

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 614.3:543.645:615.28:637.1/.3:636.3(043.3)

Jan Antonić, univ. dipl. kem.

**RAZVOJ ANALIZNIH METOD ZA UGOTAVLJANJE
OSTANKOV ANTIPARAZITIKOV IN NESTEROIDNIH
PROTIVNETNIH UČINKOVIN ZA VREDNOTENJE
PREHODA V MLEKO OVC TER VPLIVA PREDELAVE NA
VSEBNOST V MLEČNIH IZDELKIH**

Doktorska disertacija

***DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS TO
DETERMINE ANTIPARASITIC AND NON-STEROIDAL ANTI-
INFLAMMATORY DRUG RESIDUES TO STUDY DRUG
TRANSPORT FROM BLOOD PLASMA INTO MILK AND TO
ASSESS THE INFLUENCE OF MILK PROCESSING ON
CONCENTRATION LEVELS IN MILK PRODUCTS***

Dissertation thesis

Ljubljana, 2010

Jan Antoni , univ. dipl. kem.

**RAZVOJ ANALIZNIH METOD ZA UGOTAVLJANJE OSTANKOV
ANTIPARAZITIKOV IN NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH
UČINKOVIN ZA VREDNOTENJE PREHODA V MLEKO OVC TER
VPLIVA PREDELAVE NA VSEBNOST V MLEČNIH IZDELKIH**

Delo je bilo opravljeno

na Inštitutu za higieno živil in bromatologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnica prof. dr. Ksenija  inigoj Gačnik,

na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani,
predstojnik prof. dr. Albin Kristl,

na Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
v.d. predstojnika Andrej  kibin, dr. vet. med.,

na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnica prof. dr. Irena Rogelj,

na Kliniki za prežvekovalce in ambulatorno kliniko Veterinarske fakultete Univerze v
Ljubljani,
predstojnica prof. dr. Martina Klinkon Ogrinec in

na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnik znan. sod. dr. Brane Krt.

Javni zagovor je bil opravljen dne: _____

Mentorica: vi . znan. sod. dr. Vesna Cer venik Flajs
Somentor: doc. dr. Iztok Grabnar

Komisija za oceno in zagovor:

predsednica: vi . znan. sod. dr. Nevenka Kožuh Eržen
 lan: prof. dr. Janez Marin ek
 lan: prof. dr. Bogdan Perko

KAZALO

1	UVOD	17
2	PODATKI IZ LITERATURE	21
2.1	Avermektini	21
2.1.1	Ivermektin	23
2.1.2	Doramektin.....	24
2.1.3	Eprinomektin	25
2.1.4	Farmakodinamika	26
2.1.4.1	Teorija »GABA«.....	26
2.1.4.2	Odkritje kanalov GluCl	27
2.1.4.3	Vloga P-glikoproteina	27
2.1.4.4	Vpliv verapamila na P-glikoprotein.....	28
2.1.5	Farmakokinetika	29
2.1.5.1	Vnos učinkovin	29
2.1.5.2	Absorpcija in porazdelitev.....	30
2.1.5.3	Predsystemski metabolizem	30
2.1.5.4	Izločanje	30
2.1.6	Vpliv toplotne obdelave in mlečnokislinske fermentacije na eprinomektin	31
2.1.7	Analizne metode ugotavljanja ostankov makrocikličnih laktonov.....	31
2.2	Nesteroidne protivnetne učinkovine	33
2.2.1	Fizikalno-kemijske lastnosti.....	34
2.2.1.1	Diklofenak	35
2.2.1.2	Fenilbutazon	35
2.2.1.3	Fluniksin.....	36
2.2.1.4	5-hidroksi fluniksin	36
2.2.1.5	Karprofen.....	37
2.2.1.6	Ketoprofen.....	37
2.2.1.7	Meloksikam	38
2.2.1.8	Oksifenbutazon	38
2.2.1.9	Tolfenamska kislina	39
2.2.2	Vnetni proces in nesteroidne protivnetne učinkovine.....	39
2.2.2.1	Ciklooksigenaza	39
2.2.2.2	Lipooksigenaza	41
2.2.2.3	Inhibicija sinteze eikozanoidov	41
2.2.3	Uporaba v medicinske namene.....	43
2.2.4	Ostanki nesteroidnih protivnetnih učinkovin v živilih živalskega izvora	45
2.2.5	Analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin	49
2.2.5.1	Ekstrakcija in čiščenje vzorcev	50
2.2.5.2	Derivatizacija	51
2.2.5.3	Kromatografska ločba	51
2.2.5.4	Detekcija.....	52
3	MATERIALI IN METODE.....	63
3.1	Poskusa na živalih	63
3.1.1	Poskus št. 1 – Vpliv verapamila na farmakokinetiko avermektinov pri ovcah in ugotavljanje vloge P-glikoproteina pri prehodu avermektinov iz krvne plazme v mleko	63
3.1.1.1	Živali	63

3.1.1.2	Struktura poskusa in razdelitev živali	64
3.1.1.3	Vnos zdravil.....	64
3.1.1.4	Odvzem vzorcev za analizo	65
3.1.2	Poskus št. 2 – Vsebnost eprinomektina v mleku in mlečnih izdelkih.....	65
3.1.2.1	Živali	65
3.1.2.2	Vnos eprinomektina	65
3.1.2.3	Odvzem vzorcev za predelavo v mlečne izdelke.....	65
3.2	Predelava mleka v mlečne izdelke	67
3.2.1	Tehnološki postopek izdelave tekočega jogurta	67
3.2.2	Tehnološki postopek izdelave poltrdega sira	67
3.2.3	Vzorčenje in hranjenje mlečnih izdelkov.....	69
3.3	Analizna metoda določanja ostankov avermektinov v krvni plazmi, mleku in mlečnih izdelkih	69
3.3.1	Osnovne faze analiznega postopka	69
3.3.2	Matriksi	71
3.3.3	Oprema	71
3.3.3.1	Laboratorijski pribor	71
3.3.3.2	Aparature	71
3.3.3.3	Sistem HPLC	72
3.3.4	Reagenti.....	72
3.3.4.1	Kemikalije	72
3.3.4.2	Raztopine	72
3.3.5	Standardi.....	73
3.3.5.1	Osnovne spojine (referenčni standardi) v obliki praška.....	73
3.3.5.2	Standardne raztopine	73
3.3.6	Postopek	73
3.3.6.1	Ekstrakcija	74
3.3.6.2	Čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE)	74
3.3.6.3	Koncentriranje pod dušikom in predkolonska derivatizacija	75
3.3.6.4	Kromatografska analiza.....	75
3.3.6.5	Vrednotenje rezultatov	77
3.3.7	Ovrednotenje (validacija) metode za določanje ostankov eprinomektina v mlečnih izdelkih	78
3.3.7.1	Selektivnost	78
3.3.7.2	Specifičnost	78
3.3.7.3	Linearnost	79
3.3.7.4	Izkoristek	79
3.3.7.5	Obnovljivost	79
3.3.7.6	Meja vrednotenja (LOQ)	80
3.3.7.7	Stabilnost	80
3.4	Določanje vsebnosti maščobe in suhe snovi v mleku in mlečnih izdelkih	80
3.5	Farmakokinetična analiza	80
3.6	Analizna metoda določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku	81
3.6.1	Osnovne faze analiznega postopka	81
3.6.2	Matriksi	81
3.6.3	Oprema	81
3.6.3.1	Laboratorijski pribor	81
3.6.3.2	Aparature	83
3.6.3.3	Sistem LC-MS/MS.....	83
3.6.4	Reagenti.....	83
3.6.4.1	Kemikalije	83

3.6.4.2	Raztopine.....	83
3.6.5	Standardi	84
3.6.5.1	Osnovne spojine (referenčni standardi) v obliki praška.....	84
3.6.5.2	Standardne raztopine.....	84
3.6.6	Razvoj in optimizacija analizne metode	85
3.6.6.1	Izbira analitov	85
3.6.6.2	Čiščenje, priprava vzorcev in ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	85
3.6.6.3	Izbira stacionarne faze za kromatografsko analizo	86
3.6.6.4	Razvoj kromatografske metode	87
3.6.6.5	Nastavitev in optimizacija parametrov za ionizacijo v sistemu LC-MS/MS	87
3.6.6.6	»Tuning« masnega analizatorja in pogoji snemanja masnih spektrov.....	87
3.6.7	Postopek	88
3.6.7.1	Hidroliza.....	88
3.6.7.2	Priprava vzorcev na ekstrakcijo na trdni fazi	88
3.6.7.3	Čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi	88
3.6.7.4	Kromatografska analiza.....	89
3.6.7.5	Tandemska masnospektrometrična detekcija (MS/MS)	89
3.6.7.6	Potek meritev	90
3.6.7.7	Vrednotenje rezultatov	91
3.6.8	Ovrednotenje (validacija) metode za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku.....	92
3.6.8.1	Selektivnost	93
3.6.8.2	Specifičnost	93
3.6.8.3	Linearnost	93
3.6.8.4	Izkoristek	94
3.6.8.5	Ponovljivost	95
3.6.8.6	Obnovljivost	95
3.6.8.7	Meja odločitve ($CC\alpha$).....	95
3.6.8.8	Sposobnost določitve ($CC\beta$).....	96
3.6.8.9	Meja vrednotenja (LOQ)	96
3.6.8.10	Stabilnost	96
3.6.8.11	Robustnost	96
3.6.8.12	Enačbe	97
4	REZULTATI.....	101
4.1	Vpliv verapamila na farmakokinetiko ivermektina in doramektina pri ovcah v laktaciji.....	101
4.1.1	Časovni potek izločanja ivermektina in doramektina iz krvne plazme v mleko..	101
4.1.2	Vpliv verapamila na potek izločanja ivermektina in doramektina iz krvne plazme v mleko	101
4.1.3	Farmakokinetična analiza.....	101
4.2	Ostanki eprinomektina v mleku in mlečnih izdelkih.....	115
4.2.1	Validacija metode ugotavljanja ostankov eprinomektina v mlečnih izdelkih	115
4.2.1.1	Selektivnost	115
4.2.1.2	Specifičnost	115
4.2.1.3	Linearnost	115
4.2.1.4	Izkoristek	115
4.2.1.5	Obnovljivost	115
4.2.1.6	Meja vrednotenja (LOQ)	115

4.2.1.7	Stabilnost	116
4.2.1.8	Povzetek	116
4.2.2	Časovni potek koncentracij ostankov eprinomektina v mleku in mlečnih izdelkih	138
4.3	Analizna metoda določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku	141
4.3.1	Validacija metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi.....	141
4.3.1.1	Selektivnost	141
4.3.1.2	Specifičnost	141
4.3.1.3	Linearnost	141
4.3.1.4	Izkoristek	141
4.3.1.5	Ponovljivost	141
4.3.1.6	Obnovljivost	141
4.3.1.7	Meja vrednotenja (LOQ)	142
4.3.1.8	Meja odločitve ($CC\alpha$).....	142
4.3.1.9	Sposobnost določitve ($CC\beta$).....	142
4.3.1.10	Stabilnost	142
4.3.1.11	Robustnost	142
4.3.1.12	Povzetek.....	142
5	RAZPRAVA	195
5.1	Vpliv verapamila na farmakokinetiko avermektinov pri ovcah in vloga P-gp pri prehodu avermektinov iz krvne plazme v mleko	195
5.2	Validacija analizne metode določanja eprinomektina v mlečnih izdelkih	198
5.3	Ostanki eprinomektina v mleku in mlečnih izdelkih.....	200
5.4	Razvoj analizne metode za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin.....	202
5.4.1	Čiščenje, priprava vzorcev in ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	202
5.4.2	Kromatografska analiza in masnospektrometrična (MS/MS) detekcija	205
5.5	Validacija analizne metode za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin	207
6	SKLEPNE UGOTOVITVE	213
7	POVZETEK	215
8	SUMMARY	217
9	ZAHVALA	219
10	LITERATURA	221

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

5-HETE	5-hidroksieikozatetranojska kislina
5-HPETE	5-hidroperoksieikozatetranojska kislina
5-OH-fluniksin	5-hidroksi fluniksin
ABC	ATP vezavna kaseta (ang. ATP Binding Cassette)
AcOH	etanojska kislina, očetna kislina
ADAPT	(ang. Alzheimer's Disease Anti-Inflammatory Prevention Trial)
Al ₂ O ₃	aluminijev (III) oksid, alumina
AOAC	(ang. Association of Official Analytical Communities/Chemists)
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (ang. atmospheric pressure chemical ionization)
API	ionizacija pri atmosferskem tlaku (ang. atmospheric pressure ionization)
ARRS	Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije
ASK	acetilsalicilna kislina, Aspirin
ATP	adenozin trifosfat (ang. adenosine triphosphate)
AUC	ploščina pod koncentracijsko krivuljo (ang. area under the curve)
AUCM	ploščina pod krivuljo prvega momenta
C ₁₈	oktadecil
C ₈	oktil
CC α	meja odločitve
CC β	spodobnost določitve
CI/F	navidezni očistek
C _{max}	najvišja ugotovljena (dosežena) koncentracija
COX	ciklooksigenaza (ang. cyclooxygenase)
CPF	karprofen (ang. carprofen)
CRL	Centralni referenčni laboratorij Evropske Unije
CYP3A4	citokrom P(450) 3A4 (ang. cytochrome P(450) 3A4)
D	odmerek (ang. dose)
DAD	detektor z nizom diod (ang. diode array detector)
DCL	diklofenak (ang. diclofenac)
DOR	doramektin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	encimsko imunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
EMA	Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency)
EPR	eprinomektin
ES	Evropska Skupnost
ESI	ionizacija v elektrospreju (ang. electrospray ionization)
EU	Evropska Unija
FAO	Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (ang. Food and Agriculture Organization)
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (ang. Food and Drug Administration)
FLD	fluorescenčni detektor, fluorescenčna detekcija
FLU	fluniksin
FLU-OH	5-hidroksi fluniksin
GABA	gama amino butirična kislina (ang. gamma-aminobutyric acid)
GC	plinski kromatograf, plinska kromatografija (ang. gas chromatography)
GluCl	klorov ionski kanalček, ki se aktivira z vezavo glutamata
GlyRs	ionski kanalček, ki se aktivira z vezavo liganda

H ₂ B _{1a}	ivermektin B _{1a}
H ₂ B _{1b}	ivermektin B _{1b}
H ₂ O	voda
HCl	klorovodikova kislina
HCOOH	mravljična kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high performance liquid chromatography)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. International Organization for Standardization)
IUPAC	Mednarodno združenje za čisto in uporabno kemijo (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry)
IVM	ivermektin
KPF	ketoprofen
KV	koeficient variacije, relativen standardni odmik
λ _z	naklon terminalnega dela koncentracijske krivulje
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masnospektrometrično detekcijo (ang. liquid chromatography coupled with mass spectrometry)
LIF	z laserjem inducirana fluorescenca (ang. laser induced fluorescence)
LOD	meja zaznavnosti (ang. limit of detection)
LOQ	meja vrednotenja (ang. limit of quantification)
m/z	razmerje med maso in nabojem
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MLX	meloksikam (ang. meloxicam)
MAA	4-metilaminoantipirin
MRL	mejna vrednost ostankov (ang. maximum residue limit)
MRM	spremljanje masnih prehodov (ang. multiple reaction monitoring)
MRT	srednji čas zadrževanja (ang. mean residence time)
MS	masni spektrometer, masnospektrometrični detektor
MS ⁿ	sklopljeni masnospektrometrični detektorji (n navaja število sklopljenih elementov)
MSPD	disperzija trdne faze v matriksu (ang. matrix solid phase dispersion)
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid
n.p.	ni podatka
N ₂	dušik
nAChRs	ionski kanalček, ki se aktivira z vezavo acetilholina ali nikotina
NaCl	natrijev klorid
NMR	nuklearna magnetna resonanca
NRL	Nacionalni referenčni laboratorij
NSAIDs	nesteroidne protivnetne učinkovine (ang. non-steroidal anti-inflammatory drugs)
OBZ	oksifenbutazon, oksifenilbutazon
p.m.z.	pod mejo zaznavnosti
PBZ	fenilbutazon (ang. phenylbutazon)
PFBBr	pentafluorobenzil bromid
PGD ₂	prostaglandin D ₂
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGF _{2a}	prostaglandin F _{2a}
PGG ₂	prostaglandin G ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂

PGI ₂	prostaglandin I ₂
P-gp	P-glikoprotein
PTFE	politetrafluoroetilen, Teflon®
Q-TOF	kvadropolni (ang. quadropol) masni spektrometer, sklopljen z masnim spektrometrom na čas leta (ang. time-of-flight)
r	korelacijski koeficient
rec	izkoristek (ang. recovery)
rel. vl.	relativna vlažnost
RF	radiofrekvenčen
s	standardi odmik
SIM	spremljanje posameznih ionov (ang. selective/single ion monitoring)
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (ang. solid phase extraction)
t	Studentov parameter
t _{1/2}	biološka razpolovna doba
t. m.	telesna masa
TEA	trietilamin
TFA	tolfenamska kislina (ang. tolfenamic acid)
TFAA	anhidrid trifluoroacetne kisline (ang. trifluoroacetic anhydride)
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. thin layer chromatography)
T _{max}	čas po vnosu učinkovine, pri katerem je bila ugotovljena vrednost C _{max}
TxA ₂	tromboksan A ₂ (tromboxane A ₂)
UV	ultravijoličen
V _z /F	navidezni volumen distribucije
VER	verapamil
VIS	vidni (ang. visible)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)
ZDA	Združene države Amerike

RAZVOJ ANALIZNIH METOD ZA UGOTAVLJANJE OSTANKOV ANTIPARAZITIKOV IN NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN ZA VREDNOTENJE PREHODA V MLEKO OVC TER VPLIVA PREDELAVE NA VSEBNOST V MLEČNIH IZDELKIH

IZVLEČEK

Ključne besede: antiparazitna sredstva; ivermektin – analogi in derivati; verapamil – farmakologija; P-glikoprotein; farmakokinetika; protivnetni agensi, nesteroidni; ostanki zdravil – analize; hrana, analize – metode; mleko – kemija; mlečni izdelki – kemija; kri, kemična analiza; kromatografija visokotlačna, tekočinska – metode; spektroskopija, fluorescenčna; masna spektrometrija; študije veljavnosti; ovce

Razvili smo sodobne analizne metode za določanje ostankov nekaterih veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora in raziskali vlogo transportnih proteinov pri izločanju učinkovin iz krvne plazme v mleko, vpliv inhibitorjev transportnih proteinov na farmakokinetiko izločanja in obstojnost veterinarskih zdravil med termično in fermentacijsko predelavo mleka v mlečne izdelke.

V prvem poskusu smo dvema skupinama po šest ovc slovenske avtohtone mlečne pasme istrska pramenka podkožno vnesli ivermektin (IVM) oziroma doramektin (DOR) v odmerku 0,2 mg/kg t. m., drugima dvema skupinama, prav tako po šest živali, pa smo sočasno vnesli IVM oziroma DOR in verapamil (VER) v odmerku 3 mg/kg t. m. Vnos VER smo ponovili še dvakrat v obdobju 24 ur po prvem vnosu. Vzorčili smo krvno plazmo in mleko ter določili vsebnost IVM oziroma DOR in izračunali pripadajoče farmakokinetične parametre. Vrednosti C_{max} v krvni plazmi po vnosu IVM oziroma DOR sta bili 12,7 in 21,0 µg/L, ob sočasnem vnosu VER pa sta se vrednosti C_{max} povišali na 37,8 in 47,0 µg/L. Vrednost T_{max} se je s 3,3 in 1,8 dneva po vnosu IVM oziroma DOR znižala na 1,9 in 1,7 dneva po sočasnem vnosu antiparazitika in VER. Vrednosti AUC so se povišale s 76 in 85 µg dan/L za vnos IVM oziroma DOR na 201 in 254 µg dan/L za sočasni vnos avermektinov in VER. V nasprotju s pričakovanji smo ob sočasnem vnosu IVM oziroma DOR in VER ugotovili nižje vrednosti Cl/F (135 in 116 L/dan za vnos IVM oziroma DOR ter 61 in 46 L/dan za sočasen vnos IVM oziroma DOR in VER). Razmerja AUC med krvno plazmo in mlekom se med skupinami ovc niso statistično značilno razlikovala.

V drugem poskusu smo 30 ovcam pasme istrska pramenka vnesli eprinomektin (EPR) s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m. in vzorčili skupne dnevne vzorce mleka, ki smo ga pozneje predelali v mlečne izdelke. Obstoječo analizno metodo za določanje EPR v mleku smo prilagodili za analizo mlečnih izdelkov, jo ovrednotili za raziskovalne potrebe in jo uporabili za določanje vsebnosti EPR. V vseh vzorcih smo določili še vsebnost maščobe in suhe snovi. Ostanke EPR smo zaznali v vseh matriksih, razen v sekundarni sirotki. Najvišje koncentracije EPR smo izmerili v matriksih z najvišjo vsebnostjo maščobe in suhe snovi pri zorenih sirih (30 in 60 dni), kjer je bila najvišja izmerjena koncentracija 15 µg/kg pri svežem siru in albuminski skuti. Vsebnosti EPR v matriksih z višjim deležem vode, kot so jogurt iz surovega in termično obdelanega mleka ter primarna in sekundarna sirotka, so bile nižje. Koncentracije EPR so bile v vseh vzorcih pod mejno vrednostjo, ki jo predpisuje zakonodaja EU za mleko.

V zadnjem sklopu smo razvili analizno metodo za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku. Metodo, ki je bila sposobna sočasno določiti vsebnost diklofenaka, fenilbutazona, fluniksina, 5-hidroksi fluniksina, karprofena, ketoprofena, meloksikama, oksifenbutazona in tolfenamske kisline smo ovrednotili glede na zahteve analizne zakonodaje EU. Meja vrednotenja je bila med 1 in 50 µg/kg, kar je bilo najnižje v primerjavi z multimetodami, objavljenimi v dostopni literaturi. Linearnost meritev smo ovrednotili na koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/kg in izračunali vrednosti r^2 nad 0,997 za mleko oziroma nad 0,999 za krvno plazmo. Povprečni izkoristki so bili med 76 in 102 %, povprečni KV ponovljivosti med 9 in 15 %, povprečni KV znotrajlaboratorijske obnovljivosti pa med 9 in 18 %. Ovrednotenje robustnosti analizne metode je pokazalo, da je treba skrbno nadzorovati temperaturo in čas inkubacije vzorcev mleka ter pri analizi krvne plazme različnih živalskih vrst uporabiti interne standarde. Analizno metodo smo uspešno uvedli v Nacionalni referenčni laboratorij za ostanke veterinarskih zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora, kjer se od leta 2005 uporablja kot presejalna in potrditvena metoda za izvajanje državnega veterinarskosanitarnega nadzora živil in je bila v letu 2009 za mleko tudi akreditirana v skladu s standardom ISO 17025.

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS TO DETERMINE ANTIPARASITIC AND NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG RESIDUES TO STUDY DRUG TRANSPORT FROM BLOOD PLASMA INTO MILK AND TO ASSESS THE INFLUENCE OF MILK PROCESSING ON CONCENTRATION LEVELS IN MILK PRODUCTS

ABSTRACT

Keywords: antiparasitic agents; ivermectin – analogs and derivatives; verapamil – pharmacology; P-glycoprotein; pharmacokinetics; anti-inflammatory agents, non-steroidal; drug residues – analysis; food analysis – methods; milk – chemistry; dairy products – chemistry; blood, chemical analysis; chromatography, high pressure liquid – methods; spectrometry, fluorescence; mass spectrometry; validation studies as topics; sheep

We developed analytical methods to determine certain veterinary drug residues in food of animal origin, and investigated the involvement of transport proteins in excretion of drugs from blood plasma into milk. We also studied the impact of inhibitors of transport proteins on pharmacokinetic parameters and stability of veterinary drugs during thermal and fermentation processes during milk-product manufacture.

In the first experiment, we subcutaneously administered ivermectin (IVM) or doramectin (DOR) at a dose of 0.2 mg/kg b.w. to two groups of six ewes of autochthonous Slovenian dairy breed. Two other groups, also of six animals each, were subcutaneously co-administered verapamil (VER) at a dose of 3 mg/kg b.w. with IVM or DOR. VER administration was repeated twice in a 24-hour period following initial administration. Samples of blood plasma and milk were taken and analyzed for the presence of IVM and DOR, and corresponding pharmacokinetic parameters were calculated. In blood plasma $C_{\max}$ was 12.7 and 21.0 $\mu\text{g/L}$ following IVM and DOR administration respectively. Co-administration increased $C_{\max}$ values to 37.8 and 47.0 $\mu\text{g/L}$ for IVM and DOR respectively, while $T_{\max}$ values decreased from 3.3 for IVM to 1.9 days for IVM co-administered with VER. $T_{\max}$ value following DOR administration was 1.8 days and decreased to 1.7 days following VER co-administration with DOR. AUC increased from 76 $\mu\text{g day/L}$ for administration of IVM alone to 85 $\mu\text{g day/L}$ for co-administration with VER, and from 201 $\mu\text{g day/L}$ for administration of DOR alone to 254 $\mu\text{g day/L}$ for co-administration with VER. Contrary to our predictions, Cl/F values decreased with VER co-administration (from 135 to 61 L/day for IVM and from 116 to 46 L/day for DOR). The ratio between AUC in blood plasma and milk did not change significantly during the experiment.

In the second experiment we topically administered 30 sheep with eprinomectin (EPR) at a dose of 1 mg/kg b.w. We sampled collective daily milk samples and processed them into milk products. We modified the available analytical method for determination of EPR in milk in order to use it for milk product samples, and validated it for research purposes. We used the validated method to determine EPR concentration levels in milk products, along with measurements of fat and solid content. We detected EPR residues in all matrices except for whey without albumins and globulins. Highest concentrations of EPR (15 $\mu\text{g/kg}$) were measured in matrices with high fat and solid content, such as ripened cheese (30 and 60 days), curd and albumin cheese. Matrices with higher water content, such as yogurt from raw and pasteurized milk, whey and whey without albumins and globulins, had lower EPR concentrations. EPR levels in all samples were below the maximum residue limits for bovine milk established by EU legislation.

The third experiment was aimed at developing an analytical method to determine non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in blood plasma and milk. The method was able to determine concentrations of nine compounds – carprofen, diclofenac, flunixin, 5-hydroxy flunixin, ketoprofen, meloxicam, oxyphenbutazone, phenylbutazone and tolfenamic acid – and was validated in line with EU legislation regarding analytical methods. The limit of quantification was between 1 and 50 $\mu\text{g/kg}$ per substance, which was the lowest of all multi-methods we found in the literature available. Linearity of measurements in the concentration range from 1000 to 0.1 $\mu\text{g/kg}$ resulted in r^2 values above 0.997 for milk and above 0.999 for blood plasma. Mean recovery was between 76 and 102%, average CVs were between 9 and 15% for repeatability and between 9 and 18% for within-laboratory reproducibility. Ruggedness validation showed that special care should be taken to monitor time and temperature of hydrolysis of milk samples, and that use of an internal standard is necessary when analyzing blood plasma samples from different animal species, especially horses and rabbits. The method developed was successfully implemented in the National Reference Laboratory for veterinary drug residues and contaminants in food of animal origin as a screening and confirmatory method, and has been used since 2005 to analyze more than 600 samples of milk and more than 100 samples of blood plasma, required by official state residue monitoring of food of animal origin in Slovenia. Moreover, in 2009 it was accredited for milk according to the standard ISO 17025.

1 UVOD

V sodobni živinoreji se za zdravljenje, profilakso in večji prirast pogosto uporabljajo zdravila, ki lahko ob neupoštevanju navodil za uporabo oziroma ilegalni uporabi ostajajo v proizvedenih živilih (Cerkvenik in sod., 2004; Kolar, 2004). Ker veliko zdravilnih učinkovin, karcinogenov in onesnažil okolja prehaja v mleko živali in predstavlja potencialno tveganje za sesne živali in za ljudi, je proizvodnja higiensko neoporečnega mleka oziroma mlečnih izdelkov zelo pomembna.

Izločanje v mleko je kompleksen proces, odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti zdravila in interakcij na membranah, kar vse skupaj ustvarja reverzibilno ravnotežno porazdelitev zdravila med krvno plazmo in mlekom ter posledični izločitveni profil med tema dvema farmakokinetičnima prostoroma (Shoop in sod., 1996). Uporabi dovoljenih veterinarskih zdravil pri mlečnih živalih v obdobju laktacije se zaradi blaginje živali ne moremo izogniti, vendar morajo biti upoštevane karence, ko mleko zaradi preseženih najvišjih dopustnih vsebnosti ostankov teh zdravil (MRL) ni primerno za prehrano ljudi, vsebnosti ostankov pa se zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti v proizvedenih mlečnih izdelkih, kot sta sir in skuta, lahko še izdatno povečajo (Cerkvenik in sod., 2004; Imperiale in sod., 2006). Poznavanje časovnega profila izločanja učinkovin v mleku in mlečnih izdelkih je pomembno za potrošnike in proizvajalce, ker bi se ob morebitni uporabi med laktacijo zavrglo le mleko s toksično koncentracijo ostankov. Uporaba antiparazitikov s skupnim imenom makrociklični laktoni je pri rejnih mlečnih živalih večinoma prepovedana z razlogom, ker še ni bilo opravljenih zadosti študij njihovega sicer dolgotrajnega izločanja. Izjemi sta le eprinomektin in moksidektin. Če bi se opravile farmakokinetične študije, bi bil to prispevek k poznejši morebitni določitvi karenc, ki so zdaj za meso, maščobno tkivo in organe že predpisane z zakonodajo EU (ES, 2009).

Dolgo je veljalo mnenje, da se snovi izločajo v mleko s pasivno difuzijo (McManaman in Neville, 2003). To je neselektiven proces, pri katerem snovi prehajajo skozi membrano glede na koncentracijski gradient. V zadnjem obdobju pa so ugotovili, da so pri prehajanju snovi v mleko udeleženi tudi nekateri transportni proteini iz družine ABC (ATP-binding cassette) transporterjev, zlasti ABCB1 (P-glikoprotein; P-gp) in ABCG2 (Ballent in sod., 2007; Lespine in sod., 2007; McManaman in Neville, 2003). Najpomembnejši med njimi je prav P-gp. Njegova funkcija je aktiven transport učinkovin skozi celično membrano, kar omogoča uravnavanje porazdelitve in biološke uporabnosti zdravil v organizmu, odstranjuje toksične metabolite in ksenobiotike iz celic v urin, žolč in lumen prebavnega trakta, hkrati pa varuje centralni živčni sistem z izločanjem spojin iz cerebrospinalne tekočine nazaj v kri čez hematoencefalno bariero (Ling, 1997). Ekspresija v tumorjih pa kaže, da ima P-gp pomembno vlogo tudi pri nespecifični rezistenci proti zdravljenju s citostatiki (Chan in sod., 2004).

Transporterji ABC so prisotni tudi v epiteliju mlečnih žlez, kjer njihova vloga še ni pojasnjena (Alcorn in sod., 2002). Zaščitna vloga pri razstrupljanju, ki jo imajo drugje v telesu, je tu nerazumljiva. Možna razlaga za ekspresijo transporterjev ABC v mlečnih žlezah je, da so udeleženi pri transportu različnih hranil v mleko, kar kompenzira tveganje izločanja ksenobiotikov.

Na hitrost in obseg izločanja farmakološko aktivnih učinkovin z aktivnim transportom lahko vplivamo s spreminjanjem aktivnosti transportnih proteinov. Verapamil je zaviralec kalcijevih kanalčkov, ki se uporablja za zdravljenje hipertenzije, angine pectoris, srčne aritmije in v zadnjem obdobju tudi za blaženje glavobolov pri migrenah (Beck in sod., 2005). Poleg zdravljenja navedenih bolezni se verapamil uporablja tudi v celični biologiji kot inhibitor

celičnih črpalk za izločanje učinkovin, med katere spada tudi P-gp (Lespine in sod., 2007; Ling, 1997). Pri peroralnem vnosu učinkovin P-gp aktivno izloča substance, ki so se absorbirale v epitelijske celice prebavnega trakta, nazaj v lumen, s sočasnim vnosom verapamila pa bistveno znižamo transportno aktivnost P-gp. S tem upočasnimo izločanje snovi iz celic in posledično povišamo biološko uporabnost zdravil. Raziskave so pokazale, da sočasni peroralni vnos inhibitorjev P-gp in antiparazitikov bistveno poviša obseg absorpcije slednjih iz prebavnega trakta v krvno plazmo (Ballent in sod., 2007; Molento in sod., 2004).

Ker je koncentracija P-gp v prebavnem traktu precej večja kot v drugih tkivih (Molento in sod., 2004), nam sočasni peroralni vnos učinkovin z verapamilom ne da dovolj podrobne slike za preiskovanje vpliva P-gp pri izločanju učinkovin iz krvi. S sočasnim vnosom verapamila pri parenteralnem vnosu bi namreč »izolirali« le vpliv inhibitorja na transportne proteine v tkivih, kjer se učinkovine izločajo iz krvi, na njihovo absorpcijo pa inhibitor ne bi vplival. Tako bi lahko raziskali vlogo P-gp pri procesu izločanja učinkovin iz krvi v mleko. Dobljeni podatki bi se uporabljali za odkrivanje načinov podaljšanja zadrževanja učinkovin v krvni plazmi, posledično učinkovitejše zdravljenje in morebitne nižje vsebnosti izločenih učinkovin v mleku.

Postavili smo si naslednje cilje:

- Vpliv transporterjev ABC na farmakokinetiko antiparazitikov:
S primerjavo časovnih potekov koncentracije antiparazitikov v krvni plazmi in mleku po vnosu samih antiparazitikov in sočasnem vnosu antiparazitikov in inhibitorjev transporterjev ABC (verapamil je inhibitor ABCB1) opredeliti vpliv transporterjev ABC na farmakokinetiko antiparazitikov in njihov prehod v mleko. Slednje bi pomenilo pomemben prispevek k poznavanju farmakokinetike avermektinov in tudi k zdravljenju parazitov ter higiene in nadzora živil živalskega izvora, saj je zdaj uporaba makrocikličnih laktonov, razen eprinomektina in moksidektina, prepovedana pri mlečnih živalih, katerih mleko je namenjeno prehrani ljudi.
- Profili izločanja antiparazitikov v mleko ter njihova obstojnost med predelavo v mlečne izdelke:
Na osnovi koncentracijskih časovnih potekov antiparazitikov ovrednotiti izločitveni čas v mleku in mlečnih izdelkih oziroma obstojnost ostankov v proizvedenih mlečnih izdelkih, kar bi bil pomemben podatek z zdravstvenega in ekonomskega vidika ter vidika zagotavljanja varnosti, kakovosti in konkurenčnosti živil živalskega izvora.
- Analizni pristopi – uvedba najsodobnejših instrumentalnih tehnik:
Za uspešno izvedbo poskusov in za veterinarskosanitarni nadzor živil živalskega izvora je pogoj razpoložljiva analizna metoda določanja ostankov veterinarskih zdravil. Pri makrocikličnih laktonih je bil cilj uporabiti že obstoječo analizno metodo določanja ostankov preiskovanih substanc v mleku s HPLC in fluorescenčno detekcijo. Metodo bi prilagodili za analizo mlečnih izdelkov in jo ustrezno ovrednotili. Pri analizi nesteroidnih protivnetnih učinkovin smo si postavili cilj razviti metodo za določanje njihovih ostankov z uporabo tekočinske kromatografije z masnospektrometrično detekcijo (LC-MS/MS). Metodo bi uvedli v Nacionalni referenčni laboratorij za ostanke veterinarskih zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora v skladu s sodobnimi analiznimi pristopi, ki veljajo v rezidualni analitiki v EU (ES, 2009) in tako omogočili izvajanje tovrstne analitike v Sloveniji.

Uvedba novih analiznih postopkov bi razširila nadzor nad mlekom in mlečnimi izdelki v naši državi, kar bi bil prispevek k zagotavljanju varstva potrošnikov.

Doktorska disertacija je nadaljevanje raziskovalnega dela dr. Vesne Cerkvenik Flajs, ki je v okviru področja Higiena in nadzor živil živalskega izvora skupaj s sodelavci več kot desetletje raziskovala analitiko in farmakokinetiko avermektinov pri ovcah slovenske avtohtone mlečne pasme istrska pramenka.

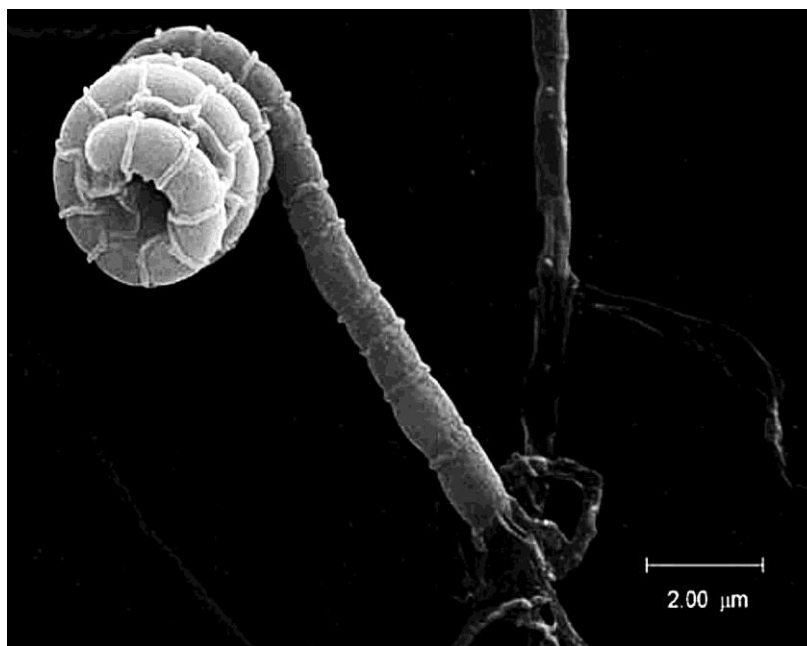
Jan Antonić je bil izbran za Mladega raziskovalca na razpisu za finančna sredstva za opravljanje podiplomskega študija in raziskav v okviru programa Znanost mladini, ki ga vodi Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS). Prikazani rezultati so bili izvedeni v okviru raziskovalnega programa P4-0092 z naslovom »Zdravje živali, okolje in varna hrana«, ki ga financira ARRS.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 AVERMEKTINI

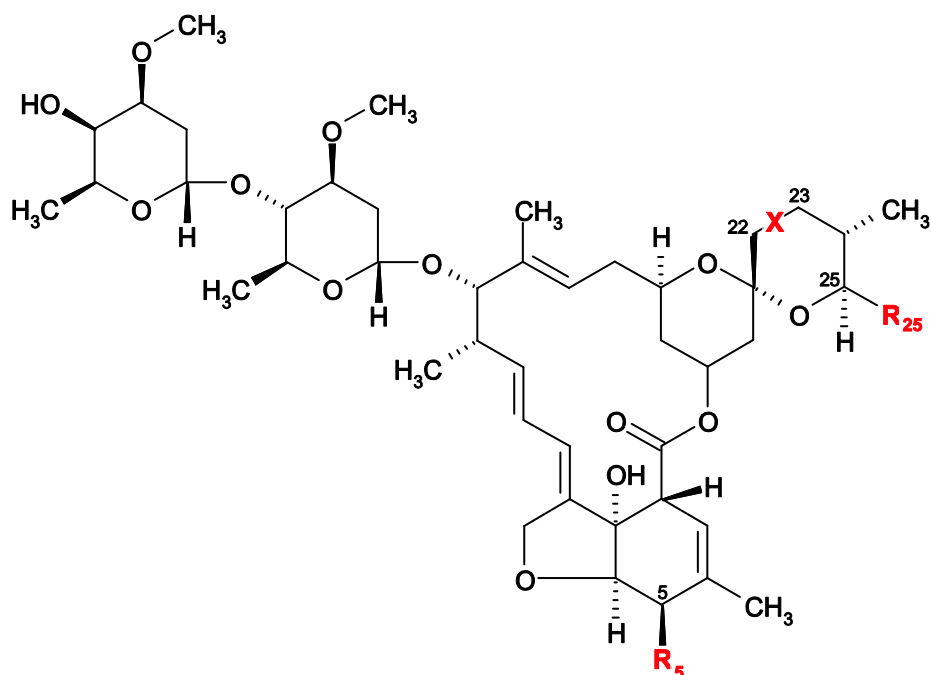
Makrolidni endektocidi so derivati fermentacijskih produktov zemeljskih mikroorganizmov *Streptomyces*. V zelo majhnih koncentracijah (<1 mg/kg) učinkovito delujejo proti notranjim in zunanjim zajedavcem pri ljudeh in živalih. Makrolidne endektocide delimo na avermektine in milbecine, oboji pa so 16-členski makrociklični laktoni, z vezanima heksahidrobenzofuransko in spiroketalno skupino (Shoop in sod., 1995). Razlika med njimi je odsotnost disaharidne skupine na mestu C₁₃ pri milbecinih. Avermektine lahko tako obravnavamo kot milbecine z dodano disaharidno skupino.

Avermektine so odkrili znanstveniki laboratorijev Merck Sharp & Dohme leta 1976 (Egerton in sod., 1979). Kulturo so izolirali iz zemlje, analiza pa je pokazala, da je fermentacijska gošča učinkovito delovala proti okužbi miši z nematodom *Nematospiroides dubius* v izjemno majhnih količinah. Takrat neznano aktivnost so poimenovali C-076, kulturo (slika 1) pa zaradi antihelmintičnega delovanja mikroorganizma *Streptomyces avermitilis* z oznako MA-4680 (Burg in sod., 1979).



Slika 1: Slika mikroorganizma *Streptomyces avermitilis* posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Povzeto po Lin in sod. (2009)

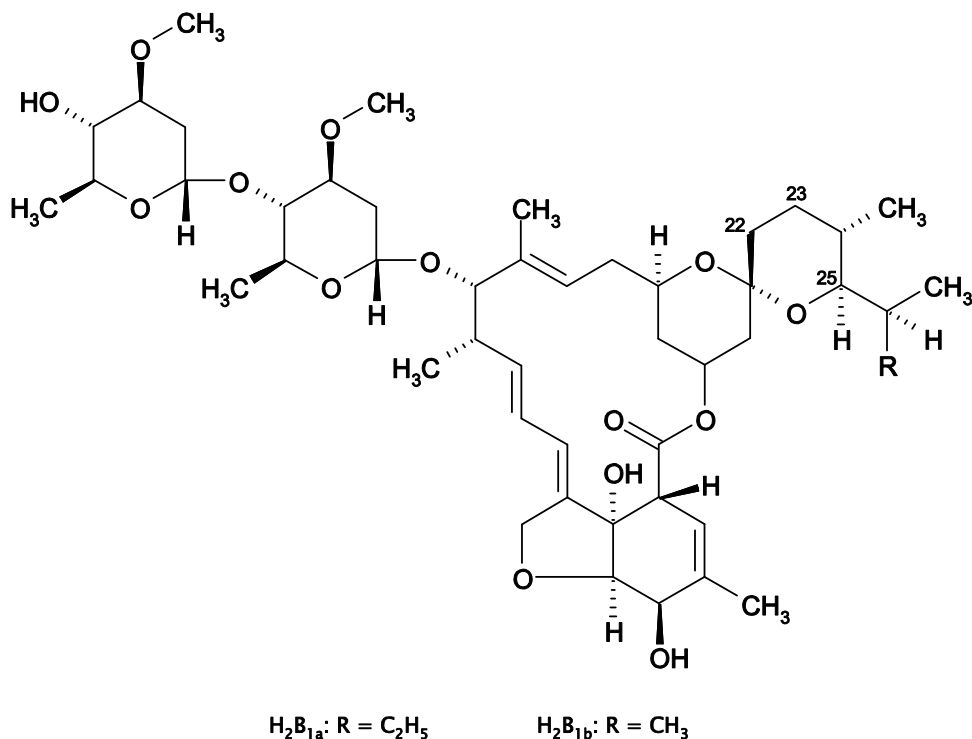
Prvotno skupino avermektinov sestavlja osem spojin. Posamezne komponente avermektinov so bile med seboj ločene in izolirane s kompleksnim postopkom ekstrakcij ki jim je sledila adsorpcijska kolonska kromatografija (Miller in sod., 1979). Vseh osem komponent (slika 2) so pozneje tudi strukturno ovrednotili z masno spektrometrijo in ¹³C NMR–spektroskopijo (Albers-Schönberg in sod., 1981).

A: $R_5 = OCH_3$ B: $R_5 = OH$ 1: $X = -CH=CH-$ 2: $X = -CH_2-CH(OH)-$ a: $R_{25} = CH(CH_3)CH_2CH_2$ b: $R_{25} = CH(CH_3)_2$

Slika 2: Kemijske strukture prvotnih osmih predstavnikov avermektinov

Strukturno gledano obstajata dve seriji A in B, ki se naprej delita na skupini 1 in 2, ti pa na dva homologa a in b. Spojine A imajo na petem ogljikovem atomu vezano metoksi skupino, spojine B pa imajo na tem mestu hidroksilno skupino. Spojine s številko 1 imajo dvojno vez med 22. in 23. ogljikovim atomom, spojine 2 pa imajo na tem mestu enojno vez in hidroksilno skupino na 23. ogljikovem atomu. Na mestu C_{25} imajo spojine a vezan sekundarni butil, spojine b pa izopropil (slika 2). Najpomembnejši avermektin je avermektin B_1 (generično abamektin), ki se uporablja predvsem v agrikulturi kot insekticid in akaricid (Tomlin, 2006), pa tudi v veterinarski medicini (Meeus in sod., 1997).

2.1.1 IVERMEKTIN



Slika 3: Kemijska struktura ivermektina

Splošno: Ivermektin ali 22,23-dihidroavermektin B₁ (slika 3) je semisintetična spojina, nastala iz abamektina z nasičenjem vezi med atomoma C₂₂ in C₂₃. Sestavljen je iz dveh homologov in sicer ivermektina B_{1a} (H₂B_{1a}) in B_{1b} (H₂B_{1b}). Ivermektin B_{1a} predstavlja vsaj 80 %, ivermektin B_{1b} pa manj kot 20 % spojine.

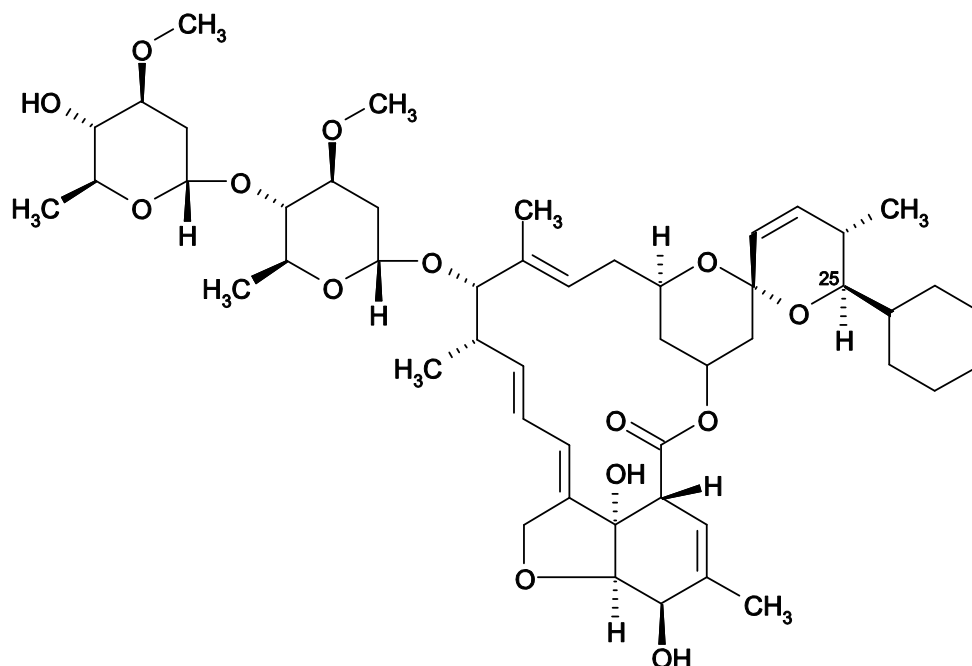
Kemijsko ime: Ivermektin B_{1a}: 5-O-demetil-22,33-dihidroavermektin A_{1a}
 Ivermektin B_{1b}: 5-O-demetil-25-de(1-metil-propil)-22,33-dihidro-25-(1-metiletil) avermektin A_{1a}

Kemijska formula: H₂B_{1a} – C₄₈H₇₄O₁₄
 H₂B_{1b} – C₄₇H₇₂O₁₄

Molska masa: H₂B_{1a} – 875,098 g/mol
 H₂B_{1b} – 861,071 g/mol

Oblika: bel prah

2.1.2 DORAMEKTIN



Slika 4: *Kemijska struktura doramektina*

Splošno: Doramektin je semisintetična spojina, nastala iz abamektina z zamenjavo skupine na atomu C₂₅ s cikloheksilno skupino (slika 4). Zaradi te strukturne značilnosti ima doramektin eno samo strukturo (brez homologov).

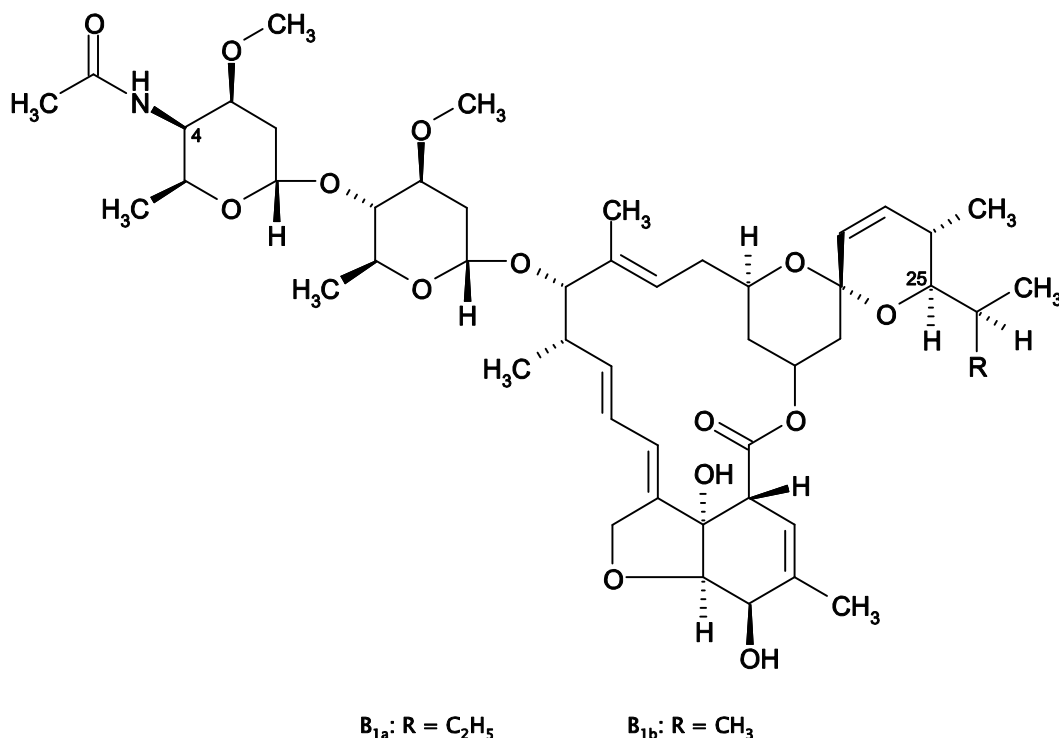
Kemijsko ime: Doramektin: 5-O-demetil-25-de(1-metil-propil)-25-cikloheksil
 avermektin A_{1a}

Kemijska formula: C₅₀H₇₄O₁₄

Molska masa: 899,119 g/mol

Oblika: bel prah

2.1.3 EPRINOMEKTIN



Slika 5: Kemijska struktura eprinomektina

Splošno: Eprinomektin (slika 5) je semisintetična spojina, nastala iz abamektina z zamenjavo hidroksilne skupine na atomu C₄ z acetaminsko skupino. Sestavljen je iz dveh homologov in sicer eprinomektina B_{1a} in B_{1b}. Eprinomektin B_{1a} predstavlja vsaj 90 %, eprinomektin B_{1b} pa manj kot 10 % spojine.

Kemijsko ime: Eprinomektin B_{1a}: (4''R)-4''-acetilamino-5-O-demetil-4''-deoksiavermektin A_{1a}
 Eprinomektin B_{1b}: (4''R)-4''-acetilamino-5-O-demetil-25-de(1-metil-propil)-4''-deoksi-25-(1-metiletil) avermektin A_{1a}

Kemijska formula: EPR B_{1a} – C₅₀H₇₅NO₁₄
 EPR B_{1b} – C₄₉H₇₃NO₁₄

Molska masa: EPR B_{1a} – 914,134 g/mol
 EPR B_{1b} – 900,107 g/mol

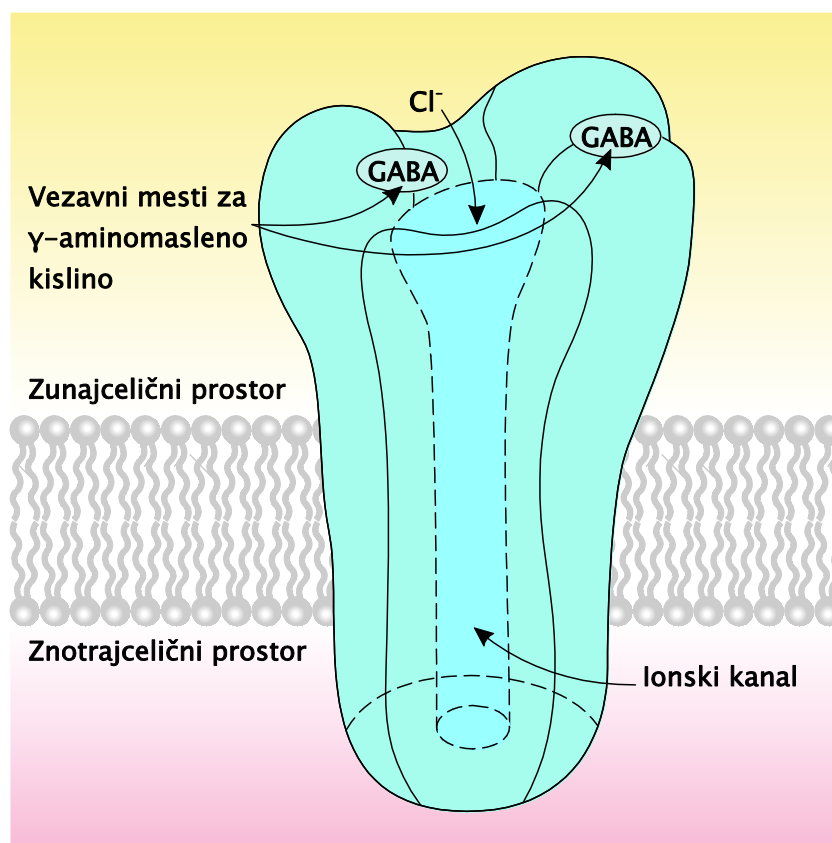
Oblika: bel prah

2.1.4 FARMAKODINAMIKA

2.1.4.1 TEORIJA »GABA«

Avermektini so zelo učinkovite protiparazitne učinkovine, vendar jih je treba dostaviti na specifično tarčno mesto v ciljnem organizmu v pravilni koncentraciji (Kolar, 2004). Na parazite učinkujejo tako, da pri njih povzročijo paralizo. Paraziti nato preprosto odpadejo z živali (zunANJI paraziti) ali pa se izločijo skozi prebavni trakt (notranji paraziti). Kljub zelo širokemu spektru delovanja avermektinov (Goudie in sod., 1993) pa le-ti niso učinkoviti proti metljajem in trakuljam, prav tako pa v terapevtskih odmerkih niso toksični za sesalce (Martin in sod., 2002).

Prve raziskave o farmakodinamiki avermektinov pri parazitech so pokazale, da se po vnosu ivermektina in posledičnem nastopu paralize poveča membranska prepustnost za kloridne ione (Cleland, 1996), hkrati pa se izrazi močan antagonističen učinek pikrotoksina (Martin in sod., 2002). Te ugotovitve so pripeljale do domnev, da ivermektin deluje kot agonist γ -amino maslene kisline (GABA). Ta teorija je lahko pojasnila dve dejstvi: neučinkovitost ivermektina proti metljajem in trakuljam (ki nimajo receptorjev za GABA) in netoksičnost ivermektina za sesalce; avermektini ne prehajajo skozi hematoencefalno bariero in zato ne dosežejo receptorjev za GABA v centralnem živčnem sistemu.



Slika 6: Shematičen prikaz receptora za γ -amino masleno kislino (GABA)

Pozneje so se pojavila nova spoznanja, ki so ovrgla teorijo »GABA«. Ob preučevanju vpliva ivermektina na mišice kobilice, ki niso bile občutljive za GABA, so znanstveniki ugotovili, da ivermektin kljub temu povečuje prepustnost membrane za kloridne ione (Scott in Duce, 1987). Pri glistah (*Ascaris*) se po vnosu ivermektina zapiralna mesta niso odprla, ampak celo bolj zaprla (Martin in Pennington, 1989). Poleg tega je postalo znano, da imajo sesalci

periferne receptorje GABA (slika 6) v prebavnem traktu in avtonomnih ganglijah, na katere pa ivermektin ni deloval. Tako teorija »GABA« znanstvenih dokazov ni vzdržala.

2.1.4.2 ODKRITJE KANALOV GLUCL

Po padcu teorije »GABA« je veljalo prepričanje, da avermektini delujejo na skupino kloridnih kanalov, ki jih zapirajo in odpirajo določeni ligandi in ki jih najdemo samo pri nevretenčarjih. Teh kanalov pa ne nadzira GABA, temveč glutamat, zato jih poznamo kot kanale GluCl (Kolar, 2004). Močna lipofilnost avermektinov je oteževala preučevanje mehanizma delovanja, saj so bile vsebnosti avermektinov ob receptorjih tako nizke, da jih ni bilo mogoče izmeriti. Po seriji poskusov na prostoživečem parazitu *Caenorhabditis elegans* (Arena in sod., 1995; Schaeffer in sod., 1990; Schaeffer in Haines, 1989) se je izkazalo, da je ta organizem zelo občutljiv za ivermektin. Druga dobra lastnost parazita *C. elegans* je ta, da se ga lahko goji v velikih količinah v fermentacijskih tankih, kjer nastane zadostna količina RNA za ekstrakcijo in ekspresijo (Martin in sod., 2002). Dokazali so, da injiciranje RNA v oocyte parazita *Xenopus* povzroči ekspresijo glutamatno aktiviranega toka Cl⁻, občutljivega za avermektine (Arena in sod., 1991; Arena in sod., 1992).

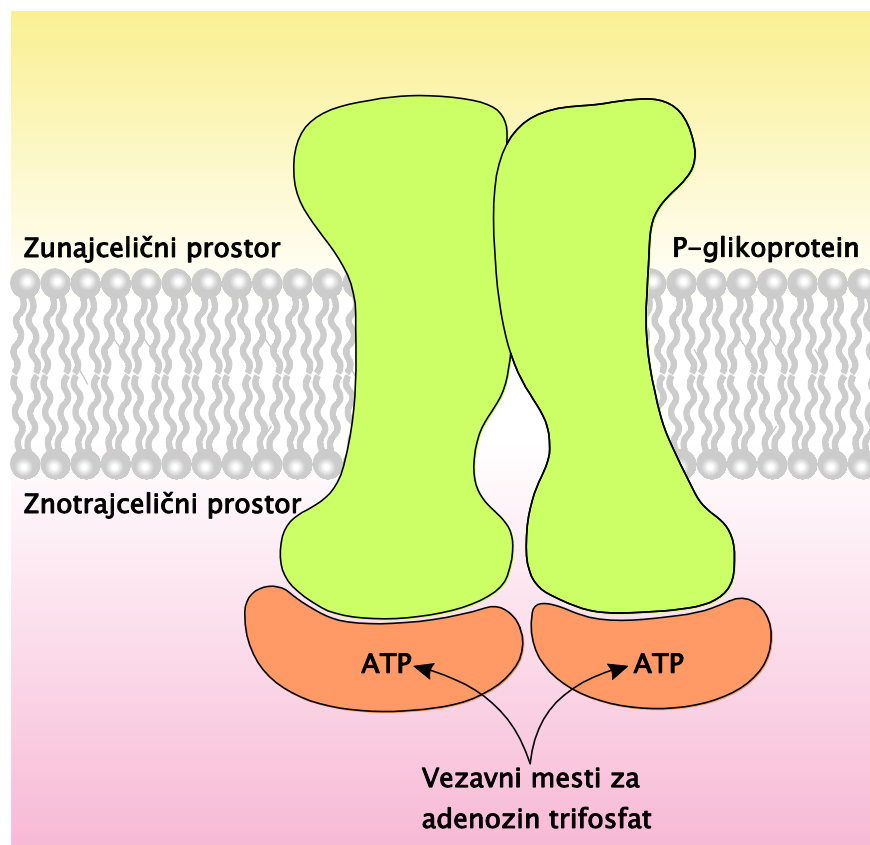
Pri parazitu *C. elegans* so odkrili dve podenoti kanala GluCl, GluCl α 1 na kromosomu V in GluCl β na kromosomu I. Izkazalo se je, da je podenota α občutljiva za ivermektin, podenota β pa za glutamat. Vsaka od podenot je sestavljena iz približno 500 aminokislin s cisteinom na terminalnem delu–N. Prisotnost cisteina na koncu–N kaže na to, da so kanali GluCl člani velike družine cisteinskih kanalov, od katerih jih del najdemo tudi pri vretenčarjih (kanali GlyRs). To napeljuje na razmišljanje, da so kanali nevretenčarjev GluCl ortološki s kanali GlyRs pri vretenčarjih (Martin in sod., 2002).

Za delovanje kanalov GluCl je predvidevana združitev petih podenot, podobno kot pri receptorju nAChRs. GluCl α 1 in GluCl β lahko tvorita homooligomerne (sestavljene iz enakih enot) in heteromerne (sestavljene iz različnih enot) ionske kanale.

2.1.4.3 VLOGA P-GLIKOPROTEINA

P-glikoprotein (slika 7) je transmembranski protein, ki spada v družino transporterjev ABC (ang. ATP Binding Cassette). Ker je v apikalni membrani v jetrih, hematoencefalni barieri, placenti in črevesnem traktu (Thiebaut in sod., 1987), sklepamo, da je njegova vloga pri prehodu ksenobiotikov in toksinov v kri in žolč zaščitna oziroma izločevalna (Chan in sod., 2004). P-glikoprotein transportira veliko kemijsko različnih spojin, a je do vsake od njih zelo specifičen. Strukturne značilnosti, ki jih mora imeti spojina, da je substrat za P-glikoprotein, še niso znane (Chan in sod., 2004), razen splošnega pravila, da mora spojina imeti hidrofoben značaj s primanjkljajem elektronov (Ito in Alcorn, 2003) in avermektini temu ustrezajo (Lespine in sod., 2007).

Shoop in sod. (1996) so odkrili, da ima nasičenost vezi med atomoma C₂₂ in C₂₃ pomembno vlogo pri interakciji avermektinov s P-glikoproteinom. Avtorji navajajo, da so spojine, ki imajo vez C₂₂-C₂₃ nasičeno, boljši substrati kot spojine, ki imajo to vez nenasičeno. Druga strukturna značilnost, ki določa, ali je spojina dober substrat za P-glikoprotein, je prisotnost sladkorne skupine v molekuli. Spojine, ki vsebujejo sladkorno skupino, izkazujejo višjo afiniteto do P-glikoproteina kot spojine, ki te skupine nimajo (Lespine in sod., 2007).

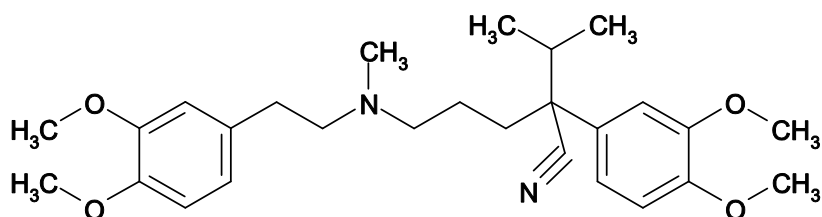


Slika 7: Shematičen prikaz transportnega proteina P-glikoprotein

Vloga P-glikoproteina pri prenosu snovi iz krvne plazme v mleko ni znana. Ugotovljeno je, da je gen za P-glikoprotein izražen v mlečnih žlezah sesalcev in da se v laktaciji sinteza P-glikoproteina v mlečni žlezi zmanjša (Alcorn in sod., 2002). Poskusi so pokazali, da je vsebnost P-glikoproteina v humanih mlečnih žlezah tako nizka, da z obstoječimi metodami ni mogoče izmeriti direktnega vpliva P-glikoproteina na transport ksenobiotikov in krvne plazme v mleko (Ito in Alcorn, 2003).

2.1.4.4 VPLIV VERAPAMILA NA P-GLIKOPROTEIN

Verapamil (slika 8) zapira kalcijeve kanalčke in se uporablja v humani medicini za zdravljenje hipertenzije, angine pectoris, srčne aritmije, v zadnjem času pa tudi za lajšanje hudih oblik migrene (Beck in sod., 2005). V celični biologiji se uporablja kot inhibitor transportnih proteinov (Bellamy, 1996), zato je mogoče sklepati, da verapamil inhibira tudi P-glikoprotein.



Slika 8: Kemijska struktura verapamila

Poskusi na miših z izbitim genom (ang. knockout mice) za P-glikoprotein so pokazali, da verapamil vpliva na prenos digoksina, ki velja za dober substrat za P-glikoprotein (Chan in

sod., 2004). Učinek sočasnega vnosa ivermektina in verapamila so preučevali Mollento in sod. (2004) in pokazali, da je bila koncentracija ivermektina v krvni plazmi pri sočasnem peroralnem vnosu verapamila višja. Razlaga za nižje vrednosti ivermektina je inhibicija P-glikoproteina v prebavnem traktu, kar posledično pomeni manj izločanja ivermektina nazaj iz krvne plazme v prebavni trakt. V isti študiji so preizkušali tudi vpliv verapamila na farmakokinetične lastnosti moksidektina, vendar niso ugotovili merljivih odstopanj. Podatkov o vplivu verapamila pri drugih načinih vnosa v dostopni literaturi nismo našli.

Med merjenjem termodinamičnih parametrov vezave verapamila na P-glikoprotein je Meier s sod. (2006) pokazal, da pri nizkih koncentracijah verapamil ne deluje kot inhibitor, ampak zavzame obratno vlogo in še dodatno aktivira P-glikoprotein. Farmakokinetičnih podatkov, ki bi to tezo potrdili na nivoju celotnega organizma, nismo našli v dostopni literaturi.

2.1.5 FARMAKOKINETIKA

Farmakokinetične lastnosti avermektinov so odvisne od več dejavnikov, med drugimi od načina vnosa, farmacevtske oblike, doze, fiziološkega stanja živali, starosti itd. Opravljene so bile številne študije farmakokinetike makrocikličnih laktonov v krvni plazmi oziroma centralnem farmakokinetičnem prostoru pri različnih živalskih vrstah, med drugimi pri govedu (Lanusse in sod., 1997; Wilkinson in sod., 1985), prašičih (Scott in McKellar, 1992), ovcah (Cerkvenik-Flajs in sod., 2007; Cerkvenik-Flajs in sod., 2005; Cerkvenik in sod., 2002), konjih (Marriner in sod., 1987; Perez in sod., 1999), kozah (Alvinerie in sod., 1993; Scott in sod., 1990), kamelah (Oukessou in sod., 1996; Oukessou in sod., 1999) in divjadi (Mackintosh in sod., 1985). Razlogi za preučevanje učinkovin v centralnem prostoru so relativno lahek dostop do vzorcev, homogenost krvne plazme in dejstvo, da se pri mnogih učinkovinah farmakokinetika v centralnem prostoru zelo dobro ujema z obnašanjem učinkovin v drugih delih organizma (Hennessy in Alvinerie, 2002).

Zaradi kompleksnih interakcij med farmakokinetičnimi prostori to ne drži vedno in Lifschitz s sod. (2000) je pokazal, da je koncentracija avermektinov v tkivih, v katerih so paraziti (sluznica in vsebina tankega črevesja in siriščnika, žolč, iztrebki, pljuča in koža), lahko celo višja kot v krvni plazmi.

Avermektini slovijo tudi po izjemni variabilnosti farmakokinetičnih parametrov glede na eksperimentalne pogoje, kot so količina (Ali in Hennessy, 1996) in sestava krme (Taylor in sod., 1992) pri drugače povsem enako oskrbovanih ovcah. Pri primerjavi farmakokinetičnih podatkov med različnimi živalskimi vrstami moramo zato biti previdni, saj brez standardizirane metodologije poskusov take primerjave niso zanesljive (Hennessy in Alvinerie, 2002).

2.1.5.1 VNOS UČINKOVIN

Po definiciji velja, da je biološka uporabnost po intravenskem vnosu učinkovin popolna (100 %). Nepopolna absorpcija in predsystemskega metabolizem sta le dva od dejavnikov, ki biološko uporabnost znižajo pri drugih načinih vnosa. Pri vnosu s polivom po koži so bile živali do 2,5-krat manj izpostavljene učinkovini kot pri podkožnem vnosu (Baoliang in sod., 2006; Lespine in sod., 2003). Izpostavljenost avermektinom po peroralnem vnosu je bila nižja kot po podkožnem vnosu, a kljub temu višja kot po vnosu s polivom po koži (Alvinerie in sod., 1993).

2.1.5.2 ABSORPCIJA IN PORAZDELITEV

Po vnosu učinkovine se začne farmakokinetična faza absorpcije in porazdelitve. Na hitrost in obseg absorpcije med drugim vplivajo tudi porazdelitveni koeficient učinkovine, struktura in velikost molekul učinkovine, pomožne snovi v farmacevtski obliki, fizikalno-kemijski pogoji na mestu vnosa in zdravstveno stanje organizma (Ansel in sod., 1999). Avermektini se v glavnem vežejo na plazemske lipoproteine, prek katerih se porazdelijo v maščobna tkiva (Chiu in sod., 1986). Bassissi s sod. (2004) je s poskusom *in vitro* pokazal, da se kar 96–99 % avermektinov veže na plazemske lipoproteine, izjema je le eprinomektin, saj se ga kar 11 % veže na beljakovinsko frakcijo krvne plazme.

2.1.5.3 PREDSYSTEMSKI METABOLIZEM

Predsistemski metabolizem pri prežvekovalcih najaktivneje poteka v predželodcu (Ladage in sod., 1989). Pri vnosu ivermektina neposredno v vamp ovc je AUC (ploščina pod koncentracijsko krivuljo; ang. Area Under Curve) dosegla manj kot tretjino vrednosti, ki je bila dosežena z neposrednim vnosom v siriščnik. Razlika med neposrednim vnosom v siriščnik in intravenskim vnosom je bila le 5 % (Prichard in sod., 1985). Tudi parazitarno vnetje lahko vpliva na pogoje na sluznici in na obseg predsistemskega metabolizma in absorpcije učinkovin (Lanusse in Prichard, 1993).

2.1.5.4 IZLOČANJE

Večina ksenobiotikov se izloča z iztrebki in urinom, manj pogosto pa izločanje poteka prek kože, sline in mleka. Mlečne žleze večine sesalcev imajo razvite mehanizme za sintezo, shranjevanje in izločanje maščob. Sinteza mlečnih maščob poteka v endoplazemskem retikulumu epitelijskih celic mlečnih žlez (McManaman in Neville, 2003). Sintetizirane maščobne molekule se združujejo v strukture, obdane s proteini (Huston in Patton, 1990). Te strukture, imenovane maščobna telesa (ang. lipid bodies), prehajajo apikalno membrano mlečnih žlez (Mather in Keenan, 1998), njihova naloga pa je predvsem preprečevanje nastanka večjih maščobnih skupkov, ki bi lahko ovirali izločanje mleka med laktacijo, hkrati pa zagotavlja vir energije, fosfolipidov in proteinov za sesne mladiče. Ker so maščobna telesa lipofilna, se v njih lahko vgradijo tudi lipofilni ksenobiotiki, ki prehajajo iz krvne plazme v mleko (Patton in Keenan, 1975).

Avermektini se zaradi lipofilnega značaja večinoma izločajo v mleko. Delež učinkovine, izločene v mleko, je med drugim odvisen od razlike vrednosti pH med krvno plazmo in mlekom, ionizacije učinkovine, lipofilnosti, vezave na plazemske proteine in velikosti molekul učinkovine (Hodošček, 2008). Nevezane in neionizirane lipofilne učinkovine prehajajo v mlečne žleze in se izločajo v mleko (Imperiale in sod., 2003).

Eprinomektin je bil razvit zato, da bi bila vsebnost ostankov v mleku med zdravljenjem živali čim nižja (Shoop in sod., 1996). Zaradi spremenjene kemijske strukture glede na ostale avermektine je razmerje med koncentracijo eprinomektina v krvni plazmi in mleku vedno manjše od 1,0 (Alvinerie in sod., 1999; Bengone-Ndong in sod., 2006; Dupuy in sod., 2001; Shoop in sod., 1996). Posledica spremenjene strukture eprinomektina je tudi večja dovzetnost za metabolne procese (Alvinerie in sod., 1999). Le 0,1 % odmerka pri govedu (Alvinerie in sod., 1999), 0,06 % pri ovcah (Imperiale in sod., 2006) in 0,3 % pri kozah (Dupuy in sod., 2001) se je izločilo v mleko, zato je eprinomektin edini avermektin, ki je dovoljen za uporabo pri živalih v laktaciji z nično karenco za mleko (Hodošček, 2008).

2.1.6 VPLIV TOPLOTNE OBDELAVE IN MLEČNOKISLINSKE FERMENTACIJE NA EPRINOMEKTIN

Končni cilj vrednotenja vsebnosti ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora predstavljajo ocene količin učinkovin, ki so jim potrošniki vsakodnevno izpostavljeni. Mnoga živila živalskega izvora, med njimi tudi mleko, meso in jajca, se pred zaužitjem običajno toplotno in fermentacijsko predelajo. Predelava izpostavi ostanke veterinarskih zdravil spremembam temperature, vrednosti pH in mikroorganizmom. Poleg navedenih dejavnikov lahko na vsebnost ostankov vpliva tudi način hranjenja živil, ki je ponavadi pri 4 °C (hladilnik) oziroma –20 °C (zamrzovalnik).

Antonijan s sodelavci (1998) je poročal o stabilnosti eprinomektina vsaj 3,5 meseca v krvni plazmi pri –20 °C, Payne s sodelavci (1997) pa je ugotovil, da je bil eprinomektin stabilen 24 mesecev v mesu in organih pri temperaturi nižji od –10 °C oziroma po vsaj šest ciklov zamrzovanja/taljenja. Izjema je bila mišičnina, kjer so ugotovili rahlo znižanje vsebnosti eprinomektina po šestih ciklih zamrzovanja/taljenja, medtem ko po treh ciklih niso opazili značilnih razlik (Payne in sod., 1997). Obstočnost eprinomektina v zamrznjenih vzorcih mleka je bila vsaj 36 dni (de Montigny, 1994).

Eprinomektin se je izkazal za obstojno spojino tudi v mlečnih izdelkih (Anastasio in sod., 2005; Imperiale in sod., 2006; Rehbein in sod., 2001). Hodošček (2008) je ugotovila, da je velik delež eprinomektina v mleku v beljakovinski frakciji, medtem ko je pri drugih avermektinih ta delež nižji. Pri preučevanju časovnega poteka izločanja eprinomektina v mleko ovc se je pokazalo, da je vsebnost eprinomektina v začetnem obdobju (14 dni) višja v beljakovinski frakciji, razmerje koncentracij eprinomektina med beljakovinsko in maščobno frakcijo pa se ne spremeni tudi ko koncentracija eprinomektina v mleku pade (Hodošček, 2008).

Tudi v krvni plazmi se visok delež (11 %) eprinomektina veže na plazemske proteine, kar je v primerjavi z drugimi avermektini (1–4 %) veliko (Bassissi in sod., 2004). Tudi poskus na govedu s polivom eprinomektina po koži je pokazal isto sliko, saj je bila vsebnost eprinomektina v jetrih in ledvicah visoka, v maščobi pa nizka (World Health Organization, 1999). Iz podatkov, dostopnih v znanstveni literaturi, je mogoče sklepati, da ima eprinomektin zaradi svojih fizikalno–kemijskih lastnosti višjo afiniteto do beljakovinske frakcije v primerjavi z drugimi avermektini pri mleku in mlečnih izdelkih ter krvni plazmi in organih (Hodošček, 2008).

2.1.7 ANALIZNE METODE UGOTAVLJANJA OSTANKOV MAKROCIKLIČNIH LAKTONOV

Z razvojem znanosti se izboljšuje razumevanje mehanizmov obolenj, kar omogoča in hkrati pospešuje razvoj novih zdravil. Za zagotavljanje varnosti potrošnikov potrebujemo analize metode za ugotavljanje ostankov veterinarskih zdravil, ki jih lahko uporabimo tudi kot orodje za preučevanje farmakokinetičnih in farmakodinamskih lastnosti učinkovin. Vzporedno z razvojem novih zdravil se pojavljajo nove analize metode, »stare« pa se ne prestopajo nadgrajujejo in izpopolnjujejo.

Analizne metode za ugotavljanje ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora so sestavljene iz dveh stopenj, to sta priprava in čiščenje vzorcev ter meritve koncentracij preučevanih analitov. Za analizo ostankov avermektinov se najpogosteje uporablja ekstrakcija z organskim topilom, ekstrakt pa dodatno očistimo z ekstrakcijo tekoče-tekoče, ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) ali z imunoafinitetno kromatografijo (Danaher in sod., 2006). Med

stacionarnimi fazami, uporabljenimi za čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi, se največkrat pojavljajo obrnjeni (reverzni) nosilci C_{18} , C_8 , alumina (Al_2O_3), kombinacija alumine in C_8 in kombinacija aktivnega oglja in C_8 (Danaher in sod., 2006). Najvišje izkoristke dosegajo nosilci C_8 in C_{18} , zato se tudi najpogosteje uporabljajo (Danaher in sod., 2006). Pojavljata se tudi ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami (Brooks in Uden, 1995) in disperzija trdne faze v matriksu (ang. matrix solid phase dispersion - MSPD) (Alvinerie in sod., 1996; Iosifidou in sod., 1994). Nekatere metode uporabljajo za čiščenje vzorca samo ekstrakcijo na trdni fazi (Kennedy in sod., 1993; Payne in sod., 1997; Roudaut, 1998), večina metod pa še vedno temelji na kombinaciji več tehnik (Cerkvenik-Flajs in sod., 2007; Cerkvenik-Flajs in sod., 2005; Cerkvenik in sod., 2002; Danaher in sod., 2006; Prabhu in sod., 1991; Tway in sod., 1981).

Najpogostejša fizikalno-kemijska tehnika meritve ostankov avermektinov v očiščenih vzorcih živil živalskega izvora je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Uporabljeni stacionarni fazi sta večinoma C_8 in C_{18} , saj lahko iz njiju avermektine eluiramo z mešanico organskih topil in vode (~90 % organskih topil) brez dodanih pufrov. Organsko topilo je lahko acetonitril, metanol ali mešanica obeh (Danaher in sod., 2006). Schenck in Lagman (1999) sta kot mobilno fazo uporabila mešanico acetonitrila, tetrahidrofurana in vode, kar jima je omogočilo boljšo ločbo in skoraj dvakrat višje kromatografske vrhove. Podobno mobilno fazo za določanje vsebnosti ivermektina v krvni plazmi je s stacionarno fazo C_8 uporabil tudi de Montigny s sod. (1990). Pri manj zahtevnih aplikacijah lahko uporabimo tankoplastno kromatografijo (Floate in sod., 1997; Malaniková in sod., 1990; Taylor in sod., 1994) in imunokemijske metode (Crooks in sod., 1998; Mitsui in sod., 1996; Schmidt in sod., 1990).

Za detekcijo najpogosteje uporabljamo fluorescenčni in UV detektor, zadnje čase pa se vse več uporablja masnospektrometrično detekcijo. Vsaka vrsta detekcije ima svoje dobre in slabe lastnosti, zato so se izoblikovala področja, na katerih prevladuje določena vrsta detektorja (Danaher in sod., 2006). UV detektorji se največkrat uporabljajo za določanje avermektinov v krmi z dodanimi zdravili, saj je vsebnost koncentracijskega reda mg/kg (Doherty in sod., 1998; Farer in sod., 1999; Fox in Fink, 1985). Kadar je potrebna meja detekcije koncentracijskega reda $\mu\text{g/kg}$, prevladujeta fluorescenčna in masnospektrometrična (MS) detekcija (Danaher in sod., 2006).

Kljub doseženim nizkim mejam določitve pa imata fluorescenčna in masnospektrometrična vrsta detekcije specifične omejitve, ki nam v nekaterih primerih omejijo izbiro. Glavna prednost masnospektrometrične detekcije je visoka selektivnost, ki dopušča nepopolne kromatografske ločbe in s tem hitrejše analize več analitov hkrati. Slabe lastnosti sistemov MS so visoki stroški nakupa in obratovanja, potreba po modifikatorjih ionizacije v mobilni fazi in omejitve posameznih ionizacijskih tehnik (Danaher in sod., 2006).

Fluorescenčnim detektorjem pripisujemo nizke meje določitve, visoko specifičnost ter nizko ceno nakupa in obratovanja. Navedena visoka specifičnost se nanaša na dolgo valovno dolžino (~470 nm), s katero izbrani analiti fluorescirajo. Če več analitov oddaja svetlobo iste valovne dolžine, potrebujemo popolno kromatografsko ločbo za določitev njihove vsebnosti. Slabosti, povezani s fluorescenco, pa sta potreba po predkolonski derivatizaciji analitov in problematična stabilnost fluorescenčnih derivatov (Danaher in sod., 2006).

Uporabo fluorescenčne detekcije za meritve avermektinov je omogočila njihova derivatizacija, saj avermektini v prvotni obliki ne fluorescirajo. Prvi postopek derivatizacije je bil objavljen leta 1980, ko je Tolan s sod. (1980) uporabil anhidrid očetne kisline in piridin. Naslednje leto je postopek dopolnila Tway s sod. (1981), ko je namesto piridina uporabila *N*-

metilimidazol, v derivatizacijski mešanici pa je bil prisoten še dimetilformamid. Derivatizacija je trajala eno uro, reakcija pa je bila kvantitativna. Obe metodi sta proizvedli neželene stranske produkte, zato je bilo potrebno poderivatizacijsko čiščenje (Cerkvenik, 2000). Z zamenjavo anhidrida očetne kisline z anhidridom trifluorocetne kisline se je čas derivatizacije avermektinov skrajšal na 30 s pri 25 °C (de Montigny in sod., 1990). Povečala se je tudi čistost ekstrakta, tako da naknadno čiščenje ni bilo več potrebno. Derivati so bili relativno stabilni, saj je po 18 urah v temi razpadlo le do 15 % analitov (Cerkvenik, 2000; de Montigny in sod., 1990).

Kljub ustreznosti derivatizacije za večino avermektinov pa je bila stabilnost derivata eprinomektina omejena (Danaher in sod., 2000). Težavo so poskušali obiti z on-line predkolonsko derivatizacijo (Payne in sod., 1997; Sutra in sod., 1998). Ali s sod. (2000) je ugotovil, da je pri daljši inkubaciji pri temperaturi 65 °C derivat eprinomektina stabilnejši, naslednje leto pa je Danaher s sod. (2001b) v derivatizacijsko mešanico dodal očetno kislino in prilagodil derivatizacijske pogoje (volumen očetne kisline, temperatura in čas inkubacije). Nastali fluorescenčni derivat eprinomektina je bil obstojnejši, poleg tega pa je bil njegov zadrževalni čas na kromatografski koloni krajši, kromatografski vrh pa višji in izrazitejši (Danaher in sod., 2001b; Hodošček, 2008).

Analizne metode za ugotavljanje ostankov avermektinov v živilih živalskega izvora so že pregledno opisane (Cerkvenik, 2000; Danaher in sod., 2006; Hodošček, 2008), zato jih v tem delu nismo podrobneje obravnavali.

2.2 NESTEROIDNE PROTIVNETNE UČINKOVINE

Nesteroidne protivnetne učinkovine (ang. non-steroidal anti-inflammatory drugs – NSAIDs) so spojine, ki imajo analgetičen, antipiretičen in protivneten učinek, tj. blažijo bolečino, znižujejo povišano telesno temperaturo in blažijo vnetja. Ime »nesteroidne« se uporablja zato, da jih eksplicitno ločimo od steroidov, ki imajo (poleg preostalih učinkov) podoben protivnetni učinek.

Prvi dokazi o uporabi nesteroidnih protivnetnih učinkovin segajo v obdobje 3000 pr. n. š., ko so Sumerci (dinastija Ur) zapisali, da imajo izvlečki vrbe zdravilne lastnosti. Prvi jasen opis, da izvleček vrbe blaži bolečino, vročico in vnetja, se pojavi v Egiptu okrog leta 1543 pr. n. š., ko je nastal Papirus Ebers, znan tudi kot eno od dveh najstarejših medicinskih besedil, ki pa je najverjetneje le nadgradnja sumerskih zapisov dinastije Ur. V petem stoletju pred našim štetjem je Hipokrat podrobneje opisal prah pripravljen iz lubja in listov vrbe, ki blaži bolečino, vročico in vnetja. Zapisi o izvlečkih vrbe so se večkrat pojavili v antični Grčiji in rimskem imperiju, v prvem stoletju našega štetja pa je bil izvleček vrbe znan kot učinkovito zdravilo po celotnem rimskem in arabskem svetu (Jeffreys, 2005).

Popularizacija salicilatov se je začela leta 1763, ko so v The Royal Society of London for the Improvement of Natural Knowledge (London, Velika Britanija) prebrali pismo Edwarda Stonea, v katerem je opisal učinkovitost izvlečkov vrbe za blaženje simptomov malarije. Do takrat so uporabljali pripravek iz drevesa kininovec, ki raste predvsem v tropskih predelih Južne Amerike in vsebuje kinin. Geografska oddaljenost je pomenila izjemno visoke cene zdravila v primerjavi z izvlečkom vrbe, ki je bil dostopen na evrazijskem kontinentu in v severni Afriki (Jeffreys, 2005).

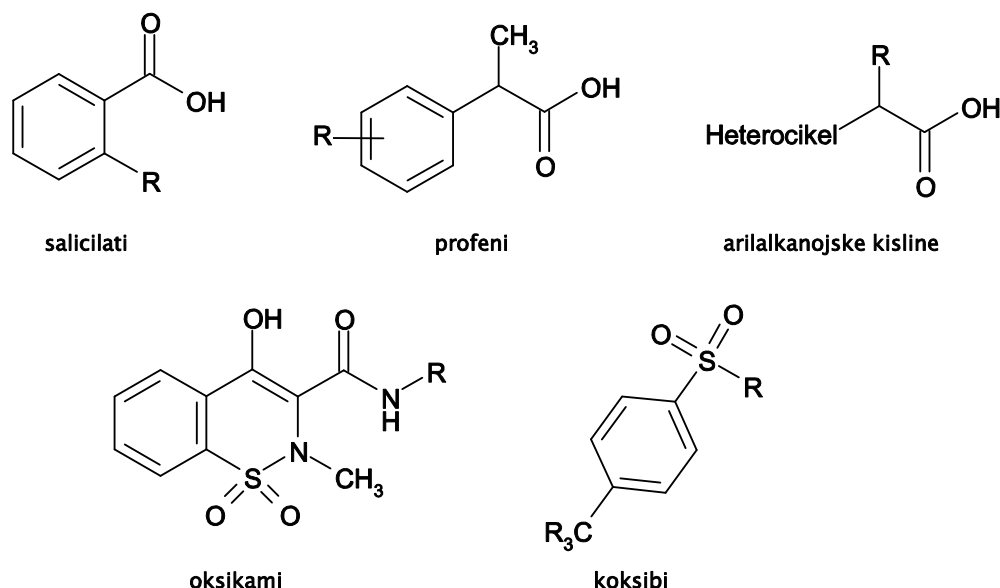
S specializacijo naravoslovnih znanosti v 19. stoletju se je začelo obdobje organske kemije, ko so znanstveniki poskušali izolirati, klasificirati in sintetizirati učinkovine iz naravnih

zdravil, med drugimi tudi iz lubja vrbe. Po neuspelem poskusu izolacije, ki sta ga leta 1826 izvedla Brugnatelli in Fontana, je leta 1828 Joseph Buchner izoliral relativno čiste kristale salicina. Z leti je metoda izolacije postala bolj selektivna z višjimi izkoristki in leta 1838 je italijanski kemik Raffaele Piria iz lubja vrbe izoliral kislno spojino, ki jo je poimenoval salicilna kislina (Jeffreys, 2005).

V 19. stoletju je majhno nemško podjetje, specializirano za barvila iz katranske smole, iskalo nove poslovne priložnosti na področju zdravil, ki bi jih lahko sintetizirali. Takrat neznano podjetje Bayer je sestavilo skupino znanstvenikov, katerih naloga je bila odkriti spojino, ki bo imela enake zdravilne lastnosti kot salicilna kislina, hkrati pa bo izkazovala manj neželenih stranskih učinkov. Leta 1897 so Arthur Eichengrün, Heinrich Dreser in Felix Hoffman prvi izvedli reakcijo, s katero so reagirali salicilno kislino z anhidridom očetne kisline in dobili acetilsalicilno kislino (ASK), pozneje poimenovano aspirin. Kljub uspešnim predkliničnim študijam se je razvoj zdravil, ki bi vsebovala aspirin, ustavil, predvsem zaradi neželenih stranskih učinkov pri zdravljenju s salicilno kislino in zaradi Bayerjevega novega paradnega konja med zdravili: diacetilmorfina oziroma heroina (Jeffreys, 2005).

