

Validacijski postupci u određivanju sedativa u bubregu životinja primjenom UHPLC-MS/MS metode

Puntarić, Ada

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:716492>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Ada Puntarić

1143/USH

**VALIDACIJSKI POSTUPCI U
ODREĐIVANJU SEDATIVA U
BUBREGU ŽIVOTINJA
PRIMJENOM UHPLC-MS/MS
METODE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i neposrednim vodstvom dr. sc. Nine Bilandžić, znanstvene savjetnice.

ZAHVALA

Želim zahvaliti mentorici, prof. dr. sc. Mirjani Hruškar, na strpljenju, savjetima i želji da ovaj diplomski rad bude napravljen u najboljoj mogućoj formi unatoč trenutnoj situaciji. Bez njene pomoći i intervencija, odrađivanje ovog diplomskog rada na Hrvatskom veterinarskom institutu ne bi bilo moguće. Nadalje, hvala dr. sc. Nini Bilandžić što je dozvolila moj boravak u Laboratoriju za određivanje rezidua i omogućila mi da barem nakratko iskusim rad u takvom laboratoriju. Ne smijem zaboraviti dipl. ing. biotehnol. Đurđicu Božić Luburić, hvala na susretljivosti, strpljivosti, velikoj pomoći prilikom izrade i konstruktivnim savjetima bez kojih ovaj rad ne bi izgledao ovako.

Prijatelju i prijateljicama, divnim ljudima koje sam upoznala na fakultetu: hvala što sam s vama stvarala uspomene i iskusila avanture koje ću zauvijek pamti. Sretna sam što sam vas upoznala i što sam baš s vama provela studentski dio svojeg života.

Svakako, najveća hvala pripada mojoj obitelji: mami Ljiljani, tati Dinku, sestrama Idi i Edi. Hvala vam što ste vjerovali u mene od početka, bili bezuvjetna podrška i poticali me da budem najbolja u svemu što radim. Hvala što ste trpili moje ispade tokom studiranja i tješili me u bitnim trenucima.

Hvala i šogorima što su me štedili s plaćanjem pića pod izlikom što sam student. Na moju žalost, ali vašu sreću – ti dani su prošlost ☺

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

VALIDACIJSKI POSTUPCI U ODREĐIVANJU SEDATIVA U BUBREGU ŽIVOTINJA PRIMJENOM UHPLC-MS/MS METODE

Ada Puntarić, 1143/USH

Sažetak: Redovitu kontrolu prehrambenih proizvoda, uz korištenje adekvatnih i pouzdanih analitičkih metoda potrebno je provoditi zbog potencijalno štetnog utjecaja na zdravlje potrošača. Prisutnost ostataka rezidua sedativa u proizvodima životinjskog podrijetla je realan. Cilj ovog rada bio je odrediti validacijske postupke u određivanju sedativa u bubregu životinja primjenom UHPLC-MS/MS metode. Od validacijskih parametara određivani su: specifičnost, linearnost, ponovljivost i međupreciznost, granična količina analita, sposobnost dokazivanja, mjerna nesigurnost, robusnost i stabilnost. Rezultati validacije su zadovoljili kriterije propisane Uredbom Europske komisije br. 657/2002. Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti kako je odabrana metoda prikladna za određivanje rezidua osam sedativa u uzorcima životinjskih bubrega.

Ključne riječi: rezidue sedativa, UHPLC-MS/MS, validacija

Rad sadrži: 57 stranica, 18 slika, 15 tablica, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Hruškar, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Pomoć pri izradi: dr.sc. Nina Bilandžić, znan. savj., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan
2. Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar
3. Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj.
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Datum obrane: 29. rujan, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduate Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Quality Control

Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

VALIDATION PROCEDURES WHILE DETERMINING SEDATIVE RESIDUES IN ANIMAL KIDNEY USING UHPLC-MS/MS METHOD

Ada Puntarić, 1143/USH

Abstract: *It is necessary to conduct regular control of food products using appropriate and reliable analytical method due to the potentially harmful impact on consumer health. The presence of sedative residues in products of animal origin is realistic. The aim of this study was to determine validation procedures in the determination of sedative residues in animal kidney using the UHPLC-MS/MS method. Validation parameters that were determined: specificity, linearity, repeatability and intermediate precision, decision limit, detection capability, measurement uncertainty, robustness and stability. The validation results met the criteria prescribed by the European Commission Regulation no. 657/2002. Based on the obtained results, it can be concluded that the chosen method is suitable for the determination of eight sedative residues in animal kidney samples.*

Keywords: *sedative residues, UHPLC-MS/MS, validation*

Thesis contains: 57 pages, 18 figures, 15 tables, 39 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Mirjana Hruškar, Full professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb*

Technical support and assistance: *PhD. Nina Bilandžić, SA, Croatian Veterinary Institute, Zagreb*

Reviewers:

1. PhD. *Marina Krpan*, Assistant professor
2. PhD. *Mirjana Hruškar*, Full professor
3. PhD. *Nina Bilandžić*, Scientific adviser
4. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 29th September, 2020

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VETERINARSKO-MEDICINSKI PROIZVODI.....	2
2.1.1. Monitoring rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda.....	3
2.1.2. Sedativi.....	6
2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA.....	14
2.2.1. Parametri validacije	15
2.2.1.1. <i>Specifičnost/selektivnost</i>	16
2.2.1.2. <i>Točnost/ istinitost</i>	16
2.2.1.3. <i>Preciznost</i>	17
2.2.1.4. <i>Linearnost</i>	18
2.2.1.5. <i>Robusnost</i>	18
2.2.1.6. <i>Granica detekcije (LOD)</i>	18
2.2.1.7. <i>Granica kvantifikacije (LOQ)</i>	18
2.2.1.8. <i>Granična koncentracija analita (CCα)</i>	19
2.2.1.9. <i>Sposobnost dokazivanja (CCβ)</i>	19
2.3. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA SEDATIVA	19
2.3.1. UHPLC-MS/MS metoda	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	24
3.1. UZORCI	24
3.2. STANDARDI	24
3.3. KEMIKALIJE.....	25
3.4. APARATURA I PRIBOR	25
3.5. METODA RADA	26
3.5.1. Postupanje s uzorcima	26
3.5.2. Priprema otopina	26
3.5.3. Priprema radnih otopina i otopina internih standarda.....	27
3.5.4. Priprema matriks kalibracijske krivulje.....	28
3.6. POSTUPCI KONTROLE KVALITETE.....	28

3.7. PROČIŠĆAVANJE UZORAKA	29
3.8. ANALIZA UZORAKA NA LC-MS/MS UREĐAJU	31
3.8.1. Kromatografski uvjeti UHPLC-MS/MS i uvjeti masene spektrometrije	32
3.9. KVALITATIVNA PROCJENA	35
3.10. KVANTITATIVNA PROCJENA	36
4. REZULTATI I RASPRAVA	40
4.1. SPECIFIČNOST	40
4.2. LINEARNOST	42
4.3. PONOVLJIVOST/MEĐUPRECIZNOST	45
4.4. GRANIČNA KOLIČINA ANALITA, SPOSOBNOST DOKAZIVANJA, ISKORIŠTENJE I MJERNA NESIGURNOST	47
4.5. ROBUSNOST	48
4.6. STABILNOST	49
5. ZAKLJUČCI	51
6. LITERATURA	52

1. UVOD

Veterinarsko-medicinski proizvodi su široko rasprostranjeni prilikom uzgoja životinja i proizvodnje hrane životinjskog podrijetla. Zbog koristi koje pružaju, čime ujedno i olakšavaju uzgoj životinja u današnje vrijeme, može se reći kako je moderna proizvodnja hrane gotovo nezamisliva bez njih. Pritom je bitno da posjednici životinja i proizvođači hrane upotrebljavaju iste u skladu s propisanim mjerama. No, često ne pridržavanje razdoblja karence dovodi do toga da veterinarsko-medicinski proizvodi zaostaju u hrani životinjskog podrijetla u obliku rezidua koje pritom mogu potencijalno naštetiti zdravlju potrošača. Stoga je u cilju zaštite zdravlja potrošača i osiguravanja zdravstveno ispravne i sigurne hrane određena najviša dopuštena količina (NDK) rezidua nekih veterinarsko-medicinskih proizvoda u životinjskim tkivima i organima i drugim proizvodima životinjskog podrijetla. Među njima su i sedativi, veterinarsko-medicinski proizvodi korišteni s ciljem smirivanja i opuštanja životinje, ponajviše prije klanja, kako bi se spriječio stres životinja koji, kao takav, posljedično može imati negativan utjecaj na kvalitetu mesa. Oni predstavljaju rizik za zdravlje potrošača prvenstveno zbog korištenja netom prije klanja (prilikom prijevoza do klaonice).

Kako bi se otkrilo postoje li nesukladnosti u uzorcima životinjskog podrijetla, potrebno je provoditi redoviti monitoring istih, uz korištenje analitičkih metoda koje su sposobne kvantificirati i nedvojbeno identificirati rezidue pri bilo kojim, čak i najmanjim koncentracijama. Postoje literaturni podaci o određivanju rezidua sedativa u biološkim uzorcima uz pomoć tekućinske/plinske kromatografije (Cerkvenjak Flajs i MacNeil, 2017) ili ELISA testova (Cooper i sur., 2004), no danas je standard za njihovo određivanje tekućinska kromatografija povezana s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) koja prednjači s visokom osjetljivošću i specifičnošću (Oliveira i sur., 2016; Robert i sur., 2013; Rocca i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je odrediti validacijske postupke u određivanju rezidua sedativa u bubregu životinja primjenom UHPLC-MS/MS metode. U ovoj metodi korišteni su uzorci bubrega juneta i svinje te osam vrsta sedativa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VETERINARSKO-MEDICINSKI PROIZVODI

„Veterinarsko-medicinski proizvod (VMP) je svaka tvar ili kombinacija tvari za koju se tvrdi da ima svojstvo liječenja i sprečavanja bolesti životinja ili svaka tvar ili kombinacija tvari koje se mogu rabiti ili primijeniti na životinjama u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili postavljanjem medicinske dijagnoze“ (Europska komisija, 2001). VMP se koriste u čitavom svijetu i može se reći kako je moderna proizvodnja hrane nezamisliva bez njih bilo da se koriste u svrhu terapije ili profilakse, modifikacije fizioloških funkcija ili poboljšanja rasta i produktivnosti životinje, njihovim korištenjem se osigurava sigurna hrana s visokim prihodima i niskim gubicima (Falowo i Akimoladum, 2019). To je od velike važnosti zbog konstantno rastuće svjetske populacije te je bitno osigurati dovoljne količine hrane (Beyene, 2016). Primjerice, potreba za mesom i drugim proizvodima od životinja intenzivno raste te se smatra kako će do 2050. godine prosječna potrošnja mesa po glavi stanovnika biti otprilike 86 kg, što je duplo više od procijenjene potrošnje mesa po glavi stanovnika danas (42,9 kg) (Falowo i Akimoladum, 2019).

Svaki VMP koji se koristi treba biti odobren za upotrebu na životinjama za proizvodnju hrane te analiziran na sve potencijalno štetne učinke koji bi se mogli pojaviti kod ljudi koji konzumiraju meso i druge proizvode tretiranih životinja (Trevisani i sur., 2019). Isto tako, svaki posjednik životinja namijenjenih prehrani ljudi treba voditi i čuvati evidenciju o liječenju navedenih životinja do pet godina nakon primjene VMP-a (Europska komisija, 2001). Naime, u proizvodima životinjskog podrijetla nerijetko zaostaju rezidue korištenih VMP-a. Reziduama nazivamo ostatke tvari s farmakološkim djelovanjem, ostatke njihovih metabolita i drugih tvari koje mogu zaostati u životinjskim organima, tkivima i proizvodima i kao takve mogu biti štetne za zdravlje ljudi (Zakon o veterinarstvu 82/2013, 2013). Iako u pravilu proizvodi životinjskog podrijetla ne bi smjeli sadržavati rezidue korištenih VMP-a jer se oni u organizmu životinja metaboliziraju s ciljem što lakšeg uklanjanja iz organizma putem urina ili izmeta; određena količina rezidua može zaostati i biti detektirana u organima i tkivima tretiranih životinja (Beyene, 2016). U cilju zaštite zdravlja potrošača, određena je i najviša dopuštena količina (NDK) rezidua (MRL, engl. *Maximum Residue Level*) VMP-a koje

zaostaju u organima i tkivima tretiranih životinja ili u proizvodima životinjskog podrijetla (Trevisani i sur., 2019). U Europskoj uniji (EU) najviše dopuštene količine rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla određene su Uredbom Komisije br. 37/2010 (Europska komisija, 2010).

Postoje brojni čimbenici koji mogu utjecati na pojavu ostataka VMP-a u hrani životinjskog podrijetla kao što su vrsta, sastav, način i mjesto primjene VMP-a, početna primijenjena doza (Trevisani i sur., 2019), ali i metabolizam i opće stanje tretirane životinje te kemijska interakcija među lijekovima koji se koriste na životinji (Beyene, 2016). Iako su u pravilu prisutni u relativno malim količinama i ne nužno toksičnima, dugotrajno i kontinuirano unošenje rezidua VMP-a u ljudski organizam hranom životinjskog podrijetla predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje i sigurnost potrošača (Beyene, 2016), a pogotovo problem nastaje kada je koncentracija rezidua iznad najviše dopuštene količine. U većini slučajeva jedan od razloga pojavnosti rezidua VMP-a, uz nepridržavanje preporučenih doza i neispravan način primjene, je nepoštivanje karence lijeka, odnosno vremena koje je potrebno da se lijek u organizmu razgradi do dopuštene razine i/ili izluči iz organizma liječenih životinja.

Postoji niz literaturnih podataka i znanstvenih studija koje su dokazale štetnost rezidua VMP-a prisutnih u hrani životinjskog podrijetla. Primjerice, prema Falowo i Akimoladumu (2019), posljedice unosa rezidua u organizam čovjeka povezuju se s razvojem antimikrobne rezistencije, poremećajima intestinalne mikroflore, razvitkom alergija ili hipersenzibilnosti, pa čak i mutagenim, teratogenim i kancerogenom djelovanjem. Također, povećanjem svijesti potrošača o utjecaju rezidua VMP-a na zdravlje narušeno je njihovo povjerenje prema hrani životinjskog podrijetla, tako da zaostajanje rezidua VMP-a indirektno utječe i na globalnu ekonomiju (Falowo i Akimoladum, 2019).

2.1.1. Monitoring rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda

„Proizvodi životinjskog podrijetla koji su namijenjeni prehrani ljudi ne smiju se stavljati u promet ukoliko sadrže ili sadrže u količinama većim od dopuštene propisima Europske unije, rezidue i druge kontaminante škodljive za ljudsko zdravlje. Posjednici životinja, veterinarski djelatnici te proizvođači hrane životinjskog podrijetla moraju se pridržavati propisanih preventivnih mjera i određenih rokova karence, prilikom uporabe veterinarsko-medicinskih proizvoda i drugih tvari kako bi se spriječila pojava rezidua. Ministar pravilnikom određuje najviše dopuštene količine rezidua i drugih kontaminanata u

izlučevinama, tjelesnim tekućinama, dlaci i proizvodima živih životinja, te organima i tkivima zaklanih životinja, vodi i hrani za životinje, ako nisu propisani propisima EU.“ (Članak 93. Zakona o veterinarstvu 82/2013, 2013).

Kako bi se smanjio sveukupan broj proizvoda životinjskog podrijetla koji sadrže rezidue VMP-a u koncentracijama višim od najviše dopuštene količine, a samim time i smanjio rizik za zdravlje potrošača, potrebno je provoditi monitoring, odnosno praćenje istih. Osim toga, provođenjem obaveznih planova za monitoring otkrivaju se ilegalne upotrebe ili zloupotrebe odobrenih VMP-a koji se koriste na životinjama za proizvodnju hrane te istražuju razlozi nesukladnosti s propisanim vrijedostima (EFSA, 2020a). Na razini Republike Hrvatske provodi se Državni program monitoringa rezidua (DPMR). U tom programu „propisan je način odabira i uzimanja uzoraka gdje su uzimani uzorci živih životinja koje su zdrave i/ili proizvoda životinjskog podrijetla koji su higijenski ispravni, a koji su namijenjeni stavljanju na tržište u cilju prehrane ljudi“ (Ministarstvo poljoprivrede, 2013). Podjela tvari čije se rezidue određuju u sklopu monitoringa prema Pravilniku o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i u proizvodima životinjskog podrijetla NN 79/2008 prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Tvari ili skupina tvari čije se rezidue određuju u okviru monitoringa
(Pravilnik, 2008)

<p align="center">SKUPINA A Tvari koje imaju anabolički učinak te njihove soli i esteri</p>	<p align="center">SKUPINA B Veterinarski lijekovi i kontaminanti (uključujući i nedozvoljene tvari koje mogu biti korištene u veterinarske svrhe)</p>
1. Stilbeni, derivati stilbena i njihove soli i esteri	1. Antibakterijske tvari uključujući sulfonamide i kinolone
2. Antitireoidne tvari	2. Drugi veterinarski lijekovi: (a) Antihelmintici (b) Kokcidistatici, uključujući nitroimidazole (c) Karbamati i piretroidi (d) Sedativi (e) Nesteroidni protuupalni lijekovi (f) Druge farmakološki aktivne tvari
3. Steroidi	3. Druge tvari i zagađivači okoliša (a) Organoklorni spojevi uključujući PCB-e (b) Organofosforni spojevi (c) Kemijski elementi
4. Laktoni rezorcilne kiseline uključujući zeranol	
5. Beta-agonisti	
6. Tvari navedene u Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla su preuzete odredbe Uredbe 2377/90 od 26. lipnja 1990. koja predviđa postupak Zajednice za određivanje najviših graničnih vrijednosti ostataka lijekova u uporabi u veterinarskoj medicini u prehranbenim proizvodima životinjskog podrijetla.	

