action</i> , granica za poduzimanje mjera
RSD	Relativna standardna devijacija
SA	Salicilna kiselina
SIM	engl. <i>Selected/Single ion monitoring</i> , snimanje jednog (odabranog) iona
SLLE-LTP	engl. <i>Solid-liquid extraction followed by a low-temperature partitioning</i> , ekstrakcija kruto-tekuće s podjelom pri niskoj temperaturi
SPE	engl. <i>Solid-phase extraction</i> , ekstrakcija na čvrstoj fazi
SSE	engl. <i>Suppression/enhancement</i> , smanjenje/pojačanje ionskog signala
SŽS	Središnji živčani sustav
TFA	Tolfenaminska kiselina
TIC	engl. <i>Total ione current</i> , snimanje ukupne struje iona
TOF	engl. <i>Time of flight</i> , analizator masa koji mjeri vrijeme leta
UPOV	Uređaj za pročišćavanje otpadnih voda
VDP	Vedaprofen
VMP	Veterinarsko-medicinski proizvodi
VR	Validacijske razine
ZOV	Zagrebačke otpadne vode

8. LITERATURA

Agilent Technologies, 2001, Basics of LC-MS/MS, 5988-2045EN, U.S.A.

Alshana, U., Goger, N.G., Ertas, N. (2013) Dispersive liquid–liquid microextraction combined with field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of non steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products. *Food Chem.* **138**(2-3), 890–897.

Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, Young, C. (2015) Advances in NSAID development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs* **75**, 859-877.

Anonymous 1:

<https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/research-development/maximum-residue-limits-mrl>. Pristupljeno 8. ožujka 2021.

Anonymous 2: <https://www.hapih.hr/en/csh/rasff/>. Pristupljeno 8. ožujka 2021.

Bach-Rojecky, L. (2016) Brzdjelujući oblik ibuprofena u liječenju boli. *Medicus* **25**, 103-106.

Bain, P.A., Kumar, A.(2014) Cytotoxicity of binary mixtures of human pharmaceuticals in a fish cell line: approaches for non-monotonic concentration-response relationships. *Chemosphere* **108**, 334-342.

Berendsen, B.J.A., Stolker, A.A.M., Nielen, M.W.F. (2013) Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. *Trends Anal. Chem.* **43**, 229-239.

Blanca, J., Muñoz, R., Muñoz, P., Aranda, A., Diaz, R., de Pozuelo, M.M. (2013) Analysis of phenylbutazone residues in horse muscle. *Revista del Comité Científico de la AESAN* **17**, 235-246.

Bols, N.C., Dayeh, V.R, Lee, L.E.J., Schirmer, K. (2005) Use of fish cell lines in toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology, In T.P. Mommsen, T.W. Moon (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (pp. 43-84).

Boison, J.O., Ramos, F.J., Chicoine, A. (2016) Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. In J.F Kay, J.D. MacNeil, J. Wang (Eds) *Chemical analysis of non-antimicrobial veterinary drugs residues in food* (pp. 427-475). Wiley, New York.

Božić Luburić, Đ., Bilandžić, N., Varenina, I., Varga, I. Solomun Kolanović, B., Vratarić, D., Radojčić Redovniković, I. (2021) The analysis of acidic and basic non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and muscle samples: a comprehensive analytical approach using UHPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **3**, 1-16.

Britzi, M., Schwartsburd, F. (2019) Development and validation of a high-throughput method for the determination of eight non-steroidal anti-inflammatory drugs and chloramphenicol in milk, using liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. *Int. J. Anal. Bioanal. Methods* 1:005.

Brune, K., Patrignani, P. (2015) New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pain Res. B* **8**, 105-118.

Brune, K., Hinz, B. (2004) The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* **50**, 2391-2399.

BVL Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. (2007) NSAIDs in fresh and lyophilised milk from bovine with LC-MS/MS (Short description, EU-RL-Berlin).

Calatayud, S., Esplugues, J. V. (2016) Chemistry, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of NSAIDs. In: NSAIDs and Aspirin. 3-16.