V 20. stoletju so se poleg salicilatov pojavile druge spojine, ki so imele protivneten in protibolečinski učinek. Leta 1955 so McNeil Laboratories proizvedli tylenol (paracetamol), leta 1962 pa še brufen (ibuprofen) (Jeffreys, 2005). Ko je Sir John R. Vane odkril način delovanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin, za kar je prejel Nobelovo nagrado za medicino leta 1982, je odprl pot raziskavam o novih protivnetnih učinkovinah (Vane, 1971; 2003). Danes poznamo več kot 20 različnih nesteroidnih protivnetnih učinkovin, ki se uporabljajo za zdravljenje ljudi in živali (FDA, 2009).

2.2.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI



Slika 9: Delitev nesteroidnih protivnetnih učinkovin glede na njihovo kemijsko strukturo

Nesteroidne protivnetne učinkovine delimo v več skupin glede na njihovo kemijsko strukturo (slika 9):

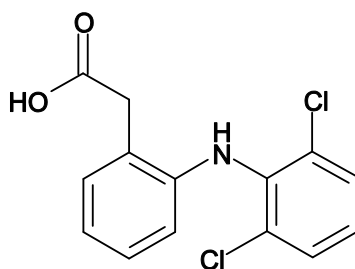
- salicilati (acetilsalicilna kislina, salicilna kislina itd.)
- arilalkanojske kisline (indometacin, diklofenak itd.)
- profeni – 2-arilpropanojske kisline (ibuprofen, ketoprofen itd.)

- enolne kisline - oksikami (piroksikam, meloksikam itd.)
- koksibi (celekoksib, rofekoksib itd.)

Spojine, ki spadajo v isto skupino, imajo podobne klinične lastnosti in tolerance. Do razlik v uporabi različnih nesteroidnih protivnetnih učinkovin prihaja predvsem zaradi različnih načinov odmerjanja, ki so pogojeni z biološko razpolovno dobo posamezne spojine in z načinom vnosa.

Večina nesteroidnih protivnetnih učinkovin je kislega značaja. Izjema je metamizol, ki je bazična spojina.

2.2.1.1 DIKLOFENAK



Slika 10: *Kemijska struktura diklofenaka*

Splošno: Diklofenak (slika 10) se najpogosteje uporablja za zdravljenje vnetij pri artritisu, poškodbah in za lajšanje menstrualnih bolečin. Poleg splošnega mehanizma delovanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin obstajajo dokazi, da diklofenak učinkuje tudi na druge mehanizme vnetja (Ku in sod., 1986).

Kemijsko ime: 2-((2,6-diklorofenil)amino)benzocetna kislina

Kemijska formula: $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$

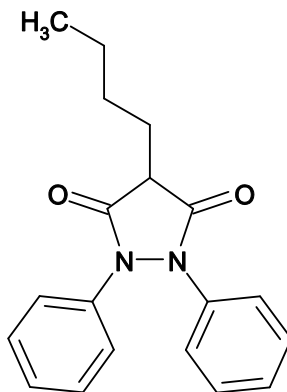
Molska masa: 296,148 g/mol

pK_a: 4,15

log K_{ow}: 4,51

Oblika: bel prah

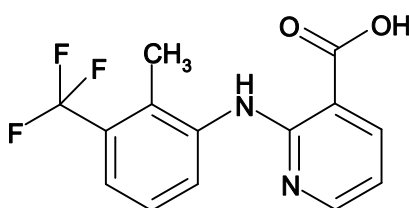
2.2.1.2 FENILBUTAZON



Slika 11: *Kemijska struktura fenilbutazona*

Splošno:	Fenilbutazon (slika 11) se uporablja za zdravljenje artritisa in drugih kroničnih bolečin. Neželeni učinki ob jemanju fenilbutazona so (poleg neželenih učinkov, skupnih vsem nesteroidnim protivnetnim učinkovinam) zaviranje nastajanja belih krvničk in aplastična anemija (McCarthy in Chalmers, 1964). Uporablja se predvsem za zdravljenje konj in psov (Lees, 2009).
Kemijsko ime:	1,2-difenil-3,5-diokso-4-butilpirazolidin
Kemijska formula:	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
Molska masa:	308,379 g/mol
pK _a :	4,5
log K _{ow} :	3,16
Oblika:	bel prah

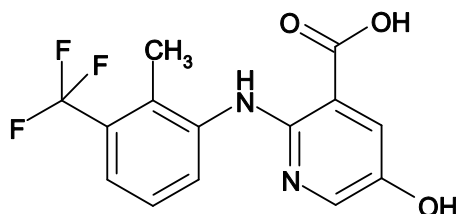
2.2.1.3 FLUNIKSIN



Slika 12: Kemijska struktura fluniksina

Splošno:	Flunixin (slika 12) se uporablja predvsem kot sol meglumina za zdravljenje vročice in blaženje bolečin pri konjih (EMEA, 2000a; 2001a).
Kemijsko ime:	2-((2-metil-3-(trifluorometil)fenil)amino)-3-piridinkarboksilna kislina
Kemijska formula:	$C_{14}H_{11}F_3N_2O_2$
Molska masa:	296,247 g/mol
pK _a :	5,82
log K _{ow} :	n/a
Oblika:	bel prah

2.2.1.4 5-HIDROKSI FLUNIKSIN

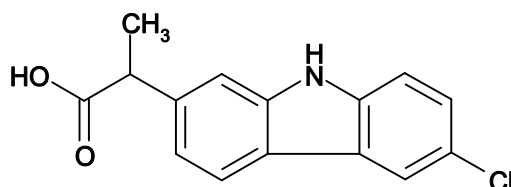


Slika 13: Kemijska struktura 5-hidroksi fluniksina

Splošno:	5-hidroksi flunixin (slika 13) je glavni metabolit fluniksina (Jaussaud in sod., 1987; Wasfi in sod., 1998). V analizo je vključen zaradi zahtev EU pri nadzoru živil živalskega izvora (EMEA, 2000a; 2001a; ES, 2002).
----------	---

Kemijsko ime:	2-((2-metil-3-(trifluorometil)fenil)amino)-3-piridin-5-hidroksi-karboksilna kislina
Kemijska formula:	$C_{14}H_{11}F_3N_2O_3$
Molska masa:	312,247 g/mol
pK _a :	n/a
log K _{ow} :	n/a
Oblika:	bel prah

2.2.1.5 KARPROFEN

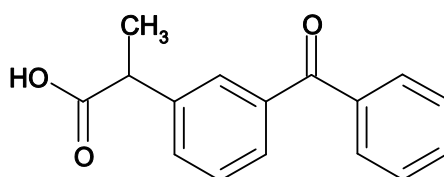


Slika 14: Kemijska struktura karprofena

Splošno: Karprofen (slika 14) se danes uporablja predvsem pri živalih, čeprav je bil več kot desetletje na razpolago tudi kot zdravilo za ljudi (EMEA, 1999a). Uporabljamo ga za blaženje simptomov artritisa pri psih in govedu (EMEA, 1999a; 1999b; 2005a).

Kemijsko ime:	6-kloro-alfa-metil-9H-karbazole-2-ocetna kislina
Kemijska formula:	$C_{15}H_{12}ClNO_2$
Molska masa:	273,718 g/mol
pK _a :	4,3
log K _{ow} :	3,79
Oblika:	bel prah

2.2.1.6 KETOPROFEN

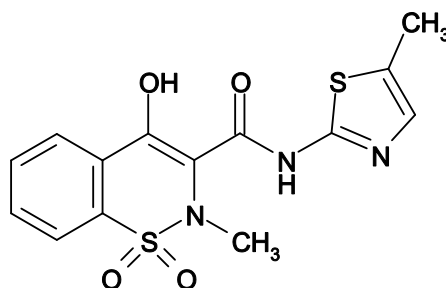


Slika 15: Kemijska struktura ketoprofena

Splošno: Ketoprofen (slika 15) je analgetik, ki se najpogosteje uporablja za lajšanje bolečin po operativnih posegih in za zdravljenje artritisa (Kantor, 1986). V veterinarski medicini se največ uporablja za zdravljenje konjev, prašičev, psov in mačk (EMEA, 1995; 1996).

Kemijsko ime:	2-(3-benzoilfenil)-propanojska kislina
Kemijska formula:	$C_{16}H_{14}O_3$
Molska masa:	254,284 g/mol
pK _a :	4,45
log K _{ow} :	3,12
Oblika:	bel prah

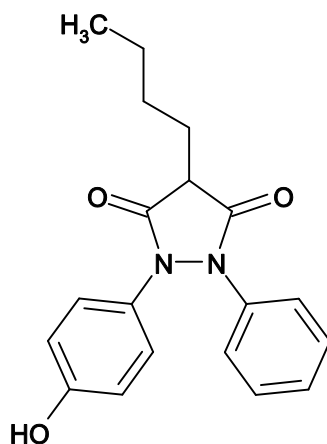
2.2.1.7 MELOSIKAM



Slika 16: Kemijska struktura melosikama

Splošno:	Melosikam (slika 16) se uporablja za zdravljenje artritisa, dismenoreje in povišane telesne temperature in je selektivni COX-2 inhibitor (EMA, 1999c; 1999d). V veterinarski medicini se uporablja za lajšanje bolečin in zdravljenje vnetij pri več živalskih vrstah (EMA, 1999c; 1999d; 2000b; 2000c; 2001b; 2002; 2006).
Kemijsko ime:	4-hidroksi-2-metil-N-(5-metiltiazolil)-2H-1,2-benzotiazin-3-karboksamid-1,1-dioksid
Kemijska formula:	$C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$
Molska masa:	351,406 g/mol
pK _a :	4,08
log K _{ow} :	3,43
Oblika:	bel prah

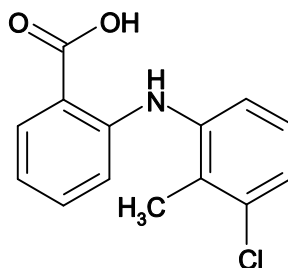
2.2.1.8 OKSIFENBUTAZON



Slika 17: Kemijska struktura oksifenbutazona

Splošno:	Oksifenbutazon (slika 17) je glavni metabolit fenilbutazona (Ober, 1974). V analizo ostankov je vključen zaradi zahtev EU pri nadzoru živil živalskega izvora (ES, 2002).
Kemijsko ime:	4-butil-1-(4-hidroksifenil)-2-fenilpirazolidin-3,5-dion
Kemijska formula:	$C_{19}H_{20}N_2O_3$
Molska masa:	324,378 g/mol
pK _a :	4,5
log K _{ow} :	2,72
Oblika:	bel prah

2.2.1.9 TOLFENAMSKA KISLINA



Slika 18: *Kemijska struktura tolfenamske kisline*

Splošno:	Tolfenamska kislina (slika 18) se uporablja za lajšanje bolečin in velja za selektivni COX-2 inhibitor (EMEA, 2005b).
Kemijsko ime:	2-((3-kloro-2-metilfenil)amino)benzojska kislina
Kemijska formula:	$C_{14}H_{12}ClNO_2$
Molska masa:	261,707 g/mol
pK _a :	4,3
log K _{ow} :	5,17
Oblika:	bel prah

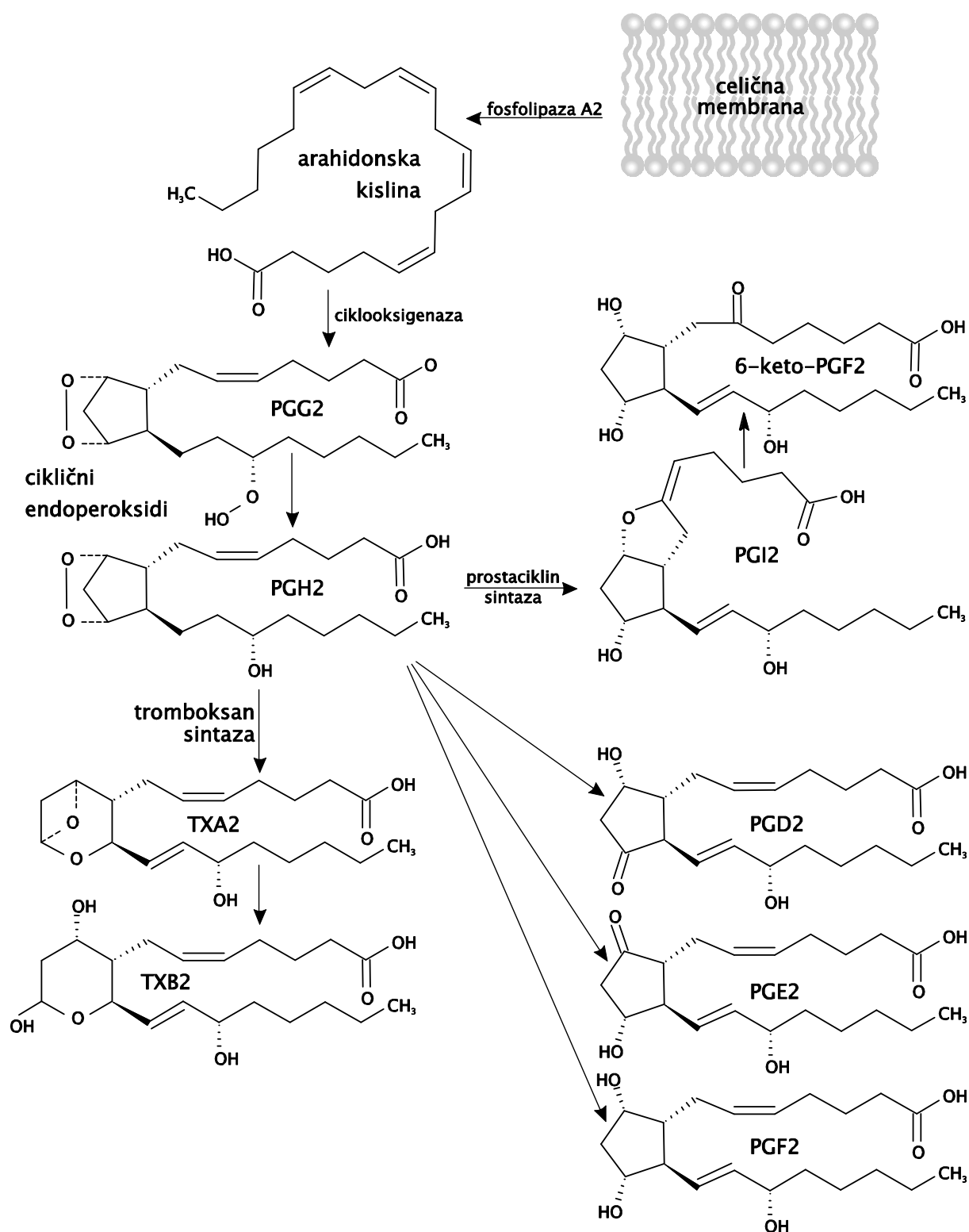
2.2.2 VNETNI PROCES IN NESTEROIDNE PROTIVNETNE UČINKOVINE

Prostaglandini, tromboksani in levkotrieni so predstavniki endogenih maščobnih kislin, sintetiziranih iz fosfolipidnih membran celic. Uvrščamo jih v skupino eikozanoidov, ki so del družine autakoidov. Eikozanoidi opravljajo veliko funkcij v organizmu, med drugimi so prisotni pri razmnoževalnih procesih (luteoliza, splav in porod), v srčno-žilnem sistemu (uravnavanje krvnega tlaka s krčenjem/širjenjem krvnih žil, uravnavanje strjevanja krvi), v ledvicah (uravnavajo pretok krvi v krvnih žilah ledvic, uravnavajo izločanje natrija, kalija, klorida in vode v urin), v gladkih mišicah, v zaščitni plasti prebavnega sistema in pri vnetnih procesih in bolečini. Patološki stimulant, kot so infekcija, mehanska, toplotna ali kemična travma, pospešijo sintezo eikozanoidov (Adams, 2009). Za blaženje posledic patoloških stimulantov uporabljamo učinkovine, ki preprečijo sintezo eikozanoidov, najpogosteje so to glukokortikoidi in nesteroidne protivnetne učinkovine.

Eikozanoidi se v primerjavi z drugimi autakoidi (serotonin, histamin idr.) ne shranjujejo v tkivih, ampak se sintetizirajo po potrebi organizma. Osnova za sintezo pri višjih sesalcih je arahidonska kislina. Gre za esencialno maščobno kislino, ki je z esterskimi vezmi vpeta v fosfolipidno membrano celic. Arahidonska kislina se sprosti ob prisotnosti acil hidrolaz, najpogosteje fosfolipaze A₂. Po sprostitvi arahidonska kislina zapade hitremu oksidativnemu katabolizmu, ki lahko poteka ob prisotnosti različnih encimov. Čeprav lahko citokrom P450 metabolizira arahidonsko kislino do eikozanoidov, sta veliko pomembnejša encima ciklooksigenaza in lipooksigenaza (Adams, 2009).

2.2.2.1 CIKLOOKSIGENAZA

Sinteza prostaglandinov (slika 19) iz arahidonske kisline se začne z encimom prostaglandin peroksid G/H sintaza, bolj znanim pod imenom ciklooksigenaza (COX). Encim ima ciklooksigenazno in hidroperoksidazno funkcijo. Pri sesalcih ga najdemo po celotnem organizmu, zato lahko vsako tkivo sintetizira prostaglandine po potrebi (Adams, 2009).



Slika 19: Prikaz sinteze eikozanoidov iz arahidonske kisline s ciklooksigenazo

Produkt prve stopnje je ciklični endoperoksid PGG₂, ki nastane z oksidacijo in ciklizacijo arahidonske kisline. Nato se s pomočjo hidroperoksidaznega značaja ciklooksigenaze pretvori v PGH₂ (Boutaud in sod., 2002). PGG₂ in PGH₂ sta nestabilna v telesu (biološka razpolovna doba je 5 minut) in se prek različnih encimskih in neencimskih procesov pretvorita v prostaglandine PGD₂, PGE₂ in PGF_{2α} (slika 19) (Adams, 2009).

Poznamo dve glavni obliki encima ciklooksigenaza, to sta ciklooksigenaza-1 (COX-1) in ciklooksigenaza-2 (COX-2). COX-1 je izražen v večini celic in služi sintezi prostaglandinov,

ki uravnavajo fiziološke funkcije (Cipollone in sod., 2004). Zelo pomembna funkcija COX-1 je sinteza eikozanoidov, ki varujejo želodčno sluznico, inhibicija tega encima pa lahko povzroči poškodbe mukoznih epitelijskih celic (Atherton in sod., 2004; Masferrer in Kulkarni, 1997).

Druga oblika, imenovana COX-2, pod normalnimi pogoji v telesu ni prisotna, se pa sinteza tega encima inducira ob prisotnosti bakterijskih lipopolisaharidov in določenih vnetnih citokinov in rastnih faktorjev (Adams, 2009). Nastali COX-2 sintetizira večje količine prostaglandinov, ki sodelujejo pri vnetnih procesih (Atherton in sod., 2004).

Poleg prostaglandinov lahko iz PGH_2 nastaneta tudi tromboksan A_2 (TxA_2) in prostaciklin (PGI_2). TxA_2 ima namesto ciklopentanske skupine oksanski obroč. Biološka razpolovna doba TxA_2 je pri fizioloških pogojih 30 sekund, nato TxA_2 razpade v stabilno komponento tromboksan B_2 . TxA_2 igra pomembno fiziološko vlogo pri krčenju krvnih žil in kot pospeševalec agregacije trombocitov (Adams, 2009).

Prostaciklin se strukturno razlikuje od prostaglandinov po dodanem drugem ciklopentanskem obroču. Funkcija prostaciklinov je nasprotna funkciji tromboksana; prostaciklin ima močan učinek na širjenje krvnih žil, hkrati pa upočasnjuje združevanje krvnih ploščic (Adams, 2009).

2.2.2.2 LIPOOKSIGENAZA

V primerjavi s ciklooksigenazami, ki so prisotne v skoraj vsakem tkivu, se lipooksigenaze pojavljajo predvsem v pljučih, krvnih ploščicah in belih krvničkah. Proces sinteze eikozanoidov se enako kot pri ciklooksigenazi začne s sproščanjem arahidonske kisline iz fosfolipidne celične membrane. Produkti lipooksigenaz so nestabilni hidroperoksidi, ki razpadejo do stabilnih hidroksi kislin ali pa se pretvorijo v druge spojine, npr. levkotriene (Brink in sod., 2003). Izbrani produkti so prikazani na sliki 20. Specifične fiziološke vloge za produkte lipooksigenaz še ne poznamo, znano pa je, da sodelujejo pri vnetnih procesih (Dwyer in sod., 2004).

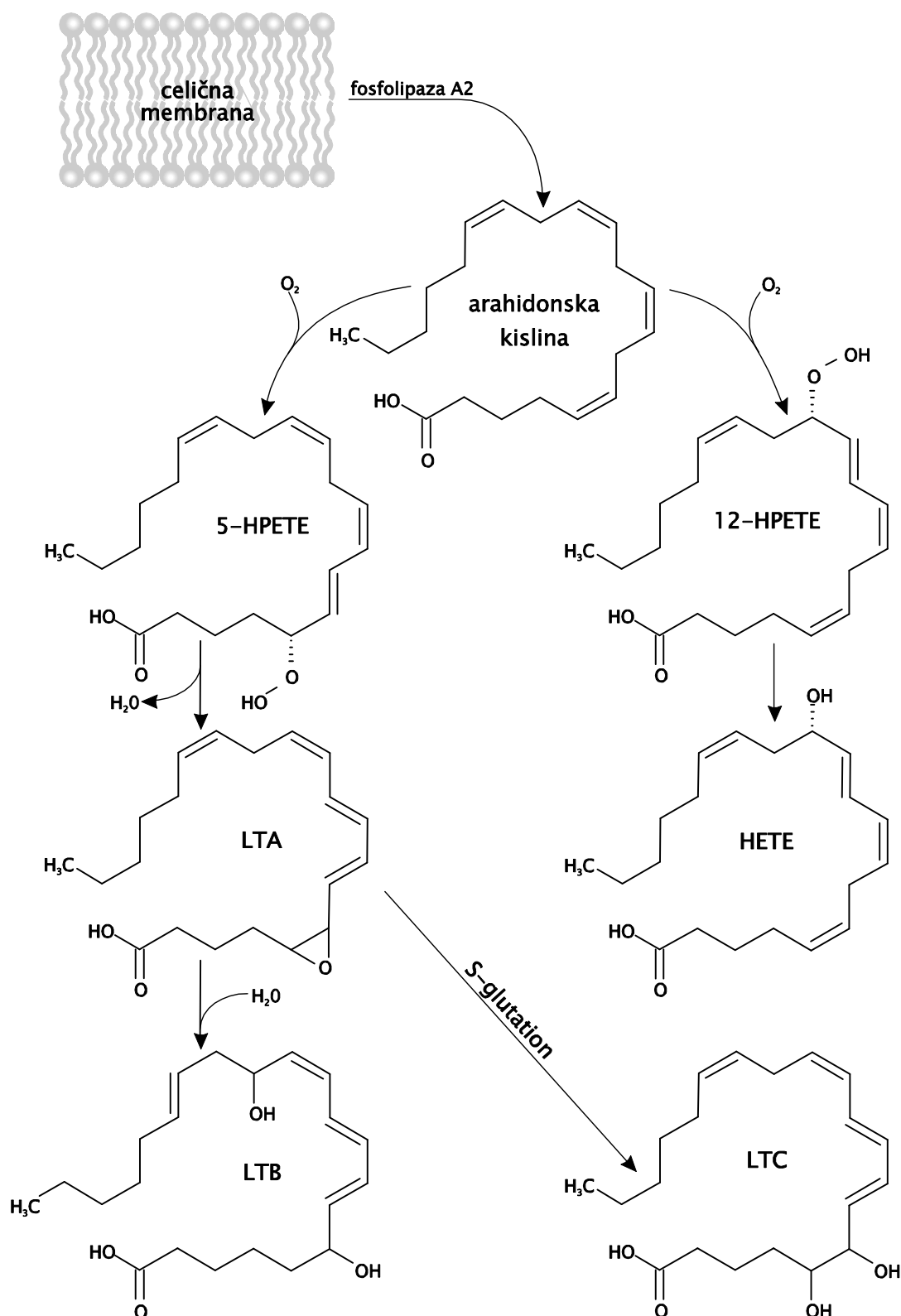
Levotrieni so neciklične karboksilne kisline, sestavljene iz 20 ogljikovih atomov, ki nastajajo s pomočjo lipooksigenaz. Ime levkotrieni so dobile, ker so jih odkrili najprej v belih krvnih celicah oziroma levkocitih in imajo podobne strukturne lastnosti kot konjugirani trieni (Samuelsson, 1983).

Prva stopnja reakcije s 5-lipooksigenazo je nastanek 5-hidroperoksiahidonske kisline (5-HPETE), ki se nato pretvori v 5-hidroksiahidonsko kislino (5-HETE) oziroma v levkotrien A_4 , ki je 5,6-epoksid izvirne spojine. V naslednjem koraku se levkotrien A_4 pretvori v obliko B_4 ali C_4 . Iz levkotriena C_4 lahko v nadaljnjih korakih dobimo obliki D_4 oziroma E_4 . Točna biokemijska funkcija levkotrienov še ni poznana, znano pa je, da sodelujejo pri vnetnih procesih in da kombinacija levkotrienov (C_4 , D_4 , E_4) igra vlogo pri anafilaksiji (Samuelsson, 1983; Samuelsson in sod., 1980).

2.2.2.3 INHIBICIJA SINTEZE EIKOZANOIDOV

Glukokortikoidi so inhibitorji sinteze eikozanoidov. Učinkujejo tako, da inducirajo sintezo spojina, imenovanih aneksini (prvotno ime »lipokortini«). Aneksini zavrejo delovanje encima fosfolipaza A_2 in s tem onemogočijo sproščanje arahidonske kisline iz fosfolipidnih celičnih membran (Wolfe, 1982). Poleg inhibicije fosfolipaze, glukokortikoidi zavirajo izražanje

encima COX-2, medtem ko na COX-1 nimajo opaznega vpliva (Donnelly in Hawkey, 1997; Masferrer in Kulkarni, 1997).



Slika 20: Prikaz sinteze eikozanoidov iz arahidonske kisline z lipooksigenazo

Z delom Vanea (1971) so se uveljavile ASK podobne učinkovine kot inhibitorji sinteze eikozanoidov. ASK in druge nesteroidne protivnetne učinkovine zavrejo sintezo prostaglandinov z inhibicijo encimov, ki nastopajo zgodaj v procesu sinteze, to je pri ciklooksigenazi (slika 19) oziroma pri lipooksigenazi (slika 20). Z inhibicijo zavremo sintezo

spojin PGG₂ in PGH₂ in preprečimo tudi nadaljnjo sintezo drugih protivnetnih prostaglandinov, kot sta na primer PGE₂ in PGI₂ (Adams, 2009; Vane, 1971).

Prvi predstavniki protivnetnih nesteroidnih učinkovin so bili neselektivni inhibitorji ciklooksigenaze, ki učinkujejo na obe obliki encima (Juni in sod., 2002). Čeprav je inhibicija COX-2 odgovorna za terapevtski učinek nesteroidnih protivnetnih učinkovin, pa inhibicija COX-1 oslabi obrambne funkcije prostaglandinov, ki so nujne za normalno delovanje celic (Donnelly in Hawkey, 1997). Učinkovine, ki bi selektivno inhibirale COX-2, bi bile terapevtsko veliko sprejemljivejše, saj bi se s tem izognili večini neželenih stranskih učinkov nesteroidnih protivnetnih učinkovin (Brune in Hinz, 2004).

Inhibicijo ciklooksigenaze in 5-lipooksigenaze so preučevali na različnih nivojih: molekularnem, celičnem, na nivoju tkiva in celotnega organizma. Molekularna vloga nesteroidnih protivnetnih učinkovin je inhibicija encimov, ki imajo ključno vlogo v kaskadi sinteze proinflammatoryh mediatorjev. Celice prenehajo s sintezo prostaglandinov, kar lajša simptome, kot so bolečina, rdečica (tkiva) in povišana telesna temperatura (celoten organizem) (Adams, 2009; Lees, 2009).

2.2.3 UPORABA V MEDICINSKE NAMENE

V zadnjem desetletju se je število nesteroidnih protivnetnih učinkovin, registriranih za uporabo na ljudeh in živalih, močno povečalo. Posledica je višja in širša uporaba terapevtikov, dodaten pogon pa dajejo spoznanja, da so nesteroidne protivnetne učinkovine uporabne pri vseh procesih, kjer sta prisotna vnetje in bolečina. Poleg tega so nesteroidne protivnetne učinkovine poceni in terapevtsko učinkovite (Lees, 2009).

Nesteroidne protivnetne učinkovine se uporabljajo za zdravljenje naslednjih obolenj:

- Akutne bolečine in vnetja
Pri živalih je pogosto težko ugotoviti prisotnost in intenzivnost bolečine, velja pa sprejeta ugotovitev, da živali občutijo bolečino. Iz tega je mogoče sklepati, da podobno kot človek tudi živali ob prisotnosti bolečine doživljajo stres in trpljenje. Raziskave, pri katerih so spremljali bolečino subjektivno (vizualna ocena) in objektivno (povzročanje mehanske travme s stiskanjem in merjenjem sile), so potrdile učinkovitost nesteroidnih protivnetnih učinkovin za zdravljenje akutne bolečine pri živalih (Holton in sod., 1998; Lipscomb in sod., 2002).
Nesteroidne protivnetne učinkovine uporabljamo za lajšanje pooperativnih bolečin, akutnih bolečin, ki so posledica travme, za zdravljenje mišičnih in skeletnih obolenj, ki vključujejo vnetne procese, in zdravljenje kolike pri konjih (Lees, 2009).
- Kronične bolečine
Neoperativna uporaba nesteroidnih protivnetnih učinkovin je v humani medicini namenjena predvsem lajšanju kroničnih bolečin, ki se pojavljajo pri boleznih, kot je na primer rak. V veterinarski medicini je glavna tarča bolečina, ki jo povzroča osteoartritis pri psih in konjih. Nesteroidne protivnetne učinkovine so edina zdravila, primerna za srednje- in dolgoročno zdravljenje osteoartritisa, saj v primerjavi z opiaty (ki se prav tako uporabljajo za lajšanje bolečin) ne učinkujejo na centralni živčni sistem, učinkujejo dlje in prinašajo manj zakonskih omejitev v primerjavi z opiaty (Lees, 2009).

- **Vpliv acetilsalicilne kisline na strjevanje krvi**
V visokih odmerkih vse nesteroidne protivnetne učinkovine inhibirajo sintezo TxA_2 in s tem zavirajo zbiranje krvnih ploščic in strjevanje krvi. Pri predpisanih terapevtskih odmerkih ne prihaja do opazno podaljšanih časov strjevanja krvi, razen ASK. ASK je edina izmed nesteroidnih protivnetnih učinkovin, ki se veže na ciklooksigenazo s kovalentno vezjo. To povzroči ireverzibilno inhibicijo encima, tako da v celotni življenjski dobi krvna ploščica ne more več sintetizirati novih encimov, s katerimi bi pospešila strjevanje krvi. ASK zato uporabljamo za profilakso in zdravljenje aortnega embolizma pri mačkah, iz istih razlogov pa pri večjih odmerkih ASK upravičeno pričakujemo večje tveganje za krvavitve (Lees, 2009).
- **Rak**
Študije na ljudeh so pokazale, da povečana ekspresija COX-2 v debelem črevesu lahko ovira apoptozo (programirana celična smrt) in poveča izločanje rastnih faktorjev, kar lahko povzroči rast tumorjev. Pri ljudeh in podganah ima rakavo tkivo povečano vsebnost PGE_2 , ki aktivira epidermalni rastni receptor in zato pospešuje rast polipov v debelem črevesu in poveča verjetnost za razvoj raka (Pai in sod., 2002). Študije o uporabi nesteroidnih protivnetnih učinkovin za preventivo in zdravljenje rakavih obolenj še potekajo, rezultati pa so za zdaj spodbudni (Baron in sod., 2003; Hallak in sod., 2003; Knapp in sod., 1992; Sandler in sod., 2003; Steinbach in sod., 2000).
- **Nevrodegenerativne bolezni**
Do zdaj smo navajali, da je COX-1 prisoten v skoraj vsakem tkivu, COX-2 pa se sintetizira po potrebi. Izjema je centralni živčni sistem, kjer je COX-2 prisoten v možganih. Pri bolnikih z demenco je aktivnost COX-2 v hipokampusu in možganski skorji povišana. Nastali prostaglandini zavirajo aktivnost nevronov pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo, hkrati pa pospešujejo nevrodegenerativne procese s povečanjem ekscitotoksičnosti glutamata. Pri demenci je pomemben korak transformacija $\text{A}\beta$ peptidov neaktivnih mikroglij in astroglij v aktivne celice, ki sproščajo širok spekter vnetnih mediatorjev (Lees, 2009). Do zdaj opravljeni poskusi kažejo, da nesteroidne protivnetne učinkovine lahko pomagajo pri preprečevanju nevrodegenerativnih bolezni (Launer, 2003; Meinert in sod., 2009; Stewart in sod., 1997).
- **Mastitis, metritis in endotoksemija**
Ko po gramu-negativne bakterije vstopijo v krvni sistem, povzročijo endotoksemijo in z njo povezane sistemske učinke. Pri akutnem in perakutnem z *E. coli* povzročenem mastitisu prihaja do velikih gospodarskih izgub zaradi zmanjšane proizvodnje mleka, cene zdravljenj, zavrženega mleka in smrtnosti. Endotoksini pospešijo sintezo in sproščanje širokega spektra vnetnih mediatorjev, zato lahko endotoksemijo obravnavamo kot akutno vnetje krvnega sistema (Lees, 2009).
Za zdravljenje mastitisa se uporablja kombinacija sistemske vnesenih nesteroidnih protivnetnih učinkovin in protimikrobnih zdravil. S poskusi so potrdili nižje vsebnosti vnetnih mediatorjev v prizadetih tkivih (Anderson in sod., 1986; Shpigel in sod., 1994), hkrati pa so poročali o boljši učinkovitosti neselektivnih inhibitorjev ciklooksigenaze v primerjavi s selektivnimi, COX-2 specifičnimi inhibitorji (Lees, 2009).
- **Bolezni dihal**
Do nevarnih vnetij dihal prihaja pri pljučnicah bakterijskega in virusnega izvora, ki so lahko pri mlajših organizmih smrtno nevarne. Poskusi trenutno kažejo mešano sliko: nekateri potrjujejo učinkovitost nesteroidnih protivnetnih učinkovin za zdravljenje

vnetij dihal (Selman in sod., 1984), drugi pa te trditve zavračajo (Lees, 2009). Kljub nekaterim spodbudnim rezultatom pa mehanizem, po katerem bi nesteroidne protivnetne učinkovine delovale pri vnetjih dihal, še ni pojasnjen (Lees, 2009).

2.2.4 OSTANKI NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN V ŽIVILIH ŽIVALSKEGA IZVORA

Vsa živila živalskega izvora, namenjena humani prehrani v Evropski Uniji (EU), morajo ustrezati vsem predpisom EU, kamor so vključeni tudi ostanki zdravil (ES, 2009). Zakonodaja EU deli učinkovine glede na mejne vrednosti njihovih ostankov v 4 skupine:

1. farmakološko aktivne snovi, za katere so določene mejne vrednosti ostankov (MRL)
2. snovi brez mejnih vrednosti ostankov
3. seznam farmakološko aktivnih snovi, ki se uporabljajo v zdravilih za uporabo v veterinarski medicini in za katere so določene začasne mejne vrednosti ostankov
4. farmakološko aktivne snovi, za katere ni mogoče določiti mejnih vrednosti ostankov in so zato prepovedane za uporabo pri rejnih živalih

Učinkovine oziroma njihove kombinacije učinkovina/živalska vrsta/matriks, uvrščene v 1. in 3. skupino, so lahko prisotne v živilih v mejah, ki jih določa EU. Učinkovine, uvrščene v 2. skupino, so lahko prisotne v živilih brez omejitev. Učinkovine uvrščene v 4. skupino, ne smejo biti prisotne v živilih. Vse preostale učinkovine oziroma njihove kombinacije učinkovina/živalska vrsta/matriks, ki niso uvrščene v nobeno od zgornjih skupin, se obravnavajo kot spojine (kombinacije) z nično mejno vrednostjo ostankov. Pregled mejnih vrednosti ostankov (MRL) nesteroidnih protivnetnih učinkovin prikazuje tabela 1.

Poleg spojin, ki imajo določene mejne vrednosti ostankov učinkovin (tabela 1), so v živilih brez omejitev učinkovin (2. skupina, (ES, 2009)) dovoljene še naslednje nesteroidne protivnetne učinkovine: acetilsalicilna kislina, salicilna kislina (vključno z aluminijevim, natrijevim in metil salicilatom), paracetamol in ketoprofen. Za druge spojine, ki niso navedene v tabeli 1 oziroma zgoraj, velja nična mejna vrednost ostankov v živilih živalskega izvora (CRL, 2007a).

Za področje nesteroidnih protivnetnih učinkovin je bil imenovan Centralni referenčni laboratorij (CRL) EU v Berlinu (ES, 1996; 2004; 2006), ki izdaja poročila o ostankih navedenih učinkovin v živilih živalskega izvora od leta 2004 naprej. Zapisali so, da se analize vzorcev na ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin v živilih živalskega izvora opravljajo v vseh državah članicah EU (graf 1), razen Bolgarije. V povprečju se nadzira šest analitov na državo članico. Število analitov za Slovenijo, prikazanih v tem grafu, se nanaša na začetno (delovno) verzijo analizne metode, ko smo preizkušali vse dostopne analite. Zaradi dolgih časov analize, visoke porabe topil in neustreznosti nekaterih spojin za analizo z izbrano tehniko smo nabor v letu 2009 zmanjšali na devet analitov. Vse države članice izvajajo analize na matriksih relevantnih živalskih vrst (govedo, vključno z mlekom, prašiči, koze, ovce, konji, perutnina, divjad in kuncí), izjemi sta le Bolgarija in Španija, ki ne nadzirata mleka na prisotnost ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin. Prav mleko uvrščamo med bolj »občutljive« matrikse, saj ga ljudje uživamo v velikih količinah, zato bi prisotnost nevarnih snovi lahko pomenila resno tveganje za zdravje potrošnikov (CRL, 2007b; 2008a; 2009).

Tabela 1: Mejne vrednosti ostankov (MRL) nesteroidnih protivnetnih učinkovin kot jih določa zakonodaja EU (ES, 2009)

Učinkovina	Analit	Živalska vrsta	Matriks	MRL (µg/kg)
karprofen	vsota karprofena in konjugata karprofena z glukoronidom	govedo	mišice	500
			maščoba	1000
			jetra	1000
			ledvice	1000
		konji	mišice	500
			maščoba	1000
			jetra	1000
			ledvice	1000
vedaprofen	vedaprofen	konji	mišice	50
			maščoba	20
			jetra	100
			ledvice	1000
fluniksin	fluniksin	govedo	mišice	20
			maščoba	30
			jetra	300
			ledvice	100
		prašiči	mišice	50
			koža in maščoba	10
			jetra	200
			ledvice	30
		konji	mišice	10
			maščoba	20
			jetra	100
			ledvice	200
	5-OH-fluniksin	govedo	mleko	40
tolfenamska k.	tolfenamska k.	govedo	mišice	50
			jetra	400
			ledvice	100
			mleko	50
		prašiči	mišice	50
			jetra	400
			ledvice	100
			ledvice	100
meloksikam	meloksikam	konji	mišice	20
			jetra	65
			ledvice	65
			ledvice	65
		prašiči	mišice	20
			jetra	65
			ledvice	65
			ledvice	65
		kunci	mišice	20
			jetra	65
			ledvice	65
			ledvice	65
		govedo	mišice	20
			jetra	65
			ledvice	65
			mleko	15
		koze	mišice	20
			jetra	65
			ledvice	65
			mleko	15

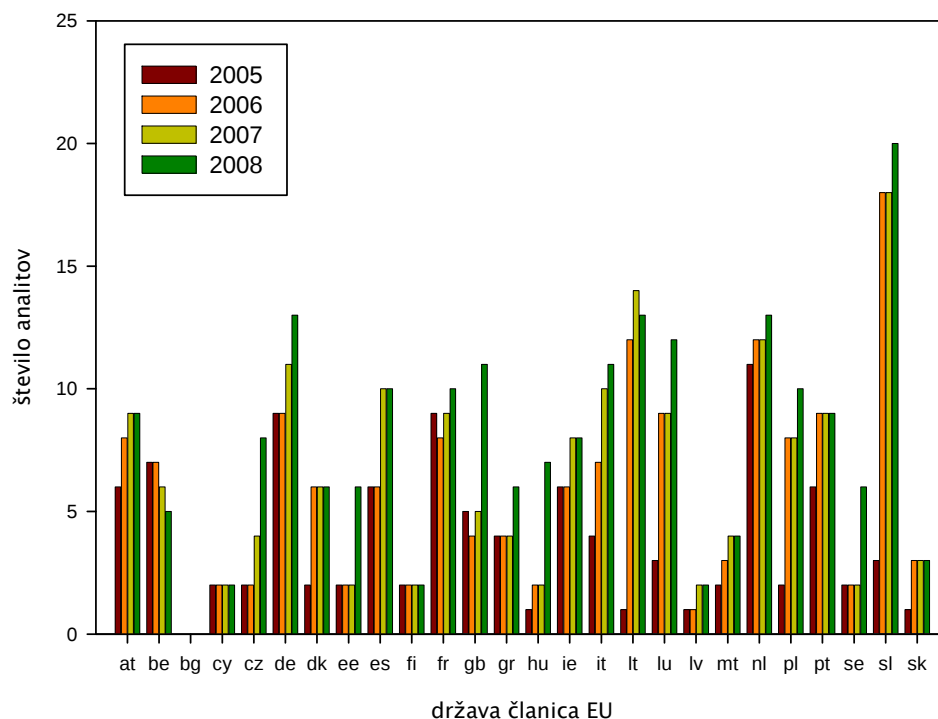
Učinkovina	Analit	Živalska vrsta	Matriks	MRL (µg/kg)
metamizol	4-metilaminoantipirin (MAA)	govedo	mišice	100
			maščoba	100
			jetra	100
			ledvice	100
			mleko	50
		prašiči	mišice	100
			koža in maščoba	100
			jetra	100
			ledvice	100
		konji	mišice	100
			maščoba	100
			jetra	100
			ledvice	100
diklofenak	diklofenak	govedo	mišice	5
			maščoba	1
			jetra	5
			ledvice	10
			mleko	0,1
		prašiči	mišice	5
			koža in maščoba	1
			jetra	5
firokoksib	firokoksib	konji	ledvice	10
			mišice	10
			maščoba	15
			jetra	60
			ledvice	10

k. – kislina; analit – oblika(e) spojine, ki jo (jih) je po predpisih EU treba meriti (ang. marker residue); MRL – najvišja dopustna vrednost ostankov

Med pripombami glede državnega nadzora nad ostanki nesteroidnih protivnetnih učinkovin so zapisali, da samo 11 držav članic EU nadzira mleko na bazične nesteroidne protivnetne učinkovine. Metamizol, za katerega ocenjujejo, da se uporablja pogosto (tabela 3), nadzira le devet članic. Poudarili so še, da samo pet članic nadzira fluniksin in njegov glavni metabolit 5-hidroksi fluniksin, tri države članice pa nadzirajo samo 5-hidroksi fluniksin. Predlagajo, da članice uvedejo analizo obeh spojin, saj se lahko razmerje med učinkovino in njenim metabolitom spreminja glede na pretečeni čas med vnosom zdravila in vzorčenjem (CRL, 2009).

Izdali so tudi priporočilo glede instrumentov, ki naj se uporabljajo za nadzor nesteroidnih protivnetnih učinkovin v živilih živalskega izvora. Zapisali so, da je s sodobnimi sistemi LC-MS/MS mogoče izmeriti približno 15 spojin v koncentracijskem območju 1–10 µg/kg. Starejše fizikalno-kemijske tehnike merjenja, ki so v nekaterih članicah še vedno v rutinski uporabi (GC-MS, HPLC-FLD, HPLC-DAD in ELISA), so omejene s številom spojin, ki jih lahko merimo istočasno in po navadi ne dosežajo zahtevanih koncentracijskih območij (CRL, 2009).

Predstavljeni rezultati obsegajo letno celokupno število neustreznih vzorcev (tabela 2) in po posameznih spojinah (tabela 3). Letno število neustreznih vzorcev se je od leta 2005 do leta 2007 znižalo s 50 na 20. Sočasno se je število vseh vzorcev, ki so jih analizirali na ostanki nesteroidnih protivnetnih učinkovin, povečalo z 11133 na 13383, kar pomeni padec v relativnem številu neustreznih vzorcev z 0,45 % v letu 2005 na 0,15 % v letu 2007.



Graf 1: Letni pregled števila nesteroidnih protivnetnih učinkovin in njihovih metabolitov (analitov) v obdobju 2005–2008, ki jih je v živilih živalskega izvora nadzirala posamezna država članica EU (CRL, 2007b; 2008a; 2009)

Tabela 2: Število neustreznih vzorcev na ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin v EU v obdobju 2004–2007 (CRL, 2007b; 2008a; 2009)

	NC	MS	S	%
2004	35	6	10212	0,34
2005	50	8	11133	0,45
2006	30	6	11657	0,26
2007	20	5	13383	0,15

NC – število neustreznih vzorcev; MS – število članic, ki so poročale o neustreznih vzorcih; S – število vseh vzorcev, analiziranih na ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin; % – relativno število (delež) neustreznih vzorcev

Tabela 3: Število neustreznih vzorcev na ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin v EU v obdobju 2004–2007 posamično za vsako spojino (CRL, 2007b; 2008a; 2009)

	2004	2005	2006	2007
fenilbutazon	13	21	6	9
oksifenbutazon				2
fluniksin	9	11	7	4
meloksikam			1	1
diklofenak		1	6	
salicilati*	4	6	1	
tolfenamska k.	4	9	5	
karprofen	1			
metamizol	4	1	4	4
ramifenazon		1		

k. – kislina; *salicilati vključujejo acetilsalicilno kislino, salicilno kislino in soli salicilne kisline

Med analiti v neustreznih vzorcih je najbolj izstopal fenilbutazon, sledili pa so mu fluniksin, metamizol in tolfenamska kislina (tabela 3). Poudariti velja, da fenilbutazon trenutno nadzira 26 držav članic EU, fluniksin 20, tolfenamsko kislino 16, metamizol pa le devet članic (tabela 4).

Tabela 4: Število držav članic EU, ki nadzirajo ostanke posameznih nesteroidnih protivnetnih učinkovin (CRL, 2007b; 2008a; 2009)

	2006	2007	2008
fenilbutazon	25	26	26
fluniksin	16	18	20
ketoprofen	13	13	14
kaprofen	12	14	17
diklofenak	12	15	18
vedaprofen	12	10	11
tolfenamska k.	10	11	16
meloksikam	9	10	15
salicilati*	7	5	6
mefenamska k.	7	6	11
metamizol	7	9	9
niflumska k.	5	6	7
naproksen	3	4	6
flufenamska k.	3	2	3
meklofenamska k.	3	3	3
ibuprofen	2	5	7
tolmetin	2	3	3

k. – kislina; *salicilati vključujejo acetilsalicilno kislino, salicilno kislino in soli salicilne kisline

2.2.5 ANALIZNE METODE DOLOČANJA OSTANKOV NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN

Z razvojem farmakologije se večja število novih učinkovitejših zdravil, ostanke teh učinkovin v živilih živalskega izvora pa je treba ugotavljati predvsem zaradi varstva potrošnikov. Analizne metode za ugotavljanje ostankov učinkovin se neprestano razvijajo in izpopolnjujejo, pojavljajo pa se tudi nove analizne metode, ki uporabljajo še bolj prilagojene tehnike čiščenja vzorcev in merjenja koncentracij. Pregled nekaterih metod za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin smo prikazali na koncu tega poglavja (tabela 5).

Za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin se najpogosteje uporablja tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), čeprav se je nekaj avtorjev odločilo za plinsko kromatografijo (Antonić in Heath, 2007; Koutsouba in sod., 2003; Rodríguez in sod., 2003). Analiti se ekstrahirajo z organskimi topili, potem sledi čiščenje, ki je najpogosteje ekstrakcija na trdni fazi (SPE). Na koncu izmerimo koncentracije s spektrofotometrično (UV/VIS) oziroma masnospektrometrično (MS) detekcijo. Za prvi način detekcije velja, da so meje zaznavnosti in določitve višje kot pri masnospektrometrični detekciji. Tudi selektivnost je pri spektrofotometrični detekciji slabša.

Pri analiznem delu želimo doseči točnost, natančnost, dovolj nizke meje zaznavnosti in določitve ter hitro in preprosto izvedbo. Strokovnjaki želijo izboljšati oziroma optimizirati analizne metode po posameznih fazah ali v celoti. V literaturi narašča tudi število

večkomponentnih metod, s katerimi v vzorcu določamo več analitov hkrati (Dowling in sod., 2009; Gallo in sod., 2008; Jedziniak in sod., 2009; Peters in sod., 2009; Vinci in sod., 2006).

Pri kronološkem pregledu analiznih metod se največkrat pokažejo mejniki, ki so pomembno vplivali na njihov razvoj. Pri analizi nesteroidnih protivnetnih učinkovin nismo ugotovili nobene pomembnejše »prelomnice«, saj se starejše analizne tehnike ekstrakcije, čiščenja in merjenja učinkovin še vedno prepletajo z novejšimi, zmogljivejšimi analiznimi tehnikami. Edina »prelomnica« je bila pojav masnospektrometričnih detektorjev ob prelomu tisočletja, kar je bila najverjetneje posledica boljše dostopnosti teh instrumentov. Kljub temu se še vedno pojavljajo nove metode, ki za merjenje uporabljajo »klasične« spektrofotometrične detektorje.

2.2.5.1 EKSTRAKCIJA IN ČIŠČENJE VZORCEV

Nesteroidne protivnetne učinkovine določamo v različnih matriksih, med drugimi v krvni plazmi (Baert in De Backer, 2003; Farrar in sod., 2002; González Martín in sod., 2002; Goosen in sod., 1998; Gowik in sod., 1998), krvnem serumu (Ibrahim in sod., 2007; Wasfi in sod., 1998), urinu (el Haj in sod., 1999; Suárez in sod., 2007; Wasfi in sod., 1998), mleku (Daeseleire in sod., 2003; Feely in sod., 2002; Malone in sod., 2009; Ngoh in sod., 2003), ledvicah (Albrecht in Thormann, 1998; Boner in sod., 2003; Igualada in sod., 2007), jetrih (Albrecht in Thormann, 1998; Boner in sod., 2003), maščobi (Boner in sod., 2003; Cristófol in sod., 1998), mišicah (Boner in sod., 2003; Igualada in sod., 2007), jajcih (Peters in sod., 2009), ribah (Peters in sod., 2009), fascii (Panas in sod., 1998), farmacevtskih oblikah (el Haj in sod., 1999; Pospíšilová in sod., 1995; Sun in sod., 2003) in okoljskih vzorcih, kot so vode (Gómez in sod., 2006; Kosjek in sod., 2005; Koutsouba in sod., 2003; Rodríguez in sod., 2003) in usedline (Antonić in Heath, 2007).

Ekstrakcija analitov se izvaja z organskimi topili, največkrat etilacetatom (el Haj in sod., 1999; Igualada in sod., 2007; Ngoh in sod., 2003; Sun in sod., 2003), dietil etrom (Baert in De Backer, 2003), acetonom (Feely in sod., 2002; Ngoh in sod., 2003) in acetonitrilom (Daeseleire in sod., 2003; González Martín in sod., 2002; Taggart in sod., 2007). Najpogosteje se izvaja ekstrakcija tekoče-tekoče (Baert in De Backer, 2003; Feely in sod., 2002; Ngoh in sod., 2003; Wasfi in sod., 1998), v nekaterih primerih pa gre bolj za obarjanje proteinov matriksa vzorca kot pa za ekstrakcijo (González Martín in sod., 2002; Ibrahim in sod., 2007; Malone in sod., 2009). Pri nekaterih vrstah matriksov moramo uporabiti agresivnejše tehnike ekstrakcije. Primerjavo ekstrakcije nesteroidnih protivnetnih učinkovin iz sedimentov s Soxhletovim aparatom, superkritičnimi tekočinami, ultrazvokom in ekstrakcijo z mikrovalovi sta opisala AntoniĆ in Heath (2007).

Po ekstrakciji sledi čiščenje ekstraktov, ki se najpogosteje izvaja z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE). Pogost korak pred čiščenjem ekstraktov je razmastitev vzorcev z ekstrakcijo tekoče-tekoče s heksanom (el Haj in sod., 1999; Malone in sod., 2009). Najpogosteje uporabljani stacionarni fazi za ekstrakcijo na trdni fazi sta obrnjena C₁₈ (Farrar in sod., 2002; Feely in sod., 2002; Gowik in sod., 1998; Koutsouba in sod., 2003) in kationsko-izmenjevalna faza (Boner in sod., 2003; Ngoh in sod., 2003; Zuccato in sod., 2005). Večina avtorjev je za čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi uporabila vnaprej pripravljene kolonice, le Farrar s sod. (2002) je uporabil 96-mestne plošče.

Namesto ekstrakcije na trdni fazi so nekateri avtorji uporabili druge tehnike čiščenja, kot so preparativna TLC (Wasfi in sod., 1998) in mikroekstrakcija tekoče faze z votlimi nanocevkami (Ramos Payán in sod., 2009). Nekaj avtorjev se je odločilo za skrajšani

postopek ekstrakcije in čiščenja, ki v nekaterih primerih obsega le obarjanje proteinov z organskimi topili (Daeseleire in sod., 2003) oziroma s spremembo ionske moči (Ibrahim in sod., 2007).

2.2.5.2 DERIVATIZACIJA

Derivatizacija nesteroidnih protivnetnih učinkovin je potrebna predvsem pred meritvijo s plinsko kromatografijo (Kosjek in sod., 2005; Koutsouba in sod., 2003), čeprav nekateri avtorji poročajo o uspešni izvedbi kromatografske ločbe na plinskem kromatografu brez predhodne derivatizacije (Wasfi in sod., 1998). Najpogosteje uporabljan reagent je N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (MSTFA) (Antonić in Heath, 2007; el Haj in sod., 1999; Kosjek in sod., 2005; Rodríguez in sod., 2003), le Koutsouba s sod. (2003) je uporabil pentafluorobenzil bromid (PFBBR).

2.2.5.3 KROMATOGRAFSKA LOČBA

Najpogosteje uporabljana metoda ločbe analitov je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) (Damiani in sod., 2001; Gowik in sod., 1998; Zuccato in sod., 2005), čeprav se uporabljajo tudi plinska kromatografija (el Haj in sod., 1999; Kosjek in sod., 2005; Koutsouba in sod., 2003), elektrokinetična kapilarna kromatografija (Albrecht in Thormann, 1998), kapilarna elektroforeza (Suárez in sod., 2007) in kapilarna isotahoforeza (Pospíšilová in sod., 1995).

Pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti je sestava mobilne faze odvisna od načina detekcije, saj so masnospektrometrični detektorji občutljivi za prisotnost soli in pufrov v mobilni fazi, hkrati pa nehlapni ostanki modifikatorjev mobilne faze krajšajo življenjsko dobo in povečajo možnost okvare instrumenta. Pri merjenju z UV/VIS spektrofotometrom je mobilna faza sestavljena iz fosfatnega pufra (vrednost pH med 2,5 in 3,5) in organskega topila (Damiani in sod., 2001; Farrar in sod., 2002; Ibrahim in sod., 2007; Sun in sod., 2003), ki je lahko acetonitril (Boner in sod., 2003; Daeseleire in sod., 2003; Zuccato in sod., 2005), metanol (Hernando in sod., 2006; Radhofer-Welte in Dittrich, 1998) ali kombinacija obeh (Feely in sod., 2002; Ngoh in sod., 2003). Sun s sod. (2003) je mobilni fazi dodal še tetrahidrofuran. Pri merjenju z masnospektrometričnim detektorjem je mobilna faza sestavljena pretežno iz vode in organskega topila, pri čemer je v eno ali obe komponenti dodana majhna količina hlapnega modifikatorja, kot na primer očetne ali mravljične kisline (Boner in sod., 2003; Daeseleire in sod., 2003; Feely in sod., 2002; Igualada in sod., 2007). Malone s sod. (2009) je edini uporabil amonijev acetat kot modifikator, Sabolovic s sod. (2004) pa je uporabila trifluoroacetno kislino. Modifikator nima opaznega vpliva na kromatografijo, izboljša pa ionizacijo in s tem občutljivost analizne metode.

Med uporabljanimi stacionarnimi fazami v analiznih kolonah za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti prevladujejo obrnjene C_{18} (Baert in De Backer, 2003; Farrar in sod., 2002; Gowik in sod., 1998) in C_8 (Boner in sod., 2003; Feely in sod., 2002; Ngoh in sod., 2003) faze, manj pogoste pa so monolitne kolone (Ramos Payán in sod., 2009). Dimenzije kolon so lahko različne, na splošno pa velja, da se pri spektrofotometrični detekciji uporabljajo kolone večjih dimenzij, ker omogočajo boljšo kromatografsko ločbo. Zanimivo je tudi dejstvo, da kljub »poplavi« kromatografskih kolon z manjšimi delci stacionarne faze večina avtorjev uporablja kolone z velikostjo delcev 5 μm , Zuccato s sod. (2005) je uporabil delce velikosti 3 μm , Dowling s sod. (2009) delce velikosti 1,8 μm , Peters s sod. (2009) pa je uporabil delce velikosti 1,7 μm .

Pri plinski kromatografiji je večina avtorjev uporabila kolono vrste HP-5 (BP5, ZB-5) dimenzij 30 m x 0,25 mm z debelino sloja stacionarne faze 25 µm.

2.2.5.4 DETEKCIJA

V zadnjem času prevladuje uporaba masnospektrometričnih detektorjev, kljub temu pa se še vedno razvijajo analizne metode, ki uporabljajo detekcijo z UV/VIS spektrofotometri.

Masni spektrometri so sestavljeni iz treh pomembnejših sklopov, to so ionizator, masni analizator in detektor. Najpogostejša tehnika ionizacije je ionizacija v elektrospreju, polarnost pa je odvisna od vrste matriksa in fizikalno-kemijskih lastnosti izbranih analitov. Večina avtorjev se je odločila za pozitivni način ionizacije (Boner in sod., 2003; Daeseleire in sod., 2003; Feely in sod., 2002; Ngoh in sod., 2003), nekateri pa za negativni način (Gómez in sod., 2006; Hernando in sod., 2006).

Masni analizator je del instrumenta, v katerem se ionizirani analiti ločijo glede na razmerje mase in naboja (m/z). Poznamo več vrst masnih analizatorjev, med drugimi masne analizatorje na odklon, na čas leta, kvadropolne analizatorje in ionske pasti. Vsi »sestavljeni« masni analizatorji običajno vključujejo še trkalno (kolizijsko) celico, v kateri s kolizijskim plinom razbijemo v ionizatorju nastale ione na ionske produkte druge generacije. Nekateri masni analizatorji omogočajo spremljanje neskončnega števila teoretičnih oziroma do šest merljivih generacij ionskih razpadov. Najpogosteje uporabljan masni analizator pri tekočinski kromatografiji je kombinacija kvadropolov (Gómez in sod., 2006; Hernando in sod., 2006; Malone in sod., 2009; Zuccato in sod., 2005), ki omogoča spremljanje masnih prehodov in ne le osnovne mase ionov, nastalih v ionizatorju. S spremljanjem masnih prehodov si zagotovimo visoko selektivnost, kar dopušča hitrejšo in manj kakovostno kromatografsko ločbo brez zvišanja mej zaznavnosti in določitve. Igualada s sod. (2007) je edini, ki je pri analitiki ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin spremljal masne prehode do tretje generacije ionov, medtem ko je večina avtorjev merila masne prehode do druge generacije ionov. Peters s sod. (2009) je edini, ki je uporabil masni analizator na čas leta, sklopljen s kvadropolom in kolizijsko celico. V kombinaciji s plinsko kromatografijo je bil največkrat uporabljen kvadropol v načinu spremljanja izbranih ionov (SIM) (el Haj in sod., 1999; Kosjek in sod., 2005; Koutsouba in sod., 2003).

Za detekcijo se v masnih spektrometrih uporablja fotopomnoževalka oziroma fotodioda. Proizvajalec instrumenta največkrat razvije in optimizira samo eno vrsto detektorja v masnem spektrometru, zato uporabniki nimajo možnosti izbire ali pa menjava elementa ni ekonomsko upravičena.

Druga vrsta detekcije je uporaba UV/VIS spektrofotometra, ki je v splošnem najpogostejša pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (Gowik in sod., 1998; Ibrahim in sod., 2007; Ramos Payán in sod., 2009). Občutljivost teh detektorjev je v primerjavi z masnimi spektrometri nižja, vendar so avtorji z dodatnimi koraki priprave vzorcev razvili metode, ki se glede meje zaznavnosti in določitve lahko primerjajo z metodami, ki uporabljajo masnospektrometrične detektorje (Gowik in sod., 1998).

Albrecht in Thormann (1998) sta za detekcijo uporabila tehniko, imenovano z laserjem inducirana fluorescenca (LIF). Gre za vzbujanje molekul z uporabo laserja. Vzbujene molekule po določenem času (v razredu nanosekund do mikrosekund) zasvetijo (fluorescirajo). Sproščeno svetlobo izmerimo in prek nje določimo vsebnost analitov.

Tabela 5: Pregled nekaterih analiznih metod za določanje vsebnosti ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v živilih živalskega izvora in okoljskih vzorcih

Referenca	Matriks	Analiti	LOD	LOQ	Deriv.	Čiščenje	Analizna metoda	Mobilna faza	Detekcija
Pospíšilová in sod. (1995)	zdravila	kebuzon tribuzon fenilbutazon	20 µmol 20 µmol 20 µmol	n.p.	n.p.	n.p.	kapilarna isotahoforeza	n.p.	n.p.
Albrecht in Thormann (1998)	ledvice jetra	naproksen	0,7 ng/L	n.p.	n.p.	n.p.	elektrokinetična kapilarna kromatografija (MECC)	n.p.	z laserjem inducirana fluorescenca (LIF)
Wasfi in sod. (1998)	urin (kamela) serum (kamela)	fluniksin 5-OH-fluniksin	n.p.	n.p.	n.p.	- ekstrakcija tekoče – tekoče - preparativna TLC	GC HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 25 µm)	n.p.	MS Način snemanja: SIM
Cristófol in sod. (1998)	jetra mišice maščoba	indometacin	n.p.	20 µg/kg	n.p.	- ekstrakcija tekoče – tekoče	HPLC Spherisorb ODS-2 (200 mm x 3,9 mm x 5 µm)	A) acetonitril B) 0,5 % očetna k. v vodi izokratska elucija	UV/VIS
Goosen in sod. (1998)	plazma	indometacin ketoprofen piroksikam	n.p.	n.p.	n.p.	- ekstrakcija tekoče – tekoče	HPLC Novapak C ₁₈ (150 mm x 4 mm x 3,9 µm)	acetonitril : voda : očetna k. (50:46:4, v/v/v) izokratska elucija	UV/VIS
Gowik in sod., (1998)	plazma	salicilna k. oksifenbutazon fluniksin karprofen diklofenak niflmska k. fenilbutazon mefenamska k. vedaprofen	0,184 mg/kg 0,088 mg/kg 0,042 mg/kg 0,063 mg/kg 0,061 mg/kg 0,060 mg/kg 0,086 mg/kg 0,076 mg/kg 0,064 mg/kg	3,600 mg/kg 0,260 mg/kg 0,057 mg/kg 0,086 mg/kg 0,081 mg/kg 0,078 mg/kg 0,184 mg/kg 0,111 mg/kg 0,084 mg/kg	n.p.	- SPE (C ₁₈)	HPLC ODS-2 inertsil (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) 0,1 M očetna k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	UV/VIS

nadaljevanje tabele 5

Referenca	Matriks	Analiti	LOD	LOQ	Deriv.	Čiščenje	Analizna metoda	Mobilna faza	Detekcija
Panus in sod. (1998)	koža mišice fascia	ketoprofen	1 mg/kg	n.p.	n.p.	- ekstrakcija tekoče-tekoče	HPLC Novapak C ₁₈ (100 mm x 8 mm x 4 µm)	acetonitril : voda : ocetna k. : triethylamin (43:57:0,1:0,03, v/v/v/v)	UV/VIS
Radhofer-Welte in Dittrich (1998)	plazma	lornoksikam	n.p.	10 µg/kg	n.p.	- SPE (C ₁₈)	HPLC ODS Hypersil C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) fosfatni pufer (pH=6,0) B) metanol izokratska elucija	UV/VIS
el Haj in sod. (1999)	urin zdravila	acetilsalicilna k. salicilna k. ibuprofen ketoprofen diklofenak mefenamska k. indometacin naproksen	n.p.	n.p.	MSTFA	- ekstrakcija tekoče-tekoče	GC HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 25 µm)	n.p.	MS Način snemanja: SIM
Damiani in sod. (2001)	zdravila	ibuprofen	n.p.	2 mg/L	n.p.	- USP metode	HPLC Lichrocart RP-18 (125 mm x 4 mm x 5 µm)	A) fosfatni pufer (pH=2,5) B) acetonitril izokratska elucija	UV/VIS
Feely in sod. (2002)	mleko (govedo)	fluniksin 5-OH-fluniksin	n.p.	1 ppb 1 ppb	n.p.	- ekstrakcija tekoče-tekoče - SPE (Oasis HLB)	HPLC Zorbax C ₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) 0,4 % ocetna k. v vodi B) acetonitril : metanol (95:5, v/v) izokratska elucija	MS ² način snemanja: MRM

nadaljevanje tabele 5

Farrar in sod. (2002)	plazma	ibuprofen	1,56 ng/L	n.p.	n.p.	SPE (Oasis HLB 96 – well plate)	HPLC Symmetry C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) fosfatni pufer (pH=2,6) B) acetonitril izokratska elucija	UV/VIS
González Martín in sod. 2002	plazma	fenilbutazon	0,016 ng/L	0,029 ng/L	n.p.	– obarjanje proteinov z acetonitrilom	HPLC Lichrospher 60 RP Select B (250 mm x 4 mm x 5 µm)	A) 0,01 M očetna k. B) metanol izokratska elucija	UV/VIS
Daeseleire in sod. (2003)	mleko (govedo)	fluniksin 5-OH-fluniksin ketoprofen	0,5 µg/L 0,5 µg/L 1,0 µg/L	n.p.	n.p.	– obarjanje proteinov z acetonitrilom	HPLC Symmetry C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm x 5 µm)	A) 0,1 % mravljična k. v vodi B) 0,1 % mravljična k. v acetonitrilu gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM
Boner in sod. (2003)	ledvice (govedo) jetra (govedo) maščoba (govedo) mišice (govedo)	fluniksin	0,1 ppb 0,1 ppb 0,2 ppb 0,2 ppb	0,1 ppb 0,1 ppb 0,2 ppb 0,2 ppb	n.p.	– ekstrakcija tekoče – tekoče – SPE (Applied Separations SCX)	HPLC Zorbax C ₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) 0,4 % mravljična k. v vodi B) metanol C) 0,4 % mravljična k. v acetonitrilu gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM
Ngoh in sod. (2003)	mleko (govedo)	5-OH-fluniksin	0,18 ppb	0,50 ppb	n.p.	– ekstrakcija tekoče – tekoče – SPE (Applied Separations SCX)	HPLC Zorbax C ₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) 0,4 % očetna k. v vodi B) 0,2 % očetna k. v mešanici acetonitrila in metanola (35:10, v/v) gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM

nadaljevanje tabele 5

Referenca	Matriks	Analiti	LOD	LOQ	Deriv.	Čiščenje	Analizna metoda	Mobilna faza	Detekcija
Baert in De Backer (2003)	plazma	salicilna k.		0,3 ng/L		– ekstrakcija tekoče – tekoče	HPLC ODS-2 inertsil (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) 1 % ocetna k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	UV/VIS
		flunixin meloksikam	n.p.	0,05 ng/L 0,02 ng/L	n.p.		HPLC C ₁₈ (100 mm x 3 mm x 5 µm)		
Koutsouba in sod. (2003)	odpadne vode	diklofenak	1 ng/L	2 ng/L	PFBBr	– SPE (C ₁₈)	GC		MS
		ibuprofen fenazon klofibrična k.	0,6 ng/L 20 ng/L 1,5 ng/L	1,6 ng/L 60 ng/L 5 ng/L			HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 25 µm)	n.p.	Način snemanja: SIM
Rodríguez in sod. (2003)	odpadne vode	ibuprofen naproksen		20 ng/L 20 ng/L	MSTFA	– SPE (Oasis HLB)	GC		MS
		ketoprofen tolfenamska k. diklofenak	n.p.	50 ng/L 30 ng/L 50 ng/L			BP5 (30 m x 0,25 mm x 25 µm)	n.p.	Način snemanja: SIM
Sun in sod. (2003)	plazma zdravila	ketoprofen	11,5 µg/L			– ekstrakcija tekoče – tekoče	HPLC	A) metanol	UV/VIS
		flurbiprofen ibuprofen diklofenak naproksen fenoprofen	13,6 µg/L 42,8 µg/L 30 µg/L 75 µg/L 75 µg/L	n.p.	n.p.		ODS inertsil (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	B) tetrahydrofuran C) fosfatni pufer (pH=3,5) izokratska elucija	
Sabolovic in sod. (2004)	jetra prebavila	ketoprofen naproksen etodolac	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	HPLC Radial Pack C ₁₈ (100 mm x 10 mm)	A) 0,05 % trifluoroocetna k. v vodi A) acetonitril gradientna elucija	UV/VIS

nadaljevanje tabele 5

Kosjek in sod. (2005)	voda	ibuprofen naproksen ketoprofen diklofenak	1,96 ng/L 5,55 ng/L 2,12 ng/L 3,06 ng/L	20,3 ng/L 65,1 ng/L 20,9 ng/L 31,5 ng/L	MSTFA	- SPE (Strata X)	GC HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 25 µm)	n.p.	MS Način snemanja: SIM
Zuccato in sod. (2005)	voda	ibuprofen	n.p.	n.p.	n.p.	- SPE (Oasis MCX)	HPLC Luna C ₈ (50 mm x 2 mm x 3 µm)	A) 0,1 % mravljična k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM
Vinci in sod. (2006)	plazma serum	salicilati karprofen ketoprofen fenilbutazon oksifenbutazon flurbiprofen naproksen niflumska k. diklofenak ibuprofen tolfenamska k. mefenamska k. meclofenamska k. suksibutazon	n.p.	n.p.	n.p.	- SPE (C ₁₈)	HPLC MAX RP 80 (250 mm x 3 mm x 4 µm)	A) 0,1 % očetna k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM
Gómez in sod. (2006)	voda	paracetamol ibuprofen diklofenak mefenamska k. indometacin	47 ng/L 31 ng/L 30 ng/L 4 ng/L 26 ng/L	132 ng/L 86 ng/L 84 ng/L 11 ng/L 72 ng/L	n.p.	- SPE (Oasis HLB)	HPLC Purospher Star RP-18 (125 mm x 2 mm x 5 µm)	A) 0,1 % mravljična k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM
Hernando in sod. (2006)	voda	ibuprofen diklofenak naproksen ketoprofen	12 ng/L 7 ng/L 26 ng/L 26 ng/L	42 ng/L 20 ng/L 75 ng/L 75 ng/L	n.p.	- SPE (Isolute C ₁₈)	HPLC Purospher Star RP-18 (125 mm x 2 mm x 5 µm)	A) voda B) metanol gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM

nadaljevanje tabele 5

Referenca	Matriks	Analiti	LOD	LOQ	Deriv.	Čiščenje	Analizna metoda	Mobilna faza	Detekcija
Antonić in Heath (2007)	usedline	ibuprofen	0,60 mg/kg	0,21 mg/kg	MSTFA	- ekstrakcija s Soxhletovim aparatom	GC	n.p.	MS
		naproksen	0,05 mg/kg	0,15 mg/kg		- ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami	Zebtron ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 25 µm)		Način snemanja: SIM
		ketoprofen	0,08 mg/kg	0,25 mg/kg		- ekstrakcija z ultrazvokom			
		diklofenak	0,03 mg/kg	0,10 mg/kg		- ekstrakcija z mikrovalovi			
Igalada in sod. (2007)	ledvice	meloksikam	76 µg/kg	86 µg/kg		- ekstrakcija tekoče-tekoče	HPLC	A) 10 mM mravljična k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	MS ³ način snemanja: MRM
		fluniksin	359 µg/kg	418 µg/kg			Xterra C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm x 5 µm)		
	mišice	karprofen	1090 µg/kg	1193 µg/kg	n.p.				
		tolfenamska k.	486 µg/kg	568 µg/kg					
		meloksikam	25 µg/kg	35 µg/kg					
		fluniksin	25 µg/kg	31 µg/kg					
Ibrahim in sod. (2007)	serum zdravlila	karprofen	584 µg/kg	667 µg/kg					
		tolfenamska k.	66 µg/kg	82 µg/kg					
		piroksikam	0,075 µM	0,15 µM		- obarjanje proteinov s fosfatnim pufrom	HPLC	A) 0,1 % H ₃ PO ₄ v vodi B) acetonitril gradientna elucija	UV/VIS
		mefenamska k.	0,1 µM	0,2 µM	n.p.		C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)		
Suárez in sod. (2007)	urin	acetilsalicilna k.	13,9 µM	27,8 µM					
		ketoprofen	1,9 µg/L	6,3 µg/L			kapilarna elektroforeza		MS
		tolmetin	1,6 µg/L	5,3 µg/L	n.p.	n.p.		n.p.	
		indometacin	2,6 µg/L	8,6 µg/L					
Taggart in sod. (2007)	jetra	diklofenak	4 µg/kg	10 µg/kg	n.p.	- ekstrakcija tekoče-tekoče	HPLC	A) 0,1 % očetna k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	MS Način snemanja: SIM
							Xterra MS C ₁₈ (150 mm x 3,9 mm x 5 µm)		

nadaljevanje tabele 5

Gallo in sod. (2008)	mleko	salicilati 5-OH-fluniksin fluniksin ketoprofen naproksen oksifenbutazon karprofen flurbiprofen suksibutazon niflumska k. diklofenak ibuprofen fenilbutazon mefenamska k. meklofenamska k. tolfenamska k.	n.p.	4 µg/L 5 µg/L 5 µg/L 3 µg/L 2 µg/L 5 µg/L 2 µg/L 4 µg/L 4 µg/L 2 µg/L 4 µg/L 5 µg/L 15 µg/L 4 µg/L 4 µg/L 4 µg/L	n.p.	- SPE (C ₁₈)	HPLC MAX RP 80 (250 mm x 3 mm x 4 µm)	A) 0,1 % očetna k. v vodi B) acetonitril gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM
Jedziniak in sod. (2009)	mleko	MAA 5-OH-fluniksin karprofen diklofenak fluniksin meloksikam oksifenbutazon fenilbutazon tolfenamska k. vedaprofen	10 µg/kg 0,5 µg/kg 10 µg/kg 1,5 µg/kg 0,5 µg/kg 1 µg/kg 10 µg/kg 5 µg/kg 1,5 µg/kg 2 µg/kg	15 µg/kg 0,7 µg/kg 20 µg/kg 3,5 µg/kg 0,7 µg/kg 2,5 µg/kg 20 µg/kg 10 µg/kg 4,5 µg/kg 5,5 µg/kg	n.p.	- ekstrakcija tekoče- tekoče	HPLC Inertsil ODS-3 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	A) 0,05 M amonijev acetat v vodi B) acetonitril gradientna elucija	UV/VIS
Dowling in sod. (2009)	mleko	karprofen diklofenak mefenamska k. fenilbutazon naproksen niflumska k. oksifenbutazon suksibutazon	0,46 µg/L 1,08 µg/L 0,92 µg/L 0,55 µg/L 1,29 µg/L 1,26 µg/L 2,12 µg/L 2,86 µg/L	0,79 µg/L 1,85 µg/L 1,56 µg/L 0,94 µg/L 2,19 µg/L 2,15 µg/L 3,62 µg/L 4,87 µg/L	n.p.	- ekstrakcija tekoče- tekoče - SPE (Evolute ABN)	HPLC Eclipse Plus C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm)	A) voda : acetonitril (9:1, v/v) + 1 mM očetne k. B) acetonitril gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM

nadaljevanje tabele 5

Referenca	Matriks	Analiti	LOD	LOQ	Deriv.	Čiščenje	Analizna metoda	Mobilna faza	Detekcija
Peters in sod. (2009)	jajca	piroksikam		131 µg/kg		- SPE (Strata X)	UPLC BEH C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm)	0,1 % mravljična k. v vodi 0,1 % mravljična k. v acetonitrilu gradientna elucija	MS ² način snemanja: Q-TOF/ MRM
	ribe	propifenazon		44 µg/kg					
	mišice	indoprofen		53 µg/kg					
		tolmetin		125 µg/kg					
		ketoprofen		138 µg/kg					
		naproksen		307 µg/kg					
		fenbufen		145 µg/kg					
		karprofen		1252 µg/kg					
		diklofenak		207 µg/kg					
		niflumska k.		131 µg/kg					
		fenilbutazon		241 µg/kg					
		flufenamska k.	n.p.	181 µg/kg	n.p.				
		mefenamska k.		209 µg/kg					
		meklofenamska k.		206 µg/kg					
		izopirin		150 µg/kg					
		izoksikam		129 µg/kg					
		tenoksikam		145 µg/kg					
Campanella in sod. (2009)	mleko	sulindak		145 µg/kg		n.p.	n.p.	n.p.	biosenzor
		indometacin		179 µg/kg					
		fluniksin		119 µg/kg					
		meloksikam		49 µg/kg					
		fenoprofen		159 µg/kg					
		tolfenamska k.		410 µg/kg					
		naproksen	50 nmol/L						
		diklofenak	50 nmol/L						
		ibuprofen	5 nmol/L	n.p.	n.p.				
		tolmetin	5 nmol/L						
Ramos Payán in sod. (2009)	n.p.	ibuprofen	673,4 µg/L			- mikroekstrakcija tekoče faze z votlimi nanocevkami	HPLC Chromolith RP-18e (100 mm x 4,6 mm)	A) 0,1 % mravljična k. v vodi B) metanol gradientna elucija	UV/VIS
		diklofenak	314,1 µg/L	n.p.	n.p.				
		salicilna k.	155,5 µg/L						

nadaljevanje tabele 5

Malone in sod. (2009)	mleko (govedo)	tolfenamska k. 5-OH-fluniksin meloksikam MAA	53,05 µg/L 45,04 µg/L 15,82 µg/L 61,39 µg/L	56,10 µg/L 50,08 µg/L 16,64 µg/L 72,78 µg/L	n.p.	- obarjanje proteinov z acetoni-trilom - razmastitev s heksanom	HPLC Symmetry C ₈ (150 mm x 3,9 mm x 5 µm)	A) 1,5 mM amonijev acetat v vodi B) acetoni-tril gradientna elucija	MS ² način snemanja: MRM
-----------------------	----------------	---	--	--	------	--	--	---	--

Deriv. – derivatizacija; k. – kislina; UV/VIS – spektrofotometrična detekcija v ultravijoličnem in vidnem delu spektra; MS – detekcija z masnim spektrometrom; SIM – snemanje izbranih ionov (ang. selected (single) ion monitoring); MRM – spremljanje masnih prehodov (ang. multiple reaction monitoring); Q-TOF – masno spektrometrična detekcija z merjenjem časa leta (ang. time of flight), sklopljena s kvadropolom; SPE – ekstrakcija na trdni fazi (ang. solid phase extraction); MAA – 4-methylamino antipyrrene; TLC – tankoplastna kromatografija (ang. thin layer chromatography); LOD – meja zaznavnosti (ang. limit of detection); LOQ – meja vrednotenja (ang. limit of quantification); n.p. – ni podatka

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSA NA ŽIVALIH

Poskusa smo izvedli na ovcah, ki so bile nastanjene na Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. Živali najmanj pol leta pred poskusoma niso prejele ivermektina oziroma doramektina.

Živali so bile pred poskusom oddvojeno nastanjene v hlevu. Hranjene so bile s krmo za ovce v obliki briketov »Ovce 18« (Pivka) v odrejeni količini, po želji pa so prejemale seno in vodo. Oba poskusa na živalih smo izvedli v spomladanskem času (april–maj), tj. v zgodnji laktacijski dobi.

3.1.1 POSKUS ŠT. 1 – VPLIV VERAPAMILA NA FARMAKOKINETIKO AVERMEKTINOV PRI OVCAH IN UGOTAVLJANJE VLOGE P-GLIKOPROTEINA PRI PREHODU AVERMEKTINOV IZ KRVNE PLAZME V MLEKO

3.1.1.1 ŽIVALI

Za poskus smo glede na zdravstveno stanje živali odbrali 26 ovc pasme istrska pramenka (slika 21) starosti 2 do 6 let (povprečje 3,8 let). Izmerili smo jim telesno temperaturo, ki je bila med 38,5 in 39,3 °C (povprečje 38,9 °C). Živali so tehtale od 47 do 67 kg (povprečje 56 kg). Preverjali smo še srčni utrip, ruminacijo in dihanje, opravili pa smo tudi parazitološke in hematološke preiskave.



Slika 21: Istrski pramenki

Pri dveh živalih, ki sta bili predvideni za poskus, smo ugotovili rahlo hipohromijo in pri dveh živalih spodnjo mejno vrednost hemoglobina. Pri dveh živalih smo ugotovili rahlo levkocitozo in pri eni levkopenijo. Pri eni ovci smo ugotovili rahlo nevtrofilijo. Pri več živalih je bila ugotovljena trombocitopenija, katere vzroka nam ni uspelo odkriti. Zaradi možnih napak pri določanju števila trombocitov smo navedene živali nadzirali in iskali klinične znake obolenja, ki pa se med poskusom niso pokazali.

Parazitološka preiskava je odkrila invadiranost s trematodi pri 11 živalih, z nematodi pri 3 živalih in z enoceličarji (*Eimerio*) pri 13 živalih. Moč invazije je bila pri vseh živalih pod mejnimi vrednostmi.

Kljub nekaterim izstopanjem pri hematološki in parazitološki sliki je bilo splošno zdravstveno stanje živali dobro. Za izvedbo poskusa smo potrebovali 26 živali, zato smo izmed 30 živali, pri katerih smo opravili preiskave, 4 živali izločili iz poskusa, dve pa smo uporabili kot »slepi« za kontrolo poskusa. Ti dve ovci nista prejeli nobenega zdravila, služili sta za odvzem slepih vzorcev in za ugotavljanje morebitnih navzkrižnih kontaminacij med poskusnimi živalmi.

3.1.1.2 STRUKTURA POSKUSA IN RAZDELITEV ŽIVALI

V poskusu smo imeli 5 skupin ovc; 4 skupine s po 6 ovcami in eno skupino dveh ovc.

V prvo skupino, označeno z »IVM«, je bilo vključenih 6 ovc, ki so prejele ivermektin v enkratnem odmerku 0,2 mg/kg t. m.

V drugo skupino, označeno z »DOR«, je bilo vključenih 6 ovc, ki so prejele doramektin v enkratnem odmerku 0,2 mg/kg t. m.

V tretjo skupino, označeno z »IVM+VER«, je bilo vključenih 6 ovc, ki so prejele ivermektin v enkratnem odmerku 0,2 mg/kg t. m. in verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

V četrto skupino, označeno z »DOR+VER«, je bilo vključenih 6 ovc, ki so prejele doramektin v enkratnem odmerku 0,2 mg/kg t. m. in verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

V peto skupino sta bili vključeni 2 ovci in je služila kot kontrolna skupina za nadzor morebitne navzkrižne kontaminacije med oddvojenimi živalmi.

3.1.1.3 VNOS ZDRAVIL

Učinkovine smo živalim vnesli podkožno glede na njihovo telesno maso.

Verapamil smo vnesli tik pred vnosom, 12 ur po vnosu in 24 ur po vnosu ivermektina oziroma doramektina.

Ivermektin smo vnesli v obliki injekcijske raztopine Ivomec® (Merial, Francija). Volumni injiciranja so bili po posameznih živalih med 0,98 in 1,22 mL. Doramektin smo vnesli v obliki raztopine za injiciranje Dectomax™ (Pfizer Animal Health S.A., Francija), volumni injiciranja pa so bili po posameznih živalih med 0,94 in 1,34 mL. Verapamil smo vnesli kot raztopino verapamila v fiziološki raztopini koncentracije 20 mg/mL. Volumni injiciranja so bili po posameznih živalih med 7,35 in 9,5 mL.

3.1.1.4 ODVZEM VZORCEV ZA ANALIZO

Živalim smo odvezemali vzorce krvi in mleka 0. (pred vnosi učinkovin), 0,5. (pred drugim vnosom verapamila), 1. (pred tretjim vnosom verapamila), 2., 3., 4., 5., 7., 9., 11., 14., 17., 20., 23., 26., in 30. dan po vnosu ivermektina oziroma doramektina. Ovce so bile oddvojene od jagnjet večer pred načrtovanim vzorčenjem mleka, kar nam je zagotovilo dovolj velik volumen vzorcev.

Kri smo odvezemali vakuumsko iz vratne vene (približno 24 mL krvi na vzorec) v 8 mL sterilne epruvete Vacuette (Greiner, Avstrija), ki so vsebovale antikoagulant litijev heparin in separacijski gel. Vzorce smo takoj po odvzemu ročno mešali približno 1 minuto in nato shranili v hladilni torbi na 4 °C do prinosa v laboratorij, kjer smo kri centrifugirali 10 minut pri 4000 obratih/minuto in oddvojeno plazmo shranili v polipropilenskih epruvetah pri –20 °C do analize. Od vsake ovce smo dobili približno 12–15 mL krvne plazme.

Mleko smo namolžli v polipropilenske prahovke z dvojnim pokrovom. Volumen vzorcev je bil približno 100 mL. Vzorce smo takoj po odvzemu shranili v hladilni torbi na 4 °C do prinosa v laboratorij, kjer smo jih zamrznili na –20 °C do analize.

3.1.2 POSKUS ŠT. 2 – VSEBNOST EPRINOMEKTINA V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH

3.1.2.1 ŽIVALI

Odbrali smo 30 ovc pasme istrska pramenka v laktaciji (brez jagnjet). Skupino smo želeli imeti čim bolj homogeno, kar se tiče starosti živali. Razpon starosti je bil med 3 in 7 let (povprečje 4,33 let). Izmerili smo jim telesno temperaturo, ki je bila med 37,9 in 39,2 °C. Živali so tehtale od 41,5 do 69,0 kg (povprečje 52,5 kg). Kontrolirali smo jim tudi srčni utrip, ruminacijo in dihanje.

Glede na dobre zdravstvene izvide parazitoloških in hematoloških preiskav iz prvega poskusa tokrat teh analiz nismo opravili.

Preverili smo še mlečnost živali, da smo si lahko zagotovili dovolj velike vzorce mleka za predelavo v mlečne izdelke.

3.1.2.2 VNOS EPRINOMEKTINA

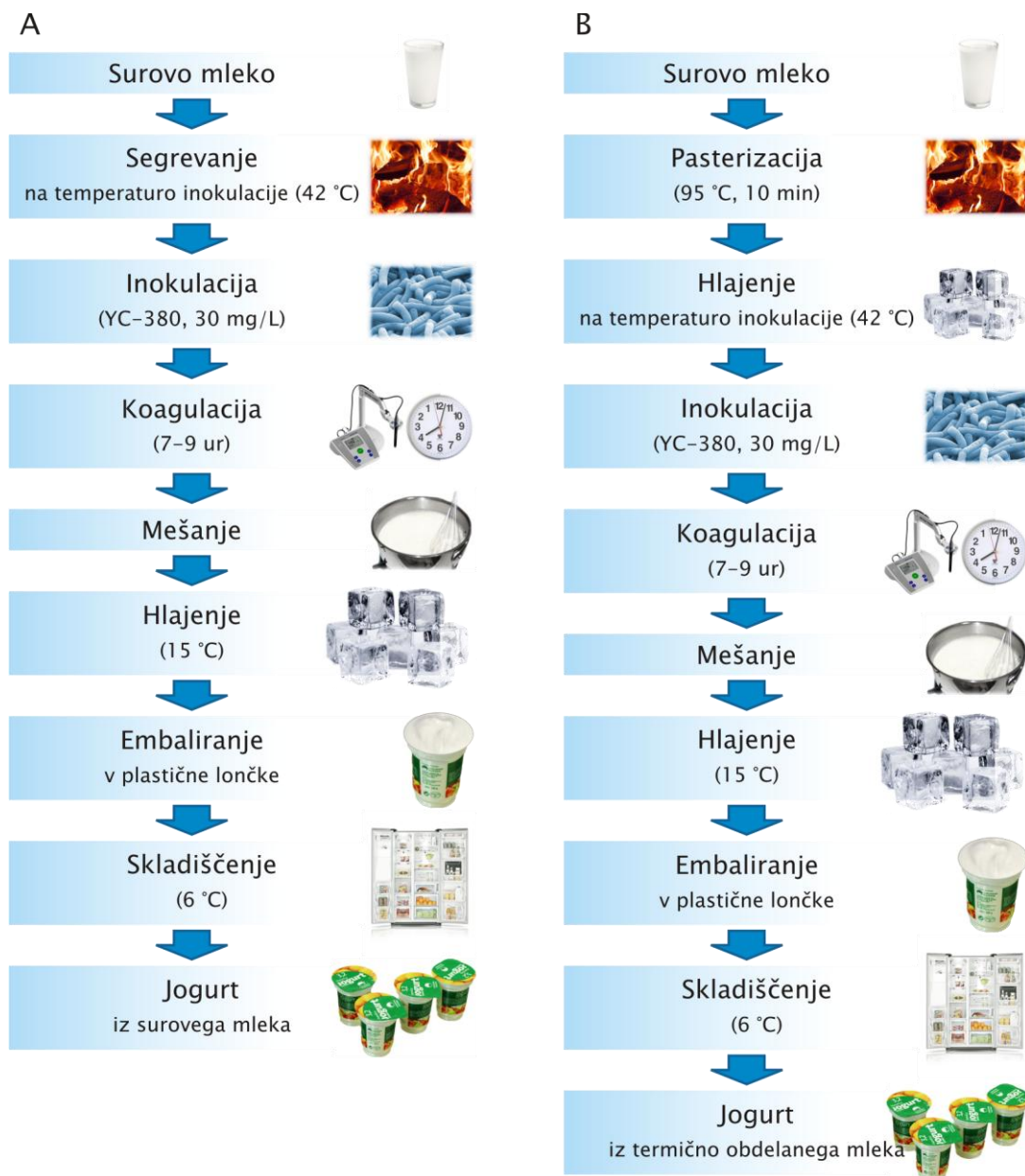
Ovce smo ostrigli v pasu od 5 do 8 cm vzdolž hrbtenice, od vihra do korena repa, na dolžino dlake največ 5 mm. Po tehtanju smo živalim na ostriženi pas kože vnesli eprinomektin v obliki kožnega poliva Eprinex® pour-on (MSD B.V. AGVET, Nizozemska) v odmerku 1 mg/kg t. m. Volumni poliva so bili po posameznih živalih med 8,3 in 13,8 mL.