Na razini Europe, Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*) iz tog razloga podnosi godišnje izvještaje o reziduama veterinarsko-medicinskih proizvoda u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla u svim zemljama članicama Europske unije. Prema posljednjem dostupnom izvještaju za 2018. godinu, od 28 zemalja članica analizirano je 657 818 uzoraka. Uzorkovanje, analiza uzoraka te općenita podjela tvari čije se rezidue određuju u pojedinim vrstama životinja su provedeni prema Direktivi Europske komisije br. 96/23 (Europska komisija, 1996), od strane nacionalnih institucija odgovornih za provođenje plana monitoringa. Od ukupnog broja uzoraka, dokazano

je kako je broj nesukladnih uzoraka iznosio 1 059, odnosno, 0,30 %, što je za 0,05 % manje nego u 2017. godini. Vidljivo je lagano povećanje nesukladnosti za antitireoidne tvari agense i steroide, a neznatno smanjenje nesukladnosti za antibakterijske lijekove, druge veterinarske lijekove (nesteroidni protuupalni lijekovi) te ostale tvari. Za ostale skupine tvari nije bilo značajnijih promjena (EFSA, 2020b).

Zaključeno je kako su dobiveni rezultati monitoringa u 2018. godini i dalje u velikoj sukladnosti s propisanim vrijednostima, ali i nadalje treba težiti smanjenju broja nesukladnih uzoraka (EFSA, 2020a). Jedino je provođenjem redovitog i opsežnog monitoringa rezidua VMP-a u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla moguće ući u trag nesukladnim uzorcima te posljedično osigurati da meso, jaja, mlijeko ili med na tržištu budu u potpunosti sigurni za konzumaciju.

2.1.2. Sedativi

Sedativi su veterinarsko-medicinski proizvodi koji prema Pravilniku o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i u proizvodima životinjskog podrijetla pripadaju skupini veterinarskih lijekova i kontaminanata, odnosno skupini drugih veterinarskih lijekova (skupini B) (tablica 1.) (Pravilnik, 2008). Upotrebljavaju se s ciljem smanjenja uznemirenosti i ukupnog odgovora organizma na vanjske stimulanse (Maksimović i sur., 2018). Prilikom upotrebe sedativa nastupa centralna depresija i pospanost te životinja nije svjesna okoline (Kos, 2008). Koriste se u situacijama kada je potrebno obuzdati životinju (transport životinja, prilikom hvatanja i identifikacije životinja, timarenja i čišćenja); u svrhu pregleda životinje; kao predmedikacija gdje se njihovom primjenom olakšava manipulacija životinjom, otklanja strah životinje i smanjuje doza anestetika potrebnih za opću anesteziju (Kos, 2008). Osobito se koriste prilikom prijevoza životinja (Trevisani i sur., 2019) i prije samog klanja kako bi se spriječilo stres životinja. Primjerice, preveliki stres svinja prije klanja može rezultirati nepoželjnim karakteristikama mesa koje tada nije privlačno kupcima (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

Najčešća podjela sedativa je na iduće skupine: fenotiazini, benzodiazepini, agonisti α 2-adrenoreceptora, antagonisti α 2-adrenoreceptora i butirofenoni (Kos, 2008), dok su ace(to)promazin, azaperon, diazepam, haloperidol, karazolol, klorpromazin, ksilazin i propionilpromazin najčešće korišteni sedativi (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

Na razini EU tijekom monitoringa rezidua VMP-a na živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla provodi se i monitoring rezidua sedativa prema Direktivi Europske komisije br. 96/23 (Europska komisija, 1996). Ako proučavamo godišnje izvješće EFSA-e o reziduama veterinarsko-medicinskih proizvoda u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla za 2018. godinu, primjećujemo kako nije bilo nesukladnih uzoraka prilikom određivanja rezidua sedativa (EFSA, 2020b). Isti podaci su bili i 2008. godine (EFSA, 2010). Unatoč izvrsnoj usklađenosti nedavnih rezultata monitoringa s najvišim dopuštenim količinama rezidua sedativa u hrani životinjskog podrijetla (EFSA, 2020b), potrebno je naglasiti kako je rizik od zaostajanja rezidua sedativa u mesu tretiranih životinja realan (Trevisani i sur., 2019). Bitno je naglasiti kako pojedini sedativi za životinje nisu odobreni za upotrebu na životinjama za proizvodnju hrane zbog velike mogućnosti zaostajanja rezidua te posljedično njihovog štetnog utjecaja na zdravlje potrošača (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Sedativi kao što su ace(to)promazin, haloperidol, klorpromazin i propionilpromazin nisu dopušteni za korištenje na životinjama za proizvodnju hrane (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Toksičnost klorpromazina i dugotrajna perzistencija njegovih rezidua je dokazana od strane Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO, engl. *Food and Agriculture Organisation*), Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organisation*) i Stručnog odbora za prehrambene aditive – JECFA-e (engl. *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) (FAO, 2020; WHO, 2019), tako da je od velike važnosti da se redovitim monitoringom ustvrdi postoje li u uzorcima životinja i proizvoda životinjskog podrijetla rezidue klorpromazina, ali i drugih sedativa koji nisu odobreni za korištenje na životinjama za proizvodnju hrane u Europi.

U nastavku će biti opisano nekoliko sedativa koji se koriste na životinjama za proizvodnju hrane. Odabrani sedativi se često koriste te je mogućnost zaostajanja njihovih rezidua u tkivima i organima tretiranih životinja izgledna. Iako neki nisu dozvoljeni, određuju se u uzorcima životinja i životinjskog podrijetla zbog česte zloupotrebe, čime je određivanje njihovih rezidua od još veće važnosti.

Bit će opisane njihove karakteristike, način upotrebe, utjecaj na životinje i vjerojatnost zaostajanja u obliku rezidua u organima i tkivima tretiranih životinja kao i propisane NDK vrijednosti. Isto tako, spomenut će se i ciljni organ ili tkiva u kojima se preporučuje procjena rezidua, odnosno mjesto u kojemu su rezidue korištenih sedativa najotpornije na razgradnju te se nalaze u najvišim koncentracijama nakon njegove primjene na životinji. Također, u tablici 2. prikazane su njihove kemijske strukture.

- Ace(to)promazin

Ace(to)promazin (ACP) (1-[10-[3-(dimetilamino)propil]fenotiazin-2-il]etanon) je acetilni derivat promazina (Clarke i Trim, 2014) i najčešće je korišten sedativ iz skupine fenotiazina (Kos, 2008). Preporučan je za korištenje na psima, mačkama i konjima, dok njegova upotreba na životinjama za proizvodnju hrane još uvijek nije odobrena u Europskoj uniji, SAD-u ili Kanadi (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). U niskim dozama mijenja ponašanje životinja. Povećavanjem doze se povećava sedacija do određenog nivoa, a nakon toga svako dodatno povećanje doze povećava dužinu sedacije, i samim time, popratne nuspojave (Kos, 2008). Neki od negativnih nuspojava korištenja ace(to)promazina su smanjenje krvnog tlaka, jačine udara i minutnog volumena srca životinje za 20-30 % (Maksimović i sur., 2018). Također, kod bikova i pastuha su primjećene negativne nuspojave na penis životinja koje posljedično mogu dovesti do amputacije, tako da se ne preporučuje njihova upotreba na tim vrstama (Kos, 2008). Ne postoje službeni podaci o kratkoročnoj ili dugoročnoj toksičnosti ace(to)promazina na laboratorijskim životinjama (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Također, još uvijek nije procijenjen od strane JECFA-e tako da nije poznato koje bi bilo ciljno tkivo za određivanje rezidua ace(to)promazina (FAO, 2020; WHO, 2019). Neki stručnjaci pak predlažu kako bi ciljno tkivo trebalo biti masno tkivo, posebice ono s područja gdje je došlo do ubrizgavanja sedativa (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

- Azaperon

Azaperon (1-(4-fluorofenil)-4-(4-piridin-2-ilpiperazin-1-il)butan-1-on) pripada skupini butirofenona (Clarke i Trim, 2014). Koristi se prvenstveno na svinjama (Kos, 2008; Maksimović i sur., 2018), a u kombinaciji s drugim lijekovima se upotrebljava na divljim životinjama kao što su jeleni, nosorozi, gazele ili slonovi (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Može se upotrebljavati i na govedima (Trevisani i sur., 2019) dok upotreba ovog sedativa nije preporučljiva na konjima (Clarke i Trim, 2014). Koristi se kao sastavni dio predmedikacije u svinja, a najčešće se daje za sedaciju prije transporta, nakon miješanja svinja iz različitih legla (Kos, 2008), u postupku spajanja mladih svinja s krmačom gdje se prevenira agresivnost krmače (Maksimović i sur., 2018) ili pri teškim i bolnim porodima (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Njegovom primjenom se postiže dobar stupanj sedacije koji je ovisan o dozi (Kos, 2008). Prema Uredbi Europske komisije (2010), NDK za azaperon je suma

azaperona i azaperola. Azaperol (α -(4-fluorophenyl)-4-(2-pyridinyl)-1-piperazine butanol) je najčešći metabolit azaperona. Njegova koncentracija u tretiranim životinjama premašuje koncentracije unesenog azaperona te je njegovo izlučivanje iz organizma sporije nego izlučivanje izvornog lijeka. Zbog toga je potrebno određivati i koncentraciju njegovih rezidua prilikom određivanja rezidua azaperona (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). NDK za mišiće; kožu i masno tkivo; jetru i bubreg svinje iznose $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Europska komisija, 2010). Prema JECFA-i najviše dopuštene vrijednosti za mišiće i masno tkivo svinje iznose $60 \mu\text{g kg}^{-1}$, dok su za jetru i bubrege vrijednosti jednake onima određenima Uredbom Komisije br. 37/2010 (Europska komisija, 2010). JECFA je odredila i prihvatljiv dnevni unos (ADI, engl. *Acceptable Daily Intake*) ovog sedativa kod ljudi koji iznosi $0-0,006 \text{ mg kg}^{-1}$ tjelesne mase. Također, JECFA smatra kako je azaperon malo vjerojatno genotoksičan ili kancerogen (WHO, 2019). Vrlo brzo se izlučuje iz organizma – u tkivima i tjelesnim tekućinama životinja koje su zaklane četiri sata nakon primjene koncentracije rezidua azaperona i azaperola su bile niže od prosjeka (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Neka istraživanja prikazuju zaostajanje rezidua azaperona i azaperola u najvećem udjelu u bubrezima te jetri te se smatra kako se upravo ti organi trebaju analizirati za rezidue navedenog sedativa (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

- Haloperidol

Haloperidol (4-[4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin-1-il]-1-(4-fluorofenil)butan-1-on)) pripada skupini butirofenona. Koristi se kao sedativ kod hvatanja divljih životinja, dok kod ljudi ima antipsihotički učinak (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Johns i sur. (2020) su dokazali kako se haloperidol može koristiti kod pjegavog jelena (*Axis axis*) kao predmedikacija prije anestezije ksilazin-ketaminom jer uspješno smanjuje stres pri hvatanju životinje. Nije odobren za upotrebu na životinjama za proizvodnju hrane te nema još literaturnih podataka koji bi opisivali metabolizam haloperidola u govedima, svinjama, konjima ili ovcama (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Neki autori sugeriraju kako bi se potencijalno mogao koristiti na životinjama za proizvodnju hrane ukoliko se primjenjuje kao lijek izvan odobrene upute (engl. *Extra-label Drug Use*) (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Lijek izvan odobrene upute označava upotrebu odobrenog lijeka u svrhu koja nije u skladnosti s onom koja mu je prvotno namijenjena i koja se nalazi na deklaraciji (npr. primjena na drugim vrstama životinja, u drugačijoj dozi ili načinu primjene) (Beyene, 2016). Ali svakako je bitno da se prije takve upotrebe haloperidola ustvrdi da u organima i tkivima

tretiranih životinja neće zaostati rezidue prije klanja (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Ciljni organi za analizu haloperidola su pluća, bubreg i jetra gdje je u svakom organu drugačija raspodjela njegovih metabolita (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

- Karazolol

Karazolol (1-(9H-karbazol-4-iloksi)-3-(propan-2-ilamino)propan-2-ol) je hipnotički sedativ koji je odobren za korištenje u svinja i goveda (Trevisani i sur., 2019), a osim toga se primjenjuje i u humanoj medicini (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). U veterinarskoj medicini se primjenjuje kada je potrebno smiriti životinju, primjerice kod pojave mastitisa, za ublažavanje tahikardije ili za smanjenje bijesa prilikom parenja (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Razdoblje karence za meso svinja je od jedan do 12 sati, dok je za meso goveda jedan dan te za mlijeko 12 h (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Prema Uredbi Komisije (2010), najviše dopuštene količine kod svinja iznose: $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ za mišiće, kožu i masno tkivo te $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ za jetru i bubreg. Za goveda su iduće vrijednosti NDK: $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ za mišiće i masno tkivo, $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ za jetru i bubreg te $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ za mlijeko. Budući da se ovaj sedativ koristi i u humanoj medicini, njegove rezidue predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. No, prednost je što se vrlo brzo eliminira iz svih tkiva nakon intramuskularne primjene preporučene doze ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Preporuka je da bubreg te mjesto ubrizgavanja ovog sedativa budu ciljna tkiva za određivanje njegovih rezidua (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). JECFA je odredila i akutnu referentnu dozu (ARfD, engl. *Acute Reference Dose*) od $0,0001 \text{ mg kg}^{-1}$ tjelesne mase. Budući da rezidue karazolola mogu zaostati na mjestu ubrizgavanja do dva sata nakon primjene, čije rezidue premašuju vrijednost ARfD-a, preporuka je da se karazolol ne koristi prilikom transporta životinja na klanje (WHO, 2019).