Castaño, A., Gómez-Lechón, M.J. (2005) Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. *Toxicol. in Vitro.* **19**, 695-705.

Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. E. J., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Riego Sintes, J., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., Segner, H. (2003) The use of fish cells in ecotoxicology. *Atla* **31**, 317-351.

Castilhos TS, Barreto F, Meneghini L, Bergold AM. 2016. Development of high-throughput multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs monitoring in swine muscle by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A* **33**,1166-1174.

Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13926-13931.

Chrusch, J., Lee, S., Fedeniuk, R., Boison, J.O. (2008) Determination of the performance characteristics of a new multi-residue method for nonsteroidal anti-inflammatory drugs,

corticosteroids and anabolic steroids in food animal tissues. *Food Addit. Contam. Part A* **25**,1482–1496.

Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A. (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**(3), 218-232.

Cleuvers, M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* **142**, 185-194.

Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC.

Ćoso, V., Rajić, Z., Zorc, B. (2009) Inhibitori ciklooksigenaze i lipoksigenaze kao lijekovi. *Farmaceutski glasnik* **65**(9), 499-512.

Česen, M., Ahel, M., Terzić, S., Heath, D. J., Heath, E. (2019) The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river. *Sci. Total Environ.* **650**, 2446-2453.

D'Herde, K., Mussche, S., Roberg, K. (2003) Morphological changes in dying cells. U: Cell Proliferation & Apoptosis (Huges, D., Mehmet, H., ured.), BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 201-231.

De Vito V. (2015) Non-steroidal anti-inflammatory drugs in food producing animals. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* **10**(2), 85-90.

DeRuiter, J. (2002) Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). *Principles of Drug Action* **2**, 1-25.

Direktiva 2000/60/EZ europskog parlamenta i vijeća kojom se uspostavlja okvir za djelovanje zajednice na području politike voda, od 23. listopada 2000 (OKVIRNA DIREKTIVA EU O VODAMA)

Dowling, G., Malone, E., Harbison, T., Martin, S. (2010) Analytical strategy for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma and improved analytical strategy for the determination of authorized and non-authorized non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam.* **27**(7), 962-982.

Dubreil-Chéneau, E., Piroatis, Y., Bessiral, M., Roudaut, B., Verdon, E. (2011) Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 non steroidal anti-

inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A* **1218**(7), 6292-6301.

Emmanuel, A.V., Tack, J., Quigley, E.M., Talley, N.J. (2009) Pharmacological management of constipation. *Neurogastroenterol. Motil.* **21**, 41–54.

EURL 2020. Guidance on minimum method performance requirements (MMPRS) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices.

[EFSA] European Food Safety Authority (2021) Report for 2019 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA J.* 18(3):EN-1997.

[EFSA] European Food Safety Authority (2019) Report for 2017 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA:EN-1578*.

[EFSA/EMA] European Food Safety Authority and European Medicines Agency (2020) Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_workdoc_2018_en.pdf. Pristupljeno 15. 11. 2020.

[EFSA/EMA] European Food Safety Authority and European Medicines Agency (2013) Joint statement of EFSA and EMA on the presence of residues of phenylbutazone in horse meat. *EFSA J.* 11(4):3190.

[EMA] European medicines agency (2018) Guideline on the environmental risk assessment of 5 medicinal products for human use. *EMA/CHMP/SWP/4447/00 Rev. 1*

[EZ] (2021): Provedbena uredba Komisije (EU) 2021/808 od 22. ožujka 2021. o provođenju analitičkih metoda za rezidue farmakološki djelatnih tvari koje se upotrebljavaju na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane i o tumačenju rezultata kao i o metodama koje treba primjenjivati za uzorkovanje te o stavljanju izvan snage odluka 2002/657/EZ i 98/179/EZ.

[EZ] (2021): Union register of veterinary medicinal products. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/reg_vet_act.htm?sort=a. Pristupljeno 19. 3. 2021.