3.1.2.3 ODVZEM VZORCEV ZA PREDELAVO V MLEČNE IZDELKE

Vnos zdravila je potekal zjutraj, skupne vzorce mleka pa smo odvezemali z večerno (prejšnji dan) in jutranjo molžo in vsakič smo ju združili. Združeni vzorec večernega mleka na dan vnosa zdravila z jutranjim vzorcem naslednjega dne smo poimenovali vzorec 1. dne, sledili pa so identični odvzemi 2., 3., 4., 7., 10., 14., 18., 23., 30., 37. in 44. dne. Ovcam smo odvzeli

skupni vzorec tudi pred vnosom učinkovine in ga poimenovali »slepi« vzorec oziroma vzorec 0. dne. Skupno smo odvzeli vzorce mleka trinajstkrat, vsakič približno 20 L.

Večerno molžo smo ohladili na 4 do 8 °C do naslednjega dne, ko smo jo združili z jutranjo molžo in v kovinski t. i. mlekarški kanti prepeljali na Inštitut za mlekarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so ga predelali v zelene mlečne izdelke. Pred predelavo smo odvzeli alikvot vzorca mleka (približno 0,5 L), ki smo ga v polipropilenskih prahovkah z dvojnim pokrovom zamrznili na –20 °C do analize.



Slika 22: Shema tehnološkega postopka izdelave tekočega jogurta iz surovega (A) in termično obdelanega (B) mleka

3.2 PREDELAVA MLEKA V MLEČNE IZDELKE

Predelava mleka v mlečne izdelke je potekala na Inštitutu za mlekarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Iz mleka, odvzetega pri drugem poskusu, smo izdelali osem različnih mlečnih izdelkov, to so bili tekoči jogurt iz surovega in termično obdelanega mleka, poltrdi sir, ki smo ga vzorčili takoj po izdelavi (sveži sir) in poltrda sira, zorena 30 in 60 dni. Takoj po izdelavi sirov smo odvzeli vzorec sirotke kot stranskega proizvoda pri izdelavi sira (primarna sirotka). Iz te sirotke smo izdelali albuminsko skuto, kot stranski proizvod pa smo dobili sekundarno sirotko, ki smo jo vzorčili takoj po izdelavi albuminske skute. Skupaj z mlekom smo imeli devet različnih matrikov.

3.2.1 TEHNOLOŠKI POSTOPEK IZDELAVE TEKOČEGA JOGURTA

Izdelali smo tekoči jogurt iz surovega in termično obdelanega mleka. Pri termični obdelavi smo mleko segreli na 95 °C za 10 minut in ohladili na inokulacijsko temperaturo 42 °C. Za izdelavo jogurta iz surovega mleka smo mleko segreli na 42 °C.

Pri 42 °C smo mleku dodali startersko kulturo za jogurt *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Yoghurt Culture YC-380, Chr. Hansen, Danska) in po 7–9 urah je mleko koaguliralo. Vrednost pH je bila 4,6. Koagulum smo premešali, hitro ohladili na 15 °C in prenesli v plastične lončke. Tako pripravljen jogurt smo ohladili na temperaturo skladiščenja (6 °C).

Shema opisanega postopka je prikazana na sliki 22.

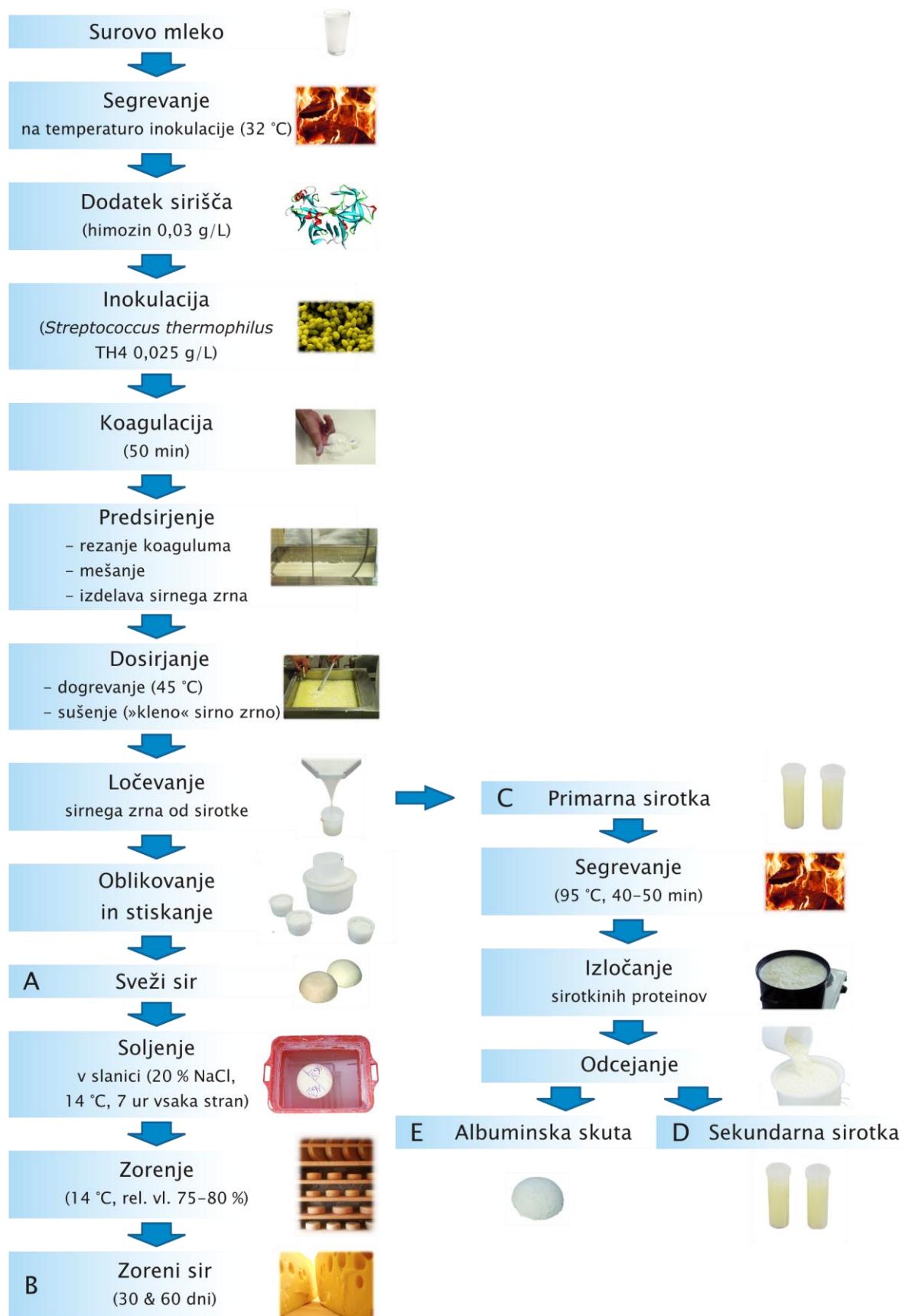
3.2.2 TEHNOLOŠKI POSTOPEK IZDELAVE POLTRDEGA SIRA

Po odvzemu mleka za predelavo v jogurt smo preostalo mleko predelali v sire, sirotki in albuminsko skuto.

Mleko smo segreli na temperaturo inokulacije (32 °C) in dodali startersko kulturo *Streptococcus thermophilus* (TH 4, Chr. Hansen, Danska) in sirišče (100 % himozin, Chymogen, Chr. Hansen, Danska). Ko je mleko koaguliralo (približno 50 minut) smo pričeli z obdelavo koaguluma. Vsebinsko sirarskega kotla smo postopoma segreli na 45 °C. Ko je postalo sirno zrno »kleno«, smo ga ločili od primarne sirotke, prenesli v oblikovala in ga stiskali do vrednosti pH 5,4 (sveži sir). Sir smo nasolili v slanici (20 % NaCl, pH 5,4, 14 °C, 7 ur na vsaki strani hlebca) in zorili pri 14 °C in relativni zračni vlažnosti 75–80 %. Po 30 dneh zorenja smo hlebec prerezali na pol: eno polovico smo zamrznili in je služila kot vzorec sira, zorenega 30 dni, drugo polovico pa smo na izpostavljeni površini prekrili z zaščitno plastjo in ga zoreli še 30 dni. Tako pripravljen sir je služil kot vzorec sira, zorenega 60 dni.

Primarno sirotko smo segreli na 95 °C (40–50 minut) in po koagulaciji albuminov izdelali albuminsko skuto, stranski proizvod pa je bila sekundarna sirotka.

Shema opisanega postopka je prikazana na sliki 23.

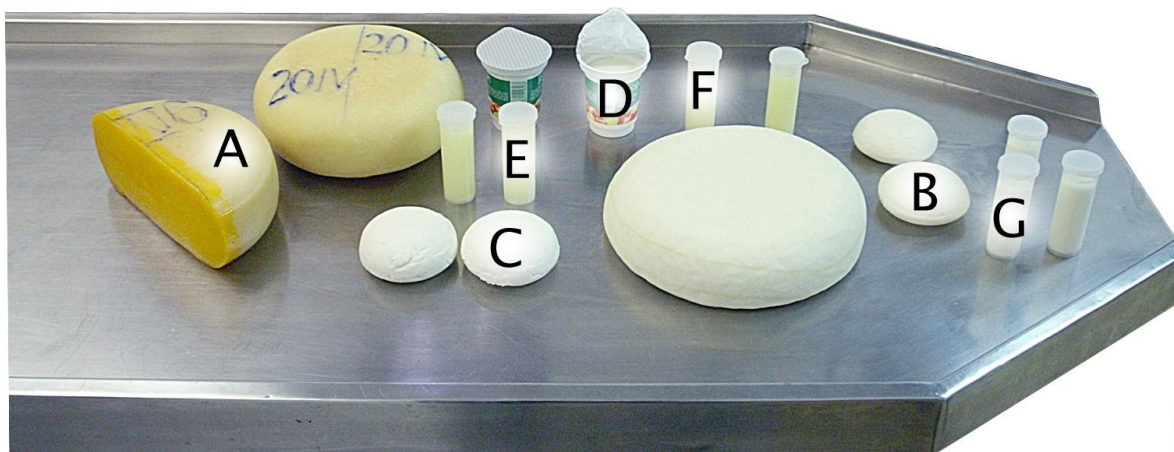


Slika 23: Shema tehnološkega postopka izdelave poltrdih svežih (A) in zorenih (30 in 60 dni) (B) sirov, primarne (C) in sekundarne (D) sirotke ter albuminske skute (E)

3.2.3 VZORČENJE IN HRANJENJE MLEČNIH IZDELKOV

Mleko:	100 mL alikvote mleka smo shranili v plastičnih lončkih (100 mL) s pokrovom (Kavčič s.p., Slovenija).
Jogurt:	jogurt iz surovega in toplotno obdelanega mleka smo shranili v jogurtovih lončkih. Volumen vzorca je bil približno 400 mL.
Sveži sir:	vzorke svežega sira smo odvzeli takoj po stiskanju sirišča. Premer hlebčkov je v povprečju meril 10 cm, višina je bila 5 cm, povprečna masa pa 250 g.
Zoreni sir:	prvotni hlebci so v povprečju merili 30 cm v premeru in imeli 10 cm višine. Po 30 dneh je vsaka od polovic tehtala približno 1200 g.
Sirotk:	aliquote 250 mL primarne in sekundarne sirotke smo vzorčili v plastične lončke (50 mL) s pokrovom (Kavčič s.p., Slovenija).
Albuminska skuta:	po gretju primarne sirotke smo pridobljeno skuto ločili od sekundarne sirotke in jo oblikovali v hlebčke podobnih dimenzij kot sveži sir z maso približno 200 g.

Vzorke sirov in albuminske skute smo najprej zamrznili, jih homogenizirali z mletjem in shranili pri -20°C do analize. Vzorke mleka, jogurtov in sirotk (slika 24) smo shranili pri -20°C do analize.



Slika 24: Vzorci sirov (zoren (A) in sveži (B)), albuminske skute (C), jogurtov (D), sirotk (E in F) in mleka (G)

3.3 ANALIZNA METODA DOLOČANJA OSTANKOV AVERMEKTINOV V KRVNI PLAZMI, MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH

Vsebnost ostankov ivermektina, doramektina in eprinomektina smo določali z analizo metodo, ki je bila v osnovi kombinacija dveh objavljenih metod (Cerkvenik, 2001; Danaher in sod., 2001b). Dodali smo še nekaj modifikacij, ki so bile prvič uporabljene pri uvedbi analizne metode določanja ostankov eprinomektina (Hodošek, 2008) in nadgrajene kot multimetoda določanja ostankov makrocikličnih laktonov (Cerkvenik-Flajs in sod., 2008; Cerkvenik-Flajs in sod., 2010).

3.3.1 OSNOVNE FAZE ANALIZNEGA POSTOPKA

Uporabili smo analizni postopek, prikazan na sliki 25.



Slika 25: Temeljne faze analiznega postopka ugotavljanja ostankov avermektinov v krvni plazmi, mleku in mlečnih izdelkih

3.3.2 MATRIKSI

Ostanke avermektinov smo določali v ovčji krvni plazmi, ovčjem mleku in mlečnih izdelkih. Pred analizo smo vzorce odtajali in homogenizirali.

3.3.3 OPREMA

3.3.3.1 LABORATORIJSKI PRIBOR

Poleg običajne laboratorijske opreme smo potrebovali še:

- vrečke za gnetilnik (»Stomacher«) dimenzij 30 cm x 19 cm (Kavčič s.p., Slovenija)
- polipropilenske centrifugirke 50 mL, dimenzij 115 x 28 mm, s pokrovčki (62.559, Sarstedt, Nemčija)
- polipropilenske centrifugirke 15 mL, dimenzij 120 x 17 mm, s pokrovčki (62.554, Sarstedt, Nemčija)
- polipropilenske merilne bučke 50 mL (36028, Brand, Nemčija)
- precizne avtomatske pipete s plastičnimi nastavki:
 - 20-200 µL: Research (4752986 in 3915153, obe Eppendorf, Nemčija)
 - 50 µL: Reference (349570, Eppendorf, Nemčija)
 - 100 µL: Reference (206271, Eppendorf, Nemčija) in Proline (DS72375, Biohit, Finska)
 - 100-1000 µL: Research (247588, Eppendorf, Nemčija) in mLine (MU11096, Biohit, Finska)
- pribor za ekstrakcijo na trdni fazi:
 - ekstrakcijske (SPE) kolone (7087-06, Bakerbond C₈; 6 mL, 500 mg, J.T. Baker, Nizozemska)
 - aparature za ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) – vacuum manifold (12 in 24 mest) (57030-U, Visiprep in 57250-U, Visiprep 24, obe Supelco, ZDA)
 - polietilenski rezervoarji za SPE 60 mL (57022, Supelco, ZDA)
 - adapterji (57020-U, Supelco, ZDA)
- pribor za filtriranje mobilne faze (58061, Supelco, ZDA)
- viala, temne, silanizirane, 2 mL (5183-4509, Agilent, ZDA) s »snap« pokrovčki (C4011-54B, National Scientific, ZDA)

3.3.3.2 APARATURE

- analizne tehtnice:
 - ± 0,1 mg / ± 0,01 mg (AT201 in XP205 DeltaRange, obe Mettler Toledo, Švica)
 - ± 1 mg (PB303 in PB303-S, Mettler Toledo, Švica)
 - ± 0,1 g (EB-3000D, Tehnica, Slovenija)
- gnetilnik »Stomacher« (400, Colworth, Velika Britanija in Iskra Prins, Slovenija)
- stresalnik (Vibromix 114, Tehnica, Slovenija)
- horizontalni stresalnik (Vibromix 314 EVT, Tehnica, Slovenija)
- ultrazvočna kopel (Sonis 4 in Sonis 10, obe Iskra, Slovenija)
- centrifuga (Minifuge T in Multifuge 3 S-R, obe Heraeus, Nemčija)
- evaporator (N-Evap 111, Organomation Associates, ZDA in Evaporator, Liebsch, Nemčija)
- sušilnik (Kelvitron t, Heraeus, Nemčija)

3.3.3.3 SISTEM HPLC

Agilent Technologies (ZDA) 1100 Series:

- kvarтерна črpalka (G1311A, Agilent Technologies, ZDA)
- razplinjevalec (G1322A, Agilent Technologies, ZDA)
- avtomatski injektor (G1329A, Agilent Technologies, ZDA)
- temperaturno kontrolirana plošča za vzorce (G1330A, Agilent Technologies, ZDA)
- termostat za kolone (G1316A, Agilent Technologies, ZDA)
- fluorescenčni detektor (G1321A, Agilent Technologies, ZDA)
- programska oprema Chemstation (G2170AA in G2180AA, Agilent Technologies, ZDA)

Analizna kolona (58991; Supelcosil LC-8-DB; 150 x 4,6 mm; delci velikosti 3 μ m, Supelco, ZDA)

Predkolona (59553; Supelcosil LC-8-DB Supelguard (z ohišjem) oziroma 59563 (samo kolona); 20 x 4,6 mm; delci velikosti 5 μ m, Supelco, ZDA)

3.3.4 REAGENTI

3.3.4.1 KEMIKAJIJE

- deionizirana voda (H_2O)
- acetonitril (MeCN) (9017, Ultra Gradient HPLC Grade, J.T. Baker, Nizozemska)
- metanol (MeOH) (8402, HPLC Gradient Grade, J.T. Baker, Nizozemska)
- trietilamin (TEA) (8.08352.0100, P.A., Merck, ZDA)
- *N*-metilimidazol (8.05852.0100, P.A., Merck, ZDA)
- anhidrid trifluorocetne kisline (TFAA) (8.08261.0025, P.A., Merck, ZDA)
- očetna kislina (AcOH) (1.00063.1000, 100 %, Merck, ZDA)
- reagent za silaniziranje stekla (33065-U, Sylon CT, 5 % DMDCS in toluene, Supelco, ZDA)

3.3.4.2 RAZTOPINE

- Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)
 - 30 % MeCN (v/v) mešanica za kondicioniranje ekstrakcijskih kolonic
 $H_2O : MeCN : TEA = 700 : 300 : 1$ (v/v/v)
 700 mL deionizirane vode smo zmešali s 300 mL MeCN in 1 mL TEA.
 - 50 % MeCN (v/v) mešanica za spiranje ekstrakcijskih kolonic
 $H_2O : MeCN : TEA = 500 : 500 : 1$ (v/v/v)
 500 mL deionizirane vode smo zmešali s 500 mL MeCN in 1 mL TEA.
- Derivatizacija
 - *N*-metilimidazol : MeCN = 1 : 1 (v/v)
 V polipropilensko epruveto smo odpipetirali 2 mL *N*-metilimidazola in 2 mL MeCN, epruveto zaprli in premešali.
 Raztopina je bila stabilna približno en teden v hladilniku (4 °C).
 - TFAA : MeCN = 1 : 2 (v/v)
 V polipropilensko epruveto smo odpipetirali 2 mL TFAA in 4 mL MeCN, epruveto zaprli in premešali.
 Raztopina je bila stabilna približno en teden v hladilniku.

- Mobilne faze za kromatografijo
 - 7 % H₂O v 1 : 1 (v/v) mešanici MeOH in MeCN
Zmešali smo 465 mL MeOH, 465 mL MeCN in 70 mL deionizirane vode. Mešanico smo prefiltrirali in razplinili pod vakuumom.
 - 8 % H₂O v 1 : 1 (v/v) mešanici MeOH in MeCN
Zmešali smo 460 mL MeOH, 460 mL MeCN in 80 mL deionizirane vode. Mešanico smo prefiltrirali in razplinili pod vakuumom.
 - 15 % H₂O v 1 : 1 (v/v) mešanici MeOH in MeCN
Zmešali smo 425 mL MeOH, 425 mL MeCN in 150 mL deionizirane vode. Mešanico smo prefiltrirali in razplinili pod vakuumom.

3.3.5 STANDARDI

3.3.5.1 OSNOVNE SPOJINE (REFERENČNI STANDARDI) V OBLIKI PRAŠKA

ivermektin (C14488000, 92 % (w/w), Dr. Ehrenstorfer, Nemčija)
doramektin (CA13083000, 96 % (w/w), Dr. Ehrenstorfer, Nemčija)
eprinomektin (CA13187000, 91 % (w/w), Dr. Ehrenstorfer, Nemčija)

3.3.5.2 STANDARDNE RAZTOPINE

Pripravili smo jih v temnih steklenih bučkah s steklenimi zamaški, ki smo jih pred prvo uporabo silanizirali.

Kot topilo smo uporabili MeCN.

Raztopine smo hranili v hladilniku (4 °C).

Pred uporabo smo bučke z standardnimi raztopinami segreli na sobno temperaturo.

- Osnovne raztopine: 100 µg/mL
Odtehtali smo 5 mg učinkovine, jo kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko in dopolnili s topilom do oznake.
- Delovne raztopine: ivermektin, doramektin 0,3–0,0005 µg/mL; eprinomektin 0,5–0,0005 µg/mL

Pripravljali smo jih iz osnovnih raztopin, običajno prek vmesnih redčitev. Koncentracije spojin smo prilagodili preučevanemu matriksu in pričakovanim vrednostim. Delovne raztopine smo pripravili za dodajanje slepim vzorcem (določanje izkoristka) in za pripravo umeritvenih krivulj.

3.3.6 POSTOPEK

Delo je potekalo v serijah in je trajalo 2 dni na serijo (12–48 vzorcev). Prvi dan smo izvedli ekstrakcijo in čiščenje vzorca, drugi dan pa koncentriranje, derivatizacijo in HPLC. V vsaki seriji smo imeli še vsaj dve paralelki slepega vzorca, ki smo jima dodali znano količino analita (za določanje izkoristka) in en slepi vzorec.

3.3.6.1 EKSTRAKCIJA

- Homogenizirane vzorce smo segreli na sobno temperaturo. V 50 mL polipropilenske centrifugirke smo natehtali $5,0 \pm 0,1$ g vzorca, pri krvni plazmi pa smo napipetirali $4,00 \pm 0,01$ mL. Sire smo natehtali v t. i. »Stomacher« vrečke.
- Slepim vzorcem mleka in mlečnih izdelkov za določanje izkoristka smo dodali 100 μ L, slepim vzorcem krvne plazme pa 80 μ L delovne standardne raztopine.
- Vzorcem mleka in mlečnih izdelkov smo dodali 20 mL MeCN, vzorcem krvne plazme pa 16 mL MeCN.
- Vzorce plazme, mleka, jogurtov, sirotk in albuminske skute smo ekstrahirali po naslednjem postopku:
 - stresanje s stresalnikom približno 15 sekund
 - stresanje s horizontalnim stresalnikom 5 minut
 - stresanje s stresalnikom približno 15 sekund
 - ekstrakcija v ultrazvočni kopeli 15 minut
 - stresanje s stresalnikom približno 15 sekund
 - stresanje s horizontalnim stresalnikom 5 minut
 - stresanje s stresalnikom približno 15 sekund
- Vzorce sirov smo ekstrahirali po naslednjem postopku:
 - z gnetilnikom »Stomacher« smo ekstrahirali 4 minut (3–4 vrečke hkrati)
 - po končani ekstrakciji smo vsebino vrečk prenesli v 50 mL polipropilenske centrifugirke
- Centrifugirali smo 10 minut pri 4000 obratih/minuto, sobna temperatura
- Supernatant smo oddekantirali v svežo 50 mL polipropilensko centrifugirko in premešali
- 15 mL supernatanta smo odpipetirali v 50 mL polipropilensko merilno bučko, dodali 50 μ L TEA, dopolnili do oznake z deionizirano vodo in premešali

3.3.6.2 ČIŠČENJE Z EKSTRAKCIJO NA TRDNI FAZI (SPE)

- Kondicioniranje ekstrakcijskih kolonic
Ekstrakcijsko kolonico Bakerbond C₈ smo skupaj z adapterjem in rezervoarjem namestili na vakuumski kolektor in jih sprali s 5 mL MeCN in 5 mL 30 % (v/v) raztopine MeCN. Raztopine za spiranje in kondicioniranje smo pretočili skozi kolonice hitro, po spiranju s 30 % (v/v) MeCN pa smo pazili, da se površina trdne faze v kolonici ni osušila.
- Nanos ekstrakta
Vsebinsko 50 mL polipropilenskih bučk smo prenesli v rezervoarje, iz katerih smo ekstrakte nanесли na ekstrakcijske kolonice. Hitrost iztekanja iz kolonice je bila 1–2 kapljici/sekundo. Ventil vakuumskega kolektorja smo zaprli, ko je stekla zadnja kapljica na vrh kolonice, le-ta se ni smela izsušiti.
- Izpiranje nečistoč
Kolonico smo na hitro, do konca sprali s 5 mL 50 % (v/v) raztopine MeCN. Odstranili smo rezervoar in adapter, preostalo tekočino na trdni fazi kolonice pa odstranili z vakuumom.
- Eluacija analitov
Ekstrakcijsko kolonico smo vstavili v 15 mL polipropilensko centrifugirko in eluirali (pod silo težnosti) s 5 mL MeCN. Preostalo tekočino na trdni fazi ekstrakcijske kolonice smo iztisnili v centrifugirko z batom brizgalke. Centrifugirko smo zaprli z zamaškom.

Na tej stopnji smo delo prekinili in vzorce shranili v hladilniku (4 °C) do kromatografske analize.

3.3.6.3 KONCENTRIRANJE POD DUŠIKOM IN PREDKOLONSKA DERIVATIZACIJA

Zaradi občutljivosti fluorescentnih derivatov avermektinov smo derivatizacijo izvajali tik pred kromatografsko analizo.

- standardi
 - V 15 mL polipropilenske centrifugirke smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 0,5 mL delovnih standardnih raztopin (2 paralelki za vsako koncentracijo). Koncentracija analita v odpipetirani raztopini je bila zaradi redčitve pri postopku derivatizacije (1 mL) v nadaljevanju enkrat višja od želene koncentracije za umeritveno krivuljo
 - Standardno raztopino smo izparili pod tokom N₂ pri temperaturi 50 °C do suhega. Ko se je centrifugirka ohladila, smo:
 - dodali 100 µL raztopine *N*-metilimidazola in 150 µL raztopine TFAA
 - stresali s stresalnikom 15 sekund
 - po 15 sekundah dodali 630 µL MeCN
 - stresali s stresalnikom 10 sekund
 - dodali 120 µL očetne kisline
 - stresali 1 minuto
- vzorci
 - Eluat smo izparili pod tokom N₂ pri temperaturi 50 °C do suhega. Ko se je centrifugirka ohladila smo:
 - dodali 100 µL raztopine *N*-metilimidazola in 150 µL raztopine TFAA
 - stresali s stresalnikom 18 sekund
 - po 15 sekundah dodali 630 µL MeCN
 - stresali s stresalnikom 10 sekund
 - dodali 120 µL očetne kisline
 - stresali 1 minuto
- vsebino centrifugirk smo prenesli v silanizirane steklene vial in vzorce inkubirali 50 minut pri temperaturi 65 °C
- po inkubaciji smo vzorce ohladili v eksikatorju (4 °C, približno 10 minut)
- pred kromatografsko analizo smo vzorce ogreli na sobno temperaturo

3.3.6.4 KROMATOGRAFSKA ANALIZA

- Pogoji dela na tekočinskem kromatografu za določanje ivermektina in doramektina:
 - izokratska kromatografija: 7 % H₂O v 1:1 (v/v) mešanici MeCN in MeOH
 - pretok mobilne faze: 1 mL/minuto
 - volumen injiciranja: 20 µL
 - temperatura termostata za analizno kolono in predkolono: 27 °C
 - parametri merjenja fluorescence:
 - eksitacija: 364 nm
 - emisija: 470 nm
 - občutljivost fotopomnoževalke (PMT-Gain): 13
- Pogoji dela na tekočinskem kromatografu za določanje eprinomektina:
 - gradientna kromatografija
 - mobilna faza A: 15 % H₂O v 1 : 1 (v/v) mešanici MeOH in MeCN

- mobilna faza B: 8 % H₂O v 1 : 1 (v/v) mešanici MeOH in MeCN
- gradient:

čas (min)	% (v/v) mobilne faze A	% (v/v) mobilne faze B
0,00	100	0
15,0	100	0
15,5	50	50
16,0	0	100
22,0	0	100
22,5	50	50
23,0	100	0
27,0	100	0

- pretok mobilne faze: 1 mL/minuto
- volumen injiciranja: 20 µL
- temperatura termostata za analizno kolono in predkolono: 27 °C
- parametri merjenja fluorescence:
 - eksitacija: 364 nm
 - emisija: 470 nm
 - občutljivost fotopomnoževalke (PMT-Gain): 13

POTEK MERITEV

- Zaporedje meritev ivermektina in doramektina je bilo sledeče:
 - standardi za izdelavo umeritvene krivulje (vsako koncentracijo smo izmerili v dveh paralelkah)
 - slepi vzorec
 - vzorci (št. 1–3, vsak v dveh paralelkah)
 - standardna raztopina za kontrolo sistema
 - vzorci (št. 4–6, vsak v dveh paralelkah)
 - slepi vzorec
 - vzorca za določanje izkoristka
 - slepi vzorec
 - vzorci (št. 7–9, vsak v dveh paralelkah)
 - standardna raztopina za kontrolo sistema
 - vzorci (št. 10–12, vsak v dveh paralelkah)
 - slepi vzorec
 - vzorca za določanje izkoristka
- Zaporedje meritev eprinomektina je bilo sledeče:
 - standardi za izdelavo umeritvene krivulje (vsako koncentracijo smo izmerili v dveh paralelkah)
 - slepi vzorec
 - vzorci (št. 1–6, vsak v dveh paralelkah)
 - vzorca za določanje izkoristka
 - standardna raztopina za kontrolo sistema
 - slepi vzorec
 - vzorci (št. 7–12, vsak v dveh paralelkah)
 - standardna raztopina za kontrolo sistema

3.3.6.5 VREDNOTENJE REZULTATOV

KVALITATIVNO VREDNOTENJE

Kromatograme vzorcev smo primerjali s kromatogrami standardov, s kromatogramom slepega vzorca in s kromatogrami vzorcev za določanje izkoristka. Če se je zadrževalni čas kromatografskega vrha v kromatogramu vzorca ujemal z zadrževalnim časom vrhov v standardu in v vzorcih za določanje izkoristka, smo sklepali, da je bil v vzorcu prisoten iskani analit.

KVANTITATIVNO VREDNOTENJE

Vsebnost analitov smo izračunali po metodi eksterne standarda glede na ploščine kromatografskih vrhov.

- Umeritvena krivulja
Za umeritveno krivuljo je veljala enačba:

$$y = k \cdot x + n,$$

kjer je:

y	ploščina kromatografskega vrha
k	naklon premice
x	koncentracija analita
n	odsek na ordinatni osi

Medsebojno ujemanje med umeritvenimi točkami je podal kvadrat korelacijskega koeficienta r^2 .

- Vsebnost analitov v vzorcih
Vsebnost analita v posameznem vzorcu smo izračunali po naslednjem postopku:

Umeritvena krivulja

↓

Upoštevanje natehte (mleko in mlečni izdelki) oziroma volumna (plazma) in ekstrakcijskega volumna pri čiščenju, uskladitev enot

↓

Popravek z deležem izkoristka

Popravek z deležem izkoristka smo izračunali po enačbi

$$C_{ugot} = C' \cdot \frac{V_e \cdot V_k}{V \cdot m},$$

kjer je:

C_{ugot}	vsebnost analita v vzorcu brez upoštevanja izkoristka ($\mu\text{g/kg}$ za mleko, $\mu\text{g/L}$ za plazmo)
C'	vsebnost analita v ekstraktu vzorca glede na umeritveno krivuljo ($\mu\text{g/kg}$ za mleko, $\mu\text{g/L}$ za plazmo)
V_e	volumen ekstrakta (mL)
V_k	končni volumen vzorca pred injiciranjem (mL)
V	volumen ekstrakta za ekstrakcijo na trdni fazi (mL)

m masa natehtanega vzorca (mleko in mlečni izdelki) (g) oziroma volumen vzorca (plazma) (mL)

in

$$C_{dej} = \frac{C_{ugot}}{rec},$$

kjer je:

C_{dej} vsebnost analita v vzorcu, popravljena z deležem izkoristka ($\mu\text{g/kg}$ za mleko, $\mu\text{g/L}$ za plazmo)

C_{ugot} vsebnost analita v vzorcu brez upoštevanja izkoristka ($\mu\text{g/kg}$ za mleko, $\mu\text{g/L}$ za plazmo)

rec delež izkoristka metode (izkoristek v %, deljen s 100)

- Izračun izkoristka

Izkoristek smo izračunali s standardnimi dodatki v slepih vzorcih. Upoštevali smo povprečno vrednost serije.

$$rec = \frac{C_{rec}}{C_{dod}} \cdot 100 \%,$$

kjer je:

rec izkoristek metode (%)

C_{rec} ugotovljena vsebnost analita v obogatenem vzorcu

C_{dod} dodana vsebnost analita v obogatenem vzorcu

3.3.7 OVREDNOTENJE (VALIDACIJA) METODE ZA DOLOČANJE OSTANKOV EPRINOMEKTINA V MLEČNIH IZDELKIH

Metoda za določanje ostankov eprinomektina v mleku je že bila validirana (Cerkvenik-Flajs in sod., 2008; Cerkvenik-Flajs in sod., 2010; Hodošček, 2008), ovrednotiti pa smo morali ustreznost metode za določanje eprinomektina v mlečnih izdelkih. Uporabili smo metodo za ugotavljanje ustreznosti analiznih postopkov, objavljeno v zakonodaji EU (ES, 2002). Ob upoštevanju dejstva, da smo analizno metodo uporabili predvsem v raziskovalne namene, smo metodo ovrednotenja nekoliko spremenili. Spremembe so bile naslednje:

- koncentracijske nivoje standardnih dodatkov smo prilagodili pričakovanim vrednostim v vzorcih mlečnih izdelkov
- izpustili smo nekatere zahtevane ponovitve meritev pri testu ponovljivosti
- nismo ovrednotili meje odločitve ($CC\alpha$) in sposobnosti določitve ($CC\beta$).

3.3.7.1 SELEKTIVNOST

Analizirali smo 20 slepih vzorcev in na kromatogramih ovrednotili morebitno ozadje v bližini zadrževalnega časa eprinomektina.

3.3.7.2 SPECIFIČNOST

Ovrednotili smo sposobnost analizne metode, da selektivno loči naslednje analite: eprinomektin, moksidektin, emamektin, nemadektin, abamektin, doramektin in ivermektin pri standardih v topilu in v matriksih. Posneli smo kromatogram standardnih mešanic v topilu in

vzorcev mlečnih izdelkov z dodano mešanico standardov ter ovrednotili medsebojno kromatografsko ločbo naštetih učinkovin.

3.3.7.3 LINEARNOST

- Linearnost standardov v matriksih

Slepim vzorcem smo dodali standarde eprinomektina v koncentracijskem območju 15–0,1 µg/kg za 30 in 60 dni zorena sira, sveži sir in albuminsko skuto, 1–0,05 µg/kg za primarno in sekundarno sirotko in 5–0,05 µg/kg za jogurt iz surovega in termično obdelanega mleka. Vsak vzorec smo očistili, derivatizirali in analizirali v dveh paralelkah.

Na abscisno os smo nanesti koncentracije, na ordinatno os pa povprečne ploščine pripadajočih kromatografskih vrhov. Z metodo najmanjših kvadratov smo izračunali enačbe umeritvenih krivulj in jih ovrednotili glede na kvadrat korelacijskega koeficienta.

3.3.7.4 IZKORISTEK

Izkoristek smo ugotavljali s seti paralelnih ($n = 5$) standardnih dodatkov treh (za jogurta in sirotki) oziroma štirih (za sire in albuminsko skuto) koncentracij, celotno analizo pa opravili dvakrat, drugič z drugim analitikom. Koncentracije eprinomektina v posameznih matriksih prikazuje tabela 6.

Tabela 6: Standardni dodatki eprinomektina v vzorcih mlečnih izdelkov za vrednotenje izkoristka in obnovljivosti

matriks	standardni dodatek (µg/kg)			
	nivo 1	nivo 2	nivo 3	nivo 4
albuminska skuta	0,2	1	4	15
sveži sir	0,2	1	4	15
sir, zoren 30 dni	0,2	1	4	15
sir, zoren 60 dni	0,2	1	4	15
jogurt iz surovega mleka	0,2	1	4	–
jogurt iz term. obd. mleka	0,2	1	4	–
primarna sirotka	0,2	0,5	1	–
sekundarna sirotka	0,2	0,5	1	–

Izkoristek metode za določanje eprinomektina smo ovrednotili kot količnik (v %) med ugotovljeno in dodano koncentracijo v obogatenih vzorcih. Izračunali smo:

- izkoristek za vsak posamični vzorec s standardnim dodatkom
- povprečni izkoristek, standardni odmik in koeficient variacije za vsak koncentracijski nivo znotrajdnevno in za oba dneva skupaj

3.3.7.5 OBNOVLJIVOST

Obnovljivost ugotavljanja eprinomektina v mlečnih izdelkih smo ugotavljali na koncentracijskih nivojih, navedenih v tabeli 6. Na vsakem koncentracijskem nivoju smo znotrajdnevno pod istimi pogoji analizirali pet paralelk, kar smo še enkrat ponovili (skupaj dva dogodka). Za ponovitev smo uvedli v metodo spremembe, kot so kemikalije drugih proizvajalcev, drug analitik in drug vir vzorcev. Pri vsakem dogodku smo za vsak koncentracijski nivo izračunali povprečje ugotovljenih koncentracij, standardni odmik in

koeficient variacije, vse tri parametre pa tudi za obe ponovitvi skupaj. Občutljivost metode smo ovrednotili s povprečnim dvodnevni standardnim odmikom in koeficientom variacije.

3.3.7.6 MEJA VREDNOTENJA (LOQ)

Mejo vrednotenja smo predvideli iz meritev linearnosti v posameznem matriksu, kar pa smo morali potrditi z zadostno znotrajdnevno natančnostjo izkoristkov v vzorcih z ustreznimi standardnimi dodatki.

Slepim vzorcem mlečnih izdelkov smo v šestih paralelkah dodali standarde eprinomektina koncentracije 0,5 µg/kg. Izračunali smo posamične izkoristke paralelk, standardni odmik in koeficient variacije.

3.3.7.7 STABILNOST

Z zaporednimi kromatografskimi meritvami smo v 44 urah po derivatizaciji spremljali morebitne spremembe ploščin kromatografskih vrhov eprinomektina v vseh mlečnih izdelkih in mleku s posamičnim standardnim dodatkom 0,5 in 4 µg/kg za mleko in jogurt iz surovega in termično obdelanega mleka, 0,5 in 1 µg/kg za primarno in sekundarno sirotko in 0,5 in 15 µg/kg za sira, zorena 30 in 60 dni, sveži sir in albuminsko skuto.

3.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI MAŠČOBE IN SUHE SNOVI V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH

Maščobo v mleku in mlečnih izdelkih, razen sirotk, smo ugotavljali z Gerberjevo acidobutimetrično metodo, suho snov pa s sušenjem do konstantne mase (Komar in sod., 1996). Suho snov v primarni in sekundarni sirotki smo ugotavljali z Abbejevim refraktometrom (Carl Zeiss, Nemčija) (Bradley in sod., 1992). Rezultate smo podali kot povprečje dveh paralelnih meritev.

3.5 FARMAKOKINETIČNA ANALIZA

Na osnovi individualnih koncentracijskih profilov v krvni plazmi in mleku smo z neprostorsko farmakokinetično analizo izračunali farmakokinetične parametre s programom WinNonlin (različica 2.1, Pharsight, ZDA). Ploščino pod koncentracijsko krivuljo od časa nič do drugega dneva (AUC_{0-2}) oziroma do zadnje izmerjene točke (AUC_{last}) smo izračunali z linearno trapezoidno metodo, ploščino od časa nič do neskončnosti (AUC_{INF}) pa z ekstrapolacijo (vsota razmerja C_{last}/λ_z in AUC_{last}). Najvišjo ugotovljeno koncentracijo (C_{max}) in čas, v katerem je bila dosežena (t_{max}), smo odčitali neposredno iz rezultatov meritev. Biološko razpolovno dobo vnesenih učinkovin smo izračunali po enačbi

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z},$$

kjer je λ_z naklon terminalnega dela krivulje, izračunan po metodi najmanjših kvadratov, v semilogaritemskem grafičnem prikazu. Srednji čas zadrževanja učinkovine (MRT) smo izračunali z uporabo enačbe

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC},$$

kjer AUMC predstavlja ploščino pod krivuljo 1. momenta, ki smo jo izračunali z linearno trapeziodno metodo.

Deleža absorbirane učinkovine oziroma biološke uporabnosti (F) iz izmerjenih podatkov ni bilo mogoče izračunati, zato smo podali navidezni očistek (CL/F), izračunan po enačbi

$$Cl/F = \frac{D}{AUC},$$

kjer je D odmerek učinkovine. Podali smo tudi navidezen volumen distribucije, ki temelji na terminalni fazi (V_z/F) in je izračunan po enačbi

$$V_z/F = \frac{Cl/F}{\lambda_z}.$$

Povprečne vrednosti s standardnimi odmiki so prikazane v poglavju Rezultati. Za ugotavljanje enakosti varianc smo uporabili Levenov test. Za primerjavo farmakokinetičnih parametrov različnih skupin ovc smo uporabili Studentov t-test (ko so bile variance enake) oziroma Bahrens-Fisherjev test (ko variance niso bile enake). Razlike med skupinami smo označili za statistično značilne pri stopnji tveganja $p < 0,05$.

Za natančen izračun farmakokinetičnih parametrov v mleku smo morali upoštevati povprečno gostoto ovčjega mleka, ki je 1,036 kg/L (Rogelj, 1984).

3.6 ANALIZNA METODA DOLOČANJA OSTANKOV NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN V KRVNI PLAZMI IN MLEKU

Ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku smo določali z metodo, ki jo uporabljajo v centralnem referenčnem laboratoriju EU, in ji dodali še lastne modifikacije.

3.6.1 OSNOVNE FAZE ANALIZNEGA POSTOPKA

Uporabili smo postopek, prikazan na sliki 26.

3.6.2 MATRIKSI

Ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin smo določali v krvni plazmi in mleku rejnih živali. Vzorce smo pred analizo odtajali.

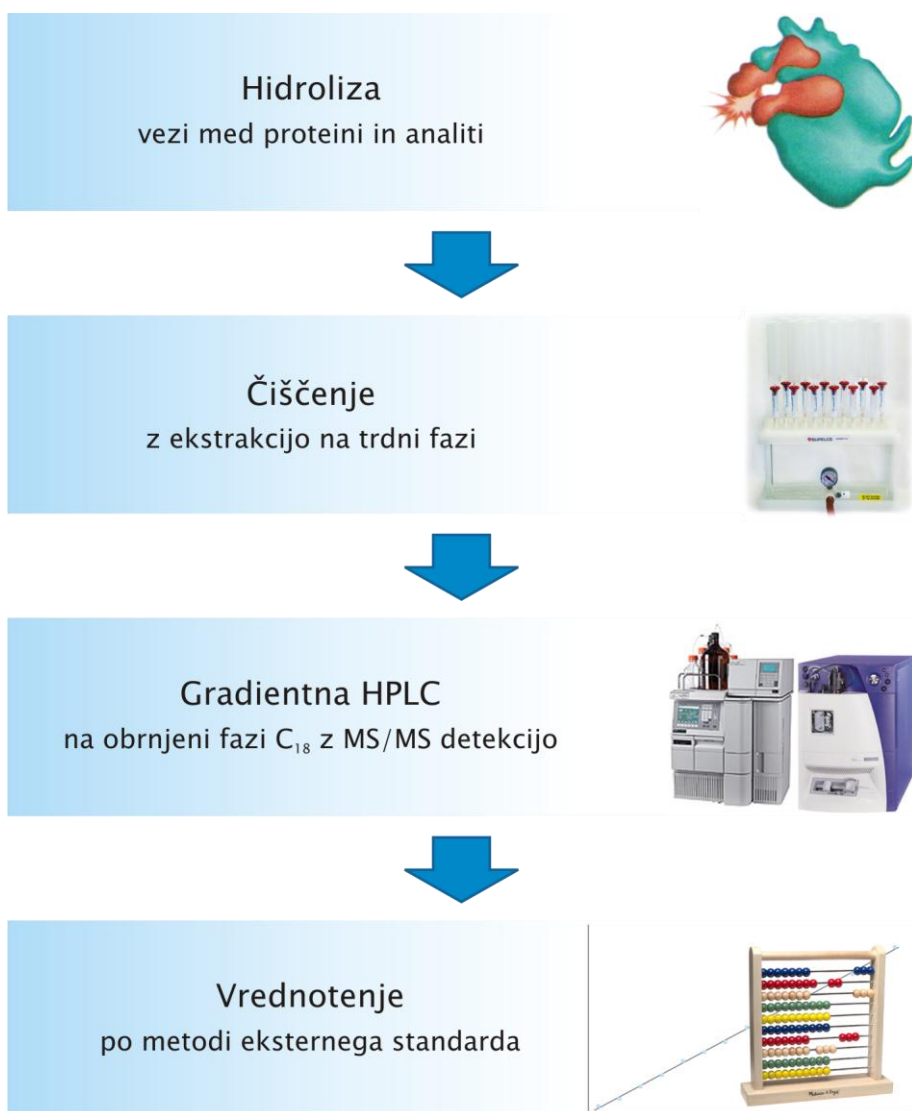
3.6.3 OPREMA

3.6.3.1 LABORATORIJSKI PRIBOR

Poleg običajne laboratorijske opreme smo potrebovali še:

- polipropilenske centrifugirke 50 mL, dimenzij 115 x 28 mm, s pokrovčki (62.559, Sarstedt, Nemčija)
- polipropilenske centrifugirke 15 mL, dimenzij 120 x 17 mm, s pokrovčki (62.554, Sarstedt, Nemčija)
- precizne avtomatske pipete s plastičnimi nastavki:
 - 2–20 µL: Research (3027653, Eppendorf, Nemčija)

- 50 µL: Reference (349570, Eppendorf, Nemčija)
- 100–1000 µL: Research (247588, Eppendorf, Nemčija) in mLine (MU11096, Biohit, Finska)
- Handystep (10X7022, Brand, Nemčija)
- pH lističe 0–6 (1.09531, Merck, ZDA)
- pribor za ekstrakcijo na trdni fazi:
 - ekstrakcijske (SPE) kolone (8B-S100-FCH, Strata X; 6 mL, 200 mg in 8B-S100-UBJ, Strata X; 3 mL, 60 mg, obe Phenomenex, ZDA)
 - aparature za ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) – vacuum manifold (12 in 24 mest) (57030-U, Visiprep in 57250-U, Visiprep 24, obe Supelco, ZDA)
 - polietilenski rezervoarji za SPE 60 mL (57022, Supelco, ZDA) in 20 mL (57021, Supelco, ZDA)
 - adapterji (57020-U, Supelco, ZDA)
- pribor za filtriranje mobilne faze (58061, Supelco, ZDA)
- polipropilenske vial, konusne, 300 µL (186002628, Waters, ZDA) s »snap« pokrovčki (186000303, Waters, ZDA)
- filtre, PTFE, 0,45 µm, 4 mm (AF0-3102-12, Phenomenex, ZDA)



Slika 26: Temeljne faze analiznega postopka določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku

3.6.3.2 APARATURE

- analizne tehtnice:
 - $\pm 0,1$ mg / $\pm 0,01$ mg (AT201 in XP205 DeltaRange, obe Mettler Toledo, Švica)
 - ± 1 mg (PB303 in PB303-S, Mettler Toledo, Švica)
 - $\pm 0,1$ g (EB-3000D, Tehtnica, Slovenija)
- stresalnik (Vibromix 114, Tehtnica, Slovenija)
- inkubator (I-285, Kambič, Slovenija)
- centrifuga (Minifuge T in Multifuge 3 S-R, obe Heraeus, Nemčija)

3.6.3.3 SISTEM LC-MS/MS

- kvarterna črpalka z razplinjevalcem, avtomatskim injektorjem, termostatom za vzorce (Alliance 2695, Waters, ZDA)
- masni spektrometer – trojni kvadropol (Quattro Micro API, Waters, ZDA)
- programska oprema Masslynx (667002584, Waters, ZDA) z dodatkom Targetlynx (667002671, Waters, ZDA)

Analizna kolona (00F-4439-B0; Gemini 3u C18 110A; 150 x 2 mm; delci velikosti 3 μ m, Phenomenex, ZDA)

Predkolona (AJ0-7596; Gemini C18; 4 x 2 mm; delci velikosti 3 μ m, Phenomenex, ZDA)

3.6.4 REAGENTI

3.6.4.1 KEMIČALIJE

- deionizirana voda (H₂O)
- acetonitril (MeCN) (9017, Ultra Gradient HPLC Grade, J.T. Baker, Nizozemska)
- metanol (MeOH) (8402, HPLC Gradient Grade, J.T. Baker, Nizozemska)
- β -glukoronidaza / aril sulfataza (1.04114.0002, Stabilised aqueous solution, Merck, ZDA)
- klorovodikova kislina (HCl) (1.00317.1000, Fuming 37 %, P.A., Merck, ZDA)
- mravljična kislina (HCOOH) (1.00264.1000, P.A., Merck, ZDA)
- L-(+)-askorbinska kislina (0161309, Kemika, Hrvaška)

3.6.4.2 RAZTOPINE

- Priprava vzorca za ekstrakcijo na trdni fazi (SPE)
 - 1 M klorovodikova kislina (HCl)
V 50 mL bučko smo odmerili 4,14 mL 37 % (w/w) HCl in dopolnili z deionizirano vodo do oznake. Bučko smo zaprli in premešali. Raztopino smo shranili v hladilniku pri 4 °C
 - 0,01 M klorovodikova kislina (HCl)
V 1000 mL steklenico smo odmerili 0,828 mL 37 % (w/w) HCl in 1000 mL deionizirane vode. Steklenico smo zaprli in premešali. Raztopino smo shranili v hladilniku pri 4 °C

- 0,01 M askorbinska kislina
V 1000 mL steklenico smo natehtali 1,7613 g askorbinske kisline in 1000 mL deionizirane vode. Steklenico smo zaprli in premešali. Raztopino smo shranili v hladilniku pri 4 °C
- Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)
 - mešanica MeOH/MeCN za spiranje kolonic in eluiranje analitov
 - MeOH : MeCN = 1 : 1 (v/v)
 - 500 mL MeOH smo zmešali s 500 mL MeCN
- Mobilne faze za kromatografijo
 - 0,05 % (v/v) mravljična kislina v H₂O
Zmešali smo 0,5 mL mravljične kisline in 1000 mL deionizirane vode. Mešanico smo prefiltrirali in razplinili pod vakuumom
 - 0,05 % (v/v) mravljična kislina v MeCN
Zmešali smo 0,5 mL mravljične kisline in 1000 mL MeCN. Mešanico smo prefiltrirali in razplinili pod vakuumom

3.6.5 STANDARDI

3.6.5.1 OSNOVNE SPOJINE (REFERENČNI STANDARDI) V OBLIKI PRAŠKA

- diklofenak (C12537500, Diclofenac Sodium, Dr. Ehrenstorfer, Nemčija)
- fenilbutazon (C16056500, Phenylbutazone, Dr. Ehrenstorfer, Nemčija)
- fluniksin (33586, Flunixin, Vetranal, Sigma-Aldrich, ZDA)
- 5-hidroksi fluniksin (SCH 16186, 5-Hydroxy Flunixin, Schering-Plough, ZDA)
- karprofen (33975, Carprofen, Vetranal, Sigma-Aldrich, ZDA)
- ketoprofen (34016, Ketoprofen, Vetranal, Sigma-Aldrich, ZDA)
- meloksikam (C14862500, Meloxicam, Dr. Ehrenstorfer, Nemčija)
- oksifenbutazon (933.00, Oxyphenbutazone Monohydrate, Mikromol, Nemčija)
- tolfenamska kislina (34073, Tolfenamic Acid, Vetranal, Sigma-Aldrich, ZDA)

3.6.5.2 STANDARDNE RAZTOPINE

Pripravili smo jih v temnih steklenih bučkah s steklenimi zamaški.

Kot topilo smo uporabili mešanico MeOH : MeCN = 1 : 1 (v/v).

Raztopine smo hranili v hladilniku (4 °C).

Pred uporabo smo bučke z standardnimi raztopinami segreli na sobno temperaturo.

- Osnovne raztopine: 100 µg/mL
Natehtali smo 2 mg učinkovine, jo kvantitativno prenesli v 20 mL merilno bučko in dopolnili s topilom do oznake.
- Delovne raztopine:
 - za mleko: diklofenak, ketoprofen 0,3–0,1 µg/mL; fenilbutazon, oksifenbutazon 1,5–0,5 µg/mL; meloksikam 2,25–0,75 µg/mL; fluniksin, 5-hidroksi fluniksin 6–2 µg/mL; tolfenamska kislina 7,5–2,5 µg/mL; karprofen 15–5 µg/mL
 - za krvno plazmo: fluniksin, 5-hidroksi fluniksin 0,12–0,04 µg/mL; meloksikam 0,6–0,2 µg/mL; diklofenak, ketoprofen 1,2–0,4 µg/mL; fenilbutazon, oksifenbutazon, tolfenamska kislina 2,4–0,8 µg/mL; karprofen 6–2 µg/mL

Delovne raztopine smo pripravili za dodajanje slepim vzorcem (določanje izkoristka) in za pripravo umeritvenih krivulj. Bile so mešanice vseh analitov v navedenih koncentracijskih območjih. Pripravljali smo jih iz osnovnih raztopin, običajno prek vmesnih redčitev. Koncentracije spojin smo prilagodili občutljivosti sistema LC-MS/MS za posamezno spojino in najnižjim dovoljenim vrednostim, ki jih določa EU.

3.6.6 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

Metoda čiščenja vzorcev in ekstrakcije je bila kombinacija več metod, ki smo jim dodali še lastne modifikacije (Antonić in Heath, 2007; CRL, 2008b; 2008c). Prilagojena je za delo z večjimi serijami vzorcev.

3.6.6.1 IZBIRA ANALITOV

Nabor analitov smo izbrali v skladu z zahtevami EU (poskušali smo vključiti čim več spojin, za katere je EU postavila mejne vrednosti – MRL), upoštevali pa smo še dobavljivost in primernost za analizo na sistemih LC-MS/MS (omejeno število analitov, ki jih lahko merimo v posamezni kromatografski analizi, kakovost ionizacije in število produktov razpada). Izmed 25 spojin, ki smo jih imeli na razpolago, smo se odločili za 9 analitov, to so bili diklofenak, fenilbutazon, fluniksin, 5-hidroksi fluniksin, karprofen, ketoprofen, meloksikam, oksifenbutazon in tolfenamska kislina.

3.6.6.2 ČIŠČENJE, PRIPRAVA VZORCEV IN EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)

Pri čiščenju vzorcev mleka smo najprej razvili in optimizirali čiščenje na trdni fazi. Začeli smo z raztopinami standardov v vodi in z več poskusi optimizirali naslednje parametre:

- izbira velikosti in stacionarne faze kolonic za čiščenje na trdni fazi
Preizkusili smo različne stacionarne faze različnih proizvajalcev, prikazane v tabeli 7.
- mešanica topil za spiranje kolonic pred analizo
Preizkusili smo MeCN, MeOH, mešanice vode z MeCN (od 50 do 90 % (v/v) MeCN v vodi), mešanice vode z MeOH (od 50 do 90 % (v/v) MeOH v vodi) in mešanice MeOH in MeCN (od 10 do 90 % (v/v) MeCN v MeOH). Odločili smo se za mešanico MeCN/MeOH (1 : 1, v/v).
- raztopina za kondicioniranje kolonic
Ker so vsi analiti šibke kisline topne v vodi, smo uporabili raztopino kisline v vodi. Za čiščenje mleka smo se odločili za 0,01 M HCl, za čiščenje krvne plazme pa 0,01 M askorbinsko kislino.
- hitrost nanašanja vzorca
Preizkusili smo nanos pod silo težnosti in nanose pri različnih podtlakih.
- volumen nanesenega vzorca
Preizkusili smo vodne raztopine HCl (za mleko) in askorbinske kisline (za krvno plazmo) za redčenje ekstraktov vzorcev in poskusili določiti najmanjši volumen, ki bi nam omogočal zadovoljive izkoristke.
- raztopina za spiranje nečistoč
Za spiranje nečistoč smo preizkusili vodne raztopine kislin, vključujoč raztopine ki smo jih uporabili za kondicioniranje kolonic, to je 0,01 M HCl za mleko in 0,01 M askorbinsko kislino za krvno plazmo.
- čas sušenja kolonic pred eluiranjem

Pred eluiranjem smo kolonice posušili in s tem zagotovili, da se je eluiral večji delež analitov. Preizkusili smo različne časovne intervale sušenja kolonic pod vakuumom vodne črpalke na zraku (od 1 do 30 minut).

- mešanica topil za eluiranje

Preizkusili smo več organskih topil in kombinacij le-teh, kot so MeOH, MeCN in mešanica MeOH in MeCN v različnih razmerjih (v/v).

Tabela 7: Stacionarne faze za ekstrakcijo na trdni fazi, preizkušene med razvijanjem metode določanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku

proizvajalec	ime st. faze	opis st. faze	masa st. faze (mg)	volumen kolonice (mL)	velikost delcev (μm)
Waters	Oasis HLB	polimerna obrnjena faza	30	1	30
			500	6	60
	Oasis MAX	polimerni mešani anionski izmenjevalec	30	1	30
			500	6	60
	Oasis WAX	polimerni šibki anionski izmenjevalec	30	1	30
			500	6	60
Phenomenex	Strata X	polimerna obrnjena faza	60	3	33
			200	6	33
	Strata X-AW	polimerni šibki anionski izmenjevalec	60	3	33
			200	6	33
J.T. Baker	Bakerbond C ₈	C ₈ obrnjena faza	500	6	40

Ko smo imeli pripravljeno metodo za čiščenje na trdni fazi, smo se posvetili razvoju čiščenja vzorcev. Glavni cilj priprave vzorca za čiščenje na trdni fazi je bila prekinitev vezi med analiti in proteini ter obarvanje proteinov:

- priprava vzorcev mleka

Za hidrolizo vezi med proteini in analiti v mleku smo vzorcem dodali encim β-glukoronidaza in preizkusili različne časovne intervale in temperature inkubacije. Po inkubaciji smo vzorcem dodali MeCN, ki je povzročil obarvanje proteinov. Pred nanosom na kolone za ekstrakcijo na trdni fazi smo vzorce centrifugirali 10 minut pri 4000 obratih/minuto in supernatant razredčili z 0,01 M HCl v vodi.

- priprava vzorcev krvne plazme

Za hidrolizo vezi med proteini in analiti smo uporabili 1 M HCl. Preizkusili smo različne čase inkubacije, ki bi nam omogočili visoke izkoristke in hitro analizo. Izbrali smo čas inkubacije 10 minut, nato pa smo vzorcem dodali 0,01 M askorbinsko kislino, ki je služila za stabilizacijo občutljivih analitov in dvig vrednosti pH, primerno za nanos vzorca na kolonice za ekstrakcijo na trdni fazi. Predhodno obarvanje proteinov v tem primeru ni bilo potrebno.

Po eluiranju z ekstrakcijskih kolonic je sledila končna priprava vzorcev na kromatografsko analizo. Očiščene ekstrakte mleka in krvne plazme smo prefiltrirali in prenesli v konusne polipropilenske vialke.

3.6.6.3 IZBIRA STACIONARNE FAZE ZA KROMATOGRFSKO ANALIZO

Preizkusili smo več stacionarnih faz različnih proizvajalcev, prikazanih v tabeli 8.

Hkrati smo morali izbrati ustrezno velikost delcev in dimenzije kolone. Kot najprimernejša se je izkazala stacionarna faza Gemini C₁₈ (Phenomenex, ZDA) z delci velikosti 3 µm v koloni z dimenzijami 150 x 2 mm.

Tabela 8: Stacionarne faze za kromatografsko analizo, preizkušene med razvijanjem metode določanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku

proizvajalec	ime st. faze	opis st. faze	dolžina kolone (mm)	premer kolone (mm)	velikost delcev (µm)
Waters	XBridge	hibridna C ₁₈ obrnjena faza	150	4,6	3,5
	XTerra	hibridna fenilna obrnjena faza	150	2,1	3,5
Phenomenex	Gemini	hibridna C ₆ -fenilna	150	2	3
		obrnjena faza	150	3	3
		hibridna C ₁₈ obrnjena	150	2	5
		faza	150	2	3

3.6.6.4 RAZVOJ KROMATOGRFSKE METODE

Preizkusili smo več topil in kombinacij le-teh v izokratskem načinu in gradientu in izvedli snemanje MS spektrov v pozitivnem in negativnem načinu. Vsako od mobilnih faz smo preizkusili z dodatkom kisline (za pozitivni način merjenja) oziroma baze (za negativni način merjenja). Kot najoptimalnejši se je izkazal gradient iz mešanice 1:1 (v/v) MeCN/H₂O v 90 % (v/v) MeCN, pri čemer smo v vsako od komponent dodali 0,05 % (v/v) mravljične kisline.

3.6.6.5 NASTAVITEV IN OPTIMIZACIJA PARAMETROV ZA IONIZACIJO V SISTEMU LC-MS/MS

Odločili smo se za ionizacijo v elektrospreju, za katero smo morali izbrati polariteto. Odločili smo se za pozitivno polariteto.

Poiskati smo morali še optimalne napetosti kapilare, stožca, ekstraktorja in RF leče, optimalno temperaturo ionskega izvora in pomožnega (desolvacijskega) plina ter pretok plina na stožcu in pomožnega (desolvacijskega) plina. Napetost stožca je bila posamično nastavljena za vsak matični ion, drugi parametri pa so veljali globalno za celotno metodo.

3.6.6.6 »TUNING« MASNEGA ANALIZATORJA IN POGOJI SNEMANJA MASNIH SPEKTROV

Za vsako spojino smo morali optimizirati pogoje masnega analizatorja, da smo iz matičnih ionov, nastalih v ionizatorju, dobili ione potomce in izmerili intenzitete izbranih masnih prehodov. Parametri, ki smo jih morali optimizirati, so bili ločljivost na vhodu in izhodu (obe za nizke in visoke mase posebej), energijo ionov v obeh kvadropolih, odprtost vhodne in izhodne zaslonke heksapolne kolizijske celice, trkalno energijo in pomnoževalni faktor. Trkalna energija je bila posamično nastavljena za vsak par matični ion/ion potomec, drugi parametri pa so veljali celotno za celotno metodo.

3.6.7 POSTOPEK

Delo je potekalo v serijah in je trajalo en dan na serijo (10–30 vzorcev). V vsaki seriji smo imeli še slepi vzorec, ki smo mu dodali znano količino analitov za določanje izkoristka in en slepi vzorec.

3.6.7.1 HIDROLIZA

- mleko
 - homogenizirane vzorce smo segreli na sobno temperaturo. V 50 mL polipropilenske centrifugirke smo natehtali $5,0 \pm 0,1$ g vzorca
 - slepim vzorcem za določanje izkoristka smo dodali 50 μ L delovne standardne raztopine
 - vzorcem smo dodali 10 μ L vodne raztopine β -glukoronidaze / aril sulfataze
 - vzorce smo inkubirali pri 37 ± 1 °C eno uro
- plazma
 - homogenizirane vzorce smo segreli na sobno temperaturo. V 15 mL polipropilenske centrifugirke smo natehtali $2,0 \pm 0,1$ g vzorca
 - slepim vzorcem za določanje izkoristka smo dodali 50 μ L delovne standardne raztopine
 - vzorcem smo dodali 250 μ L 1 M HCl
 - vzorce smo inkubirali pri sobni temperaturi 10–15 minut

3.6.7.2 PRIPRAVA VZORCEV NA EKSTRAKCIJO NA TRDNI FAZI

- mleko
 - hidroliziranim vzorcem smo dodali 5 mL MeCN in stresali približno 15 sekund (obarjanje proteinov)
 - vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 4000 obratih/minuto, pri sobni temperaturi
 - supernatant smo prelili v drugo 50 mL polipropilensko centrifugirko, dodali 0,01 M HCl do oznake 50 mL in premešali
 - s papirčkom za merjenje vrednosti pH smo preverili, da je bila le-ta med 1,5 in 2,5
- plazma
 - hidroliziranim vzorcem smo dodali 0,01 M askorbinsko kislino do oznake 10 mL in premešali
 - s papirčkom za merjenje vrednosti pH smo preverili, da je bila le-ta med 1,5 in 2,5

3.6.7.3 ČIŠČENJE Z EKSTRAKCIJO NA TRDNI FAZI

- Kondicioniranje ekstrakcijskih kolonic
 Ekstrakcijsko kolonico Strata X 200 mg/6 mL (za mleko) oziroma 60 mg/3 mL (za plazmo) smo skupaj z rezervoarjem volumna 60 mL (za mleko) oziroma 20 mL (za plazmo) namestili na vakuumski kolektor in jih sprali s 5 mL (za mleko) oziroma z 2 mL (za plazmo) mešanice MeOH/MeCN in s 5 mL 0,01 M HCl (za mleko) oziroma z 2 mL 0,01 M askorbinske kisline (za plazmo). Po drugem spiranju smo pazili, da se površina trdne faze v kolonici ni osušila.

- **Nanos ekstrakta**
Vsebinsko centrifugirali smo prenesli v rezervoarje, iz katerih smo vzorce nanесли na ekstrakcijske kolonice. Hitrost iztekanja iz kolonic je bila 1–2 kapljici/sekundo. Ventil vakuumskega kolektorja smo zaprli, ko je stekla zadnja kapljica na vrh kolonice, le-ta se ni smela izsušiti.
- **Izpiranje nečistoč**
Kolonico smo na hitro, do konca sprali s 5 mL 0,01 M HCl (za mleko) oziroma z 2 mL 0,01 M askorbinske kisline (za plazmo). Odstranili smo rezervoar in adapter, preostalo tekočino na trdni fazi kolonice pa odstranili z vakuumom.
- **Elucija analitov**
 - **mleko**
ekstrakcijsko kolonico smo vstavili v 15 mL polipropilensko centrifugirko in eluirali (pod silo težnosti) s 5 mL mešanice MeOH/MeCN (1 : 1, v/v). Preostalo tekočino na trdni fazi kolonice smo iztisnili v centrifugirko z batom brizgalke. Centrifugirko smo zaprli in premešali
 - **plazma**
v vakuumski kolektor smo pod kolonice postavili 15 mL polipropilenske centrifugirke in eluirali (pod silo težnosti) z 2 mL mešanice MeOH/MeCN. Preostalo tekočino na trdni fazi kolonice smo iztisnili v centrifugirko z batom brizgalke. Centrifugirko smo zaprli in premešali
- Alikvot eluata volumna 300 µL smo prenesli v konusne polipropilenske vialе za kromatografsko analizo.

3.6.7.4 KROMATOGRAFSKA ANALIZA

- **Pogoji dela za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin:**
 - gradientna kromatografija
 - mobilna faza A: H₂O z 0,05 % (v/v) mravljične kisline
 - mobilna faza B: MeCN z 0,05 % (v/v) mravljične kisline
 - gradient:

čas (min)	% (v/v) mobilne faze A	% (v/v) mobilne faze B
0,00	50	50
10,0	20	80
10,1	10	90
11,0	10	90
11,1	50	50
15,0	50	50

- pretok mobilne faze: 250 µL/minuto
- volumen injiciranja: 10 µL
- temperatura termostata za vzorce: 10 °C
- temperatura termostata za analizno kolono in predkolono: 40 °C

3.6.7.5 TANDEMSKA MASNOSPEKTROMETRIČNA DETEKCIJA (MS/MS)

- **Pogoji v ionizatorju:**
 - način ionizacije: elektrosprej
 - polariteta: pozitivna
 - napetost kapilare: 4,0 kV
 - napetost stožca: po programu snemanja

- napetost ekstraktorja: 2 V
- napetost RF leče: 0,5 V
- temperatura izvora: 120 °C
- temperatura pomožnega (desolvacijskega) plina: 300 °C
- pretok plina (N₂) na stožcu: 120 L/uro
- pretok pomožnega (desolvacijskega) plina (N₂): 650 L/uro
- Pogoji v masnem analizatorju:
 - prvi kvadropol:
 - ločljivost nizkih mas: 13,0
 - ločljivost visokih mas: 13,0
 - energija ionov: 0,5
 - trkalna celica:
 - odprtost vhodne zaslonke: –2
 - trkalna energija: po programu snemanja
 - odprtost izhodne zaslonke: 1
 - drugi kvadropol:
 - ločljivost nizkih mas: 13,0
 - ločljivost visokih mas: 13,0
 - energija ionov: 1,0
 - pomnoževalni faktor: 650
- Pogoji snemanja masnih spektrov:
 - časovni interval snemanja: 1,0–13,0 minut
 - način ionizacije in polariteta: elektrosprej v pozitivnem načinu
 - način snemanja: snemanje masnih prehodov (multiple reaction monitoring; MRM)
 - program snemanja:

spojina	m/z matičnega iona	m/z iona potomca	napetost stožca (V)	trkalna energija (eV)
diklofenak	298	214	15	35
		216		35
fenilbutazon	309	104	35	33
		160		20
fluniksin	297	264	35	35
		279		25
5-hidroksi fluniksin	313	280	40	35
		295		25
karprofen	274	193	25	30
		228		20
ketoprofen	255	105	30	25
		209		22
meloksikam	352	115	30	20
		141		20
oksifenbutazon	325	160	30	22
		204		15
tolfenamenska kislina	262	209	25	28
		244		15

3.6.7.6 POTEK MERITEV

Zaporedje meritev nesteroidnih protivnetnih učinkovin je bilo naslednje:

- topilo (mešanica MeOH/MeCN, 1 : 1, v/v)
- standardi za izdelavo umeritvene krivulje

- topilo (mešanica MeOH/MeCN, 1 : 1, v/v)
- slepi vzorec
- vzorci (št. 1–10)
- slepi vzorec
- vzorci za določanje izkoristka
- slepi vzorec
- vzorci (št. 11–20; na vsakih 10 vzorcev smo injicirali slepi vzorec, vzorec za določanje izkoristka in slepi vzorec)
- slepi vzorec
- vzorci za določanje izkoristka
- topilo (mešanica MeOH/MeCN, 1 : 1, v/v)
- standardi za izdelavo umeritvene krivulje
- topilo (mešanica MeOH/MeCN, 1 : 1, v/v)
- standardi za izdelavo umeritvene krivulje
- topilo (mešanica MeOH/MeCN, 1 : 1, v/v)

3.6.7.7 VREDNOTENJE REZULTATOV

KVALITATIVNO VREDNOTENJE

Prisotnost analitov smo ugotavljali na dva načina:

- Zadrževalni čas kromatografskih vrhov:
Kromatograme vzorcev smo primerjali s kromatogrami standardov, s kromatogramom slepega vzorca in s kromatogrami vzorcev za določanje izkoristka. Če se je zadrževalni čas kromatografskega vrha v kromatogramu vzorca ujema z zadrževalnim časom vrha v standardu in v vzorcih za določanje izkoristka, smo nadaljevali ugotavljanje prisotnosti iskanega analita.
- Relativno ionsko razmerje primarnega in sekundarnega prehoda:
Ionsko razmerje smo računali po enačbi:

$$R = \frac{A_{1st}}{A_{2nd}},$$

kjer je:

R relativno ionsko razmerje (%)

A_{1st} ploščina kromatografskega vrha pri primarnem prehodu

A_{2nd} ploščina kromatografskega vrha pri sekundarnem prehodu

Če so bile vrednosti relativnega ionskega razmerja v mejah, predpisanih z zakonodajo EU (ES, 2002), smo sklepali, da je bil iskani analit prisoten.

KVANTITATIVNO VREDNOTENJE

Vsebnost analitov smo izračunali po metodi eksterne standarda glede na ploščine kromatografskih vrhov.

- Umeritvena krivulja
Za umeritveno krivuljo je veljala enačba:

$$y = k \cdot x + n,$$

kjer je:

y	ploščina kromatografskega vrha
k	naklon premice
x	koncentracija analita
n	odsek na ordinatni osi

Medsebojno ujemanje med umeritvenimi točkami je podal kvadrat korelacijskega koeficienta r^2 .

- Vsebnost analitov v vzorcih
Vsebnost analita v posameznem vzorcu smo izračunali po naslednjem postopku:

Umeritvena krivulja

↓

Popravek z deležem izkoristka

Popravek z deležem izkoristka smo izračunali po enačbi

$$C = \frac{C'}{rec},$$

kjer je:

C vsebnost analita v vzorcu, popravljen z deležem izkoristka ($\mu\text{g/kg}$)

C' vsebnost analita v vzorcu glede na umeritveno krivuljo ($\mu\text{g/kg}$)

rec delež izkoristka metode (vrednost izkoristka v %, deljena s 100)

- Izračun izkoristka
Izkoristek smo izračunali s pomočjo standardnih dodatkov v slepih vzorcih za določanje izkoristka. Upoštevali smo povprečno vrednost serije.

$$rec = \frac{C'_{rec}}{C_{dod}} \cdot 100 \%,$$

kjer je:

rec izkoristek metode (%)

C'_{rec} vsebnost analita v vzorcu za določanje izkoristka glede na umeritveno krivuljo ($\mu\text{g/kg}$)

C_{dod} dodana vsebnost analita v vzorcu za določanje izkoristka ($\mu\text{g/kg}$)

3.6.8 OVREDNOTENJE (VALIDACIJA) METODE ZA DOLOČANJE OSTANKOV NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN V KRVNI PLAZMI IN MLEKU

Za ovrednotenje metode za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin smo uporabili smernice za ugotavljanje ustreznosti analiznih postopkov, objavljene v zakonodaji EU (ES, 2002). Ker je bila metoda uporabljena v Nacionalnem referenčnem laboratoriju (NRL) za ostanke veterinarskih zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora, smo morali upoštevati vsa podana navodila.

Poleg napotkov, ki veljajo za vse analizne metode, s katerimi opravljamo veterinarsko-sanitarni nadzor, pa je EU postavila še dodatne zahteve glede metod, ki za detekcijo uporabljajo masnospektrometrično detekcijo. Prvi pogoj so štiri t. i. identifikacijske točke, pri čemer je vsak matični ion merjenega masnega prehoda vreden eno točko, vsak ion potomca merjenega masnega prehoda pa 1,5 točke. Merjenje enega matičnega iona in dveh ionov potomcev nam tako da štiri identifikacijske točke, kar je pogoj za potrditev prepovedanih

substanc (skupina A v aneksu I Direktive Sveta 96/23/ES (1996)). Za spojine iz skupine B aneksa I navedene direktive, kamor so uvrščene tudi nesteroidne protivnetne učinkovine, zadostujejo tri identifikacijske točke (ES, 2002).

Drugi pogoj za ustreznost masnospektrometrične detekcije je vezan na dovoljena odstopanja relativnih ionskih razmerij med merjenimi prehodi za določen analit oziroma na relativno višino/ploščino kromatografskih vrhov navedenih prehodov. Izmerjen rezultat mora zadostiti vsem pogojem v odvisnosti od vrste kromatografije in masnospektrometrične detekcije, saj sicer ne smemo označiti merjenega vzorca kot neustreznega (ES, 2002).

3.6.8.1 SELEKTIVNOST

Analizirali smo 20 slepih vzorcev za vsak matriks (pri vsakem matriksu smo izbrali vzorce različnih živalskih vrst) in na kromatogramih ovrednotili morebitno ozadje v bližini zadrževalnih časov izbranih analitov.

3.6.8.2 SPECIFIČNOST

Ovrednotili smo sposobnost analizne metode, da selektivno loči izbrane analite. Posneli smo kromatograme standardnih raztopin in vzorcev z dodano mešanico standardov ter ovrednotili medsebojno kromatografsko ločbo izbranih analitov.

3.6.8.3 LINEARNOST

MLEKO

- Linearnost standardov v topilu
Analizirali smo standarde izbranih analitov v mešanici MeCN/MeOH (1:1, v/v). Koncentracijska območja so bila 1000–0,1 µg/L za fluniksin in 5-hidroksi fluniksin (17 podatkovnih točk), 1000–0,25 µg/L za ketoprofen (16 podatkovnih točk), 1000–0,75 µg/L za diklofenak (15 podatkovnih točk), 1000–2,5 µg/L za fenilbutazon, meloksikam in tolfenamsko kislino (12 podatkovnih točk) in 1000–5,0 µg/L za karprofen in oksifenbutazon (11 podatkovnih točk).

Na abscisno os smo nanegli koncentracije, na ordinatno os pa ploščine pripadajočih kromatografskih vrhov. Z metodo najmanjših kvadratov smo izračunali enačbe umeritvenih krivulj in jih ovrednotili glede na kvadrat korelacijskega koeficienta.

- Linearnost standardov v matriksih
Slepim vzorcem smo dodali standarde izbranih analitov. Koncentracijska območja so bila 1000–0,1 µg/kg za fluniksin in 5-hidroksi fluniksin (17 podatkovnih točk), 1000–0,5 µg/kg za diklofenak, ketoprofen in meloksikam (15 podatkovnih točk), 1000–2,5 µg/kg za fenilbutazon, oksifenbutazon in tolfenamsko kislino (12 podatkovnih točk) in 1000–25,0 µg/kg za karprofen (8 podatkovnih točk).

Na abscisno os smo nanegli koncentracije, na ordinatno os pa ploščine pripadajočih kromatografskih vrhov. Z metodo najmanjših kvadratov smo izračunali enačbe umeritvenih krivulj in jih ovrednotili glede na kvadrat korelacijskega koeficienta.

KRVNA PLAZMA

- Linearnost standardov v topilu

Analizirali smo standarde izbranih analitov v topilu. Koncentracijska območja so bila 1000–1,0 µg/L za fluniksin, 5-hidroksi fluniksin in meloksikam (13 podatkovnih točk), 1000–2,5 µg/L za ketoprofen (12 podatkovnih točk), 1000–7,5 µg/L za tolfenamsko kislino (10 podatkovnih točk), 1000–10,0 µg/L za diklofenak, fenilbutazon in oksifenbutazon (9 podatkovnih točk) in 1000–25,0 µg/L za karprofen (8 podatkovnih točk).

Na abscisno os smo nanesti koncentracije, na ordinatno os pa ploščine pripadajočih kromatografskih vrhov. Z metodo najmanjših kvadratov smo izračunali enačbe umeritvenih krivulj in jih ovrednotili glede na kvadrat korelacijskega koeficienta.

- Linearnost standardov v matriksih

Slepim vzorcem smo dodali standarde izbranih analitov. Koncentracijska območja so bila 20–0,05 µg/kg za fluniksin in 5-hidroksi fluniksin (12 podatkovnih točk), 100–0,25 µg/kg za ketoprofen in meloksikam (12 podatkovnih točk), 200–0,5 µg/kg za diklofenak, fenilbutazon, oksifenbutazon in tolfenamsko kislino (12 podatkovnih točk) in 1000–2,5 µg/kg za karprofen (12 podatkovnih točk).

Na abscisno os smo nanesti koncentracije, na ordinatno os pa ploščine pripadajočih kromatografskih vrhov. Z metodo najmanjših kvadratov smo izračunali enačbe umeritvenih krivulj in jih ovrednotili glede na kvadrat korelacijskega koeficienta.

3.6.8.4 IZKORISTEK

Izkoristek smo ugotavljali s seti paralelnih ($n = 6$) standardnih dodatkov treh koncentracij. Koncentracijske nivoje smo izbrali na podlagi vrednosti MRL EU za fluniksin, 5-hidroksi fluniksin, meloksikam in tolfenamsko kislino v mleku (ES, 2009), oziroma glede na meje vrednotenja pri drugih spojinah in v krvni plazmi. Koncentracijski nivoji za določanje izkoristkov v mleku in krvni plazmi so prikazani v tabeli 9.

Tabela 9: Koncentracija analitov po standardnih dodatkih za mleko in krvno plazmo

spojina	standardni dodatek v mleku (µg/kg)			standardni dodatek v krvni plazmi (µg/kg)		
	nižji	srednji	višji	nižji	srednji	višji
diklofenak	1	2	3	10	20	30
fenilbutazon	5	10	15	20	40	60
fluniksin	20	40	60	1	2	3
5-hidroksi fluniksin	20	40	60	1	2	3
karprofen	50	100	150	50	100	150
ketoprofen	1	2	3	10	20	30
meloksikam	7,5	15	22,5	5	10	15
oksifenbutazon	5	10	15	20	40	60
tolfenamska kislina	25	50	75	20	40	60

Izkoristek metode za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin smo ovrednotili kot količnik (v %) med ugotovljeno in dodano koncentracijo v obogatenih vzorcih. Izračunali smo:

- izkoristek za vsak posamični vzorec s standardnim dodatkom

- povprečni izkoristek, standardni odmik in koeficient variacije za vsak koncentracijski nivo

3.6.8.5 PONOVLJIVOST

Ponovljivost smo ugotavljali na treh koncentracijskih nivojih (tabela 9). Na vsakem koncentracijskem nivoju smo znotrajdneno pod istimi pogoji analizirali šest paralelk, kar smo ponovili še dvakrat. Za vsak koncentracijski nivo smo izračunali dnevno srednjo vrednost ugotovljenih koncentracij, standardni odmik in koeficient variacije, vse tri parametre pa tudi za vse tri dni skupaj. Ponovljivost metode smo ovrednotili s standardnim odmikom in koeficientom variacije tridnevni ugotovljenih koncentracij.

3.6.8.6 OBNOVLJIVOST

Zakonodaja EU je ovrednotila meje, ki jih lahko zavzema relativni standardni odmik obnovljivosti v odvisnosti od koncentracije. Osnova za določitev mej je Horwitzova enačba

$$KV = 2^{(1-0,5\log C)},$$

kjer je:

KV relativni standardni odmik obnovljivosti – koeficient variacije (%)

C koncentracija, izražena z razmerjem mas s potenco števila 10 ($\mu\text{g/kg}$ ustreza 10^{-9} itd.)

Slaba stran Horwitzove enačbe je njena uporabnost predvsem za višje koncentracije. Če pa hočemo izračunati KV za koncentracije, nižje od $100 \mu\text{g/kg}$, dobimo nesprejemljivo visoke vrednosti, zato želimo v tem koncentracijskem območju doseči čim nižje vrednosti KV (ES, 2002).

Obnovljivost smo ugotavljali na treh koncentracijskih nivojih (tabela 9). Na vsakem koncentracijskem nivoju smo znotrajdneno pod istimi pogoji analizirali šest paralelk, kar smo ponovili še dvakrat. Za vsako ponovitev smo uvedli v metodo spremembe, kot so kemikalije drugih proizvajalcev, drug analitik in drug vir vzorcev. Za vsak koncentracijski nivo smo izračunali srednjo vrednost ugotovljenih koncentracij, standardni odmik in koeficient variacije, vse tri parametre pa tudi za vse tri dni skupaj. Občutljivost metode smo ovrednotili s standardnim odmikom in koeficientom variacije tridnevni ugotovljenih koncentracij.

3.6.8.7 MEJA ODLOČITVE ($CC\alpha$)

Pričakovane vrednosti $CC\alpha$ smo določili iz krivulj linearnosti v matriksih kot vrednosti LOQ oziroma uporabili mejne vrednosti (MRL) za mleko, ki jih določa EU (ES, 2009). Koncentracije so prikazane v tabeli 10. Dvajsetim slepim vzorcem smo dodali standardne dodatke in jih analizirali na prisotnost izbranih analitov.

Izračunali smo standardni odmik za vsak vzorec in povprečni standardni odmik. Vrednost $CC\alpha$ smo ovrednotili kot pričakovano vrednost $CC\alpha$, povečano za 1,64 povprečnega standardnega odmika.

Tabela 10: Pričakovane in izmerjene vrednosti CC α

spojina	pričakovana vrednost CC α ($\mu\text{g/kg}$)		ovrednotena vrednost CC α ($\mu\text{g/kg}$)	
	mleko	krvna plazma	mleko	krvna plazma
diklofenak	2	10	2,98	12,39
fenilbutazon	5	20	6,46	25,71
fluniksin	40*	1	45,41	1,12
5-hidroksi fluniksin	40*	1	47,00	1,21
karprofen	50	50	63,96	61,68
ketoprofen	2	10	2,50	11,11
meloksikam	15*	5	16,49	5,62
oksifenbutazon	5	20	5,96	24,85
tolfenamska kislina	50*	20	55,86	23,41

* – MRL vrednost glede na ES (2009)

3.6.8.8 SPOSOBNOST DOLOČITVE (CC β)

Dvajset slepih vzorcev smo obogatili s standardnimi dodatki koncentracij CC α (ovrednotenih analitov) (tabela 10) in jih analizirali na prisotnost izbranih analitov. Izračunali smo standardni odmik za vsak vzorec in povprečni standardni odmik. CC β vrednost smo ovrednotili kot vrednost CC α , povečano za 1,64 povprečnega standardnega odmika.

3.6.8.9 MEJA VREDNOTENJA (LOQ)

Mejo vrednotenja smo predvideli iz meritev linearnosti v matriksu, kar pa smo morali potrditi z zadostno znotrajdnevno natančnostjo izkoristkov v vzorcih z ustreznimi standardnimi dodatki.

Slepim vzorcem mleka smo v šestih paralelkah dodali standarde izbranih analitov, in sicer 50 $\mu\text{g/kg}$ za karprofen, 1 $\mu\text{g/kg}$ za fluniksin, 5-hidroksi fluniksin in meloksikam, 2 $\mu\text{g/kg}$ za diklofenak in ketoprofen in 5 $\mu\text{g/kg}$ za fenilbutazon, oksifenbutazon in tolfenamsko kislino.

Slepim vzorcem krvne plazme smo v šestih paralelkah dodali standarde izbranih analitov. Koncentracije so prikazane v tabeli 9, rubrika »standardni dodatek v krvni plazmi ($\mu\text{g/kg}$)«, stolpec »nižji«.

3.6.8.10 STABILNOST

Z zaporednimi kromatografskimi meritvami smo v 24 urah po prvem injiciranju spremljali morebitne spremembe ploščin kromatografskih vrhov izbranih analitov v standardih in slepih vzorcih, obogatenih z dodatkom standardnih raztopin izbranih analitov. Koncentracije analitov v standardih in obogatenih vzorcih so bile na vrednostih LOQ za vsak matriks.

3.6.8.11 ROBUSTNOST

Robustnost metode za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku smo ovrednotili z uvajanjem sprememb, kot so mleko drugih živalskih vrst in obdelano mleko in spremenjeni laboratorijski pogoji v postopku analize.

Analizirali smo 10 vzorcev mleka, po dva za vsako vrsto (goveje, ovčje, kozje, sterilizirano goveje in pasterizirano goveje mleko). Vzorcem smo dodali standarde izbranih analitov. Izračunali smo koncentracije za vsak vzorec posebej in povprečje koncentracij za posamezno vrsto mleka, nato pa z dvostranskim Studentovim t-testom (stopnja tveganja $p < 0,05$) ovrednotili statistične razlike med posameznimi vrstami mleka.

Za ovrednotenje robustnosti za spremenjene laboratorijske pogoje v postopku analize smo preverjali različne kombinacije temperature in časa inkubacije pri hidrolizi vzorcev mleka. 30 slepih vzorcev mleka smo obogatili s standardi izbranih analitov in jih razdelili v 5 skupin po 6 vzorcev. Skupino št. 1 smo inkubirali 45 minut pri 37 °C, skupino št. 2 60 minut pri 37 °C, skupino št. 3 75 minut pri 37 °C, skupino št. 4 60 minut pri 34 °C in skupino št. 5 60 minut pri 40 °C. Izračunali smo koncentracije za vsak vzorec posebej in povprečje koncentracij za vsako skupino, nato pa z dvostranskim Studentovim t-testom (stopnja tveganja $p < 0,05$) ovrednotili statistične razlike med skupinami, ki so bile podvržene različnim pogojem inkubacije.

Robustnost metode za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi smo ovrednotili glede na različne živalske vrste. Analizirali smo 10 vzorcev krvne plazme, po dva za vsako vrsto (goveja, konjska, piščančja, prašičja in kunčja plazma). Vzorcem smo dodali standarde izbranih analitov. Izračunali smo koncentracije za vsak vzorec posebej in povprečje koncentracij za posamezno vrsto krvne plazme, nato pa z dvostranskim Studentovim t-testom (stopnja tveganja $p < 0,05$) ovrednotili statistične razlike med posameznimi vrstami krvne plazme.