- Klorpromazin

Klorpromazin (3- (2-klorofenotiazm-10-il)-N,N-dimetilpropan-1 amin) je sedativ koji se prema Uredbi Komisije (2010) nalazi u skupini zabranjenih tvari čiju najvišu dopuštenu količinu nije moguće utvrditi. Na temelju rezultata evaluacije od strane JECFA-e, klorpromazin se dokazao potencijalno genotoksičnim te neurotoksičnim sa štetnim učincima na reproduktivni sustav (WHO, 2019). Također, JECFA nije odredila ADI zbog „nedostatka relevantnih toksikoloških podataka, dugotrajne perzistencije kod ljudi, spektra dodatnih

učinaka lijeka i vjerojatnosti da čak i male doze mogu uzrokovati promjene u ponašanju.“ (FAO, 2020; WHO, 2019). Ne preporučuje se za upotrebu na konjima (Papich, 2016) kod kojih su primjećeni metaboliti klorpromazina u urinu do čak 96 h nakon oralnog ili intravenskog unosa (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Zbog nedostatka informacija još uvijek nije preporučeno ciljno tkivo za određivanje rezidua klorpromazina, iako neki stručnjaci preporučuju mjesto ubrizgavanja te bubreg ili jetru kao potencijalne ciljne organe (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

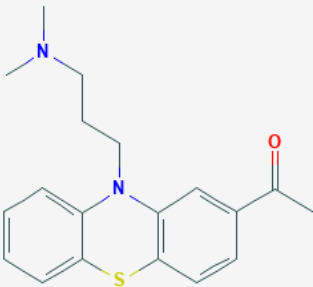
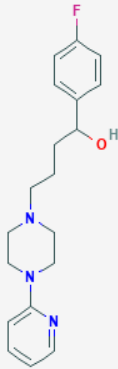
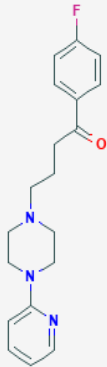
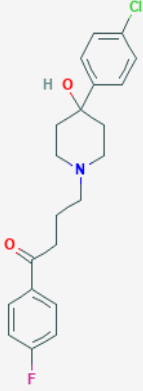
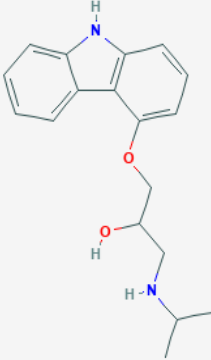
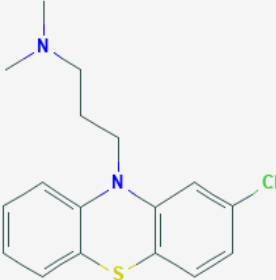
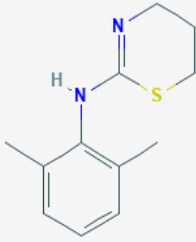
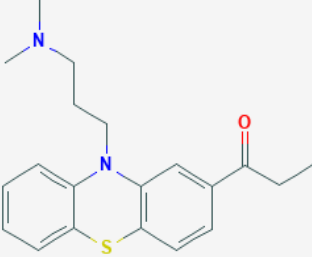
- Ksilazin

Ksilazin (N- (2,6-dimetilfenil)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazin-2-amin) je agonist α 2-adrenoreceptora koji se koristi kod malih i velikih životinja kao sedativ, sredstvo za predmedikaciju, mišićnu relaksaciju ili kao analgetik (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). U kombinaciji s ketaminom se može koristiti i za održavanje anestezije (Maksimović i sur., 2018) kod konja, goveda, pasa, mačaka i većine laboratorijskih životinja (Kos, 2008). Postoje velike razlike u potrebnim dozama između pojedinih životinjskih vrsta, gdje su se goveda pokazala najosjetljivijom vrstom s obzirom da im je potrebna niža doza nego drugim životinjama (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). No, konjima kojima je potrebna do deset puta veća doza od goveda, stupanj sedacije je manji nego onog kod goveda (Kos, 2008). Studije na konjima, govedima i štakorima je pokazala veoma brz metabolizam ksilazina, no njegova upotreba je ograničena ili zabranjena u mnogim zemljama (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Prema Uredbi Komisije br 37/2010, NDK rezidua ksilazin hidroklorida nije potrebna kod kopitara i goveda (Europska komisija, 2010). JECFA isto tako nije odredila NDK jer su informacije o reziduama ksilazina nepotpune i nedovoljne. ADI nije određen jer je Odbor zaključio kako je metabolit ksilazina (2,6-ksilidin) genotoksičan i kancerogen (WHO, 2019). Prema Papich (2016), vrijeme karence za goveda pri primijenjenoj dozi od 0,016 mg kg⁻¹ je pet dana za meso te 72 h za mlijeko. Za dozu 0,05-0,3 mg kg⁻¹ ona iznosi deset dana za meso i 120 h za mlijeko. Neki autori preporučuju praćenje rezidua ksilazina preko mjesta ubrizgavanja ili bubrega (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

- Propionilpromazin

Propionilpromazin (1-[10-[3-(dimetilamino)propil]fenotiazim-2-il]propan-1-on), poznat kao i propiopromazin (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017), je sedativ koji se koristi kod malih i velikih životinja (Clarke i Trim, 2014) kako bi se smanjio stres i patnja, posebice kod svinja tijekom transporta do klaonice (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Može se koristiti i kao predmedikacija (Clarke i Trim, 2014). Zbog nedostataka informacija o farmakološkom i toksikološkom utjecaju ovog sedativa, JECFA nije odredila najvišu dopuštenu količinu rezidua kao ni ADI. Odbor je s druge strane svjestan da se ovaj sedativ koristi u okolnostima u kojima će potrošač biti izložen reziduama koji bi mogli imati farmakološki učinak, tako da nije preporučio upotrebu propionilpromazina kod životinja za proizvodnju hrane (WHO, 2019). JECFA također nije uspjela identificirati ciljno tkivo za praćenje rezidua (WHO, 2019). Neka istraživanja su pokazala kako je kod svinja tretiranih propionilpromazinom najviša količina rezidua zadržana u masnom tkivu vrata te masnom tkivu oko bubrega, dok su niže koncentracije pronađene u jetri i znatno niže u mišićima (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Prema nedavnoj studiji autori preporučuju da se uzorci za određivanje rezidua uzimaju s područja masnog tkiva gdje je došlo do ubrizgavanja sedativa (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

Tablica 2. Kemijske strukture opisanih sedativa (PubChem, 2020)

		
<p>Ace(t)promazin</p>	<p>Azaperol</p>	<p>Azaperon</p>
		
<p>Haloperidol</p>	<p>Karazolol</p>	<p>Klorpromazin</p>
		
<p>Ksilazin</p>	<p>Propionilpromazin</p>	

S obzirom kako ciljno tkivo/organ za određivanje rezidua sedativa ovisi o mnogo čimbenika, ponajviše o vrsti upotrijebljenog sedativa, potrebno je bilo uspostaviti standard za njihovo određivanje. Prema većini dostupnih literaturnih podataka, ispostavilo se kako je bubreg organ u kojemu postoje najviše mjerljive koncentracije rezidua sedativa, iako neki stručnjaci predlažu i mišiće kao ciljno tkivo (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). U tablici 3. nalazi se sažet prikaz opisanih sedativa koji se određuju prilikom monitoringa s odgovarajućim marker supstancama za određivanje njihovih rezidua u bubregu životinja te određenim NDK vrijednostima prema Uredbi Komisije br. 37/2010 (Europska komisija, 2010).

Tablica 3. Marker supstance za određivanje sedativa te propisane NDK vrijednosti za bubreg životinja (Europska komisija, 2010)

Vrsta sedativa	Marker supstanca	Životinjska vrsta	NDK ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ace(to)promazin	Osnovna supstanca	Sve	Zabranjen
Azaperon	Suma Azaperon + Azaperol	Svinja	100
Haloperidol	Osnovna supstanca	Sve	Zabranjen
Karazolol	Osnovna supstanca	Govedo Svinja	15 25
Klorpromazin	Osnovna supstanca	Sve	Zabranjen
Ksilazin	Osnovna supstanca	Sve	-
Propionilpromazin	Osnovna supstanca	Sve	Zabranjen

2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Validacija je postupak dokazivanja da je odabrana metoda prikladna za svoju namjenjenu svrhu. Svrha metode se određuje prije samog postupka validacije, gdje je najbitnije ustanoviti što tom metodom želimo odrediti i zašto, a nakon toga na kojim uzorcima ćemo provoditi metodu, na koji način ćemo pripremiti uzorke, koju vrstu opreme ćemo koristiti itd. (NATA, 2018). Prema ISO normi 17025, najbitnijoj normi za rad ispitnih i umjernih laboratorija, po kojoj u Republici Hrvatskoj „od siječnja 2002. laboratoriji za

službenu kontrolu moraju biti ovlašteni“ (Europska komisija, 2002), postupak validiranja metoda je obavezan korak prilikom usvajanja nestandardnih metoda, razvijanja/izmjene unutarlaboratorijskih metoda, izmjene standardnih metoda ili korištenja istih izvan njihova namijenjena opsega (Eurachem 2014; ISO 17025, 2005). Na taj se način dokazuje da laboratorij unutar kojeg se provodi metoda ima sposobnost dobiti točne, objektivne, pouzdane i usporedive rezultate koji se nakon toga mogu koristiti s povjerenjem, čime se razvija i povjerenje kupaca prema tom laboratoriju (Eurachem 2014; Gašljević, 2009). Iako je sam postupak validiranja specifičan za svaku metodu te se ne može odrediti uniformirani obrazac kojeg bi koristili svi laboratoriji (Lazarić, 2012), postoje razni priručnici, vodiči i smjernice objavljene od strane uglednih organizacija kao što su FDA (engl. *Food and Drug Administration*), IUPAC (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*), ICH (engl. *The International Council for Harmonisation*) i dr., koje izvođačima validacije uvelike olakšavaju posao.

Primijenjene metode u okviru nacionalnih planova definiranih Direktivom Europske komisije br. 96/23 (Europska komisija, 1996) moraju biti validirane odnosno podvrgnute postupcima vrednovanja ispitivanjem određenih parametara koji dokazuju njenu specifičnu primjenu sukladno kriterijima propisanim Direktivom Komisije 2002/657/EC (Europska komisija, 2002).

2.2.1. Parametri validacije

Nakon što se odredi osnovna namjena metode te plan za njezinu provedbu, potrebno je odrediti izvedbene parametre validacije, odnosno parametre učinkovitosti pomoću kojih će se odrediti je li metoda prikladna za određenu analitičku svrhu.

Ovisno o zahtjevima metode, provodi li se kvalitativna ili kvantitativna analiza; je li traženi analit prevladavajući u matriksu uzorka ili se nalazi samo u tragovima itd. (Lazarić, 2012), kao i radi li se potpuna ili djelomična validacija, odabiru se različiti validacijski parametri i slijedi određeni validacijski protokol. Kao pomoć pri odabiru odgovarajućih parametara mogu se koristiti već spomenuti vodiči ili propisane smjernice koje na detaljan način pojašnjavaju koji parametar odabrati ovisno o metodi (Eurachem, 2014).

Neki od najčešće korištenih validacijskih parametara su:

- Specifičnost/ selektivnost
- Točnost/ istinitost
- Preciznost
- Mjerna ponovljivost (repetabilnost)
- Unutarlaboratorijska obnovljivost (međupreciznost)
- Mjerna obnovljivost (reproducibilnost)
- Linearnost
- Robusnost
- Granica detekcije (LOD)
- Granica kvantifikacije (LOQ)
- Granična koncentracija analita ($CC\alpha$)
- Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)

2.2.1.1. Specifičnost/selektivnost

Specifičnost metode označava sposobnost metode da razlikuje traženi analit od drugih tvari u uzorku (Pravilnik, 2005). Druge tvari u uzorku mogu biti razni zaostaci nečistoća, razgradnih produkata, otapala itd. Specifična metoda pruža točne podatke o sadržaju i potencijalu specifičnog analita u uzorku (ICH, 2005). Ako metodom želimo odrediti više komponenata istovremeno, potrebno je da ona bude selektivna, odnosno, da se sve tražene komponente mogu odrediti, a da istovremeno ne dođe do interferencija između njih (Lazarić, 2012). Prilikom određivanja specifičnosti analiziraju se i uspoređuju slijepi uzorci s obogaćenim uzorcima kako bi se otkrila prisutnost mogućih interferirajućih supstanci i procijenio njihov učinak, a njihov broj mora biti minimalno 20 (Europska komisija, 2002).

2.2.1.2. Točnost/ istinitost

Točnost se može opisati kao stupanj podudaranja između prosječne (srednje) vrijednosti dobivenih rezultata ispitivanja i općeprihvaćene referentne vrijednosti (Pravilnik, 2005). U nekim literaturnim zapisima ova definicija se naziva „istinitošću“, dok se točnost određuje utvrđivanjem istinitosti i preciznosti (ICH, 2005). Ako dobiveni rezultati odudaraju

od referentnih vrijednosti, vjerojatno je prisutna sustavna pogreška te ta metoda nije istinita, a samim time ni točna. Dakle, da bi se metoda pokazala točnom, ona treba biti i istinita i precizna (NATA, 2018).

2.2.1.3. Preciznost

Preciznost se smatra stupnjem podudaranja između dobivenih rezultata ispitivanja koji su provedeni sa istim uzorkom pod unaprijed određenim propisanim uvjetima. Izračunava se kao standardna devijacija rezultata ispitivanja i što je preciznost veća, to je standardna devijacija manja (Pravilnik, 2005). Ovaj parametar se može pojasniti i kao mjera širenja rezultata (tzv. stupanj raspršenosti), odnosno bliskost slaganja rezultata dobivenih nizom mjerenja na homogenom uzorku pri istim uvjetima (ICH, 2005, NATA, 2018). No, preciznost ne daje informaciju koliko su dobiveni rezultati blizu stvarnoj vrijednosti jer on ovisi samo o raspodjeli slučajnih pogrešaka. Tako metoda može biti precizna, ali ne i točna (istinita) i obratno (NATA, 2018). Stoga je uvijek uz određivanje preciznosti bitno odrediti i točnost (istinitost) metode.

Preciznost se, ovisno o uvjetima, može razmotriti na tri razine: ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost.

- *Ponovljivost* je preciznost u uvjetima koji mogu biti ponovljivi (Pravilnik, 2005). Dakle, metoda se provodi u istom laboratoriju, od strane istog analitičara, na istoj aparaturi s istim uzorkom u kratkom vremenskom periodu i uvjetima koji su što je moguće konstantniji (Lazarić, 2012; NATA 2018).
- *Međupreciznost* označava preciznost koja procjenjuje odstupanja rezultata mjerenja u istom laboratoriju, ali pod uvjetima koji su promijenjiviji od ponovljivosti (Eurachem, 2012). Riječ je o provođenju mjerenja u različitim danima, s različitim analitičarima, opremom, reagensima od drugačijeg dobavljača i sl. Prikazuje moguće varijacije u rezultatima u laboratoriju pri njihovim rutinskim provođenjima metode kroz duži vremenski period (ICH, 2005).
- *Obnovljivost* je procjena preciznosti između laboratorija, najčešće prilikom provođenja suradničkih studija ili u svrhu normiranja i standardizacije metode te se rijetko provodi u samostalnim laboratorijima (ICH, 2005; Lazarić, 2012). Provodi se ista metoda, ali s različitim analitičarima, opremom i uvjetima u različitom vremenskom peirodu (NATA, 2018).

2.2.1.4. Linearnost

Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određuje se mjerenjem odziva instrumenta na različitim, poznatim koncentracijama referencijskog materijala te se može procijeniti matematički i grafički. Matematički se preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca ($y=kx+l$) i izračuna koeficijent korelacije (r). Nagib pravca (k) je parametar koji izravno ukazuje na osjetljivost metode, a odsječak pravca (l) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij $r \geq 0,99$ dok se za vrlo niske koncentracije prihvaća i kriterij $r \geq 0,98$ (Lazarić, 2012).

2.2.1.5. Robusnost

Ovaj validacijski parametar označava podložnost metode na male, namjerne promjene uvjeta ispitivanja. Mijenja se vrsta uzorka koji se ispituje, priprema uzorka, uvjeti provođenja metode (manje oscilacije u temperaturi, pH, koncentraciji reagensa) – zapravo svi uvjeti ispitivanja koji bi u praksi, pri rutinskom provođenju metode, mogli utjecati na rezultate metode. Prilikom određivanja robusnosti bitno je i odrediti i stabilnost analita ili sastojaka matriksa u uzorku pri različitim uvjetima pohrane, ukoliko ista nije poznata (Pravilnik, 2005). Promijenjeni uvjet koji ne utječe na dobivene rezultate je uvjet u području robusnosti metode (Lazarić, 2012).

2.2.1.6. Granica detekcije (LOD)

Najmanja količina analita koja se može detektirati (i ne nužno kvantificirati) u uzorku se naziva granica detekcije (Lazarić, 2012). Granica detekcije se obično određuje samo u metodama u kojima se može očekivati jako niska količina traženog analita (NATA, 2018). Omjer signala i šuma od 3:1 se općenito smatra prihvatljivim.

2.2.1.7. Granica kvantifikacije (LOQ)

Granica kvantifikacije je najniža količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuje se kod metoda gdje se očekuje jako

niska koncentracija analita, za tvari koje se u uzorcima nalaze u tragovima, a bitni su za određivanje i kvantifikaciju (ostatci pesticida, teški metali) (NATA, 2018).

2.2.1.8. Granična koncentracija analita ($CC\alpha$)

Ovaj parametar predstavlja granicu na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost α pogreške da je uzorak pozitivan. 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 količina 5 % (Europska komisija, 2002).

2.2.1.9. Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)

Sposobnost dokazivanja je najmanji mogući udio tvari koji se može dokazati, identificirati i kvantificirati u odabranom 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 $1 - \beta$ (Europska komisija, 2002).

2.3. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE REZIDUA SEDATIVA

U osiguravanju sigurne i zdravstveno ispravne hrane u lancu od polja do stola, veliku ulogu imaju, već spomenuti, akreditirani laboratoriji koji svojim analizama osiguravaju monitoring i daju povratne informacije o uspješnosti kontrola koje se provode (Cannavan i sur., 2017). Monitoring je potrebno provoditi korištenjem provjerenih i pouzdanih analitičkih metoda pomoću kojih će se, ukoliko su prisutni, odrediti točna količina rezidua (Europska komisija, 2001) kao i osigurati njihova nedvojbena identifikacija (Cannavan i sur., 2017). U kontroli se primjenjuju orijentacijske i potvrdne metode. Orijetacijske (engl. *Screening*) metode koje dokazuju prisutnost neke tvari na razini značajnosti nisu dovoljne prilikom određivanja organskih rezidua i kontaminanata. Ove metode karakterizira sposobnost brze obrade velikog broja uzoraka i otkrivanja mogućih pozitivnih rezultata. Sumnjivi i pozitivni uzorci idu na daljnju analizu kvantitativnom potvrdnom metodom koja omogućuje potpune podatke o tvari na temelju kojih će se istu moći nedvojbeno identificirati i po potrebi

kvantificirati (Pravilnik, 2005). Potvrдне metode karakterizira visoka osjetljivost, niska granica određivanja, selektivnost, preciznost i brzina analize.