[EZ] (2015): Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2015) 1756).

[EZ] (2015): IZVJEŠĆE KOMISIJE EUROPSKOM PARLAMENTU I VIJEĆU o funkcioniranju Uredbe (EZ) br. 470/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 6. svibnja 2009. o propisivanju postupaka Zajednice za određivanje najvećih dopuštenih količina rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla, o stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 2377/90 i o izmjeni Direktive 2001/82/EZ Europskog parlamenta i Vijeća i Uredbe (EZ) br. 726/2004 Europskog parlamenta i Vijeća.

[EZ] (2010): Uredba Komisije (EU) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. godine o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla (SL L 15, 20. 1. 2010., sa svim izmjenama i dopunama).

[EZ] (2009): UREDBA (EZ) br. 470/2009 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 6. svibnja 2009. o propisivanju postupaka Zajednice za određivanje najvećih dopuštenih količina rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla, o stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 2377/90 i o izmjeni Direktive 2001/82/EZ Europskog parlamenta i Vijeća i Uredbe (EZ) br. 726/2004 Europskog parlamenta i Vijeća.

[EZ] (2006): Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.

[EZ] (2002) Odluka komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, 2002/657/EZ.

[FDA] Food Drug Agency (2019): Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products 3rd Edition, U.S. Food and Drug Administration, Foods Program, 2019.

Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **76**, 122-159.

Fent, K. (2001) Fish cell lines as ersatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. in Vitro* **15**, 477-488.

Freitas, A., Vila Pouca, A.S., Magalhães, D., Gamboa-Cruz, C., Barros, S., Barbosa, J., Ramos, F. (2020) Development and Validation of a multi-detection confirmatory method for antibiotics determination in piglet kidneys by UHPLC-TOF-MS according to Commission Decision 2002/657/EC. *Food Anal Methods* **14**, 430-441.

Gallo, P., Fabbrocino, S., Dowling, G., Salini, M., Fiori, M., Perretta, G., Serpe, L. (2010) Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drug residues in raw milk by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**(17), 2832-2839.

Gallo, P., Fabbrocino, S., Vinci, F., Fiori, M., Danese, V., Nasi, A., Serpe, L. (2006) Multi-residue determination of non-steroidal anti-inflammatory drug residues in animal serum and plasma by HPLC and photo-diode array detection. *J. Chromatogr. Sci.* **44**(10), 585-90.

Gašljević, V. (2010) Method validation and measurement uncertainty. *Biochemia Medica* **20**(1), 57-63.

Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Mainero Rocca, L., Curini, R., Venditti, A. (2012) Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating nonsteroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**(5), 1375–1388.

Gross, J.H. (2017) Mass spectrometry: a textbook, 3. izdanje, Springer Internation Publishing AG, Cham.

Guatteo, R., Levionnois, O., Fournier, D., Gue'mene, D., Latouche, K., Leterrier, C., Mormede, P., Prunier, A., Serviere, J., Terlouw, C., Le Neindre, P. (2012) Minimising pain in farm animals: the 3S approach-„Suppress, Substitute, Soothe“. *Anim.* **6**, 1261-1274.

Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M. (2012) Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* **1259**, 3-15.

[HZN] Hrvatski zavod za norme (2017): Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija HRN EN ISO/IEC 17025.

Hu, T., Peng, T., Li, X.J., Chen, D.D., Dai, H.H., Deng, X.J., Yue, Z.F., Wang, G.M., Shen, J.Z., Xia, X., Ding, S.Y., Zhou, Y.N., Zhu, A.L., Jiang, H.Y. (2012) Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A* **1219**, 104-113.

Jedziniak, P., Olejnik, M., Pietruk, K., Protasiuk, E., Szprengier-Juszkiewicz, T., Żmudzki, J. (2015) Simultaneous determination of residues of non-steroidal anti-inflammatory drugs and glucocorticosteroids in animal muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods* **9**, 1837-1848.

Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T., Pietruk, K., Śledzińska, E., Żmudzki, J. (2012) Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**(10), 2955–2963.