3.6.8.12 ENAČBE

Za izračun parametrov ovrednotenja metode smo uporabili naslednje enačbe:

POVPREČJE

Za izračun povprečja smo uporabili enačbo:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i,$$

kjer je:

$\bar{x}$	povprečna vrednost meritev
N	število meritev
x_i	posamezna meritev ($i = 1 \dots N$)

IZKORISTEK

Za izračun izkoristka smo uporabili enačbo:

$$\text{rec} = \frac{\bar{x}}{a} \times 100 \%,$$

kjer je:

rec	izkoristek metode (%)
$\bar{x}$	povprečna vrednost meritev
a	dodana vrednost analita

STANDARDNI ODMIK

Za izračun standardnega odmika smo uporabili enačbo:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i - \bar{x}^2}{N-1}},$$

kjer je:

s	standardni odmik
N	število meritev
x_i	posamezna meritev
$\bar{x}$	povprečna vrednost meritev

RELATIVNI STANDARDNI ODMIK – KOEFICIENT VARIACIJE

Za izračun koeficienta variacije smo uporabili enačbo:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 (\%),$$

kjer je:

CV	koeficient variacije – relativni standardni odmik (%)
s	standardni odmik
$\bar{x}$	povprečje vrednosti meritev

MEJA ODLOČITVE ($CC\alpha$)

Za izračun meje odločitve $CC\alpha$ smo uporabili enačbo:

$$CC\alpha = MRL(LOQ) + 1,64 \cdot s_{MRL(LOQ)},$$

kjer je:

$CC\alpha$	meja odločitve
MRL	najvišja dovoljena vsebnost, določena s strani EU (ES, 2009)
LOQ	meja vrednotenja
$s_{MRL(LOQ)}$	standardni odmik, izmerjen pri koncentracijah MRL oziroma LOQ

SPOSOBNOST DOLOČITVE ($CC\beta$)

Za izračun sposobnosti določitve $CC\beta$ smo uporabili enačbo:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \cdot s_{CC\alpha},$$

kjer je:

$CC\beta$	sposobnost določitve
$CC\alpha$	meja odločitve
$s_{CC\alpha}$	standardni odmik, izmerjen pri meji odločitve

DVOSTRANSKI STUDENTOV T-TEST

Za izračun statističnih razlik med skupinami glede na Studentov dvostranski t-test smo uporabili enačbo:

$$t = \frac{\bar{c}_a - \bar{c}_b}{s_{c_a, c_b} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b}}},$$

kjer je:

t	Studentov parameter
$\bar{c}_a, \bar{c}_b$	povprečne vrednosti koncentracij skupin a in b
n_a, n_b	število vzorcev v skupinah a in b
s_{c_a, c_b}	združen standardni odmik za skupini a in b

Za izračun združenega standardnega odmika smo uporabili enačbo:

$$s_{c_a, c_b} = \sqrt{\frac{n_a - 1 \cdot s_a^2 + n_b - 1 \cdot s_b^2}{n_a + n_b - 2}},$$

kjer je:

s_{c_a, c_b}	združen standardni odmik za skupini a in b
n_a, n_b	število vzorcev v skupinah a in b
s_a, s_b	standardna odmika za skupini a in b

4 REZULTATI

4.1 VPLIV VERAPAMILA NA FARMAKOKINETIKO IVERMEKTINA IN DORAMEKTINA PRI OVCAH V LAKTACIJI

4.1.1 ČASOVNI POTEK IZLOČANJA IVERMEKTINA IN DORAMEKTINA IZ KRVNE PLAZME V MLEKO

Časovni potek izločanja ostankov ivermektina in doramektina smo prikazali s tabelami in pripadajočimi grafi.

Koncentracije ivermektina in doramektina v krvni plazmi in mleku posamično za vsako ovco prikazujejo tabele 11–14 in grafi 2–5. V tabelah 11–14 so navedena tudi dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije za posamezno skupino.

4.1.2 VPLIV VERAPAMILA NA POTEK IZLOČANJA IVERMEKTINA IN DORAMEKTINA IZ KRVNE PLAZME V MLEKO

Vpliv verapamila na časovni potek izločanja ostankov ivermektina in doramektina smo prikazali s tabelami in pripadajočimi grafi.

Koncentracije ivermektina in doramektina ob sočasnem vnosu verapamila v krvni plazmi in mleku posamično za vsako ovco prikazujejo tabele 15–18 in grafi 6–9. V tabelah 15–18 so navedena tudi dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije za posamezno skupino.

Primerjavo med dnevnimi povprečji koncentracij ivermektina in doramektina s sočasnim vnosom verapamila in brez njega za celotno poskusno skupino prikazujejo grafi 10–13.

4.1.3 FARMAKOKINETIČNA ANALIZA

V tabelah 19–21 so podani farmakokinetični parametri za ivermektin in doramektin v krvni plazmi in mleku posamezne ovce, skupaj s skupinskimi povprečji in standardnimi odmiki. Rezultate statistične primerjave skupin, ki so prejele ivermektin oziroma doramektin s skupinami, pri katerih smo sočasno vnesli še verapamil, prav tako prikazujejo iste zgoraj navedene tabele.

Tabela 11: Koncentracije ivermektina ($\mu\text{g H}_2\text{B}_{1a}/\text{L}$) v krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odkik	KV (%)
	51317	190600	190634	191094	215081	215084			
0,5	3,60	6,13	1,97	4,79	8,38	2,76	4,60	2,36	51,4
1	10,36	11,39	6,69	9,50	12,40	8,39	9,79	2,07	21,1
2	10,13	13,32	7,68	7,43	11,81	9,83	10,03	2,29	22,9
3	7,73	9,31	6,50	7,73	9,17	7,97	8,07	1,05	13,0
4	11,55	5,33	14,60	6,78	9,23	13,64	10,19	3,73	36,6
5	5,64	6,70	5,76	10,55	6,81	6,84	7,05	1,79	25,4
7	3,31	4,35	5,00	1,73	5,25	3,18	3,80	1,32	34,7
9	4,08	3,05	3,02	3,54	2,40	2,08	3,03	0,73	24,1
14	2,82	0,90	1,68	0,09	0,05	0,25	0,96	1,10	114,2
23	0,69	0,15	0,48	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	0,44	0,27	61,4

p.m.z. – pod mejo zaznavnosti analizne metode (0,02 $\mu\text{g}/\text{L}$); st. odkik – standardni odkik; KV – koeficient variacije

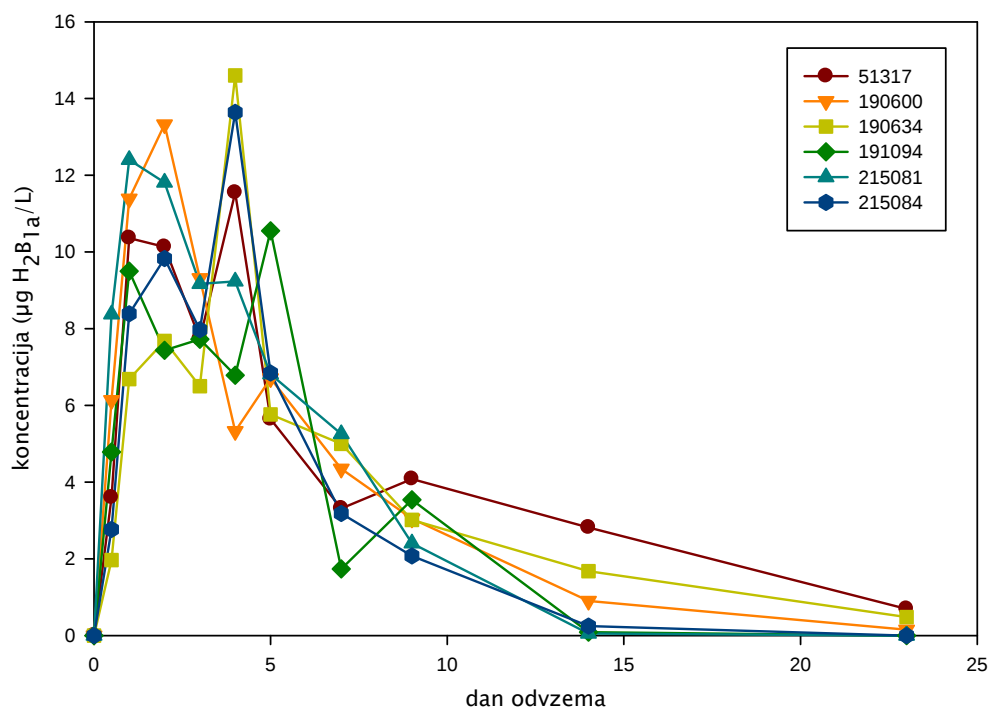
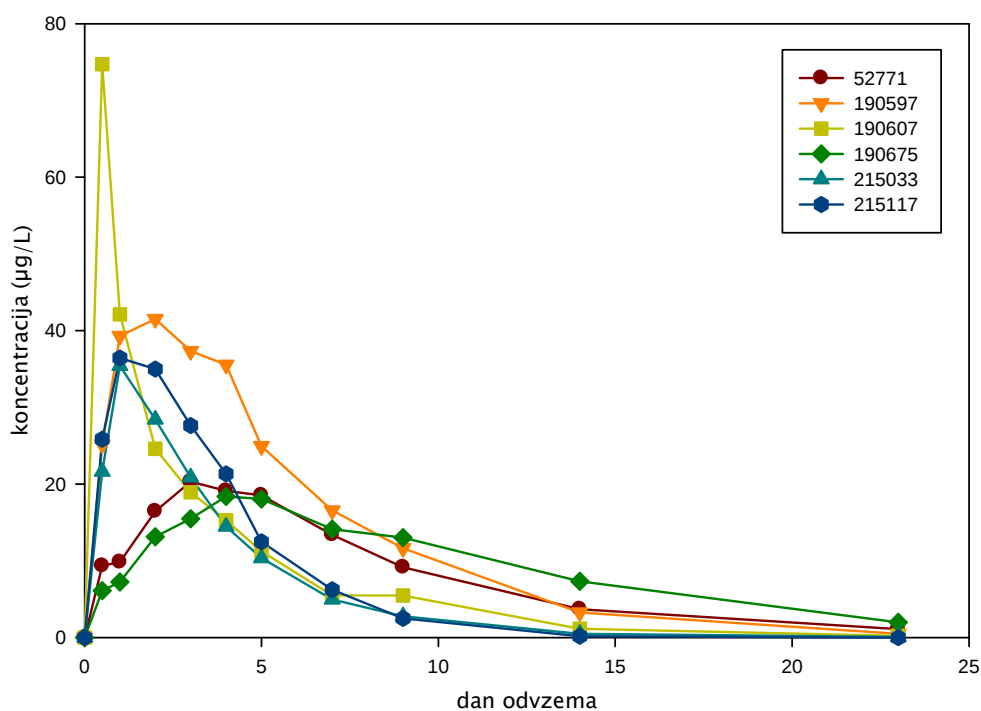
**Graf 2:** Časovni potek koncentracij ivermektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Tabela 12: Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/L}$) v krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odmik	KV (%)
	52771	190597	190607	190675	215033	215117			
0,5	9,34	25,16	74,73	6,10	21,62	25,84	27,13	24,74	91,2
1	9,84	39,29	42,11	7,24	35,42	36,44	28,39	15,57	54,9
2	16,45	41,50	24,60	13,12	28,42	35,00	26,51	10,81	40,8
3	20,31	37,34	18,93	15,48	20,89	27,64	23,43	7,89	33,7
4	19,12	35,56	15,26	18,38	14,46	21,32	20,69	7,71	37,3
5	18,54	24,94	11,23	18,06	10,34	12,48	15,93	5,62	35,3
7	13,38	16,55	5,49	14,13	4,96	6,22	10,12	5,12	50,6
9	9,16	11,64	5,47	13,03	2,77	2,50	7,43	4,51	60,8
14	3,69	3,27	1,14	7,32	0,50	0,16	2,68	2,70	100,7
23	1,09	0,48	0,21	1,97	0,08	p.m.z.	0,77	0,78	101,4

p.m.z. – pod mejo zaznavnosti analizne metode (0,02 $\mu\text{g/L}$); st. odmik – standardni odmik; KV – koeficient variacije



Graf 3: Časovni potek koncentracij doramektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Tabela 13: Koncentracije ivermektina ($\mu\text{g H}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odmik	KV (%)
	51317	190600	190634	191094	215081	215084			
0,5	4,33	7,21	3,54	6,08	10,19	3,99	5,89	2,52	42,8
1	6,28	3,93	4,14	4,71	6,40	2,36	4,64	1,53	33,0
2	11,95	7,93	9,70	6,78	6,42	4,30	7,84	2,68	34,2
3	8,93	6,84	7,14	5,22	4,67	4,42	6,20	1,74	28,1
4	8,58	5,01	10,02	2,07	3,75	4,36	5,63	3,04	54,0
5	7,05	4,79	5,51	5,82	4,26	2,80	5,04	1,45	28,8
7	3,87	2,82	2,83	13,24	2,42	1,27	4,41	4,41	99,9
9	3,34	1,88	3,09	13,25	1,63	0,88	4,01	4,62	115,1
14	2,14	0,58	1,61	0,18	p.m.z.	0,05	0,91	0,92	100,9
23	0,59	0,08	0,53	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	0,40	0,28	69,4

p.m.z. – pod mejo zaznavnosti analizne metode (0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$); st. odmik – standardni odmik; KV – koeficient variacije

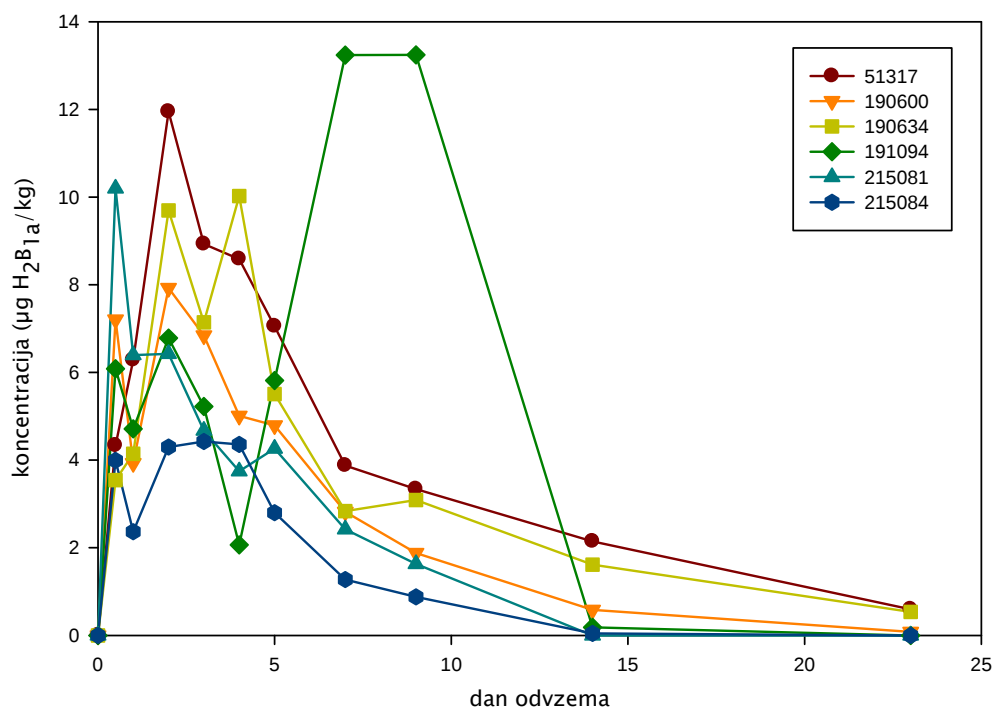
**Graf 4:** Časovni potek koncentracij ivermektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Tabela 14: Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odmik	KV (%)
	52771	190597	190607	190675	215033	215117			
0,5	4,67	15,03	42,24	5,34	11,28	13,20	15,29	13,85	90,5
1	17,85	11,61	24,75	18,98	32,86	13,72	19,96	7,79	39,0
2	15,24	27,56	23,40	31,99	49,14	32,01	29,89	11,33	37,9
3	94,13	100,22	22,18	7,25	22,88	18,84	44,25	41,42	93,6
4	46,81	46,03	13,25	11,63	32,01	18,71	28,07	15,91	56,7
5	42,84	27,85	10,78	11,09	25,38	12,07	21,67	12,83	59,2
7	38,44	23,04	5,86	10,45	5,50	5,83	14,85	13,36	89,9
9	32,48	11,29	4,31	6,98	2,55	1,23	9,81	11,67	119,0
14	10,99	3,66	1,14	7,10	0,67	0,13	3,95	4,31	109,2
23	2,37	0,43	0,26	1,75	0,14	0,04	0,83	0,98	118,4

st. odmik – standardni odmik; KV – koeficient variacije

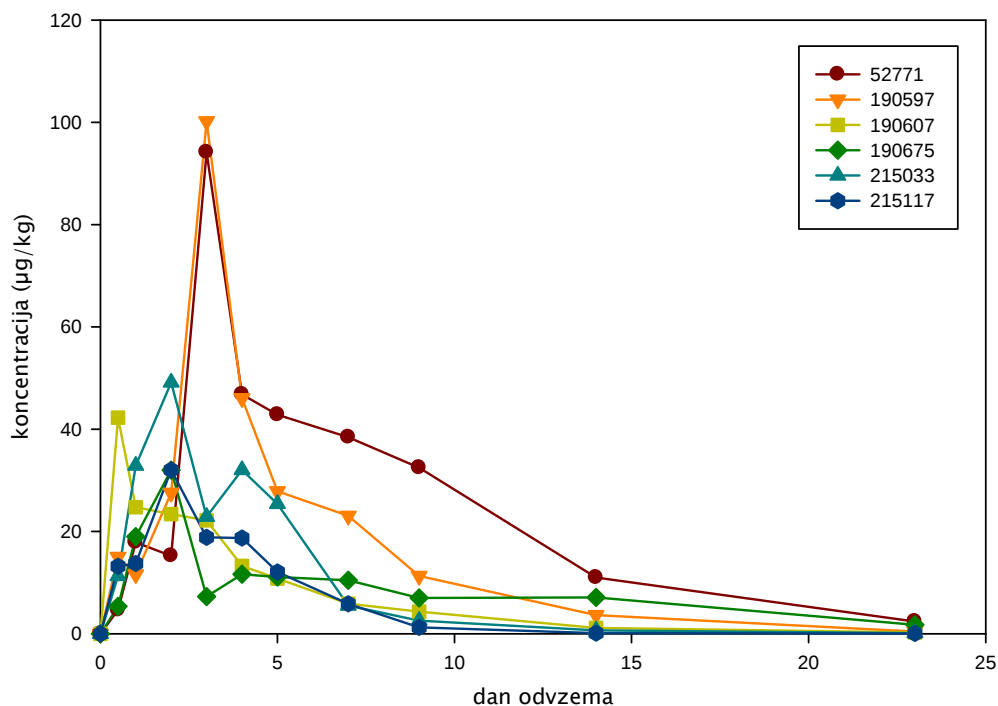
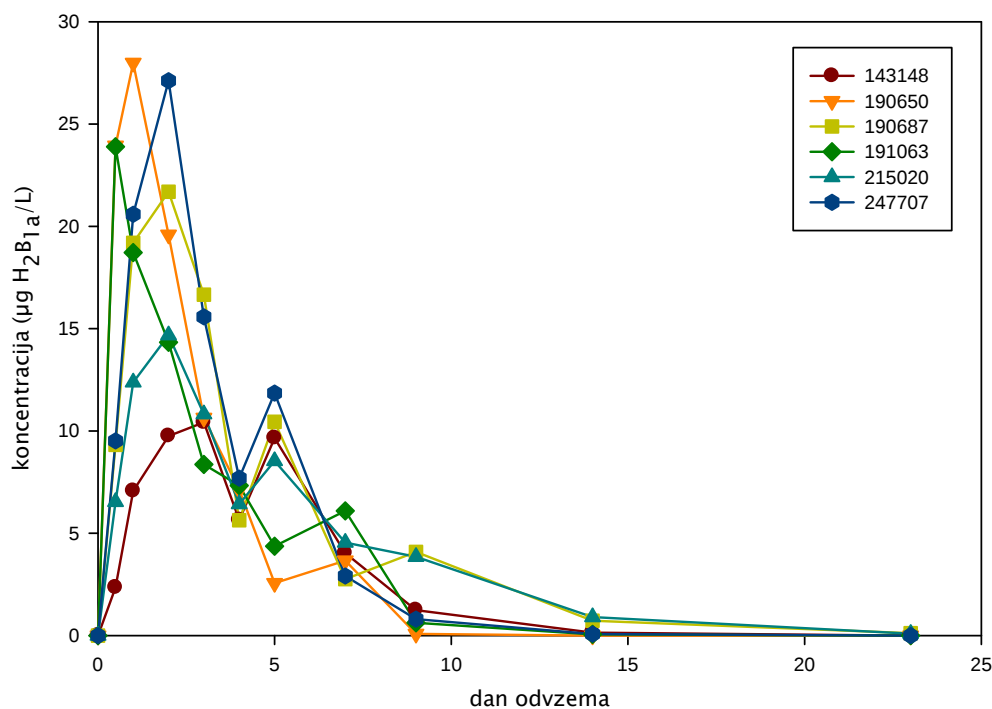
**Graf 5:** Časovni potek koncentracij doramektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.

Tabela 15: Koncentracije ivermektina v ($\mu\text{g H}_2\text{B}_{1a}/\text{L}$) krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovč, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odmik	KV (%)
	143148	190650	190678	191063	215020	247707			
0,5	2,35	23,94	9,32	23,89	6,53	9,51	12,59	9,15	72,6
1	7,06	27,99	19,19	18,71	12,37	20,59	17,65	7,20	40,8
2	9,75	19,59	21,69	14,33	14,68	27,12	17,86	6,19	34,7
3	10,42	10,64	16,66	8,36	10,82	15,58	12,08	3,27	27,1
4	5,64	7,12	5,64	7,33	6,42	7,70	6,64	0,88	13,3
5	9,65	2,56	10,44	4,37	8,53	11,85	7,90	3,65	46,2
7	4,03	3,66	2,76	6,10	4,54	2,91	4,00	1,23	30,7
9	1,24	0,08	4,08	0,62	3,84	0,80	1,78	1,73	97,5
14	0,14	p.m.z.	0,73	0,06	0,90	0,07	0,38	0,40	106,4
23	p.m.z.	p.m.z.	0,11	p.m.z.	0,09	p.m.z.	0,10	0,02	17,1

p.m.z. – pod mejo zaznavnosti analizične metode (0,02 $\mu\text{g/L}$); st. odmik – standardni odmik; KV – koeficient variacije

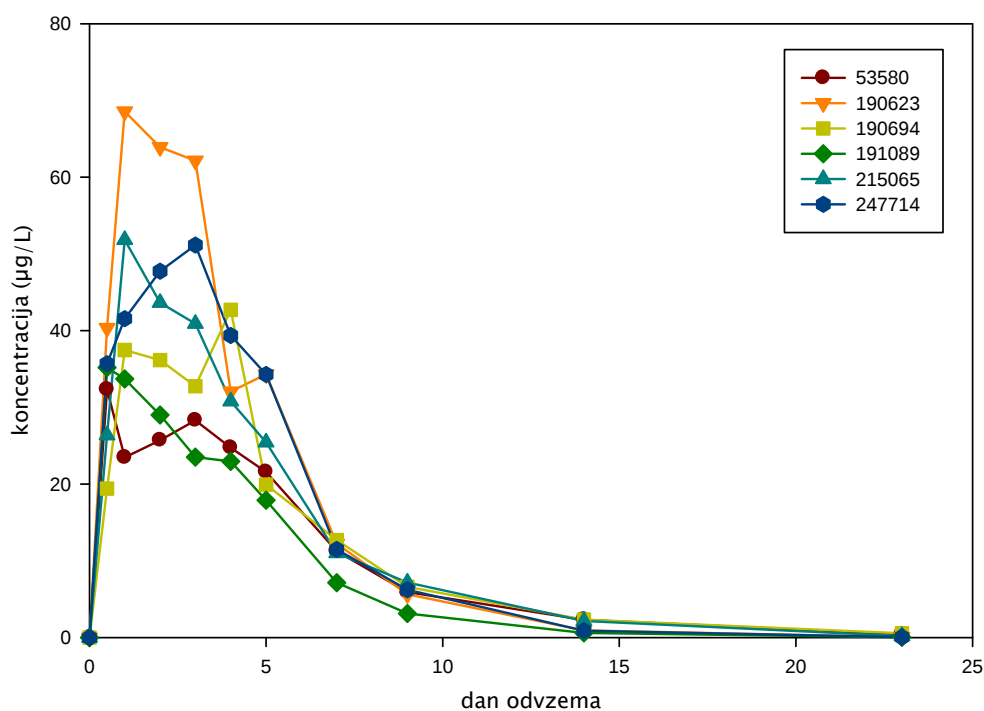


Graf 6: Časovni potek koncentracij ivermektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

Tabela 16: Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/L}$) v krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odklik	KV (%)
	53580	190623	190694	191089	215065	247714			
0,5	32,32	40,34	19,41	35,18	26,37	35,68	31,55	7,51	23,8
1	23,47	68,55	37,48	33,70	51,82	41,57	42,77	15,69	36,7
2	25,71	63,92	36,17	29,00	43,63	47,75	41,03	13,99	34,1
3	28,30	62,15	32,75	23,52	40,89	51,15	39,80	14,67	36,9
4	24,74	32,04	42,70	22,96	30,79	39,37	32,10	7,80	24,3
5	21,57	34,32	19,93	17,89	25,43	34,28	25,57	7,20	28,2
7	11,25	12,24	12,70	7,14	11,01	11,49	10,97	1,98	18,1
9	5,92	5,64	6,59	3,13	7,16	6,22	5,78	1,40	24,3
14	2,32	0,94	2,33	0,60	2,16	0,90	1,54	0,81	52,5
23	0,42	0,05	0,55	0,02	0,20	0,06	0,22	0,22	102,1

st. odklik – standardni odklik; KV – koeficient variacije

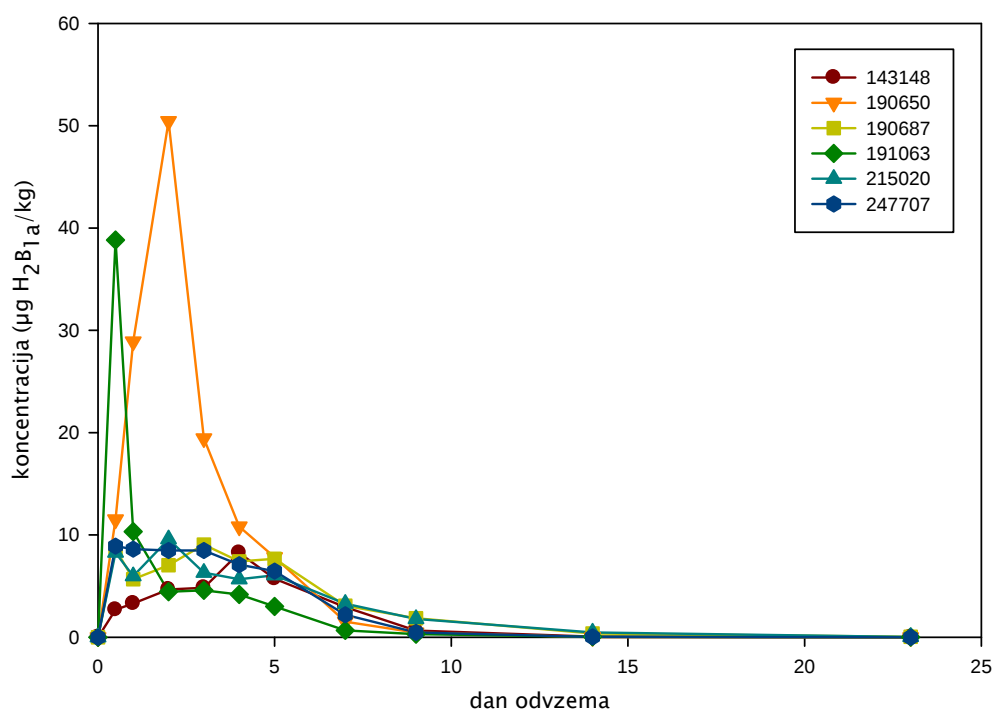


Graf 7: Časovni potek koncentracij doramektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

Tabela 17: Koncentracije ivermektina ($\mu\text{g H}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odmik	KV (%)
	143148	190650	190678	191063	215020	247707			
0,5	2,69	11,52	8,63	38,82	8,27	8,90	13,14	12,91	98,3
1	3,29	28,90	5,66	10,33	5,98	8,62	10,46	9,36	89,5
2	4,67	50,43	7,03	4,44	9,58	8,47	14,11	17,91	127,0
3	4,83	19,43	9,06	4,57	6,32	8,48	8,78	5,53	63,0
4	8,24	10,81	7,41	4,18	5,66	7,09	7,23	2,27	31,3
5	5,72	7,82	7,67	3,00	6,05	6,46	6,12	1,75	28,6
7	2,94	1,51	3,07	0,67	3,27	2,19	2,28	1,02	44,9
9	0,65	0,44	1,86	0,30	1,78	0,46	0,92	0,71	77,4
14	0,06	0,02	0,36	0,04	0,47	0,03	0,16	0,20	122,8
23	p.m.z.	p.m.z.	0,05	p.m.z.	0,03	p.m.z.	0,03	0,02	91,4

p.m.z. – pod mejo zaznavnosti analizne metode (0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$); st. odmik – standardni odmik; KV – koeficient variacije

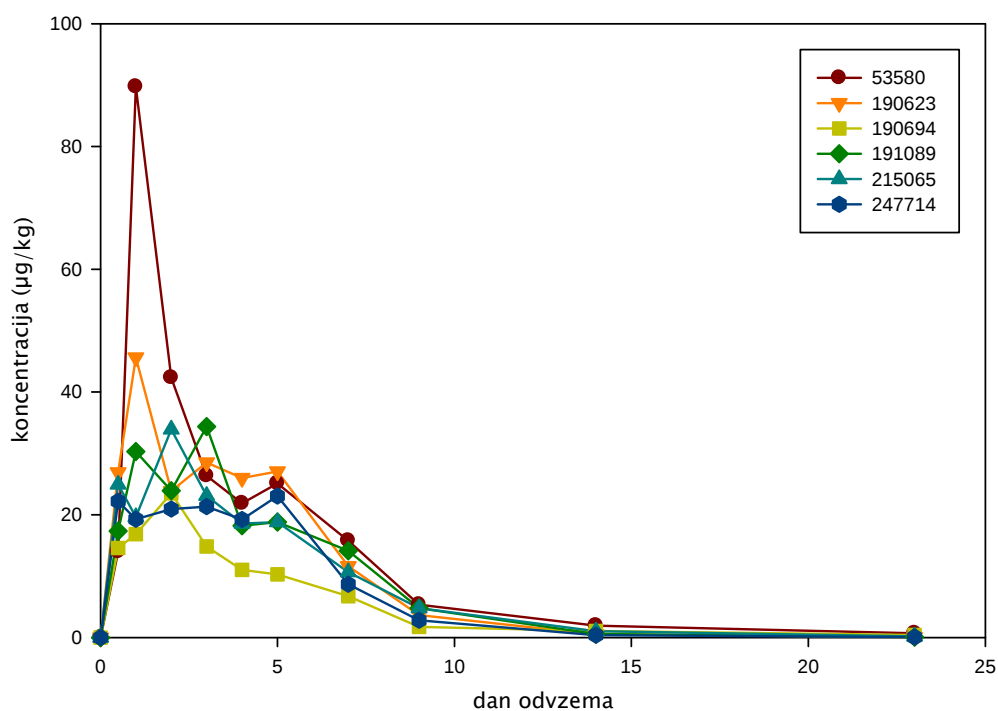


Graf 8: Časovni potek koncentracij ivermektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

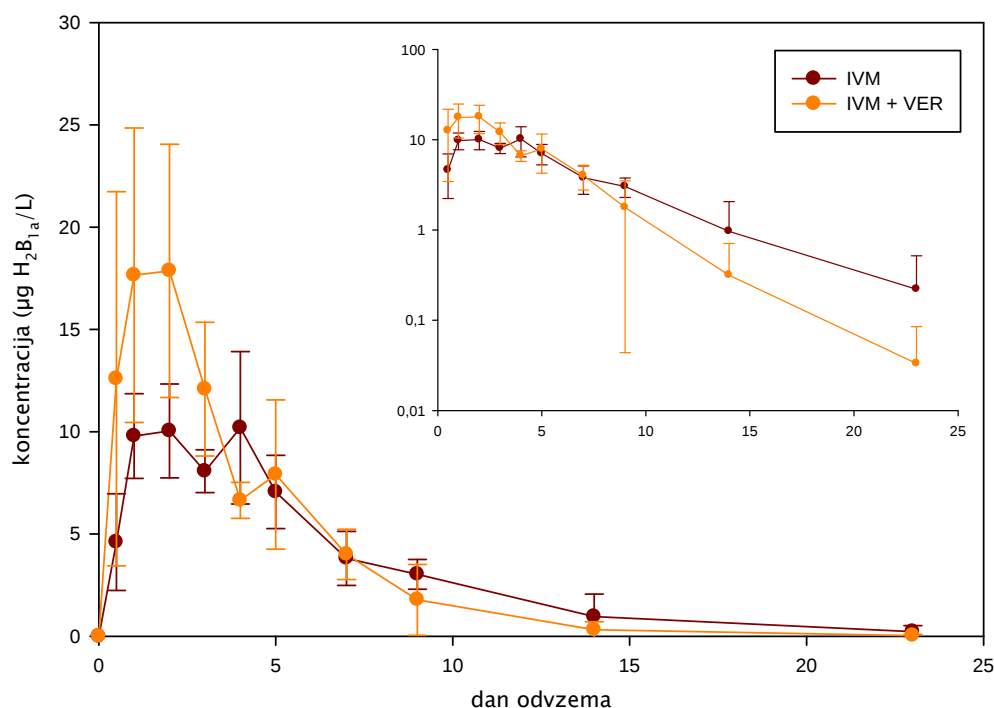
Tabela 18: Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.

Dan odvzema	Ušesna številka						povprečje	st. odmik	KV (%)
	53580	190623	190694	191089	215065	247714			
0,5	14,00	26,92	14,59	17,35	24,93	22,21	20,00	5,47	27,3
1	89,73	45,62	16,83	30,31	19,63	19,27	36,90	28,01	75,9
2	42,32	23,86	23,49	23,92	33,90	20,93	28,07	8,29	29,5
3	26,36	28,54	14,83	34,37	23,11	21,34	24,76	6,66	26,9
4	21,86	25,98	11,02	18,23	18,54	19,22	19,14	4,93	25,7
5	25,09	27,06	10,29	18,81	18,80	23,04	20,52	6,01	29,3
7	15,77	11,61	6,73	14,13	10,65	8,67	11,26	3,36	29,8
9	5,34	3,66	1,73	4,79	4,78	2,80	3,85	1,39	36,0
14	1,93	0,52	1,06	0,57	1,02	0,38	0,91	0,57	62,6
23	0,69	0,07	0,41	0,06	0,18	0,07	0,25	0,25	102,7

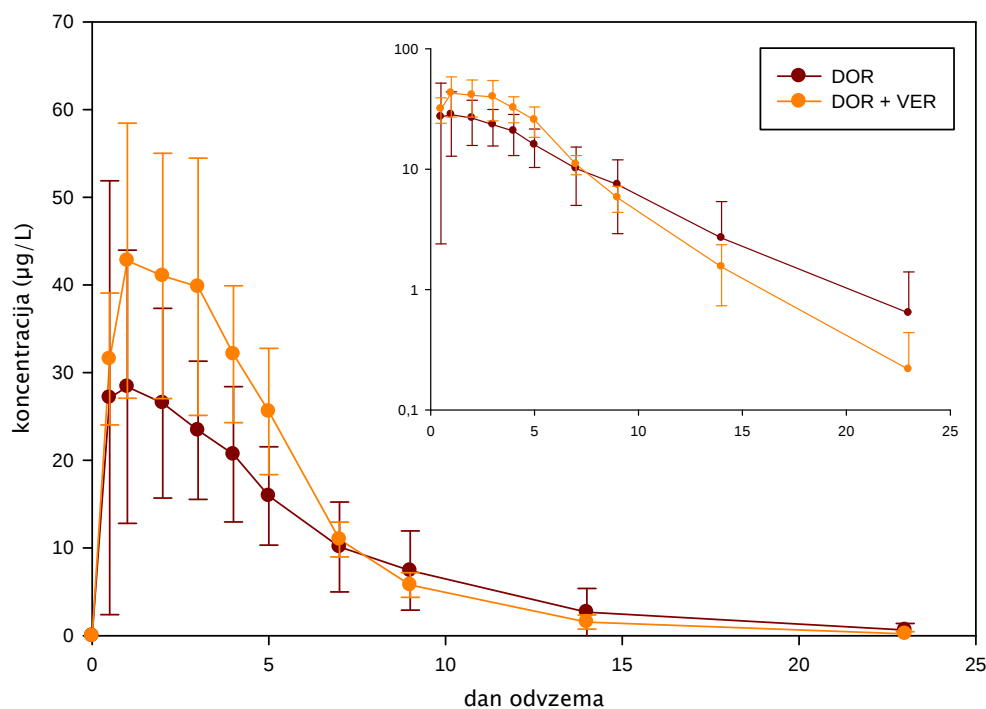
st. odmik – standardni odmik; KV – koeficient variacije



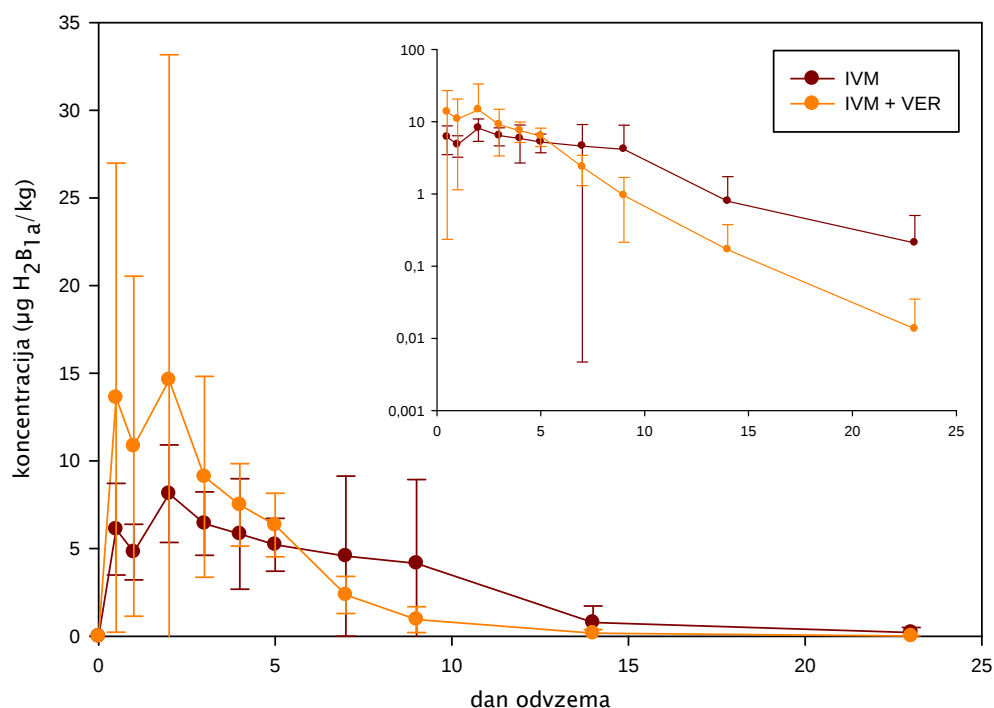
Graf 9: Časovni potek koncentracij doramektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.



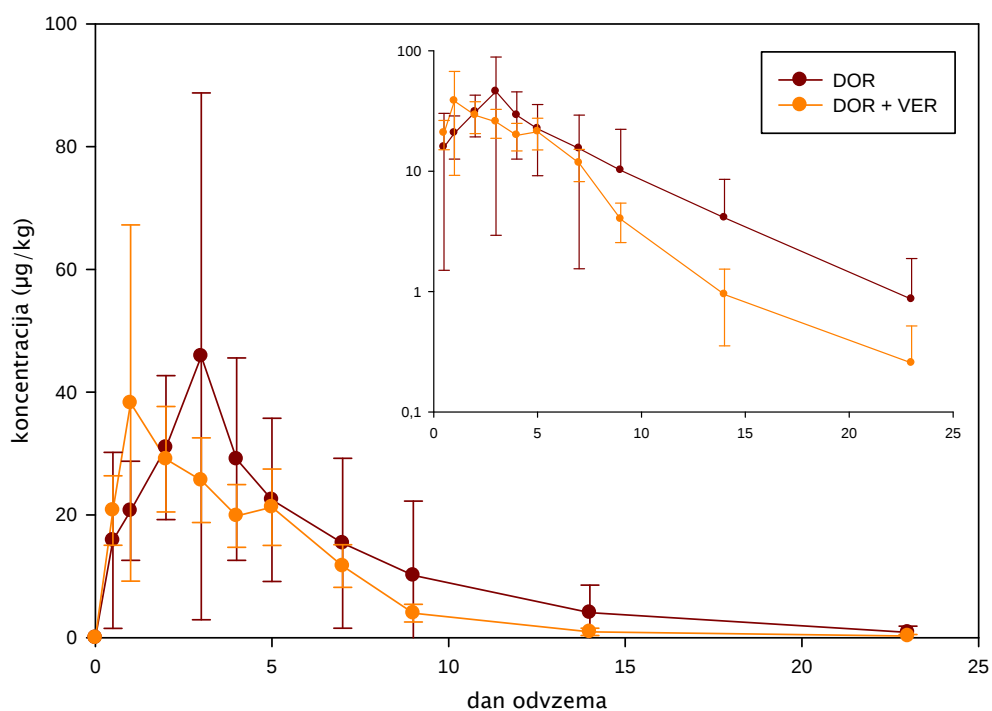
Graf 10: Časovni potek povprečij koncentracij ivermektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v krvni plazmi ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli ivermektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (IVM), in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg ivermektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (IVM+VER)



Graf 11: Časovni potek povprečij koncentracij doramektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v krvni plazmi ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli doramektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (DOR), in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg doramektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (DOR+VER)



Graf 12: Časovni potek povprečij koncentracij ivermektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v mleku ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli ivermektin v odmerku $0,2 \text{ mg/kg t. m. (IVM)}$, in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg ivermektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po $3 \text{ mg/kg t. m. (IVM+VER)}$



Graf 13: Časovni potek povprečij koncentracij doramektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v mleku ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli doramektin v odmerku $0,2 \text{ mg/kg t. m. (DOR)}$, in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg doramektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po $3 \text{ mg/kg t. m. (DOR+VER)}$

Tabela 19: Farmakokinetični parametri za krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (A) ter farmakokinetični parametri za krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (B)

A	Parameter	Ušesna številka						povp.	st. odmik
		51317	190600	190634	191094	215081	215084		
Krvna plazma	T_{max} (dan)	4	2	4	5	1	4	3,33	1,51
	C_{max} (µg/L)	11,55	13,32	14,60	10,55	12,40	13,64	12,68	1,48
	AUC_{last} (µg dan/L)	91,18	75,99	77,89	63,35	72,97	63,63	74,17	10,35
	λ_z (1/dan)	0,13	0,21	0,13	0,50	0,68	0,38	0,34	0,22
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	5,32	3,28	5,24	1,39	1,02	1,81	3,01	1,92
	AUC_{INF} (µg dan/L)	96,48	76,71	81,52	63,53	73,05	64,27	75,93	12,27
	V_z/F (L/kg)	885,33	595,04	862,12	356,19	192,88	388,98	546,7	283,8
	Cl/F (L/dan)	115,38	125,93	113,98	177,26	130,98	148,87	135,4	24,09
	MRT_{INF} (dan)	8,56	5,44	7,75	4,63	4,15	4,45	5,83	1,87
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	14,64	18,27	9,84	13,23	19,40	12,59	14,66	3,61
Mleko	T_{max} (dan)	4	2	4	5	2	4	3,50	1,22
	C_{max} (µg/kg)	11,55	13,32	14,60	10,55	12,40	13,64	12,68	1,48
	λ_z (1/dan)	0,12	0,22	0,13	0,66	0,24	0,45	0,30	0,21
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	5,85	3,12	5,54	1,05	2,88	1,56	3,33	1,99
	AUC_{INF} (µg dan/L)	92,23	52,36	77,13	106,65	45,99	27,85	67,03	30,00
	MRT_{INF} (dan)	8,22	5,37	8,18	6,80	4,93	4,16	6,28	1,72
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	13,31	10,89	10,08	10,33	13,58	6,13	10,72	2,70
	Razmerje AUC mleko/krvna plazma							0,89	0,44

B	Parameter	Ušesna številka						povp.	st. odmik
		143148	190650	190678	191063	215020	247707		
Krvna plazma	T_{max} (dan)	3	1	2	0,5	2	2	1,75	0,88
	C_{max} (µg/L)	10,42	27,99	21,69	23,89	14,68	27,12	20,96	7,03
	AUC_{last} (µg dan/L)	59,51	81,56	104,10	77,05	86,51	97,16	84,31	15,73
	λ_z (1/dan)	0,47	0,64	0,25	0,43	0,27	0,52	0,43	0,15
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	1,46	1,09	2,76	1,61	2,58	1,33	1,80	0,69
	AUC_{INF} (µg dan/L)	59,80	81,69	104,54	77,18	86,83	97,30	84,56	15,76
	V_z/F (L/kg)	327,40	173,09	372,58	279,75	441,34	182,62	296,1	106,0
	Cl/F (L/dan)	155,38	110,37	93,64	120,15	118,66	95,50	115,6	22,48
	MRT_{INF} (dan)	4,29	2,44	4,52	3,17	5,22	3,18	3,80	1,04
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	11,35	42,76	29,90	33,14	19,88	33,76	28,46	11,16
Mleko	T_{max} (dan)	3	1	2	0,5	2	2	1,75	0,88
	C_{max} (µg/kg)	10,42	27,99	21,69	23,89	14,68	27,12	20,96	7,03
	λ_z (1/dan)	0,50	0,65	0,27	0,37	0,30	0,61	0,45	0,16
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	1,38	1,06	2,55	1,86	2,32	1,14	1,72	0,63
	AUC_{INF} (µg dan/L)	39,95	128,95	61,24	49,26	57,55	52,58	64,92	32,21
	MRT_{INF} (dan)	4,37	2,58	4,76	2,15	4,79	3,44	3,68	1,14
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	6,37	54,54	12,51	30,43	13,89	15,69	22,24	17,72
	Razmerje AUC mleko/krvna plazma							0,78	0,39

T_{max} – čas po vnosu učinkovine, ko je bila ugotovljena njena najvišja koncentracija; C_{max} – najvišja ugotovljena koncentracija učinkovine; AUC – ploščina pod koncentracijsko krivuljo; λ_z – naklon terminalnega dela koncentracijske krivulje; $t_{1/2}$ – biološka razpolovna doba; V_z/F – navidezni distribucijski volumen; Cl/F – navidezni plazemski očistek; MRT – srednji zadrževalni čas učinkovine v organizmu; povp. – povprečje; st. odmik – standardni odmik; $last$ – označuje časovno območje od začetka poskusa do zadnje izmerjene podatkovne točke; INF – označuje časovno območje od začetka poskusa do neskončnosti (simulirane); $0-2$ – označuje časovno območje od začetka do drugega dne poskusa; za mleko smo upoštevali povprečno gostoto 1,036 kg/L

Tabela 20: Farmakokinetični parametri za krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (A) ter farmakokinetični parametri za krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (B)

A	Parameter	Ušesna številka						povp.	st. odmik
		52771	190597	190607	190675	215033	215117		
Krvna plazma	T_{max} (dan)	3	2	0,5	4	1	1	1,92	1,36
	C_{max} (µg/L)	20,31	41,50	74,73	18,38	35,42	36,44	37,80	20,34
	AUC_{last} (µg dan/L)	185,27	292,73	183,65	216,53	140,08	164,52	197,1	53,21
	λ_z (1/dan)	0,16	0,22	0,23	0,14	0,29	0,53	0,26	0,14
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	4,43	3,12	3,03	5,09	2,41	1,32	3,23	1,36
	AUC_{INF} (µg dan/L)	192,22	294,90	184,57	230,98	140,36	164,83	201,3	54,86
	V_z / F (L/kg)	445,06	178,67	265,05	394,63	296,75	108,37	281,4	126,9
	Cl / F (L/dan)	69,71	39,67	60,68	53,77	85,49	57,03	61,06	15,48
	MRT_{INF} (dan)	7,66	5,38	3,84	9,77	3,62	3,29	5,59	2,61
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	20,28	62,80	81,25	15,04	51,58	57,75	48,12	25,64
Mleko	T_{max} (dan)	3	2	0,5	4	1	1	1,92	1,36
	C_{max} (µg/kg)	20,31	41,50	74,73	18,38	35,42	36,44	37,80	20,34
	λ_z (1/dan)	0,18	0,23	0,21	0,10	0,20	0,34	0,21	0,08
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	3,87	2,96	3,31	7,22	3,41	2,01	3,80	1,79
	AUC_{INF} (µg dan/L)	546,53	359,28	157,35	212,95	205,46	126,11	267,9	158,2
	MRT_{INF} (dan)	7,77	5,46	4,39	10,14	3,88	3,61	5,87	2,58
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	24,18	31,08	53,23	34,08	56,83	34,08	38,92	13,05
Razmerje AUC mleko/krvna plazma								1,34	0,78

B	Parameter	Ušesna številka						povp.	st. odmik
		53580	190623	190694	191089	215065	247714		
Krvna plazma	T_{max} (dan)	0,5	1	4	0,5	1	3	1,67	1,47
	C_{max} (µg/L)	32,32	68,55	42,70	35,18	51,82	51,15	46,95	13,26
	AUC_{last} (µg dan/L)	206,26	332,17	246,61	174,74	268,63	290,02	253,0	56,98
	λ_z (1/dan)	0,19	0,34	0,18	0,35	0,26	0,33	0,28	0,08
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	3,67	2,02	3,95	1,95	2,71	2,08	2,73	0,88
	AUC_{INF} (µg dan/L)	208,49	332,30	249,75	174,80	269,42	290,19	254,1	56,64
	V_z / F (L/kg)	284,50	103,58	256,10	174,82	152,32	131,57	183,8	71,56
	Cl / F (L/dan)	53,72	35,51	44,93	62,01	38,97	43,76	46,48	9,80
	MRT_{INF} (dan)	5,28	3,64	5,14	3,72	4,46	3,99	4,37	0,71
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	46,62	103,54	55,90	57,36	73,86	72,89	68,36	20,19
Mleko	T_{max} (dan)	0,5	1	4	1	1	3	1,75	1,41
	C_{max} (µg/kg)	32,32	68,55	42,70	35,18	51,82	51,15	46,95	13,26
	λ_z (1/dan)	0,14	0,32	0,10	0,32	0,26	0,32	0,24	0,10
	$t_{1/2}$ (λ_z) (dan)	4,86	2,14	6,68	2,14	2,70	2,19	3,45	1,90
	AUC_{INF} (µg dan/L)	283,99	214,30	121,62	192,27	184,03	157,41	192,2	55,08
	MRT_{INF} (dan)	4,76	3,98	5,55	4,35	4,56	4,18	4,56	0,56
	AUC_{0-2} (µg dan/L)	98,89	61,75	32,80	44,93	45,73	37,31	53,57	24,30
Razmerje AUC mleko/krvna plazma								0,80	0,35

T_{max} – čas po vnosu učinkovine, ko je bila ugotovljena njena najvišja koncentracija; C_{max} – najvišja ugotovljena koncentracija učinkovine; AUC – ploščina pod koncentracijsko krivuljo; λ_z – naklon terminalnega dela koncentracijske krivulje; $t_{1/2}$ – biološka razpolovna doba; V_z/F – navidezni distribucijski volumen; Cl/F – navidezni plazemski očistek; MRT – srednji zadrževalni čas učinkovine v organizmu; povp. – povprečje; st. odmik – standardni odmik; $last$ – označuje časovno območje od začetka poskusa do zadnje izmerjene podatkovne točke; INF – označuje časovno območje od začetka poskusa do neskončnosti (simulirane); $0-2$ – označuje časovno območje od začetka do drugega dne poskusa; za mleko smo upoštevali povprečno gostoto 1,036 kg/L

Tabela 21: Primerjava varianc in povprečij farmakokinetičnih parametrov skupin ovc, ki smo jim podkožno vnesli ivermektin oziroma doramektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m., z ovcami, ki smo jim sočasno podkožno vnesli verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. Enakost varianc smo preverjali z Levenovim testom, enakost povprečnih vrednosti farmakokinetičnih parametrov pa s Studentovim (če sta bili varianci enaki) oziroma z Bahrens-Fisherjevim testom (če varianci nista bili enaki) glede na izračunane p-vrednosti

Parameter		IVM		DOR	
		Levene	Student	Levene	Student
			Bahrens–Fisher		Bahrens–Fisher
Krvna plazma	T _{max} (dan)	0,139	0,050	0,713	0,766
	C _{max} (µg/L)	0,011	0,034	0,613	0,377
	AUC _{last} (µg dan/L)	0,391	0,216	0,768	0,109
	λ _z (1/dan)	0,232	0,419	0,462	0,822
	t _{1/2} (λ _z) (dan)	0,012	0,195	0,426	0,469
	AUC _{INF} (µg dan/L)	0,589	0,315	0,911	0,132
	V _z /F (L/kg)	0,020	0,086	0,233	0,132
	Cl/F (L/dan)	0,744	0,172	0,461	0,080
	MRT _{INF} (dan)	0,089	0,043	0,019	0,313
	AUC _{0–2} (µg dan/L)	0,050	0,016	0,474	0,160
Mleko	λ _z (1/dan)	0,568	0,198	0,344	0,533
	t _{1/2} (λ _z) (dan)	0,031	0,107	0,553	0,752
	AUC _{INF} (µg dan/L)	0,733	0,909	0,043	0,310
	MRT _{INF} (dan)	0,149	0,012	0,011	0,273
	AUC _{0–2} (µg dan/L)	0,017	0,174	0,289	0,222
Razmerje AUC mleko/krvna plazma		0,807	0,660	0,267	0,152
Razmerje AUC _{0–2} mleko/krvna plazma		0,285	0,867	0,830	0,636

IVM, DOR – skupina, ki je prejela ivermektin oziroma doramektin; Levene – Levenov test za ugotavljanje enakosti varianc. Vrednost manjša od 0,05 pomeni, da varianci primerjanih skupin nista enaki, vrednost nad 0,05 pa da sta enaki; Student/Bahrens-Fisher – Studentov oziroma Bahrens-Fisherjev dvostranski test za ugotavljanje enakosti povprečnih vrednosti. Vrednost pod 0,05 pomeni, da je med povprečjema statistično značilna razlika (v tabeli označeno z rdečim ozadjem), vrednost nad 0,05, pa da razlike ni; T_{max} – čas po vnosu učinkovine, ko je bila ugotovljena njena najvišja koncentracija; C_{max} – najvišja ugotovljena koncentracija učinkovine; AUC – ploščina pod koncentracijsko krivuljo; λ_z – naklon terminalnega dela koncentracijske krivulje; $t_{1/2}$ – biološka razpolovna doba; V_z/F – navidezni distribucijski volumen; Cl/F – navidezni plazemski očistek; MRT – srednji zadrževalni čas učinkovine v organizmu; $last$ – označuje časovno območje od začetka poskusa do zadnje izmerjene podatkovne točke; INF – označuje časovno območje od začetka poskusa do neskončnosti (simulirane); $0-2$ – označuje časovno območje od začetka do drugega dne poskusa; za mleko smo upoštevali povprečno gostoto 1,036 kg/L

4.2 OSTANKI EPRINOMEKTINA V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH

4.2.1 VALIDACIJA METODE UGOTAVLJANJA OSTANKOV EPRINOMEKTINA V MLEČNIH IZDELKIH

4.2.1.1 SELEKTIVNOST

Pri 20 negativnih vzorcih mlečnih izdelkov nismo ugotovili kromatografskega ozadja pri zadrževalnem času eprinomektina, kar na slikah 27–31 prikazujejo značilni kromatogrami slepih vzorcev, slepih vzorcev s standardnim dodatkom (koncentracija 0,5 µg/kg) in standardov (koncentracija 0,01 µg/L) eprinomektina.

4.2.1.2 SPECIFIČNOST

Analizna metoda je specifično ločila eprinomektin, moksidektin, emamektin, nemadektin, abamektin, doramektin in ivermektin pri standardih in vseh matriksih, kar prikazujejo kromatogrami standardnih mešanic (vse učinkovine s koncentracijo 0,01 µg/L) in kromatogrami slepih vzorcev vseh mlečnih izdelkov s standardnimi dodatki eprinomektina (vse učinkovine s koncentracijo 4,0 µg/kg) na slikah 27 in 32–33.

4.2.1.3 LINEARNOST

Linearnost eprinomektina v mlečnih izdelkih na koncentracijskih območjih, navedenih v tabeli 35, je prikazana v tabelah 22–29 in grafih 14–21.

4.2.1.4 IZKORISTEK

Izkoristek eprinomektina v mlečnih izdelkih na koncentracijskih nivojih, navedenih v tabeli 6, ovrednoten v petih paralelkah (dvodnevno), smo s povprečjem, standardnim odmikom in koeficientom variacije za vsak koncentracijski nivo znotrajdneno in za oba dneva skupaj prikazali v tabelah 30 in 31.

4.2.1.5 OBNOVLJIVOST

Obnovljivost določanja ostankov eprinomektina v mlečnih izdelkih na koncentracijskih nivojih, navedenih v tabeli 6, ovrednoteno v petih paralelkah (dvodnevno), smo s povprečjem, standardnim odmikom in koeficientom variacije za vsak koncentracijski nivo znotrajdneno in za oba dneva skupaj prikazali v tabelah 32 in 33.

4.2.1.6 MEJA VREDNOTENJA (LOQ)

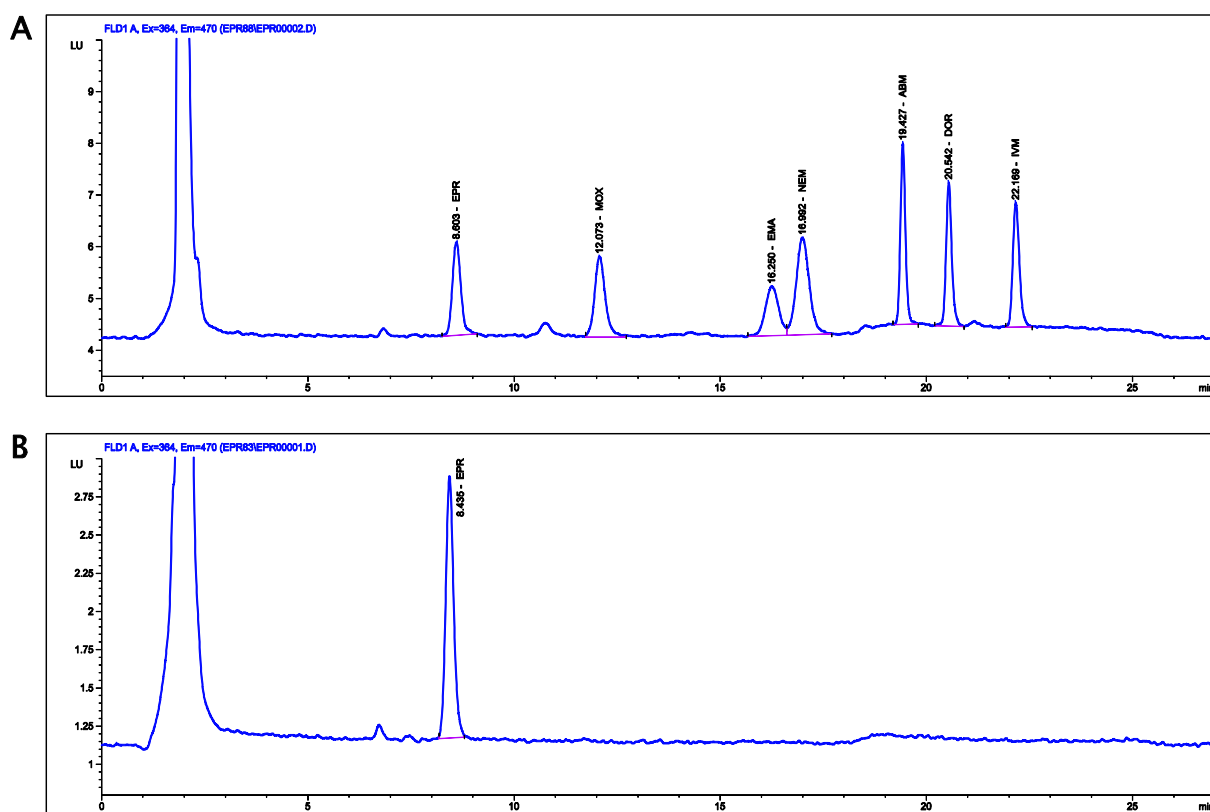
Meje kvantitativne določitve (LOQ) analizne metode določanja eprinomektina v mlečnih izdelkih, ovrednotene s povprečjem petih meritev, povprečnimi izkoristki, standardnimi odmiki in koeficienti variacije, prikazuje tabela 34. Kromatogrami slepih vzorcev s standardnim dodatkom eprinomektina na koncentraciji LOQ so prikazani na slikah 30 in 31.

4.2.1.7 STABILNOST

Fluorescenčni derivati eprinomektina v topilu, mleku in mlečnih izdelkih na dveh koncentracijskih nivojih so bili obstojni še 44 ur po derivatizaciji z *N*-metilimidazolom, anhidridom trifluorocetne kisline in očetno kislino, kar smo prikazali v grafih 22 in 23.

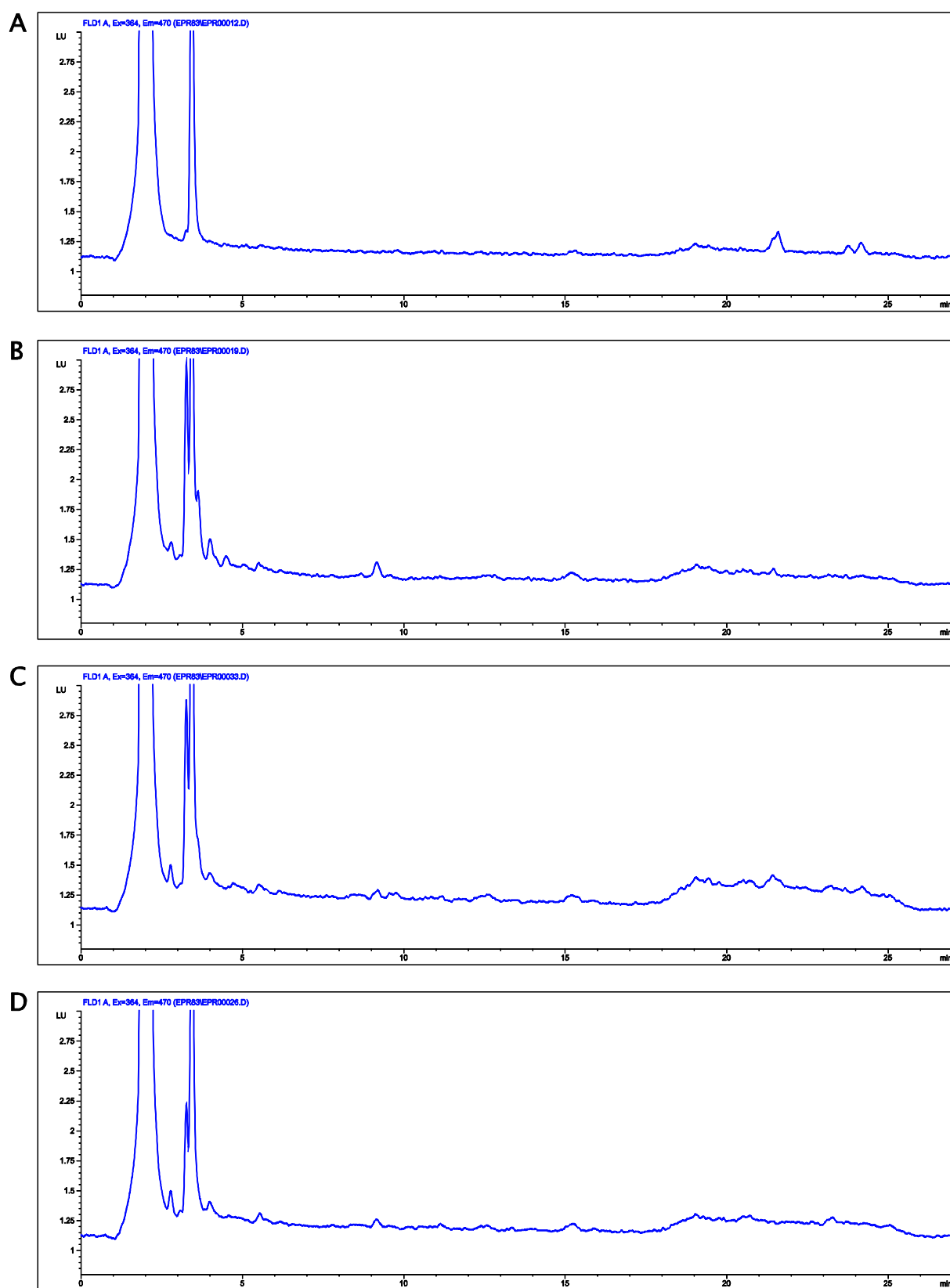
4.2.1.8 POVZETEK

Ovrednotene validacijske parametre analizne metode določanja ostankov eprinomektina v preučevanih mlečnih izdelkih smo zbrali v tabeli 35.

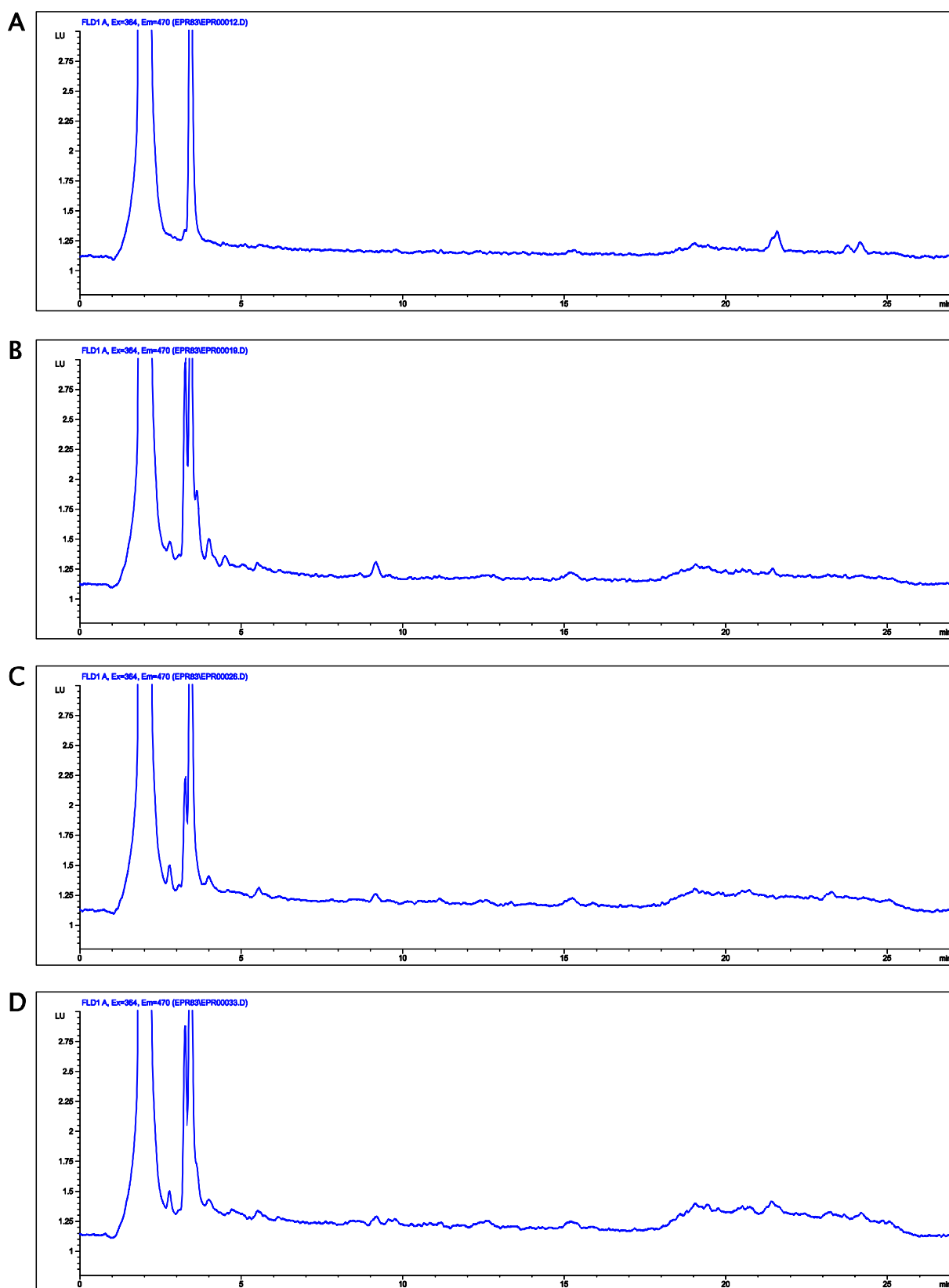


Slika 27: Značilni kromatogrami standardov avermektinov

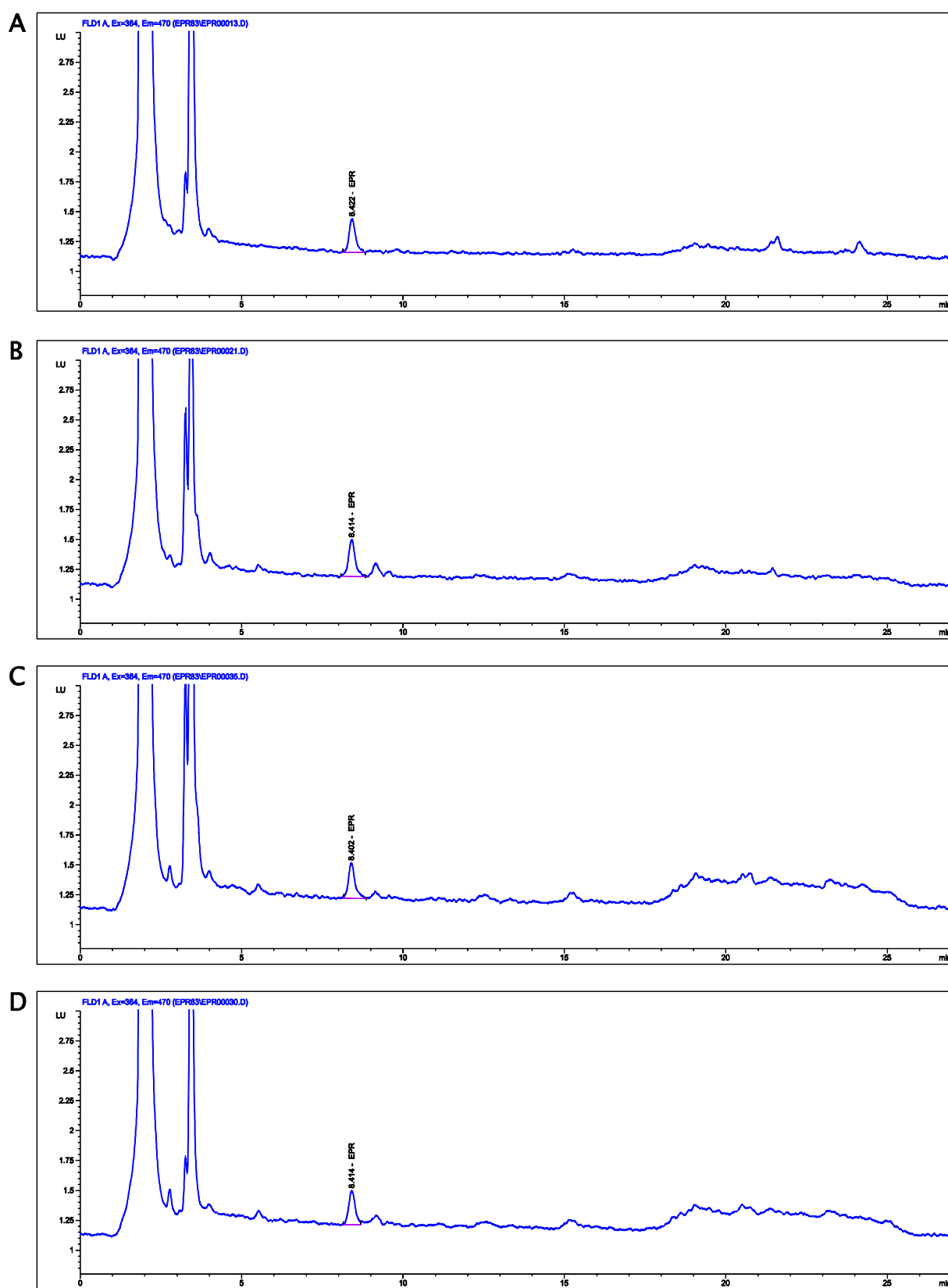
A – standardna mešanica avermektinov koncentracije 0,01 µg/L; B – standardna raztopina eprinomektina koncentracije 0,01 µg/L



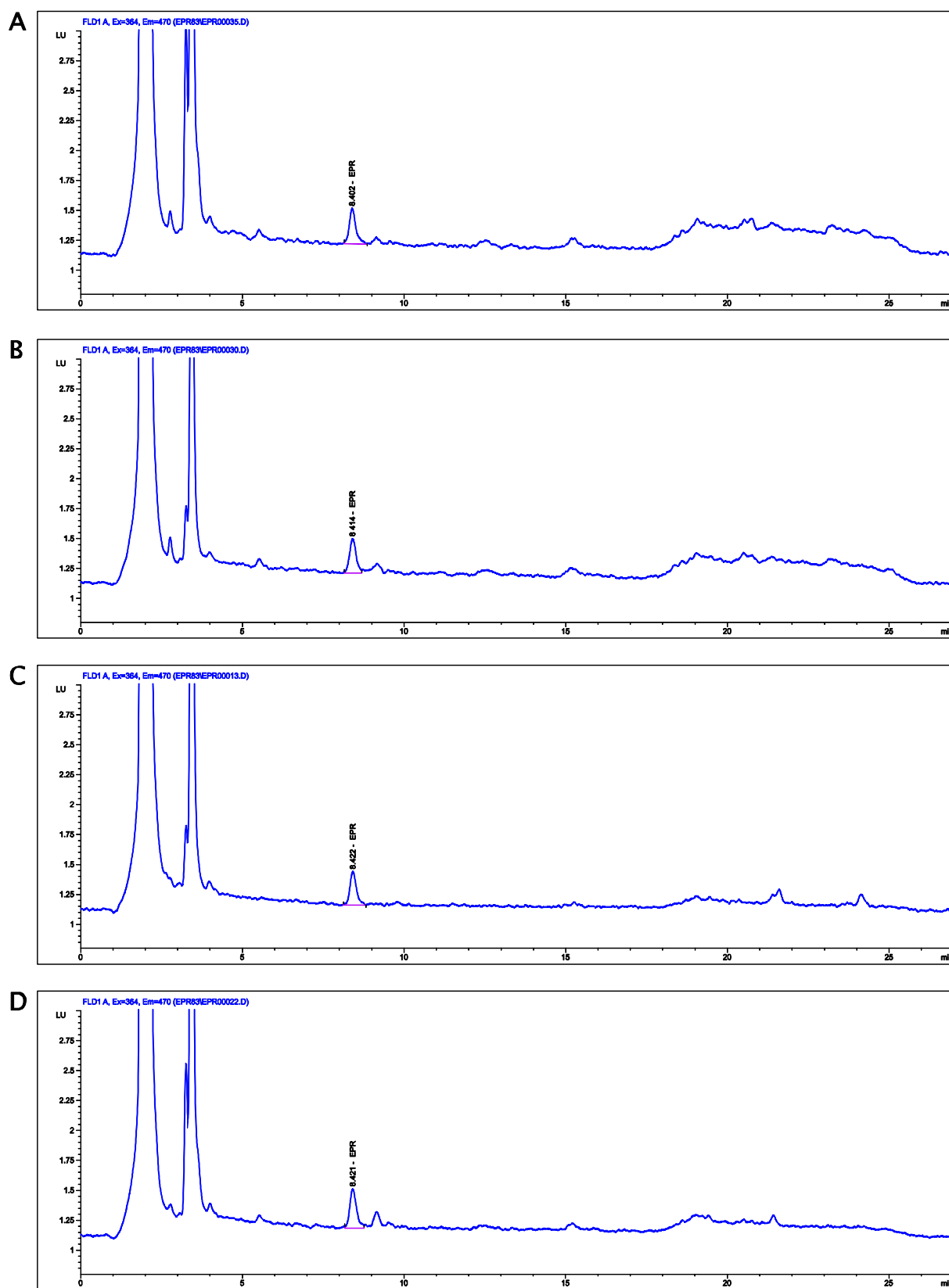
Slika 28: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov
A – albuminska skuta; B – sveži sir; C – zoren sir (30 dni); D – zoren sir (60 dni)



Slika 29: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov
A – jogurt iz surovega mleka; B – jogurt iz termično obdelanega mleka; C – primarna sirotka; D – sekundarna sirotka

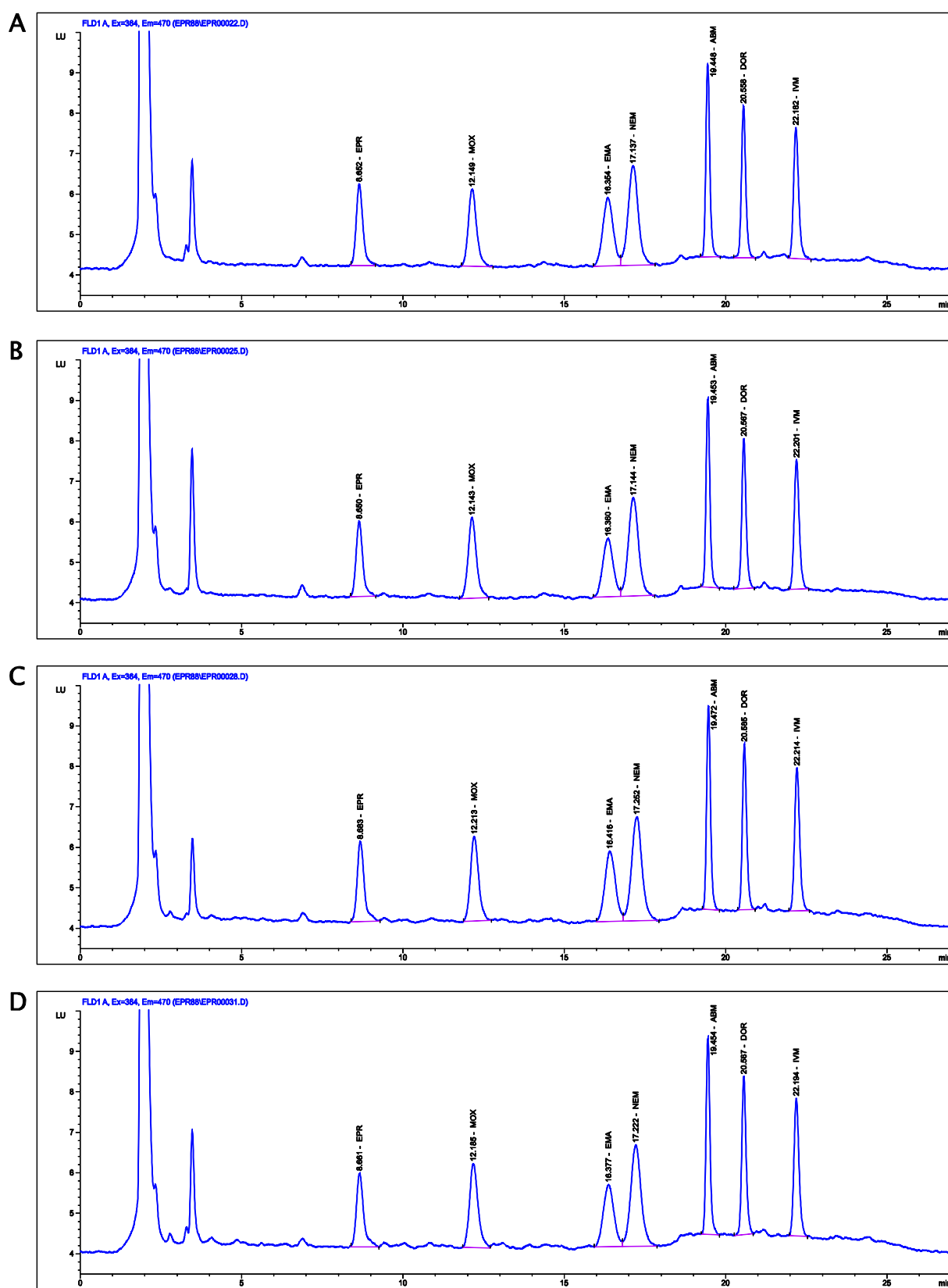


Slika 30: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom eprinomektina koncentracije $0,5 \mu\text{g/kg}$ (LOQ)
 A – albuminska skuta; B – sveži sir; C – zoren sir (30 dni); D – zoren sir (60 dni)

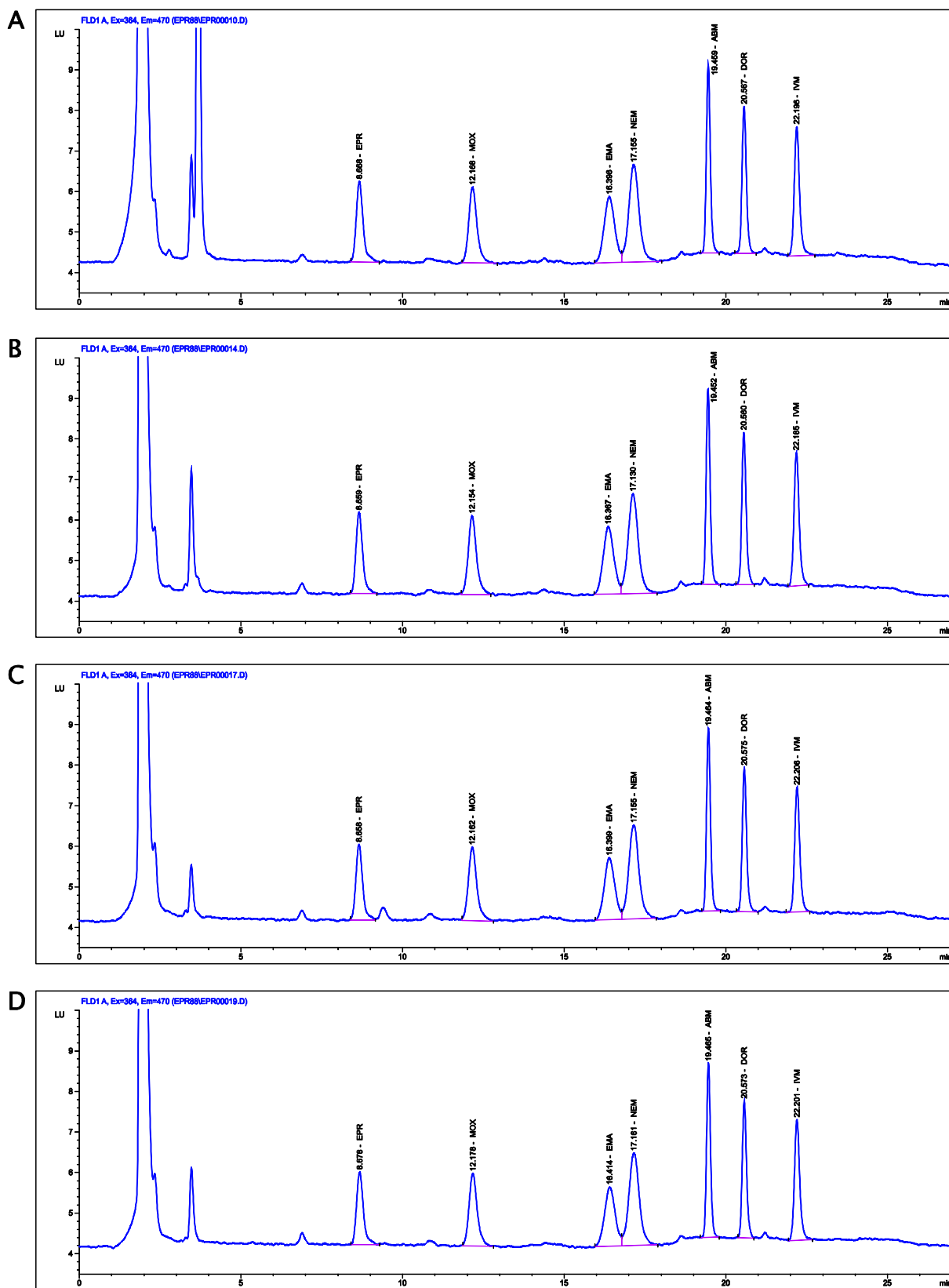


Slika 31: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom eprinomektina koncentracije $0,5 \mu\text{g/kg}$ (LOQ)

A – jogurt iz surovega mleka; B – jogurt iz termično obdelanega mleka; C – primarna sirotka; D – sekundarna sirotka



Slika 32: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom avermektinov koncentracije 4,0 µg/kg
 A – albuminska skuta; B – sveži sir; C – zoren sir (30 dni); D – zoren sir (60 dni)



Slika 33: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom avermektinov koncentracije 4,0 µg/kg

A – jogurt iz surovega mleka; B – jogurt iz termično obdelanega mleka; C – primarna sirotka; D – sekundarna sirotka

Tabela 22: Linearnost meritev eprinomektina v albuminski skuti v območju standardnih dodatkov 15–0,5 μg EPR B_{1a}/kg

dodano (μg EPR B_{1a}/kg)	ugotovljeno (μg EPR B_{1a}/kg)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
15	10,59	10,81	71	72
	11,03		74	
10	6,45	6,97	64	70
	7,49		75	
7,5	4,94	4,97	66	66
	5,01		67	
5	3,10	3,11	62	62
	3,11		62	
2,5	1,52	1,56	61	63
	1,61		64	
1	0,44	0,55	44	55
	0,65		65	
0,5	0,25	0,22	49	45
	0,20		40	

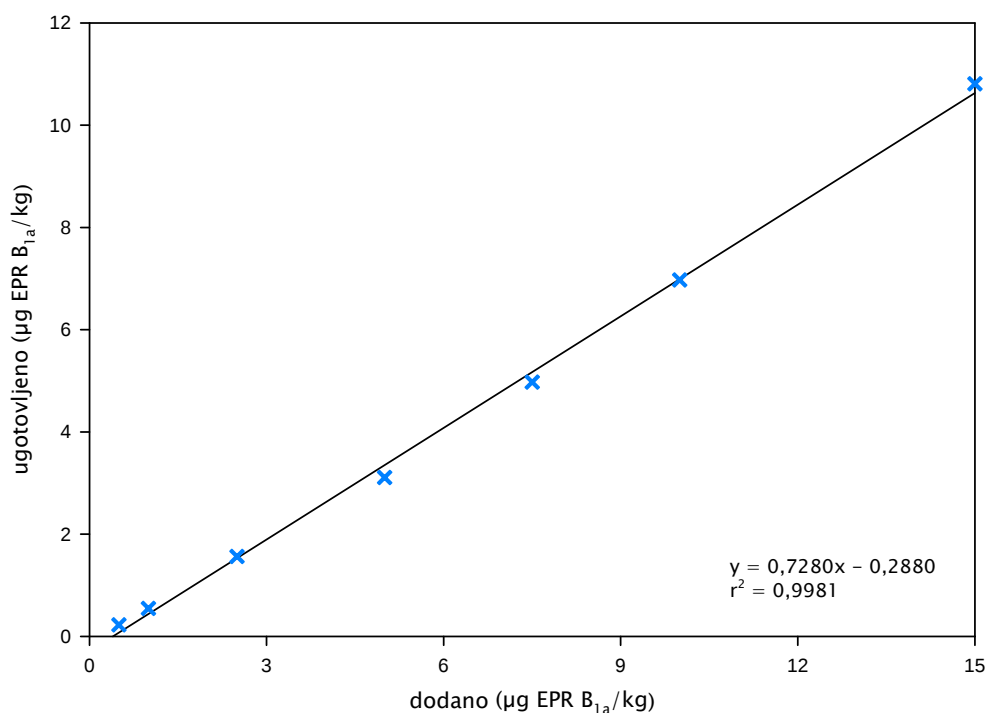
**Graf 14:** Regresijska premica eprinomektina v albuminski skuti v koncentracijskem območju 15–0,5 μg EPR B_{1a}/kg ; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 23: Linearnost meritev eprinomektina v svežem siru v območju standardnih dodatkov 15–0,5 μg EPR B_{1a}/kg

dodano (μg EPR B_{1a}/kg)	ugotovljeno (μg EPR B_{1a}/kg)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
15	10,33	9,67	69	64
	9,00		60	
10	7,27	6,80	73	68
	6,34		63	
7,5	4,87	4,68	65	62
	4,49		60	
5	3,28	3,28	66	66
	3,27		65	
2,5	1,66	1,78	67	71
	1,90		76	
1	0,87	0,71	87	71
	0,55		55	
0,5	0,24	0,24	48	49
	0,25		49	