Za određivanje rezidua sedativa u biološkim uzorcima dostupno je nekoliko analitičkih metoda (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Prije nego li se krene u analizu, potrebno je poznavati farmakološka svojstva sedativa, način unosa sedativa, njegov metabolizam i raspodjelu unutar životinjskog organizma, reprezentativni (ciljni) organ/tkivo koji će se analizirati te dati „pravu sliku“ o koncentraciji rezidua i njihovom zadržavanju unutar organizma (MacNeil i Kay, 2017). Kod provođenja analiza na rezidue sedativa, kao što je već rečeno, najčešće se kao ciljno tkivo, odnosno organ, uzima bubreg (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

Prema dostupnoj literaturi, neke od metoda koje se koriste u određivanju rezidua sedativa u biološkim uzorcima su kromatografske metode (tekućinska kromatografija (LC, engl. *Liquid Chromatography*), tankoslojna kromatografija (TLC, engl. *Thin Layer Chromatography*) ili plinska kromatografija (GC, engl. *Gas Chromatography*)) te imunološki testovi (ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017). Primjerice, Copper i sur. su uz pomoć ELISA metode odredili ostatke šest vrsta sedativa u svinjskom bubregu (Cooper i sur., 2004). Ona omogućava brzu detekciju i razlučivanje negativnih i potencijalno pozitivnih rezultata (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017), jednostavno se koristi i dostupni su kitovi za velik broj specifičnih komponenti (Toldrá i Reig, 2006). No, glavni nedostatak ove metode, koji je ujedno i glavni razlog njezine rijetke upotrebe u ove svrhe, je potreba za dodatnim korištenjem potvrđnih metoda kod dobivanja pozitivnih rezultata (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

Devedesetih godina prošlog stoljeća HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) metoda s fluorescentnim i/ili UV-detektorom bila je dominantna analitička metoda za određivanje rezidua sedativa (Toldrá i Reig, 2006). Razvitkom tehnologije, ova metoda se danas sve rjeđe koristi, no smatra se, kako bi kombinacijom navedenih detektora, ova metoda mogla biti dostojna zamjena u situacijama kada nije dostupan maseni spektrometar (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017).

Maseni spektrometar se zbog svojih svojstava u današnje vrijeme smatra gotovo obaveznim prilikom određivanja rezidua sedativa, ali i rezidua drugih kontaminanata u biološkim uzorcima. Tako je i većina metoda koje se koriste za određivanje rezidua sedativa temeljeno na tekućinskoj kromatografiji povezanoj s masenom spektrometrijom (engl. *Mass*

Spectrometry – MS) – LC-MS/MS (Cerkvenik Flajs i MacNeil, 2017; Rocca i sur., 2017). Princip rada te značajke ove, najčešće korištene, metode za određivanje rezidua sedativa opisane su u idućem potpoglavlju.

2.3.1. UHPLC-MS/MS metoda

UHPLC-MS/MS metoda je metoda koja se zasniva na kombinaciji tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti te masene spektrometrije.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se temelji na prolasku sastojaka uzorka u obliku otopine u struji mobilne faze, pod visokim tlakom, kroz kromatografsku kolonu koja je ispunjena česticama stacionarne faze. Na temelju specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka uzorka te njihovih interakcija sa stacionarnom, tj. mobilnom fazom, analizirani sastojci se različito vrijeme zadržavaju u koloni čime dolazi do njihova razdvajanja.

Razvojem tehnologije, posljednjih se godina sve više koristiti tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UHPLC, engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) koja se odlikuje visokom razlučivosti, osjetljivošću i preciznošću (Dong i Zhang, 2014). U odnosu na HPLC metodu, UHPLC s kraćim vremenom analize i bržim uravnoteženjem kolona idealna kod brzog razvoja metoda, budući da uporaba UHPLC metode značajno povećava produktivnost u svim fazama razvoja metode, od inicijalnog ispitivanja, optimizacije, do kvalifikacije i validacije (Dong i Zhang, 2014).

Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojem (engl. *Interface*) koji ima višestruku ulogu: otparavanje tekućine, ionizacije neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator. Elektrosprej ionizacija (ESI, engl. *Electrospray Ionization*) je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS koji je kompatibilan sa svim analizatorima. Ionizacija može biti pozitivna i negativna (u ovisnosti o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi), a ionizacija i nebulizacija se događaju pri atmosferskom tlaku. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C i događa se u struji dušika. Ionizacija se odvija tako da pokretna faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru (iglu), koja ujedno predstavlja elektrodu pod visokim naponom (Cindrić i sur., 2009). Na uzorak djeluje jako električno polje (stvora se između igle i elektrode kroz koju prolazi) te zbog razlike potencijala nastaju nabijene kapljice. Daljnjim isparavanjem kapljica nastaju ioni. Nakon ionizacije nabijeni ioni ulaze u maseni spektrometar.

Masena spektrometrija se smatra najznačajnijim analitičkim postupkom u suvremenoj analizi. Princip rada se temelji na analizi molekula na osnovi njihovog omjera mase i naboja, m/z . U kvantitativnoj analizi prevladavaju spektrometri masa s dva analizatora (Q1 i Q3), sastoje se od četiri paralelne šipke tzv. kvadrupoli, koje se nalaze pod određenim naponom istosmjerne struje (DC, engl. *Direct Current*) i radiofrekvencije (RF, engl. *Radiofrequency*), između kojih se nalazi kolizijska ćelija koja predstavlja dodatni kvadrupol iako se radi o heksapolu (Q3), te formiraju tzv. trostruki kvadrupol (QQQ, engl. *Triple Quadrupol*). Kvadrupoli se koriste kao maseni filteri, budući da ovisno o primjeni zadanih DC i RF napona propuštaju se ioni određene m/z vrijednosti kroz kvadrupol do detektora. Maseni detektor pristigle ione pretvara u elektronske signale te na računalu se dobiva kromatografski pik.

Na slici 1. prikazan je primjer UHPLC-MS/MS uređaja koji se koristi za određivanje rezidua sedativa.



Slika 1. UHPLC-MS/MS uređaj – UHPLC Agilent Tech. 1290 Infinity (Vlastita fotografija).

Postoje brojni literaturni podaci o učinkovitosti (U)HPLC-MS/MS metode za određivanje sedativa, ali i drugih vrsta veterinarskih lijekova. Tako su Robert i sur. (2013) uspješno dokazali kako se ova metoda može primijeniti za određivanje širokog raspona rezidua

veterinarskih lijekova (antihelmintika, beta-agonista, antibiotika, nesteroidnih protuupalnih lijekova, sedativa i dr.) na uzorcima jaja, mlijeka, meda i mišića životinja. Isto tako, De Oliveira i sur. (2016) LC-MS/MS nazivaju jednostavnom i jeftinom metodom koja se može koristiti za određivanje pet vrsta sedativa (acepromazin, azaperol, azaperon, karazolol, klorpromazine i kslazine) i 14 vrsta beta-blokatora u bubregu svinja, goveda i konja.

Može se reći kako je UHPLC-MS/MS metoda zbog svoje selektivnosti u kombinaciji s velikom osjetljivošću postala standard za određivanje rezidua veterinarskih lijekova te se konstantno unaprijeđuje (Rocca i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZORCI

U svrhu validacije metode uzimani su slijepi, homogenizirani uzorci bubrega juneta i svinje. Uzorci su obogaćivani na četiri različite koncentracijske razine (1, 5, 10 i 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) tijekom dva dana od strane dva analitičara.

3.2. STANDARDI

Referentni i interni standardi koji su potrebni za provedbu ove metode s pripadajućim proizvođačima nalaze se u tablici 4.

Tablica 4. Standardi potrebni za provedbu metode

1.	Acepromazine maleate salt	Sigma Aldrich (Njemačka)
	Acepromazine-dimethyl-D6 maleate	Witega (Njemačka)
2.	Azaperol	Sigma Aldrich (Njemačka)
	Azaperol-D4	Witega (Njemačka)
3.	Azaperon	Sigma Aldrich (Njemačka)
	Azaperon-D4	
4.	Carazolol	Dr. Ehrenstorfer (Njemačka)
	Carazolol-D7	Sigma Aldrich (Njemačka)
5.	Chlorpromazine hydrochloride	Sigma Aldrich (Njemačka)
	Chlorpromazine-D6 hydrochloride	
6.	Haloperidol	Cerilliant Reference Laboratory (SAD)
	Haloperidol-D4	
7.	Propionylpromazine hydrochloride	Sigma Aldrich (Njemačka)
	Propionylpromazine-D6 hydrochloride	Witega (Njemačka)
8.	Xylazine hydrochloride	Sigma Aldrich (Njemačka)
	Xylazine-D6	

3.3. KEMIKALIJE

Kemikalije korištene pri provedbi ove metode su:

- Acetonitril (LC-MS čistoće, Biosolve)
- Kalij-dihidrogenfosfat KH_2PO_4 (Merck for analysis EMSURE® ISO)
- Metanol (LC-MS čistoće, Biosolve)
- Etanol (Merck absolute for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur)
- Kloridna kiselina 25 % (Merck for analysis EMSURE®)
- Amonijak 25 % (Merck for analysis EMSURE® ISO,Reag. Ph Eur)
- Natrijev-hidroksid (Merck pellets for analysis EMSURE®)
- Ultračista voda

3.4. APARATURA I PRIBOR

- Precizna analitička vaga s rasponom od 0 do 10 g i preciznošću od 0,02 mg (OHAUS, Sjedinjene Američke Države (SAD))
- Analitička vaga s rasponom od 0 do 100 g i preciznošću od 0,01 mg (OHAUS, SAD)
- Vortex homogenizator (IKA, Njemačka)
- Centrifuga s max 4600 o/min (Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- Centrifuga s max 15000 o/min (Thermo, SAD)
- pH metar (Sartorius, Njemačka)
- Sustav evaporacije tekućim dušikom sa kupelji, MultiVap 54 (LabTech, Italija)
- Ultrazvučna kupelj (Grant, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Precizne analitičke pipete volumena od 10 μL do 5 mL
- Električne pipete (Multipette Xstream) volumena do 50 mL (Eppendorf, SAD)
- Polipropilenske epruvete s čepom na navoj 50 mL
- Epruvete za ultracentrifugu volumena do 2 mL (Eppendorf, SAD)
- Viale s konusnim umetkom za 500 μL
- Vakum sustav za SPE (engl. *Solid Phase Extraction*) sustav – ekstraktor u čvrstoj fazi od 24 mjesta (Supelco, SAD)
- SPE kolonice Strata™ X-C 33 μLm Polymeric Strong Cation 500mg/600mL (Phenomenex, SAD)

- Polipropilenske epruvete s čepom na navoj 15 mL
- UHPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity
- Maseni spektrometar Triple Quad LC-MS G6460
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 2,1x100 mm (Waters, SAD)
- Predkolona: Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m VanGuard Cartridge (Waters, SAD)

3.5. METODA RADA

3.5.1. Postupanje s uzorcima

Uzorci koji su doneseni u laboratorij na analizu se pohranjuju u hladnjak na temperaturu od 2 do 8 °C na 24 sata ili se odmah homogeniziraju te se tako mogu čuvati do tri mjeseca na temperaturi -18 °C. Prije postupka homogenizacije potrebno je ukloniti masnoću i žilice s bubrega. Prije analize homogenizirani uzorak se ostavi na sobnoj temperaturi da se otopi. Za analizu je potrebno odvagati 1,0 \pm 0,05 g uzorka homogeniziranog bubrega u epruvetu od 50 mL.

3.5.2. Priprema otopina

Otopine korištene pri provedbi ove metode su pripremljene na sljedeći način:

- Kloridna kiselina 1M: 13 mL kloridne kiseline (25 %) dodati u tikvicu od 1000 mL s ultračistom vodom te nadopuniti do oznake. Rok valjanosti je jedan mjesec na sobnoj temperaturi.
- Natrijev hidroksid 1M: otopiti 4 g NaOH u 90 mL vode u tikvici od 100 mL te nadopuniti ultračistom vodom. Rok valjanosti je jedan mjesec na sobnoj temperaturi.
- Acetonitril/voda 40/60 (v/v): pomiješati 40 mL acetonitrila s 60 mL vode. Rok valjanosti je jedan mjesec na sobnoj temperaturi.
- Amonijak 2 % u metanolu: pomiješati 92 mL metanola s 8 mL amonijaka (25 %). Rok valjanosti je jedan mjesec na sobnoj temperaturi.
- Fosfatni pufer 50 mM pH 7,0: otopiti 6,8 g KH₂PO₄ u 900 mL vode. Namjestiti pH do 7.0 dodatkom 1 M NaOH ili 1M HCl. Nadopuniti s vodom do 1000 mL volumena. Rok valjanosti je jedan mjesec na sobnoj temperaturi.

- Mobilna faza A: Pomiješati 2,3 mL amonijaka (25 %) s 500 mL vode. Rok valjanosti je jedan mjesec na sobnoj temperaturi.
- Mobilna faza B: Pomiješati 2,3 mL amonijaka (25 %) s 500 mL acetonitrila. Rok valjanosti je jedan mjesec na sobnoj temperaturi.

3.5.3. Priprema radnih otopina i otopina internih standarda

- Priprema radnih standardnih otopina

Bazna otopina MS, koncentracije 1000 mg L⁻¹ priprema se na način da se proračunata masa standarda sedativa (~10 mg) odvaže u zasebne odmjerne tikvice i otopi etanolom. Rok valjanosti otopine je dvije godine u zamrzivaču.

Radna standardna otopina RS1, koncentracije 10 µg mL⁻¹ priprema se pipetiranjem 100 µL svake pojedine bazne otopine sedativa MS u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se nadopuni etanolom do oznake. Rok valjanosti otopine je šest mjeseci u zamrzivaču.

Radna standardna otopina RS2, koncentracije 100 ng mL⁻¹ priprema se pipetiranjem 100 µL radne standardne otopine RS1 u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se nadopuni etanolom do oznake. Rok valjanosti otopine je šest mjeseci u zamrzivaču.

- Priprema otopina internih standarda

Bazna otopina internog standarda MS-ISTD, koncentracije 1000 mg L⁻¹ priprema se na način da se proračunata masa internog standarda (~10 mg) odvaže u zasebne odmjerne tikvice i otopi etanolom. Rok valjanosti otopine je dvije godine u zamrzivaču.

Radna otopina RIS1, koncentracije 10 µg mL⁻¹ priprema se pipetiranjem 100 µL svake pojedine bazne otopine internog standarda MS-ISTD u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se tada nadopuni etanolom do oznake. Rok valjanosti otopine je šest mjeseci u zamrzivaču.

Radna otopina RIS2, koncentracije 100 ng mL⁻¹ priprema se pipetiranjem radne otopine RIS1 u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se nadopuni etanolom do oznake. Rok valjanosti je šest mjeseci u zamrzivaču.

Radna otopina standarda za kontrolu sustava koja odgovara koncentraciji od 1,0 µg kg⁻¹ u bubregu priprema se pipetiranjem 20 µL radne standardne otopine RS2 (100 ng mL⁻¹) i 20 µL radne otopine RIS2 (100 ng mL⁻¹) u epruvetu. Epruveta se odparuje pri 60 °C i rekonstituirana s 250 µL otopinom acetonitrila/vode 40/60 (v/v).

3.5.4. Priprema matriks kalibracijske krivulje

Matriks kalibracijska krivulja se priprema na način da se u svakoj analizi $1,0 \pm 0,05$ g slijepog uzorka bubrega obogati na pet koncentracijskih razina (M1-M5) radnom standardnom otopinom RS2 (100 ng mL^{-1}) u rasponu od 1 do $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Uzorci se obogaćuju i radnom otopinom internog standarda RIS2 (100 ng mL^{-1}) čija je koncentracija ista u svim uzorcima i iznosi $50 \mu\text{L}$.

Prikaz koncentracijskih razina te standarda kojima su obogaćivani uzorci bubrega prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz pripreme matriks kalibracijske krivulje

<i>MATRIKS</i>	<i>Slijepa proba</i>	M1	M2	M3	M4	M5	
	Obogaćenje $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	1	2	5	8	10
<i>BUBREG</i> <i>1,0 ± 0,05 g</i>	<i>μL</i> Radna standardna otopina RS2 (100 ng mL^{-1})	0	10	20	50	80	100
	<i>μL</i> Radna otopina RIS2 (100 ng mL^{-1})	50	50	50	50	50	50

3.6. POSTUPCI KONTROLE KVALITETE

- Kontrolni uzorak stanja instrumenta

Radna otopina standarda za kontrolu sustava koja odgovara koncentraciji od $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ u bubregu predstavlja kontrolni uzorak osjetljivosti instrumenta (engl. *Response Check*). Na početku i na kraju radne liste za injektiranje uzoraka instrument mora detektirati pik s omjerom signala i šuma $S/N > 10$.