Jedziniak, P., Szprengier-Juszkiewicz, T., Olejnik, M., Żmudzki, J. (2010) Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal muscles by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **672**(1-2), 85-92.

Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., Widmer, M. (2014) Determination of corticosteroids, anabolic steroids, and basic nonsteroidal anti-inflammatory drugs in milk and animal tissues. *JAOAC Int.* **97**(1), 263-272.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.

Kumirska, J. (2020) Special Issue“Pharmaceutical Residues in the Environment“. *Molecules* **25**, 2-4.

Kümmerer, K. (2010) Pharmaceuticals in the Environment. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **35**, 57-75.

Laufer, S. (2007) NSAIDs, chemical structure and molecular mode of action. In: Schmidt, R., Willis, W. (eds) *Encyclopedia of pain*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda-osnovna načela. *Svijet po mjeri* **1**, 61-64.

Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., Zito, S. W. (2013) *Foye's principles of medicinal chemistry: 7th ed.* Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott, Williams & Wilkins, 988-1042.

Loetsch, J., Oertel, B. (2013) NSAIDs, Pharmacokinetics. *Encyclopedia of Pain* 2350–2361.

- Malone, E.M., Dowling, G., Elliott, C.T., Kennedy, D.G., Regan, L. (2009) Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of antiinflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1216**(46), 8132–40.
- Mainero Rocca, L., Gentili, A., Pérez-Fernández, V., Tomai, P. (2017) Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LCMS based methods. *Food Addit. Contam. Part A* **34**(5), 766-784.
- McEvoy, J.D.G. (2015) Emerging food safety issues: An EU perspective. *Drug Test. Analysis* **8**, 511-520.
- Mehanna, A.S. (2003) NSAIDs: Chemistry and Pharmacological Actions. *Am. J. Pharm. Educ.* **67**, 1-7.
- Mennillo, E., Arukwe, A., Monni, G., Meucci, V., Intorre L., Pretti, C. (2018) Ecotoxicological properties of ketoprofen and S(+)-enantiomer (dexketoprofen): Bioassays in freshwater model species and biomarkers in fish PLHC-1 cell line. *Environ. Toxicol. Chem.* **37**(1), 201-212.
- Mimica Matanović, S. (2014) Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika. *Medicus* **23**, 31-46.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- [NN] Narodne novine (2017): Zakon o zaštiti životinja, br. 102/17.
- [NN] Narodne novine (2013): Zakon o veterinarstvu br. 82/2013-1734.
- [NN] Narodne novine (2005): Pravilnik o provođenju analitičkih rezultata i tumačenju rezultata br. 2/2005-16.
- Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) — clinical effect and indication. In: Rovenský J., Payer J. (eds) Dictionary of Rheumatology. Springer, Vienna, 145-146.
- Oertel, B., Lötsch, J. (2007) NSAIDs, Pharmacokinetics. In: Schmidt R., Willis W. (eds) Encyclopedia of Pain. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A. (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* **427**, 630-633.

- Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P., Edder, P. (2009) Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **877**, 2363-2374.
- Osafo, N., Agyare, C., Obiri, D. D., Antwi, A. O. (2017) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. InTech – open science / open minds 1-15.
- Parolini, M. (2020) Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Sci Total Environ.* **740**, 140043.
- Parolini, M., Binelli, A. (2012) Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve, *Dreissena polymorphas*. *Ecotoxicol.* **21**, 379-392.
- Peng, T., Zhu, A.L., Zhou, Y.N., Hu, T., Yue, Z.F., Chen, D.D., Wang, G.M., Kang, J., Fan, C.L., Chen, Y., Jiang, H.Y. (2013) Development of a simple method for simultaneous determination of nine subclasses of NSAIDs in milk and dairy products by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **933**, 15-23.
- Pietruk, M., Jedziniak, P., Olejnik, M. (2021) LC-MS/MS Determination of 21 Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Residues in Animal Milk and Muscle. *Molecules* **26**, 5892.
- Pountos, I., Georgouli, T., bird, H., Giannoudis, P.V. (2011) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandis, indications, and side effects. *Int. J. Interferon, Cytokine Mediat.* **3**, 19-27.
- Rainsford, K. D. (2007) Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell. Biochem.* **42**, 3-27.
- Pugajeva, I., Ikkere, L.E., Judjallo, E., Bartkevics, V. (2019) Determination of residues and metabolites of more than 140 pharmacologically active substances in meat by liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed.* **166**, 252-263.
- Rao, P.N.P., Knaus, E.E. (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **11**, 81s-110s.
- Rehberger, K., Kropf, C., Segner, H. (2018) *In vitro* or not *in vitro*: a short journey through a long history. *Environ. Sci. Eur.* **30**(23), 1-12.