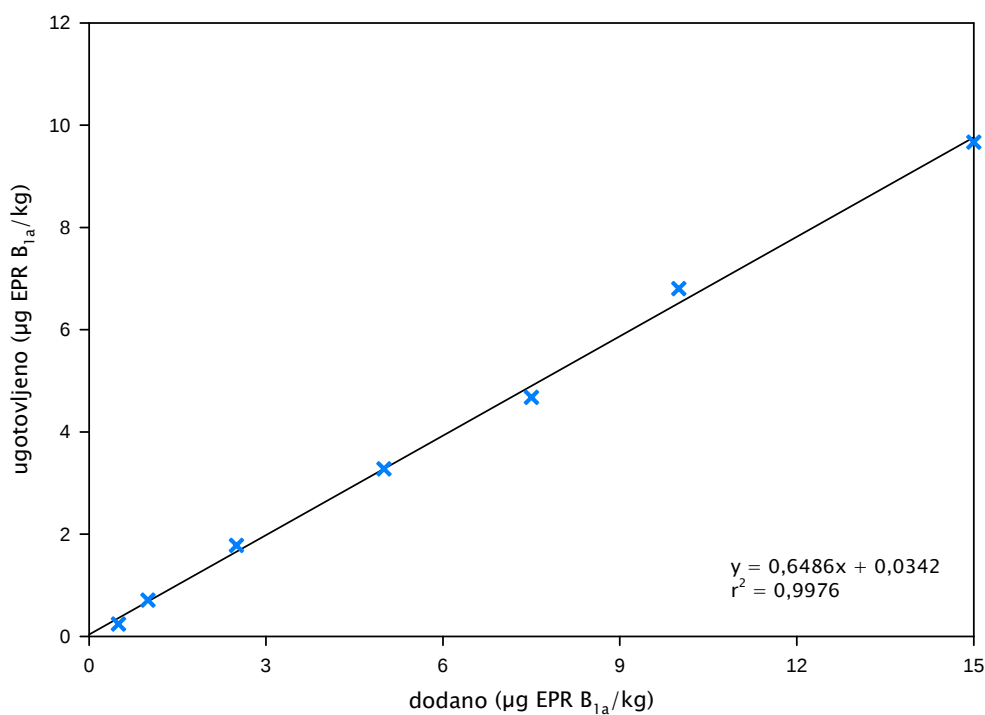
**Graf 15:** Regresijska premica eprinomektina v svežem siru v koncentracijskem območju 15–0,5 μg EPR B_{1a}/kg ; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 24: Linearnost meritev eprinomektina v zorenem siru (30 dni) v območju standardnih dodatkov 15–0,5 $\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$

dodano ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)	ugotovljeno ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
15	5,24	6,20	35	41
	7,16		48	
10	3,21	4,03	32	40
	4,86		49	
7,5	3,46	3,51	46	47
	3,55		47	
5	3,40	2,57	68	51
	1,73		35	
2,5	1,47	1,22	59	49
	0,98		39	
1	0,74	0,67	74	67
	0,59		59	
0,5	0,37	0,42	73	84
	0,47		94	

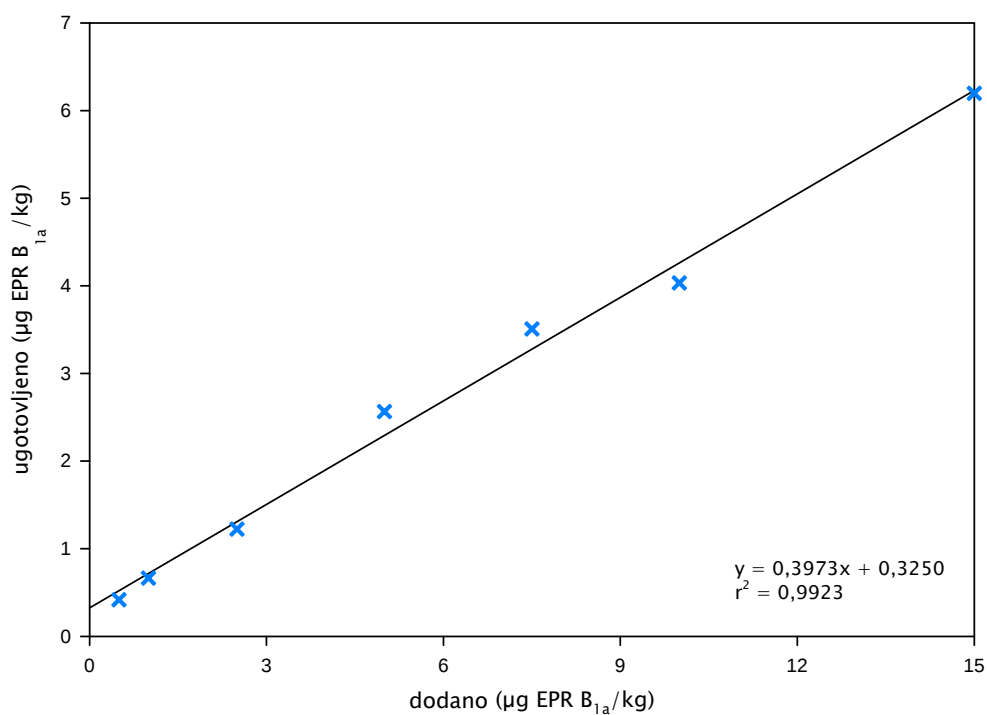
**Graf 16:** Regresijska premica eprinomektina v zorenem siru (30 dni) v koncentracijskem območju 15–0,5 $\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 25: Linearnost meritev eprinomektina v zorenem siru (60 dni) v območju standardnih dodatkov 15–0,5 $\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$

dodano ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)	ugotovljeno ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
15	7,16	6,69	48	45
	6,22		41	
10	3,70	3,56	37	36
	3,42		34	
7,5	2,57	2,74	34	37
	2,91		39	
5	2,76	2,36	55	47
	1,97		39	
2,5	1,69	1,45	68	58
	1,21		48	
1	0,60	0,57	60	57
	0,54		54	
0,5	0,30	0,33	61	65
	0,35		69	

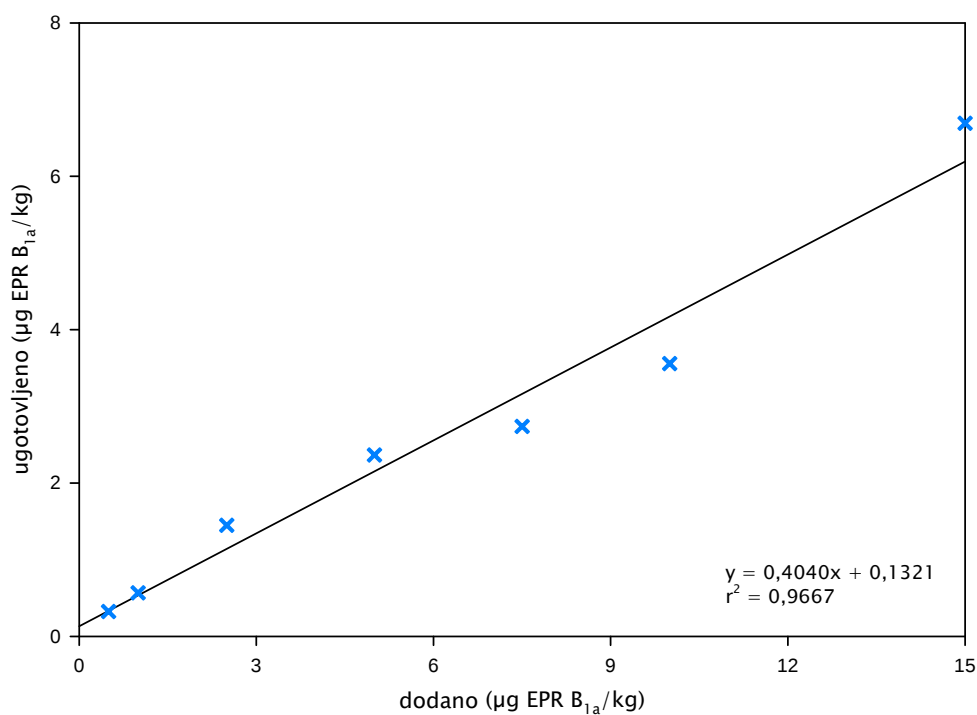
**Graf 17:** Regresijska premica eprinomektina v zorenem siru (60 dni) v koncentracijskem območju 15–0,5 $\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 26: Linearnost meritev eprinomektina v jogurtu iz surovega mleka v območju standardnih dodatkov 5–0,1 $\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$

dodano ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)	ugotovljeno ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
5	4,56	4,35	91	87
	4,13		83	
4	3,94	3,79	98	95
	3,64		91	
3	2,71	2,87	90	96
	3,04		101	
2	2,35	2,14	118	107
	1,93		96	
1	0,84	0,93	84	93
	1,02		102	
0,5	0,75	0,78	150	156
	0,81		163	
0,1	0,12	0,14	123	139
	0,16		155	

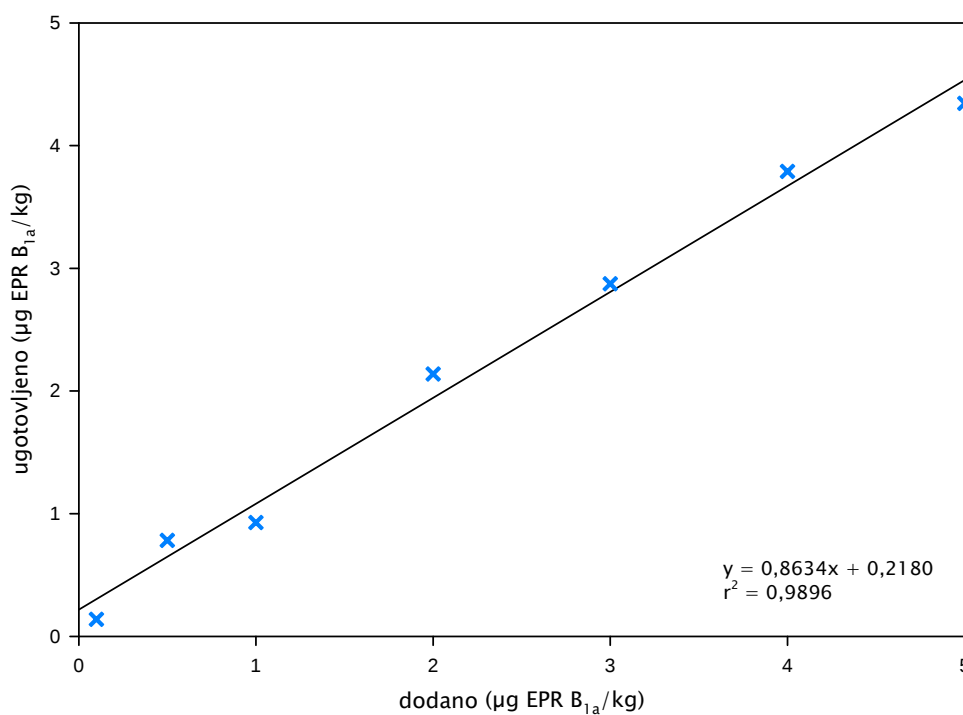
**Graf 18:** Regresijska premica eprinomektina v jogurtu iz surovega mleka v koncentracijskem območju 5–0,1 $\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 27: Linearnost meritev eprinomektina v jogurtu iz termično obdelanega mleka v območju standardnih dodatkov 5–0,1 µg EPR B_{1a}/kg

dodano (µg EPR B _{1a} /kg)	ugotovljeno (µg EPR B _{1a} /kg)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
5	4,99	5,11	100	102
	5,23		104	
4	3,99	4,16	100	104
	4,33		108	
3	2,73	3,03	91	101
	3,34		111	
2	1,99	2,10	99	105
	2,21		111	
1	1,06	1,10	106	110
	1,14		113	
0,5	0,75	0,83	150	166
	0,91		181	
0,1	0,07	0,11	73	112
	0,15		151	

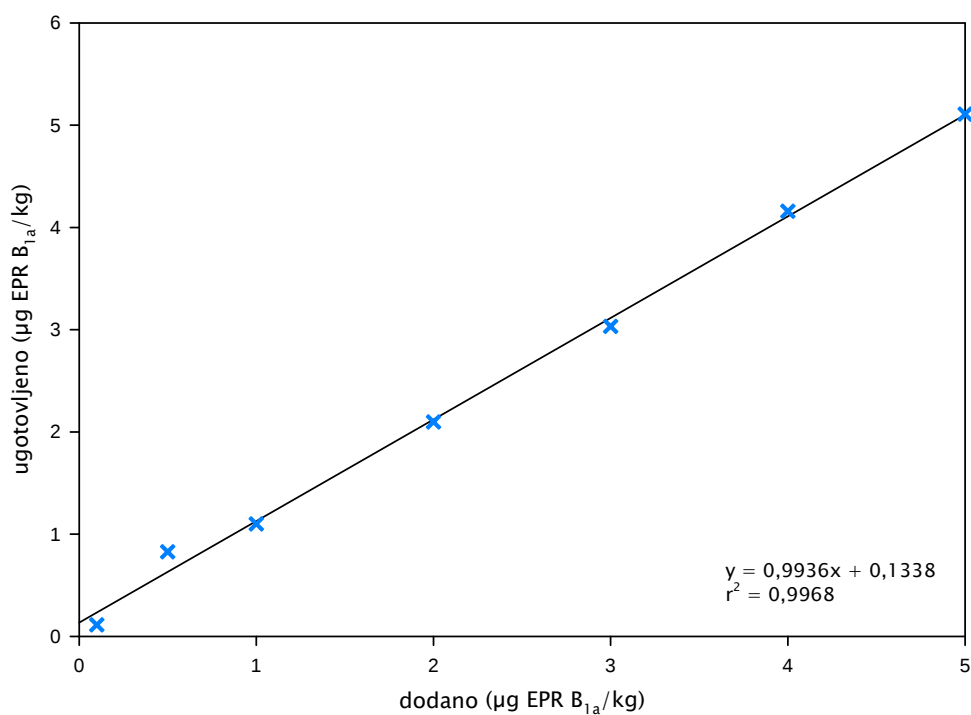
**Graf 19:** Regresijska premica eprinomektina v jogurtu iz termično obdelanega mleka v koncentracijskem območju 5–0,1 µg EPR B_{1a}/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 28: Linearnost meritev eprinomektina v primarni sirotki v območju standardnih dodatkov 1–0,05 μg EPR B_{1a}/kg

dodano (μg EPR B_{1a}/kg)	ugotovljeno (μg EPR B_{1a}/kg)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
1	0,90	0,94	91	94
	0,97		97	
0,8	0,68	0,71	85	89
	0,73		92	
0,6	0,54	0,55	90	91
	0,55		92	
0,4	0,39	0,38	97	95
	0,38		94	
0,2	0,17	0,21	87	104
	0,24		121	
0,1	0,20	0,17	200	167
	0,13		134	
0,05	0,08	0,05	151	101
	0,03		51	

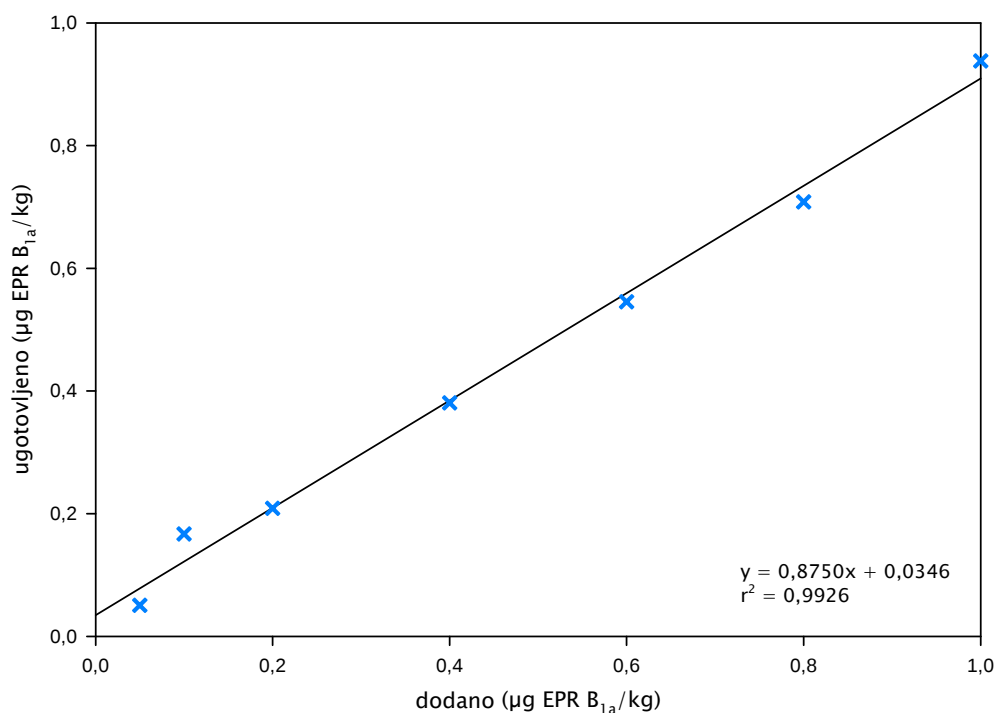
**Graf 20:** Regresijska premica eprinomektina v primarni sirotki v koncentracijskem območju 1–0,05 μg EPR B_{1a}/kg ; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 29: Linearnost meritev eprinomektina v sekundarni sirotki v območju standardnih dodatkov 0,6–0,05 μg EPR B_{1a}/kg

dodano (μg EPR B _{1a} /kg)	ugotovljeno (μg EPR B _{1a} /kg)		izkoristek (%)	
	posamično	povprečno	posamično	povprečno
0,6	0,56	0,57	93	94
	0,58		96	
0,4	0,38	0,38	95	95
	0,38		95	
0,2	0,18	0,19	91	94
	0,20		97	
0,1	0,16	0,17	155	169
	0,18		182	
0,05	0,03	0,04	63	69
	0,04		76	

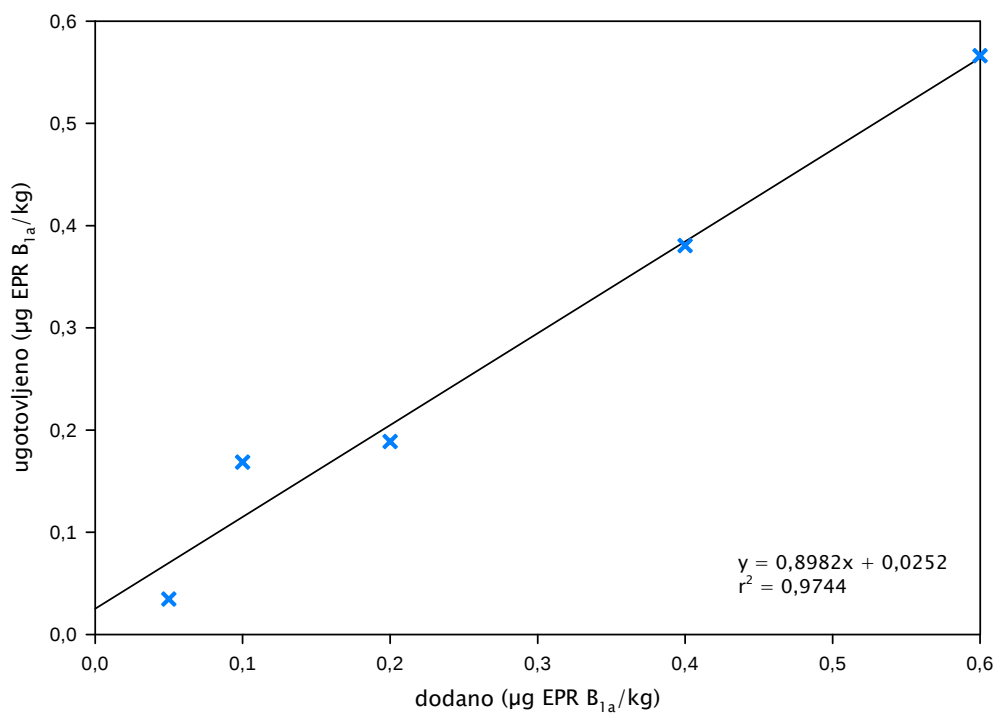
**Graf 21:** Regresijska premica eprinomektina v sekundarni sirotki v koncentracijskem območju 0,6–0,05 μg EPR B_{1a}/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk

Tabela 30: Izkoristek (%) ugotavljanja eprinomektina v albuminski skuti, svežem siru (A) in zorenih sirih (30 in 60 dni) (B)

Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)									
A	albuminska skuta				sveži sir				
	0,2	1	4	15	0,2	1	4	15	
Dan 1		99	84	82	56	122	82	77	60
		124	87	85	59	116	71	79	56
		105	92	78	64	121	80	74	57
		114	88	86	65	126	75	72	61
		102	89	80	59	117	72	68	52
	Povprečje (%)	109	88	82	61	121	76	74	57
	S _{izk}	10	3	3	4	4	5	4	3
	KV _{izk} (%)	9	3	4	6	3	7	5	6
Dan 2		124	80	75	67	102	90	80	60
		102	76	78	68	110	88	81	55
		107	72	71	71	106	89	81	59
		137	73	76	72	136	80	82	57
		117	79	73	69	n.p.	86	75	58
	Povprečje (%)	117	76	74	70	113	86	80	58
	S _{izk}	14	4	3	2	15	4	3	2
	KV _{izk} (%)	12	5	4	3	14	5	3	3
Skupno	Povprečje (%)	113	82	78	65	117	81	77	57
	S _{izk}	12	7	5	5	11	7	4	3
	KV _{izk} (%)	11	8	6	8	9	9	6	5

Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)									
B	zoren sir (30 dni)				zoren sir (60 dni)				
	0,2	1	4	15	0,2	1	4	15	
Dan 1		103	72	68	55	97	72	70	56
		125	77	74	65	136	86	69	61
		109	79	64	55	n.p.	80	69	53
		122	74	74	54	113	79	n.p.	56
		97	83	74	44	115	76	74	54
	Povprečje (%)	111	77	71	55	115	79	70	56
	S _{izk}	12	4	4	8	16	5	3	3
	KV _{izk} (%)	11	5	6	14	14	7	4	6
Dan 2		107	88	66	54	104	53	59	47
		122	84	69	45	73	66	56	46
		114	74	60	50	79	70	49	48
		121	76	68	33	97	69	35	45
		138	85	74	33	74	54	29	45
	Povprečje (%)	120	81	67	43	85	63	45	46
	S _{izk}	11	6	5	10	14	8	13	2
	KV _{izk} (%)	10	8	8	23	17	13	29	3
Skupno	Povprečje (%)	116	79	69	49	99	71	56	51
	S _{izk}	12	5	5	10	21	11	16	6
	KV _{izk} (%)	10	7	7	21	21	15	29	11

n.p. – ni podatka

Tabela 31: Izkoristek (%) ugotavljanja eprinomektina v jogurtu iz surovega in jogurtu iz termično obdelanega mleka (A) ter v primarni in sekundarni sirotki (B)

A	Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)						
	jogurt iz surovega mleka			jogurt iz termično obdelanega mleka			
	0,2	1	4	0,2	1	4	
Dan 1		86	64	84	46	100	80
		70	68	91	55	85	96
		64	88	92	70	79	91
		56	69	104	85	60	92
		67	81	88	81	80	85
	Povprečje (%)	68	74	92	67	81	89
	S _{izk}	11	10	7	17	14	6
	KV _{izk} (%)	16	14	8	25	18	7
Dan 2		94	77	72	94	83	82
		94	79	76	92	91	88
		91	84	81	89	82	81
		93	80	87	89	88	75
		95	77	95	91	82	83
	Povprečje (%)	93	79	82	91	85	82
	S _{izk}	2	3	9	2	4	5
	KV _{izk} (%)	2	4	11	3	5	6
Skupno	Povprečje (%)	81	77	87	79	83	85
	S _{izk}	15	8	9	17	10	6
	KV _{izk} (%)	19	10	11	21	12	7

B	Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)						
	primarna sirotka			sekundarna sirotka			
	0,2	0,5	1	0,2	0,5	1	
Dan 1		n.p.	99	68	67	96	71
		52	92	71	55	83	75
		62	82	72	59	99	63
		67	77	77	61	81	88
		62	80	68	53	84	70
	Povprečje (%)	61	86	71	59	89	73
	S _{izk}	6	9	4	5	8	9
	KV _{izk} (%)	10	11	5	9	10	13
Dan 2		74	75	76	87	76	70
		82	72	79	77	76	68
		74	66	73	66	73	74
		80	72	77	66	71	79
		78	73	70	88	70	72
	Povprečje (%)	77	72	75	77	73	73
	S _{izk}	4	3	4	11	3	4
	KV _{izk} (%)	5	5	5	14	4	6
Skupno	Povprečje (%)	70	79	73	68	81	73
	S _{izk}	10	10	4	12	10	7
	KV _{izk} (%)	14	13	5	18	12	9

n.p. – ni podatka

Tabela 32: Obnovljivost meritev ugotavljanja eprinomektina v albuminski skuti, svežem siru (A) in zorenih sirih (30 in 60 dni) (B), ovrednotena na osnovi ugotovljenih koncentracij ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)

A		Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)							
		albuminska skuta				sveži sir			
		0,2	1	4	15	0,2	1	4	15
Dan 1		0,20	0,84	3,27	8,45	0,24	0,82	3,08	8,96
		0,25	0,87	3,40	8,79	0,23	0,71	3,14	8,34
		0,21	0,92	3,14	9,60	0,24	0,80	2,97	8,49
		0,23	0,88	3,45	9,72	0,25	0,75	2,90	9,09
		0,20	0,89	3,22	8,88	0,23	0,72	2,74	7,79
	Povprečje	0,22	0,88	3,30	9,09	0,24	0,76	2,96	8,53
	s	0,02	0,03	0,13	0,55	0,01	0,05	0,16	0,52
	KV (%)	9,3	3,2	3,9	6,1	3,5	6,7	5,4	6,1
Dan 2		0,25	0,80	2,99	10,12	0,20	0,90	3,20	8,94
		0,20	0,76	3,11	10,24	0,22	0,88	3,24	8,30
		0,21	0,72	2,83	10,66	0,21	0,89	3,23	8,83
		0,27	0,73	3,03	10,85	0,27	0,80	3,29	8,57
		0,23	0,79	2,93	10,29	n.p.	0,86	3,01	8,74
	Povprečje	0,23	0,76	2,98	10,43	0,23	0,86	3,19	8,68
	s	0,03	0,04	0,11	0,31	0,03	0,04	0,11	0,25
	KV (%)	11,7	4,6	3,6	3,0	13,5	4,7	3,5	2,9
Skupno	Povprečje	0,23	0,82	3,14	9,76	0,23	0,81	3,08	8,60
	s	0,02	0,07	0,20	0,82	0,02	0,07	0,18	0,39
	KV (%)	10,8	8,3	6,4	8,5	9,0	8,6	5,8	4,6

B		Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)							
		zoren sir (30 dni)				zoren sir (60 dni)			
		0,2	1	4	15	0,2	1	4	15
Dan 1		0,21	0,72	2,74	8,28	0,19	0,72	2,79	8,41
		0,25	0,77	2,98	9,82	0,27	0,86	2,75	9,21
		0,22	0,79	2,57	8,31	n.p.	0,80	2,76	7,95
		0,24	0,74	2,95	8,03	0,23	0,79	n.p.	8,34
		0,19	0,83	2,97	6,55	0,23	0,76	2,98	8,14
	Povprečje	0,22	0,77	2,84	8,20	0,23	0,79	2,82	8,41
	s	0,02	0,04	0,18	1,16	0,03	0,05	0,11	0,48
	KV (%)	10,7	5,2	6,3	14,2	13,8	6,6	3,8	5,7
Dan 2		0,21	0,88	2,64	8,08	0,21	0,53	2,34	7,03
		0,24	0,84	2,77	6,79	0,15	0,66	2,23	6,89
		0,23	0,74	2,40	7,49	0,16	0,70	1,95	7,22
		0,24	0,76	2,71	4,95	0,19	0,69	1,39	6,69
		0,28	0,85	2,97	4,88	0,15	0,54	1,14	6,69
	Povprečje	0,24	0,81	2,70	6,44	0,17	0,63	1,81	6,90
	s	0,02	0,06	0,21	1,46	0,03	0,08	0,52	0,23
	KV (%)	9,5	7,6	7,7	22,8	16,8	12,9	29,0	3,3
Skupno	Povprečje	0,23	0,79	2,77	7,32	0,20	0,71	2,26	7,66
	s	0,02	0,05	0,20	1,55	0,04	0,11	0,65	0,87
	KV (%)	10,4	6,8	7,1	21,2	21,5	15,0	28,9	11,4

n.p. – ni podatka

Tabela 33: Obnovljivost meritev ugotavljanja eprinomektina v jogurtu iz surovega in jogurtu iz termično obdelanega mleka (A) ter primarne in sekundarne sirotke (B), ovrednotena na osnovi ugotovljenih koncentracij ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$)

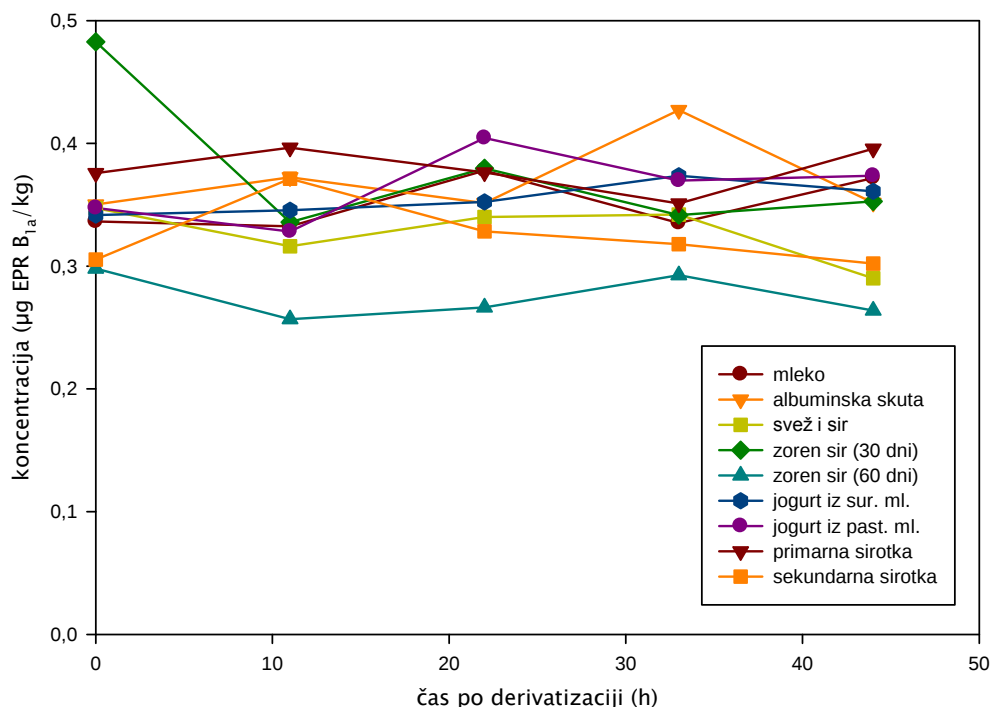
		Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)					
A		jogurt iz surovega mleka			jogurt iz termično obdelanega mleka		
		0,2	1	4	0,2	1	4
Dan 1		0,17	0,64	3,35	0,09	1,00	3,21
		0,14	0,68	3,65	0,11	0,85	3,83
		0,13	0,88	3,70	0,14	0,79	3,66
		0,11	0,69	4,15	0,17	0,60	3,67
		0,13	0,81	3,52	0,16	0,80	3,41
	Povprečje	0,14	0,74	3,67	0,13	0,81	3,55
	s	0,02	0,10	0,30	0,03	0,14	0,24
	KV (%)	16,1	13,6	8,2	24,7	17,8	6,9
Dan 2		0,19	0,77	2,88	0,19	0,83	3,29
		0,19	0,79	3,04	0,18	0,91	3,51
		0,18	0,84	3,25	0,18	0,82	3,26
		0,19	0,80	3,49	0,18	0,88	2,98
		0,19	0,77	3,81	0,18	0,82	3,32
	Povprečje	0,19	0,79	3,29	0,18	0,85	3,27
	s	0,00	0,03	0,37	0,00	0,04	0,19
	KV (%)	1,7	3,6	11,2	2,5	5,0	5,7
Skupno	Povprečje	0,16	0,77	3,48	0,16	0,83	3,41
	s	0,03	0,08	0,38	0,03	0,10	0,25
	KV (%)	18,8	9,8	10,8	21,2	12,3	7,4
		Standardni dodatek (µg EPR B _{1a} /kg)					
B		primarna sirotka			sekundarna sirotka		
		0,2	0,5	1	0,2	0,5	1
Dan 1		n.p.	0,50	0,68	0,13	0,48	0,71
		0,10	0,46	0,71	0,11	0,41	0,75
		0,12	0,41	0,72	0,12	0,50	0,63
		0,13	0,39	0,77	0,12	0,41	0,88
		0,12	0,40	0,68	0,11	0,42	0,70
	Povprečje	0,12	0,43	0,71	0,12	0,44	0,73
	s	0,01	0,05	0,04	0,01	0,04	0,09
	KV (%)	10,1	10,9	5,1	9,1	9,6	12,8
Dan 2		0,15	0,37	0,76	0,17	0,38	0,70
		0,16	0,36	0,79	0,15	0,38	0,68
		0,15	0,33	0,73	0,13	0,36	0,74
		0,16	0,36	0,77	0,13	0,36	0,79
		0,16	0,37	0,70	0,18	0,35	0,72
	Povprečje	0,15	0,36	0,75	0,15	0,37	0,73
	s	0,01	0,02	0,04	0,02	0,01	0,04
	KV (%)	4,8	4,6	4,9	13,8	3,6	5,8
Skupno	Povprečje	0,14	0,39	0,73	0,14	0,41	0,73
	s	0,02	0,05	0,04	0,02	0,05	0,07
	KV (%)	14,3	12,7	5,5	18,4	12,5	9,4

n.p. – ni podatka

Tabela 34: Meja vrednotenja (LOQ) analizne metode določanja ostankov eprinomektina ($\mu\text{g EPR B}_{1a}/\text{kg}$) v mlečnih izdelkih

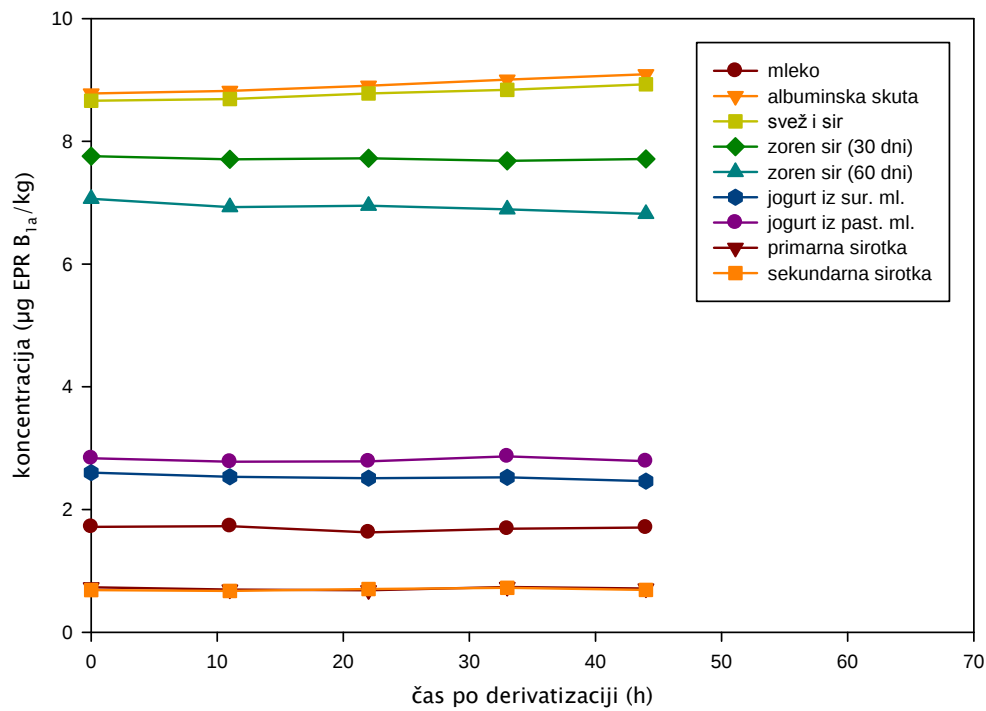
	dodano ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ugot. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	izk. (%)	KV (%)
albuminska skuta	0,5	0,40	0,01	81	2,4
sveži sir		0,49	0,04	98	7,8
zoren sir (30 dni)		0,45	0,02	91	5,1
zoren sir (60 dni)		0,45	0,03	90	6,6
jogurt iz surovega mleka		0,54	0,05	108	9,3
jogurt iz termično obdelanega mleka		0,51	0,05	103	9,2
primarna sirotka		0,50	0,03	99	6,3
sekundarna sirotka		0,48	0,04	96	8,0

ugot. – povprečna ugotovljena koncentracija (n=5); izk. – izkoristek; s – standardni odmik; KV – koeficient variacije



jogurt iz sur. ml. – jogurt iz surovega mleka; jogurt iz past. ml. – jogurt iz pasteuriziranega mleka

Graf 22: Časovni potek koncentracij eprinomektina v derivatiziranih slepih vzorcih mleka in mlečnih izdelkov z dodanimi standardnimi dodatki eprinomektina na nižjem koncentracijskem nivoju



jogurt iz sur. ml. – jogurt iz surovega mleka; jogurt iz past. ml. – jogurt iz pasteriziranega mleka

Graf 23: Časovni potek koncentracij eprinomektina v derivatiziranih slepih vzorcih mleka in mlečnih izdelkov z dodanimi standardnimi dodatki eprinomektina na višjem koncentracijskem nivoju

Tabela 35: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov eprinomektina v mlečnih izdelkih

Selektivnost										
vsi matriksi			DA							
Specifičnost proti moksidektinu, emamektinu, nemadektinu, abamektinu, doramektinu in ivermektinu										
vsi matriksi			DA							
	Linearnost									
	koncentracijsko območje (µg EPR B _{1a} /kg)		število kalibracijskih točk		regresija in korelacija					
					naklon	presečišče	korelacijski koeficient			
albuminska skuta	15–0,5		7		0,728		–0,288		0,999	
sveži sir	15–0,5		7		0,649		0,034		0,999	
zoren sir (30 dni)	15–0,5		7		0,394		0,325		0,996	
zoren sir (60 dni)	15–0,5		7		0,404		0,132		0,983	
jogurt iz surovega mleka	5–0,1		7		0,863		0,218		0,995	
jogurt iz term. obd. mleka	5–0,1		7		0,994		0,134		0,998	
primarna sirotka	1–0,05		7		0,875		0,035		0,996	
sekundarna sirotka	0,6–0,05		5		0,898		0,025		0,987	
	Izkoristek (%)									
	nivo 1		nivo 2		nivo 3		nivo 4			
	konc. (µg/kg)	povp.	konc. (µg/kg)	povp.	konc. (µg/kg)	povp.	konc. (µg/kg)	povp.		
albuminska skuta	0,2	113	1	82	4	78	15	65		
sveži sir	0,2	117	1	81	4	77	15	57		
zoren sir (30 dni)	0,2	116	1	79	4	69	15	49		
zoren sir (60 dni)	0,2	99	1	71	4	56	15	51		
jogurt iz surovega mleka	0,2	81	1	77	4	87	–	–		
jogurt iz term. obd. mleka	0,2	79	1	83	4	85	–	–		
primarna sirotka	0,2	70	0,5	79	1	73	–	–		
sekundarna sirotka	0,2	68	0,5	81	1	73	–	–		
	Obnovljivost									
	nivo 1		nivo 2		nivo 3		nivo 4			
	konc. (µg/kg)	KV (%)	konc. (µg/kg)	KV (%)	konc. (µg/kg)	KV (%)	konc. (µg/kg)	KV (%)		
albuminska skuta	0,2	10,8	1	8,3	4	6,4	15	8,5		
sveži sir	0,2	9,0	1	8,6	4	5,8	15	4,6		
zoren sir (30 dni)	0,2	10,4	1	6,8	4	7,1	15	21,2		
zoren sir (60 dni)	0,2	21,5	1	15,0	4	28,9	15	11,4		
jogurt iz surovega mleka	0,2	18,8	1	9,8	4	10,8	–	–		
jogurt iz term. obd. mleka	0,2	21,2	1	12,3	4	7,4	–	–		
primarna sirotka	0,2	14,3	0,5	12,7	1	5,5	–	–		
sekundarna sirotka	0,2	18,4	0,5	12,5	1	9,4	–	–		
Meja vrednotenja										
vsi matriksi			0,5 µg EPR B _{1a} /kg							
Stabilnost										
vsi matriksi			najmanj 44 ur po derivatizaciji							

povp. – povprečje; KV – koeficient variacije; koncentracijski nivoji so prikazani v tabeli 6; jogurt iz term. obd. mleka – jogurt iz termično obdelanega mleka; »–« – meritve nismo opravili

4.2.2 ČASOVNI POTEK KONCENTRACIJ OSTANKOV EPRINOMEKTINA V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH

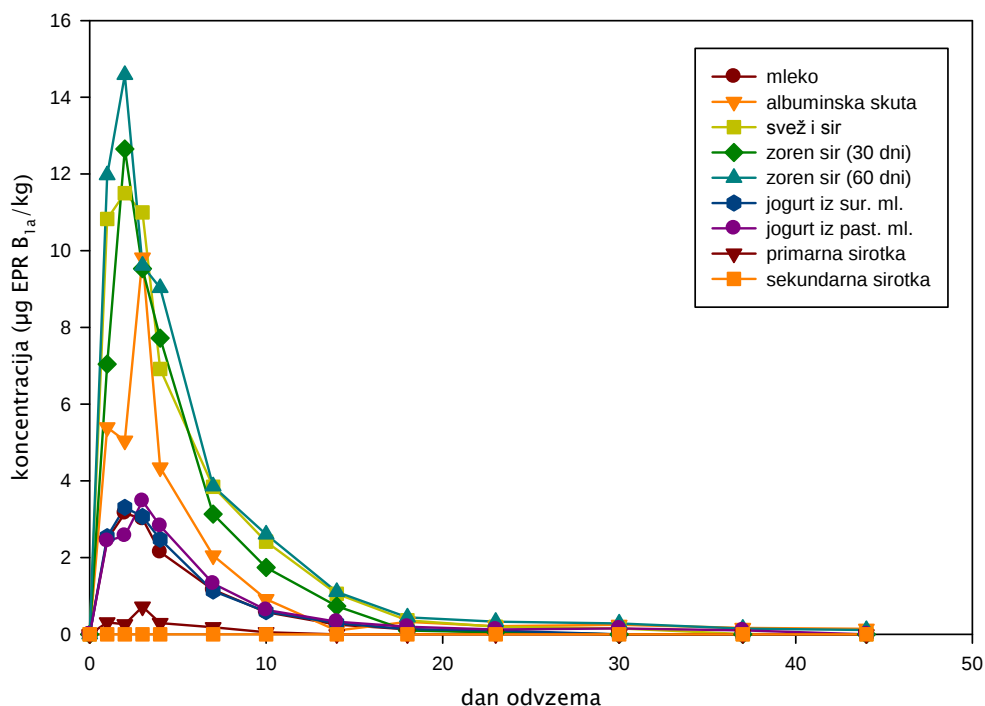
Časovni potek koncentracij ostankov eprinomektina smo prikazali s tabelami in pripadajočimi grafi.

Koncentracije eprinomektina v vseh matriksih prikazujeta tabela 36 in graf 24, vsebnost maščobe graf 25, vsebnost suhe snovi pa graf 26.

Tabela 36: Koncentracije eprinomektina (μg EPR B_{10}/kg) v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc ($n = 30$) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.

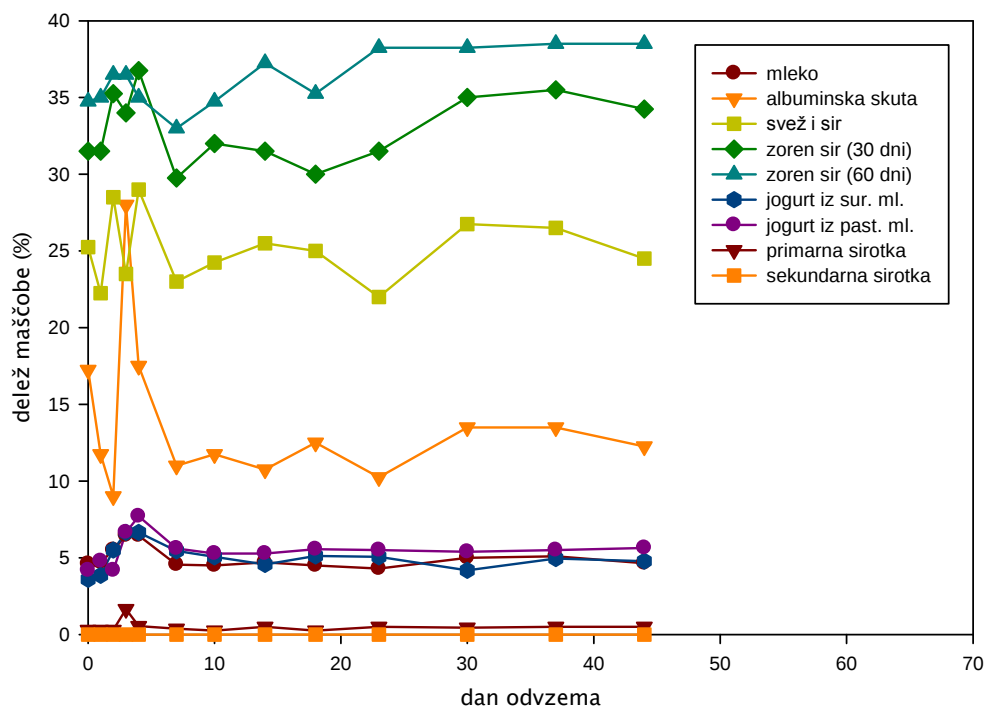
Dan vzorčenja	mleko	albumin. skuta	sveži sir	zoren sir (30 dni)	zoren sir (60 dni)	jogurt iz sur. ml.	jogurt iz past. ml.	primarna sirotka	sekund. sirotka
0	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
1	2,47	5,40	10,83	7,04	11,97	2,55	2,43	0,31	p.m.z.
2	3,15	5,05	11,50	12,65	14,59	3,31	2,57	0,26	p.m.z.
3	3,01	9,82	11,00	9,53	9,61	3,07	3,48	0,72	p.m.z.
4	2,14	4,35	6,92	7,72	9,03	2,48	2,82	0,29	p.m.z.
7	1,16	2,05	3,85	3,13	3,86	1,13	1,32	0,18	p.m.z.
10	0,58	0,92	2,42	1,74	2,60	0,59	0,63	0,05	p.m.z.
14	0,25	0,10	1,06	0,73	1,11	0,29	0,33	p.m.z.	p.m.z.
18	0,13	0,32	0,36	0,10	0,44	0,14	0,20	p.m.z.	p.m.z.
23	0,04	0,21	0,20	0,05	0,33	0,10	0,12	p.m.z.	p.m.z.
30	p.m.z.	0,25	0,15	p.m.z.	0,28	p.m.z.	0,15	p.m.z.	p.m.z.
37	p.m.z.	0,16	p.m.z.	p.m.z.	0,14	p.m.z.	0,10	p.m.z.	p.m.z.
44	p.m.z.	0,14	p.m.z.	p.m.z.	0,11	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.

albumin. skuta – albuminska skuta; jogurt iz sur. ml. – jogurt iz surovega mleka; jogurt iz past. ml. – jogurt iz pasteriziranega mleka; sekund. sirotka – sekundarna sirotka; p.m.z. – pod mejo zaznavnosti analizne metode (0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$)



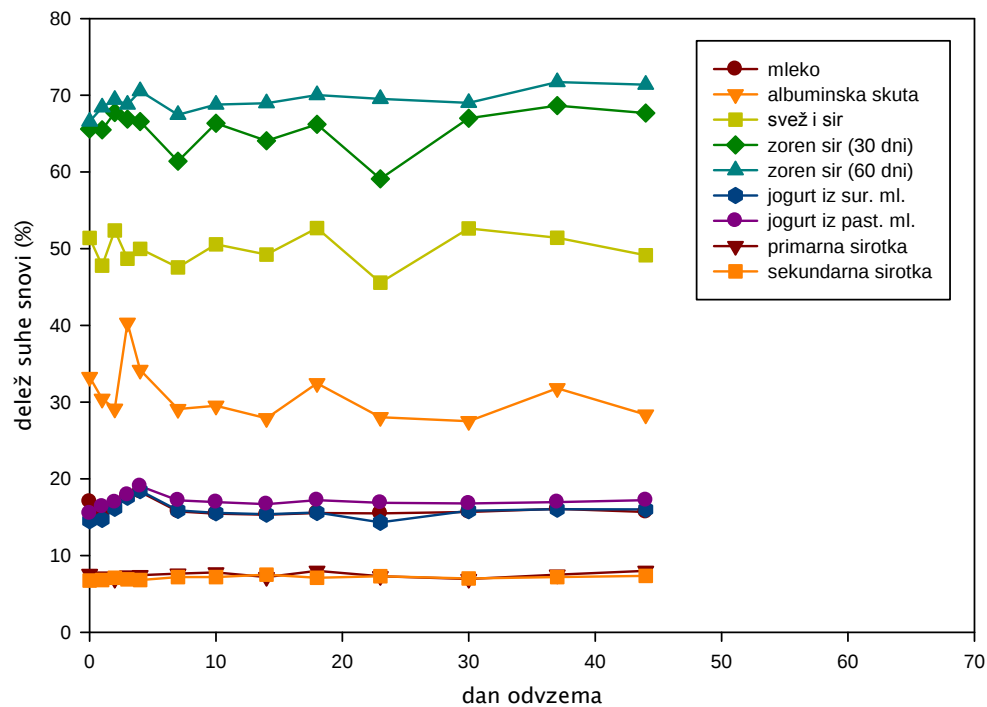
jogurt iz sur. ml. – jogurt iz surovega mleka; jogurt iz past. ml. – jogurt iz pasteriziranega mleka

Graf 24: Časovni potek koncentracij eprinomektina v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc ($n = 30$) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.



jogurt iz sur. ml. – jogurt iz surovega mleka; jogurt iz past. ml. – jogurt iz pasteriziranega mleka

Graf 25: Časovni potek deleža maščobe v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc ($n = 30$) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.



jogurt iz sur. ml. – jogurt iz surovega mleka; jogurt iz past. ml. – jogurt iz pasteriziranega mleka

Graf 26: Časovni potek deleža suhe snovi v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc ($n = 30$) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.

4.3 ANALIZNA METODA DOLOČANJA OSTANKOV NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN V KRVNI PLAZMI IN MLEKU

4.3.1 VALIDACIJA METODE DOLOČANJA OSTANKOV NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN V MLEKU IN KRVNI PLAZMI

4.3.1.1 SELEKTIVNOST

Pri 20 slepih vzorcih mleka in krvne plazme nismo ugotovili kromatografskega ozadja pri zadrževalnem času izbranih analitov, kar prikazujejo na slikah 34–39 značilni kromatogrami standardov na koncentracijskih nivojih LOQ v mleku in krvni plazmi (tabela 58), slepih vzorcev in slepih vzorcev s standardnimi dodatki izbranih analitov na koncentracijskih nivojih LOQ v mleku in krvni plazmi (tabela 58).

4.3.1.2 SPECIFIČNOST

Analizna metoda je uspešno ločila vse izbrane analite v standardnih raztopinah ter v mleku in krvni plazmi, kar prikazujejo kromatogrami (slike 36–39) standardnih mešanic na koncentracijskih nivojih LOQ v mleku in krvni plazmi (tabela 58) in kromatogrami slepih vzorcev mleka in krvne plazme s standardnim dodatkom izbranih analitov na koncentracijskih nivojih LOQ (tabela 58).

4.3.1.3 LINEARNOST

Linearnost izbranih analitov v topilu je prikazana v grafih 27–35. Linearnost izbranih analitov v mleku je prikazana v tabeli 37 in grafih 36–44, v krvni plazmi pa v tabelah 38 in 39 ter grafih 45–53.

4.3.1.4 IZKORISTEK

Izkoristek izbranih analitov v mleku in krvni plazmi na treh koncentracijskih nivojih (tabela 9), ovrednoten v šestih paralelkah (tridnevno), smo s povprečjem, standardnim odmikom in koeficientom variacije za vsak koncentracijski nivo znotrajdnevno in za vse tri dni skupaj prikazali v tabelah 40–45.

4.3.1.5 PONOVLJIVOST

Ponovljivost določanja izbranih analitov v mleku in krvni plazmi na treh koncentracijskih nivojih (tabela 9) v šestih paralelkah, ovrednoteno s povprečnim tridnevnim standardnim odmikom in koeficientom variacije smo prikazali v tabelah 46–51, kjer so prikazane tudi srednje dnevne vrednosti ugotovljenih koncentracij, standardni odmiki in koeficienti variacije.

4.3.1.6 OBNOVLJIVOST

Obnovljivost določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi na treh koncentracijskih nivojih (tabela 9) v šestih paralelkah, ovrednoteno s povprečnim

tridnevnim standardnim odmikom in koeficientom variacije, smo prikazali v tabelah 52–57, kjer so prikazane tudi srednje dnevne vrednosti ugotovljenih koncentracij, standardni odmiki in koeficienti variacije.

4.3.1.7 MEJA VREDNOTENJA (LOQ)

Meje vrednotenja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi prikazuje tabela 58. Kromatogrami slepih vzorcev mleka in krvne plazme s standardnimi dodatki na koncentracijskih nivojih LOQ so prikazani na slikah 36 in 37.

4.3.1.8 MEJA ODLOČITVE ($CC\alpha$)

Mejo odločitve analizne metode določanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi, ovrednoteno s standardnim odmikom 20 slepih vzorcev s standardnim dodatkom izbranih analitov na koncentracijskih nivojih, prikazanih v tabeli 10, smo prikazali v tabelah 59 in 60.

4.3.1.9 SPOSOBNOST DOLOČITVE ($CC\beta$)

Sposobnost določitve analizne metode določanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi, ovrednoteno s standardnim odmikom 20 slepih vzorcev s standardnim dodatkom izbranih analitov na koncentracijskih nivojih $CC\alpha$, prikazanih v tabeli 10, smo prikazali v tabelah 61 in 62.

4.3.1.10 STABILNOST

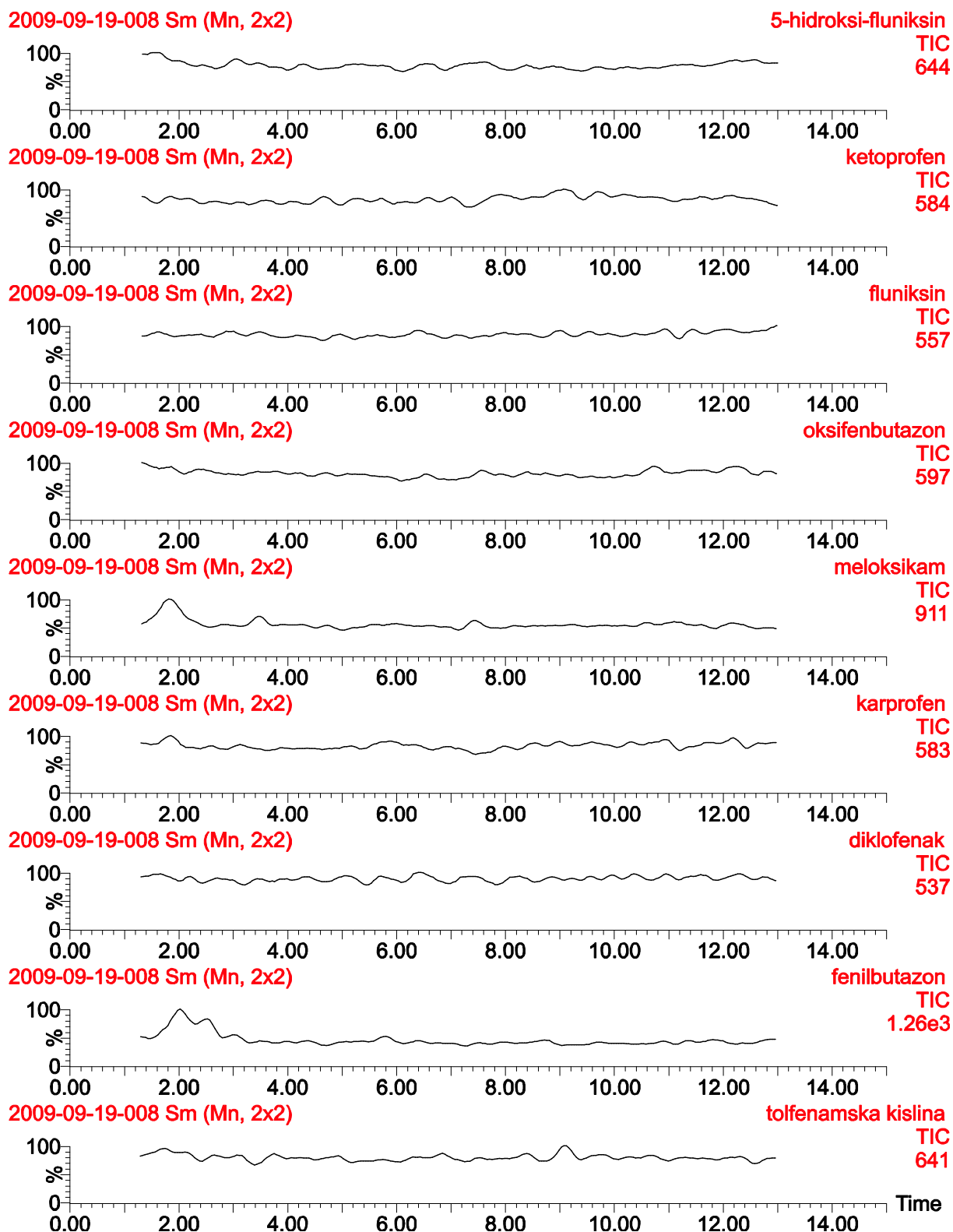
Izbrane nesteroidne protivnetne učinkovine v topilu in kot standardni dodatek v mleku na koncentracijskih nivojih meje vrednotenja so bile obstojne v 24 urah po prvem injiciranju, kar smo prikazali v grafih 54–71.

4.3.1.11 ROBUSTNOST

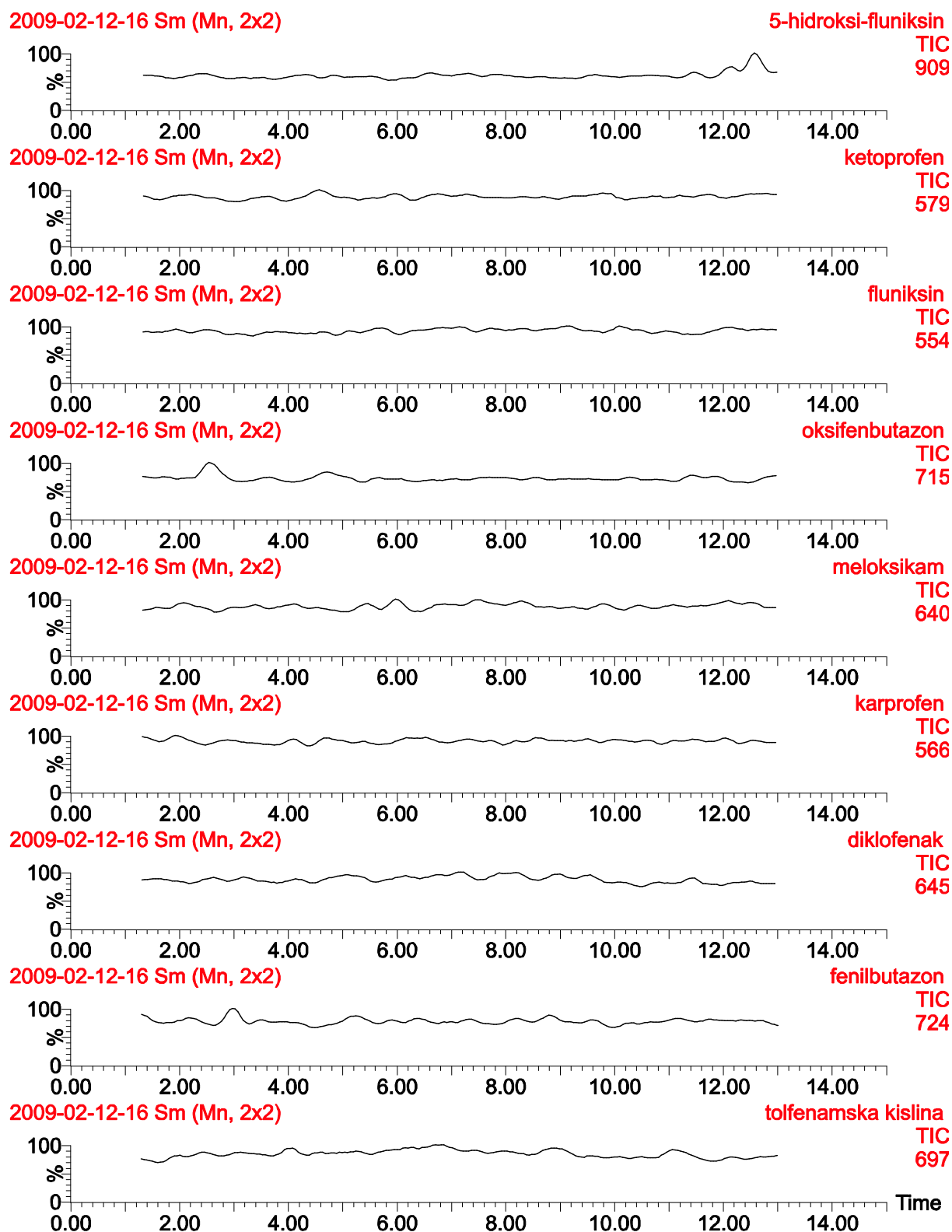
Robustnost analizne metode določanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku smo preverjali glede na živalsko vrsto in glede na pogoje inkubacije vzorcev z dodanim encimom β -glukuronidaza. Robustnost analizne metode v krvni plazmi smo preverjali glede na živalsko vrsto. Rezultate ovrednotenja robustnosti s pomočjo Studentovega t-testa za ugotavljanje statistično značilnih razlik med dvema populacijama smo prikazali v tabelah 63–65.

4.3.1.12 POVZETEK

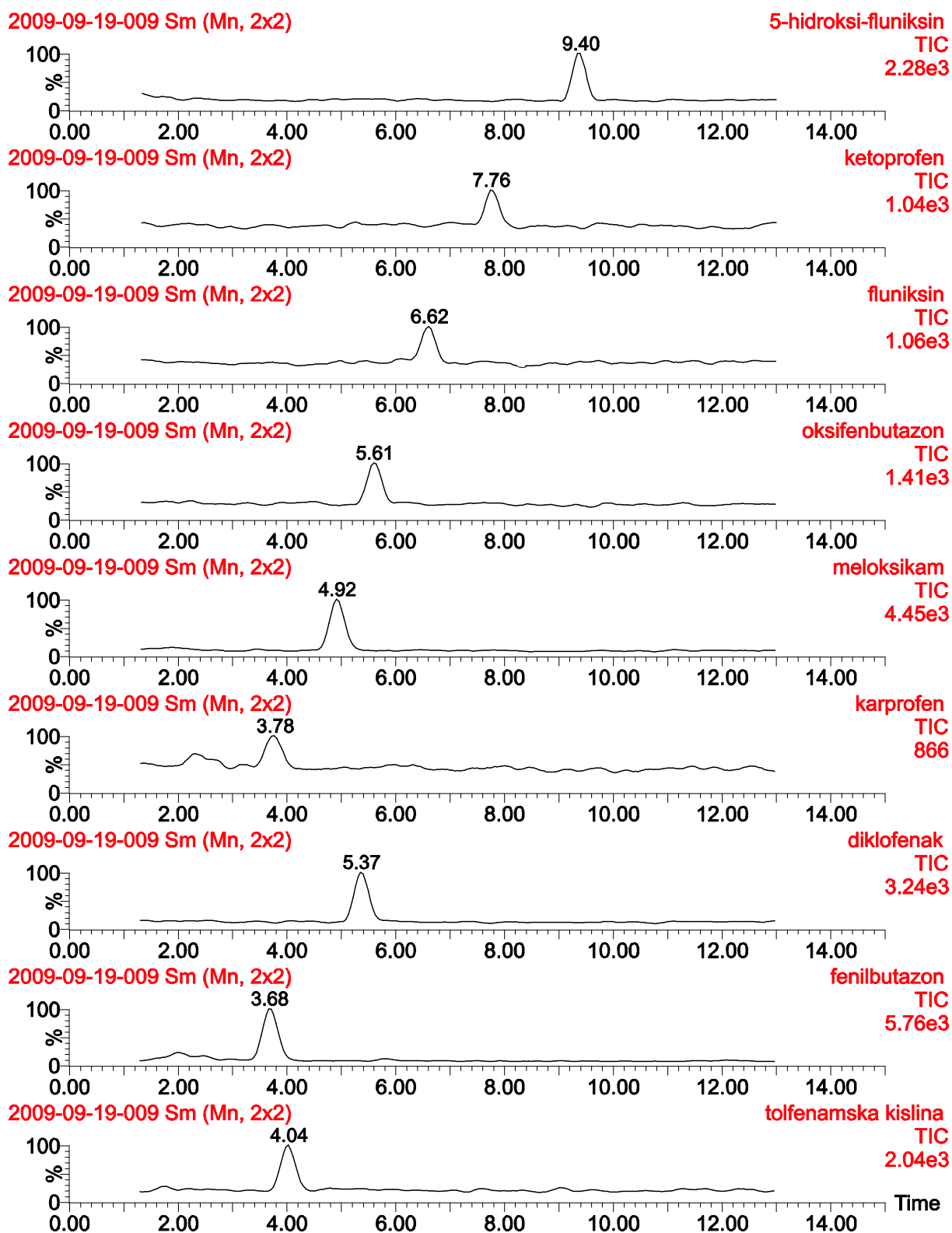
Ovrednotene validacijske parametre analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi smo zbrali v tabelah 66–74.



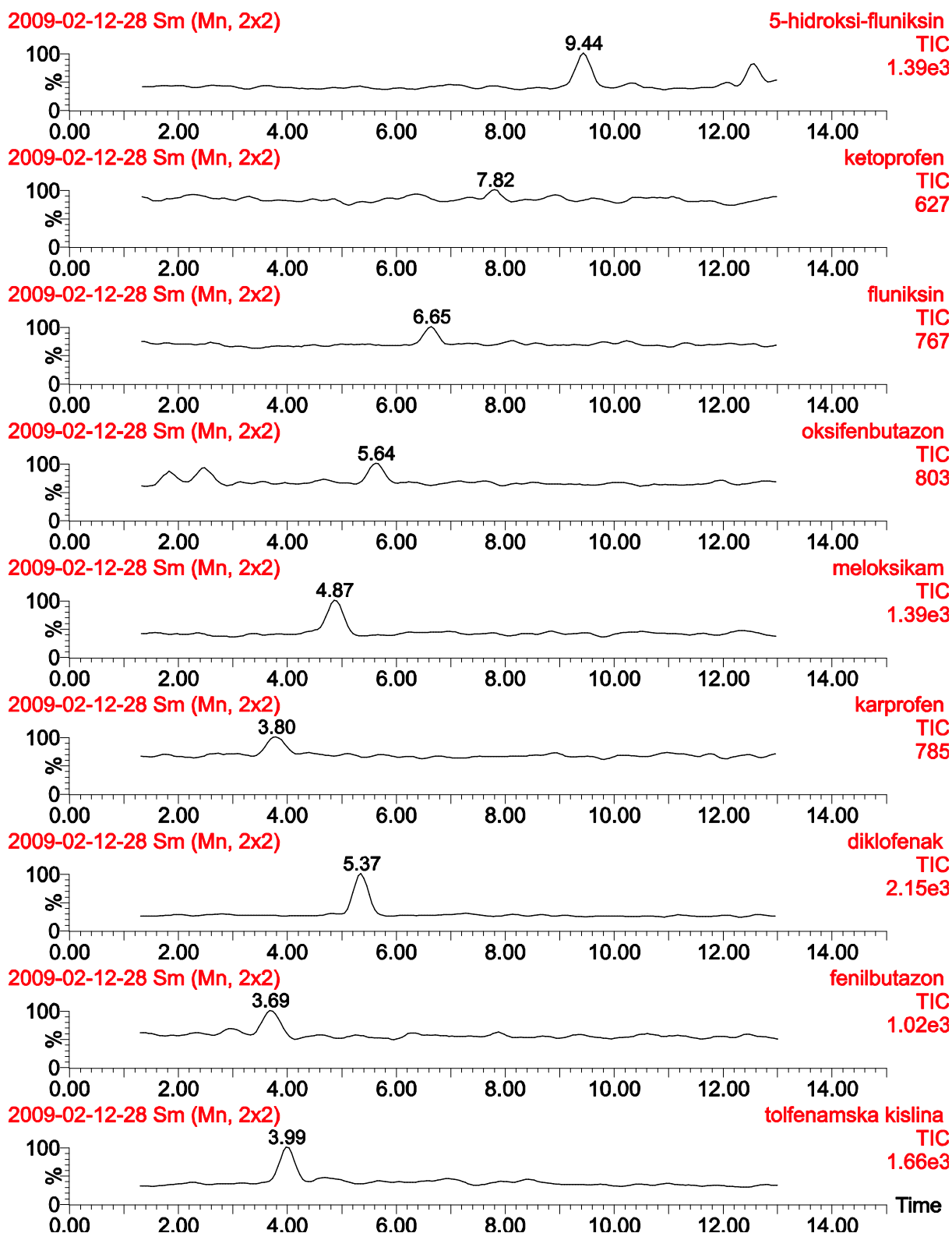
Slika 34: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca



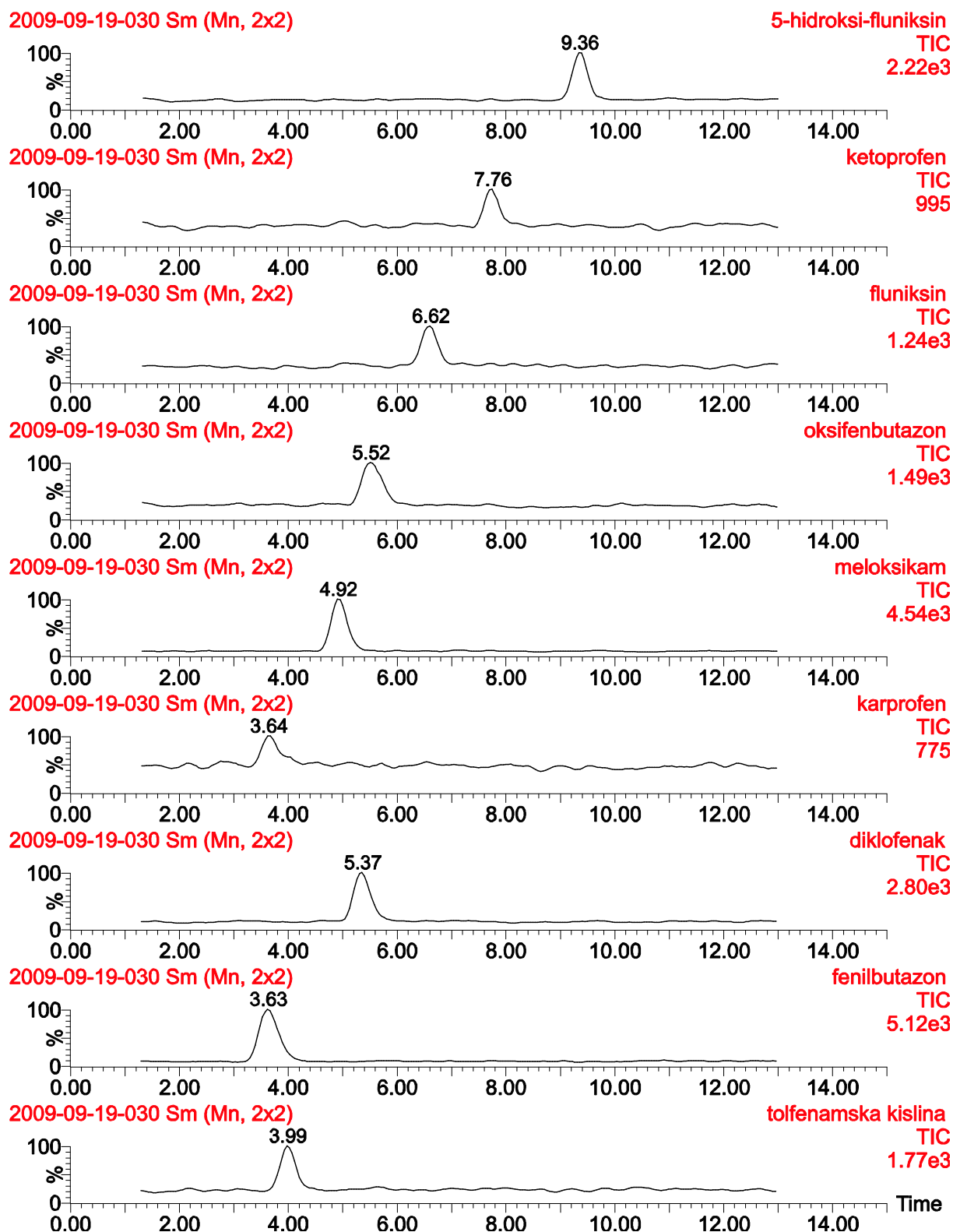
Slika 35: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca



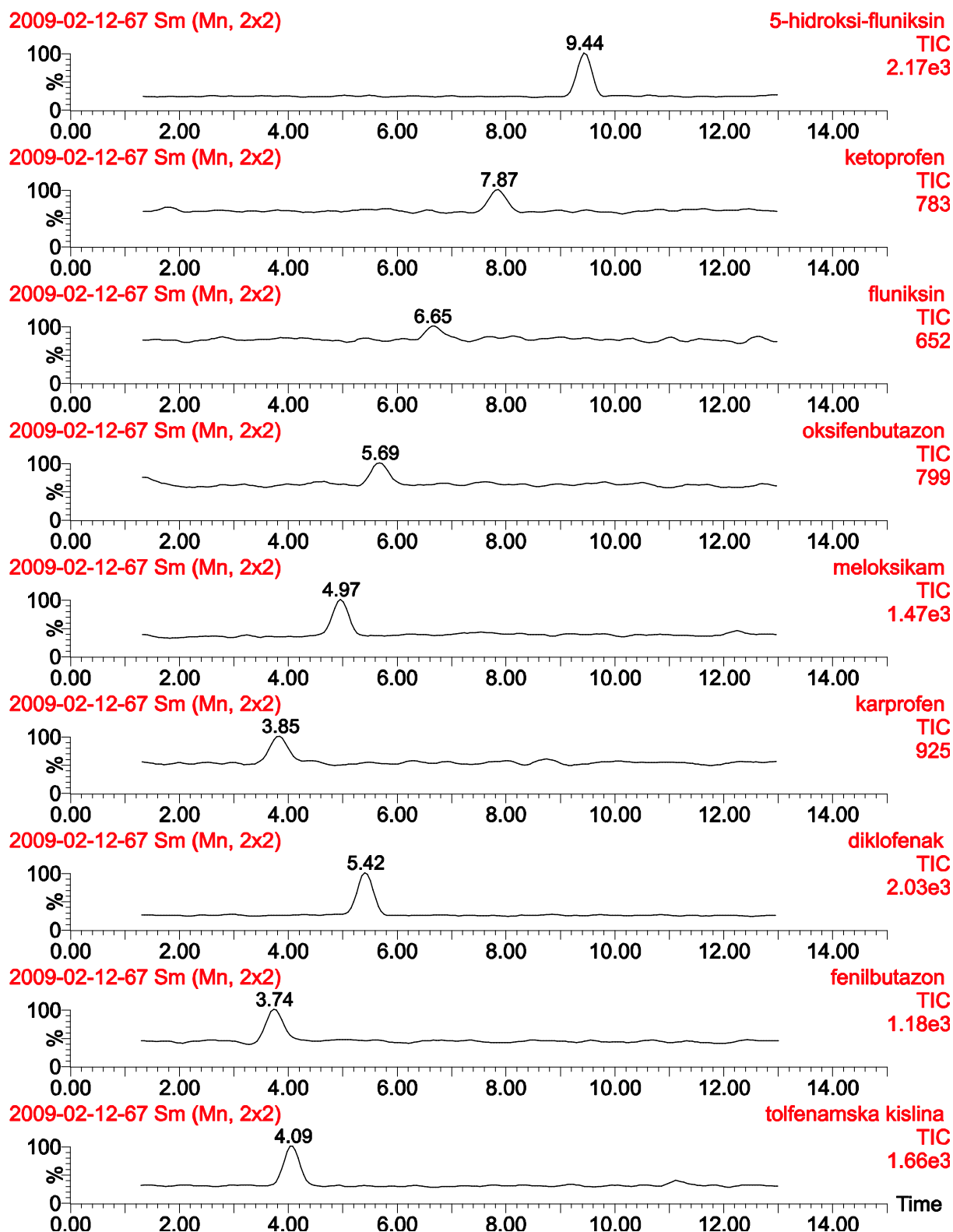
Slika 36: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca s standardnim dodatkom na koncentracijskem nivoju LOQ (tabela 58)



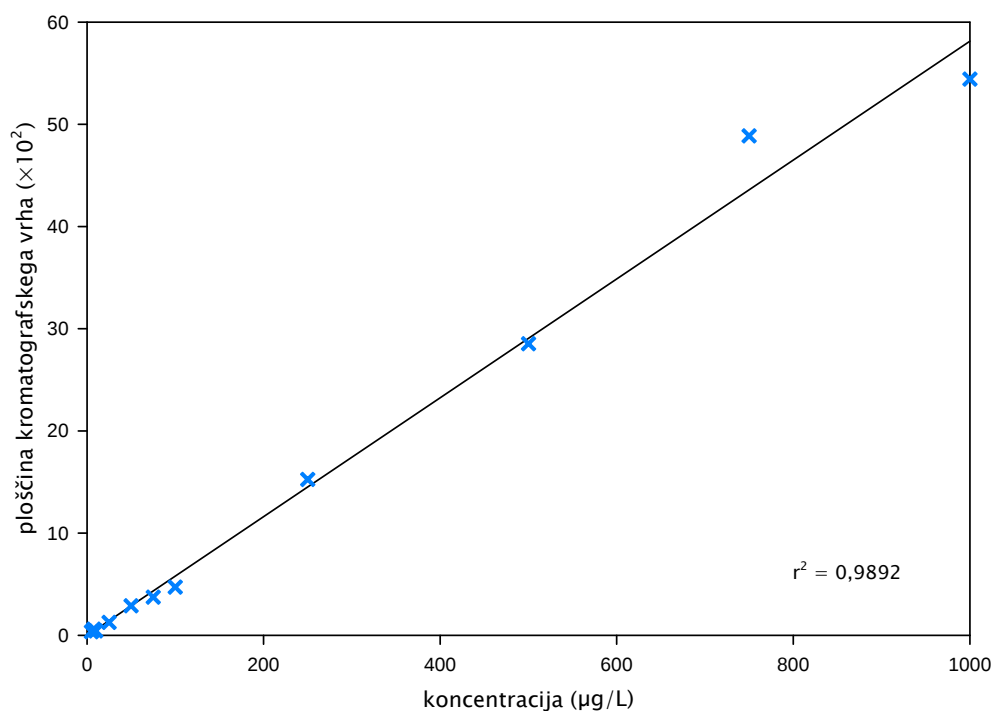
Slika 37: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca s standardnim dodatkom na koncentracijskem nivoju LOQ (tabela 58)



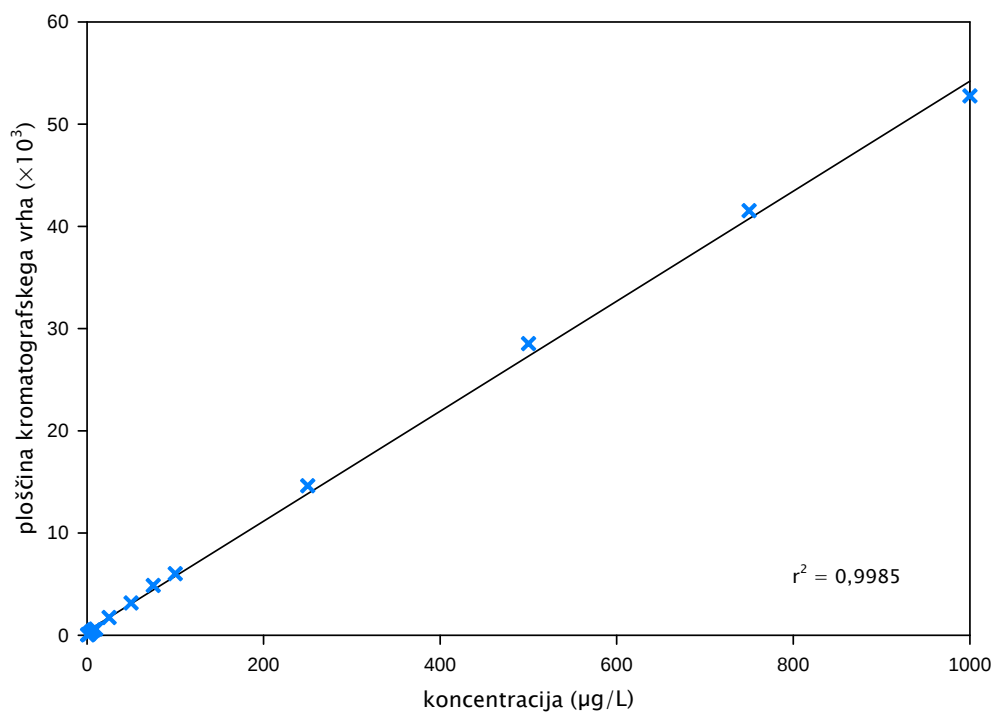
Slika 38: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) standardov v topilu na koncentracijskih nivojih odgovarjajočih vrednostim LOQ v krvni plazmi (tabela 58)



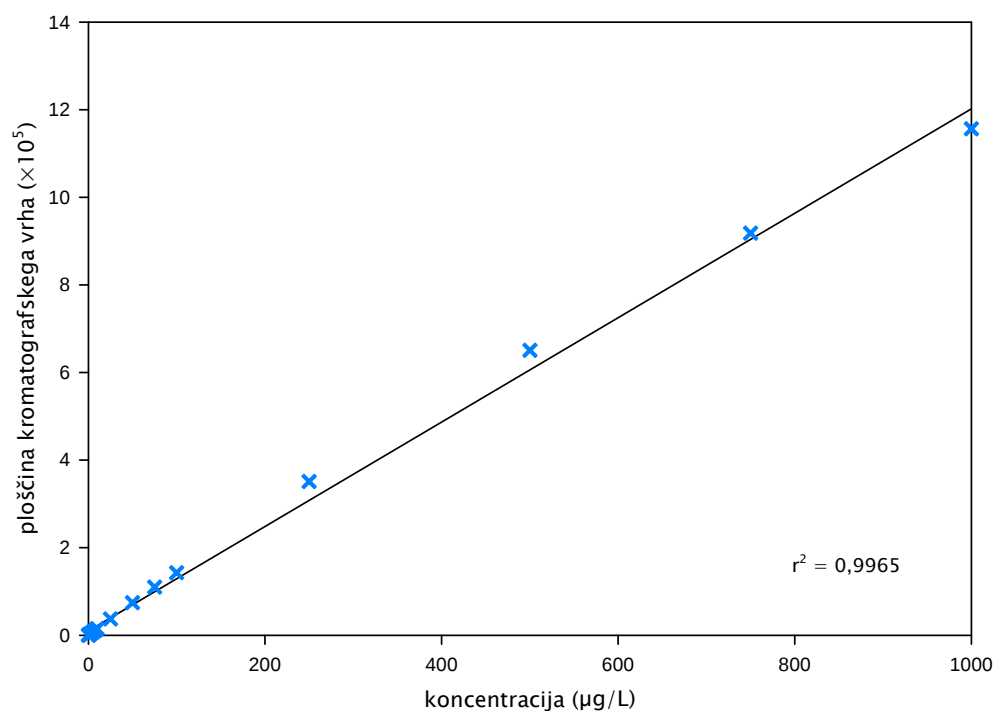
Slika 39: Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) standardov v topilu na koncentracijskih nivojih odgovarjajočih vrednostim LOQ v mleku (tabela 58)



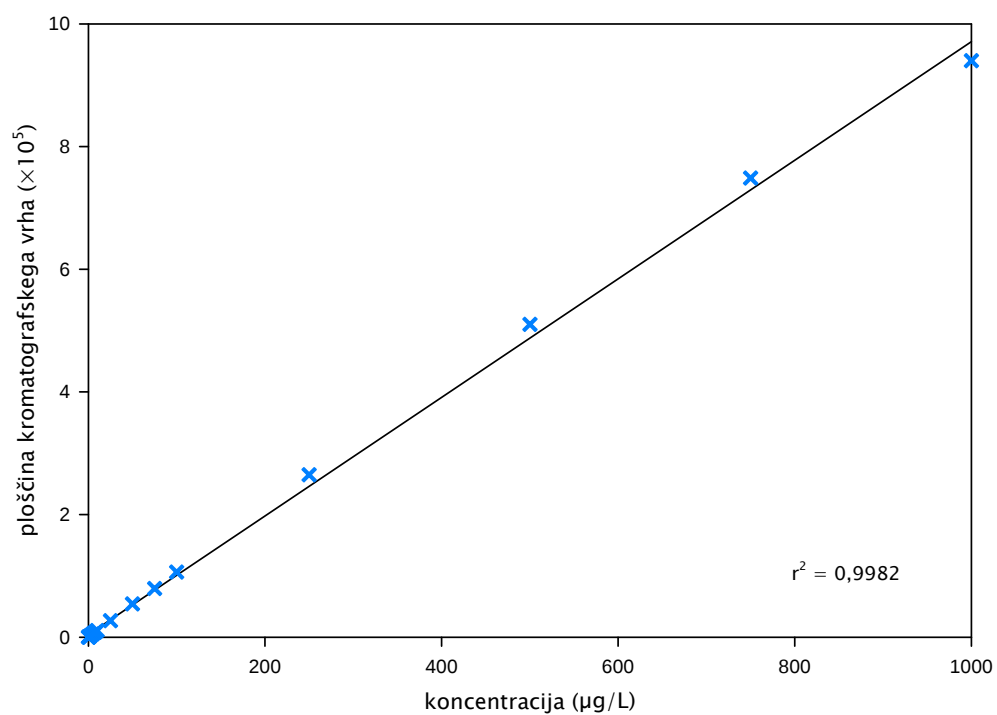
Graf 27: Regresijska premica karprofena v topilu v koncentracijskem območju 1000–5 $\mu\text{g/L}$



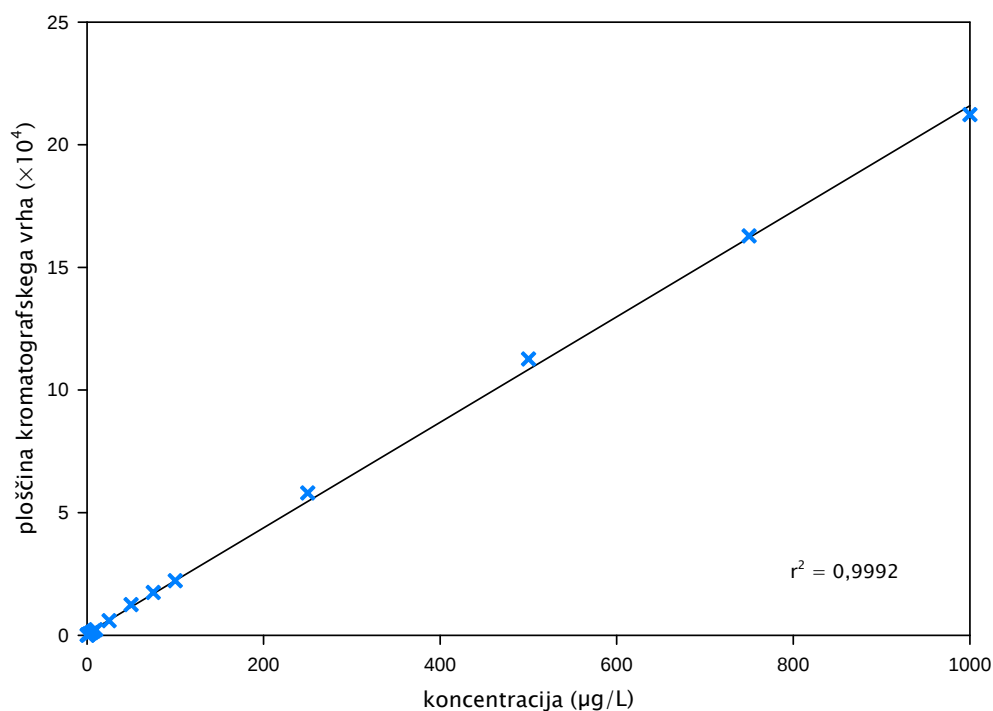
Graf 28: Regresijska premica diklofenaka v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,75 $\mu\text{g/L}$



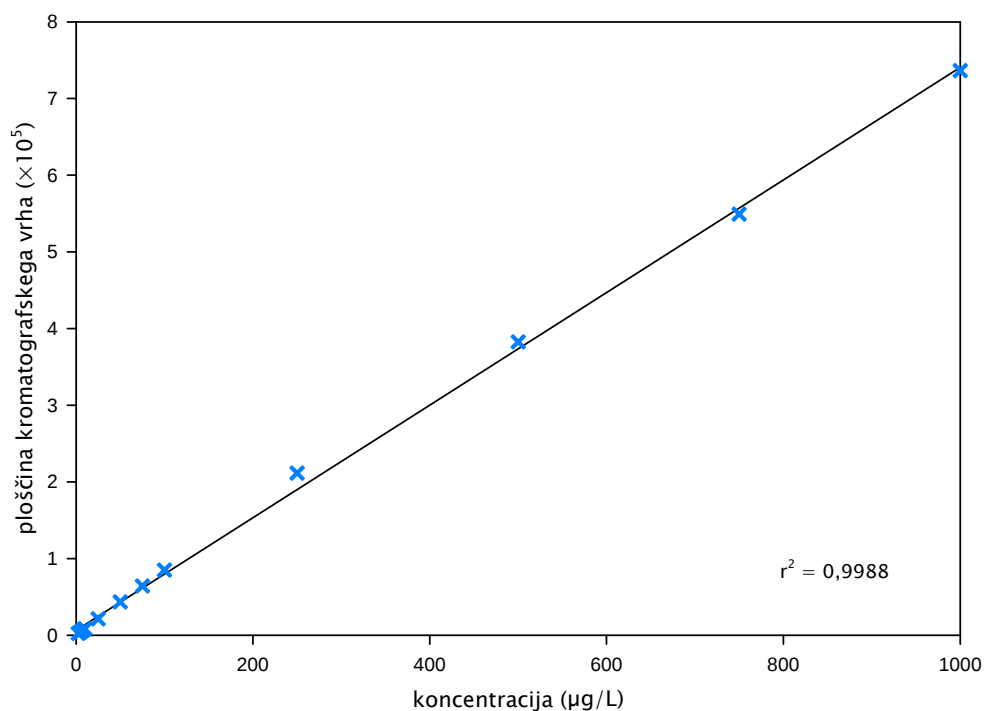
Graf 29: Regresijska premica fluniksina v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/L