- Slijepi kontrolni uzorak

Slijepi kontrolni uzorak (engl. *Blank*) predstavlja mješavina acetonitril/vode: 40/60 (v/v).

- Negativni kontrolni uzorak otapala

Slijepi kontrolni uzorak otapala (engl. *Solvent blank*) predstavlja uzorak proveden kroz ekstrakciju bez prisustva matriksa, kako bi se lako detektirala eventualna kontaminacija otapala korištenih u ekstrakciji.

- Negativni kontrolni uzorak matriksa

Negativni kontrolni uzorak matriksa (engl. *Matrix blank*) predstavlja uzorak bubrega koji ne sadrži analite koji se pretražuju ovom metodom.

- Obogaćeni kontrolni uzorak – matriks kalibracijska krivulja

Negativni uzorci bubrega obogaćuju se standardnim otopinama i internim standardima prema tablici 5.

3.7. PROČIŠĆAVANJE UZORAKA

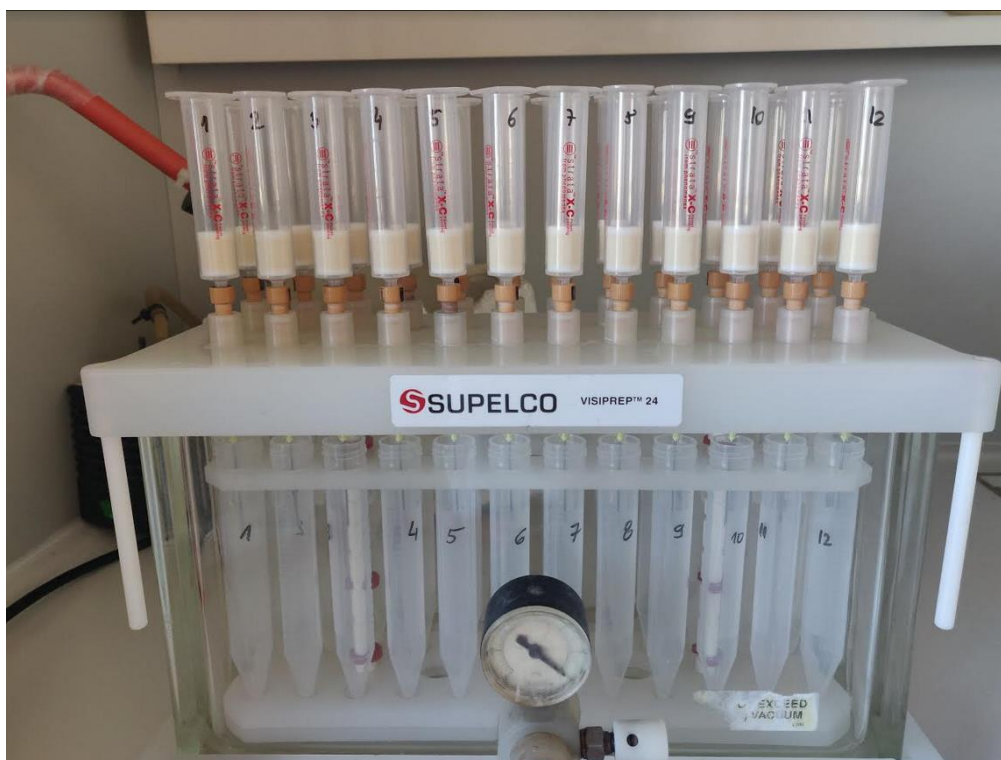
Pročišćavanje uzorka veoma je bitan korak u samoj metodi. Uzorak treba biti dobro pročišćen od svih nečistoća te tvari koje bi mogle interferirati prilikom analize. Na taj se način postiže viša osjetljivost te specifičnost metode.

Za postupak pročišćavanja uzorka bubrega prvo je potrebno odvagati $1 \pm 0,05$ g uzorka u epruvetu od 50 mL i dodati 50 μ L radne otopine internog standarda RIS2 (100 ng mL^{-1}). U uzorke koji se koriste za matriks kalibracijsku krivulju je potrebno dodati otopinu mješavine standarda kako je opisano u tablici 5., nakon kratkog vorteksiranja ostaviti uzorke 15 min kako bi se ujednačile koncentracije. mL. Potom, u sve uzorke dodati 5 mL acetonitrila i vorteksirati 30 s te ih staviti u ultrazvučnu kupelj tijekom 10 min nakon čega ponovno vorteksirati 5 s. Uzorke centrifugirati pri 3600 o/min na 4 °C tijekom 5 min, nakon čega ih staviti na -20 °C kroz minimalno sat vremena. Dobiveni supernatant prebaciti u epruvetu od 15 mL i dodati 6 mL fosfatnog pufera pH 7,0 te kratko pojedinačno vorteksirati. Pročišćavanje se provodi na SPE kolonama Strata X-C koje je potrebno prvo aktivirati s 4 mL metanola a zatim s 4 mL fosfatnog pufera pH 7,0. Nakon toga se na kolonice iz epruveta kvantitativno prenese ekstrakt uzorka i propušta bez vakuuma. Kolonice ispirati s 4 mL vode te s 4 mL metanola. Kolonice osušiti vakuumom tijekom jedne minute. Analite eluirati s 4 mL 2 % amonijaka u metanolu i eluat sakupiti uz eventualnu upotrebu vakuuma. Nakon elucije, uzorak upariti u struji dušika do suhoga pri 60 °C. Zaostatak dobiven uparivanjem otopiti u 500 μ L acetonitrila i vorteksirati te staviti uzorke na 5 min u ultrazvučnu kupelj.

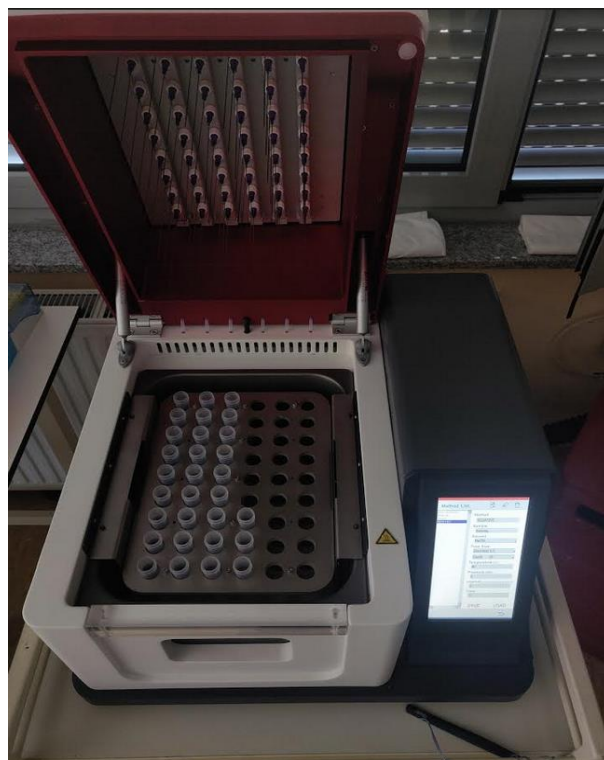
Ponovno upariti uzorke u struji dušika do suhoga pri 60 °C, u ovom koraku se priprema radna otopina standarda za kontrolu sustava te slijedi dalje jednaku proceduru postupanja kao i uzorci. Nakon uparavanja, dobiveni zaostatak otopiti u 250 µL acetonitril/vode 40/60 (v/v), vorteksirati i staviti na 5 min u ultrazvučnu kupelj. Otopinu uzorka prebaciti u u Eppendorf epruvetu od 2 mL za ultracentrifugu te centrifugirati pri 15000 o/min i 4 °C kroz 5 min. Bistru otopinu uzorka (250 µL) prebaciti u vialu s insertom.

Ovim postupkom ekstrakcije faktor koncentriranja uzorka f u konačnom ekstraktu uzorka bubrega iznosi 4 (Hrvatski veterinarski institut, 2020).

Na slici 2. prikazan je postupak pročišćavanja uzorka na vakum sustavu za SPE – ekstraktor u čvrstoj fazi, dok se na slici 3. nalazi korišteni uparivač MultiVap 54.



Slika 2. SPE pročišćavanje uzorka (Vlastita fotografija).



Slika 3. Uparivač MultiVap 54 (Vlastita fotografija).

3.8. ANALIZA UZORAKA NA LC-MS/MS UREĐAJU

Za provođenje analize koristi se UHPLC Agilent Tech. 1290 Infinity vezan s analizatorom mase trostruki kvadrupol Triple Quad LC/MS 6460 s *Jet Stream ESI* sustavom za elektrosprej ionizaciju. Analiti se ioniziraju u pozitivnom načinu rada. Vrijednosti m/z iona prekursora, iona produkata, fragmentor, kolizijska energija i ostali podaci vezani uz analite nalaze se u tablici 7.

MassHunter Acquisition software koristi se za upravljanje instrumentom, prikupljanje i obradu podataka.

Injektiranje uzoraka treba biti prema sljedećem rasporedu:

1. Slijepi kontrolni uzorak (*Blank*) – mobilna faza
2. Radna otopina standarda za kontrolu sustava
3. Slijepi kontrolni uzorak – mobilna faza
4. Negativni kontrolni uzorak bez analita koji se ispituju (*Matrix blank*)
5. Matriks kalibracijska krivulja
6. Slijepi kontrolni uzorak – mobilna faza

7. Uzorci (svakih deset injektiranja treba propustiti otopinu standarda za kontrolu sustava, nakon čega prije idućeg injektiranja uzoraka treba injektirati *Matrix blank*)
8. Uzorci
9. Negativni kontrolni uzorak otapala (*Solvent blank*)
10. Radna otopina standarda za kontrolu sustava
11. Slijepi kontrolni uzorak

3.8.1. Kromatografski uvjeti UHPLC-MS/MS i uvjeti masene spektrometrije

Kromatografski uvjeti UHPLC-MS/MS

<u>Kromatografska kolona:</u>	Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 2,1x100 mm
<u>Predkolona:</u>	Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m VanGuard
<u>Protok:</u>	0,4 mL min ⁻¹
<u>Vrijeme analize:</u>	8 min
<u>Temperatura odjeljka kolone:</u>	55 °C
<u>Sustav za uzorkovanje:</u>	Volumen injektiranja 10 μ L, Temperatura 12 °C Injektiranje s ispiranjem igle 20 s (metanol/acetonitril/propanol 5: 2,5: 2,5)
<u>Mobilna faza:</u>	Mobilna faza A: 2,3 mL amonijaka (25 %) s 500 mL H ₂ O Mobilna faza B: 2,3 mL amonijaka (25 %) s 500 mL acetonitrila
<u>Gradijent:</u>	Propuštanje mobilnih faza vrši se prema rasporedu prikazanom u tablici 6.

Tablica 6. Gradijent mobilnih faza korišten za provedbu metode

	Vrijeme	MF A	MF B	Protok
1	0 min	70 %	30 %	0,4 mL min ⁻¹
2	5 min	20 %	80 %	
3	5,1 min	0 %	100 %	
4	6,5 min	0 %	100 %	
5	6,6 min	70 %	30 %	
6	8,0 min	70 %	30 %	

Uvjeti masene spektrometrije

Ionske tranzicije snimaju se DMRM tipom skeniranja. Snima se jedan prekursor s dvije tranzicije u produkt ione ili dva prekursora, svaki sa jednom tranzicijom. Ionske tranzicije analita zajedno s vremenom zadržavanja (RT, engl. *Retention Time*), optimiranim naponom fragmentora (F), kolizijskom energijom (CE, engl. *Collision Energy*) i akceleracijskim naponom u kolizijskoj ćeliji (CAV, engl. *Cell Accelerator Voltage*) su navedene u tablici 7. s podcrtanim tranzicijama koje su najzastupljenije i pomoću kojih se provodi kvantifikacija.

Optimirani parametri izvora UHPLC-MS/MS koji utječu na proces ionizacije i prijenos iona kroz maseni analizator navedeni su u tablici 8.

Tablica 7. Ionske tranzicije UHPLC-MS/MS

Redni broj	Analit	RT (min)	Prekursor ion	Produkt ion*	F (V)	CE (eV)	CAV (eV)
1.	Ace(to)promazin	5,58	327,1	$\frac{254,1}{240,2}$	90	20 16	7 7
	Ace(to)promazin-D6	5,54	333,3	254,2	100	20	7
2.	Azaperol	4,02	330,2	$\frac{149,1}{192,1}$	95	26 16	1 1
	Azaperol-D4	4,01	334,3	149,3	100	26	1
3.	Azaperon	4,51	328,2	$\frac{165,1}{121,1}$	95	18 22	3 3
	Azaperon-D4	4,5	332,3	169,4	120	18	3
4.	Haloperidol	4,92	376,2	$\frac{165,0}{123,0}$	95	20 44	7 7
	Haloperidol-D4	-	380,1	169,1	-	-	7
5.	Karazolol	3,66	299,3	$\frac{116,1}{222,1}$	110	18 14	7 7
	Karazolol-D7	3,63	306,3	123,1	100	18	7
6.	Klorpromazin	6,76	319,1	$\frac{86,2}{246,3}$	95	18 22	3 3
	Klorpromazin-D6	6,72	325,3	92,6	95	18	3
7.	Ksilazin	3,66	221,1	$\frac{90,4}{164,1}$	120	20 24	7 7
	Ksilazin-D6	3,63	227,2	90,4	85	20	7
8.	Propionilpromazin	6,23	341,2	$\frac{268,1}{239,2}$	110	20 22	7 7
	Propionilpromazin-D6	6,23	347,3	268,1	80	20	7

Tablica 8. Parametri izvora UHPLC-MS/MS

Parametar	UHPLC-MS/MS (I-2-116)
Temperatura plina	350 °C
Protok plina	9 L min ⁻¹
Nebulizer	25 psi
Sheath Gas Temp	350 °C
Sheath Gas Flow	7 L min ⁻¹
Način rada	Pozitivni
Capillary	3000 V
Nozzle voltage	500 V
Delta EMV	350

3.9. KVALITATIVNA PROCJENA

Prije proračuna rezultata potrebno je provjeriti jesu li svi uvjeti kontrole kvalitete zadovoljeni.

Kvalitativna procjena glede prisutnosti određenog sedativa izvodi se usporedbom RT pikova eventualno prisutnih u otopini uzorka. U slijepom kontrolnom uzorku, negativnom kontrolnom uzorku otapala i negativnom kontrolnom uzorku matriksa ne smiju biti prisutni pikovi koji su u području retencije analita $RT \pm 2,5 \%$, od retencije zadane validacijom.

U slučaju kada se u otopini uzorka ne pronađu pikovi koji posjeduju RT usporedive s retencijom analita iz kalibracije, uzimajući kao interval pouzdanosti vrijednosti $\pm 2,5 \%$, uzorak se smatra negativnim, a rezultat se prikazuje kao sukladan. U slučaju da postoji sukladnost između RT-a, potrebno je procijeniti prisutnost iona prekursora ili iona produkta karakterističnih za taj analit analize.

U slučaju prisutnosti dijagnostičkih iona analita u uzorku analize, potrebno je izračunati ionski odnos (R) između dvije tranzicije ion prekursor – ion produkt:

$$R = \frac{An2}{An1} * 100 \quad [1]$$

Gdje je:

An1 – površina ionske tranzicije intenzivnijeg iona u otopini uzorka;

An2 – površina ionske tranzicije manje intenzivnog iona u otopini uzorka.

Ionski odnos dobiven za otopine uzorka mora biti uspoređen s ionskim odnosom matriks kalibracijske krivulje, tako da je potrebno izračunati devijaciju ionskog odnosa ΔR sa sljedećom formulom:

$$\Delta R = \frac{R_{uzorka} - R_{kal.uz.}}{R_{uzorka}} * 100 \quad [2]$$

gdje je:

R_{uzorak} ionski odnos 1° i 2° tranzicije analita u otopini uzorka

$R_{kal.uz.}$ ionski odnos 1° i 2° tranzicije analita u otopini uzoraka matriks kalibracijske krivulje.

Odnos izmjerenih intenziteta iona produkata mora odgovarati uvjetima opisanim u tablici 9.

Tablica 9. Maksimalna dozvoljena odstupanja relativnih intenziteta (Europska komisija, 2002).

Relativni intenzitet (% baznog pika)	LC-MSn
> 50 %	± 20 %
20 % - 50 %	± 25 %
10 % - 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

Dakle, da bi se dobila potvrda traženog analita prilikom provođenja potvrdne metode, potrebno je zadovoljiti sljedeće uvjete:

- Retencijsko vrijeme, s odstupanjem od ± 0,5 min
- Prisutnost iona prekursora analita, s omjerom signala i šuma S/N >10
- Prisutnost minimalno dva produkt iona, s omjerom signala i šuma S/N >10
- Odstupanje ionskog odnosa prekursora i produkta koje mora odgovarati uvjetima u tablici 9.