Ribas, J.L.C., da Silva, C.A., de Andrade, L., Galvan, G.L., Cestari, M.M., Trinidad, E.S., Zamprônio, A.R., de Assis H.C. (2014) Effects of anti-inflammatory drug in primary kidney cell culture of a freshwater fish. *Fish Shellfish Immunol.* **40**, 296-303.

Rodrigues, E.T., Varela, A.T., Pardal, M.A., Sardão, V.A. (2020) Cell-based assays as an alternative for the study of aquatic toxicity of pharmaceuticals. *Environ, Sci, Pollut. Res.* **27**, 7145–7155.

Rouzer, C.A., Marnett, L.J. (2008) Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.* **50** (Supplement), S29-S34.

Rúbies, A., Guo, L., Centrich, F., Granados, M. (2016). Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry: Triple quadrupole versus Q-Orbitrap mass analyzers. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**(21), 5769-5778.

Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M. C.B.S.M. (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **175**, 45-95.

Schneider, M.J., Lehotay, S.J., Lightfield, A.R. (2012) Evaluation of a multi-class, multi-residue liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for analysis of 120 veterinary drugs in bovine kidney. *Drug Test. Analysis* **4**, 91-102.

Scott, P.R. (2013) The challenges to improve farm animal welfare in the United Kingdom by reducing disease incidence with greater veterinary involvement on farm. *Anim.* **3**, 629-646.

Smith, G.W., Davis, J.L., Tell, L.A., Webb, A.I., Riviere, J.M. (2008) Extralabel use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cattle. *JAVMA Vet Med Today: FARAD Digest.* **232**, 697-701.

Stachniuk, A., Fornal, E. (2016) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal. Meth.* **9**, 1654-1665.

Stoyke, M., Gowik, P. (2005) Confirmatory method for the determination of acid NSAIDs in muscle, liver and kidney with LC-MS-MS. NSAI_004. BVL Standard Operating Procedure (EU-RL-Berlin).

- Styszko, K., Proctor, K., Castrignanò, E., Kasprzyk-Hordern, B. (2021) Occurrence of pharmaceutical residues, personal care products, lifestyle chemicals, illicit drugs and metabolites in wastewater and receiving surface waters of Krakow agglomeration in South Poland. *Sci. Total Environ.* **768**, 144360.
- Thornton P.K. (2010) Livestock production: Recent trends, future prospects. *Philos. Trans. R. Soc. B* **365**, 2853-2867.
- Terzić, S., Andrišić, M., Žarković, I., Vujnović, A., Perak Junaković, E., Vretenar Špigelski, K., Sinković, M., Pehec, M., Fajdić, D., Šandor, K. (2020) Mogućnost primjene neodobrenih veterinarsko-medicinskih proizvoda (off-label use). *Vet. stanica* **51**(4), 455-461.
- Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Müller, J., Knepper, T., Martí, I., Ventura, F., Jovančić, P., Jabučar, D. (2008) Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan region. *Sci. Total Environ.* **399**, 66–77.
- Truhaut, R. (1977) Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **1**, 157-173.
- Van Hoof, N., De Wasch, K., Poelmans, S., Noppe, H., De Brabander, H. (2004) Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine muscle: optimisation of ion trap parameters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**(23), 2823–2829.
- van Pamel, E., Daeseleire, E. (2015) A multiresidue liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the detection and quantification of 15 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk. *Anal Bioanal Chem.* **407**, 4485-4494.
- Vane, J.R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* **231**, 232-235.
- Vane, J.R., Botting, R.M. (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* **104**, 2S–8S.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M. (1998) Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 97-120.
- Vrček, V. (2017) Farmakoeкологија – okolišna sudbina lijekova. *Kem. Ind.* **66**, 135-144.
- Wong, R.S.Y. (2019) Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in cancer prevention and cancer promotion. *Adv. Pharmacol. Sci.* 1-10.