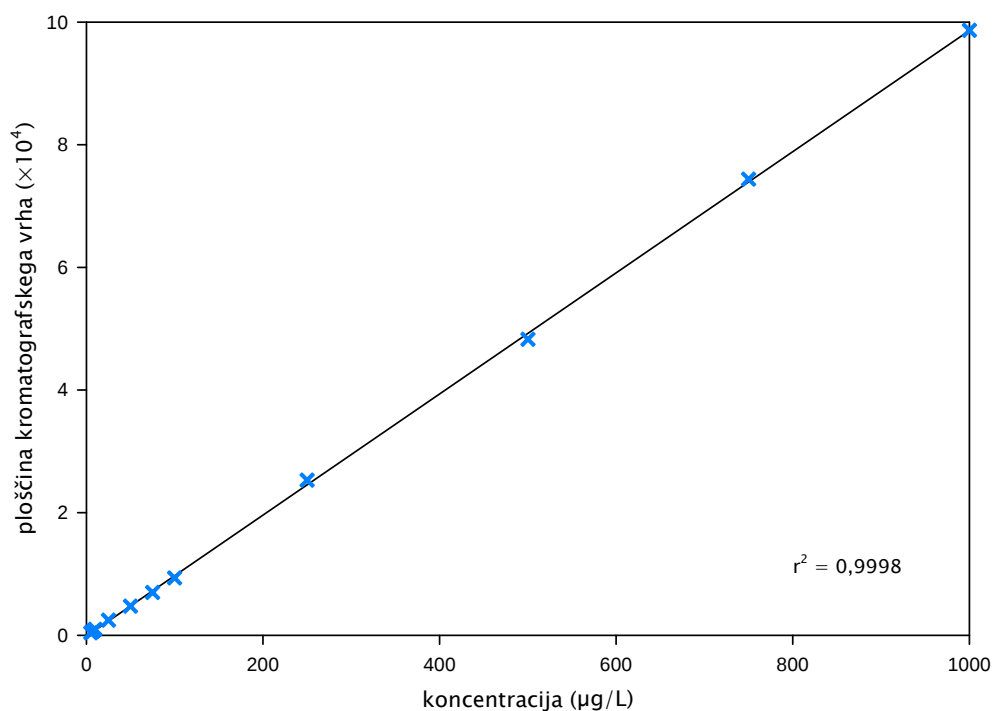
Graf 30: Regresijska premica 5-hidroksi-fluniksina v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/L



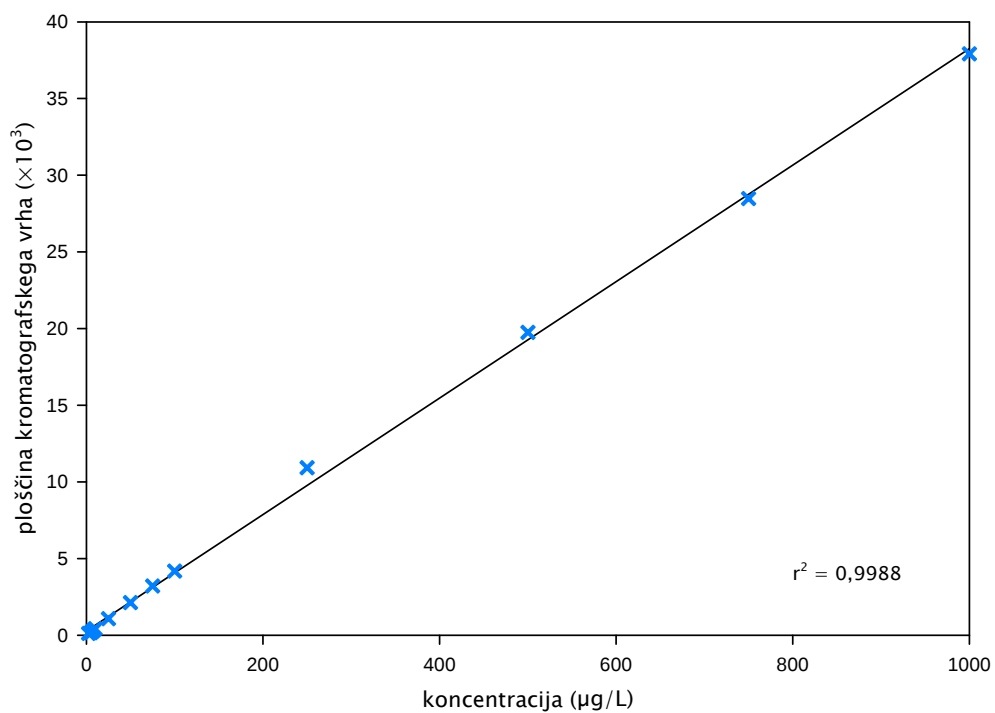
Graf 31: Regresijska premica ketoprofena v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,25 $\mu\text{g/L}$



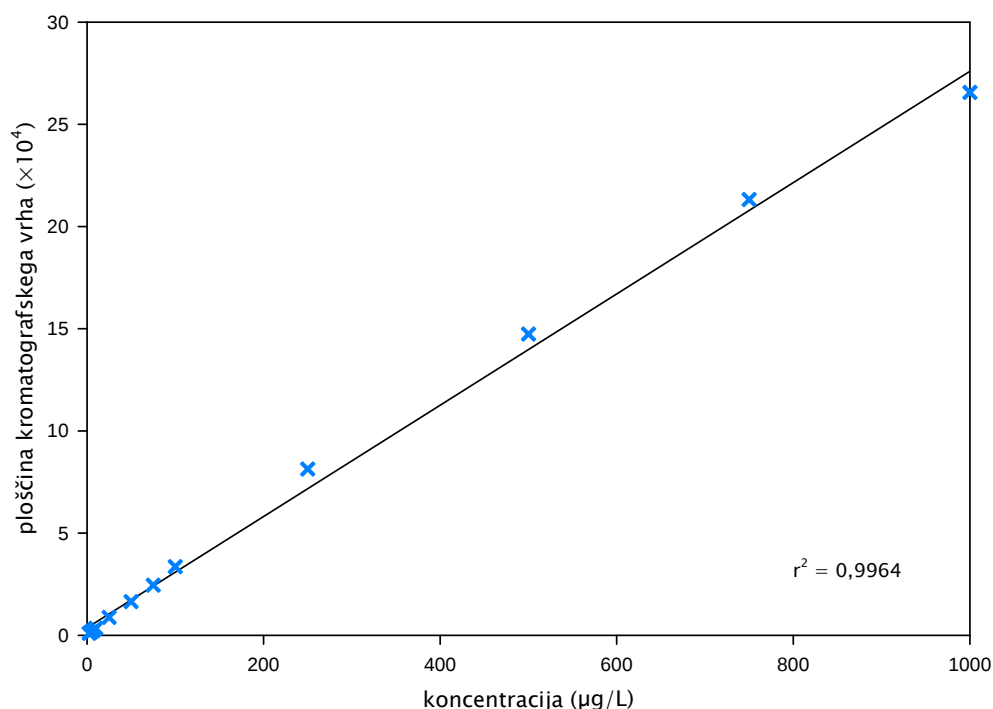
Graf 32: Regresijska premica meloksikama v topilu v koncentracijskem območju 1000–2,5 $\mu\text{g/L}$



Graf 33: Regresijska premica oksifenbutazona v topilu v koncentracijskem območju 1000–5 µg/L



Graf 34: Regresijska premica fenilbutazona v topilu v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/L

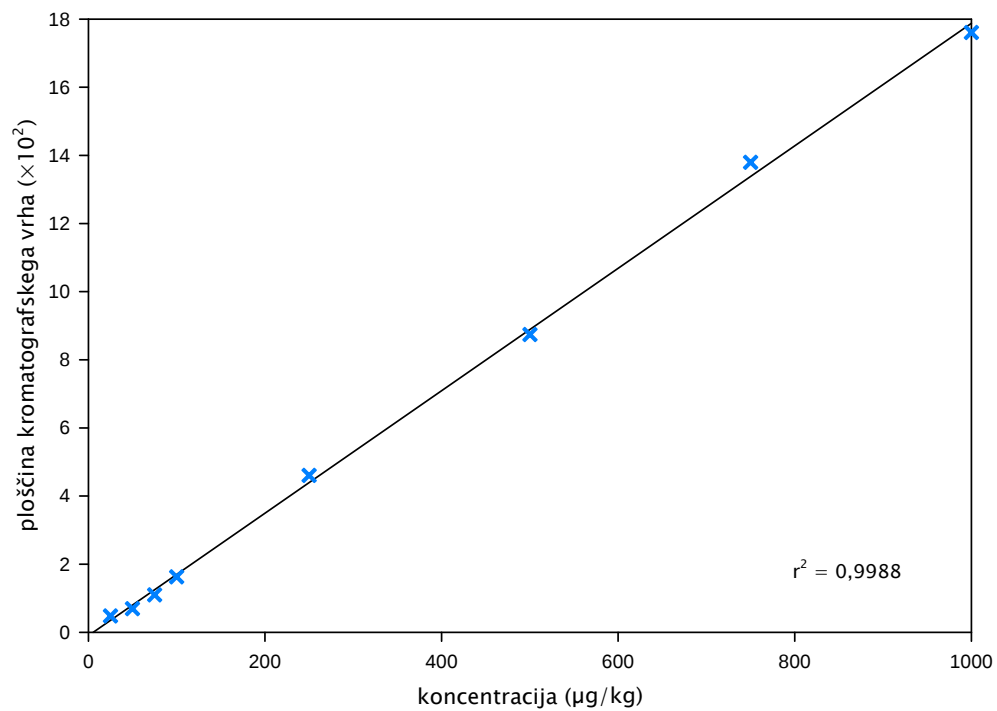


Graf 35: Regresijska premica tolifenamske kisline v topilu v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/L

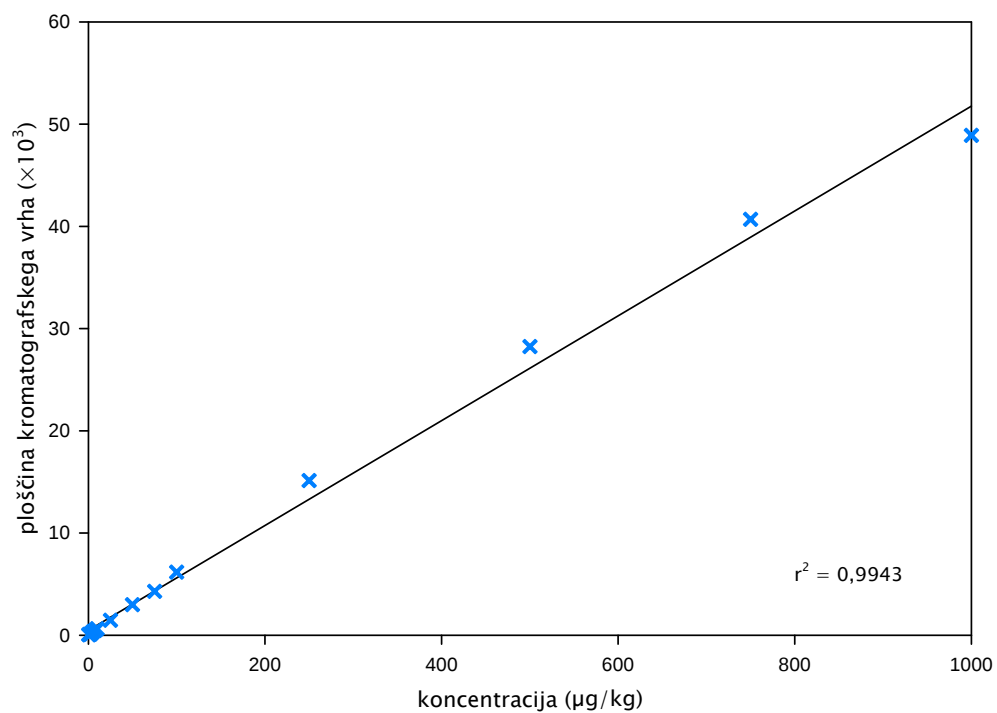
Tabela 37: Linearnost ploščin kromatografskih vrhov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku v območju standardnih dodatkov 1000–0,1 µg/kg

Dodano (µg/kg)	CPF	DCL	FLU	FLU-OH	KPF	MLX	OBZ	PBZ	TFA
0,1	p.m.v.	p.m.v.	200,71	142,24	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.
0,25	p.m.v.	p.m.v.	283,59	176	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.
0,5	p.m.v.	60,199	525,34	406,23	143,07	263,51	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.
0,75	p.m.v.	67,201	732,8	465,53	158,84	355,8	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.
1	p.m.v.	87,747	1151,1	694,81	165,53	429,57	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.
2,5	p.m.v.	114,46	2650,8	1840,6	480,77	1228,3	49,823	251,63	732,39
5	p.m.v.	336,66	5065,7	3326,4	1035,2	2029,4	135	422,05	1350,4
7,5	p.m.v.	466,69	7750,4	5045,4	1607,6	3064,2	155,99	659,84	2106
10	p.m.v.	636,28	10776	6674,6	2127,3	4054,6	420,24	803,54	2501,5
25	47,844	1465,1	26802	17250	4806,2	10259	770,06	2397,4	6662,6
50	69,115	2982,5	51544	34315	10102	20983	1648	4760	12652
75	110,18	4289,1	74162	51613	16043	31061	2517,7	6817	18399
100	163,04	6164,4	98235	71030	21427	40893	3254	8727,5	24688
250	460,73	15138	238170	185270	51268	104980	8569,3	22655	57049
500	874,12	28239	418950	357350	95465	195570	17389	43594	101350
750	1379,5	40688	583430	523060	144540	283950	26375	64551	141970
1000	1760,7	48905	751230	685400	186980	368890	34031	78163	177920
naklon:	1,80	51,22	767,64	693,21	188,91	372,90	34,52	81,19	181,63
presečišče:	-9,57	526,17	8203,34	1094,08	780,49	2681,27	-40,91	708,23	3611,42
r:	0,9994	0,9971	0,9979	0,9998	0,9997	0,9994	0,9998	0,9980	0,9973
r ² :	0,9988	0,9942	0,9958	0,9995	0,9994	0,9989	0,9996	0,9961	0,9947

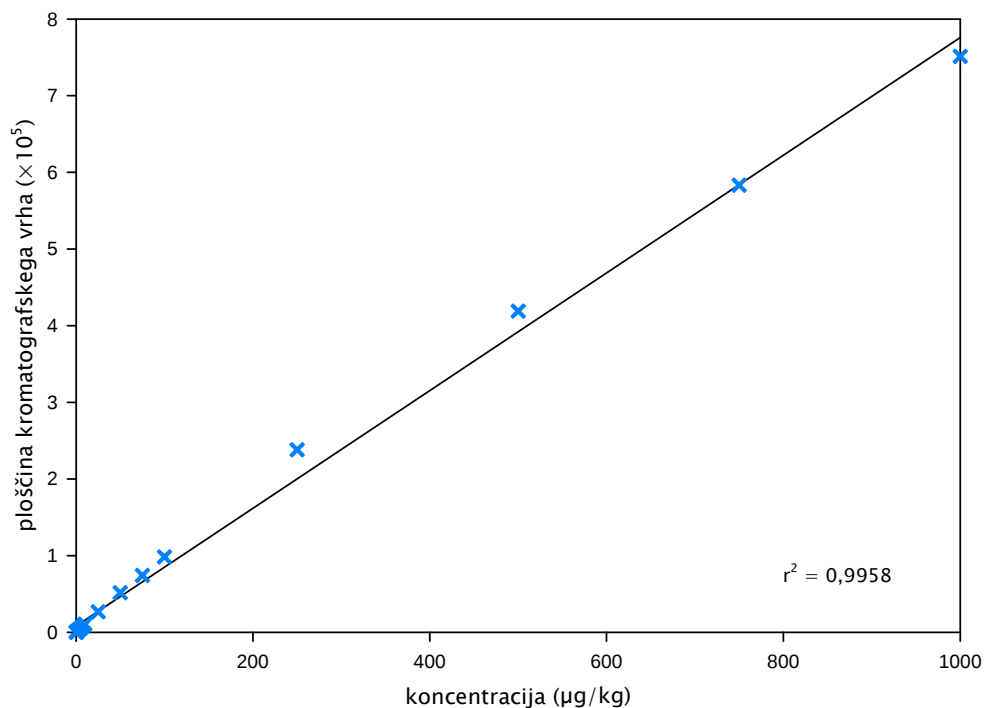
CPF – karprofen; DCL – diklofenak; FLU – fluniksini; FLU-OH – 5-hidroksi-fluniksini; KPF – ketoprofen; MLX – meloksikam; OBZ – oksifenbutazon; PBZ – fenilbutazon; TFA – tolifenamska kislina; p.m.v. – pod mejo vrednotenja analizne metode



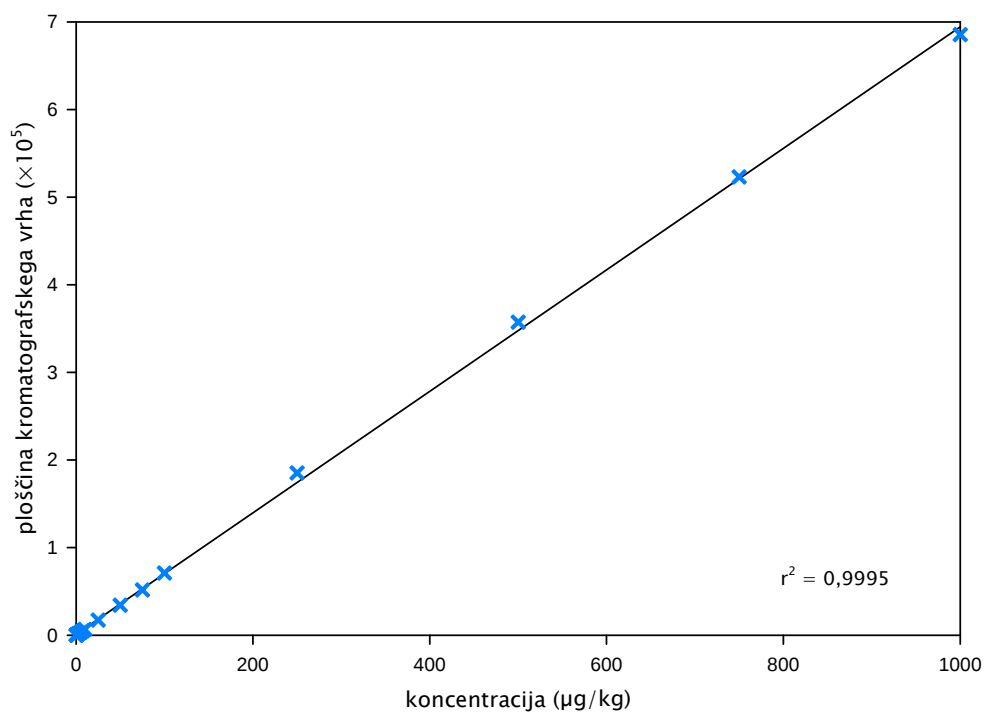
Graf 36: Regresijska premica karpofena v mleku v koncentracijskem območju 1000–25 $\mu\text{g/kg}$



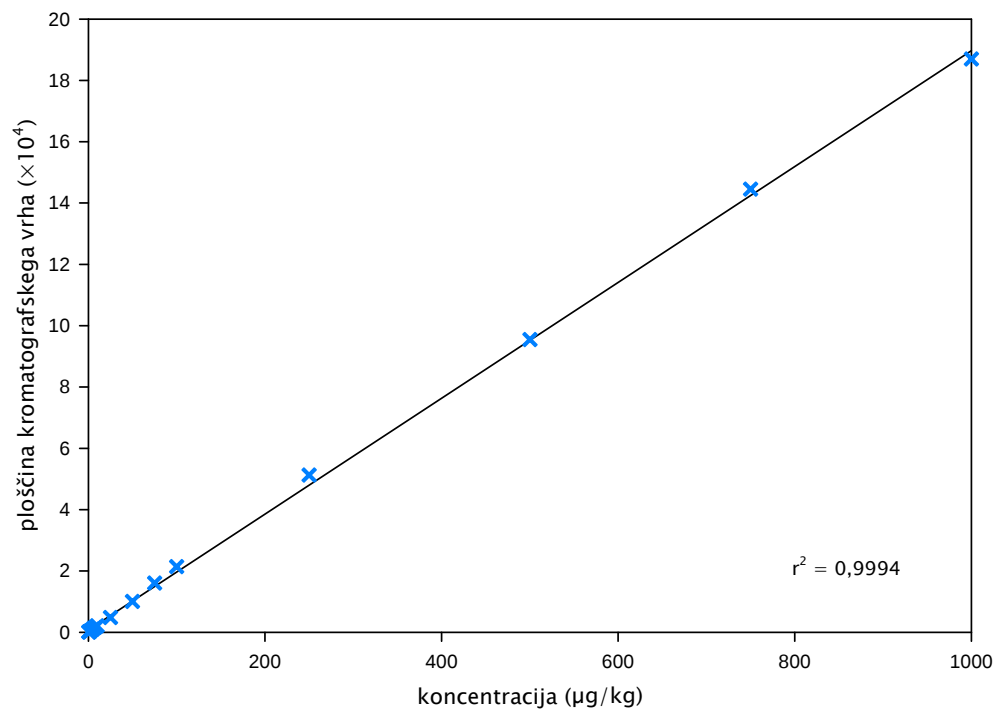
Graf 37: Regresijska premica diklofenaka v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,5 $\mu\text{g/kg}$



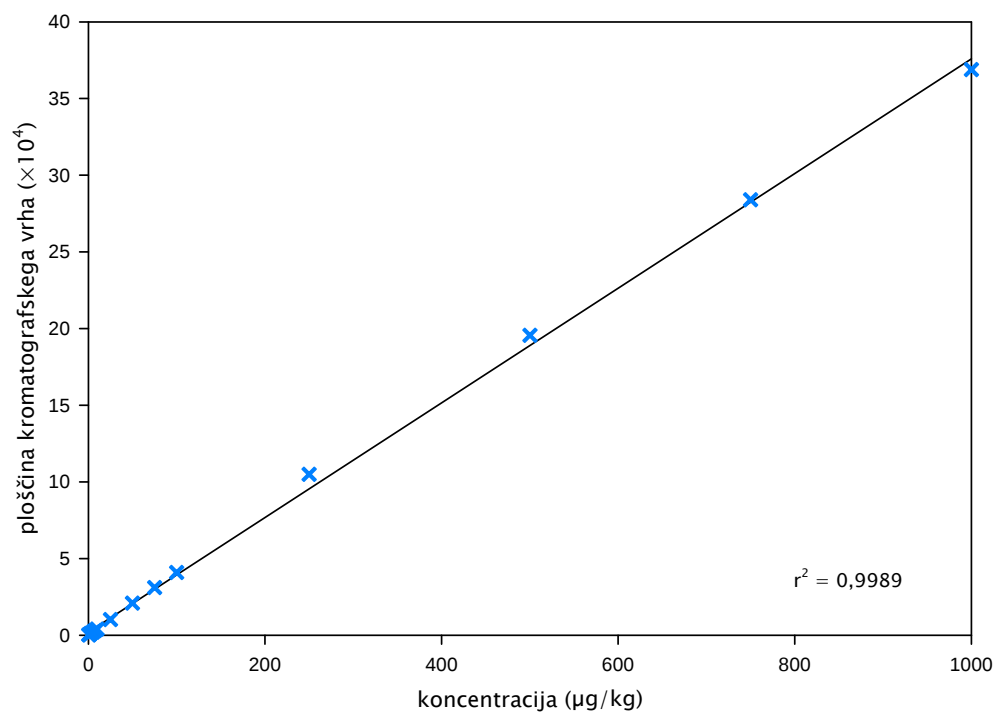
Graf 38: Regresijska premica fluniksina v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/kg



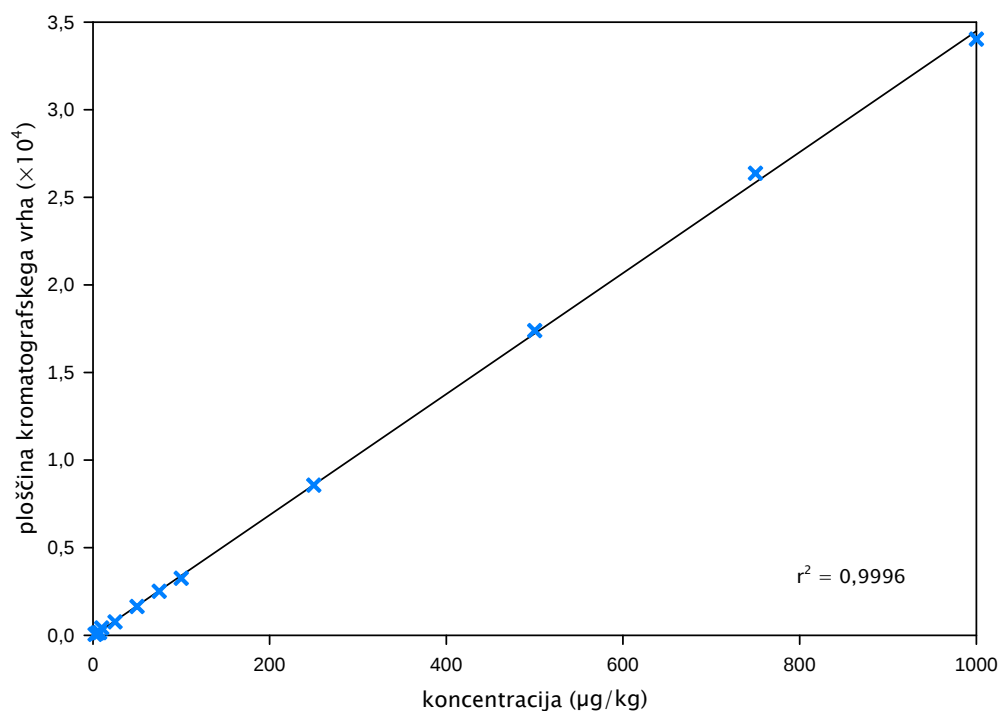
Graf 39: Regresijska premica 5-hidroksi-fluniksina v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/kg



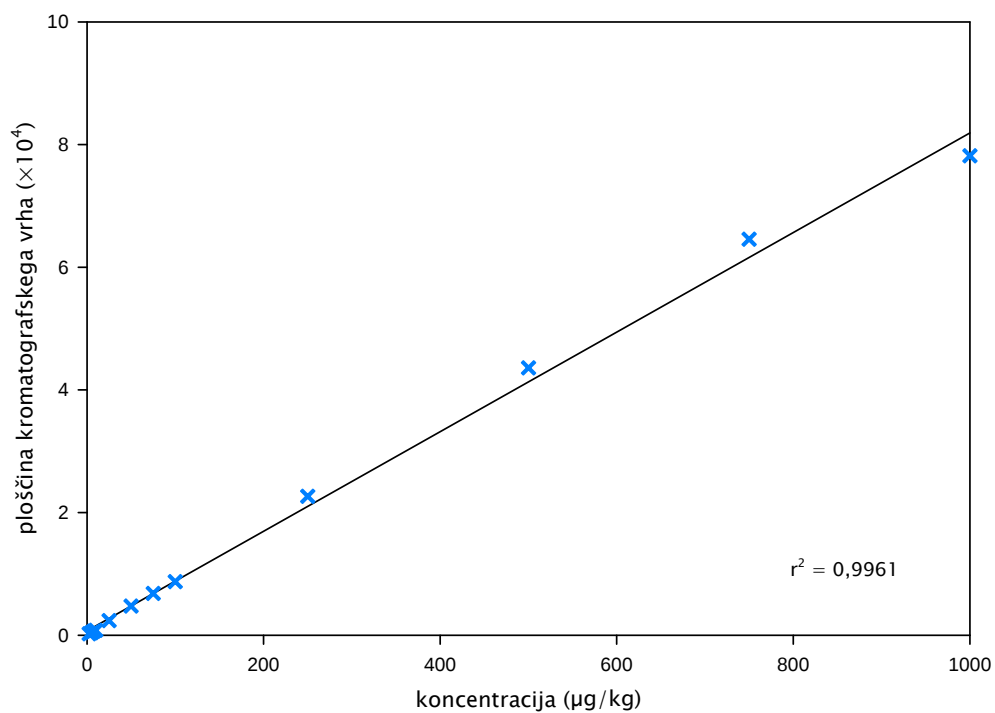
Graf 40: Regresijska premica ketoprofena v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,5 µg/kg



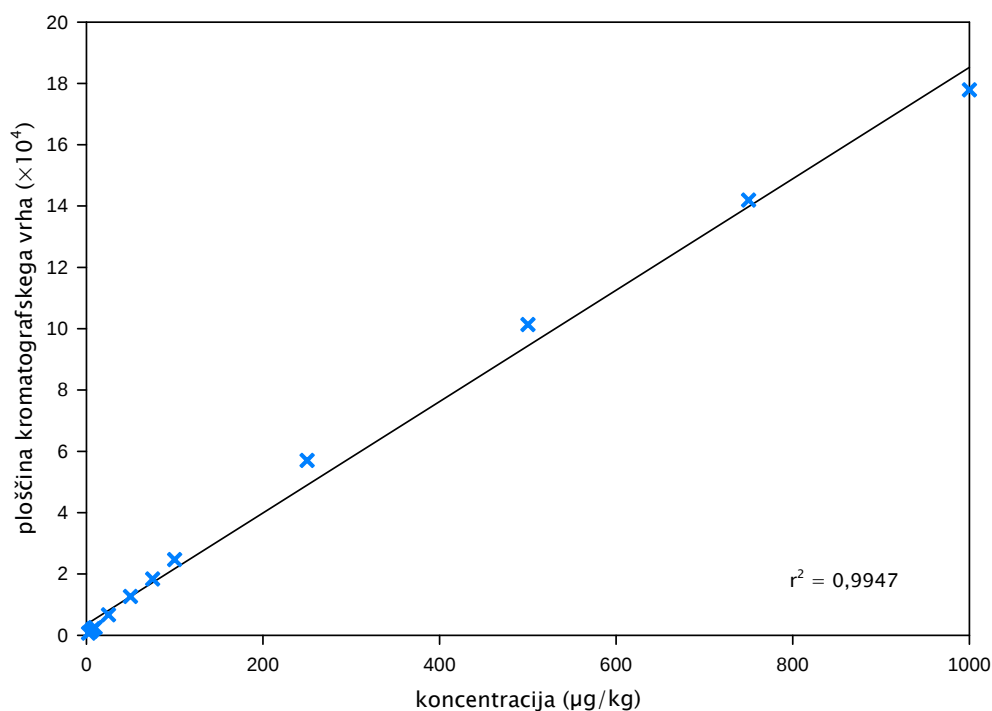
Graf 41: Regresijska premica meloksikama v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,5 µg/kg



Graf 42: Regresijska premica oksifenbutazona v mleku v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/kg



Graf 43: Regresijska premica fenilbutazona v mleku v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/kg



Graf 44: Regresijska premica tolfenamske kisline v mleku v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/kg

Tabela 38: Linearnost ploščin kromatografskih vrhov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi v območju standardnih dodatkov 1000–10 µg/kg (CPF) in 200–2 µg/kg (DCL, OBZ, PBZ, TFA)

Dodano (µg/kg)	CPF
10	p.m.v.
25	60,516
50	175,62
75	243,67
100	311,68
250	998,8
500	1730,8
750	2739
1000	3683,6
naklon:	3,68
presečišče:	-23,60
r:	0,9992
r ² :	0,9985

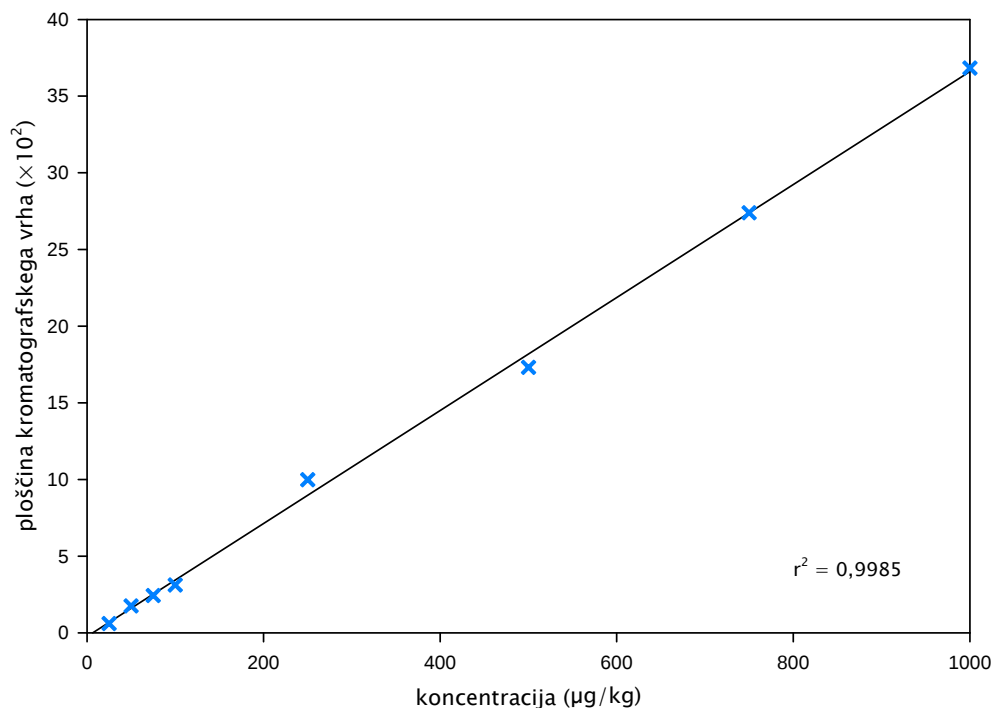
Dodano (µg/kg)	DCL	OBZ	PBZ	TFA
2	59,054	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.
5	77,501	p.m.v.	p.m.v.	p.m.v.
10	223,83	p.m.v.	p.m.v.	607,35
15	345,72	193,57	111,9	769,96
20	409,77	260,76	147,08	1073
50	1086,8	809,42	334,32	2712
100	2061,6	1400,8	563,09	5753,7
150	3280,3	2038,6	914,35	8653
200	4496,4	2714,9	1202,7	11592
naklon:	22,18	13,47	5,85	58,28
presečišče:	-22,69	35,58	23,57	-85,91
r:	0,9993	0,9985	0,9986	0,9999
r ² :	0,9986	0,9971	0,9972	0,9998

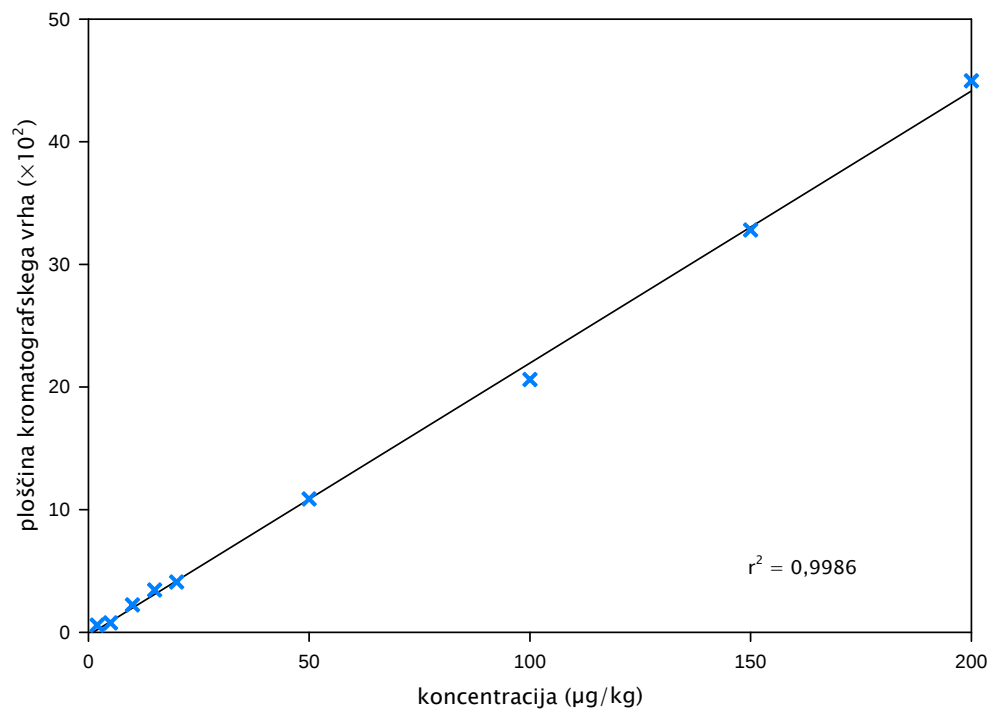
CPF – karprofen; DCL – diklofenak; OBZ – oksifenbutazon; PBZ – fenilbutazon; TFA – tolfenamska kislina; p.m.v. – pod mejo vrednotenja analizne metode

Tabela 39: Linearnost ploščin kromatografskih vrhov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi v območju standardnih dodatkov 100–0,75 µg/kg (KPF, MLX) in 20–0,15 µg/kg (FLU, FLU-OH)

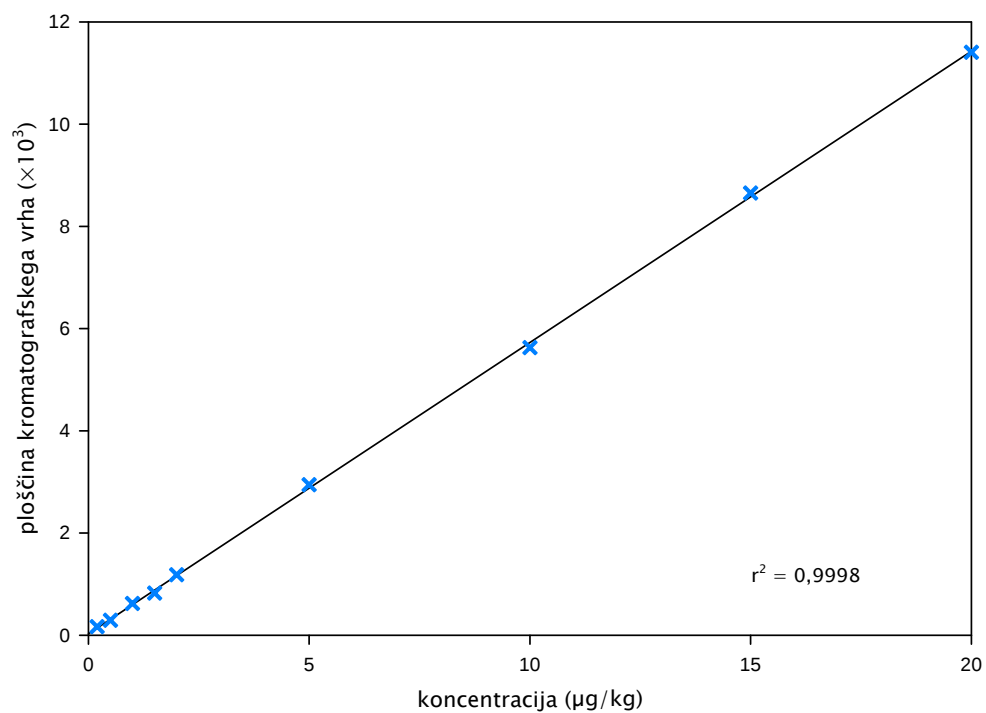
Dodano (µg/kg)	KPF	MLX	Dodano (µg/kg)	FLU	FLU-OH
0,75	p.m.v.	152,97	0,15	p.m.v.	p.m.v.
1	p.m.v.	263,78	0,2	166,84	p.m.v.
2,5	593,49	605,9	0,5	294,35	215,07
5	902,74	1135,8	1	620,83	423,37
7,5	1073,2	1998	1,5	825,3	695,99
10	1250,4	2355,7	2	1185,3	862,62
25	2808	5998,3	5	2944,9	2395,1
50	4929,8	11948	10	5626,9	4868,4
75	7498,5	17723	15	8652	7647,3
100	9550,1	24231	20	11406	10058
naklon:			naklon:		
92,50			569,81		
presečišče:			presečišče:		
396,11			29,87		
r:			r:		
0,9996			0,9999		
r ² :			r ² :		
0,9992			0,9998		

KPF – ketoprofen; MLX – meloksikam; FLU – fluniksini; FLU-OH – 5-hidroksi-fluniksini; p.m.v. – pod mejo vrednotenja analizne metode

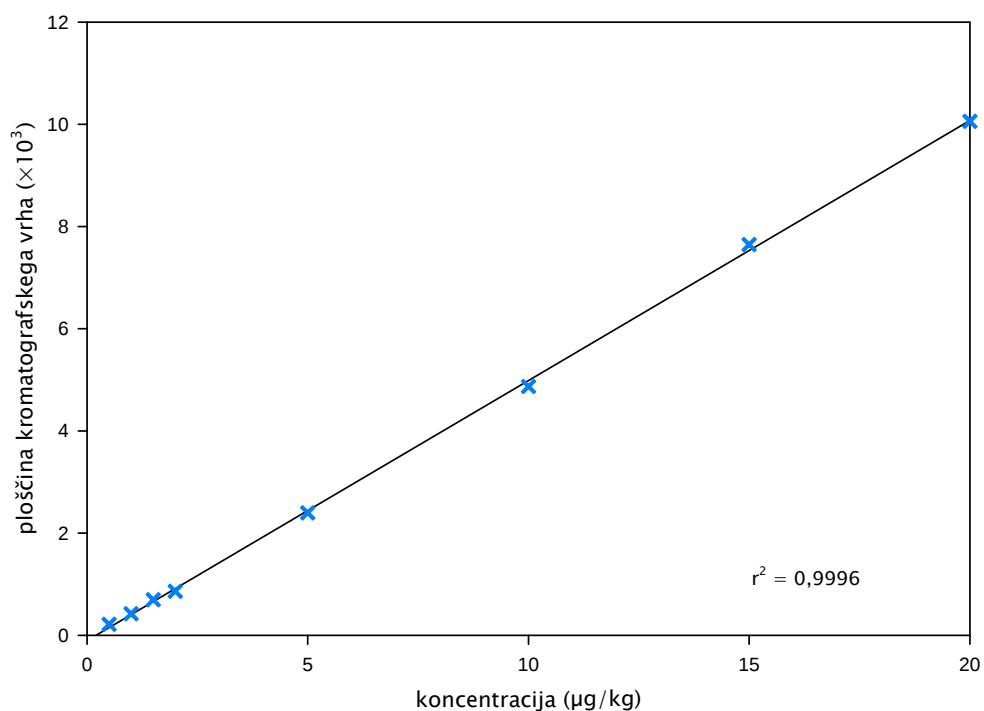
**Graf 45:** Regresijska premica karprofena v krvni plazmi v koncentracijskem območju 1000–25 µg/kg



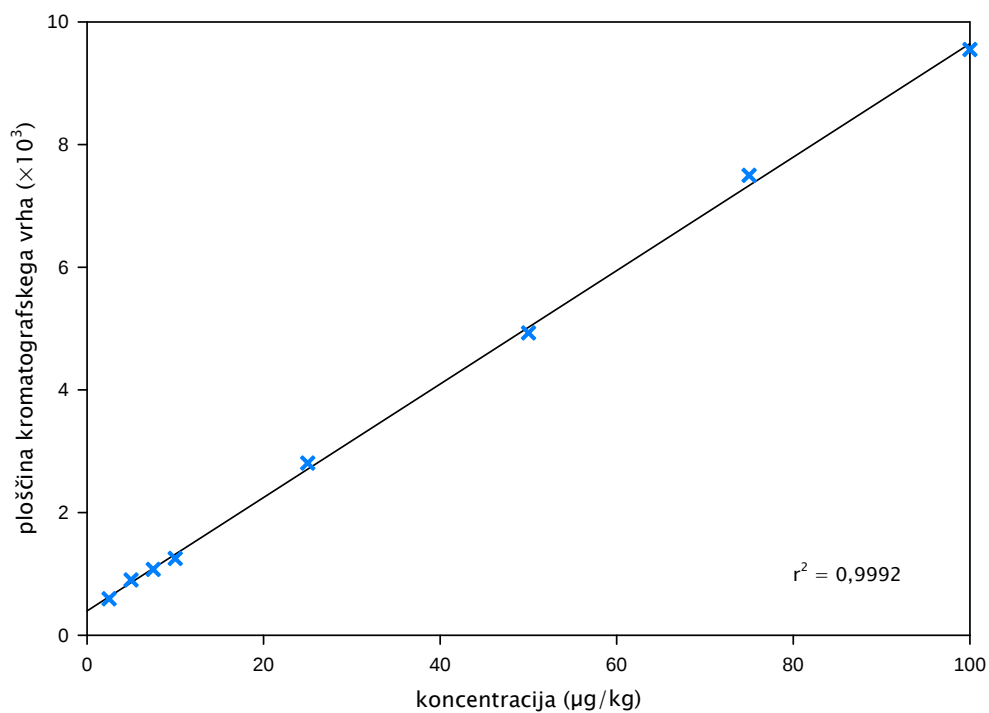
Graf 46: Regresijska premica diklofenaka v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–2 µg/kg



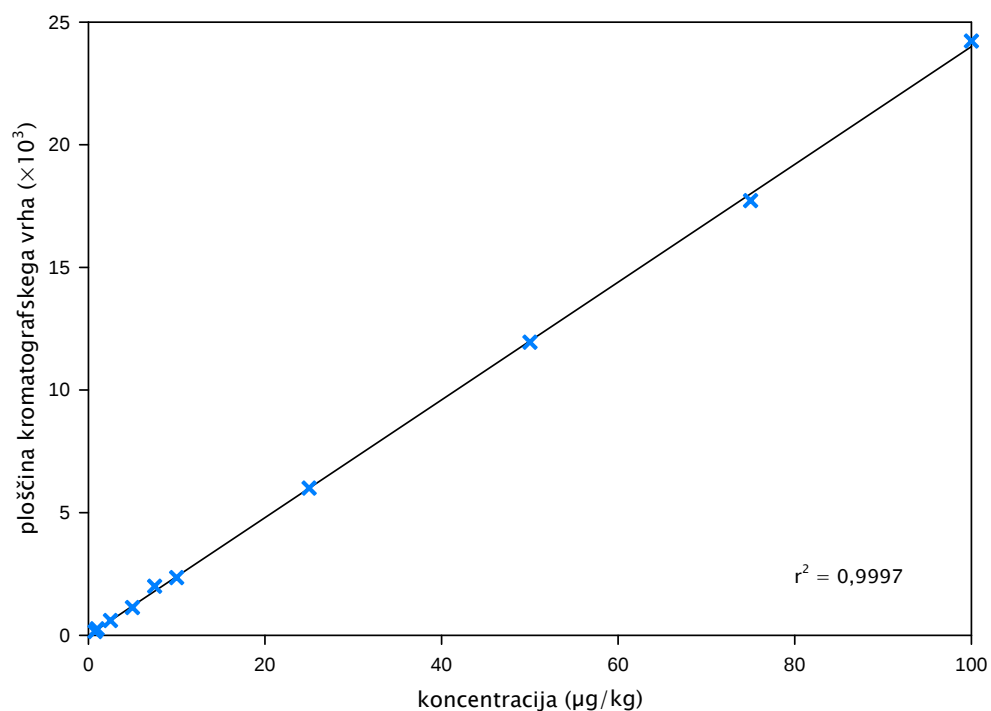
Graf 47: Regresijska premica fluniksina v krvni plazmi v koncentracijskem območju 20–0,2 µg/kg



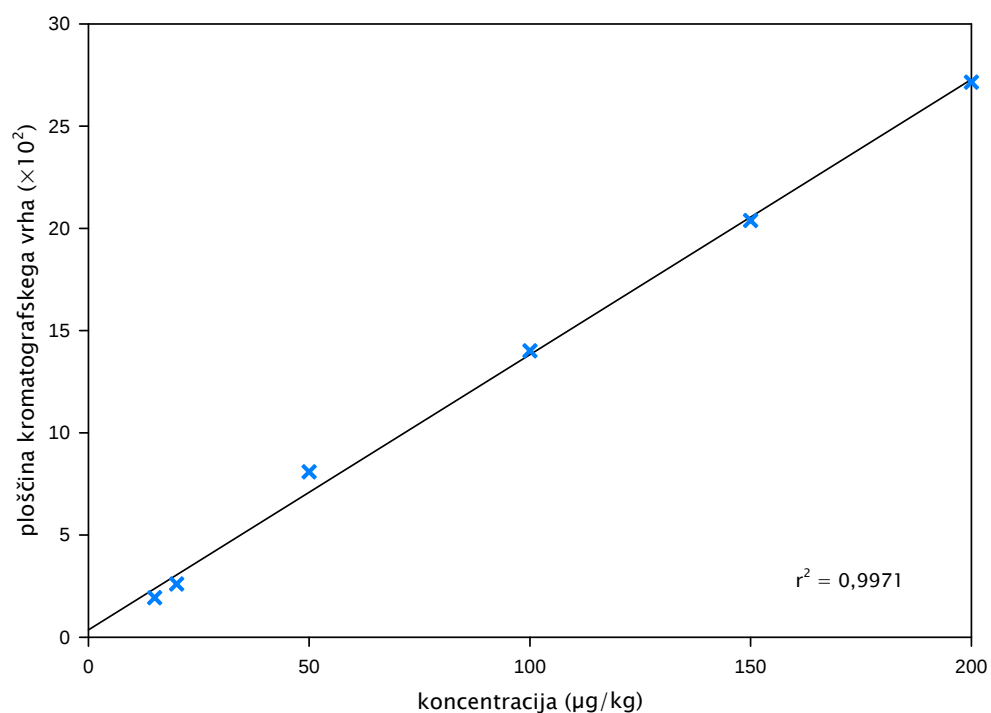
Graf 48: Regresijska premica 5-hidroksi-fluniksina v krvni plazmi v koncentracijskem območju 20–0,5 $\mu\text{g/kg}$



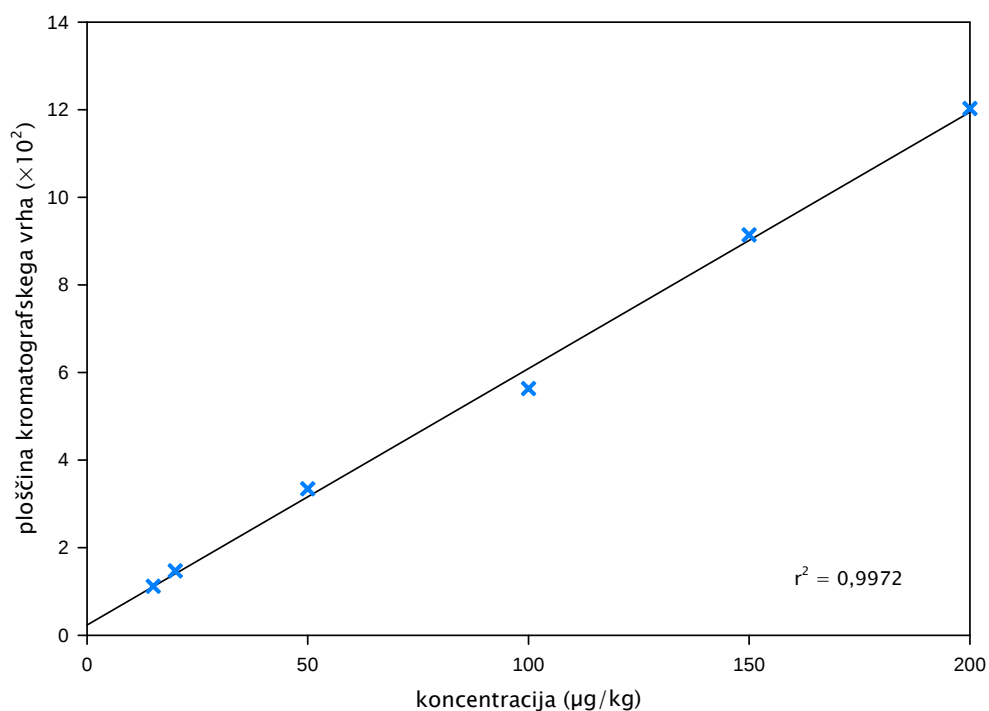
Graf 49: Regresijska premica ketoprofena v krvni plazmi v koncentracijskem območju 100–2,5 $\mu\text{g/kg}$



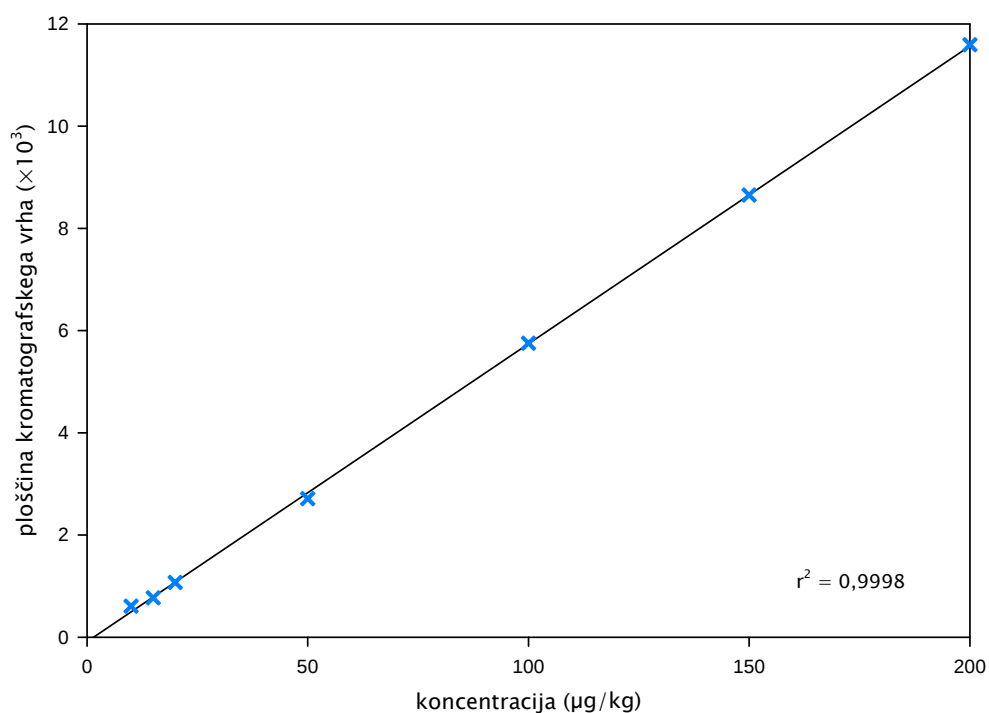
Graf 50: Regresijska premica meloksikama v krvni plazmi v koncentracijskem območju 100–0,75 µg/kg



Graf 51: Regresijska premica oksifenbutazona v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–15 µg/kg



Graf 52: Regresijska premica fenilbutazona v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–15 µg/kg



Graf 53: Regresijska premica tolifenamske kisline v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–10 µg/kg

Tabela 40: Izkoristek (%) ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v mleku

	St. dodatek (µg CPF/kg)			St. dodatek (µg DCL/kg)			St. dodatek (µg FLU/kg)		
	50	100	150	1	2	3	20	40	60
Dan 1	81	67	95	78	103	138	79	79	78
	112	104	81	93	138	124	76	80	79
	130	100	76	93	181	131	74	80	77
	101	93	79	59	132	115	76	82	78
	82	103	71	80	110	132	75	81	77
	94	83	88	176	132	123	78	80	76
	Povprečje	100	92	82	97	133	127	76	80
	S _{izk}	19	14	9	41	27	8	2	1
	KV _{izk} (%)	19,0	15,7	10,4	42,3	20,7	6,4	2,7	1,4
Dan 2	108	80	67	98	96	110	75	84	86
	110	95	75	95	97	85	73	79	81
	93	84	78	88	85	96	72	80	79
	76	58	64	79	97	104	73	79	84
	76	81	90	66	98	85	76	82	83
	84	72	78	77	98	85	74	85	85
	Povprečje	91	78	75	84	95	94	74	82
	S _{izk}	15	12	9	12	5	11	3	3
	KV _{izk} (%)	16,6	15,8	12,4	14,4	5,4	11,6	2,0	3,2
Dan 3	56	103	79	53	44	77	89	100	81
	90	83	92	43	67	69	101	90	94
	101	92	80	46	100	54	93	99	79
	79	62	93	65	79	76	75	87	104
	94	72	74	33	89	90	88	93	82
	68	83	80	80	60	107	75	106	84
	Povprečje	81	82	83	54	73	79	87	96
	S _{izk}	17	14	8	17	20	18	10	7
	KV _{izk} (%)	20,7	17,5	9,5	31,3	27,8	23,0	11,5	7,4
Skupno	Povprečje	91	84	80	78	100	100	79	86
	S _{izk}	18	14	9	31	31	24	8	7
	KV _{izk} (%)	19,7	16,8	10,9	39,7	31,4	24,1	10,3	9,6

Tabela 41: Izkoristek (%) ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v mleku

		St. dodatek (µg FLU–OH/kg)			St. dodatek (µg KPF/kg)		St. dodatek (µg MLX/kg)			
		20	40	60	1	2	3	7,5	15	22,5
Dan 1		70	74	75	51	105	101	61	76	80
		73	75	74	68	84	95	67	79	76
		70	73	74	28	105	85	66	76	86
		75	78	74	68	107	86	68	81	85
		73	76	73	36	77	90	71	86	81
		71	75	70	42	67	125	71	79	82
	Povprečje	72	75	73	49	91	97	67	79	82
	S _{izk}	2	2	2	17	17	15	4	4	4
	KV _{izk} (%)	2,9	2,3	2,3	34,1	18,8	15,4	5,4	4,9	4,4
Dan 2		84	100	101	52	58	90	64	78	99
		88	98	96	21	70	74	71	85	78
		90	94	97	24	67	59	67	80	89
		91	98	96	39	71	85	70	82	87
		97	99	97	37	79	90	68	85	92
		103	98	98	42	58	100	67	92	86
	Povprečje	92	98	97	36	67	83	68	84	89
	S _{izk}	7	2	2	12	8	14	3	5	7
	KV _{izk} (%)	7,2	2,1	2,1	32,0	12,2	17,2	3,7	5,9	7,8
Dan 3		88	98	79	85	85	80	82	93	78
		102	89	93	107	83	96	91	83	93
		94	96	79	109	85	77	87	91	73
		78	86	100	84	79	97	67	85	101
		92	92	81	96	87	83	81	84	81
		79	102	83	91	97	90	68	99	87
	Povprečje	89	94	86	95	86	87	79	89	85
	S _{izk}	9	6	9	10	6	8	10	6	10
	KV _{izk} (%)	10,5	6,5	10,1	10,9	6,9	9,7	12,5	6,9	12,0
Skupno	Povprečje	84	89	85	60	81	89	71	84	85
	S _{izk}	11	11	11	29	15	13	8	6	8
	KV _{izk} (%)	13,0	12,2	13,2	48,3	18,4	15,1	11,6	7,5	8,8

Tabela 42: Izkoristek (%) ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v mleku

	St. dodatek (µg OBZ/kg)			St. dodatek (µg PBZ/kg)			St. dodatek (µg TFA/kg)		
	5	10	15	5	10	15	25	50	75
Dan 1	63	49	57	75	81	79	81	77	77
	75	44	58	81	82	72	74	71	83
	56	54	56	66	72	66	78	75	78
	58	60	56	62	79	70	78	79	74
	62	55	58	64	83	71	78	81	75
	63	56	47	65	76	65	84	76	76
	Povprečje	63	53	55	69	79	70	79	76
	S _{izk}	6	6	4	8	4	5	3	3
	KV _{izk} (%)	10,3	11,1	7,5	11,0	5,4	7,1	4,1	4,1
Dan 2	47	57	57	54	81	72	80	80	82
	51	62	53	72	74	75	85	81	85
	69	66	63	70	98	71	84	84	81
	57	63	62	55	80	76	85	78	75
	56	58	54	54	74	70	89	82	87
	59	59	53	70	79	70	81	90	90
	Povprečje	56	61	57	63	81	72	84	83
	S _{izk}	8	3	4	9	9	3	4	5
	KV _{izk} (%)	13,4	5,6	7,7	14,3	11,1	3,6	3,9	6,3
Dan 3	78	64	58	56	95	73	86	91	76
	80	58	74	117	81	86	95	87	93
	88	65	52	106	89	69	90	90	75
	59	61	79	101	98	78	79	87	98
	55	60	62	91	81	92	91	85	81
	62	69	67	67	97	64	76	99	89
	Povprečje	70	63	65	90	90	77	86	85
	S _{izk}	14	4	10	24	8	11	7	10
	KV _{izk} (%)	19,2	6,3	15,6	26,5	8,6	13,7	8,6	11,1
Skupno	Povprečje	63	59	59	74	83	73	83	82
	S _{izk}	11	6	8	19	9	7	6	7
	KV _{izk} (%)	17,2	10,4	13,2	25,2	10,3	9,8	6,8	8,7

Tabela 43: Izkoristek (%) ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v krvni plazmi

		St. dodatek (µg CPF/kg)			St. dodatek (µg DCL/kg)			St. dodatek (µg FLU/kg)		
		50	100	150	10	20	30	1	2	3
Dan 1		102	103	101	84	83	88	89	92	105
		101	103	100	67	87	96	101	85	104
		105	104	104	84	76	80	92	99	96
		105	101	100	80	79	93	89	87	105
		106	99	104	64	87	91	106	106	99
		105	99	104	83	90	100	84	92	109
	Povprečje	104	102	102	77	84	91	94	93	103
	S _{izk}	2	2	2	9	5	7	8	8	5
	KV _{izk} (%)	1,8	2,2	1,9	12,0	6,3	7,3	9,0	8,3	4,5
Dan 2		98	99	107	62	82	91	96	96	103
		93	105	101	109	99	92	94	95	92
		111	101	102	98	98	96	89	91	97
		97	104	104	76	97	90	94	105	98
		108	96	104	77	80	94	93	100	92
		104	102	105	93	103	88	96	96	95
	Povprečje	102	101	104	86	93	92	94	97	96
	S _{izk}	7	3	2	17	10	3	2	5	4
	KV _{izk} (%)	6,6	3,1	2,1	20,0	10,2	3,2	2,5	5,0	4,5
Dan 3		96	101	106	70	91	100	115	103	96
		96	100	104	105	84	83	100	94	95
		94	103	103	108	85	91	84	88	96
		102	102	104	84	93	81	101	100	99
		102	101	101	85	81	90	101	99	95
		106	102	106	87	78	96	102	99	93
	Povprečje	99	101	104	90	85	90	100	97	96
	S _{izk}	5	1	2	14	6	7	10	5	2
	KV _{izk} (%)	4,7	1,0	1,9	16,1	6,8	8,2	9,8	5,6	2,2
Skupno	Povprečje	102	101	103	84	87	91	96	96	98
	S _{izk}	5	2	2	14	8	6	8	6	5
	KV _{izk} (%)	4,9	2,1	2,0	16,9	9,1	6,3	8,2	6,3	5,1

Tabela 44: Izkoristek (%) ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v krvni plazmi

		St. dodatek (µg FLU-OH/kg)			St. dodatek (µg KPF/kg)		St. dodatek (µg MLX/kg)			
		1	2	3	10	20	30	5	10	15
Dan 1		108	94	110	117	100	111	102	98	100
		96	105	112	100	100	108	89	90	102
		101	120	118	95	106	106	84	97	100
		131	98	108	105	108	111	84	98	104
		95	113	115	112	105	102	93	97	100
		86	112	118	106	106	113	94	100	104
	Povprečje	103	107	113	106	104	108	91	97	102
	S _{izk}	15	10	4	8	3	4	7	4	2
	KV _{izk} (%)	15,1	9,1	3,8	7,6	3,3	3,8	7,5	3,7	1,9
Dan 2		103	117	121	122	117	120	97	102	94
		115	115	110	111	119	114	93	107	105
		97	118	118	119	116	114	99	104	95
		143	110	108	117	116	112	88	96	103
		107	110	117	106	125	97	104	102	95
		142	124	114	118	117	115	100	101	92
	Povprečje	118	116	115	116	118	112	97	102	97
	S _{izk}	20	6	5	6	3	8	5	4	5
	KV _{izk} (%)	17,0	4,8	4,4	5,2	2,9	7,1	5,7	3,7	5,4
Dan 3		122	128	122	84	98	97	100	89	90
		113	107	103	103	109	106	98	95	92
		108	99	115	104	93	105	105	92	99
		112	117	108	99	97	101	103	104	94
		93	108	127	97	105	108	92	89	94
		102	103	115	105	104	105	97	95	92
	Povprečje	108	110	115	99	101	104	99	94	93
	S _{izk}	10	11	9	8	6	4	5	5	3
	KV _{izk} (%)	9,0	9,6	7,6	7,8	5,9	3,8	4,6	5,7	3,3
Skupno	Povprečje	110	111	114	107	108	108	96	98	97
	S _{izk}	16	9	6	10	9	6	6	5	5
	KV _{izk} (%)	14,6	8,3	5,3	9,2	8,1	5,9	6,8	5,4	5,1

Tabela 45: Izkoristek (%) ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v krvni plazmi

	St. dodatek (µg OBZ/kg)			St. dodatek (µg PBZ/kg)			St. dodatek (µg TFA/kg)		
	20	40	60	20	40	60	20	40	60
Dan 1	119	104	103	106	89	86	86	87	93
	118	105	101	108	95	83	86	90	90
	117	104	102	105	88	83	85	88	95
	116	105	102	110	92	85	89	90	87
	118	105	103	108	92	85	95	92	91
	117	102	102	109	90	84	91	90	97
	Povprečje	118	104	102	108	91	84	89	92
	S _{izk}	1	1	1	2	2	1	4	4
	KV _{izk} (%)	0,8	1,1	0,7	1,7	2,7	1,5	4,3	3,9
Dan 2	136	109	100	108	90	89	89	91	92
	137	106	103	112	86	92	86	90	89
	139	119	96	113	94	91	92	91	89
	138	111	103	109	95	86	90	87	90
	131	106	101	104	93	90	96	87	90
	138	105	99	99	89	89	89	88	85
	Povprečje	137	109	100	107	91	90	89	89
	S _{izk}	3	5	3	5	3	2	3	2
	KV _{izk} (%)	2,1	4,6	2,7	5,1	3,6	2,0	3,8	2,4
Dan 3	116	101	106	105	95	95	89	89	92
	118	104	106	109	93	95	92	86	90
	120	105	108	113	92	91	88	90	93
	125	102	105	102	90	95	86	89	93
	118	103	109	112	93	93	92	88	95
	126	105	108	105	90	91	89	85	89
	Povprečje	120	103	107	107	92	93	89	92
	S _{izk}	4	2	1	5	2	2	2	2
	KV _{izk} (%)	3,4	1,5	1,2	4,2	2,4	2,1	2,6	2,6
Skupno	Povprečje	125	106	103	108	91	89	90	89
	S _{izk}	9	4	3	4	3	4	3	2
	KV _{izk} (%)	7,2	3,8	3,3	3,7	2,9	4,7	3,5	2,2

Tabela 46: Ponovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v mleku

		St. dodatek (µg CPF/kg)			St. dodatek (µg DCL/kg)			St. dodatek (µg FLU/kg)		
		50	100	150	1	2	3	20	40	60
Dan 1		40,29	67,11	142,35	0,78	2,06	4,14	15,86	31,59	47,08
		56,01	104,09	121,56	0,93	2,75	3,71	15,27	32,07	47,18
		65,25	100,46	113,76	0,93	3,62	3,93	14,72	31,85	46,35
		50,57	93,43	118,86	0,59	2,65	3,46	15,23	32,84	46,80
		40,90	102,51	106,89	0,80	2,19	3,97	14,91	32,42	46,23
		47,24	82,90	132,02	1,76	2,64	3,69	15,60	31,85	45,75
	Povprečje	50,04	91,75	122,57	0,97	2,65	3,82	15,27	32,10	46,56
	s	9,53	14,37	12,80	0,41	0,55	0,24	0,42	0,46	0,55
	KV (%)	19,0	15,7	10,4	42,3	20,7	6,4	2,8	1,4	1,2
Dan 2		53,79	79,86	99,85	0,98	1,92	3,29	14,90	33,77	51,51
		55,05	95,23	113,12	0,95	1,94	2,55	14,67	31,75	48,33
		46,69	84,18	116,71	0,88	1,69	2,88	14,43	32,14	47,24
		38,09	58,42	96,61	0,79	1,94	3,11	14,50	31,72	50,18
		37,88	80,50	135,57	0,66	1,95	2,55	15,23	32,98	49,51
		41,93	71,85	117,45	0,77	1,95	2,54	14,73	34,13	51,03
	Povprečje	45,57	78,34	113,22	0,84	1,90	2,82	14,74	32,75	49,63
	s	7,58	12,37	14,03	0,12	0,10	0,33	0,29	1,04	1,63
	KV (%)	16,6	15,8	12,4	14,4	5,4	11,6	2,0	3,2	3,3
Dan 3		28,23	102,75	117,87	0,53	0,87	2,30	17,73	39,88	48,49
		44,79	82,80	137,67	0,43	1,34	2,08	20,18	35,81	56,59
		50,67	91,83	119,37	0,46	2,00	1,62	18,56	39,40	47,46
		39,32	61,61	140,14	0,65	1,58	2,29	15,08	34,94	62,17
		46,86	72,15	110,90	0,33	1,78	2,71	17,61	37,11	49,47
		34,09	82,58	119,57	0,80	1,21	3,20	15,07	42,50	50,48
	Povprečje	40,66	82,29	124,25	0,54	1,46	2,37	17,37	38,27	52,44
	s	8,43	14,42	11,81	0,17	0,41	0,54	2,00	2,84	5,74
	KV (%)	20,7	17,5	9,5	31,3	27,8	23,0	11,5	7,4	11,0
Skupno	Povprečje	45,43	84,13	120,02	0,78	2,00	3,00	15,79	34,38	49,55
	s	8,94	14,16	13,12	0,31	0,63	0,72	1,62	3,30	4,08
	KV (%)	19,7	16,8	10,9	39,7	31,4	24,1	10,3	9,6	8,2

Tabela 47: Ponovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v mleku

		St. dodatek (µg FLU–OH/kg)			St. dodatek (µg KPF/kg)			St. dodatek (µg MLX/kg)		
		20	40	60	1	2	3	7,5	15	22,5
Dan 1		14,07	29,47	45,00	0,51	2,10	3,03	4,58	11,35	18,05
		14,62	30,04	44,16	0,68	1,67	2,86	4,99	11,86	17,16
		14,06	29,35	44,39	0,28	2,10	2,54	4,93	11,39	19,33
		15,07	31,25	44,41	0,68	2,14	2,59	5,07	12,15	19,21
		14,67	30,20	43,91	0,36	1,54	2,69	5,33	12,92	18,21
		14,11	29,89	42,07	0,42	1,35	3,75	5,29	11,84	18,38
	Povprečje	14,43	30,03	43,99	0,49	1,81	2,91	5,04	11,91	18,39
	s	0,42	0,68	1,01	0,17	0,34	0,45	0,27	0,58	0,80
	KV (%)	2,9	2,3	2,3	34,1	18,8	15,4	5,4	4,9	4,4
Dan 2		16,76	40,06	60,71	0,52	1,15	2,70	4,77	11,75	22,34
		17,65	39,20	57,41	0,21	1,41	2,22	5,31	12,82	17,60
		18,02	37,61	58,13	0,24	1,34	1,78	5,06	11,99	19,94
		18,20	39,30	57,57	0,39	1,42	2,55	5,23	12,29	19,67
		19,33	39,42	57,92	0,37	1,59	2,71	5,06	12,82	20,66
		20,53	39,37	59,09	0,42	1,17	2,99	5,02	13,82	19,30
	Povprečje	18,42	39,16	58,47	0,36	1,35	2,49	5,08	12,58	19,92
	s	1,33	0,82	1,25	0,12	0,16	0,43	0,19	0,75	1,56
	KV (%)	7,2	2,09	2,1	32,0	12,2	17,2	3,7	5,9	7,8
Dan 3		17,70	39,39	47,42	0,85	1,69	2,39	6,12	13,99	17,52
		20,41	35,68	55,56	1,07	1,66	2,87	6,84	12,46	20,86
		18,81	38,39	47,14	1,09	1,70	2,32	6,52	13,63	16,47
		15,61	34,33	59,92	0,84	1,58	2,92	5,02	12,79	22,71
		18,36	36,80	48,48	0,96	1,75	2,50	6,10	12,53	18,23
		15,71	40,86	49,57	0,91	1,93	2,71	5,11	14,78	19,63
	Povprečje	17,77	37,57	51,35	0,95	1,72	2,62	5,95	13,36	19,24
	s	1,86	2,43	5,21	0,10	0,12	0,25	0,74	0,93	2,30
	KV (%)	10,5	6,5	10,2	10,9	6,9	9,7	12,5	6,9	12,0
Skupno	Povprečje	16,87	35,59	51,27	0,60	1,63	2,67	5,35	12,62	19,18
	s	2,19	4,34	6,77	0,29	0,30	0,40	0,62	0,94	1,70
	KV (%)	13,0	12,2	13,2	48,3	18,4	15,1	11,6	7,5	8,9

Tabela 48: Ponovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v mleku

		St. dodatek (µg OBZ/kg)			St. dodatek (µg PBZ/kg)			St. dodatek (µg TFA/kg)		
		5	10	15	5	10	15	25	50	75
Dan 1		3,13	4,87	8,57	3,73	8,10	11,80	20,29	38,73	57,41
		3,73	4,38	8,72	4,06	8,21	10,84	18,51	35,52	62,30
		2,80	5,37	8,39	3,28	7,15	9,84	19,62	37,28	58,55
		2,89	6,03	8,35	3,08	7,90	10,49	19,58	39,49	55,58
		3,11	5,53	8,71	3,21	8,28	10,62	19,57	40,35	56,42
		3,13	5,63	7,06	3,25	7,61	9,72	20,90	37,80	56,80
	Povprečje	3,13	5,30	8,30	3,44	7,88	10,55	19,75	38,20	57,84
	s	0,32	0,59	0,63	0,38	0,43	0,75	0,81	1,72	2,40
	KV (%)	10,3	11,1	7,6	11,0	5,5	7,2	4,1	4,5	4,2
Dan 2		2,33	5,72	8,56	2,71	8,07	10,82	19,89	39,80	61,79
		2,54	6,25	7,98	3,62	7,38	11,22	21,37	40,65	63,91
		3,44	6,58	9,41	3,51	9,81	10,58	21,05	41,88	60,42
		2,83	6,34	9,35	2,77	7,97	11,37	21,22	39,14	56,37
		2,82	5,78	8,09	2,72	7,39	10,49	22,16	41,17	65,27
		2,94	5,93	8,01	3,51	7,92	10,47	20,20	44,88	67,63
	Povprečje	2,82	6,10	8,57	3,14	8,09	10,82	20,98	41,25	62,56
	s	0,38	0,34	0,66	0,45	0,90	0,39	0,82	2,02	3,96
	KV (%)	13,4	5,6	7,7	14,3	11,1	3,6	3,9	4,9	6,3
Dan 3		3,92	6,37	8,64	2,78	9,55	11,02	21,58	45,47	57,24
		3,99	5,82	11,06	5,86	8,12	12,97	23,72	43,39	69,81
		4,41	6,51	7,76	5,29	8,90	10,34	22,57	44,89	55,88
		2,95	6,10	11,86	5,04	9,78	11,76	19,75	43,67	73,55
		2,73	6,01	9,30	4,53	8,12	13,85	22,86	42,50	61,08
		3,12	6,92	10,03	3,35	9,72	9,65	18,99	49,53	67,11
	Povprečje	3,52	6,29	9,78	4,48	9,03	11,60	21,58	44,91	64,11
	s	0,68	0,40	1,53	1,19	0,77	1,59	1,86	2,50	7,14
	KV (%)	19,2	6,3	15,6	26,5	8,6	13,7	8,6	5,6	11,1
Skupno	Povprečje	3,16	5,90	8,88	3,68	8,33	10,99	20,77	41,45	61,51
	s	0,54	0,61	1,17	0,93	0,86	1,08	1,42	3,45	5,37
	KV (%)	17,2	10,4	13,2	25,2	10,3	9,8	6,8	8,3	8,7

Tabela 49: Ponovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v krvni plazmi

		St. dodatek (µg CPF/kg)			St. dodatek (µg DCL/kg)			St. dodatek (µg FLU/kg)		
		50	100	150	10	20	30	1	2	3
Dan 1		50,90	102,97	151,50	8,45	16,60	26,55	0,89	1,85	3,15
		50,49	103,30	150,34	6,74	17,41	28,83	1,01	1,71	3,12
		52,26	104,29	155,91	8,44	15,29	24,14	0,92	1,99	2,87
		52,32	100,92	150,61	8,02	15,80	27,96	0,89	1,73	3,16
		52,85	99,21	156,51	6,38	17,34	27,28	1,06	2,11	2,98
		52,53	99,06	155,84	8,34	18,04	29,91	0,84	1,83	3,26
	Povprečje	51,89	101,63	153,45	7,73	16,74	27,44	0,94	1,87	3,09
	s	0,96	2,22	2,92	0,92	1,05	2,00	0,08	0,16	0,14
	KV (%)	1,8	2,2	1,9	12,0	6,3	7,3	9,0	8,3	4,5
Dan 2		49,16	99,18	160,22	6,22	16,45	27,44	0,96	1,91	3,10
		46,62	104,78	151,18	10,89	19,74	27,72	0,94	1,90	2,75
		55,29	101,40	152,46	9,81	19,66	28,81	0,89	1,82	2,90
		48,45	103,74	156,12	7,60	19,35	27,06	0,94	2,10	2,95
		53,83	96,20	155,58	7,67	16,09	28,26	0,93	2,01	2,77
		51,93	101,88	157,40	9,29	20,70	26,31	0,96	1,91	2,84
	Povprečje	50,88	101,20	155,49	8,58	18,66	27,60	0,94	1,94	2,89
	s	3,36	3,12	3,29	1,71	1,91	0,88	0,02	0,10	0,13
	KV (%)	6,6	3,1	2,1	20,0	10,2	3,2	2,5	5,0	4,5
Dan 3		48,13	101,35	159,70	6,96	18,13	30,11	1,15	2,06	2,87
		47,86	99,73	156,24	10,49	16,82	24,93	1,00	1,88	2,86
		46,86	102,79	154,02	10,83	17,00	27,23	0,84	1,76	2,87
		51,22	101,95	156,73	8,35	18,62	24,20	1,01	2,01	2,98
		50,83	100,88	152,13	8,48	16,10	26,98	1,01	1,99	2,84
		52,79	101,93	159,09	8,71	15,60	28,72	1,02	1,97	2,80
	Povprečje	49,61	101,44	156,32	8,97	17,05	27,03	1,00	1,94	2,87
	s	2,32	1,06	2,90	1,45	1,16	2,23	0,10	0,11	0,06
	KV (%)	4,7	1,0	1,9	16,1	6,8	8,2	9,8	5,6	2,2
Skupno	Povprečje	50,79	101,42	155,09	8,43	17,48	27,36	0,96	1,92	2,95
	s	2,47	2,16	3,12	1,42	1,60	1,71	0,08	0,12	0,15
	KV (%)	4,9	2,1	2,0	16,9	9,1	6,3	8,2	6,3	5,1

Tabela 50: Ponovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v krvni plazmi

		St. dodatek (µg FLU-OH/kg)			St. dodatek (µg KPF/kg)			St. dodatek (µg MLX/kg)		
		1	2	3	10	20	30	5	10	15
Dan 1		1,08	1,88	3,29	11,71	19,95	33,40	5,08	9,77	15,02
		0,96	2,10	3,36	10,03	20,04	32,30	4,44	8,97	15,30
		1,01	2,39	3,55	9,48	21,23	31,81	4,19	9,75	15,02
		1,31	1,96	3,23	10,48	21,61	33,41	4,19	9,81	15,54
		0,95	2,27	3,44	11,21	20,91	30,55	4,65	9,73	15,02
		0,86	2,23	3,53	10,57	21,30	33,76	4,68	10,02	15,66
	Povprečje	1,03	2,14	3,40	10,58	20,84	32,54	4,54	9,68	15,26
	s	0,15	0,20	0,13	0,80	0,69	1,23	0,34	0,36	0,29
	KV (%)	15,1	9,1	3,8	7,6	3,3	3,8	7,5	3,7	1,9
Dan 2		1,03	2,35	3,63	12,21	23,36	36,12	4,84	10,15	14,08
		1,15	2,30	3,31	11,13	23,79	34,14	4,64	10,68	15,71
		0,97	2,37	3,54	11,93	23,14	34,21	4,93	10,45	14,21
		1,43	2,19	3,23	11,68	23,18	33,67	4,41	9,57	15,39
		1,07	2,19	3,51	10,57	24,96	29,00	5,19	10,16	14,26
		1,42	2,48	3,43	11,78	23,42	34,42	4,98	10,14	13,74
	Povprečje	1,18	2,31	3,44	11,55	23,64	33,59	4,83	10,19	14,56
	s	0,20	0,11	0,15	0,60	0,69	2,40	0,27	0,37	0,79
	KV (%)	17,0	4,8	4,4	5,2	2,9	7,1	5,7	3,7	5,4
Dan 3		1,22	2,57	3,65	8,42	19,51	29,17	5,01	8,94	13,46
		1,13	2,13	3,09	10,30	21,81	31,85	4,90	9,45	13,73
		1,08	1,98	3,46	10,37	18,68	31,60	5,26	9,21	14,80
		1,12	2,33	3,24	9,92	19,36	30,27	5,15	10,37	14,04
		0,93	2,15	3,82	9,69	20,93	32,39	4,61	8,93	14,07
		1,02	2,07	3,45	10,52	20,87	31,57	4,86	9,45	13,75
	Povprečje	1,08	2,21	3,45	9,87	20,19	31,14	4,96	9,39	13,97
	s	0,10	0,21	0,26	0,77	1,19	1,19	0,23	0,53	0,46
	KV (%)	9,0	9,6	7,6	7,8	5,9	3,8	4,6	5,7	3,3
Skupno	Povprečje	1,10	2,22	3,43	10,67	21,56	32,42	4,78	9,75	14,60
	s	0,16	0,18	0,18	0,99	1,75	1,90	0,32	0,53	0,75
	KV (%)	14,6	8,3	5,3	9,2	8,1	5,9	6,8	5,4	5,1

Tabela 51: Ponovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v krvni plazmi

	St. dodatek (µg OBZ/kg)			St. dodatek (µg PBZ/kg)			St. dodatek (µg TFA/kg)		
	20	40	60	20	40	60	20	40	60
Dan 1	23,81	41,48	61,76	21,29	35,47	51,72	17,20	34,83	55,93
	23,65	42,20	60,61	21,60	37,83	49,56	17,26	35,81	53,72
	23,48	41,54	61,48	20,99	35,16	49,88	16,91	35,28	56,76
	23,27	42,03	61,26	21,98	36,70	50,91	17,89	36,06	52,07
	23,56	41,97	61,67	21,53	36,64	50,79	18,96	36,78	54,71
	23,49	40,99	60,94	21,89	35,85	50,51	18,15	35,83	57,94
	Povprečje	23,54	41,70	61,29	21,55	36,27	50,56	17,73	35,77
	s	0,18	0,45	0,45	0,37	0,98	0,77	0,76	2,13
	KV (%)	0,8	1,1	0,7	1,7	2,7	1,5	4,3	3,9
Dan 2	27,19	43,48	60,16	21,57	36,09	53,29	17,73	36,58	54,94
	27,48	42,38	61,59	22,47	34,58	54,90	17,27	35,87	53,37
	27,74	47,47	57,54	22,65	37,65	54,62	18,31	36,45	53,61
	27,67	44,24	61,97	21,78	38,03	51,90	18,05	34,75	53,91
	26,21	42,40	60,43	20,72	37,17	54,04	19,30	34,67	54,28
	27,69	42,08	59,40	19,77	35,61	53,60	17,88	35,12	50,79
	Povprečje	27,33	43,68	60,18	21,49	36,52	53,73	18,09	35,57
	s	0,58	2,03	1,60	1,09	1,32	1,08	0,69	1,43
	KV (%)	2,1	4,6	2,7	5,1	3,6	2,0	3,8	2,4
Dan 3	23,18	40,48	63,64	20,90	38,15	56,98	17,82	35,45	55,46
	23,61	41,74	63,77	21,78	37,38	57,07	18,45	34,32	53,83
	24,03	41,84	64,85	22,63	36,90	54,76	17,56	35,85	56,00
	24,98	40,70	63,29	20,37	35,94	57,12	17,28	35,40	55,69
	23,51	41,31	65,25	22,40	37,36	55,77	18,40	35,12	57,11
	25,12	41,83	64,55	20,91	35,87	54,62	17,79	33,94	53,29
	Povprečje	24,07	41,32	64,23	21,50	36,93	56,05	17,88	35,01
	s	0,81	0,60	0,77	0,91	0,89	1,17	0,46	0,73
	KV (%)	3,4	1,5	1,2	4,2	2,4	2,1	2,6	2,1
Skupno	Povprečje	24,98	42,23	61,90	21,51	36,58	53,45	17,90	35,45
	s	1,81	1,58	2,02	0,80	1,05	2,51	0,63	0,78
	KV (%)	7,2	3,8	3,3	3,7	2,9	4,7	3,5	2,2

Tabela 52: Obnovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v mleku

		St. dodatek (µg CPF/kg)			St. dodatek (µg DCL/kg)			St. dodatek (µg FLU/kg)		
		50	100	150	1	2	3	20	40	60
Analitik 1		40,29	67,11	142,35	0,78	2,06	4,14	15,86	31,59	47,08
		56,01	104,09	121,56	0,93	2,75	3,71	15,27	32,07	47,18
		65,25	100,46	113,76	0,93	3,62	3,93	14,72	31,85	46,35
		50,57	93,43	118,86	0,59	2,65	3,46	15,23	32,84	46,80
		40,90	102,51	106,89	0,80	2,19	3,97	14,91	32,42	46,23
		47,24	82,90	132,02	1,76	2,64	3,69	15,60	31,85	45,75
	Povprečje	50,04	91,75	122,57	0,97	2,65	3,82	15,27	32,10	46,56
	s	9,53	14,37	12,80	0,41	0,55	0,24	0,42	0,46	0,55
	KV (%)	19,0	15,7	10,4	42,3	20,7	6,4	2,7	1,4	1,2
Analitik 2		53,79	79,86	99,85	0,98	1,92	3,29	14,90	33,77	51,51
		55,05	95,23	113,12	0,95	1,94	2,55	14,67	31,75	48,33
		46,69	84,18	116,71	0,88	1,69	2,88	14,43	32,14	47,24
		38,09	58,42	96,61	0,79	1,94	3,11	14,50	31,72	50,18
		37,88	80,50	135,57	0,66	1,95	2,55	15,23	32,98	49,51
		41,93	71,85	117,45	0,77	1,95	2,54	14,73	34,13	51,03
	Povprečje	45,57	78,34	113,22	0,84	1,90	2,82	14,74	32,75	49,63
	s	7,58	12,37	14,03	0,12	0,10	0,33	0,29	1,04	1,63
	KV (%)	16,6	15,8	12,4	14,4	5,4	11,6	2,0	3,2	3,3
Analitik 3		38,21	110,14	117,23	1,53	2,61	3,08	13,94	35,07	53,75
		16,37	114,82	139,44	0,91	1,77	3,91	16,10	35,01	55,58
		35,27	79,07	182,18	2,17	3,20	2,72	18,22	34,41	58,49
		44,96	102,86	147,31	1,07	2,14	3,21	17,43	34,34	58,52
		38,33	77,62	141,07	0,98	2,41	2,31	16,62	38,02	58,17
		63,97	88,73	134,82	2,71	1,66	2,85	16,75	36,12	56,64
	Povprečje	39,52	95,54	143,67	1,56	2,30	3,01	16,51	35,50	56,86
	s	15,39	15,98	21,44	0,74	0,57	0,54	1,46	1,39	1,92
	KV (%)	38,9	16,7	14,9	47,1	25,0	17,9	8,8	3,9	3,4
Skupno	Povprečje	45,04	88,54	126,49	1,12	2,28	3,22	15,51	33,45	51,02
	s	11,53	15,44	20,32	0,56	0,54	0,58	1,13	1,80	4,65
	KV (%)	25,6	17,4	16,1	50,2	23,5	17,9	7,3	5,4	9,1