Navedeni kvalitativni parametri prate se uz pomoć računalnog programa instrumenta MassHunter Quantitative analysis for QQQ.

3.10. KVANTITATIVNA PROCJENA

Za kvantitativnu procjenu potrebno je proračunati rezultate s matriks kalibracijske krivulje, čija upotreba 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. Kalibracijska krivulja uključuje i točku T(0,0).

Proračun rezultata izvodi se pomoću računalnog programa instrumenta MassHunter Quantitative analysis for QQQ koji preračunava koncentracije analiziranih uzoraka prema dobivenoj kalibracijskoj krivulji.

Ukoliko se ne koristi navedeni program potrebno je:

Izračunati faktor odgovora (RF, engl. *Response Factor*) za svaki od analita u odnosu na interni standard za uzorke matriks kalibracije i ispitne uzorke, u skladu sa slijedećom formulom:

$$RF = \frac{A_n^1 * C_{istd}}{A_{istd}^1 * C_n} \quad [3]$$

gdje je:

A_n^1 - površina pika najzastupljenije tranzicije standarda

C_n – koncentracija standarda u matriks kalibraciji

A_{istd}^1 – površina pika najzastupljenije tranzicije internog standarda

C_{istd} – koncentracija internog standarda u matriks kalibraciji.

Izračunati srednju vrijednost faktora odgovora za standardne otopine i standardnu devijaciju te CV %:

$$CV \% = \frac{SD_{RF_n}}{RF_n} * 100 \quad [4]$$

SD_{RF_n} – standardna devijacija RF vrijednosti za standarde

RF_n – srednja vrijednost RF za standarde.

Vrijednost % RDS ne bi trebala biti veća od 25 %.

Koncentracija analita C_n u otopini uzorka izražena u $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) računa se pomoću formule:

$$C_n = \frac{C_{istd} * A_n^1}{A_{istd}^1 * \overline{RF_n}} \quad [5]$$

gdje je:

C_{istd} – koncentracija internog standarda u uzorku

A_n^1 – površina pika najzastupljenije tranzicije standarda u uzorku

A_{ista}^1 – površina pika najzastupljenije tranzicije internog standarda u uzorku

\overline{RF}_n – srednja vrijednost RF kod uzoraka matriks kalibracije

Koncentracija analita izražava se u ng g^{-1} ili $\mu\text{g kg}^{-1}$ koristeći tri značajna decimalna mjesta. Kao što je već navedeno, korekcija iskorištenja uračunata je u rezultat budući da se kvantitativno određivanje provodi pomoću matriks kalibracijske krivulje, isto kao što je i proširena mjerna nesigurnost uključena u proračun granične koncentracije analita $CC\alpha$.

Granična koncentracija analita $CC\alpha$ i sposobnost dokazivanja $CC\beta$ računa se uz pomoć InterVAL Plus programa. Proračun parametara provodi se na temelju NDK vrijednosti, odnosno na temelju C_0 vrijednosti za supstance bez utvrđenih graničnih koncentracija, prema Odluci komisije 2002/657/EZ.

$CC\alpha$ za zabranjene tvari se računa iz sljedeće formule:

$$CC\alpha = C_0 + 2,33 * Sr_{C_0} \quad [6]$$

gdje je:

C_0 - najniža razina ispitivanja

Sr_{C_0} - standardna devijacija reproducibilnosti pri C_0 .

Dok se za tvari kojima je određena dopuštena granica računa prema sljedećoj formuli:

$$CC\alpha = C_1 + 1,64 * Sr_{C_1} \quad [7]$$

gdje je:

C_1 -koncentracija na dozvoljenoj granici

Sr_{C_1} - standardna devijacija reproducibilnosti pri C_1 .

$CC\beta$ se računa iz sljedeće formule:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 * Sr_{CC\alpha} \quad [8]$$

gdje je:

$Sr_{CC\alpha}$ -standardna devijacija reproducibilnosti pri $CC\alpha$.

Rezultat potvrđne analize se smatra pozitivan ukoliko je koncentracija premašila graničnu koncentraciju analita $CC\alpha$, dok se rezultat smatra negativan ukoliko koncentracija nije premašila graničnu koncentraciju analita $CC\alpha$.

Rezultat orijentacijske analize se smatra sumnjivim ukoliko je koncentracija premašila vrijednost $CC\beta$.

Ukoliko rezultat, izračunat na osnovu kalibracijske krivulje, ukazuje na koncentraciju veću od $CC\beta$ utvrđene pri C_0 koncentraciji, tj. veću koncentraciju od $CC\alpha$ vrijednosti za supstance bez NDK vrijednosti, potrebno je ponoviti analizu pripremom uzorka u duplikatu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je validacija za osam supstanci iz grupe sedativa od kojih je samo za neke propisana NDK vrijednost. Supstance su odabrane prema planu Nacionalnog programa monitoringa rezidua antibiotika.

Za tvari obuhvaćene Uredbom Europske komisije 37/2010 o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla provedena je validacija metode pri koncentracijama koje odgovaraju NDK vrijednostima, u skladu s važećim dokumentima za validaciju analitičkih metoda (Odluka Komisije o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata 2002/657/EZ, Europska unija, 2002). S druge strane, spomenuta Odluka komisije 2002/657/EZ zahtjeva ispitivanje metode oko NDK vrijednosti kad se radi o supstancama s propisanim NDK, odnosno pri što nižim koncentracijama kada za njih nisu propisane granične vrijednosti. Zadovoljavajući propisane zahtjeve, metoda je validirana u mjernom području od 1-100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Validacijski parametri određeni provedbom ove metode su: specifičnost, linearnost, ponovljivost, međupreciznost, granična koncentracija analita CC α i sposobnost dokazivanja CC β (uz pomoć InterVAL Plus programa (QuoData, Njemačka)), robusnost i stabilnost u skladu s Odlukom komisije 2002/657/EZ.

4.1. SPECIFIČNOST

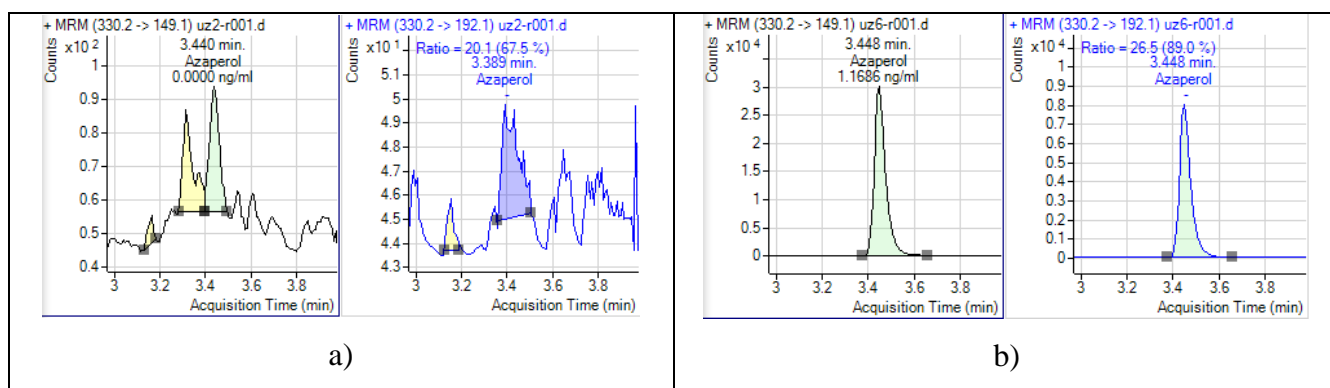
Specifičnost je testirana na slijepim uzorcima matriksa bubrega prateći pritom postojanje pikova poteklih od matriksa koji bi mogli interferirati s pikom analita.

Injektirane su strukturno slične supstance, gdje je tražene analite moguće razlučiti prema njihovoj specifičnoj masi, fragmentaciji, ionskom odnosu i retencijskom vremenu. Kako je utjecaj matriksa značajan, potrebno je pripremiti zasebnu matriks kalibracijsku krivulju za svaku vrstu uzorka bubrega.

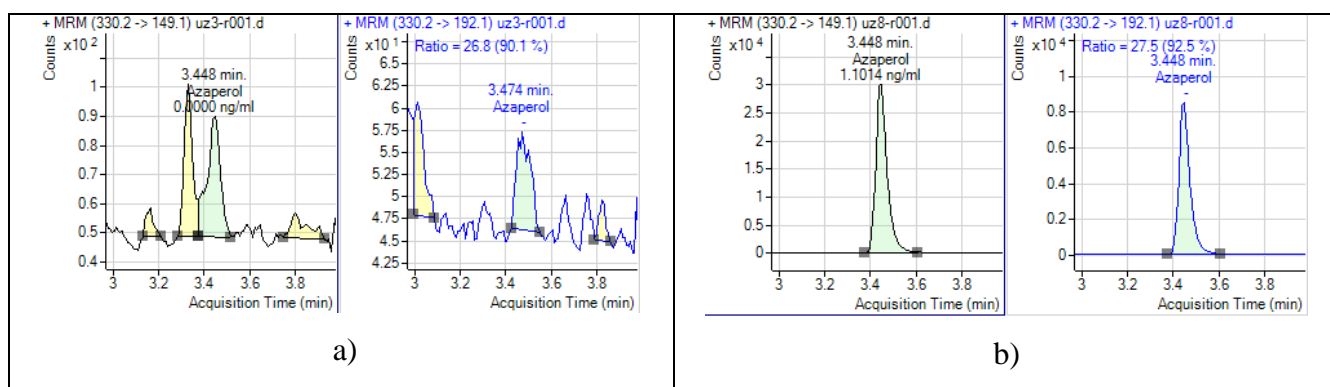
Propuštani su slijepi te obogaćivani uzorci bubrega juneta i svinje. Ukupno je analizirano 20 slijepih uzoraka na čijim kromatogramima nisu pronađeni pikovi u vremenu zadržavanja (specifičnom za analite od interesa), poštujući uvjet odstupanja od retencijskog vremena pika $\pm 2,5\%$ koji bi mogli interferirati s analitom. Na pojedinim kromatogramima prisutan je pik

šuma u vremenskom intervalu u kojem se očekuje analit od interesa pri čemu je omjer signal-šum (S/N) kod svih manji od 10, a prema analitičkoj praksi laboratorija takvi se pikovi ne integriraju i ne utječu na rezultat. Isto tako, na slikama od 4. do 9. usporedbom kromatograma slijepog i obogaćenog uzorka prikazanih analita azaperola, klorpromazina i karazolola u bubregu juneta i svinje, vidljivo je kako su kod kromatograma obogaćenih uzoraka prisutni specifični i snažni odzivi pri odgovarajućim retencijskim vremenima i ionskim tranzicijama.

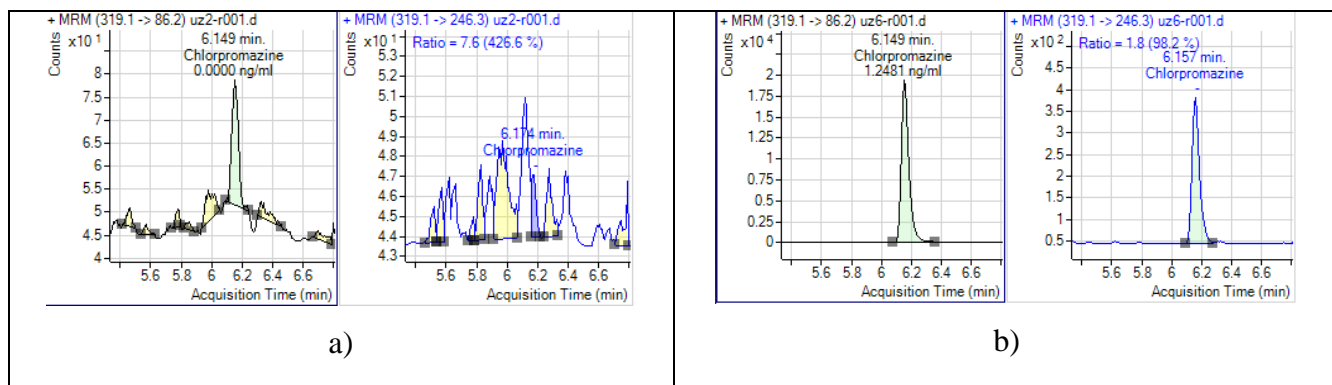
Na slici 10. prikazan je kromatogram svih analiziranih analita s njihovim pripadajućim retencijskim vremenima. Vidi se kako su pikovi svih analita jasno odvojeni, izuzev dvaju pikova s najkraćim retencijskim vremenima (ksilazin i karazolol) koji imaju približno jednako retencijsko vrijeme (RT za ksilazin= 3,632 min; RT za karazolol= 3,635 min).



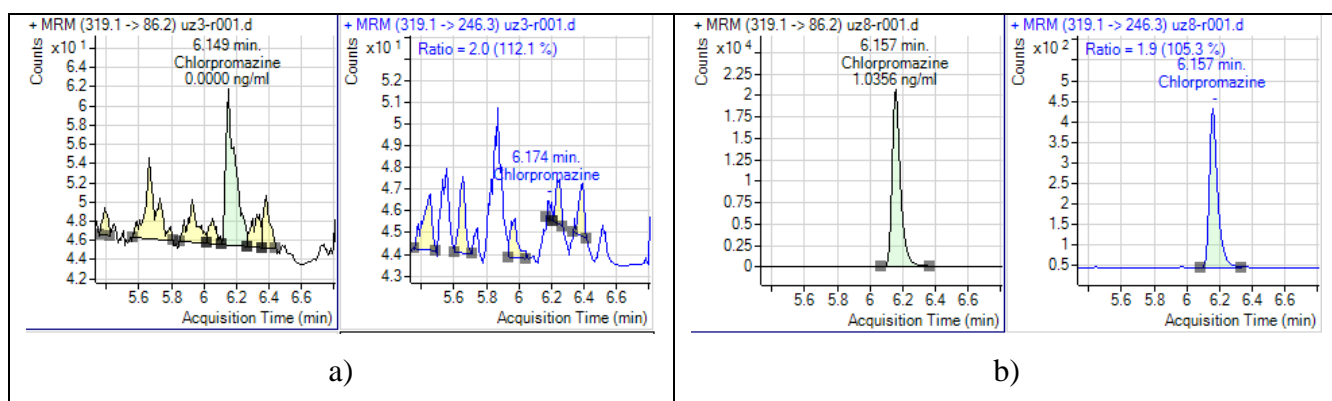
Slika 4. MRM kromatogrami dviju tranzicija azaperola a) slijepog uzorka bubrega juneta i b) uzorka obogaćenog na M1 koncentracijsku razinu.



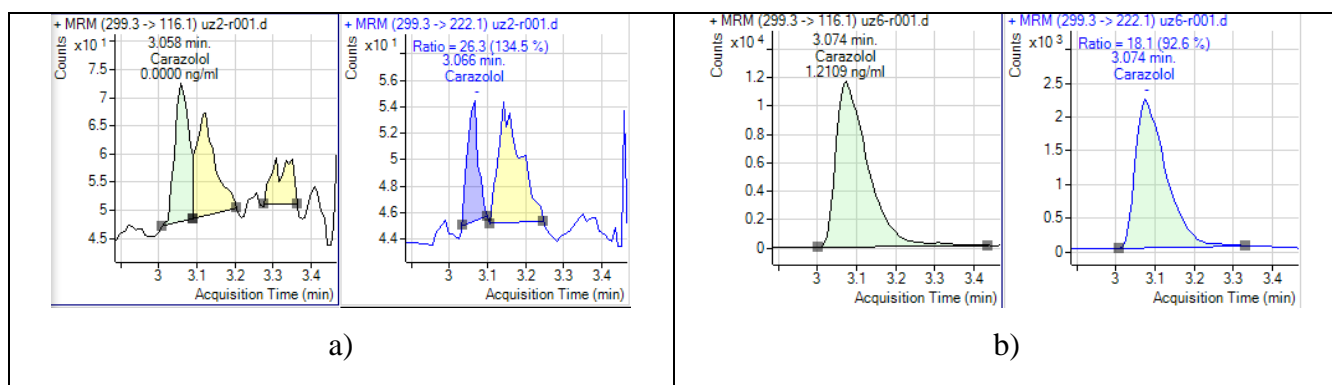
Slika 5. MRM kromatogrami dviju tranzicija azaperola a) slijepog uzorka bubrega svinje i b) uzorka obogaćenog na M1 koncentracijsku razinu.