9. ŽIVOTOPIS

Đurđica Božić Luburić (rođ. Božić) rođena je 6. svibnja 1985. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu (Srednja škola Sesvete, opća gimnazija). Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2004. godine te ga završava 2010. godine. Diplomom inženjera biotehnologije stekla je 21. 12. 2010. godine obranom diplomskog rada pod naslovom „Utjecaj agroekoloških uvjeta na sekundarne metabolite u tri sorte brokule (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.)“ izrađenog pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković. Akademske godine 2009./2010., zajedno s još dvoje kolega, dobila je Dekanovu nagradu za rad pod naslovom „Utjecaj agroekoloških uvjeta uzgoja na biološki aktivne spojeve lista batata (*Ipomoea batatas* L.)“.

U lipnju 2011. godine zaposlena je kao stručni suradnik analitičar u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu na razvoju analitičkih metoda za određivanje ostataka (rezidua) veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla. Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. godine.

Sudjelovala je na brojnim edukacijama u inozemstvu na kojima je usavršavala znanje i vještine iz područja analitičkih metoda tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS i LC-Q-TOF) te kontrole zaostajanja farmakološki aktivnih tvari u hrani (2014. i 2016. godine u Referentnom laboratoriju za nesteroidne protuupalne lijekove, EURL-BVL u Berlinu, Njemačka, 2015. godine u Referentnom laboratoriju za antibiotike, EURL-Anses, Fougères, Francuska). Aktivna je u područjima validacije analitičkih metoda. Vodila je manji istraživački projekt naslova „Razvoj napredne analitičke metode za određivanje ostataka nitrofurana i njihovih metabolita u uzorcima životinjskog podrijetla“, odobrenog od strane Povjerenstva za ocjenu zahtjeva za namjensko institucijsko financiranje znanstvene djelatnosti sredstvima Ministarstva znanosti i obrazovanja provedenog u periodu od prosinca 2020. do veljače 2021. godine.

Do sada je objavila 10 znanstvenih a1 radova, 16 a2, 1 a3 te 1 stručni rad. Sudjelovala je na 5 međunarodnih i na 1 domaćem znanstvenom skupu.