Tabela 53: Obnovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v mleku

		St. dodatek (µg FLU-OH/kg)			St. dodatek (µg KPF/kg)			St. dodatek (µg MLX/kg)		
		20	40	60	1	2	3	7,5	15	22,5
Analitik 1		14,07	29,47	45,00	0,51	2,10	3,03	4,58	11,35	18,05
		14,62	30,04	44,16	0,68	1,67	2,86	4,99	11,86	17,16
		14,06	29,35	44,39	0,28	2,10	2,54	4,93	11,39	19,33
		15,07	31,25	44,41	0,68	2,14	2,59	5,07	12,15	19,21
		14,67	30,20	43,91	0,36	1,54	2,69	5,33	12,92	18,21
		14,11	29,89	42,07	0,42	1,35	3,75	5,29	11,84	18,38
	Povprečje	14,43	30,03	43,99	0,49	1,81	2,91	5,04	11,91	18,39
	s	0,42	0,68	1,01	0,17	0,34	0,45	0,27	0,58	0,80
	KV (%)	2,9	2,3	2,3	34,1	18,8	15,4	5,4	4,9	4,4
Analitik 2		16,76	40,06	60,71	0,52	1,15	2,70	4,77	11,75	22,34
		17,65	39,20	57,41	0,21	1,41	2,22	5,31	12,82	17,60
		18,02	37,61	58,13	0,24	1,34	1,78	5,06	11,99	19,94
		18,20	39,30	57,57	0,39	1,42	2,55	5,23	12,29	19,67
		19,33	39,42	57,92	0,37	1,59	2,71	5,06	12,82	20,66
		20,53	39,37	59,09	0,42	1,17	2,99	5,02	13,82	19,30
	Povprečje	18,42	39,16	58,47	0,36	1,35	2,49	5,08	12,58	19,92
	s	1,33	0,82	1,25	0,12	0,16	0,43	0,19	0,75	1,56
	KV (%)	7,2	2,1	2,1	32,0	12,2	17,2	3,7	5,9	7,8
Analitik 3		13,81	31,82	54,79	0,90	1,30	2,37	5,30	13,19	20,37
		13,98	35,07	52,19	0,80	1,61	2,48	5,06	13,27	20,15
		15,31	31,10	48,79	0,76	1,56	2,45	6,48	14,06	22,24
		16,45	35,23	52,27	0,96	1,59	1,96	6,83	13,25	22,27
		14,78	34,56	53,02	0,72	1,05	2,70	6,57	13,90	21,96
		15,41	30,73	51,48	0,98	1,17	2,02	6,63	13,22	19,99
	Povprečje	14,96	33,09	52,09	0,85	1,38	2,33	6,14	13,48	21,16
	s	0,99	2,09	1,97	0,11	0,24	0,29	0,76	0,39	1,10
	KV (%)	6,6	6,3	3,8	12,5	17,4	12,3	12,3	2,9	5,2
Skupno	Povprečje	15,94	34,09	51,52	0,57	1,51	2,58	5,42	12,66	19,82
	s	2,04	4,11	6,25	0,25	0,33	0,45	0,69	0,86	1,62
	KV (%)	12,8	12,0	12,1	43,7	21,7	17,3	12,8	6,8	8,2

Tabela 54: Obnovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v mleku

		St. dodatek (µg OBZ/kg)			St. dodatek (µg PBZ/kg)			St. dodatek (µg TFA/kg)		
		5	10	15	5	10	15	25	50	75
Analitik 1		3,13	4,87	8,57	3,73	8,10	11,80	20,29	38,73	57,41
		3,73	4,38	8,72	4,06	8,21	10,84	18,51	35,52	62,30
		2,80	5,37	8,39	3,28	7,15	9,84	19,62	37,28	58,55
		2,89	6,03	8,35	3,08	7,90	10,49	19,58	39,49	55,58
		3,11	5,53	8,71	3,21	8,28	10,62	19,57	40,35	56,42
		3,13	5,63	7,06	3,25	7,61	9,72	20,90	37,80	56,80
	Povprečje	3,13	5,30	8,30	3,44	7,88	10,55	19,75	38,20	57,84
	s	0,32	0,59	0,63	0,38	0,43	0,75	0,81	1,72	2,40
	KV (%)	10,3	11,1	7,5	11,0	5,4	7,1	4,1	4,5	4,1
Analitik 2		2,33	5,72	8,56	2,71	8,07	10,82	19,89	39,80	61,79
		2,54	6,25	7,98	3,62	7,38	11,22	21,37	40,65	63,91
		3,44	6,58	9,41	3,51	9,81	10,58	21,05	41,88	60,42
		2,83	6,34	9,35	2,77	7,97	11,37	21,22	39,14	56,37
		2,82	5,78	8,09	2,72	7,39	10,49	22,16	41,17	65,27
		2,94	5,93	8,01	3,51	7,92	10,47	20,20	44,88	67,63
	Povprečje	2,82	6,10	8,57	3,14	8,09	10,82	20,98	41,25	62,56
	s	0,38	0,34	0,66	0,45	0,90	0,39	0,82	2,02	3,96
	KV (%)	13,4	5,6	7,7	14,3	11,1	3,6	3,9	4,9	6,3
Analitik 3		6,91	9,93	10,96	5,33	9,89	10,56	16,25	35,91	48,20
		6,83	9,97	10,66	3,63	5,12	8,21	14,56	30,22	48,42
		6,71	8,85	10,98	4,12	5,84	8,94	16,29	30,39	47,05
		6,92	10,28	12,92	5,96	7,63	11,55	15,24	32,72	48,77
		6,91	8,68	10,47	4,30	7,56	6,54	17,08	36,50	47,28
		6,37	8,05	10,22	3,51	5,92	8,27	18,38	32,62	51,81
	Povprečje	6,78	9,29	11,04	4,48	6,99	9,01	16,30	33,06	48,59
	s	0,21	0,89	0,97	0,97	1,74	1,80	1,35	2,66	1,71
	KV (%)	3,2	9,6	8,8	21,7	24,9	19,9	8,3	8,1	3,5
Skupno	Povprečje	4,24	6,90	9,30	3,68	7,65	10,13	19,01	37,50	56,33
	s	1,87	1,88	1,46	0,85	1,19	1,35	2,25	4,03	6,54
	KV (%)	44,1	27,2	15,7	23,1	15,6	13,4	11,9	10,8	11,6

Tabela 55: Obnovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v krvni plazmi

		St. dodatek (µg CPF/kg)			St. dodatek (µg DCL/kg)			St. dodatek (µg FLU/kg)		
		50	100	150	10	20	30	1	2	3
Analitik 1		50,90	102,97	151,50	8,45	16,60	26,55	0,89	1,85	3,15
		50,49	103,30	150,34	6,74	17,41	28,83	1,01	1,71	3,12
		52,26	104,29	155,91	8,44	15,29	24,14	0,92	1,99	2,87
		52,32	100,92	150,61	8,02	15,80	27,96	0,89	1,73	3,16
		52,85	99,21	156,51	6,38	17,34	27,28	1,06	2,11	2,98
		52,53	99,06	155,84	8,34	18,04	29,91	0,84	1,83	3,26
	Povprečje	51,89	101,63	153,45	7,73	16,74	27,44	0,94	1,87	3,09
	s	0,96	2,22	2,92	0,92	1,05	2,00	0,08	0,16	0,14
	KV (%)	1,8	2,2	1,9	12,0	6,3	7,3	9,0	8,3	4,5
Analitik 2		49,16	99,18	160,22	6,22	16,45	27,44	0,96	1,91	3,10
		46,62	104,78	151,18	10,89	19,74	27,72	0,94	1,90	2,75
		55,29	101,40	152,46	9,81	19,66	28,81	0,89	1,82	2,90
		48,45	103,74	156,12	7,60	19,35	27,06	0,94	2,10	2,95
		53,83	96,20	155,58	7,67	16,09	28,26	0,93	2,01	2,77
		51,93	101,88	157,40	9,29	20,70	26,31	0,96	1,91	2,84
	Povprečje	50,88	101,20	155,49	8,58	18,66	27,60	0,94	1,94	2,89
	s	3,36	3,12	3,29	1,71	1,91	0,88	0,02	0,10	0,13
	KV (%)	6,6	3,1	2,1	20,0	10,2	3,2	2,5	5,0	4,5
Analitik 3		57,77	107,80	157,26	9,46	17,86	31,27	1,12	2,21	3,26
		52,48	100,61	156,05	12,05	18,49	27,38	1,09	2,10	2,99
		49,50	101,61	159,65	8,47	16,26	25,81	0,96	2,15	3,16
		47,84	104,95	153,58	9,60	18,15	27,40	1,06	2,23	3,30
		53,05	110,93	155,38	9,31	18,40	30,66	1,08	2,00	2,64
		61,46	104,01	150,40	7,18	20,07	29,85	1,02	2,08	2,99
	Povprečje	53,68	104,98	155,39	9,34	18,20	28,73	1,05	2,13	3,06
	s	5,11	3,87	3,17	1,60	1,23	2,17	0,06	0,09	0,24
	KV (%)	9,5	3,7	2,0	17,1	6,7	7,5	5,2	4,0	8,0
Skupno	Povprečje	52,15	102,60	154,78	8,55	17,87	27,92	0,98	1,98	3,01
	s	3,56	3,43	3,10	1,53	1,60	1,77	0,08	0,16	0,19
	KV (%)	6,8	3,3	2,0	17,9	8,9	6,3	8,2	7,9	6,4

Tabela 56: Obnovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v krvni plazmi

		St. dodatek (µg FLU-OH/kg)			St. dodatek (µg KPF/kg)			St. dodatek (µg MLX/kg)		
		1	2	3	10	20	30	5	10	15
Analitik 1		1,08	1,88	3,29	11,71	19,95	33,40	5,08	9,77	15,02
		0,96	2,10	3,36	10,03	20,04	32,30	4,44	8,97	15,30
		1,01	2,39	3,55	9,48	21,23	31,81	4,19	9,75	15,02
		1,31	1,96	3,23	10,48	21,61	33,41	4,19	9,81	15,54
		0,95	2,27	3,44	11,21	20,91	30,55	4,65	9,73	15,02
		0,86	2,23	3,53	10,57	21,30	33,76	4,68	10,02	15,66
	Povprečje	1,03	2,14	3,40	10,58	20,84	32,54	4,54	9,68	15,26
	s	0,15	0,20	0,13	0,80	0,69	1,23	0,34	0,36	0,29
	KV (%)	15,1	9,1	3,8	7,6	3,3	3,8	7,5	3,7	1,9
Analitik 2		1,03	2,35	3,63	12,21	23,36	36,12	4,84	10,15	14,08
		1,15	2,30	3,31	11,13	23,79	34,14	4,64	10,68	15,71
		0,97	2,37	3,54	11,93	23,14	34,21	4,93	10,45	14,21
		1,43	2,19	3,23	11,68	23,18	33,67	4,41	9,57	15,39
		1,07	2,19	3,51	10,57	24,96	29,00	5,19	10,16	14,26
		1,42	2,48	3,43	11,78	23,42	34,42	4,98	10,14	13,74
	Povprečje	1,18	2,31	3,44	11,55	23,64	33,59	4,83	10,19	14,56
	s	0,20	0,11	0,15	0,60	0,69	2,40	0,27	0,37	0,79
	KV (%)	17,0	4,8	4,4	5,2	2,9	7,1	5,7	3,7	5,4
Analitik 3		1,28	2,26	3,93	10,55	20,22	30,46	5,11	10,81	17,68
		1,09	2,16	3,51	10,10	21,42	33,13	5,43	11,29	17,68
		1,26	2,56	3,51	10,74	22,85	30,51	5,62	10,98	17,75
		1,20	2,52	3,58	9,32	23,69	33,98	5,77	11,41	17,31
		1,22	2,50	3,88	11,43	20,79	33,62	5,80	11,59	15,55
		1,10	2,46	3,58	11,22	20,79	32,11	5,28	11,78	17,21
	Povprečje	1,19	2,41	3,67	10,56	21,63	32,30	5,50	11,31	17,20
	s	0,08	0,16	0,19	0,77	1,35	1,54	0,27	0,36	0,84
	KV (%)	6,5	6,6	5,2	7,3	6,3	4,8	5,0	3,2	4,9
Skupno	Povprečje	1,13	2,29	3,50	10,90	22,03	32,81	4,96	10,39	15,67
	s	0,16	0,19	0,19	0,83	1,51	1,78	0,50	0,78	1,31
	KV (%)	14,3	8,3	5,5	7,6	6,9	5,4	10,1	7,5	8,4

Tabela 57: Obnovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v krvni plazmi

		St. dodatek (µg OBZ/kg)			St. dodatek (µg PBZ/kg)			St. dodatek (µg TFA/kg)		
		20	40	60	20	40	60	20	40	60
Analitik 1		23,81	41,48	61,76	21,29	35,47	51,72	17,20	34,83	55,93
		23,65	42,20	60,61	21,60	37,83	49,56	17,26	35,81	53,72
		23,48	41,54	61,48	20,99	35,16	49,88	16,91	35,28	56,76
		23,27	42,03	61,26	21,98	36,70	50,91	17,89	36,06	52,07
		23,56	41,97	61,67	21,53	36,64	50,79	18,96	36,78	54,71
		23,49	40,99	60,94	21,89	35,85	50,51	18,15	35,83	57,94
	Povprečje	23,54	41,70	61,29	21,55	36,27	50,56	17,73	35,77	55,19
	s	0,18	0,45	0,45	0,37	0,98	0,77	0,76	0,67	2,13
	KV (%)	0,8	1,1	0,7	1,7	2,7	1,5	4,3	1,9	3,9
Analitik 2		27,19	43,48	60,16	21,57	36,09	53,29	17,73	36,58	54,94
		27,48	42,38	61,59	22,47	34,58	54,90	17,27	35,87	53,37
		27,74	47,47	57,54	22,65	37,65	54,62	18,31	36,45	53,61
		27,67	44,24	61,97	21,78	38,03	51,90	18,05	34,75	53,91
		26,21	42,40	60,43	20,72	37,17	54,04	19,30	34,67	54,28
		27,69	42,08	59,40	19,77	35,61	53,60	17,88	35,12	50,79
	Povprečje	27,33	43,68	60,18	21,49	36,52	53,73	18,09	35,57	53,48
	s	0,58	2,03	1,60	1,09	1,32	1,08	0,69	0,84	1,43
	KV (%)	2,1	4,6	2,7	5,1	3,6	2,0	3,8	2,4	2,7
Analitik 3		20,43	32,91	51,10	21,42	41,36	54,97	19,61	34,54	58,54
		20,45	35,57	56,64	27,02	42,81	58,94	19,27	34,29	55,67
		17,61	38,06	59,76	27,73	42,81	54,36	18,08	35,38	56,93
		19,94	35,38	56,06	21,15	33,37	58,94	18,31	35,98	56,10
		20,83	35,79	65,73	21,96	45,46	55,23	18,69	34,58	57,86
		21,99	31,04	52,13	23,11	47,57	54,67	18,77	33,67	54,53
	Povprečje	20,21	34,79	56,90	23,73	42,23	56,19	18,79	34,74	56,60
	s	1,45	2,46	5,35	2,91	4,88	2,15	0,57	0,82	1,47
	KV (%)	7,2	7,1	9,4	12,3	11,5	3,8	3,1	2,4	2,6
Skupno	Povprečje	23,69	40,06	59,46	22,26	38,34	53,49	18,20	35,36	55,09
	s	3,11	4,29	3,59	2,01	3,98	2,74	0,78	0,87	2,07
	KV (%)	13,1	10,7	6,0	9,0	10,4	5,1	4,3	2,4	3,8

Tabela 58: Meje vrednotenja (LOQ) za analizno metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi

	LOQ (µg/kg)	
	mleko	plazma
karprofen	50	50
diklofenak	2	10
fluniksin	1	1
5-hidroksi-fluniksin	1	1
ketoprofen	2	10
meloksikam	1	5
oksifenbutazon	5	20
fenilbutazon	5	20
tolfenamska kislina	5	20

Tabela 59: Ugotovljene koncentracije ($\mu\text{g/kg}$) za vrednotenje meje odločitve ($\text{CC}\alpha$) za analizno metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku

	CPF	DCL	FLU	FLU-OH	KPF	MLX	OBZ	PBZ	TFA
MRL/LOQ	50	2	40	40	2	15	5	5	50
	40,29	2,06	31,59	29,47	2,10	11,35	3,13	3,73	38,73
	56,01	2,75	32,07	30,04	1,67	11,86	3,73	4,06	35,52
	65,25	3,62	31,85	29,35	2,10	11,39	2,80	3,28	37,28
	50,57	2,65	32,84	31,25	2,14	12,15	2,89	3,08	39,49
	40,90	2,19	32,42	30,20	1,54	12,92	3,11	3,21	40,35
	47,24	2,64	31,85	29,89	1,35	11,84	3,13	3,25	37,80
	53,79	1,92	33,77	40,06	1,15	11,75	2,33	2,71	39,80
	55,05	1,94	31,75	39,20	1,41	12,82	2,54	3,62	40,65
	46,69	1,69	32,14	37,61	1,34	11,99	3,44	3,51	41,88
	38,09	1,94	31,72	39,30	1,42	12,29	2,83	2,77	39,14
	37,88	1,95	32,98	39,42	1,59	12,82	2,82	2,72	41,17
	41,93	1,95	34,13	39,37	1,17	13,82	2,94	3,51	44,88
	28,23	0,87	39,88	39,39	1,69	13,99	3,92	2,78	45,47
	44,79	1,34	35,81	35,68	1,66	12,46	3,99	5,86	43,39
	50,67	2,00	39,40	38,39	1,70	13,63	4,41	5,29	44,89
	39,32	1,58	34,94	34,33	1,58	12,79	2,95	5,04	43,67
	46,86	1,78	37,11	36,80	1,75	12,53	2,73	4,53	42,50
	34,09	1,21	42,50	40,86	1,93	14,78	3,12	3,35	49,53
	45,47	2,14	39,20	32,84	1,94	13,38	4,32	3,13	47,24
	49,53	1,70	34,33	39,88	2,00	12,29	3,62	3,92	44,79
s	8,51	0,60	3,30	4,27	0,30	0,91	0,58	0,89	3,57
CCα	63,96	2,98	45,41	47,00	2,50	16,49	5,96	6,46	55,86

CPF – karprofen; DCL – diklofenak; FLU – fluniksin; FLU-OH – 5-hidroksi-fluniksin; KPF – ketoprofen; MLX – meloksikam; OBZ – oksifenbutazon; PBZ – fenilbutazon; TFA – tolfenamska kislina; MRL – najvišja dovoljena vsebnost ostankov; LOQ – meja vrednotenja; s – standardni odmik; CC α – meja odločitve

Tabela 60: Ugotovljene koncentracije ($\mu\text{g/kg}$) za vrednotenje meje odločitve ($\text{CC}\alpha$) za analizno metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi

	CPF	DCL	FLU	FLU-OH	KPF	MLX	OBZ	PBZ	TFA
LOQ	50	10	1	1	10	5	20	20	20
	43,04	7,17	1,05	1,20	10,65	4,82	24,75	25,77	15,43
	56,46	9,80	1,05	1,23	9,67	4,94	25,76	25,73	19,50
	52,88	10,28	1,01	1,35	8,99	5,03	29,98	22,78	17,04
	55,91	8,15	1,07	1,12	10,45	5,08	31,12	15,46	16,97
	48,15	8,92	1,12	1,25	10,81	4,28	26,25	13,31	19,27
	46,80	9,43	0,99	1,37	10,94	5,11	25,53	18,99	20,90
	58,43	7,11	1,07	1,16	10,76	5,60	24,12	20,77	21,16
	40,75	8,61	1,00	1,06	10,45	4,80	21,54	17,84	19,20
	52,86	11,71	0,99	1,34	10,71	4,90	19,83	18,51	17,59
	63,53	11,83	1,07	1,15	11,09	5,03	25,88	19,38	22,05
	58,31	10,14	1,06	1,10	10,88	4,48	26,25	23,06	18,50
	54,62	9,22	0,92	1,29	10,49	5,08	29,50	18,31	17,09
	42,88	9,11	0,97	1,10	10,18	4,30	20,08	18,51	16,72
	60,21	8,35	1,01	1,34	9,50	4,72	26,36	18,43	19,23
	48,95	9,20	1,08	1,25	10,00	5,34	22,15	17,61	17,67
	49,56	8,92	0,92	1,23	10,00	4,26	25,28	17,18	15,89
	40,28	8,84	0,94	0,97	9,26	4,09	26,45	25,57	14,17
	40,90	6,81	0,84	0,96	9,44	4,76	24,55	21,33	15,19
	49,67	6,32	0,89	1,12	10,91	4,85	23,10	22,78	18,30
	58,37	7,94	0,95	0,96	11,44	4,79	25,58	23,48	16,56
s	7,12	1,46	0,07	0,13	0,67	0,38	2,96	3,48	2,08
CCα	61,68	12,39	1,12	1,21	11,11	5,62	24,85	25,71	23,41

CPF – karprofen; DCL – diklofenak; FLU – fluniksin; FLU-OH – 5-hidroksi-fluniksin; KPF – ketoprofen; MLX – meloksikam; OBZ – oksifenbutazon; PBZ – fenilbutazon; TFA – tolfenamska kislina; LOQ – meja vrednotenja; s – standardni odmik; CC α – meja odločitve

Tabela 61: Ugotovljene koncentracije ($\mu\text{g/kg}$) za vrednotenje sposobnosti določitve ($CC\beta$) za analizno metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku

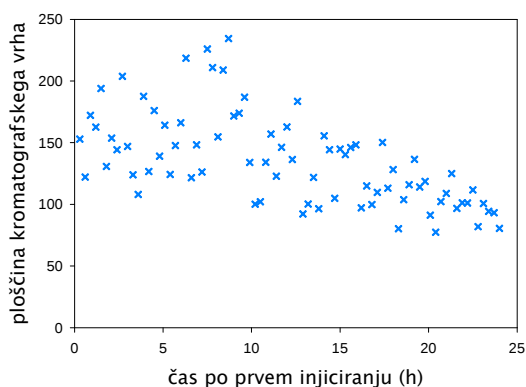
	CPF	DCL	FLU	FLU-OH	KPF	MLX	OBZ	PBZ	TFA
$CC\alpha$	63,96	2,98	45,41	47,00	2,50	16,49	5,96	6,46	55,86
	40,15	2,07	38,80	37,81	2,00	15,03	3,85	3,94	46,82
	36,12	1,83	43,93	38,53	2,07	15,24	4,37	4,81	43,99
	46,00	1,53	43,82	41,70	2,25	15,64	4,87	5,01	49,90
	31,27	2,36	44,75	41,75	2,21	15,82	4,70	5,38	51,64
	37,08	1,93	44,82	40,78	1,96	15,55	5,45	4,15	46,85
	58,33	2,45	45,35	35,92	1,95	16,02	4,34	5,00	43,66
	45,52	2,63	44,10	40,97	1,53	13,86	3,69	3,97	52,31
	57,26	2,41	46,19	37,63	1,50	14,91	4,04	5,95	52,88
	30,33	1,44	42,99	40,83	1,56	14,72	3,47	5,00	45,94
	41,55	1,98	42,25	40,17	2,49	15,40	4,08	4,68	45,13
	64,64	2,59	44,17	39,98	1,62	15,39	4,68	3,74	45,24
	45,62	2,29	48,26	44,13	2,22	16,92	4,32	6,21	44,47
	41,64	1,86	49,24	43,08	2,08	16,91	4,35	5,13	50,61
	63,15	2,29	47,88	44,00	2,55	17,05	5,29	5,57	49,92
	63,80	1,93	43,35	40,33	1,71	16,12	5,79	3,11	50,15
	48,09	1,86	40,99	41,40	2,32	16,04	4,41	3,59	51,78
	52,03	1,86	41,30	42,32	1,99	15,78	4,85	3,56	51,30
	49,98	1,32	34,54	40,44	1,79	15,38	4,52	2,76	43,77
	40,73	1,95	34,42	41,12	2,07	14,39	4,81	4,51	45,22
	44,30	1,33	35,24	38,52	2,28	13,74	5,31	7,91	38,76
s	10,32	0,39	4,27	2,11	0,31	0,91	0,60	1,19	3,81
$CC\beta$	80,88	3,63	52,42	50,46	3,00	17,99	6,94	8,41	62,11

CPF – karprofen; DCL – diklofenak; FLU – fluniksin; FLU-OH – 5-hidroksi-fluniksin; KPF – ketoprofen; MLX – meloksikam; OBZ – oksifenbutazon; PBZ – fenilbutazon; TFA – tolfenamska kislina; MRL – najvišja dovoljena vsebnost ostankov; s – standardni odmik; $CC\alpha$ – meja odločitve; $CC\beta$ – sposobnost določitve

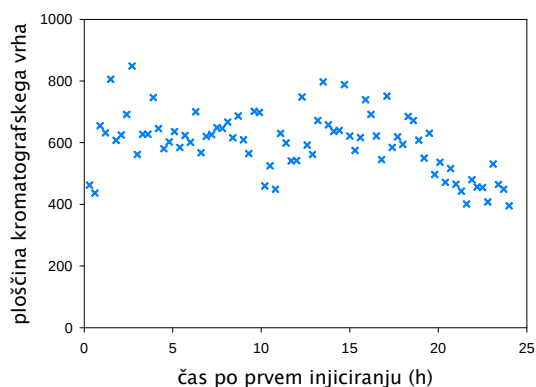
Tabela 62: Ugotovljene koncentracije ($\mu\text{g/kg}$) za vrednotenje sposobnosti določitve ($\text{CC}\beta$) za analizno metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi

	CPF	DCL	FLU	FLU-OH	KPF	MLX	OBZ	PBZ	TFA
CCα	61,68	12,39	1,12	1,21	11,11	5,62	24,85	25,71	23,41
	60,70	8,62	1,01	1,10	9,72	6,03	21,06	16,09	18,66
	61,10	10,67	1,13	1,36	11,97	6,18	28,99	22,86	19,24
	70,41	10,67	0,91	1,30	11,80	5,71	26,58	27,30	18,38
	68,00	10,97	1,08	1,39	9,33	5,92	28,46	30,62	18,50
	64,51	10,36	0,94	1,50	9,91	6,08	26,21	26,80	19,96
	58,21	10,93	0,84	1,45	11,32	6,65	28,10	30,25	19,32
	48,42	10,60	1,02	1,11	9,28	5,72	26,04	20,83	18,84
	66,18	9,79	0,97	1,14	9,54	6,15	26,68	33,96	18,52
	47,48	10,14	0,99	1,14	11,20	6,11	25,89	29,17	18,76
	66,67	10,70	0,92	1,05	10,01	6,31	32,79	30,62	17,58
	81,03	10,48	0,95	1,18	11,04	5,79	27,10	20,84	18,47
	41,56	11,20	0,98	1,10	9,77	5,01	28,53	23,90	19,08
	60,39	10,50	1,05	1,32	9,27	6,11	28,35	25,60	18,68
	42,33	10,06	0,93	1,16	10,72	5,69	30,09	27,60	18,56
	52,67	10,26	0,96	1,34	10,70	5,90	33,14	24,75	18,30
	59,14	9,36	0,88	1,17	9,48	5,99	28,13	26,37	18,50
	59,02	10,21	0,95	1,29	10,46	5,68	29,47	26,30	18,24
	66,04	9,94	0,89	1,19	9,86	5,70	26,04	26,69	18,36
	58,18	9,54	0,80	1,14	10,09	5,82	30,37	24,97	18,38
	39,71	10,60	0,90	1,26	9,90	5,25	28,42	19,79	18,29
s	10,59	0,61	0,08	0,13	0,84	0,36	2,63	4,27	0,49
CCβ	79,05	13,39	1,25	1,42	12,48	6,21	29,16	32,70	24,22

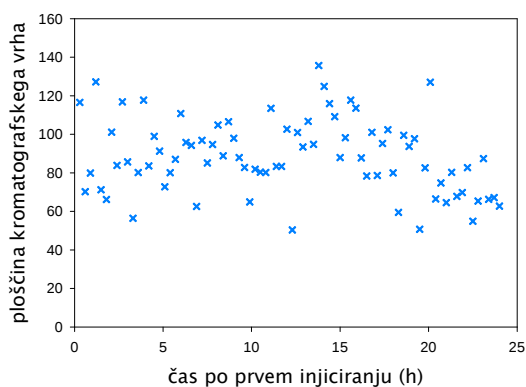
CPF – karprofen; DCL – diklofenak; FLU – fluniksin; FLU-OH – 5-hidroksi-fluniksin; KPF – ketoprofen; MLX – meloksikam; OBZ – oksifenbutazon; PBZ – fenilbutazon; TFA – tolfenamska kislina; s – standardni odmik; CC α – meja odločitve; CC β – sposobnost določitve



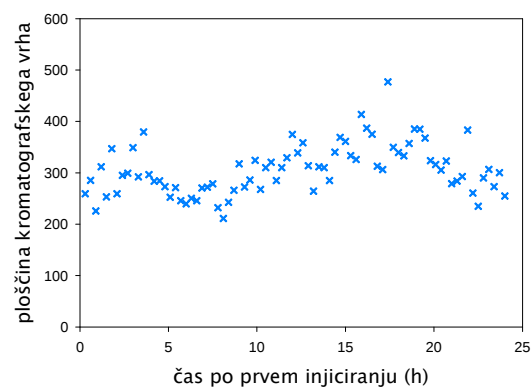
Graf 54: Stabilnost karprofena koncentracije 50 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



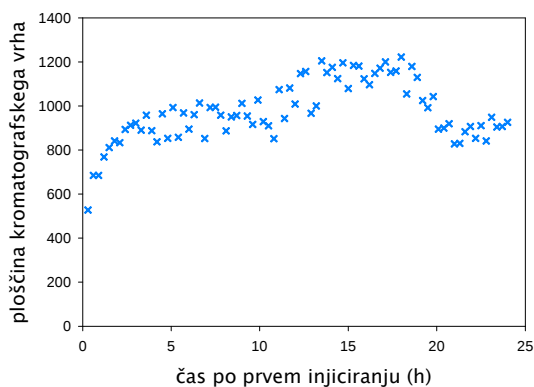
Graf 57: Stabilnost 5-hidroksi-fluniksina koncentracije 1 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



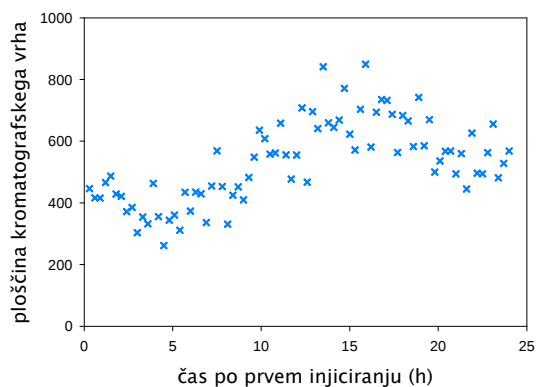
Graf 55: Stabilnost diklofenaka koncentracije 2 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



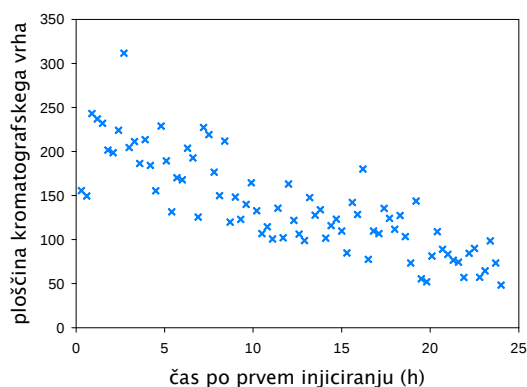
Graf 58: Stabilnost ketoprofena koncentracije 2 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



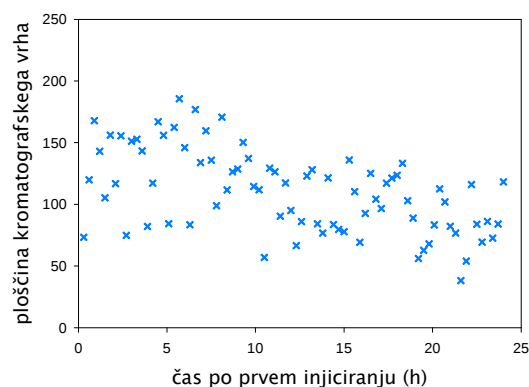
Graf 56: Stabilnost fluniksina koncentracije 1 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



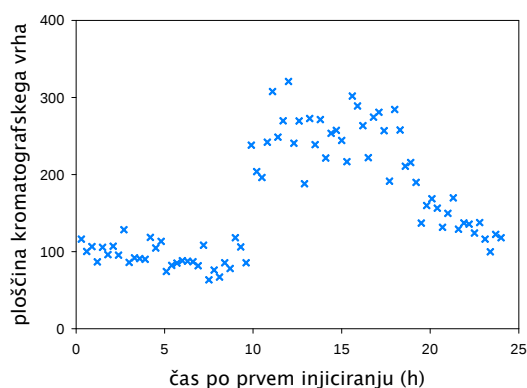
Graf 59: Stabilnost meloksikama koncentracije 1 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



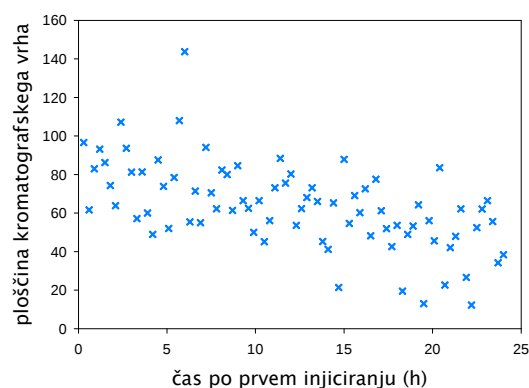
Graf 60: Stabilnost oksifenbutazona koncentracije 5 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



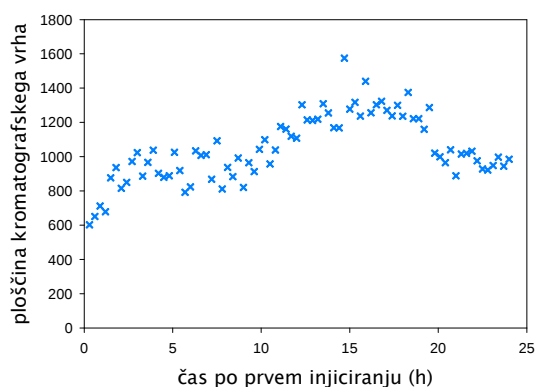
Graf 63: Stabilnost karprofena koncentracije 50 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



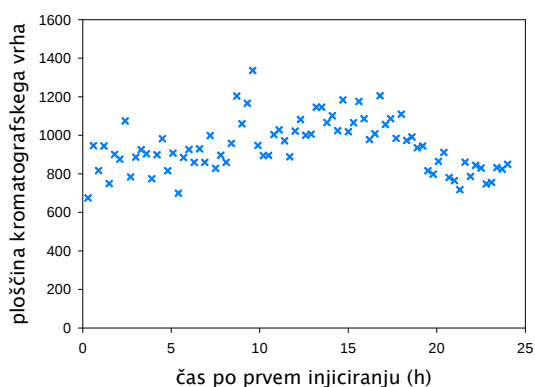
Graf 61: Stabilnost fenilbutazona koncentracije 5 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



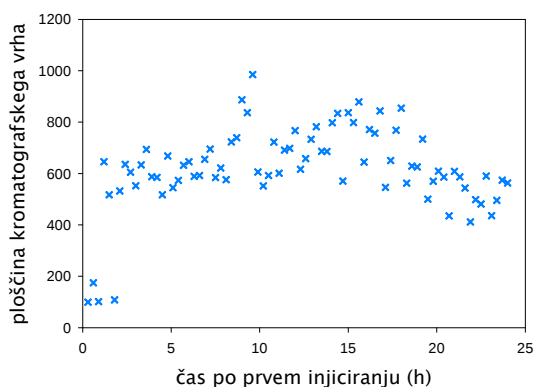
Graf 64: Stabilnost diklofenaka koncentracije 2 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



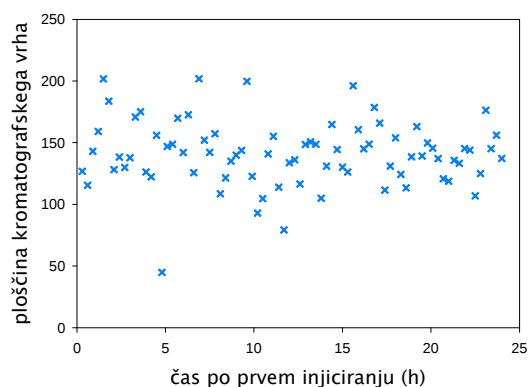
Graf 62: Stabilnost tolifenamske kisline koncentracije 5 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



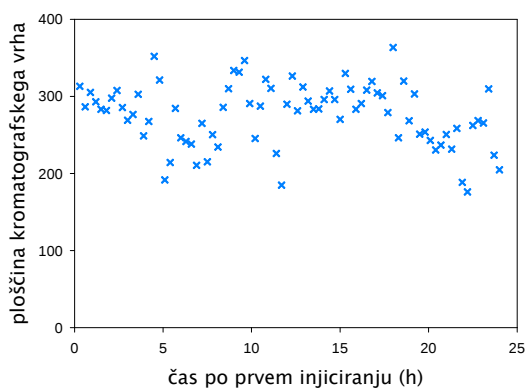
Graf 65: Stabilnost fluniksina koncentracije 1 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



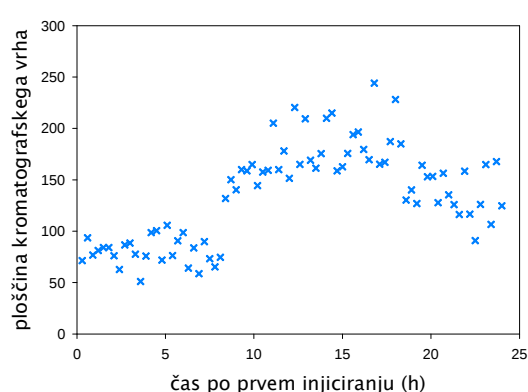
Graf 66: Stabilnost 5-hidroksi-fluniksina koncentracije 1 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



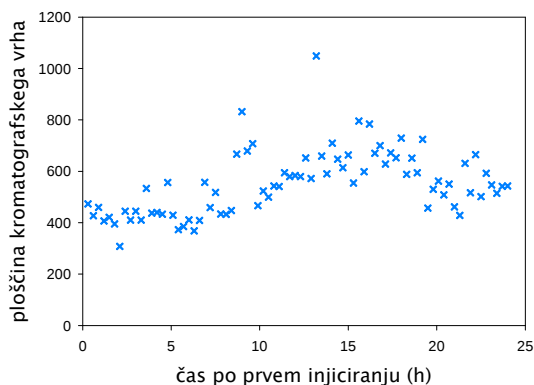
Graf 69: Stabilnost oksifenbutazona koncentracije 5 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



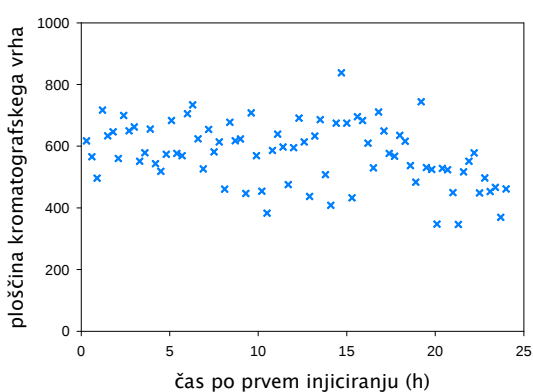
Graf 67: Stabilnost ketoprofena koncentracije 2 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



Graf 70: Stabilnost fenilbutazona koncentracije 5 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



Graf 68: Stabilnost meloksikama koncentracije 1 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov



Graf 71: Stabilnost tolfenamske kisline koncentracije 5 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov

Tabela 63: Robustnost analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku, ovrednotena s Studentovim t-testom glede na statistično značilne razlike med populacijami vzorcev, hidroliziranih pri različnih pogojih

	t_{teor}	t_{izr}			
		37 °C 45 min	37 °C 75 min	34 °C 60 min	40 °C 60 min
karprofen	2,228	2,151	-0,413	0,335	0,515
diklofenak	2,228	1,164	0,358	0,523	-0,217
fluniksin	2,228	0,069	-1,064	-2,661	-4,235
5-hidroksi-fluniksin	2,228	0,886	-0,439	-1,602	-0,372
ketoprofen	2,228	1,029	0,276	-0,308	1,803
meloksikam	2,228	-0,724	0,192	0,448	0,958
oksifenbutazon	2,228	-1,375	1,283	1,158	8,489
fenilbutazon	2,228	0,507	1,613	0,585	2,121
tolfenamska kislina	2,228	0,212	0,638	1,026	-0,023

t_{teor} – vrednost za statistično verjetnost, pri kateri lahko s 95 % verjetnostjo trdimo (pri 10 prostostnih stopnjah, dvostranski t-test), da se populaciji (poskus pri 37 °C in 60 minut in eden od poskusov v tabeli) ne razlikujeta (ničelna hipoteza); t_{izr} – izračunana vrednost. Če velja $-t_{\text{teor}} < t_{\text{izr}} < +t_{\text{teor}}$, potem ničelna hipoteza drži (s prej navedeno verjetnostjo). Če zgornji izraz ne velja (v tabeli označeno z modrim ozadjem), potem ničelna hipoteza za izbrani analit v izbrani populaciji (poskusu) ne drži

Tabela 64: Robustnost analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku, ovrednotena s Studentovim t-testom glede na statistično značilne razlike med populacijami vzorcev mleka različnih živalskih vrst, steriliziranega in pasteriziranega mleka

	t_{teor}	t_{izr}			
		Kozje mleko	Ovčje mleko	Steril. mleko	Paster. mleko
karprofen	4,303	-2,053	-1,097	-0,290	-1,690
diklofenak	4,303	0,490	0,916	0,261	-0,580
fluniksin	4,303	1,101	2,207	1,791	-0,350
5-hidroksi-fluniksin	4,303	-0,472	2,502	0,603	-0,710
ketoprofen	4,303	-0,500	-0,878	0,593	0,410
meloksikam	4,303	0,088	-1,582	-3,565	-3,181
oksifenbutazon	4,303	0,989	2,282	-5,550	-3,442
fenilbutazon	4,303	1,151	0,649	-1,132	-1,010
tolfenamska kislina	4,303	0,536	0,841	0,022	-0,034

t_{teor} – vrednost za statistično verjetnost, pri kateri lahko s 95 % verjetnostjo trdimo (pri 2 prostostnih stopnjah, dvostranski t-test), da se populaciji (poskus s surovim govejim mlekom in eden od poskusov v tabeli) ne razlikujeta (ničelna hipoteza); t_{izr} – izračunana vrednost. Če velja $-t_{\text{teor}} < t_{\text{izr}} < +t_{\text{teor}}$, potem ničelna hipoteza drži (s prej navedeno verjetnostjo). Če zgornji izraz ne velja (v tabeli označeno z modrim ozadjem), potem ničelna hipoteza za izbrani analit v izbrani populaciji (poskusu) ne drži

Tabela 65: Robustnost analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi, ovrednotena s Studentovim t-testom glede na statistično značilne razlike med populacijami vzorcev krvne plazme različnih živalskih vrst

	t_{teor}	t_{izr}			
		Konji	Kunci	Piščanci	Prašiči
karprofen	2,776	0,953	1,234	0,757	1,203
diklofenak	2,776	-0,048	-1,196	-0,484	-0,915
fluniksin	2,776	-0,274	-1,683	-0,508	-1,482
5-hidroksi-fluniksin	2,776	-7,016	-1,334	-1,685	-2,049
ketoprofen	2,776	0,474	-0,060	0,095	-0,406
meloksikam	2,776	-0,201	0,825	-0,294	-1,589
oksifenbutazon	2,776	0,518	0,370	-0,106	2,381
fenilbutazon	2,776	-1,247	-0,313	-2,644	-0,755
tolfenamska kislina	2,776	0,133	-3,187	-0,544	-2,159

t_{teor} – vrednost za statistično verjetnost, pri kateri lahko s 95 % verjetnostjo trdimo (pri 4 prostostnih stopnjah, dvostranski t-test), da se populaciji (poskus z govejo krvno plazmo in eden od poskusov v tabeli) ne razlikujeta (ničelna hipoteza); t_{izr} – izračunana vrednost. Če velja $-t_{\text{teor}} < t_{\text{izr}} < +t_{\text{teor}}$, potem ničelna hipoteza drži (s prej navedeno verjetnostjo). Če zgornji izraz ne velja (v tabeli označeno z rdečim ozadjem), potem ničelna hipoteza za izbrani analit v izbrani populaciji (poskusu) ne drži

Tabela 66: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – selektivnost

	Selektivnost	
	mleko	krvna plazma
vsí analiti	DA	

Tabela 67: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – specifičnost

Matriks		Specifičnost
karprofen	mleko	DA, proti diklofenaku, fluniksinu, 5-hidroksi-fluniksinu, ketopropenu, meloksikamu, oksifenbutazonu, fenilbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
diklofenak	mleko	DA, proti karprofenu, fluniksinu, 5-hidroksi-fluniksinu, ketopropenu, meloksikamu, oksifenbutazonu, fenilbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
fluniksin	mleko	DA, proti karprofenu, diklofenaku, 5-hidroksi-fluniksinu, ketopropenu, meloksikamu, oksifenbutazonu, fenilbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
5-hidroksi-fluniksin	mleko	DA, proti karprofenu, diklofenaku, fluniksinu, ketopropenu, meloksikamu, oksifenbutazonu, fenilbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
ketoprofen	mleko	DA, proti karprofenu, diklofenaku, fluniksinu, 5-hidroksi-fluniksinu, meloksikamu, oksifenbutazonu, fenilbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
meloksikam	mleko	DA, proti karprofenu, diklofenaku, fluniksinu, 5-hidroksi-fluniksinu, ketopropenu, oksifenbutazonu, fenilbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
oksifenbutazon	mleko	DA, proti karprofenu, diklofenaku, fluniksinu, 5-hidroksi-fluniksinu, ketopropenu, meloksikamu, fenilbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
fenilbutazon	mleko	DA, proti karprofenu, diklofenaku, fluniksinu, 5-hidroksi-fluniksinu, ketopropenu, meloksikamu, oksifenbutazonu in tolfenamski kislini
	krvna plazma	
tolfenamska kislina	mleko	DA, proti karprofenu, diklofenaku, fluniksinu, 5-hidroksi-fluniksinu, ketopropenu, meloksikamu, oksifenbutazonu in fenilbutazonu
	krvna plazma	

Tabela 68: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – linearnost

	Matriks	koncentracijsko območje (μg EPR B _{1a} /kg)	število kalibracij skih točk	regresija in korelacija		
				naklon	presečišče	korelacijski koeficient
karprofen	mleko	1000–25	8	1,80	–9,57	0,999
	krvna plazma	1000–25	8	3,68	–23,60	0,999
diklofenak	mleko	1000–0,5	15	51,22	526,17	0,997
	krvna plazma	200–2	9	22,18	–22,69	0,999
fluniksin	mleko	1000–0,1	17	767,64	8203,3	0,998
	krvna plazma	20–0,2	9	569,81	29,87	0,999
5–hidroksi–fluniksin	mleko	1000–0,1	17	693,21	1094,1	0,999
	krvna plazma	20–0,5	8	508,90	–102,96	0,999
ketoprofen	mleko	1000–0,5	15	188,91	780,49	0,999
	krvna plazma	100–2,5	8	92,50	396,11	0,999
meloksikam	mleko	1000–0,5	15	372,90	2681,3	0,999
	krvna plazma	100–0,75	10	240,06	–2,30	0,999
oksifenbutazon	mleko	1000–2,5	12	34,52	–40,91	0,999
	krvna plazma	200–15	6	13,47	35,58	0,999
fenilbutazon	mleko	1000–2,5	12	81,19	708,23	0,998
	krvna plazma	200–15	6	5,85	23,57	0,999
tolfenamska kislina	mleko	1000–2,5	12	181,63	3611,4	0,997
	krvna plazma	200–10	7	58,28	–85,91	0,999

Tabela 69: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – izkoristek (%)

	nivo 1		nivo 2		nivo 3	
	mleko	krvna plazma	mleko	krvna plazma	mleko	krvna plazma
karprofen	91	102	84	101	80	103
diklofenak	78	84	100	87	100	91
fluniksin	79	96	86	96	83	98
5–hidroksi–fluniksin	84	110	89	111	85	114
ketoprofen	60	107	81	108	89	108
meloksikam	71	96	84	98	85	97
oksifenbutazon	63	125	59	106	59	103
fenilbutazon	74	108	83	91	73	89
tolfenamska kislina	83	90	83	89	82	91

povp. – povprečje; s – standardni odmik; koncentracijski nivoji so prikazani v tabeli 9

Tabela 70: Povzetek validacije analizične metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – ponovljivost

	Matriks	nivo 1		nivo 2		nivo 3	
		konc. (µg/kg)	KV (%)	konc. (µg/kg)	KV (%)	konc. (µg/kg)	KV (%)
karprofen	mleko	50	19,7	100	16,8	150	10,9
	krvna plazma	50	4,9	100	2,1	150	2,0
diklofenak	mleko	1	39,7	2	31,4	3	24,1
	krvna plazma	10	16,9	20	9,1	30	6,3
fluniksin	mleko	20	10,3	40	9,6	60	8,2
	krvna plazma	1	8,2	2	6,3	3	5,1
5-hidroksi-fluniksin	mleko	20	13,0	40	12,2	60	13,2
	krvna plazma	1	14,6	2	8,3	3	5,3
ketoprofen	mleko	1	48,3	2	18,4	3	15,1
	krvna plazma	10	9,3	20	8,1	30	5,9
meloksikam	mleko	7,5	11,6	15	7,5	22,5	8,9
	krvna plazma	5	6,8	10	5,4	15	5,1
oksifenbutazon	mleko	5	17,2	10	10,4	15	13,2
	krvna plazma	20	7,2	40	3,8	60	3,3
fenilbutazon	mleko	5	25,2	10	10,3	15	9,8
	krvna plazma	20	3,7	40	2,9	60	4,7
tolfenamska kislina	mleko	25	6,8	50	8,3	75	8,7
	krvna plazma	20	3,5	40	2,2	60	3,3

s – standardni odmik; KV – koeficient variacije

Tabela 71: Povzetek validacije analizične metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – obnovljivost

	Matriks	nivo 1		nivo 2		nivo 3	
		konc. (µg/kg)	KV (%)	konc. (µg/kg)	KV (%)	konc. (µg/kg)	KV (%)
karprofen	mleko	50	25,6	100	17,4	150	16,1
	krvna plazma	50	6,8	100	3,3	150	2,0
diklofenak	mleko	1	50,2	2	23,6	3	17,9
	krvna plazma	10	17,9	20	8,9	30	6,3
fluniksin	mleko	20	7,3	40	5,4	60	9,2
	krvna plazma	1	8,2	2	7,9	3	6,6
5-hidroksi-fluniksin	mleko	20	12,8	40	12,0	60	12,1
	krvna plazma	1	14,3	2	8,3	3	5,5
ketoprofen	mleko	1	43,7	2	21,7	3	17,4
	krvna plazma	10	7,7	20	6,9	30	5,4
meloksikam	mleko	7,5	12,8	15	6,8	22,5	8,2
	krvna plazma	5	10,1	10	7,5	15	8,4
oksifenbutazon	mleko	5	44,1	10	27,2	15	15,7
	krvna plazma	20	13,1	40	10,7	60	6,0
fenilbutazon	mleko	5	23,1	10	15,6	15	13,4
	krvna plazma	20	9,0	40	10,3	60	5,1
tolfenamska kislina	mleko	25	11,9	50	10,8	75	11,6
	krvna plazma	20	4,3	40	2,5	60	3,8

s – standardni odmik; KV – koeficient variacije

Tabela 72: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – meja odločitve (CC α), sposobnost določitve (CC β) in meja vrednotenja (LOQ)

	CC α (μ g/kg)		CC β (μ g/kg)		LOQ (μ g/kg)	
	mleko	krvna plazma	mleko	krvna plazma	mleko	krvna plazma
karprofen	63,96	61,68	80,88	79,05	50	50
diklofenak	2,98	12,39	3,63	13,39	2	10
fluniksin	45,41	1,12	52,42	1,25	1	1
5-hidroksi-fluniksin	47,00	1,21	50,46	1,42	1	1
ketoprofen	2,50	11,11	3,00	12,48	2	10
meloksikam	16,49	5,62	17,99	6,21	1	5
oksifenbutazon	5,96	24,85	6,94	29,16	5	20
fenilbutazon	6,46	25,71	8,41	32,70	5	20
tolfenamska kislina	55,86	23,41	62,11	24,22	5	20

Tabela 73: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – stabilnost vzorcev, pripravljenih za meritev z LC-MS/MS

	Stabilnost	
	mleko	krvna plazma
vsi analiti	najmanj 24 ur po prvem injiciranju	

Tabela 74: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – robustnost

	Vpliv temperature in časa inkubacije	Vpliv živalske vrste
karprofen	Ne	Ne
diklofenak		
fluniksin	Da, pri 34 °C 60 min in 40 °C 60 min	Da, pri konjih
5-hidroksi-fluniksin	Ne	Ne
ketoprofen		
meloksikam		
oksifenbutazon	Da, pri 40 °C 60 min	Da, pri steriliziranem govejem mleku
fenilbutazon	Ne	Ne
tolfenamska kislina		Da, pri kuncih

modra barva označuje vpliv v mleku, rdeča pa vpliv v krvni plazmi

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV VERAPAMILA NA FARMAKOKINETIKO AVERMEKTINOV PRI OVCAH IN VLOGA P-GP PRI PREHODU AVERMEKTINOV IZ KRVNE PLAZME V MLEKO

Farmakokinetika je veda, ki preučuje kinetiko absorpcije, distribucije, metabolizma in izločanja snovi iz organizma. Največkrat z njo preučujemo zdravila in njihove komponente, vendar jo lahko uporabimo za katero koli spojino, ki jo vnesemo v organizem. S farmakokinetičnimi študijami lahko določimo številne parametre, ki natančno opisujejo kaj se dogaja z učinkovino v različnih časovnih intervalih po vnosu v organizem. Glavni prispevek farmakokinetike je v zmanjšanem številu poskusov na živalih, ki bi bili brez tovrstnih študij potrebni za zagotovitev učinkovitih, varnih in dostopnih zdravil za humano in veterinarsko medicino.

Iste metode lahko uporabimo tudi za ugotavljanje sprememb v farmakokinetičnih procesih, kar lahko izkoristimo za preučevanje biokemijskih sistemov v živih organizmih (npr. sistem transportni protein – substrat), kar po navadi ni mogoče brez kirurškega posega. Če poznamo farmakokinetične parametre učinkovine in strukturo ter lastnosti farmakokinetičnega modela (simulacije), lahko preučujemo vse farmakokinetične faze (absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje) in objektivno primerjamo različne učinkovine, še preden začnemo poskuse na živalih oziroma ljudeh.

Cilj prvega poskusa je bil ugotoviti vpliv inhibicije P-gp na farmakokinetične parametre ivermektina in doramektina v krvni plazmi in mleku ovc, hkrati pa smo poskušali ugotoviti, ali je P-gp udeležen pri transportu avermektinov iz krvne plazme v mleko.

S stališča higiene živil bi bil precejšen vpliv inhibitorjev P-gp na farmakokinetiko avermektinov pomemben, saj bi lahko s sočasnim vnosom hipotetično upočasnili oziroma celo zaustavili izločanje v mleko ter tako uporabili večje število avermektinov za zdravljenje živali, katerih mleko je namenjeno humani potrošnji. Hkrati bi pripomogli k izboljšanju zdravljenja parazitarnih infekcij pri živalih, saj bi s širšim naborom dovoljenih učinkovin lahko bolje izbirali vrsto protiparazitnega zdravila za določen parazit in s tem znižali možnost za razvoj rezistence pri parazitih (Xu in sod., 1998).

Pri živalih, ki smo jim vnesli samo enega od avermektinov, so se vrednosti farmakokinetičnih parametrov ujemale z vrednostmi, objavljenimi v dostopni literaturi (Cerkvenik-Flajs in sod., 2005; Cerkvenik in sod., 2002). Za ivermektin je bila najvišja povprečna koncentracija ($C_{\max}$) v krvni plazmi $13 \pm 1 \mu\text{g H}_2\text{B}_{1a}/\text{L}$, dosežena pa je bila v $3,3 \pm 1,5$ dneh ($T_{\max}$). Ploščina pod koncentracijsko krivuljo do zadnje izmerjene točke v krvni plazmi (AUC_{last}) je bila $74 \pm 10 \mu\text{g dan/L}$, ploščina, aproksimirana do neskončnosti (AUC_{INF}), pa je bila za krvno plazmo $76 \pm 12 \mu\text{g dan/L}$, za mleko pa $67 \pm 30 \mu\text{g dan/L}$. Srednji čas zadrževanja (MRT_{INF}) je bil v krvni plazmi $5,8 \pm 1,9$ dni, v mleku pa $6,3 \pm 1,7$ dni. Biološka razpolovna doba ($t_{1/2}$) je bila $3,0 \pm 1,9$ dni v krvni plazmi in $3,3 \pm 2,0$ dni v mleku. Razmerje ploščin pod koncentracijsko krivuljo med mlekom in krvno plazmo za ivermektin je bilo $0,9 \pm 0,4$ (tabele 11, 13 in 19, grafa 2 in 4).

Farmakokinetični parametri doramektina so se razlikovali od parametrov za ivermektin, kar je razvidno tudi iz literature. Najvišja koncentracija doramektina v krvni plazmi je bila v povprečju $38 \pm 20 \mu\text{g/L}$, dosežena pa je bila v $1,9 \pm 1,4$ dneva. Ploščina pod koncentracijsko krivuljo do zadnje izmerjene točke (AUC_{last}) je bila $197 \pm 53 \mu\text{g dan/L}$, ploščina, aproksimirana do neskončnosti (AUC_{INF}), je bila za krvno plazmo $201 \pm 55 \mu\text{g dan/L}$, za

mleko pa $268 \pm 158 \mu\text{g dan/L}$. Srednji čas zadrževanja (MRT_{INF}) je bil v krvni plazmi $5,6 \pm 2,6$ dni, v mleku pa $5,8 \pm 2,6$ dni. Biološka razpolovna doba ($t_{1/2}$) je bila $3,2 \pm 1,4$ dni v krvni plazmi in $3,8 \pm 1,8$ dni v mleku. Razmerje ploščin pod koncentracijsko krivuljo med mlekom in krvno plazmo za doramektin je bilo $1,3 \pm 0,8$ (tabele 12, 14 in 20, grafa 3 in 5).

Razlike med farmakokinetičnimi parametri ivermektina in doramektina so bile najverjetneje posledica različnih fizikalno-kemijskih lastnosti, vezanih na kemijsko strukturo molekul. Doramektin namreč izkazuje več kot desetkrat višjo lipofilnost kot ivermektin (vrednosti $\log K_{\text{ow}}$ sta 3,22 za ivermektin in 4,41 za doramektin), zato je bila absorpcija po podkožnem vnosu pri doramektinu hitrejša, kar je imelo za posledico nižjo vrednost T_{max} . Druga možna razlaga za nižjo vrednost T_{max} je hitrejšo izločanje doramektina v primerjavi z ivermektinom. Navidezni volumen porazdelitve (V_z/F ; $547 \pm 284 \text{ L/kg}$ za ivermektin in $281 \pm 127 \text{ L/kg}$ za doramektin) in navidezni očistek (Cl/F ; $135 \pm 24 \text{ L/dan}$ za ivermektin in $61 \pm 15 \text{ L/dan}$ za doramektin) sta bila pri doramektinu nižja, sistemska izpostavljenost organizma pa višja, kar je bilo skladno z razlago, vezano na fizikalno kemijske lastnosti in z objavljenimi podatki v dostopni literaturi (Lanusse in sod., 1997) (tabeli 19 in 20).

Druga razlaga za ugotovljeno razliko med farmakokinetičnimi parametri ivermektina in doramektina bi bila lahko razlika v afiniteti do P-gp. Shoop in sod. (1996) so ugotovili, da so avermektini z nasičeno vezjo C_{22-23} (npr. ivermektin) boljši substrati za P-gp kot spojine, ki imajo nenasičeno vez C_{22-23} (npr. doramektin). Ker je P-gp izražen v organih, ki skrbijo za izločanje spojin iz telesa (Ballent in sod., 2007) (predvsem na apikalni membrani v jetrih, ki so glavna izločevalna pot za avermektine, ter v placenti, hematoencefalni barieri in prebavilih (Thiebaut in sod., 1987)), bi lahko razlika v afinitetah pomenila značilno različne farmakokinetične parametre. V našem poskusu smo določili vrednosti navideznega očistka za obe preučevani spojini in izkazalo se je, da se doramektin počasneje izloča iz organizma, kar je bilo v skladu s prej navedeno razlago, da je doramektin šibkejši substrat za P-gp v primerjavi z ivermektinom.

P-gp je izražen tudi v prebavnem traktu, kjer ima velik vpliv na farmakokinetiko avermektinov (Molento in sod., 2004). Naš poskus je bil zasnovan s podkožnim vnosom učinkovin, da bi se izognili predsistemskemu delovanju P-gp in se osredotočili na druga mesta interakcij med zdravili, kot so jetra. Kljub podkožnemu vnosu je še vedno obstajala možnost enterohepatične cirkulacije, vendar je (če je sploh bila prisotna) potekala v tako majhnem obsegu, da njenega vpliva nismo zaznali.

Farmakokinetični parametri po sočasnem podkožnem vnosu ivermektina in verapamila so se statistično značilno spremenili glede na vnos samo ivermektina (tabela 21). Kot že rečeno, je ivermektin dober substrat za P-gp, zato bi sočasen vnos verapamila moral upočasniti procese, pri katerih P-gp sodeluje kot prenašalec avermektinov. Po sočasnem vnosu ivermektina in verapamila smo tako za ivermektin posledično ugotovili višje vrednosti C_{max} in nižje vrednosti T_{max} . Podobne ugotovitve so za peroralni vnos objavili Molento in sod. (2004), rezultat pa so pripisali inhibiciji P-gp v prebavnem traktu, zmanjšanjem izločanju prek jeter in posledično boljši in hitrejši absorpciji iz prebavnega trakta v krvno plazmo. V nasprotju z ugotovitvami Molenta in sod. (2004) smo v našem poskusu ugotovili krajše srednje čase zadrževanja in biološke razpolovne dobe namesto pričakovanih daljših. To neskladje s pričakovanimi rezultati bi bilo lahko posledica ostankov verapamila v organizmu v zelo nizkih koncentracijah. Meier in sod. (2006) so namreč ugotovili, da verapamil v zelo nizkih koncentracijah ne deluje kot inhibitor, ampak še dodatno aktivira P-gp in pospeši procese, pri katerih P-gp sodeluje. Iz grafov 10–13 je dobro razvidna razlika v naklonih terminalnega dela (v semilogaritemskem prikazu), ki je sorazmeren z biološko razpolovno dobo. Naša razlaga za opisano odstopanje je, da je verapamil v zgodnjih stadijih poskusa inhibiral P-gp, ko pa je

koncentracija verapamila padla na dovolj nizko raven, je še dodatno aktiviral P-gp in povzročil prej navedena odstopanja. Za potrditev te hipoteze so potrebni nadaljnji ciljani poskusi.

P-gp je, čeprav v manjšem obsegu, izražen tudi v mlečnih žlezah (Ito in Alcorn, 2003). Biološka funkcija mlečne žleze najverjetneje ni izločanje ksenobiotikov iz krvne plazme v mleko, pač pa je zagotavljanje zadostne količine hranil za sesne mladiče. Čeprav je bil srednji čas zadrževanja ivermektina v mleku po sočasnem vnosu verapamila krajši v primerjavi z vnosom ivermektina samega, je bila ugotovljena razlika verjetno posledica spremenjenih koncentracij v krvni plazmi. Razmerje AUC med mlekom in krvno plazmo nakazuje, da je glavni mehanizem za prenos avermektinov iz krvne plazme v mleko najverjetneje pasivna difuzija, saj se razmerje ob sočasnem vnosu verapamila ni statistično značilno spremenilo (tabela 21). Ta podatek sicer ne izloča aktivne vloge P-gp pri prehodu avermektinov v mleko, za potrditev te hipoteze pa so potrebni nadaljnji poskusi.

Vpliv verapamila na farmakokinetiko doramektina ni bil tako izrazit kot pri ivermektinu. Edina statistično značilna razlika je bila pri navideznem očistku, ki se je po sočasnem vnosu verapamila znižal. Drugi parametri so izkazovali enak trend kot pri ivermektinu, vendar nam ni uspelo potrditi statistično značilnih razlik. Povišali sta se vrednosti AUC in C_{max} , znižali pa sta se vrednosti $t_{1/2}$ in MRT v krvni plazmi in mleku (tabeli 20 in 21).

Razlog za manjši vpliv verapamila na farmakokinetiko doramektina bi bil lahko v nižji afiniteti do P-gp kot posledici nenasičene vezi C_{22-23} (Shoop in sod., 1996). Druga razlaga bi bila lahko v razliki v lipofilnosti obeh avermektinov. Doramektin se je zaradi višje lipofilnosti hitreje in v večjem obsegu porazdelil v maščobno tkivo (Lanusse in sod., 1997), od koder se je počasneje izločal (Hennessy in Alvinerie, 2002). Po tej razlagi je vpliv verapamila samo prehodni in zato težje izmerljiv.

Pomembno lahko vplivajo na farmakokinetične parametre tudi metabolni procesi, kjer bi lahko z dodatkom verapamila vplivali na metabolne poti avermektinov (Molento in sod., 2004). Glavni encim, ki presnavlja avermektine, je P450, in sicer v obliki CYP3A4 (Zeng in sod., 1998). Ta encim presnavlja širok spekter spojin in je izražen v jetrih in prebavnem traktu (Lown in sod., 1998). Ker verapamil velja tudi za inhibitorja tega encima, bi lahko pričakovali interakcije med zdravili na osnovi metabolnih procesov (Molento in sod., 2004). Na osnovi dejstva, da se avermektini večinoma izločajo v nespremenjeni obliki (Hennessy in Alvinerie, 2002), lahko sklepamo, da vpliv verapamila na metabolne procese nima pomembne vloge v farmakokinetiki ivermektina in doramektina (Molento in sod., 2004).

Eksperimentalno smo potrdili vpliv verapamila kot inhibitorja P-gp na farmakokinetiko ivermektina v krvni plazmi po podkožnem vnosu. Pri doramektinu je bil učinek verapamila šibkejši, kar lahko pripišemo več dejavnikom, kot sta nižja afiniteta doramektina za P-gp in višja lipofilnost, obe vezani na razliko v kemijski strukturi med obema avermektinoma.

Kljub razlikam v koncentraciji ivermektina v mleku po sočasnem vnosu verapamila nam ni uspelo doseči postavljenega cilja modifikacije oziroma zaustavitve njegovega izločanja s pomočjo verapamila. Koncentracija ivermektina v mleku je bila še vedno previsoka za humano potrošnjo glede na priporočila, ki jih je objavila Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization, 2000). V navedenem dokumentu sta WHO in FAO priporočila začasno mejno koncentracijo $10 \mu\text{g H}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$ v govejem mleku, ki pa nima zakonske veljave v EU. Zvišanje odmerka verapamila verjetno ne bi imelo statistično značilnega večjega vpliva na farmakokinetične parametre. Hipotetično znižanje prenosa avermektinov iz krvne plazme v mleko bi namreč omogočilo večjo izbiro pri uporabi avermektinov pri živalih, katerih mleko

je namenjeno prehrani ljudi. To bi predstavljalo pomemben prispevek k zdravstveni oskrbi živali, vendar so za potrditev te hipoteze potrebni nadaljnji poskusi.

Vloge P-gp pri transportu avermektinov iz krvne plazme v mleko nam ni uspelo potrditi, čeprav je naši rezultati ne izključujejo. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je vloga P-gp pri izločanju avermektinov iz krvne plazme v mleko majhna. Za potrditev postavljene hipoteze o tej vlogi P-gp bi bile zato potrebne še nadaljnje ciljne raziskave.

5.2 VALIDACIJA ANALIZNE METODE DOLOČANJA EPRINOMEKTINA V MLEČNIH IZDELKIH

Za uspešno izvedbo drugega poskusa je bilo treba uvesti dovolj občutljivo in selektivno analitiko eprinomektina v mleku in mlečnih izdelkih, podprto z validacijo. Uporabljeno metodo smo obširno ovrednotili s standardnimi dodatki v slepih vzorcih v smiselnem koncentracijskem območju glede na pričakovane vsebnosti eprinomektina v mlečnih izdelkih. S tem smo si zagotovili verodostojnost rezultatov poskusa.

Validacijo analizne metode ugotavljanja eprinomektina v mleku je že opravila Hodošek (2008), v tem delu pa smo se posvetili ovrednotenju analizne metode za določanje eprinomektina v mlečnih izdelkih.

Kot vodilo za izvedbo validacije smo uporabili zakonodajo EU (ES, 2002), ki ureja področje analitike ostankov veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora. Ker smo metodo uporabili v raziskovalne namene, smo postopek modificirali, tako da smo izpustili ovrednotenje ponovljivosti, meje odločitve ($CC\alpha$) in sposobnosti določitve ($CC\beta$).

Povzetek ovrednotenih validacijskih parametrov je prikazan v tabeli 35.

Selektivnost metode smo prikazali na slikah 28–31 s primerjavo kromatogramov slepih vzorcev brez standardnih dodatkov in z njimi. Na zadrževalnem času eprinomektina nismo pri nobenem preučevanem matriksu odkrili interferenc endogenih spojin oziroma nečistoč, izhajajočih iz samega analiznega postopka.

Analizna metoda je specifično ločila eprinomektin, moksidektin, emamektin, nemadektin, abamektin, doramektin in ivermektin pri standardih in v vseh matriksih (slike 27, 32 in 33). Specifičnost je dragocen podatek o uporabnosti te metode kot multikomponentne, tj. za hkratno ugotavljanje vsebnosti vseh navedenih učinkovin v mlečnih izdelkih (npr. za izvajanje veterinarsko-sanitarnega nadzora nad ostanki avermektinov v živilih živalskega izvora).

Linearnost metode smo ovrednotili glede na regresijske in korelacijske parametre za umeritvene krivulje, ki smo jih pridobili z merjenjem paralel standardov oziroma slepih vzorcev s standardnimi dodatki na različnih koncentracijskih nivojih. Koncentracijska območja smo prilagodili glede na pričakovane vsebnosti eprinomektina v posameznem matriksu.

Linearnost ugotavljanja eprinomektina je bila dobra, saj je bil kvadrat korelacijskega koeficienta $r^2 \geq 0,99$, razen za zoren sir (60 dni) in sekundarno sirotko, pri katerih sta bili vrednosti r^2 0,967 oziroma 0,974 (tabele 22–29, grafi 14–21).

Za ovrednotenje izkoristka smo dnevno analizirali pet paralelk na treh (jogurta in sirotki) oziroma štirih koncentracijskih nivojih (albuminska skuta in siri). Postopek smo še enkrat ponovili, tokrat z drugim analitikom.

Pri večini matrikov je izkoristek padal z naraščajočo koncentracijo eprinomektina. Pri albuminski skuti in sirih je bil izkoristek na najnižjih nivojih, navedenih v tabeli 6, nad 110 % (izjema je bil zoren sir (60 dni), ki je imel na najnižjem nivoju izkoristek 99 %), na najvišjih koncentracijskih nivojih (tabela 6) pa je bil izkoristek le še okrog 50 % (tabela 30). Kljub spremenljivemu izkoristku v albuminski skuti in sirih smo z uporabo eksterne standarda in vzorcev za določanje izkoristka razvili metodo, ki je zadostila vsem ovrednotenim validacijskim parametrom. Izkoristki v jogurtih in sirotkah so se gibali okrog vrednosti 80 % ne glede na koncentracijo (tabela 31).

Analizno metodo za določanje ivermektina in moksidektina v mlečnih izdelkih so razvili tudi Imperiale in sod (2004). Ugotovili so izkoristke med 78 % (moksidektin v siru) in 97 % (ivermektin v sirotki). Metodo so pozneje prilagodili za določanje eprinomektina v mlečnih izdelkih Imperiale in sod. (2006) in ovrednotili izkoristek med 86 in 92 % v odvisnosti od matriksa. Višje izkoristke določanja ivermektina so ugotovili tudi Cerkenik in sod. (2004), med 84 in 103 %. Danaher in sod. (2001b) so določali avermektine v jetrih, izkoristki pa so bili 75 % za eprinomektin in 94 % za ivermektin. Iz dostopne literature je razvidno, da ima ivermektin navadno višji izkoristek, kar moramo upoštevati, če medsebojno primerjamo izkoristke analiznih metod za določanje ivermektina in metod za določanje eprinomektina.

Glede na zakonodajo EU, vezano na izvajanje veterinarsko-sanitarnega nadzora živil živalskega izvora, naj bi bil izkoristek analizne metode med 50 in 120 % za koncentracijsko območje pod 1 µg/kg (ES, 2002). Metoda, ki smo jo uporabili za analizo mleka in mlečnih izdelkov, teh norm ni dosegla, vendar naš primarni namen ni bil izvajanje veterinarsko-sanitarnega nadzora, temveč raziskovalna dejavnost. Za potrebe našega poskusa je bila analizna metoda določanja eprinomektina v mlečnih izdelkih ustrezna.

Za ovrednotenje znotrajlaboratorijske obnovljivosti smo dnevno analizirali pet paralelk na treh (jogurta in sirotki) oziroma štirih koncentracijskih nivojih (albuminska skuta in siri). Postopek smo še enkrat ponovili, tokrat z drugim analitikom, drugim proizvajalcem kemikalij in drugim virom vzorcev. Ovrednotene vrednosti KV so bile med 4,6 in 28,9 % s skupnim povprečjem 12,1 %. Največja odstopanja so bila pri zorenem siru (60 dni), katerega povprečje je bilo 19,2 % (tabeli 32 in 33).

Zahteve EU pri obnovljivosti izhajajo iz Horwitzove enačbe (ES, 2002), opisane v poglavju 3.6.8.6. Za mejo vrednotenja 0,5 µg EPR B_{1a}/kg v vseh matriksih je bila mejna vrednost KV, izračunana po Horwitzovi enačbi, 50 %. Ob upoštevanju 2/3 te izračunane vrednosti, tj. 33 %, ležijo ovrednotene vrednosti KV ugotavljanja eprinomektina v vseh mlečnih izdelkih v območju, ki ga zahtevajo predpisi EU.

Izkoristki so se na koncentracijskem nivoju meje vrednotenja gibali med 81 in 108 %, s povprečjem 96 %. Relativni standardni odmik KV je bil na tej koncentraciji za vse matrikse pod 10 % (tabela 34).

Najnižja meja vrednotenja, ki smo jo zasledili v dostopni literaturi, je bila 0,05 µg/kg za določanje eprinomektina v krvni plazmi s fluorescenčno detekcijo (Antonin in sod., 1998). Metodo za določanje ivermektina in moksidektina v krvni plazmi, mleku in mlečnih izdelkih, ki so jo razvili Imperiale in sod. (2004), so ovrednotili z mejo vrednotenja 0,25 µg/kg (za ivermektin v svežem in zorenem siru ter za moksidektin v sirotki, svežem in zorenem siru)

oziroma 0,1 µg/kg (za ivermektin v krvni plazmi, mleku in sirotki ter za moksidektin v krvni plazmi in mleku). Avtorji so metodo pozneje prilagodili za določanje eprinomektina v mlečnih izdelkih (Imperiale in sod., 2006) in ovrednotili mejo vrednotenja eprinomektina 0,1 µg/kg za vse matrikse, razen sirotke, pri kateri je bila le-ta 0,25 µg/kg. Anastasio in sod. (2005) so ugotavljali vsebnost eprinomektina v sirih iz kozjega mleka in navedli mejo vrednotenja 0,08 µg/kg. Upoštevati moramo dejstvo, da meje vrednotenja niso ovrednotili glede na najnižjo izmerjeno koncentracijo v vzorcih, ampak glede na vodila AOAC International, ki določajo mejo vrednotenja kot trikratnik standardnega odmika slepega vzorca na mestu, kjer bi se pojavil kromatografski vrh analita (AOAC International, 2002). Večina drugih analiznih metod določanja eprinomektina, ki uporabljajo fluorescenčno detekcijo, je imela meje vrednotenja 2 µg/kg in več v jetrih (Danaher in sod., 2001a; Danaher in sod., 2001b), ledvicah, mesu in maščobi (Payne in sod., 1997). Večina metod z masnospektrometrično detekcijo je imela višjo mejo vrednotenja od metod s fluorescenčno detekcijo (Ali in sod., 2000). Izjemi sta bili metodi, ki sta ju razvila Howells in Sauer (2001) (meja vrednotenja 0,4 µg/kg) ter Durden (2007) (meja vrednotenja 0,06 µg/kg).

Stabilnost eprinomektina v mlečnih izdelkih smo ovrednotili v časovnem intervalu 44 ur na dveh koncentracijskih nivojih. V vseh matriksih je bil eprinomektin stabilen na obeh koncentracijskih nivojih med celotnim poskusom, kar nam je omogočilo merjenje večjih serij vzorcev brez izgub eprinomektina (grafa 22 in 23).

5.3 OSTANKI EPRINOMEKTINA V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH

Ostanki zdravil, ki jih vnesemo živalim, namenjenim za humano potrošnjo, se lahko izločajo oziroma v nekaterih primerih tudi koncentrirajo v določenih tkivih in bioloških tekočinah. Če ljudje uživamo kontaminirana tkiva (meso, organi, maščoba) oziroma biološke tekočine (mleko, kri), lahko pride do neželenih stranskih učinkov, ki so v najhujših primerih lahko celo smrtni. Farmakološke učinkovine so lahko obstojne tudi med postopki predelave primarnih živil živalskega izvora, kot je na primer predelava mleka v mlečne izdelke.

Cilj drugega poskusa je bil razkriti pot, po kateri eprinomektin »potuje« od izločanja v mleko ovc pa vse do končnih mlečnih izdelkov, kot so siri, jogurti in skuta, ter sirotki kot stranska proizvoda tehnološkega postopka. Ugotoviti smo poskušali vpliv proizvodnih procesov in fizikalno-kemijskih lastnosti končnih izdelkov na stabilnost eprinomektina in na njegovo vsebnost v navedenih izdelkih.

Koncentracije eprinomektina po vnosu s polivom po koži so dosegle najvišje vrednosti drugi dan (3,2 µg/kg v mleku, 11,5 µg/kg v svežem siru, 12,7 µg/kg v zorenem siru (30 dni), 14,6 µg/kg v zorenem siru (60 dni) in 3,3 µg/kg v jogurtu iz surovega mleka) oziroma tretji dan (9,8 µg/kg v albuminski skuti, 3,5 µg/kg v jogurtu iz termično obdelanega mleka in 0,7 µg/kg v primarni sirotki). V podobnem poskusu, ki so ga izvedli Imperiale in sod. (2006), so ugotovili najvišjo koncentracijo v zorenem siru (40 dni), in sicer približno 5,5 µg/kg, kar je glede na odmere eprinomektina, ki so ga prejele ovce (0,5 mg/kg t. m. s polivom po koži), primerljivo z vrednostmi, dobljenimi v našem poskusu, ko smo ovcam vnesli eprinomektin s polivom po koži v odmerku 1,0 mg/kg t. m. Anastasio in sod. (2005) pa so pri poskusu na kozah ugotovili najvišjo koncentracijo eprinomektina 10 µg/kg oziroma 20 µg/kg v sirih, zorenih 20, 40 in 80 dni, po vnosu s polivom po koži v odmerkih 0,5 oziroma 1,0 mg/kg t. m.

Ostanke eprinomektina smo lahko v vseh matriksih spremljali vsaj en teden, izjema je bila sekundarna sirotka, pri kateri je bila vsebnost eprinomektina pod mejo zaznavnosti v vseh vzorcih. Ostanke so se najdlje zadrževali v albuminski skuti in zorenem siru (60 dni), kjer smo

jih izmerili še 44. dan po vnosu učinkovine v ovce (tabela 36, graf 24). Imperiale in sod. (2006) so zaznali eprinomektin v mleku in mlečnih izdelkih po vnosu v ovce s polivom po koži v odmerku 0,5 mg/kg t. m. do 15. dne, podatkov za poznejše dneve vzorčenja (vzorčili so do 35. dne) pa niso objavili. Anastasio in sod. (2005) so vzorčili le 6 dni, zato podatkov o ostankih eprinomektina v izdelkih iz kozjega mleka za daljše časovno obdobje ni bilo na razpolago.

Povprečna vsebnost maščobe je bila 36 % v zorenem siru (60 dni), 33 % v zorenem siru (30 dni), 25 % v svežem siru in 14 % v albuminski skuti. V jogurtih in sirotkah je bila vsebnost maščobe pod 6 %. Povprečna vsebnost suhe snovi je bila 69 % v zorenem siru (60 dni), 66 % v zorenem siru (30 dni), 50 % v svežem siru in 31 % v albuminski skuti. Rezultati so se ujemali s podatki, objavljenimi v literaturi (Cerkvenik, 2000).

Po pričakovanjih smo najvišje vsebnosti suhe snovi in maščobe izmerili v zorenih sirih, sledili so sveži sir, albuminska skuta ter mleko in jogurti. Najnižje vsebnosti smo izmerili v obeh sirotkah. V sekundarni sirotki je bila vsebnost maščobe v vseh vzorcih pod mejo zaznavnosti.

Vsebnost maščobe in suhe snovi se med poskusom ni bistveno spreminjala (grafa 25 in 26), opazili pa smo manjša odstopanja pri albuminski skuti do petega dneva. Vsebnost maščobe in suhe snovi pri albuminski skuti je padala od 0. do 3. dne, 4. dan pa smo zaznali skokovito povečanje. Ta odstopanja so najverjetneje vzrok za »stopnico«, ki se pojavi v koncentracijskem profilu eprinomektina v albuminski skuti iz tretjega na četrti dan (graf 24). Podobna odstopanja v vsebnosti maščobe in suhe snovi smo odkrili tudi pri drugih matriksih, vendar v veliko manjšem obsegu. Razlog za odstopanja gre pripisati stresu, ki so mu bile v začetnih fazah poskusa podvržene živali v poskusu. Posledice so bile spremembe v hranjenju in gibanju živali, kar se je pokazalo tudi v sestavi njihovega mleka.

Podobna odstopanja je ugotovila tudi Cerkvenik (2000), saj je bila v prvih dneh poskusa vsebnost maščobe in suhe snovi spremenljiva, po petem dnevu pa so se vrednosti ustale.

Iz rezultatov je razvidno, da se je eprinomektin zadrževal v matriksih z visoko vsebnostjo maščobe in suhe snovi ter nizko vsebnostjo vode. Hodošek (2008) je ugotovila, da se velik delež eprinomektina v mleku nahaja v beljakovinski frakciji, medtem ko je pri drugih avermektinih ta delež nižji. S tem so se ujemale tudi naše ugotovitve, saj so bile najvišje koncentracije eprinomektina izmerjene v matriksih z najvišjo vsebnostjo suhe snovi, ki pri mlečnih izdelkih predstavlja beljakovinsko frakcijo mleka. V primerjavi z ivermektinom, ki ga je Cerkvenik s sod. (2004) izmerila tudi v sekundarni sirotki, pa eprinomektina v tem matriksu med našim poskusom nismo zaznali. Porazdelitev eprinomektina v drugih matriksih se je prav tako ujemala s koncentracijskimi profili, prikazanimi v navedenem članku.

Eprinomektin se je izkazal za obstojno spojino med predelavo mleka, saj smo ga lahko izmerili v vseh matriksih, razen v sekundarni sirotki. Razlog za odsotnost eprinomektina v tem matriksu najverjetneje ni bila njegova (ne)stabilnost, ampak njegove fizikalno-kemijske lastnosti. Visoke vsebnosti ostankov, izmerjene v zorenih sirih, potrjujejo stabilnost eprinomektina tudi med fermentacijskimi procesi (Imperiale in sod., 2006; Rehbein in sod., 2001) v dolgem časovnem obdobju, podobne vsebnosti v jogurtu iz surovega in jogurtu iz termično obdelanega mleka pa potrjujejo njegovo obstojnost tudi pri višjih temperaturah (Imperiale in sod., 2006).

5.4 RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN

Za potrebe nadzora živil živalskega izvora nad ostanki nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku smo razvili analizno metodo. Glede na razpoložljivo instrumentalno opremo in dostopno literaturo smo se odločili uporabiti kombinacijo že objavljenih metod, ki smo jim dodali lastne modifikacije (Antonić in Heath, 2007; CRL, 2008b; 2008c).

Pri izbiri analitov smo med 25 možnimi spojinami izbrali za vključitev v analizno metodo devet spojin. Kriteriji za izbiro so bili: zahteve EU (poskušali smo vključiti čim več spojin, za katere je EU postavila mejne vrednosti – MRL (ES, 2009)), dobavljivost standardov in primernost posamezne spojine za meritev z instrumentom LC-MS/MS. Kompatibilnost spojine z načinom merjenja MS/MS vključuje kakovost ionizacije, število razpadnih produktov v kolizijski celici in celokupno število analitov, ki jih lahko z razpoložljivo opremo izmerimo med posamezno kromatografsko analizo.

5.4.1 ČIŠČENJE, PRIPRAVA VZORCEV IN EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)

Pri optimizaciji analizne metode smo se najprej posvetili najbolj kompleksnemu koraku, to je bilo čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi. Preizkusili smo različne vrste in količine nosilcev, različne pogoje za nanos vzorca in različne raztopine za kondicioniranje, spiranje in elucijo analitov. Začeli smo z raztopinami standardov v vodi in z več poskusi optimizirali naslednje parametre: velikost in vrsto delcev stacionarne faze kolonic za čiščenje na trdni fazi, mešanico topil za spiranje kolonic, raztopino za kondicioniranje kolonic, hitrost nanašanja vzorca, volumen nanesenega vzorca, raztopino za spiranje nečistoč, čas sušenja kolonic pred eluiranjem, mešanico topil za eluiranje in pripravo vzorcev mleka in krvne plazme na čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi.

Kot glavni kriterij za izbiro velikosti in vrste delcev stacionarne faze kolonic za čiščenje na trdni fazi smo uporabili izkoristke izbranih analitov, drugi kriteriji pa so bili še vrsta in količina topil, potrebnih za čiščenje, in čas čiščenja. Za vsako stacionarno fazo smo poskušali optimizirati čiščenje s podatki proizvajalca in literature. Preizkusili smo več kombinacij različnih nosilcev, njihovih količin in volumna kolonice (tabela 7). Odločili smo se za uporabo kolonic Strata X (Phenomenex, ZDA) in sicer 6 mL/200 mg (volumen kolonice/masa stacionarne faze) za čiščenje vzorcev mleka in 3 mL/60 mg za vzorce krvne plazme. Različna velikost kolonic je bila posledica dejstva, da je bila količina krvne plazme na razpolago, v primerjavi z mlekom, veliko bolj omejena.

Pri analiznih metodah, opisanih v dostopni literaturi, so bile večinoma uporabljene kolonice s stacionarno fazo, ki je bila enaka oziroma zelo podobna izbrani stacionarni fazi (Antonić in Heath, 2007; Feely in sod., 2002; Gowik in sod., 1998; Kosjek in sod., 2005; Peters in sod., 2009). Nekateri avtorji so uporabili ionsko izmenjevalne kolonice (Boner in sod., 2003; Ngoh in sod., 2003; Zuccato in sod., 2005), nekaj avtorjev pa ni uporabilo čiščenja z ekstrakcijo na trdni fazi, ampak ekstrakcijo tekoče-tekoče (Igualada in sod., 2007; Jedziniak in sod., 2009; Taggart in sod., 2007) oziroma podatkov o čiščenju niso objavili (Albers-Schönberg in sod., 1981; Campanella in sod., 2009; Pospíšilová in sod., 1995; Sabolovic in sod., 2004; Suárez in sod., 2007).

Pred ekstrakcijo na trdni fazi smo morali zagotoviti, da na kolonicah ni bilo nečistoč, ki bi lahko zmanjšale učinkovitost čiščenja. V ta namen smo kolonice sprali s topilom oziroma s kombinacijo topil, ki je dobro raztapljala analite in vse druge analitom podobne spojine.

Večina nesteroidnih protivnetnih učinkovin je dobro topna v polarnih organskih topilih, kot sta MeOH in MeCN, zato smo se osredotočili na optimizacijo mešanice za spiranje kolonic, sestavljene iz navedenih topil in vode. Kot najprimernejša se je izkazala mešanica MeOH : MeCN (1 : 1, v/v), ki smo jo uporabili v končni metodi.

Po čiščenju kolonic je bilo treba stacionarno fazo pripraviti (kondicionirati) za nanos analitov. Glavni cilj tega koraka je pripraviti pogoje na stacionarni fazi, pri katerih je vezava analitov čim učinkovitejša. Izbira raztopine za kondicioniranje kolonic je pogosto odvisna od priprave vzorca za čiščenje na trdni fazi, saj je treba zagotoviti čim bolj podobne fizikalno-kemijske pogoje v vzorcu in na trdni fazi. Druge omejitve so še vrsta in količina nosilca ter volumen kolonice. Izbrani analiti so šibke kisline, kar je omejilo naš izbor na kisle raztopine. Za analizo vzorcev mleka smo izbrali 0,01 M raztopino HCl v vodi, za analizo vzorcev krvne plazme pa 0,01 M raztopino askorbinske kisline v vodi. Slednjo uporabljajo tudi v Centralnem referenčnem laboratoriju EU v Berlinu (CRL, 2008b), saj upočasnjuje razpad nekaterih nesteroidnih protivnetnih učinkovin in s tem omogoča višje izkoristke pri čiščenju krvne plazme.

Zaradi različnih afinitet analitov do stacionarne faze in različnih hitrosti vezav smo morali določiti optimalno hitrost nanašanja vzorcev, ki bi nam omogočila hitro in učinkovito čiščenje večjih serij vzorcev. Hitrost nanosa bi lahko pospešili z uporabo podtlaka, vendar pa se je izkazalo, da je nanos vzorcev pod silo težnosti dovolj počasen, da zagotavlja učinkovito vezavo analitov, hkrati pa tudi dovolj hiter za sočasno analizo več vzorcev.

Priprava vzorcev na ekstrakcijo na trdni fazi običajno vključuje uporabo organskih topil, v katerih so analiti dobro topni, hkrati pa v bioloških matriksih povzročajo obarjanje proteinov. V našem primeru smo za čiščenje vzorcev mleka uporabili MeCN. Nanos vzorca, raztopljenega le v MeCN, nam je dal izjemno nizke izkoristke ekstrakcije na trdni fazi, kar je bilo nesprejemljivo pri metodah za določanje ostankov analitov zaradi že tako nizke vsebnosti le-teh. Posledično smo se odločili za redčenje ekstraktov z različnimi vodnimi raztopinami, vključujoč samo vodo. Vzorce mleka in krvne plazme smo v končni metodi razredčili z raztopino, ki smo jo uporabili za kondicioniranje kolonic. Zaradi kisle vrednosti pH raztopine smo sočasno dosegli, da so bili analiti v vzorcih večinoma v neioniziranem stanju, kar je omogočilo boljšo vezavo na nosilec in posledično višje izkoristke. Pri čiščenju vzorcev krvne plazme smo zaradi problematične obstojnosti nekaterih analitov uporabili vodno raztopino askorbinske kisline, pri čiščenju vzorcev mleka pa vodno raztopino HCl.