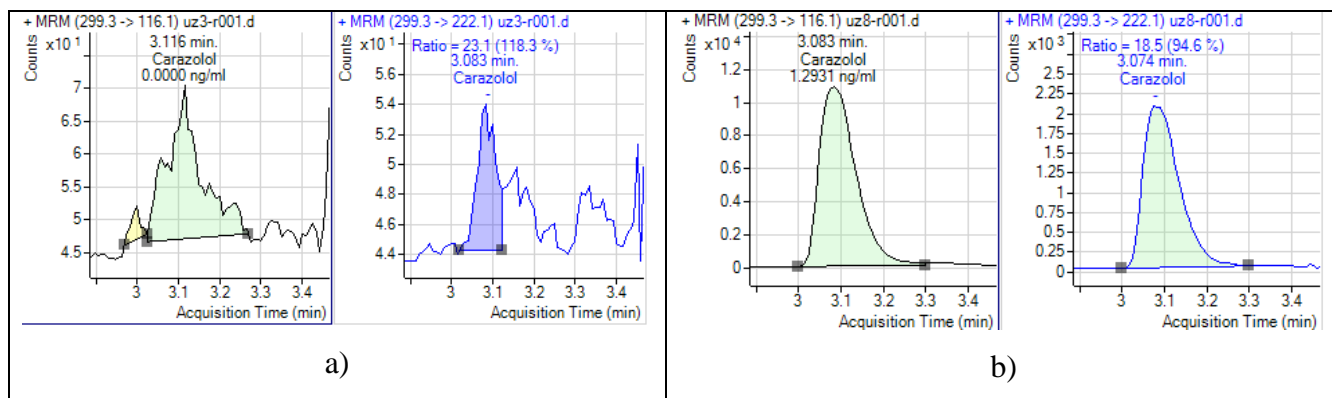
Slika 6. MRM kromatogrami dviju tranzicija klorpromazina a) slijepog uzorka bubrega juneta i b) uzorka obogaćenog na M1 koncentracijsku razinu.



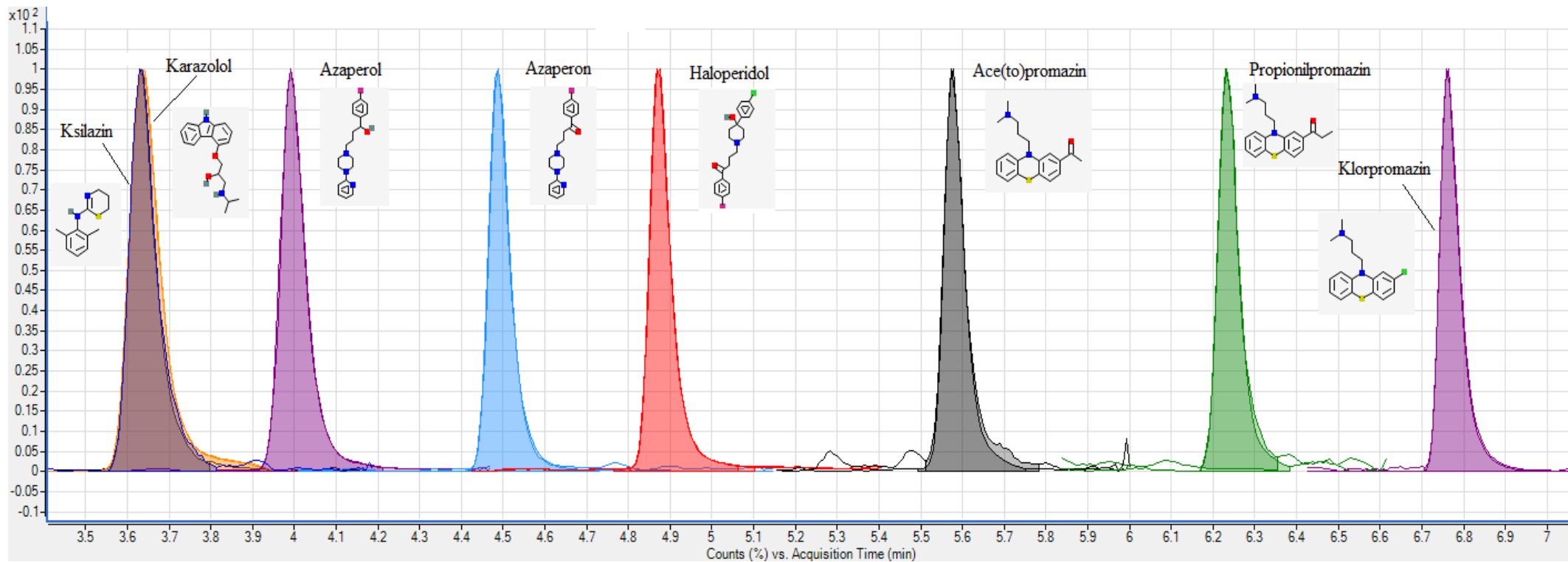
Slika 7. MRM kromatogrami dviju tranzicija klorpromazina a) slijepog uzorka bubrega svinje i b) uzorka obogaćenog na M1 koncentracijsku razinu.



Slika 8. MRM kromatogrami dviju tranzicija karazolola a) slijepog uzorka bubrega juneta i b) uzorka obogaćenog na M1 koncentracijsku razinu.



Slika 9. MRM kromatogrami dviju tranzicija karazolola a) slijepog uzorka bubrega svinje i b) uzorka obogaćenog na M1 koncentracijsku razinu.

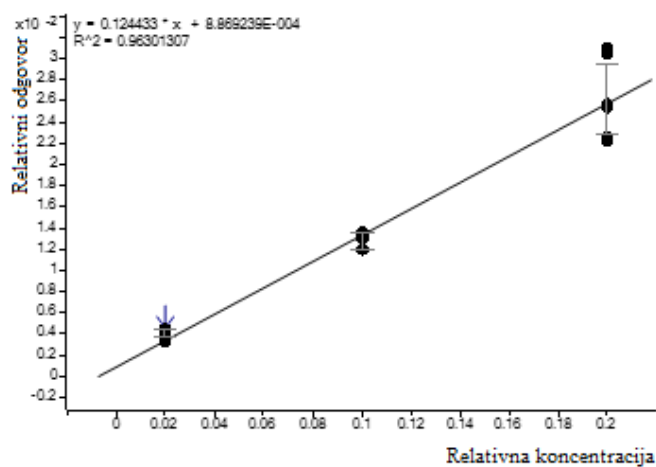


Slika 10. Kromatogram analiziranih analita s pripadajućim retencijskim vremenima. Strukturne formule analita preuzete s PubChem, 2020.

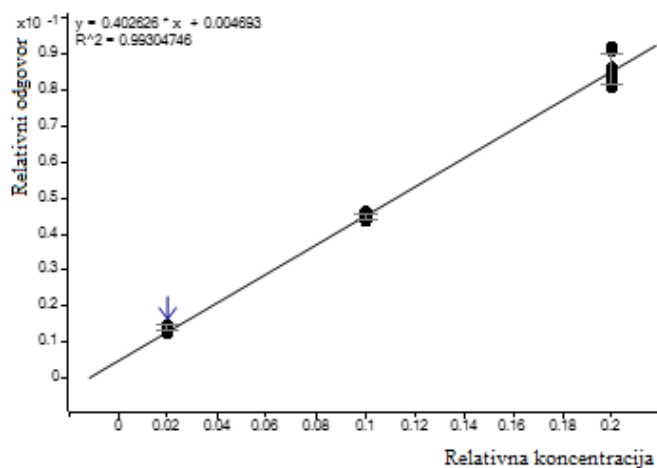
Dobiveni rezultati ukazuju kako je metoda sposobna razlučiti pozitivne od negativnih uzoraka čime se potvrđuje njena specifičnost, odnosno selektivnost.

4.2. LINEARNOST

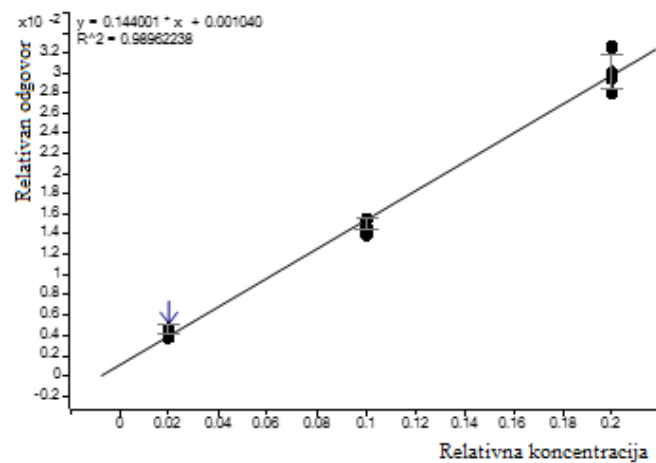
Linearnost je testiranje odgovora instrumenta u području određivanja. Postupak linearnosti se ispituje u pet točaka matriks kalibracijske krivulje u koncentracijskom rasponu od 1 do 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na slikama od 11. do 18. prikazane su kalibracijske krivulje za analizirane analite.



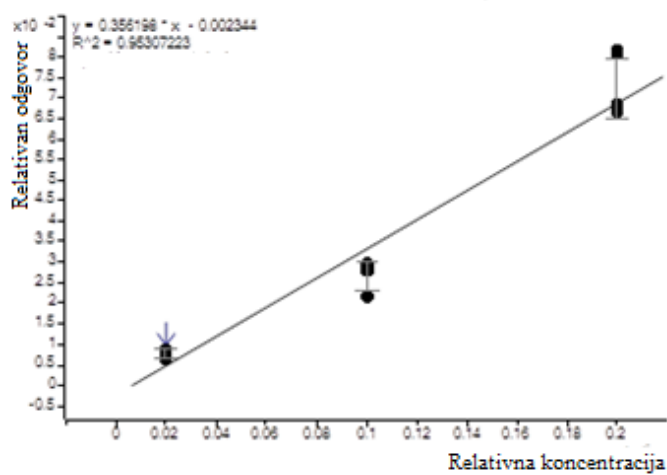
Slika 11. Kalibracijska krivulja za ace(to)promazin.



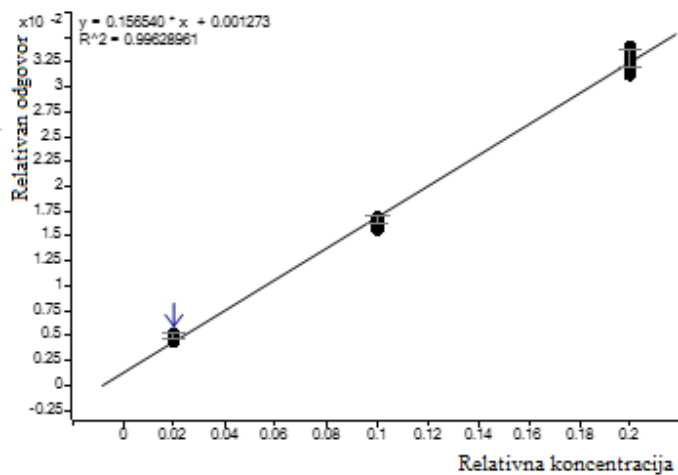
Slika 12. Kalibracijska krivulja za azaperol.



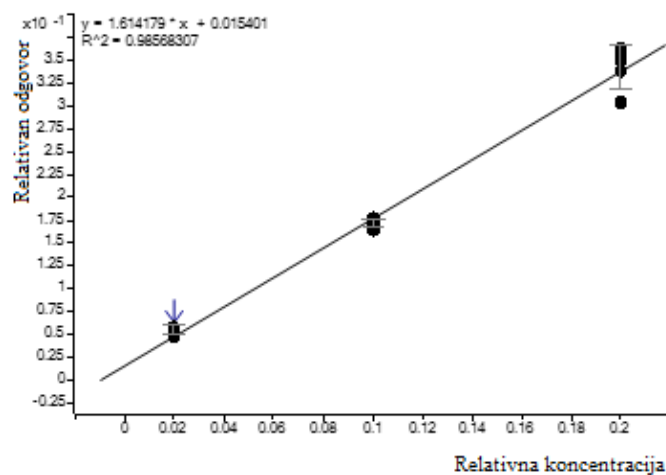
Slika 13. Kalibracijska krivulja za azaperon.



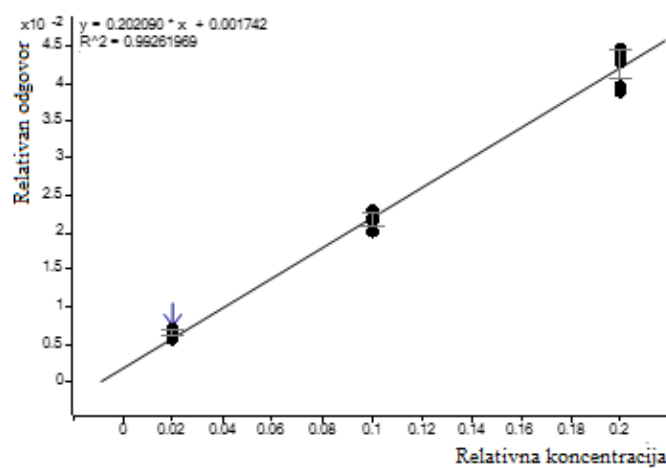
Slika 14. Kalibracijska krivulja za haloperidol.



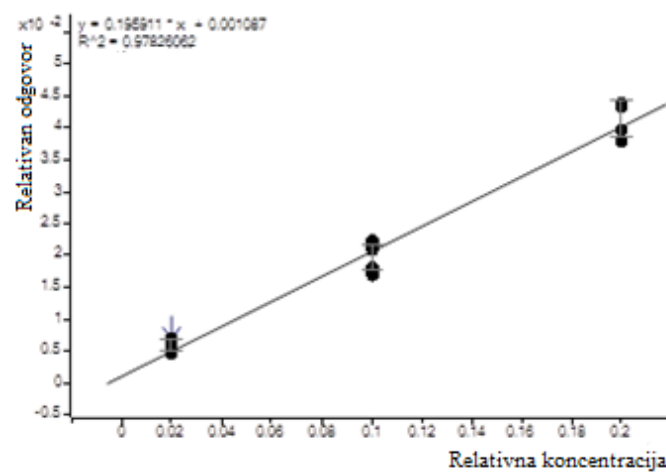
Slika 15.:Kalibracijska krivulja za karazolol.



Slika 16. Kalibracijska krivulja za klorpromazin.



Slika 17. Kalibracijska krivulja za ksilazin.



Slika 18. Kalibracijska krivulja za propionilpromazin.

Regresijska analiza podataka pokazala je linearnu ovisnost koncentracije analita u uzorku i omjera površine pika analita i internog standarda. Koeficijenti korelacije, r, kreću se od 0,953 za haloperidol do 0,996 za karazolol, te su prikazani za svaki pojedini analit u tablici 10., zajedno s pripadajućim jednadžbama pravaca.

Tablica 10. Prikaz parametara linearnosti

Analit	r	Jednadžba pravca
Ace(to)promazin	0,963	$y = 0,124x + 8,869E-0,004$
Azaperol	0,993	$y = 0,403x + 0,0047$
Azaperon	0,987	$y = 0,144x + 0,0010$
Haloperidol	0,953	$y = 0,356x - 0,0023$
Karazolol	0,996	$y = 0,157x + 0,0013$
Klorpromazin	0,986	$y = 1,614x + 0,0154$
Ksilazin	0,993	$y = 0,202x + 0,0017$
Propionilpromazin	0,978	$y = 0,1959x + 0,0011$

4.3. PONOVLJIVOST/MEĐUPRECIZNOST

Provođenjem ovog validacijskog postupka ispitalo se ponašanje metode u uvjetima ponovljivosti, te ponavljanjem analiza obogaćenih uzoraka i njihovom usporedbom dobiveni su rezultati preciznosti (ponovljivost i međupreciznost) i istinitosti.

Dvije vrste uzoraka bubrega (juneta i svinje) obogaćeni su na četiri koncentracijske razine: M1; M2; M3 i M4 (1; 5; 10 i 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Po svakoj koncentracijskoj razini napravljeno je po četiri ponavljanja tijekom dva dana od strane dva različita analitičara. Ukupno je analizirano 32 uzoraka. U analizu su uzeti u obzir faktori koji mogu utjecati na rezultate analize (različiti analitičari i različite životinjske vrste za matriks bubrega).

Prema Odluci komisije 2002/657/EZ, ponovljivost se računa izračunom koeficijenta varijacije, CV % koristeći sljedeću formulu:

$$CV \% = \frac{SD}{\bar{C}} \quad [9]$$

gdje je:

SD – standardna devijacija dobivenih koncentracija pri određenom obogaćenju, izražena u $\mu\text{g kg}^{-1}$

\bar{C} – prosječna koncentracija uzoraka pri određenom obogaćenju u $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Koeficijent varijacije dobivenih vrijednosti ponavljajućih analiza referentnog materijala ne smije prelaziti vrijednost dobivenu Horwitzovom jednadžbom:

$$CV \% = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad [10]$$

gdje je C maseni udio izražen kao potencija s bazom 10.