Popis objavljenih radova:**a1**

1. Varenina, I., Bilandžić, N., **Božić Luburić, Đ.**, Solomun Kolanović, B. Varga, I. (2022) High resolution mass spectrometry method for the determination of 13 antibiotic groups in bovine, swine, poultry and fish meat: An effective screening and confirmation analysis approach for routine laboratories. *Food control Part A*, 1-11
 2. **Božić Luburić, Đ.**, Bilandžić, N., Varenina, I., Varga, I., Solomun Kolanović, B., Vratarić, D., Radojčić Redovniković, I. (2021) The analysis of acidic and basic non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and muscle samples: a comprehensive analytical approach using UHPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam. - Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **3**, 1-16
 3. Bilandžić, N., Sedak, M., Čalopek, B., Đokić, M., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., **Božić Luburić, Đ.**, Varga, I., Hruškar, M. (2021) Dietary exposure of the adult Croatian population to meat, liver and meat products from the Croatian market: Health risk assessment. *J. Food Compos. Anal.* **95**, 103672.
 4. Bilandžić, N., Sedak, M., Čalopek, B., Đokić, M., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., **Božić Luburić, Đ.**, Varga, I., Roncarati, A. (2020) Evaluation of element concentrations in beef and pork meat cuts available to the population in the Croatian capital. *Foods* **9**(12), 1861-1861.
 5. Solomun Kolanović, B., Bilandžić, N., Kos, B., Šušković, J., Cvetnić, L., Varenina, I., **Božić Luburić, Đ.**, Varga, I., Pavliček, D., Denžić Lugomer, M., Cvetnić, Ž. (2019) Distribution and elimination of levamisole in eggs and tissues after oral administration to laying hens, determined by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. - Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **36**(5), 729-739.
 6. Varenina, I., Bilandžić, N., Solomun Kolanović, B., **Božić, Đ.**, Sedak, M., Đokić, M., Varga, I. (2016) Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in muscle, egg, milk and honey. *Food Addit. Contam. - Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **33**(4), 656-667.
 7. Bilandžić, N., Tlak Gajger, I., Kosanović, M., Čalopek, B., Sedak, M., Solomun Kolanović, B., Varenina, I., **Božić Luburić, Đ.**, Varga, I., Đokić, M. (2017) Essential and toxic element concentrations in monofloral honeys from southern Croatia. *Food chem.* **234**, 245-253.
-

8. Bilandžić, N., Tanković, S., Jelušić, V., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., **Božić Luburić, Đ.**, Cvetnić, Ž. (2016) Aflatoxin M1 in raw and UHT cow milk collected in Bosnia and Herzegovina and Croatia. *Food control*, 68, 352-377.
9. Varenina, I., Bilandžić, N., Cvetnić, L., Kos, B., **Božić, Đ.**, Solomun Kolanović, B., Cvetnić, Ž. (2015) Deposition and depletion of maduramicin residues in eggs after oral administration to laying hens determined by LC-MS. *Food Addit. Contam. - Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **32**(3), 324-332.
10. Bilandžić, N., **Božić, Đ.**, Solomun Kolanović, B., Varenina, I., Cvetnić, L., Cvetnić, Ž. (2015) Distribution of sulfamonomethoxine and trimethoprim in egg yolk and white, *Food chemistry* **178**, 32-37.

a2

1. Puntarić, A., **Božić Luburić, Đ.**, Varenina, I., Bilandžić, N., Krpan, M. Hruškar, M. (2020) Sedativi u veterinarskoj medicini i njihovo određivanje. *Veterinarska stanica*, 152(2); 193-206.
2. Varga, I., Solomun Kolanović, B., Varenina, I., **Božić Luburić, Đ.**, Bilandžić, N. (2020) Kontaminacija mliječnih proizvoda aflatoksinom M1. *Veterinarska stanica*, **51**(5), 547-556
3. Bilandžić, N., Varenina, I., Varga, I., Solomun Kolanović, B., **Božić Luburić, Đ.** (2019) Kontrola antibiotika u mesu i mesnim proizvodima u Europskoj Uniji. *Meso : prvi hrvatski časopis o mesu. XXI svibanj-lipanj.* **3**, 279-294.
4. Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., **Božić Luburić, Đ.**, Varga, I., Terzić, S. (2018) Kolistin, polipeptidni antibiotik zadnje obrane protiv invazivnih Gram-negativnih bakterija. *Veterinarska stanica.* **49**(4), 273-286.
5. Varga, I., **Božić Luburić, Đ.**, Solomun Kolanović, B., Varenina, I., Bilandžić, N. (2018) Salicilna kiselina - lijek sa različitim ljekovitim svojstvima. *Veterinarska stanica.* **49** (6), 413-422.

Stručni radovi

1. **Božić Luburić, Đ.**, Bilandžić, N., Radojčić Redovniković, I., Varenina, I., Varga, I., Solomun Kolanović, B. (2016) Nesteroidni protuupalni lijekovi – svojstva, mehanizam djelovanja, primjena i kontrola. *Veterinarska stanica*, **47**(6), 523-532.
-