Za ponovljivost i međupreciznost je bitno da se CV % računa za svaku koncentracijsku razinu obogaćenja uzoraka te da dobivene vrijednosti odgovaraju vrijednostima navedenima u tablici 11. Za koncentracije manje od $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ bitno je da CV % vrijednost bude što niža.

Za analize izvedene pod uvjetima ponovljivosti, unutarlaboratorijski CV % obično bi trebao iznositi između jedne polovine i dvije trećine vrijednosti navedenih u tablici 11.

Tablica 11. Primjeri CV vrijednosti reproducibilnosti kvantitativnih metoda pri različitim rasponima frakcija masa (Europska komisija, 2002).

Koncentracija	CV %
$1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-
$10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-
$100 \mu\text{g kg}^{-1}$	23
$1000 \mu\text{g kg}^{-1}$	16

CV % vrijednosti su izračunate za svaki analit, zajedno sa standardnim devijacijama te prosječnim koncentracijama pri četiri razine koncentracijskih obogaćenja. Rezultati su prikazani u tablici 12.

Tablica 12. Izračunate vrijednosti SD te CV % za sve analite

Analit	Obogaćenje	\bar{C} $\mu\text{g kg}^{-1}$	SD $\mu\text{g kg}^{-1}$	CV %
Ace(to)promazin	M1	1,200	0,152	13
	M2	4,729	0,292	6
	M3	10,116	1,290	13
	M4	100,375	2,516	3
Azaperol	M1	1,108	0,100	9
	M2	4,951	0,096	2
	M3	10,014	0,518	5
	M4	100,4	3,112	3
Azaperon	M1	1,150	0,143	12
	M2	4,821	0,235	5
	M3	10,075	0,604	6
	M4	100,425	4,012	4
Haloperidol	M1	1,362	0,165	12
	M2	3,762	0,640	17
	M3	9,928	1,035	10
	M4	100,325	7,898	8
Karazolol	M1	1,134	0,076	7
	M2	4,860	0,146	3
	M3	10,056	0,300	3
	M4	102,313	4,221	4
Klorpromazin	M1	1,185	0,131	11
	M2	4,786	0,135	3
	M3	10,089	0,751	7
	M4	100,4	2,581	3
Ksilazin	M1	1,118	0,121	11
	M2	4,896	0,234	5
	M3	10,040	0,499	5
	M4	931,055	24,952	3
Propionilpromazin	M1	1,230	0,212	17
	M2	4,637	0,531	11
	M3	10,158	1,932	19
	M4	100,375	1,858	2

Preciznost ove kvantitativne metode zadovoljila je uvjete da je CV < 23 %.

Koeficijenti varijacije rezultata niži su od vrijednosti izračunatih Horwitzovom jednadžbom te ukazuju na vrlo dobru ponovljivost metode.

4.4. GRANIČNA KOLIČINA ANALITA, SPOSOBNOST DOKAZIVANJA, ISKORIŠTENJE I MJERNA NESIGURNOST

Granična koncentracija analita CC α i sposobnost dokazivanja CC β izračunati su uz pomoć InterVAL Plus programa.

U tablici 13. prikazani su parametri $CC\alpha$ i $CC\beta$ određeni u validaciji za svaki pojedinačni analit za matriks bubrega, zajedno s pripadajućim iskorištenjem, standardnom devijacijom te mjernom nesigurnosti.

Tablica 13. Validacijski parametri $CC\alpha$ i $CC\beta$, iskorištenje, standardna devijacija i mjerna nesigurnost određeni validacijom metode

Matriks: BUBREG	$CC\alpha$ $\mu\text{g kg}^{-1}$	$CC\beta$ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Iskorištenje [%]	Rel SR [%]	Mjerna nesigurnost [%]
			pri $CC\alpha$	pri $CC\alpha$	
Ace(to)promazin	1,72	2,26	108,2	12,8	16,2
Azaperol	1,57	1,98	107,8	11,2	7,6
	100,9	1,74	96,9	4,4	
Azaperon	1,80	2,38	107,8	13,8	11,1
	101,3	2,01	95,4	6,5	
Haloperidol	3,33	6,47	98,7	26,2	58,1
Karazolol	1,51	1,95	110,8	10,9	14,5
	17,5	1,71	95,8	8,9	
	27,5	1,71	95,2	8,9	
Klorpromazin	1,56	2,00	108,3	11,9	14,9
Ksilazin	1,65	2,19	108,0	13,2	16,5
Propionilpromazin	2,27	3,48	106,6	19,5	42,8

Za sedative s točno određenom NDK vrijednosti, $CC\alpha$ je izražena pri NDK za tu određenu vrstu bubrega životinje te pri C_0 za ostale vrste. Na temelju dobivenih rezultata iz tablice 13. vidljivo je vrlo visoko iskorištenje pri $CC\alpha$ za svaki sedativ, od 95,2 % za azaperon do 110,8 % za karazolol. Iz rezultata standardne devijacije, utvrđeno je veliko odstupanje za haloperidol koje iznosi 26,2 % te za propionilpromazin koje iznosi 19,5 %. Veće odstupanje predstavlja slabije reproducibilan rezultat. Za ostale analite utvrđena su nešto niža odstupanja. Kao što je već navedeno, mjerna nesigurnost analitičkog rezultata izražena je preko $CC\alpha$ i $CC\beta$ jer računavaju standardnu devijaciju reproducibilnost metode određene u validaciji, a uglavnom se navodi kada je rezultat nesukladan te je potrebno izraziti njegovu točnu koncentraciju i odstupanje mjerne nesigurnosti vezano uz taj rezultat.

4.5. ROBUSNOST

Robusnost se testira uvođenjem malih promjena u postupak pripreme i pročišćavanja uzorka od strane laboratorija i promatranjem njihovih posljedica na dobivene rezultate

analize. Robusnost metode potvrđena je kontrolom faktora različitih analitičara i vrste uzorka (tablica 14. i 15.). U tablici 14. prikazani su faktori i razine promjena koji bi mogli utjecati na ishod rutinskih analiza. U tablici 15. je prikazan raspored propuštanja uzoraka po danima s obzirom na analitičare te životinjsku vrstu bubrega.

Tablica 14. Faktori i razine promjena za provedenu analitičku metodu

Faktori	Razine
analitičar	Analitičar 1 – Analitičar 2
životinjska vrsta	Bubreg : june –svinja

Tablica 15. Faktori i razine promjena za matriks bubrega.

Analiza broj	Dan	Analitičar	Životinjska vrsta
01	1	Analitičar 2	Bubreg june
02	1	Analitičar 2	Bubreg june
03	1	Analitičar 2	Bubreg svinja
04	1	Analitičar 2	Bubreg svinja
05	2	Analitičar 1	Bubreg june
06	2	Analitičar 1	Bubreg june
07	2	Analitičar 1	Bubreg svinja
08	2	Analitičar 1	Bubreg svinja

Validacija je provedena unutar jednog mjeseca, stoga se može tvrditi da je analitički sustav stabilan za provedbu rutinskih analiza.

4.6. STABILNOST

Stabilnost analita u standardnim radnim otopinama se provodi pod određenim vremenskim uvjetima (npr. nakon jedan, dva, tri tjedna ili mjeseca), gdje se provjerava prisutnost značajnih odstupanja u instrumentalnom odgovoru ($\pm 10\%$), uspoređujući dobivene vrijednosti s otopinama radnih standarda pripremljenih na dan provjere. Stabilnost analita u matriksu se može utvrditi analizom ekstrakata analita u matriksu kroz period od maksimalno sedam dana.

Provođenjem metode dokazalo se kako su standardi vrlo stabilni, kako u standardnim otopinama tako i u ekstraktima pripremljenih uzoraka. Pripremljene uzorke je potrebno analizirati unutar 48 sati.

Sama metoda pa tako i rok čuvanja standardnih otopina preuzeti su iz službene metode europskog referentnog laboratorija za sedative WFSR-EURL, Wageningen Food Safety Research iz Nizozemske.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je odrediti validacijske postupke u određivanju sedativa u bubregu životinja primjenom UHPLC-MS/MS metode.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- UHPLC-MS/MS metoda validirana je za mjerno područje koje odgovara masenim udjelima najnižih koncentracija ($CC\alpha$ pri c_0) zabranjenih sedativa kao i graničnim masenim udjelima određivanja ($CC\alpha$) ispod propisanih najvećih dopuštenih količina (NDK) dozvoljenih sedativa u bubregu.
- Postupak pripreme uzoraka bubrega uključuje ekstrakciju čvrstom fazom pri čemu su se kolonice Strata™ X-C pokazale kao prikladne za istovremeno određivanje ace(to)promazina, azaperona (i metabolita azaperola), haloperidola, karazolola, klorpromazina, ksilazina i propionilpromazina u uzorcima bubrega juneta i svinje.
- Budući da se radi o složenom biološkom matriksu, značajan utjecaj matriksa na odziv analita minimizira se primjenom matriks kalibracijskih krivulja i dodatkom internog standarda.
- Odabrani parametri validacije (specifičnost, linearnost, preciznost i međupreciznost, granična količina analita i sposobnost dokazivanja, robusnost i stabilnost) zadovoljavaju kriterije o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata prema važećoj Uredbi Komisije 2002/657/EZ.
- Validirana metoda visoke je specifičnosti, točnosti i preciznosti za orijentacijske i potvrdne postupke određivanja navedenih sedativa.

6. LITERATURA

Beyene T. (2016) Veterinary drugs residues in food-animal products: its factors and potential effect on public health. *J. Veterinar. Sci. Technol.* **7** (1), 1-7.

Cannavan, A., Kay, J.F., Jandrić, Z. (2017) Method Validation and Quality Assurance/Quality Control Approaches for Multi-residue Methods. U: Chemical Analysis of Non-antimicrobial Veterinary Drug Residues in Food, (Kay, J.F., MacNeil, J.D., Wang, J., ured.), JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, SAD, str. 549-569.

Cerkvenik Flajs, V. i MacNeil, J.D. (2017) Sedatives and Tranquilizers. U: Chemical Analysis of Non-antimicrobial Veterinary Drug Residues in Food, (Kay, J.F., MacNeil, J.D., Wang, J., ured.), JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, SAD, str. 311-362.

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

Clarke, K. i Trim, C. (2014) Veterinary Anaesthesia, 11. izd, Saunders Elsevier Ltd., str. 81, 82.

Copper, J., Delahant, P., Fodey, T.L., Elliott, C.T. (2004) Development of a rapid screening test for veterinary sedatives and beta-blocker carazolol in porcine kidney by ELISA. *Analyst* **29**, 169-174. doi: 10.1039/b311709j

De Oliveira, L.G., Barreto, F., Hoff, R., Rübensam, G., Sherer Kurz, M.H., Galle, G., Gonçalves, F. (2016) Validation of a method for sedatives and β -blockers determination in swine, bovine and equine kidney using LC coupled with tandem MS. *Food Addit. Contam. A* **37**, 32-39. doi: 10.1080/19440049.2016.1252468

Dong, M.W. i Zhang, K. (2014) Ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* **63**, 21-30. doi: 10.1016/j.trac.2014.06.019

EFSA (2010) Report for 2008 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in food of animal origin in the Member States. *EFSA Journal* **8(4)**, 1-55. Wiley Online Library, doi:10.2903/j.efsa.2010.1559 (EFSA – European Food Safety Authority)

EFSA (2020a) Veterinary drug residues in animals and food: compliance with safety still high. EFSA – European Food Safety Authority, <<http://www.efsa.europa.eu/en/news/veterinary-drug-residues-animals-and-food-compliance-safety-levels-still-high>>. Pristupljeno 05. svibnja 2020.

EFSA (2020b) Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Supporting Publications* **17(3)**, 1-74. Wiley Online Library, doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1775 (EFSA – European Food Safety Authority)

Eurachem (2014) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Eurachem – A Focus for Analytical Chemistry in Europe, <<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>>. Pristupljeno 04. svibnja, 2020.

Europska komisija (1996) Direktiva Vijeća 96/23/EZ od 29. travnja 1996. o mjerama za nadzor određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla i ukidanju Direktiva 85/358/EEZ i 86/469/EEZ i Odluka 89/187/EEZ i 91/664/EEZ. *Off. J. Eur. Commun.* L 125. 10-32.

Europska komisija (2001) Direktiva 2001/82/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 6. studenog 2001. o zakoniku Zajednice o veterinarsko-medicinskim proizvodima. *Off. J. Eur. Commun.* L 311. **030**, 76-141.

Europska komisija (2002) Odluka komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2002/657/EZ). *Off. J. Eur. Commun.* L 221. **032**, 109-137.

Europska komisija (2010) Uredba komisije br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla. *Off. J. Eur. Commun.* L 15. **032**, 275-346.

Falowo, A.B. i Akimoladum, O.F. (2019) Veterinary Drug Residues in Meat and Meat Products: Occurrence, Detection and Implications. U: Veterinary Medicine and Pharmaceuticals, (Bekoe, S.M., Adosraku, R.K., Saravanan, M., Ramkumar, P.K., ured.), IntechOpen. str. 1-18. doi: 10.5772/intechopen.79335

FAO (2020) JECFA databases, Online edition: „Residues of some veterinary drugs in food and animals“, FAO – Food and Agriculture Organisation, <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs/en/>>. Pristupljeno 16. lipnja 2020.

Gašljević, V. (2009) Validacija i mjerna nesigurnost. *Biochem. Medica* **20(1)**, 57-63.

ICH (2005) Harmonised Tripartite Guideline: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH – International Committee for Harmonisation. <<https://www.ich.org/page/quality-guidelines>>. Pristupljeno 04. svibnja 2020.

Hrvatski veterinarski institut (2020) Interna procedura analitičkih metoda.

ISO 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

Johns, J., Caulkett, N., Chandy, G., Aleksander, J., Venugopal, S.K., Surendran, S., Sreedharannair, A. (2020) Oral haloperidol premedication to reduce capture stress prior to xylazine-ketamine anesthesia in captive spotted deer (*Axis axis*). *J. Zoo Wildl. Med.* **51(1)**, 88-95. doi: 10.1638/2017-0034

Kos, J. (2008) Uvod u anesteziologiju. Premedikacija i sedacija. Podjela anestezije. Lokalna i regionalna anestezija. Intavenska anestezija., Klinika za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

MacNeil, J.D. i Kay, J.F. (2017). Basic Consideration for the Analyst for Veterinary Drug Residue Analysis in Animal Tissues. U: Chemical Analysis of Non-antimicrobial Veterinary Drug Residues in Food, (Kay, J.F., MacNeil, J.D., Wang, J., ured.), JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, SAD, str. 1-21.

Maksimović, A., Lutvikadić, I., Filipović, S., Hadžijunuzović-Alagić, Dž. (2018) Analgetici, sedativi i anestetici u veterinarskoj medicini sa referentnim protokolima, Veterinarski fakultet Sarajevo, Sarajevo, str. 18,19,21,22.

Ministarstvo poljoprivrede (2013) Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane: Praćenje rezidua/ Državni plan monitoringa rezidua (DPMR), <<http://www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=123>>. Pristupljeno 23. lipnja 2020.

NATA (2018) General Accreditation Guidance – Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. NATA – National Association of Testing Authorities, <<https://www.nata.com.au/accreditation-information/accreditation-criteria-and-guidance/nata-accreditation-criteria-nac-packages/research-and-development>>. Pristupljeno 04. svibnja, 2020.

Papich, M.G. (2016) Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large Animal, 4. izd., Elsevier, SAD, str. 153,154.

Pravilnik o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i u proizvodima životinjskog podrijetla (2008) *Narodne novine* **79**, Zagreb.

Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2005) *Narodne novine* **2**, Zagreb.

PubChem (2020) Open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH), <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Pristupljeno 25. kolovoza, 2020.

Robert, C., Gillard, N., Brasseur, P.-Y., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., Delahaut, Ph. (2013) Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods

of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A* **30(3)**, 443-457. doi: 10.1080/19440049.2012.751632

Rocca, L.M., Gentili, A., Pérez-Fernández, V., Tomai, P. (2017) Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Addit. Contam. A* **34(5)**, 1-39. doi:10.1080/19440049.2017.1298846

Toldrá, F. i Reig, M. (2006) Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal food. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 482-489. doi: 10.1016/j.tifs.2006.02.002

Trevisani., M., Fedrizzi, G., Diegoli., G. (2019) Chemical hazards in meat and associated monitoring activities. U: Food safety assurance and veterinary public health, volume 7 – Chemical hazards in food of animal origin (Smulders., F.J.M., Rietjens, I.M.C.M., Rose, M.D., ured.), Wageningen Academic Publishers, Nizozemska, str. 315-340. doi: 10.3920/978-90-8686-877-3_13 c 2019

WHO (2019) Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Database, WHO – World Health Organisation, <<https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx>>. Pristupljeno 18. lipnja, 2020.

Zakon o veterinarstvu (2013) *Narodne novine* **82**, Zagreb.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Eda Zutić