Volumen nanesenega vzorca je bil odvisen od količine organskih topil in deleža vode, ki smo ga potrebovali za zadovoljive izkoristke. Izkazalo se je, da mora biti delež vode v vzorcih, pripravljenih za nanos, vsaj 80 % (v/v), saj so bili pri nižjih deležih izkoristki nižji. Glede na količine vzorca smo ekstrakte mleka (5 mL) redčili na ~50 mL z 0,01 M raztopino HCl, vzorce krvne plazme (2 mL) pa na ~10 mL z 0,01 M raztopino askorbinske kisline v vodi.

Po nanosu vzorcev na kolonice je bilo treba sprati nečistoče, ki so bile poleg analitov prisotne v vzorcih. Ker med spiranjem nečistoč nismo smeli izgubiti analitov, smo ponovno uporabili 0,01 M vodno raztopino HCl (za mleko) oziroma 0,01 M raztopino askorbinske kisline (za krvno plazmo).

Omočena stacionarna faza v kolonicah je zagotovila vezavo analitov. Pred eluiranjem smo kolonice še posušili in s tem zagotovili, da se je eluiral večji delež analitov. Sušenje je moralo biti dovolj dolgo, da se je stacionarna faza čim bolj posušila, hkrati pa smo želeli čim hitrejšo in učinkovitejšo analizo. Odločili smo se za čas sušenja 10 minut, saj se je pri tem času izkoristek ustalil in je ostal nespremenjen tudi pri daljših časih sušenja.

Topilo za eluiranje mora imeti podobne lastnosti kot ekstrakcijsko topilo, hkrati pa mora v nekaterih primerih še tako spremeniti fizikalno-kemijske lastnosti stacionarne faze v kolonicah, da je eluiranje analitov sploh mogoče. Za izbrano stacionarno fazo velja, da je eluiranje mogoče brez predhodne modifikacije, ki je potrebna pri ionsko-izmenjevalnih stacionarnih fazah (Boner in sod., 2003; Ngoh in sod., 2003; Zuccato in sod., 2005), zato smo kot mešanico topil izbrali MeCN/MeOH (1 : 1, v/v).

Po optimizaciji metode za čiščenje na trdni fazi smo se posvetili razvoju čiščenja vzorcev. Biološki vzorci veljajo za kompleksne matrikse predvsem zato, ker vsebujejo veliko različnih proteinov, ki lahko vežejo analite in s tem onemogočajo nadaljnjo analizo. Glavni cilj priprave vzorca za čiščenje na trdni fazi je bila zato prekinitev vezi med analiti in proteini ter obarvanje proteinov.

Osnova za pripravo vzorcev mleka je bilo poročilo o hidrolizi govejega mleka, ki so ga izdelali v Centralnem referenčnem laboratoriju EU v Berlinu (CRL, 2008c). V poročilu opisan postopek smo poenostavili in prilagodili večjim serijam vzorcev.

Uporabili smo encim β -glukoronidaza, ki smo ga dodali v vsak vzorec. Da bi ugotovili pogoje za čim hitrejšo hidrolizo s čim višjimi izkoristki, smo preizkusili delovanje encima v različnih časovnih intervalih in pri različnih temperaturah. Odločili smo se za hidrolizo z 10 μ L raztopine encima in 1 urno inkubacijo vzorca pri 37 °C.

Po hidrolizi smo vzorcem mleka dodali MeCN, ki je povzročil obarvanje proteinov. Po centrifugiranju smo proteinski del zavrgli, supernatant pa razredčili z 0,01 M vodno raztopino HCl.

Osnova priprave vzorcev krvne plazme je bila metoda za določanje diklofenaka in meloksikama v krvni plazmi, prav tako razvita v Centralnem referenčnem laboratoriju EU v Berlinu (CRL, 2008b). V poročilu opisani postopek smo poenostavili in ga prilagodili večjim serijam vzorcev.

Za hidrolizo smo uporabili 1 M vodno raztopino HCl, saj se je izkazala za dovolj agresivno sredstvo za prekinitev vezi med proteini in analiti. Ker nekatere nesteroidne protivnetne učinkovine razpadajo ob nizkih vrednostih pH, smo morali optimizirati čas inkubacije. V končni metodi smo vzorce inkubirali 10 minut, nato pa smo jim dodali 0,01 M vodno raztopino askorbinske kisline, ki je služila za stabilizacijo občutljivih analitov in dvig vrednosti pH na primerno raven za nanos vzorca na kolonice za ekstrakcijo na trdni fazi. Predhodno obarvanje proteinov pri krvni plazmi ni bilo potrebno.

Pri večini analiznih metod, objavljenih v dostopni literaturi, so avtorji uporabili enake tehnike priprave vzorca na čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi. Vzorce so najprej hidrolizirali (Jedziniak in sod., 2009), nato pa proteine oborili z dodatkom acetonitrila (Gowik in sod., 1998).

Očiščene ekstrakte mleka in krvne plazme smo pripravili na kromatografsko analizo tako, da smo jih prefiltrirali, saj se je s tem zvišala verjetnost, da med serijo vzorcev ni prišlo do napak na sistemu LC-MS/MS zaradi nečistoč v vzorcih, hkrati pa se je podaljšala življenjska doba instrumentalnega sistema. Prefiltrirane vzorce smo prenesli v konusne polipropilenske vialke.

5.4.2 KROMATOGRAFSKA ANALIZA IN MASNOSPEKTROMETRIČNA (MS/MS) DETEKCIJA

Ker imajo masni spektrometri specifične zahteve in omejitve pri izbiri mobilne faze, smo morali najti ustrezno stacionarno fazo, ki je zadovoljivo ločila izbrane analite. Zaradi omejenega območja pretoka mobilne faze, pri katerem je masni spektrometer deloval optimalno, smo morali izbrati ustrezno velikost delcev in dimenzije kolone.

Preizkusili smo kromatografske kolone, navedene v tabeli 8. Kot najprimernejša se je izkazala stacionarna faza Gemini C₁₈ (Phenomenex, ZDA) z delci velikosti 3 µm v koloni z dimenzijami 150 x 2 mm. Izbrana kolona je omogočala dovolj nizek pretok mobilne faze za optimalno delovanje masnega spektrometra in zadovoljivo ločitev analitov od komponent matriksa. S tem smo se izognili morebitnim neželenim interakcijam med samo meritvijo.

Pri analiznih metodah, objavljenih v dostopni literaturi, je večina avtorjev uporabila kromatografsko kolono s podobno stacionarno fazo, dimenzije pa so bile prilagojene glede na zahteve instrumenta in detektorja (Cristòfol in sod., 1998; Daeseleire in sod., 2003; Farrar in sod., 2002; Gowik in sod., 1998; Radhofer-Welte in Dittrich, 1998). Nekaj avtorjev se je odločilo za uporabo monolitne kolone (Damiani in sod., 2001; González Martín in sod., 2002; Hernando in sod., 2006; Ramos Payán in sod., 2009), vendar so navedene analizne metode vključevale največ štiri analite.

Ker smo za detekcijo uporabljali sistem MS/MS, popolna kromatografska ločba analitov ni bila pogoj za izvedbo analize. Naš cilj je bil časovno ločiti analite od komponent matriksa, ki lahko pri masni spektrometriji povzročajo zaplete, najpogostejša med njimi sta »zatiranje ionov« (ang. ion suppression) in »spodbujanje ionov« (ang. ion enhancement). Oba negativna pojava povzročata napake pri kvantifikaciji pri uporabi metode eksterne standarda.

Preizkusili smo več topil in kombinacij le-teh v izokratskem načinu črpanja mobilne faze in gradientu ter izvedli snemanje spektrov MS v pozitivnem in negativnem načinu ionizacije. Posamezen način snemanja spektrov zahteva specifične modifikatorje (pozitivni način ionizacije zahteva modifikatorje, ki spodbujajo nastanek kationov, negativni način pa modifikator, ki spodbuja nastanek anionov). Vsako od mobilnih faz smo preizkusili z dodatkom kisline (za pozitivni način merjenja) oziroma baze (za negativni način merjenja). Kot najoptimalnejši se je izkazal gradient iz mešanice MeCN/H₂O (1 : 1 (v/v)) v MeCN/H₂O (9 : 1 (v/v)), pri čemer smo v vsako od komponent dodali 0,05 % (v/v) mravljične kisline, s katero smo izboljšali ionizacijo pred masnospektrometrično meritvijo. Čas analize za posamezen vzorec je bil 15 minut, končni pogoji kromatografske analize pa so opisani v poglavju 3.6.7.4.

Tudi pri metodah, objavljenih v dostopni literaturi, je večina avtorjev za mobilno fazo uporabila mešanico acetonitrila in vode z dodatkom kisline za izboljšanje ionizacije (Dowling in sod., 2009; Gallo in sod., 2008; Peters in sod., 2009; Taggart in sod., 2007).

Kljub več objavljenim metodam za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin s sistemi LC-MS/MS, je nastavitve parametrov v instrumentalnem sistemu zaradi razlik v izdelavi prilagojena za vsak posamezen instrument. Naš cilj je bil optimizirati ionizacijo preučevanih analitov in hkrati zagotoviti čim nižje ozadje zaradi ionizacije mobilne faze, komponent matriksa in nečistoč v vzorcih. Na izbiro smo imeli dva načina ionizacije, in sicer kemijsko ionizacijo pri atmosferskem tlaku (ang. atmospheric pressure chemical ionization – APCI) in ionizacijo v elektrospreju (ang. electrospray ionization – ESI). Odločili smo se za slednjo, saj je v primerjavi z APCI manj selektivna (ionizira vse analite), predvsem pa APCI velja kot »trša« metoda ionizacije, pri kateri občutljivi matični ioni pogosto prehitro razpadejo na

manjše ione, posledično pa detektor nikoli ne zazna matičnega iona. Tudi v dostopni literaturi nismo zasledili uporabe ionizacije APCI, saj je večina avtorjev uporabila ionizacijo v elektrospreju (Gómez in sod., 2006; Hernando in sod., 2006; Igualada in sod., 2007).

Za izbrano ionizacijo v elektrospreju smo najprej preizkusili pozitivno polariteto. Ker so vsi analiti šibke kisline, bi morala biti optimalna polariteta negativna. S preizkušanjem različnih nastavitev pa smo ugotovili, da čeprav so bili matični ioni pri negativni polariteti res intenzivnejši, so bili ioni potomci le malokrat prisotni v merljivih količinah. S pozitivno polariteto pa so bile koncentracije matičnih ionov in ionov potomcev zadovoljive, hkrati pa je dodatek mravljične kisline mobilni fazi še zvišal intenziteto matičnih ionov in ionov potomcev.

Poiskati smo morali še optimalne napetosti kapilare, stožca, ekstraktorja in leče RF, optimalno temperaturo ionskega izvora in pomožnega (desolvacijskega) plina ter pretok plina na stožcu in pomožnega (desolvacijskega) plina. Iskanje optimalnih nastavitev je potekalo s preizkušanjem različnih kombinacij (ang. trial and error) in iteracijami postopka do zadovoljivih rezultatov. Napetost stožca je bila individualno nastavljena za vsak matični ion, drugi parametri pa so veljali za celotno analizno metodo. Končni pogoji za ionizacijo analitov so opisani v poglavju 3.6.7.5.

Glavni del meritve MS/MS oziroma del, kjer spektrometer loči ione glede na razmerje m/z (razmerje mase in naboja iona), poteka v masnem analizatorju. Instrument, ki smo ga uporabili, je opremljen z masnim analizatorjem tipa trojni kvadropol. V našem primeru je bila kolizijska celica (drugi »kvadropol«) sestavljena iz šestih elektrod, zato jo imenujemo tudi heksapol. Tak sistem omogoča več načinov sledenja ionom skozi analizator, npr. merjenje matičnih ionov, merjenje ionov potomcev, spremljanje nevtralne izgube mase (razlike v masi med matičnim ionom in ionom potomcem v obliki nevtralnih delov molekul, ki jih masni spektrometer drugače ni sposoben zaznati) in spremljanje masnih prehodov (ang. multiple reaction monitoring – MRM). Slednjega smo uporabili za merjenje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin, saj je izjemno specifičen in relativno hiter, kar dopušča meritev več analitov hkrati tudi ob nepopolni kromatografski ločbi.

Optimizirati smo morali parametre obeh kvadropolov (ločljivost visokih in nizkih mas, energija ionov), kolizijske celice (odprtost vhodne in izhodne zaslonke, trkalna energija) in globalne parametre, kot je pomnoževalni faktor. Zagotoviti smo morali dovolj dobro ionizacijo molekul analitov in njihovo stabilnost na poti do kolizijske celice, kjer smo matične ione razbili na ione potomce. Stremeli smo k čim bolj selektivnim razpadom matičnih ionov, kar smo dosegli z optimizacijo trkalne energije v kolizijski celici. Rezultat selektivnega razpada je bilo majhno število ionov potomcev, med katerimi je običajno eden prevladoval, kar nam je omogočalo nižje meje vrednotenja. Za vsak matični ion smo poiskali vsaj dva iona potomca, nato pa glede na razmerje signal/šum določili najustreznejše pare matični ion/ion potomec za meritve v končni metodi. Trkalna energija je bila posamično nastavljena za vsak par matični ion/ion potomec, drugi parametri pa so veljali za celotno metodo. Končni pogoji v masnem analizatorju in seznam parov matični ion/ion potomec, skupaj s trkalnimi energijami, so opisani v poglavju 3.6.7.5.

5.5 VALIDACIJA ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH UČINKOVIN

Razvito analizno metodo za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku smo morali pred uvedbo v laboratoriju ovrednotiti glede na zahteve EU (ES, 2002). Upoštevati smo morali vse kriterije in ovrednotiti vse naslednje parametre: selektivnost, specifičnost, linearnost, izkoristek, ponovljivost, obnovljivost, meja vrednotenja (LOQ), meja odločitve ($CC\alpha$), sposobnost določitve ($CC\beta$), stabilnost in robustnost.

Povzetek validacijskih parametrov je prikazan v tabelah 66–74.

Na splošno velja, da je selektivnost masnih spektrometrov med najboljšimi na področju kromatografskih detektorjev. Razlog za to je sposobnost instrumenta, da ločeno beleži signal za vsak ion oziroma za vsak par matični ion/ion potomec, kar v večini primerov izloči tudi morebitno ozadje iz kromatogramov.

Slaba stran tako visoke selektivnosti pa so vplivi matriksa na ionizacijo analitov. Ker ozadja na kromatogramih navadno ne vidimo, se lahko iz kolone istočasno eluirajo analiti in komponente matriksa, kar lahko povzroči »zatiranje ionov« (ang. ion suppression) oziroma »spodbujanje ionov« (ang. ion enhancement). Oba pojava lahko privedeta do statistično značilnih napak pri računanju koncentracij, zato moramo uporabiti tehnike, s katerimi lahko vpliv ozadja nadzorujemo. Ena izmed njih je ta, da v tok mobilne faze dodamo konstantno količino analitov, kot vzorec pa injiciramo slepi vzorec. Če komponente matriksa vplivajo na katerega od analitov, se to izrazi kot povišanje (če gre za spodbujanje ionov) oziroma znižanje (če gre za zatiranje ionov). Če matriks vpliva na ionizacijo analitov, moramo njegov vpliv odstraniti (največkrat z optimizacijo kromatografije) oziroma upoštevati v izračunih. Slednje izvedemo z uporabo internih standardov, ki so po kemijsko-fizikalnih lastnostih čim bolj podobni izbranim analitom. Najbolj se temu pogoju približajo izotopsko označeni analiti, kjer gre največkrat za zamenjavo atoma vodika z atomom devterija oziroma atoma ogljika ^{12}C z atomom ogljika ^{13}C .

Selektivnost metode smo prikazali na slikah 34–37 s primerjavo kromatogramov slepih vzorcev brez standardnih dodatkov in z njimi. Na zadrževalnih časih nesteroidnih protivnetnih učinkovin nismo pri nobenem matriksu odkrili interferenc endogenih spojin oziroma nečistoč, izhajajočih iz samega analiznega postopka.

Podobno kot pri selektivnosti veljajo masni spektrometri tudi za najbolj specifične na področju kromatografskih detektorjev. Z uporabo različnih masnih analizatorjev lahko izbiramo med ločljivostjo mas (s kakšno natančnostjo lahko izbrani instrument določi mase ionov), občutljivostjo detektorja in številom ionov oziroma ionskih parov, ki jih lahko detektor beleži sočasno.

Za izvedbo poskusa smo imeli na razpolago masni spektrometer s tremi kvadropoli, ki se ne ponaša z visoko ločljivostjo mas, je pa zato izjemno hiter pri beleženju ionov oziroma masnih prehodov in lahko sočasno meri do 20 masnih prehodov. V teoriji je sicer število masnih prehodov, ki jih lahko detektor izmeri sočasno, neomejeno, v praksi pa zgornjo mejo določajo občutljivost fotopomnoževalke oziroma fotodiode in hitrost delovanja elektronskih vezij v instrumentu. Če bi želeli meriti večje število analitov, bi s tem znižali občutljivost instrumenta in tvegali navzkrižno kontaminacijo v kolizijski celici. Navedenim slabostim bi se lahko izognili z uporabo daljše in bolj kompleksne kromatografije, ki bi analite razporedila v širše časovno območje izpiranja iz kolone, vendar bi bili kromatografski vrhovi pri tem pristopu širši in nižji (nižja občutljivost metode), podaljšal pa bi se čas analize in povečala poraba topil za posamezno analizo.

Analizna metoda je specifično ločila devet nesteroidnih protivnetnih učinkovin, to so bili karprofen, diklofenak, fluniksin, 5-hidroksi fluniksin, ketoprofen, meloksikam, oksifenbutazon, fenilbutazon in tolfenamska kislina v obliki standardov in v obeh preučevanih matriksih (slike 36–39).

Linearnost metode smo ovrednotili glede na regresijske in korelacijske parametre za umeritvene krivulje, ki smo jih dobili z merjenjem standardov oziroma slepih vzorcev s standardnimi dodatki na različnih koncentracijskih nivojih.

Linearnost meritev nesteroidnih protivnetnih učinkovin je bila dobra v topilu in matriksih na širokem koncentracijskem območju (tabela 68). Kvadrati korelacijskih koeficientov r^2 so bili nad 0,99, edina izjema je bil karprofen v topilu, kjer je bil r^2 0,989 (tabele 37–39, grafi 27–53).

Za ovrednotenje izkoristka smo dnevno analizirali šest paralelk na treh koncentracijskih nivojih, prikazanih v tabeli 9. Postopek smo ponovili še dvakrat.

V zakonodaji EU so predpisane absolutne vrednosti točnosti (pravilnosti), ki jih mora dosegati analizna metoda. V analiznih krogih se je kljub natančni definiciji tega parametra v zakonodaji EU uveljavilo mnenje, da se omejitve nanašajo na točnost in izkoristek (izplen) analize metode, čeprav definicija (poglavje 2.3.2.1 v Odločbi Komisije z dne 14. avgusta 2002 o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES (ES, 2002)) pravi, da so »...*priporočeni razponi odmika* pravilnosti (točnosti) *kvantitativnih metod eksperimentalno določene srednje masne frakcije*, korigirane z izplenom (izkoristkom), *od potrjene vrednosti...*« ter da so »...*podatki*, ki se korigirajo s povprečnim izplenom (izkoristkom), *sprejemljivi samo, kadar so v razponu, prikazanem v tabeli...*« in s tem jasno določa meje točnosti (pravilnosti) metode in ne izkoristka. Vendar pri večini presojevalcev prevladuje mnenje, da predpisi EU pri analiznih metodah za izvajanje veterinarskosanitarnega nadzora živil živalskega izvora zahtevajo vrednost izkoristka med 50 in 120 % za koncentracijsko območje pod 1 µg/kg, med 70 in 110 % za koncentracijsko območje med 1 in 10 µg/kg ter med 80 in 110 % za koncentracijsko območje nad 10 µg/kg (ES, 2002).

Čeprav bi odločba, ki bi predpisovala absolutne zahtevane vrednosti izkoristka, imela svoj namen, pa je po našem mnenju pomembnejša konstantnost izkoristka od vzorca do vzorca. Izkoristki, manjši od tistih, ki jih zahteva EU, povzročajo le zvišanje meje vrednotenja. Če je metoda dovolj občutljiva in natančna, to ne prispeva nikakršne napake h končnim rezultatom, ne glede na absolutno vrednost izkoristka. Če pa se izkoristek statistično značilno spreminja od vzorca do vzorca, bodo končni rezultati vsaj za del vzorcev napačni, ne glede na vrednost izkoristka. Temu se lahko izognemo z uporabo internega standarda, ki ga dodamo vsakemu vzorcu na začetku analiznega postopka.

Najnižje vrednosti izkoristkov smo izmerili pri ketoprofenu v mleku na koncentracijskem nivoju 1 µg/kg (60 %) in oksifenbutazonu v mleku na vseh treh koncentracijskih nivojih (63, 59 in 59 %). Najvišji izkoristek smo izmerili pri oksifenbutazonu v krvni plazmi na koncentracijskem nivoju 20 µg/kg (125 %). V preostalih primerih se je izkoristek gibal med 71 in 114 %, povprečje pa je bilo 90 % (tabele 40–45).

Podatki iz literature o izkoristkih t. i. multimetod za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin dosegajo podobne vrednosti, kot smo jih dosegli sami. Peters in sod. (2009) so izmerili izkoristke med 62 in 170 %, v to območje pa nista všteta nizka izkoristka fenilbutazona (32 %) in tenoksikama (47 %) ter izjemno visok izkoristek piroksikama (1274 %). Dowling in sod. (2009) so ovrednotili izkoristke med 82 in 108 %, Jedziniak in

sod. (2009) med 44 in 98 %, Gallo in sod. (2008) pa med 43 in 97 %, razen salicilne kisline, katere izkoristek je bil le ~20 %.

Za ovrednotenje ponovljivosti smo dnevno analizirali šest paralelk na treh koncentracijskih nivojih, prikazanih v tabeli 9. Postopek smo ponovili še dvakrat.

Povprečni relativni standardni odklik oziroma koeficient variacije je bil 15,9 % za mleko in 6,1 % za krvno plazmo s skupnim povprečjem 11,0 %. Najvišje vrednosti smo izmerili pri ketoprofenu v mleku na koncentracijskem nivoju 1 µg/kg (48,3 %) in diklofenaku v mleku na koncentracijskih nivojih 1 in 2 µg/kg (39,7 in 31,4 %), najnižje pa pri karprofenu v krvni plazmi na koncentracijskih nivojih 100 in 150 µg/kg (2,1 in 2,0 %). V preostalih primerih so se vrednosti koeficienta variacije ponovljivosti gibale med 2,2 in 25,2 % (tabele 46–51).

Za ovrednotenje znotrajlaboratorijske obnovljivosti smo dnevno analizirali šest paralelk na treh koncentracijskih nivojih, prikazanih v tabeli 9. Postopek smo ponovili še dvakrat, obakrat pa smo v metodo vnesli spremembe, kot so kemikalije drugih proizvajalcev, drug analitik in drug vir vzorcev.

Povprečni koeficient variacije obnovljivosti je bil 18,3 % za mleko in 7,6 % za krvno plazmo s skupnim povprečjem 13,0 % (tabele 52–57). Pri mleku smo opazili visoke vrednosti na najnižjem koncentracijskem nivoju pri diklofenaku (1 µg/kg; 50,2 %), ketoprofenu (1 µg/kg; 43,7 %) in oksifenbutazonu (5 µg/kg; 44,1 %), zato smo meje vrednotenja za te spojine ustrezno dvignili na koncentracije, pri katerih so bile vrednosti koeficientov variacije obnovljivosti pod 25 %.

Po predpisih EU mora biti vrednost KV manjša ali enaka vrednosti, izračunani po Horwitzovi enačbi (ES, 2002). Horwitzove vrednosti za koncentracijske nivoje, pri katerih smo ovrednotili najvišje vrednosti KV, so bile 45 % za 1 µg/kg (diklofenak in ketoprofen) in 36 % za 5 µg/kg (oksifenbutazon). Pri diklofenaku in ketoprofenu smo s tem razlogom dvignili meji vrednotenja na vrednost, pri kateri je ta parameter ustrezal zahtevam EU.

Meje vrednotenja smo ovrednotili glede na razmerje signal/šum manj občutljivega para matični ion/ion potomec za vsak analit. Najvišjo mejo vrednotenja smo ugotovili pri karprofenu (50 µg/kg v mleku in krvni plazmi), preostale meje vrednotenja pa so bile med 1 in 5 µg/kg za mleko in med 1 in 20 µg/kg za krvno plazmo (tabela 58).

V literaturi smo našli metode, ki imajo mejo vrednotenja nižjo od naših vrednosti (Boner in sod., 2003; Farrar in sod., 2002; González Martín in sod., 2002; Panus in sod., 1998). Poudariti pa velja, da so vse navedene metode namenjene ugotavljanju enega analita in so kot take lahko veliko bolj optimizirane za doseganje nizkih mej vrednotenja kot pa multimetode. Med metodami, s katerimi lahko določimo 5 ali več analitov hkrati, smo zasledili le tri, pri katerih so bile meje vrednotenja v istem koncentracijskem območju kot pri naši metodi (Dowling in sod., 2009; Gallo in sod., 2008; Jedziniak in sod., 2009). Metoda, ki so jo razvili Gallo in sod., je bila edina sposobna določiti večje število analitov kot naša metoda, vse druge pa so določale manjše število analitov ali pa so imele višje meje vrednotenja.

Za ovrednotenje meje odločitve ($CC\alpha$) in sposobnosti določitve ($CC\beta$) moramo razumeti α - in β -napako. Statistična α -napaka, imenovana tudi napaka vrste 1 (ang. »false positive« error), je napaka, ki jo storimo, če zavrnilo ničto hipotezo, ko je pravilna. V primeru veterinarsko-sanitarnega nadzora živil živalskega izvora je ničta hipoteza ta, da vzorec ustreza predpisom EU. Če smo storili α -napako, smo ustrezen vzorec pomotoma označili kot neustrezen. Vsakič, ko ugotovimo neskladje, je običajen postopek preverjanje rezultatov in morebitna ponovitev

analize za potrditev prvotnega rezultata. Če je med analizo prišlo do α -napake, jo ob ponovitvi analize odkrijemo in napako popravimo, zato α -napaka velja za manj kritično.

Meja odločitve je parameter, ki se pogosto povezuje z mejo zaznavnosti. Po definiciji je meja zaznavnosti najnižja vsebnost spojine, ki jo lahko ločimo od slepega vzorca z vnaprej določeno verjetnostjo (IUPAC, 2009). Meja odločitve je definirana kot najnižja vsebnost spojine, pri kateri lahko z vnaprej določeno verjetnostjo α -napake trdimo, da vzorec ni ustrezen (ES, 2002). Vrednost meje odločitve in meje zaznavnosti sta si v določenih primerih (prepovedane, neavtorizirane spojine) lahko podobni, večinoma pa se vrednost meje odločitve določi arbitrarno glede na potrebe, največkrat gre za zahteve EU glede najnižjih dovoljenih vsebnosti (ES, 2009).

Vrednosti $CC\alpha$ smo določili glede na zahteve EU (ES, 2002) in jih prikazali v tabeli 72. Predstavljajo meje koncentracijskih območij, v katerih lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da so analizirani vzorci neustrezni.

Statistična β -napaka, imenovana tudi napaka vrste 2 (ang. »false negative« error), je napaka, ki jo storimo, če potrdimo ničo hipotezo, ko ta ne drži. V primeru veterinarskosanitarnega nadzora živil živalskega izvora to pomeni, da smo neustrezen vzorec označili kot ustrezen. Ta vrsta napake je veliko bolj nevarna, saj vzorcev, ki jih označimo kot ustrezne, navadno ne preverjamo z dodatnimi analizami.

Podobno kot meja odločitve se tudi sposobnost določitve ($CC\beta$) loči od najbližjega kemijskega parametra, to je meje vrednotenja (LOQ). Pri LOQ gre za najnižjo vsebnost spojine, pri kateri lahko z vnaprej določeno napako izmerimo koncentracijo, sposobnost določitve pa je v predpisih EU definirana kot vsebnost spojine, ki jo lahko v vzorcih izmerimo z β -napako, manjšo od 5 %. To je lahko katera koli vrednost, ki ustreza definiciji, ne le najnižja.

Vrednosti $CC\beta$ smo ovrednotili glede na zahteve EU (ES, 2002) in jih prikazali v tabeli 72. Rezultati so meje koncentracijskih območij, v katerih lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da vzorci vsebujejo iskani analit in določimo njegovo koncentracijo s 5 % β -napako.

Stabilnost nesteroidnih protivnetnih učinkovin smo ovrednotili v topilu in mleku na časovnem intervalu 24 ur po prvem injiciranju. Spojine so bile stabilne tako v topilu kot v mleku, kar je razvidno iz grafov 54–71.

Pri fenilbutazonu in tolfenamski kislini v topilu smo opazili značilen »skok« signala pri času med 10 in 12 ur, ki je trajal do približno 20 ur. Z meritvami stabilnosti smo začeli v dopoldanskem času dneva, kar pomeni, da časovne točke v razmiku 10–12 ur ustrezajo uri, pri kateri sta se v laboratoriju, v katerem je bil nameščen instrument, spremenila temperatura in zračni tlak. Predvsem sprememba temperature ima lahko v določenih primerih velik vpliv na občutljivost detektorja, kar smo opazili tudi pri rutinskih meritvah vzorcev.

Robustnost analizne metode smo preverjali glede na pogoje inkubacije v mleku in glede na živalsko vrsto (za krvno plazmo in mleko).

Pri pogojih inkubacije smo pokazali značilne razlike pri fluniksinu, inkubiranjem 60 minut pri 34 °C in 60 minut pri 40 °C, ter oksifenbutazonu, inkubiranjem 60 minut pri 40 °C (tabela 63).

Pri hidrolizi mleka moramo skrbno nadzorovati temperaturo in čas inkubacije, saj lahko odstopanja od predpisanih vrednosti vnesejo napako v meritve. Če upoštevamo temperaturo

do 1 °C natančno in čas inkubiranja do 15 minut natančno, ne bi smeli opaziti značilnih razlik med vzorci, ki bi bile posledica različnih pogojev inkubacije.

Iz rezultatov je razvidno, da je metoda robustna in ustrezna za večino živalskih vrst, izjeme so bili oksifenbutazon v steriliziranem mleku (tabela 64), 5-hidroksi fluniksin v konjski plazmi in tolfenamska kislina v plazmi kuncev (tabela 65).

Večina analiz se izvaja na vzorcih surovega mleka, kjer nismo našli odstopanj pri nobeni od preučevanih živalskih vrst. Pri analizi krvne plazme pa moramo biti previdni pri konjih in kuncih, saj smo opazili značilne razlike glede na druge živalske vrste. Morebitnim razlikam zaradi različnih živalskih vrst bi se lahko izognili z uporabo internih standardov.

Končna metoda se je izkazala kot primerna za uporabo pri državnem veterinarskosanitarnem nadzoru nesteroidnih protivnetnih učinkovin v živilih živalskega izvora. Ustrezala je vsem zahtevam EU glede opravljanja analiznih metod in razlage rezultatov (ES, 2002), kar smo dokazali z njeno validacijo za mleko in krvno plazmo. Metodo za določanje ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin smo vpeljali v Nacionalni referenčni laboratorij za ostanke veterinarskih zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora kot presejalno in potrditveno metodo, s katero smo od leta 2005 do konca leta 2009 analizirali prek 600 vzorcev mleka in prek 100 vzorcev krvne plazme. V letu 2009 je bila metoda za mleko tudi akreditirana v skladu s standardom ISO 17025 (ISO, 2005a).

6 SKLEPNE UGOTOVITVE

V treh raziskovalnih sklopih v okviru doktorske disertacije smo raziskali različne vidike zagotavljanja higiene in varnosti živil in ugotovili naslednje:

Koncentracijski profili in farmakokinetični parametri ivermektina in doramektina, podkožno vnešenih ovcam pasme istrska pramenka v odmerku 0,2 mg/kg t. m., so se ujemali s podatki, objavljenimi v dostopni literaturi. Najvišja povprečna koncentracija ivermektina v krvni plazmi je bila 13 µg/L, doramektina pa 38 µg/L in je bila za ivermektin dosežena v 3,3 dneh, za doramektin pa v 1,9 dneva. Izločitveni časi so bili pri obeh avermektinih dolgi, kar se je skladalo z njunim lipofilnim značajem.

Ob sočasnem podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in verapamila v odmerku 3 mg/kg t. m., ki smo ga v obdobju 24 ur ponovili še dvakrat, so se nekateri farmakokinetični parametri statistično značilno spremenili. Po pričakovanjih smo izmerili višje vrednosti $C_{\max}$ in nižje vrednosti $T_{\max}$. Presenetili so nas rezultati izračuna srednjega časa zadrževanja (MRT) in biološke razpolovne dobe ($t_{1/2}$), ker niso bili primerljivi s podatki v dostopni literaturi. Kot možno razlago smo navedli nedavne ugotovitve, da verapamil v nizkih koncentracijah ne deluje kot inhibitor transportnega proteina P-gp, ampak ga celo dodatno aktivira.

Farmakokinetični parametri doramektina se ob sočasnem vnosu verapamila niso statistično značilno spremenili. Kljub temu smo opazili podoben trend kot pri ivermektinu, to sta bili višji vrednosti AUC in $C_{\max}$ ter nižji vrednosti MRT in $T_{\max}$. Vpliv verapamila na farmakokinetiko doramektina je bil v nizkih koncentracijah enak kot pri ivermektinu.

Vloge P-gp pri izločanju avermektinov iz krvne plazme v mleko nam ni uspelo potrditi, prav tako pa rezultati poskusa aktivne vloge P-gp niso zavrnil.

Hipoteze, da bi z modifikacijo izločanja avermektinov znižali njihovo vsebnost v mleku, kar bi omogočilo zdravljenje in profilakso s širšim naborom protiparazitnih zdravil in s tem pripomoglo k boljši zdravstveni oskrbi živali, hkrati pa izboljšalo ekonomsko upravičenost zdravljenja zaradi manjše količine mleka, neustreznega za prehrano ljudi, nam ni uspelo potrditi.

Za ugotavljanje obstojnosti in porazdelitve eprinomektina v mlečnih izdelkih smo prilagodili obstoječo analizo metodo za določanje eprinomektina v mleku, ki uporablja HPLC s fluorescenčno detekcijo. Prilagojeno metodo smo ovrednotili za potrebe raziskovalne dejavnosti glede na naslednje parametre: selektivnost, specifičnost, linearnost, izkoristek, znotrajlaboratorijska obnovljivost, meja vrednotenja in stabilnost.

Po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m. 30 ovcam pasme istrska pramenka, smo ostanke učinkovine ugotovili v vseh vrstah mlečnih izdelkov, razen v sekundarni sirotki. Po pričakovanjih so bile najvišje koncentracije eprinomektina (15 µg/kg) v matriksih z najvišjo vsebnostjo maščobe in suhe snovi, to so zoren (30 in 60 dni) in sveži sir ter albuminska skuta, ugotovili pa smo jih drugi oziroma tretji dan po vnosu.

Koncentracije eprinomektina v mlečnih izdelkih so bile med celotnim poskusom pod mejno vrednostjo, ki jo za mleko predpisuje zakonodaja EU.

Eprinomektin se je izkazal za obstojno spojino tako med toplotno kot med fermentacijsko predelavo mleka v mlečne izdelke.

Za potrebe državnega veterinarsko-sanitarnega nadzora nesteroidnih protivnetnih učinkovin v živilih živalskega izvora smo razvili analizno metodo za ugotavljanje njihovih ostankov z uporabo LC-MS/MS. Metodo smo ovrednotili glede na naslednje parametre: selektivnost, specifičnost, linearnost, izkoristek, ponovljivost, znotrajlaboratorijska obnovljivost, meja vrednotenja, meja odločitve ($CC\alpha$), sposobnost določitve ($CC\beta$), stabilnost in robustnost. Analizna metoda je povsem ustrezala zahtevam analizne zakonodaje EU.

Metoda je dosegla nižje meje vrednotenja kot metode, objavljene v dostopni literaturi, s katerimi lahko sočasno določimo podobno število analitov.

Ovrednotenje robustnosti analizne metode je pokazalo, da je treba skrbno nadzorovati pogoje inkubacije mleka ter pri analizi krvne plazme različnih živalskih vrst uporabljati interne standarde.

Analizno metodo ugotavljanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku smo uspešno uvedli v Nacionalni referenčni laboratorij za ostanke veterinarskih zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora, kjer se uporablja kot presejalna in potrditvena metoda za izvajanje državnega veterinarskosanitarnega nadzora živil. Od leta 2005 naprej smo tako analizirali več kot 600 vzorcev mleka in več kot 100 vzorcev krvne plazme. V letu 2009 je bila metoda za mleko tudi akreditirana v skladu s standardom ISO 17025.

7 POVZETEK

V okviru doktorske disertacije smo razvili in uporabili analizne metode za določanje ostankov nekaterih veterinarskih zdravil v živilih živalskega izvora za raziskovanje vloge transportnih proteinov pri izločanju učinkovin iz krvne plazme v mleko in vpliva inhibitorjev transportnih proteinov na farmakokinetiko izločanja ter za preučevanje obstojnosti veterinarskih zdravil med postopki predelave mleka v mlečne izdelke. Analizne metode smo ustrezno ovrednotili in uvedli v Nacionalni referenčni laboratorij za ostanke veterinarskih zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora za izvajanje veterinarskosanitarnega nadzora živil.

V poglavju Podatki iz literature smo predstavili fizikalno-kemijske lastnosti preučevanih avermektinov, njihove farmakokinetične in farmakodinamske lastnosti ter podatke o vlogi P-gp pri transportu avermektinov v organizmu. Predstavili smo še podatke o obstojnosti avermektinov, predvsem med toplotno in fermentacijsko predelavo mleka v mlečne izdelke in analizne postopke za določanje avermektinov. Drugi del poglavja o podatkih iz literature je bil namenjen predstavitvi nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAIDs) in njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Opisali smo še biokemijske procese vnetja in orisali vlogo NSAIDs kot inhibitorje teh procesov. Predstavili smo uporabo NSAIDs v veterinarski in humani medicini ter ostanke NSAIDs v živilih živalskega izvora z vidika higiene živil. Zadnji del poglavja je bil namenjen predstavitvi obstoječih analiznih metod določanja ostankov NSAIDs.

Med prvim poskusom smo prvima dvema skupinama po šest ovc mlečne pasme istrska pramenka podkožno vnesli ivermektin oziroma doramektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m., drugima dvema skupinama, prav tako po šest živali, pa smo sočasno podkožno vnesli ivermektin oziroma doramektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in verapamil v odmerku 3 mg/kg t. m., ki smo ga vnesli v enakem odmerku še dvakrat, in sicer 12 in 24 ur po prvem vnosu.

Z analizo bioloških tekočin smo ovrednotili farmakokinetične parametre izločanja navedenih antiparazitikov iz krvne plazme v mleko ter poskušali ugotoviti vlogo transportnih proteinov pri tem procesu. Odkrili smo statistično značilne razlike med farmakokinetičnimi parametri ivermektina in doramektina, ki so bili najverjetneje posledica različnih fizikalno-kemijskih lastnosti, vezanih na kemijsko strukturo. Druga možna razlaga za izmerjene razlike je bila različna afiniteta transportnega proteina P-gp do obeh spojin, ki je prav tako pogojena s kemijsko strukturo.

Ob sočasnem vnosu verapamila so se nekateri farmakokinetični parametri ivermektina statistično značilno spremenili. Pri doramektinu smo zaznali podoben trend kot pri ivermektinu, ni pa nam uspelo potrditi statistično značilnih razlik. Kljub opaženim spremembam farmakokinetičnih parametrov ob sočasnem vnosu verapamila se razmerje med vsebnostjo avermektinov v krvni plazmi in mleku ni spremenilo, kar nakazuje na možnost, da je glavni mehanizem transporta avermektinov iz krvne plazme v mleko pasivna difuzija. Glavna delovna hipoteza tega poskusa je bila, da bi z morebitnim znižanjem oziroma zaustavitvijo prehoda avermektinov iz krvne plazme v mleko lahko omogočili večjo izbiro pri uporabi avermektinov pri živalih, katerih mleko je namenjeno prehrani ljudi. To bi predstavljalo pomemben prispevek k poznavanju farmakokinetike avermektinov in k zdravstveni oskrbi živali, saj bi imeli širši nabor zdravil, kar bi preprečevalo razvoj rezistence, prav tako pa bi se izboljšala ekonomična upravičenost zdravljenja in profilakse, saj bi se količine mleka, neustreznega za prehrano ljudi, zmanjšale. Za potrditev hipoteze, da P-gp sodeluje pri prehodu avermektinov iz krvne plazme v mleko in morebitni regulaciji njegove aktivnosti in s tem koncentracije avermektinov v mleku, so potrebni nadaljnji poskusi.

Pri drugem poskusu smo 30 ovcam vnesli eprinomektin s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m. ter vzorčili skupne dnevne vzorce mleka, ki smo jih nato s termično obdelavo in fermentacijo predelali v naslednje mlečne izdelke: albuminsko skuto, sveži sir, zoren sir (30 in 60 dni), jogurt iz surovega in termično obdelanega mleka ter primarno in sekundarno sirotko. Z uporabo prilagojene analizne metode za določanje ostankov eprinomektina s HPLC s fluorescenčno detekcijo, katere osnova sta bili metodi, ki sta ju razvila Cerkvénik (2001) in Danaher s sod. (2001b), smo v mlečnih izdelkih določili koncentracije eprinomektina ter s podatki o vsebnosti maščobe in suhe snovi ovrednotili obstojnost eprinomektina med predelavo mleka. Predhodno ovrednotenje je dokazalo primernost uporabljene analizne metode za predvideno raziskovalno delo.

Ostanke eprinomektina smo zaznali v vseh matriksih, razen sekundarni sirotki, kjer so bile vsebnosti eprinomektina pod mejo vrednotenja analizne metode (0,5 µg/kg) med celotnim poskusom. Ostanke so se zadrževali v mlečnih izdelkih dlje kot v mleku, najdlje (do 44. dne po vnosu) pa v matriksih z visoko vsebnostjo maščobe in suhe snovi. Najvišje koncentracije ostankov eprinomektina smo izmerili v zorenih sirih, kjer je bila najvišja vsebnost 15 µg/kg, kar pa je še vedno pod mejo 20 µg/kg, ki jo za mleko dopuščajo predpisi EU (ES, 2009).

V zadnjem sklopu doktorskega dela smo razvili analizno metodo za določanje ostankov NSAIDs z uporabo LC-MS/MS v krvni plazmi in mleku. Osnova so bile metode, ki so jih razvili Antonić in Heath (2007) ter Centralni referenčni laboratorij EU v Berlinu (CRL, 2008b; 2008c). Metodo smo ovrednotili glede na analizne zahteve zakonodaje EU (ES, 2002).

Z optimizirano metodo smo lahko določili devet analitov (diklofenak, fenilbutazon, fluniksini, 5-hidroksi fluniksini, karprofen, ketoprofen, meloksikam, oksifenbutazon in tolfenamska kislina) na koncentracijskem območju od 1 do 50 µg/kg, kar je najnižje glede na dostopno literaturo. Z validacijskimi parametri smo potrdili ustreznost metode glede na predpisane analizne standarde. Z metodo smo specifično in selektivno ločili izbrane analite od ozadja, linearnost meritev pa je bila ustrezna na širokem koncentracijskem območju (1000–0,1 µg/kg) v mleku ($r^2 \geq 0,997$) in krvni plazmi ($r^2 \geq 0,999$). Povprečen izkoristek je bil glede na koncentracijsko območje in vrsto matriksa med 76 in 102 %, povprečni koeficient variacije ponovljivosti med 9 in 15 %, povprečni koeficient variacije znotrajlaboratorijske obnovljivosti pa med 9 in 18 %. Poleg meje odločitve ($CC\alpha$) in sposobnosti določitve ($CC\beta$) (tabela 72) smo ovrednotili še robustnost metode. Statistično značilne razlike smo odkrili pri spremenjeni temperaturi inkubacije za fluniksini in oksifenbutazon v mleku, ter pri analizi krvne plazme konjev in kuncev. Prvemu neskladju se izognemo z dovolj natančnim uravnavanjem temperature inkubacije, drugemu pa se lahko izognemo z uporabo internih standardov.

Analizna metoda določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin je bila uspešno uvedena in se od leta 2005 naprej uporablja kot presejalna in potrditvena metoda za izvajanje državnega veterinarskosanitarnega nadzora v Nacionalnem referenčnem laboratoriju za ostanke veterinarskih zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Leta 2009 je bila metoda za mleko tudi akreditirana v skladu s standardom ISO 17025 (ISO, 2005a).

8 SUMMARY

The doctoral thesis was aimed at developing and applying analytical methods to determine certain veterinary drug residues in food of animal origin, to apply these methods to investigate the role of transport proteins in pharmacokinetics of veterinary drug excretion from blood plasma into milk, effects of transport protein inhibition on excretion pharmacokinetics, and to determine the fate of these drugs during processing of milk into milk products. Analytical methods were validated and deployed in the National Reference Laboratory for veterinary drug residues and contaminants in food of animal origin for the purpose of official state residue monitoring.

Physicochemical, pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of avermectins and the involvement of P-gp in drug transport are presented in chapter entitled "Podatki iz literature". Additional data on avermectin stability during thermal and fermentation processes for milk product manufacturing were also presented. The second part of this chapter describes the properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), processes involved in inflammatory response and the role of NSAIDs as their inhibitors. The use of NSAIDs in human and veterinary medicine and their implications for drug residues in food of animal origin are described. The last part of the chapter is a short summary of analytical methods to determine NSAIDs found in accessible literature.

In the first experiment, two groups of six ewes of Istrian Pramenka dairy breed were subcutaneously administered ivermectin (IVM) or doramectin (DOR) at a dose of 0.2 mg/kg b.w. Two more groups, also of six ewes each, were subcutaneously co-administered verapamil (VER) at a dose of 3 mg/kg b.w. in addition to IVM or DOR administration. Administration of VER was repeated twice at the same dose in the 24 hours after the initial administration.

Analysis of blood plasma and milk yielded pharmacokinetic parameters of IVM and DOR. We used the results to study the involvement of transport proteins in excretion of avermectins from blood plasma into milk. We discovered statistically significant differences between IVM and DOR pharmacokinetics, which were most likely the result of differing physicochemical properties, originating from different chemical structure of the molecules. Another possible explanation could be the difference in P-glycoprotein (P-gp) affinity, which also originates in different chemical structures.

While we observed statistically significant changes in pharmacokinetics of IVM with co-administration of VER, the same was not true for DOR, despite a similar trend observed as with IVM. Even changing blood plasma concentration levels does not affect the ratio between blood plasma and milk, indicating that the main mechanism of avermectin excretion from blood plasma into milk is passive diffusion. The main hypothesis of the experiment was that we could influence the concentration levels of avermectins in milk by inhibiting transport proteins such as P-gp. This would contribute to the knowledge of avermectin pharmacokinetics and in turn enable the use of more anti-parasitic drugs, resulting in more efficient health care, less chance of parasite resistance and better economic viability of treating milk producing animals. Further experiments are needed to confirm this hypothesis.

In the second experiment, 30 sheep were topically administered eprinomectin (EPR) at a dose of 1 mg/kg b.w. as a pour-on. We sampled collective milk samples and processed them into milk products, such as albumin cheese, curd, ripened cheese (30 and 60 days), yogurt from raw and pasteurized milk, whey and whey without albumins and globulins. We modified a

method developed by Cerkvénik (2001) and Danaher et. al. (2001b), and applied it to analysis of milk products to investigate EPR concentration levels for each matrix. Concentrations coupled with fat and solid content of matrices investigated were used to study the fate of EPR during milk processing. The modified analytical method was validated and proved to be fit for research purposes.

EPR residues were detected in all matrices except for whey without albumins and globulins, where EPR concentration was below the quantification limit (0.5 µg/kg) for the entire experiment. We measured EPR residues in ripened cheese as long as 44 days post EPR administration, mainly due to its high fat and solid contents and lipophilicity of EPR. The highest EPR content was measured in ripened cheese (60 days) at a concentration of 15 µg/kg, which was still below the maximum residue level established by EU legislation for raw bovine milk (ES, 2009).

During the last experiment we developed an analytical method to determine NSAID residues in blood plasma and milk using LC-MS/MS. We based our method on analytical procedures published by Antonić and Heath (2007) and the Community Reference Laboratory of the EU in Berlin (CRL Berlin, 2008a; 2008b). The method was validated according to the EU analytical legislation (ES, 2002).

The method developed was able to simultaneously determine nine NSAIDs (carprofen, diclofenac, flunixin, 5-hydroxy flunixin, ketoprofen, meloxicam, oxyphenbutazone, phenylbutazone and tolfenamic acid) in concentrations ranging from 1 to 50 µg/kg per substance. These are the lowest of any multi-residue method we could find in accessible literature. The method was validated and proved to be selective, specific and linear on broad concentration range (1000–0.1 µg/kg) both in milk ($r^2 \geq 0.997$) and blood plasma ($r^2 \geq 0.999$). Mean recovery was between 76 and 102% depending on concentration level and type of matrix. Mean CV was between 9 and 15% for repeatability and between 9 and 18% for within-laboratory reproducibility. Detection capability ($CC\alpha$), decision limit ($CC\beta$) (Table 72) and ruggedness were also validated. It was discovered that special care should be taken regarding time and temperature of milk sample hydrolysis, and that an internal standard should be used when performing analysis of blood plasma samples from different animal species simultaneously.

The analytical method to determine NSAIDs was successfully implemented in the National Reference Laboratory for veterinary drug residues and contaminants in food of animal origin at Veterinary Faculty of University of Ljubljana. Since 2005, it has been used as a screening and confirmatory method to analyze more than 600 milk and more than 100 blood plasma samples for the purposes of official state residue monitoring in Slovenia, and was accredited in 2009 for milk according to the standard ISO 17025 (ISO, 2005b).

9 ZAHVALA

Za nastanek doktorskega dela se moram zahvaliti vsem, ki so me že od nekdaj navduševali nad opazovanjem in preučevanjem sveta, vsem ki so me spodbujali k radovednosti, raziskovanju in razumevanju. Odgovori na zastavljena vprašanja mi velikokrat niso bili vseh, vedno pa sem se iz njih naučil nekaj novega, nekaj, kar mi je odprlo pot k novim vprašanjem, k novim razmišljanjem, k novem razumevanju.

Veliko več kot samo zahvalo dolgujem mentorici dr. Vesni Cerkvenik Flajs za njeno vodenje pri doktorskem delu in mentorstvo pri disertaciji, za vpogled v nova znanstvena področja, za vso znanje ki ste mi ga podarila. Hvala za vašo neizmerno potrpežljivost, za vaš čas in za nov pogled na znanost in svet. Vi ste razlog da ta disertacija sploh obstaja.

Zahvalil bi se dr. Iztoku Grabnarju za vpogled v svet farmakokinetike, za somentorstvo pri izdelavi disertacije, za pomoč in vodenje pri raziskovalnem delu, za nasvete in pripombe s katerimi je doktorsko delo pridobilo na kakovosti, strokovnosti in estetiki.

Iz vsega srca se zahvaljujem dr. Matiji Strliču, ki me je navdušil nad analizo kemijo. Hvala ker ste me sprejeli na študentsko prakso, ker ste mi omogočili mojo prvo znanstveno predstavitev in mi stali ob strani tekom študija ter me vzpodbujali vse do cilja. Brez Vas prav gotovo ne bi ubral poti po kateri hodim danes.

Zahvala gre vsem sodelavcem, ki so mi pomagali pri raziskovalnem delu. Predvsem bi se rad zahvalil Luku in Adici za pomoč v laboratoriju, za nasvete in za družbo ob kavi. Zahvalil bi se tudi dr. Nevenki Kožuh Eržen za pomoč pri delu ter za pripombe in nasvete ki so pripomogli k nastanku disertacije.

Za del disertacije, ki je nastal na Inštitutu za mlekarstvo Biotehniške fakultete, se moram zahvaliti dr. Bogdanu Perkotu, ki mi je omogočil opravljanje poskusov in me naučil vse kar moram vedeti o mleku, sirih in jogurtih (in še marsičem drugem).

Posebna zahvala pripada moji družini, ki mi je skozi desetletja stala ob strani in mi pomagala ob vsakem koraku na poti odraščanja. Hvala za vso pomoč, odrekanje in vzpodbude brez katerih tega dela ne bi bilo.

Zahvalil bi se vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani in pomagali pri reševanju problemov, predvsem tistih neznansvenih.

Ne smem pozabiti na osebje Centra za sonaravno rekultiviranje Vremščica in na njihovo pomoč pri izvajanju poskusov. Zahvala gre tudi šekastim in volnenim stanovalkam omenjenega centra, brez katerih poskusi ne bi bili mogoči.

Zahvaliti se moram tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, ki je preko programa Mladi raziskovalec financirala moje raziskovalno delo in podiplomski študij, ter Inštitutu za higieno živil in bromatologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer sem opravljal raziskovalno delo.

Hvala Urški ki me je vedno, ne le v času študija, vzpodbujala in stala ob strani, ko sem potreboval pomoč.

HVALA!!!

10 LITERATURA

1. Adams RH (2009). Prostaglandins, related factors and cytokines. In: Riviere JE, Papich MG, eds. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9th ed. Ames: Wiley-Blackwell, 439-55.
2. Albers-Schönberg G, Arison BH, Chabala JC et al. (1981). Avermectins. Structure determination. *J Am Chem Soc* 103:4216-21.
3. Albrecht C, Thormann W (1998). Determination of naproxen in liver and kidney tissues by electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* 802(1):115-20.
4. Alcorn J, Lu X, Moscow JA, McNamara PJ (2002). Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther* 303(2):487-96.
5. Ali DN, Hennessy DR (1996). The effect of level of feed intake on the pharmacokinetic disposition and efficacy of ivermectin in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 19(2):89-94.
6. Ali MS, Sun T, McLeroy GE, Phillippo ET (2000). Confirmation of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J AOAC Int* 83(1):39-52.
7. Alvinerie M, Sutra JF, Capela D et al. (1996). Matrix solid-phase dispersion technique for the determination of moxidectin in bovine tissues. *Analyst* 121(10):1469-72.
8. Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P (1993). Ivermectin in goat plasma and milk after subcutaneous injection. *Vet Res* 24(5):417-21.
9. Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P, Mage C (1999). Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. *Res Vet Sci* 67(3):229-32.
10. Anastasio A, Veneziano V, Capurro E et al. (2005). Fate of eprinomectin in goat milk and cheeses with different ripening times following pour-on administration. *J Food Prot* 68(5):1097-101.
11. Anderson KL, Smith AR, Shanks RD, Davis LE, Gustafsson BK (1986). Efficacy of flunixin meglumine for the treatment of endotoxin-induced bovine mastitis. *Am J Vet Res* 47(6):1366-72.
12. Ansel HC, Allen LV, Popovich NG (1999). *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 7th ed. Baltimore: Lippincott-Williams & Wilkins, 298-315.
13. Antonian L, DeMontigny P, Wislocki PG (1998). An automated method for the determination of subnanogram concentrations of eprinomectin in bovine plasma. *J Pharm Biomed Anal* 16(8):1363-71.
14. Antonić J, Heath E (2007). Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Anal Bioanal Chem* 387(4):1337-42.
15. AOAC International (2002). AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods. http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf <23.02.2010>
16. Arena JP, Liu KK, Paress PS, Cully DF (1991). Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 40(3):368-74.
17. Arena JP, Liu KK, Paress PS et al. (1995). The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J Parasitol* 81(2):286-94.

18. Arena JP, Liu KK, Paress PS, Schaeffer JM, Cully DF (1992). Expression of a glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin. *Mol Brain Res* 15(3/4):339-48.
19. Atherton C, Jones J, McKaig B et al. (2004). Pharmacology and gastrointestinal safety of lumiracoxib, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor: an integrated study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2(2):113-20.
20. Baert K, De Backer P (2003). Comparative pharmacokinetics of three non-steroidal anti-inflammatory drugs in five bird species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134(1):25-33.
21. Ballent M, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C (2007). Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. *J Vet Pharmacol Ther* 30(3):242-8.
22. Baoliang P, Yuwan W, Zhende P, Lifschitz AL, Ming W (2006). Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following subcutaneous administration to lactating dairy cattle. *Vet Res Commun* 30(3):263-70.
23. Baron JA, Cole BF, Sandler RS et al. (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 348(10):891-9.
24. Bassissi MF, Alvinerie M, Lespine A (2004). Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. *Comp Biochem Physiol C* 138(4):437-44.
25. Beck E, Sieber WJ, Trejo R (2005). Management of cluster headache. *Am Fam Physician* 71(4):717-24.
26. Bellamy WT (1996). P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:161-83.
27. Bengone-Ndong T, Ba MA, Kane Y, Sane I, Sutra JF, Alvinerie M (2006). Eprinomectin in dairy zebu Gobra cattle (*Bos indicus*): plasma kinetics and excretion in milk. *Parasitol Res* 98(6):501-6.
28. Boner PL, Liu DD, Feely WF, Robinson RA, Wu J (2003). Determination of flunixin in edible bovine tissues using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51(26):7555-9.
29. Boutaud O, Aronoff DM, Richardson JH, Marnett LJ, Oates JA (2002). Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10):7130-5.
30. Bradley RL Jr, Arnold E Jr, Barbano DM, Semerad RG, Smith DE, Vines BK (1992). Chemical and physical methods. In: Marshall RT, ed. *Standard methods for the examination of dairy products*. 16th ed. Washington: American Public Health Association, 493-4.
31. Brink C, Dahlen SE, Drazen J et al. (2003). International union of pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol Rev* 55(1):195-227.
32. Brooks MW, Uden PC (1995). The determination of abamectin from soil and animal tissue by supercritical fluid extraction and fluorescence detection. *Pestic Sci* 43(2):141-6.
33. Brune K, Hinz B (2004). Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol* 33(1):1-6.
34. Burg RW, Miller BM, Baker EE et al. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother* 15(3):361-7.
35. Campanella L, Di Persio G, Pintore M et al. (2009). Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in milk and fresh cheese based on the inhibition of cyclooxygenase. *Food Technol Biotechnol* 47(2):172-7.

36. Cerkvenik-Flajs V, Grabnar I, Kožuh Eržen N et al. (2007). Kinetics of abamectin disposition in blood plasma and milk of lactating dairy sheep and suckling lambs. *J Agric Food Chem* 55(23):9733-8.
37. Cerkvenik-Flajs V, Grabnar I, Kožuh Eržen N et al. (2005). Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and suckling lambs. *Anal Chim Acta* 529:353-9.
38. Cerkvenik-Flajs V, Milčinski L, Süßinger A, Danaher M, Antonić J (2008). Determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. In: *Residues of veterinary drugs in food: proceedings of the Euroresidue VI conference*. Egmond aan Zee, 407-12.
39. Cerkvenik-Flajs V, Milčinski L, Süßinger A, Hodošek L, Danaher M, Antonić J (2010). Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chim Acta* 663(2):165-71.
40. Cerkvenik V (2000). Ostanki ivermektina v ovčji plazmi in mleku ter vpliv toplotne obdelave in mlečnokislinske fermentacije na njihovo vsebnost v mlečnih izdelkih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani. Doktorska disertacija.
41. Cerkvenik V (2001). Analytics of ivermectin residues in blood plasma and food of animal origin. *Slov Vet Res* 38(2):139-52.
42. Cerkvenik V, Grabnar I, Skubic V et al. (2002). Ivermectin pharmacokinetics in lactating sheep. *Vet Parasitol* 104(2):175-85.
43. Cerkvenik V, Perko B, Rogelj I et al. (2004). Fate of ivermectin residues in ewes' milk and derived products. *J Dairy Res* 71(1):39-45.
44. Chan LM, Lowes S, Hirst BH (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 21(1):25-51.
45. Chiu SH, Sestokas E, Taub R et al. (1986). Metabolic disposition of ivermectin in tissues of cattle, sheep, and rats. *Drug Metab Dispos* 14(5):590-600.
46. Cipollone F, Toniato E, Martinotti S et al. (2004). A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 291(18):2221-8.
47. Cleland TA (1996). Inhibitory glutamate receptor channels. *Mol Neurobiol* 13(2):97-136.
48. Cristòfol C, Pérez B, Pons M, Valladares JE, Martí G, Arboix M (1998). Determination of indomethacin residues in poultry by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 709(2):310-4.
49. CRL (2007a). CRL guidance paper (7 december 2007) on CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. Berlin: Community Reference Laboratory.
50. CRL (2007b). Evaluation of the 2006 National Residue Monitoring Plans and the 2005 results for substance groups: A5, A6, B2a, B2b and B2e: report. Berlin: Community Reference Laboratory, 1-8.
51. CRL (2008a). Evaluation of the 2007 national residue monitoring plans and the 2006 results for substance groups: A5, A6, B2a, B2b and B2e: report. Berlin: Community Reference Laboratory.
52. CRL (2008b). NSAIDs (DC and MLX) plasma (cattle and pig) including test of Strata X with LC-MS/MS. Berlin: Community Reference Laboratory.
53. CRL (2008c). Test hydrolysis - NSAIDs in milk from cattle with LC-MS/MS. Berlin: Community Reference Laboratory.
54. CRL (2009). Evaluation of the 2008 national residue control plans and the 2007 results for substance groups: A5, A6, B2a, B2b and B2e: report. Berlin: Community Reference Laboratory.
55. CRL Berlin (2008a). NSAIDs (DC and MLX) plasma (cattle and pig) including test of Strata X with LC-MS/MS. Interno gradivo.

56. CRL Berlin (2008b). Test hydrolysis - NSAIDs in milk from cattle with LC-MS/MS. Interno gradivo.
57. Crooks SRH, Baxter GA, Traynor IM, Elliott CT, McCaughey WJ (1998). Detection of ivermectin residues in bovine liver using an enzyme immunoassay. *Analyst* 123(2):355-8.
58. Daeseleire E, Mortier L, De Ruyck H, Geerts N (2003). Determination of flunixin and ketoprofen in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 488(1):25-34.
59. Damiani PC, Bearzotti M, Cabezon MA (2001). Spectrofluorometric determination of ibuprofen in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 25(3/4):679-83.
60. Danaher M, Howells LC, Crooks SR, Cerkvenik-Flajs V, O'Keeffe M (2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 844(2):175-203.
61. Danaher M, O'Keeffe M, Glennon JD (2000). Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up. *Analyst* 125(10):1741-4.
62. Danaher M, O'Keeffe M, Glennon JD (2001a). Extraction and isolation of avermectins and milbemycins from liver samples using unmodified supercritical CO₂ with in-line trapping on basic alumina. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 761(1):115-23.
63. Danaher M, O'Keeffe M, Glennon JD, Howells L (2001b). Development and optimisation of an improved derivatisation procedure for the determination of avermectins and milbemycins in bovine liver. *Analyst* 126(5):576-80.
64. de Montigny P (1994). Analytical procedure for the determination of MK-0397 in cattle milk. Merck Research Laboratories, Memo BMV0397LB1, 12 July 1994.
65. de Montigny P, Shim JS, Pivnichny JV (1990). Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. *J Pharm Biomed Anal* 8(6):507-11.
66. Doherty SJ, Fox A, Fink DW (1998). Liquid chromatographic determination of ivermectin in feed. *J AOAC Int* 81(4):869-72.
67. Donnelly MT, Hawkey CJ (1997). Review article: COX-II inhibitors-a new generation of safer NSAIDs? *Aliment Pharmacol Ther* 11(2):227-36.
68. Dowling G, Gallo P, Malone E, Regan L (2009). Rapid confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216(46):8117-31.
69. Dupuy J, Chartier C, Sutra JF, Alvinerie M (2001). Eprinomectin in dairy goats: dose influence on plasma levels and excretion in milk. *Parasitol Res* 87(4):294-8.
70. Durden DA (2007). Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850(1/2):134-46.
71. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM et al. (2004). Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 350(1):29-37.
72. Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS et al. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. *Antimicrob Agents Chemother* 15(3):372-8.
73. el Haj BM, al Ainri AM, Hassan MH, Bin Khadem RK, Marzouq MS (1999). The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine. *Forensic Sci Int* 105(3):141-53.

74. EMEA (1995). Ketoprofen: summary report. In: EMEA/MRL/020/95. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-4.
75. EMEA (1996). Ketoprofen: summary report (extension to pigs). In: EMEA/MRL/076/96-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-3.
76. EMEA (1999a). Carprofen: summary report (1). In: EMEA/MRL/042/95-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-4.
77. EMEA (1999b). Carprofen: summary report (2). In: EMEA/MRL/528/98-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-4.
78. EMEA (1999c). Meloxicam: summary report (1). In: EMEA/MRL/236/97-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-7.
79. EMEA (1999d). Meloxicam: summary report (2). In: EMEA/MRL/571/99-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-5.
80. EMEA (2000a). Flunixin: summary report (1). In: EMEA/MRL/661/99-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-11.
81. EMEA (2000b). Meloxicam (extension to bovine milk): summary report (4). In: EMEA/MRL/635/99-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-2.
82. EMEA (2000c). Meloxicam (modification for bovine): summary report (3). In: EMEA/MRL/634/99-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-2.
83. EMEA (2001a). Flunixin (extension to horses): summary report (2). In: EMEA/MRL/744/00-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-3.
84. EMEA (2001b). Meloxicam (extension to pigs): summary report (5). In: EMEA/MRL/765/00-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-3.
85. EMEA (2002). Meloxicam (extension to horses): summary report (6). In: EMEA/MRL/833/02-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-3.
86. EMEA (2005a). Carprofen (extension to dairy cattle): summary report (3). In: EMEA/MRL/914/04-final. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-3.
87. EMEA (2005b). COX-2 inhibitors in veterinary medicine. In: EMEA/CVMP/108858/2005-Rev1. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-4.
88. EMEA (2006). Meloxicam (extrapolation to rabbits and goats): summary report (7). In: EMEA/CVMP/152255/2006-final. London: European Agency for the Evaluation

- of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products, 1-9.
89. ES (1996). Direktiva Sveta 96/23/ES z dne 29. aprila 1996 o ukrepih za spremljanje nekaterih snovi in njihovih ostankov v živih živalih in v živalskih proizvodih ter razveljavitvi direktiv 85/358/EGS in 86/469/EGS in odločb 89/187/EGS in 91/664/EGS. UL L 125:10-27.
 90. ES (2002). Odločba Komisije z dne 14. avgusta 2002 o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES glede opravljanja analitskih metod in razlage rezultatov (notificirano pod dokumentarno številko K(2002)3044) (Besedilo velja za EGP) (2002/657/ES). UL L 221:8-36.
 91. ES (2004). Uredba (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali. UL L 165:1-141.
 92. ES (2006). Uredba Komisije (ES) št. 776/2006 z dne 23. maja 2006 o spremembi Priloge VII k Uredbi (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta glede referenčnih laboratorijev Skupnosti (Besedilo velja za EGP). UL L 136:3-8.
 93. ES (2009). Uredba (ES) št. 470/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 6. maja 2009 o določitvi postopkov Skupnosti za določitev mejnih vrednosti ostankov farmakološko aktivnih snovi v živilih živalskega izvora in razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 2377/90 in spremembi Direktive 2001/82/ES Evropskega parlamenta in Sveta ter Uredbe (ES) št. 726/2004 Evropskega parlamenta in Sveta (Besedilo velja za EGP). UL L 152:11-22.
 94. Farer LJ, Hayes J, Rosen J, Knight P (1999). Determination of emamectin benzoate in medicated fish feed. *J AOAC Int* 82(6):1281-7.
 95. Farrar H, Letzig L, Gill M (2002). Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 780(2):341-8.
 96. FDA (2009). COX-2 selective (includes Bextra, Celebrex, and Vioxx) and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm103420.htm#COX2> <2.12.2009>
 97. Feely WF, Chester-Yansen C, Thompson K et al. (2002). Flunixin residues in milk after intravenous treatment of dairy cattle with (14)C-flunixin. *J Agric Food Chem* 50(25):7308-13.
 98. Floate KD, Taylor WG, Spooner RW (1997). Thin-layer chromatographic detection of ivermectin in cattle dung. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 694(1):246-51.
 99. Fox A, Fink DW (1985). Determination of ivermectin in feeds by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 110(3):259-61.
 100. Gallo P, Fabbrocino S, Vinci F, Fiori M, Danese V, Serpe L (2008). Confirmatory identification of sixteen non-steroidal anti-inflammatory drug residues in raw milk by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(6):841-54.
 101. Gómez MJ, Petrović M, Fernández-Alba AR, Barceló D (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A* 1114(2):224-33.
 102. González Martín MI, Sánchez González CI, Jiménez Hernández A, García Cachán MD, Castro de Cabo MJ, Garzón Cuadrado AL (2002). Determination by high-performance liquid chromatography of phenylbutazone in samples of plasma from fighting bulls. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 769(1):119-26.

103. Goosen C, du Plessis J, Müller DG, Janse van Rensburg LF (1998). Correlation between physicochemical characteristics, pharmacokinetic properties and transdermal absorption of NSAID's. *Int J Pharm* 163:203-9.
104. Goudie AC, Evans NA, Gration KA et al. (1993). Doramectin - a potent novel endectocide. *Vet Parasitol* 49(1):5-15.
105. Gowik P, Julicher B, Uhlig S (1998). Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 716(1-2):221-32.
106. Hallak A, Alon-Baron L, Shamir R et al. (2003). Rofecoxib reduces polyp recurrence in familial polyposis. *Dig Dis Sci* 48(10):1998-2002.
107. Hennessy DR, Alvinerie M (2002). Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: Vercruysse J, Rew RS, eds. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. Wallingford: CABI Publishing, 97-123.
108. Hernando MD, Heath E, Petrović M, Barceló D (2006). Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters: a pilot-survey study. *Anal Bioanal Chem* 385(6):985-91.
109. Hodošček L (2008). Izločanje ostankov eprinomektina pri drobnici v času laktacije. Ljubljana: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani. Doktorska disertacija.
110. Holton LL, Scott EM, Nolan AM, Reid J, Welsh E, Flaherty D (1998). Comparison of three methods used for assessment of pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 212(1):61-6.
111. Howells L, Sauer MJ (2001). Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSn. *Analyst* 126(2):155-60.
112. Huston GE, Patton S (1990). Factors related to the formation of cytoplasmic crescents on milk fat globules. *J Dairy Sci* 73(8):2061-6.
113. Ibrahim H, Boyer A, Bouajila J, Couderc F, Nepveu F (2007). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and human serum by dual-mode gradient HPLC and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 857(1):59-66.
114. Igualada C, Moragues F, Pitarch J (2007). Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector. *Anal Chim Acta* 586(1/2):432-9.
115. Imperiale F, Pis A, Sallovitz J et al. (2006). Pattern of eprinomectin milk excretion in dairy sheep unaffected by lactation stage: comparative residual profiles in dairy products. *J Food Prot* 69(10):2424-9.
116. Imperiale FA, Buseti MR, Suarez VH, Lanusse CE (2004). Milk excretion of ivermectin and moxidectin in dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and ripening period. *J Agric Food Chem* 52(20):6205-11.
117. Imperiale FA, Mottier L, Sallovitz JM, Lifschitz AL, Lanusse CE (2003). Disposition of doramectin milk residues in lactating dairy sheep. *J Agric Food Chem* 51(10):3185-90.
118. Iosifidou E, Shearan P, O'Keeffe M (1994). Application of the matrix solid phase dispersion technique for the determination of ivermectin residues in fish muscle tissue. *Analyst* 119(10):2227-9.
119. ISO (2005a). Slovenski standard. Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev (ISO/IEC 17025:2005). Ljubljana: Slovenski inštitut za standardizacijo, 30 str.
120. ISO (2005b). Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev (ISO/IEC 17025:2005).
121. Ito S, Alcorn J (2003). Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland. *Adv Drug Deliv Rev* 55(5):653-65.

122. IUPAC (2009). Limit of detection in analysis. In: IUPAC gold book: compendium of chemical terminology. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. XML on-line corrected version 2.1.5 (updated 7.9.2009).
123. Jaussaud P, Courtot D, Guyot JL, Paris J (1987). Identification of a flunixin metabolite in the horse by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 423(4):123-30.
124. Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Olejnik M (2009). Multi-residue screening method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drug residues in cow's milk with HPLC-UV and its application to meloxicam residue depletion study. *Bull Vet Inst Pulawy* 53(4):731-9.
125. Jeffreys D (2005). Aspirin: the remarkable story of a wonder drug. London: Bloomsbury Publishing, 335 str.
126. Juni P, Rutjes AW, Dieppe PA (2002). Are selective COX 2 inhibitors superior to traditional non steroidal anti-inflammatory drugs? *BMJ* 324(7349):1287-8.
127. Kantor TG (1986). Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties. *Pharmacotherapy* 6(3):93-103.
128. Kennedy DG, Cannavan A, Hewitt SA, Rice DA, Blanchflower WJ (1993). Determination of ivermectin residues in the tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using HPLC with fluorescence detection. *Food Addit Contam* 10(5):579-84.
129. Knapp DW, Richardson RC, Bottoms GD, Teclaw R, Chan TC (1992). Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 29(3):214-8.
130. Kolar L (2004). Mehanizmi delovanja protiparazitnih zdravil. *Vet Nov* 30:167-74.
131. Komar M, Doganoc D, Šinigoj Gačnik K (1996). Higiena in nadzor živil: kemijske analize. Ljubljana: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, 33-4.
132. Kosjek T, Heath E, Krbavčič A (2005). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environ Int* 31(5):679-85.
133. Koutsouba V, Heberer T, Fuhrmann B, Schmidt-Baumler K, Tsiipi D, Hiskia A (2003). Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51(2):69-75.
134. Ku EC, Lee W, Kothari HV, Scholer DW (1986). Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med* 80(4B):18-23.
135. Ladage CA, Kleinepiper JF, van Miert AS (1989). Some pharmacokinetic data of the liver-fluke anthelmintic nitroclofene in ruminant and pre-ruminant kids. *J Vet Pharmacol Ther* 12(4):451-4.
136. Lanusse C, Lifschitz A, Virkel G et al. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 20(2):91-9.
137. Lanusse CE, Prichard RK (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet Parasitol* 49(2/4):123-58.
138. Launer L (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk for Alzheimer's disease: dissecting the epidemiological evidence. *Drugs* 63(8):731-9.
139. Lees P (2009). Analgesic, antiinflammatory, antipiretic drugs. In: Riviere JE, Papich MG, eds. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9th ed. Ames: Wiley-Blackwell, 457-92.
140. Lespine A, Martin S, Dupuy J et al. (2007). Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship. *Eur J Pharm Sci* 30(1):84-94.
141. Lespine A, Sutra JF, Dupuy J, Alvinerie M (2003). Eprinomectin in goat: assessment of subcutaneous administration. *Parasitol Res* 89(2):120-2.
142. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J et al. (2000). Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Vet Parasitol* 87(4):327-38.

143. Lin X, Wen Y, Li M et al. (2009). A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti-tumor activity on human cancer cell lines in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(5):839-45.
144. Ling V (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol* 40(Suppl):S3-8.
145. Lipscomb VJ, AliAbadi FS, Lees P, Pead MJ, Muir P (2002). Clinical efficacy and pharmacokinetics of carprofen in the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 150(22):684-9.
146. Lown KS, Ghosh M, Watkins PB (1998). Sequences of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A4 cDNAs are identical. *Drug Metab Dispos* 26(2):185-7.
147. Mackintosh CG, Mason PC, Manley T, Baker K, Littlejohn R (1985). Efficacy and pharmacokinetics of febantel and ivermectin in red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J* 33(8):127-31.
148. Malaniková M, Malaník V, Marek M (1990). Use of thin-layer chromatography for the testing of avermectins produced by *Streptomyces avermitilis* strains. *J Chromatogr B* 513:401-4.
149. Malone EM, Dowling G, Elliott CT, Kennedy DG, Regan L (2009). Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216(46):8132-40.
150. Marriner SE, McKinnon I, Bogan JA (1987). The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *J Vet Pharmacol Ther* 10(2):175-9.
151. Martin RJ, Pennington AJ (1989). A patch-clamp study of effects of dihydroavermectin on *Ascaris* muscle. *Br J Pharmacol* 98(3):747-56.
152. Martin RJ, Robertson AP, Wolstenholme AJ (2002). Mode of action of the macrocyclic lactones. In: Vercruysse J, Rew RS, eds. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. Wallingford: CABI Publishing, 125-40.
153. Masferrer JL, Kulkarni PS (1997). Cyclooxygenase-2 inhibitors: a new approach to the therapy of ocular inflammation. *Surv Ophthalmol* 41(Suppl 2):S35-S40.
154. Mather IH, Keenan TW (1998). Origin and secretion of milk lipids. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3(3):259-73.
155. McCarthy DD, Chalmers TM (1964). Hematological complications of phenylbutazone therapy: Review of the literature and report of two cases. *Can Med Assoc J* 90:1061-7.
156. McManaman JL, Neville MC (2003). Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev* 55(5):629-41.
157. Meeus PF, De Bont J, Vercruysse J (1997). Comparison of the persistent activity of ivermectin, abamectin, doramectin and moxidectin in cattle in Zambia. *Vet Parasitol* 70(4):219-24.
158. Meier M, Blatter XL, Seelig A, Seelig J (2006). Interaction of verapamil with lipid membranes and P-glycoprotein: connecting thermodynamics and membrane structure with functional activity. *Biophys J* 91(8):2943-55.
159. Meinert CL, McCaffrey LD, Breitner JCS, (ADAPT Research Group) (2009). Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial: design, methods, and baseline results. *Alzheimers Dement* 5(2):93-104.
160. Miller TW, Chalet L, Cole DJ et al. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. *Antimicrob Agents Chemother* 15(3):368-71.
161. Mitsui Y, Tanimori H, Kitagawa T, Fujimaki Y, Aoki Y (1996). Simple and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for ivermectin. *Am J Trop Med Hyg* 54(3):243-8.

162. Molento MB, Lifschitz A, Sallovitz J, Lanusse C, Prichard R (2004). Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitol Res* 92(2):121-7.
163. Ngoh MA, Wislocki PG, Thompson K et al. (2003). Residue depletion study and withdrawal period for flunixin-N-methyl glucamine in bovine milk following intravenous administration. *J Agric Food Chem* 51(16):4701-7.
164. Ober KF (1974). Mechanism of interaction of tolbutamide and phenylbutazone in diabetic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 7(4):291-4.
165. Oukessou M, Badri M, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M (1996). Pharmacokinetics of ivermectin in the camel (*Camelus dromedarius*). *Vet Rec* 139(17):424-5.
166. Oukessou M, Berrag B, Alvinerie M (1999). A comparative kinetic study of ivermectin and moxidectin in lactating camels (*Camelus dromedarius*). *Vet Parasitol* 83(2):151-9.
167. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS (2002). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 8(3):289-93.
168. Panus PC, Tober-Meyer B, Ferslew KE (1998). Tissue extraction and high-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen enantiomers. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 705(2):295-302.
169. Patton S, Keenan TW (1975). The milk fat globule membrane. *Biochim Biophys Acta* 415(3):273-309.
170. Payne LD, Mayo VR, Morneweck LA, Hicks MB, Wehner TA (1997). HPLC-Fluorescence method for the determination of eprinomectin marker residue in edible bovine tissue. *J Agric Food Chem* 45(9):3501-6.
171. Perez R, Cabezas I, Garcia M et al. (1999). Comparison of the pharmacokinetics of moxidectin (Equest) and ivermectin (Eqvalan) in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 22(3):174-80.
172. Peters RJ, Bolck YJ, Rutgers P, Stolker AA, Nielen MW (2009). Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216(46):8206-16.
173. Pospíšilová M, Jokl V, Polásek M, Mokrá J (1995). Determination of some non-steroid anti-inflammatory drugs by capillary isotachophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 13(9):1147-52.
174. Prabhu SV, Wehner TA, Tway PC (1991). Determination of ivermectin levels in swine tissues at the parts per billion level by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 39(8):1468-71.
175. Prichard RK, Steel JW, Lacey E, Hennessy DR (1985). Pharmacokinetics of ivermectin in sheep following intravenous, intra-abomasal or intraruminal administration. *J Vet Pharmacol Ther* 8(1):88-94.
176. Radhofer-Welte S, Dittrich P (1998). Determination of the novel non-steroidal anti-inflammatory drug lornoxicam and its main metabolite in plasma and synovial fluid. *J Chromatogr B* 707(1/2):151-9.
177. Ramos Payán M, Bello López MÁ, Fernández-Torres R, Pérez Bernal JL, Callejón Mochón M (2009). HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). *Anal Chim Acta* 653(2):184-90.
178. Rehbein S, Wiedemann M, Ellner R, Maier S, Pollmeier M (2001). The production of cheese and yogurt using milk from cows treated with the endectocide eprinomectin. *Milchwissenschaft* 56(10):543-5.

179. Rodríguez I, Quintana JB, Carpinteiro J, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R (2003). Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr A* 985(1/2):265-74.
180. Rogelj I (1984). Prispevek k poznavanju kakovosti ovčjega mleka in možnost njegove predelave v sir: specialistično delo. Ljubljana: VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za živinorejo.
181. Roudaut B (1998). Multiresidue method for the determination of avermectin and moxidectin residues in the liver using HPLC with fluorescence detection. *Analyst* 123(12):2541-4.
182. Sabolovic N, Heydel JM, Li X et al. (2004). Carboxyl nonsteroidal anti-inflammatory drugs are efficiently glucuronidated by microsomes of the human gastrointestinal tract. *Biochim Biophys Acta* 1675(1-3):120-9.
183. Samuelsson B (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220(4597):568-75.
184. Samuelsson B, Hammarstrom S, Murphy RC, Borgeat P (1980). Leukotrienes and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A). *Allergy* 35(5):375-81.
185. Sandler RS, Halabi S, Baron JA et al. (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 348(10):883-90.
186. Schaeffer JM, Frazier EG, Bergstrom AR, Williamson JM, Liesch JM, Goetz MA (1990). Cochlioquinone A, a nematocidal agent which competes for specific [³H]ivermectin binding sites. *J Antibiot (Tokyo)* 43(9):1179-82.
187. Schaeffer JM, Haines HW (1989). Avermectin binding in *Caenorhabditis elegans*: a two-state model for the avermectin binding site. *Biochem Pharmacol* 38(14):2329-38.
188. Schenck FJ, Lagman LH (1999). Multiresidue determination of abamectin, doramectin, ivermectin, and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection. *J AOAC Int* 82(6):1340-4.
189. Schmidt DJ, Clarkson CE, Swanson TA et al. (1990). Monoclonal antibodies for immunoassay of avermectins. *J Agric Food Chem* 38(8):1763-70.
190. Scott EW, Kinabo LD, McKellar QA (1990). Pharmacokinetics of ivermectin after oral or percutaneous administration to adult milking goats. *J Vet Pharmacol Ther* 13(4):432-5.
191. Scott EW, McKellar QA (1992). The distribution and some pharmacokinetic parameters of ivermectin in pigs. *Vet Res Commun* 16(2):139-46.
192. Scott RH, Duce IR (1987). Pharmacology of GABA receptors on skeletal muscle fibres of the locust (*Schistocerca gregaria*). *Comp Biochem Physiol C* 86(2):305-11.
193. Selman IE, Allan EM, Gibbs HA, Wiseman A, Young WB (1984). Effect of anti-prostaglandin therapy in experimental parainfluenza type 3 pneumonia in weaned, conventional calves. *Vet Rec* 115(5):101-5.
194. Shoop WL, DeMontigny P, Fink DW et al. (1996). Efficacy in sheep and pharmacokinetics in cattle that led to the selection of eprinomectin as a topical endectocide for cattle. *Int J Parasitol* 26(11):1227-35.
195. Shoop WL, Mrozik H, Fisher MH (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet Parasitol* 59(2):139-56.
196. Shpigel NY, Chen R, Winkler M, Saran A, Ziv G, Longo F (1994). Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. *Res Vet Sci* 56(1):62-8.
197. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK et al. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342(26):1946-52.
198. Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ (1997). Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48(3):626-32.

199. Suárez B, Simonet BM, Cárdenas S, Valcárcel M (2007). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1159(1/2):203-7.
200. Sun Y, Takaba K, Kido H, Nakashima MN, Nakashima K (2003). Simultaneous determination of arylpropionic acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 30(5):1611-9.
201. Sutra JF, Chartier C, Galtier P, Alvinerie M (1998). Determination of eprinomectin in plasma by high-performance liquid chromatography with automated solid phase extraction and fluorescence detection. *Analyst* 123(7):1525-7.
202. Taggart MA, Senacha KR, Green RE et al. (2007). Diclofenac residues in carcasses of domestic ungulates available to vultures in India. *Environ Int* 33(6):759-65.
203. Taylor SM, Mallon TR, Blanchflower WJ, Kennedy DG, Green WP (1992). Effects of diet on plasma concentrations of oral anthelmintics for cattle and sheep. *Vet Rec* 130(13):264-8.
204. Taylor WG, Danielson TJ, Orcutt RL (1994). Thin-layer chromatographic detection of ivermectin in cattle serum. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661(2):327-33.
205. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21):7735-8.
206. Tolan JW, Eskola P, Fink DW, Mrozik H, Zimmerman LA (1980). Determination of avermectins in plasma at nanogram levels using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 190(2):367-76.
207. Tomlin CDS (2006). The pesticide manual: a world compendium. 14th ed. Tomlin CDS, ed. Alton: British Crop Protection Council, 1349 str.
208. Tway TC, Wood JS, Jr., Downing GV (1981). Determination of ivermectin in cattle and sheep tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 29(5):1059-63.
209. Vane JR (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231(25):232-5.
210. Vane JR (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 110(5/6):255-8.
211. Vinci F, Fabbrocino S, Fiori M, Serpe L, Gallo P (2006). Determination of fourteen non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal serum and plasma by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(22):3412-20.
212. Wasfi IA, Hadi AAA, Alkatheeri NA et al. (1998). Identification of a flunixin metabolite in camel by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 709(2):209-15.
213. Wilkinson PK, Pope DG, Baylis FP (1985). Pharmacokinetics of ivermectin administered intravenously to cattle. *J Pharm Sci* 74(10):1105-7.
214. Wolfe LS (1982). Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J Neurochem* 38(1):1-14.
215. World Health Organization (1999). Evaluation of certain veterinary drug residues in food: fiftieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO, 1-94. (WHO Technical Report Series No 888)
216. World Health Organization (2000). Residues of some veterinary drugs in animals and food: monographs. 54th meeting of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives. Geneva, 2000. Rome: Food and Agriculture organizations of the United Nations, 53-7. (FAO food and nutrition paper 41/13)
217. Xu M, Molento MB, Blackhall W, Ribeiro P, Beech R, Prichard R (1998). Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasit* 91:327-35.

218. Zeng Z, Andrew NW, Arison BH, Luffer-Atlas D, Wang RW (1998). Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 28(3):313-21.
219. Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater* 122(3):205-9.

SEZNAM SLIK

Slika 1:	<i>Slika mikroorganizma Streptomyces avermitilis posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Povzeto po Lin in sod. (2009).....</i>	21
Slika 2:	<i>Kemijske strukture prvotnih osmih predstavnikov avermektinov</i>	22
Slika 3:	<i>Kemijska struktura ivermektina.....</i>	23
Slika 4:	<i>Kemijska struktura doramektina</i>	24
Slika 5:	<i>Kemijska struktura eprinomektina.....</i>	25
Slika 6:	<i>Shematičen prikaz receptorja za γ-amino masleno kislino (GABA).....</i>	26
Slika 7:	<i>Shematičen prikaz transportnega proteina P-glikoprotein.....</i>	28
Slika 8:	<i>Kemijska struktura verapamila</i>	28
Slika 9:	<i>Delitev nesteroidnih protivnetnih učinkovin glede na njihovo kemijsko strukturo ...</i>	34
Slika 10:	<i>Kemijska struktura diklofenaka</i>	35
Slika 11:	<i>Kemijska struktura fenilbutazona</i>	35
Slika 12:	<i>Kemijska struktura fluniksina.....</i>	36
Slika 13:	<i>Kemijska struktura 5-hidroksi fluniksina.....</i>	36
Slika 14:	<i>Kemijska struktura karprofena.....</i>	37
Slika 15:	<i>Kemijska struktura ketoprofena</i>	37
Slika 16:	<i>Kemijska struktura meloksikama</i>	38
Slika 17:	<i>Kemijska struktura oksifenbutazona</i>	38
Slika 18:	<i>Kemijska struktura tolfenamske kisline</i>	39
Slika 19:	<i>Prikaz sinteze eikozanoidov iz arahidonske kisline s ciklooksigenazo</i>	40
Slika 20:	<i>Prikaz sinteze eikozanoidov iz arahidonske kisline z lipooksigenazo</i>	42
Slika 21:	<i>Istrski pramenki</i>	63
Slika 22:	<i>Shema tehnološkega postopka izdelave tekočega jogurta iz surovega (A) in termično obdelanega (B) mleka.....</i>	66
Slika 23:	<i>Shema tehnološkega postopka izdelave poltrdih svežih (A) in zorenih (30 in 60 dni) (B) sirov, primarne (C) in sekundarne (D) sirotke ter albuminske skute (E)</i>	68
Slika 24:	<i>Vzorci sirov (zoren (A) in sveži (B)), albuminske skute (C), jogurtov (D), sirotk (E in F) in mleka (G)</i>	69
Slika 25:	<i>Temeljne faze analiznega postopka ugotavljanja ostankov avermektinov v krvni plazmi, mleku in mlečnih izdelkih.....</i>	70
Slika 26:	<i>Temeljne faze analiznega postopka določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku</i>	82
Slika 27:	<i>Značilni kromatogrami standardov avermektinov</i>	116
Slika 28:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov</i>	117
Slika 29:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov</i>	118
Slika 30:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom eprinomektina koncentracije 0,5 $\mu\text{g/kg}$ (LOQ).....</i>	119
Slika 31:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom eprinomektina koncentracije 0,5 $\mu\text{g/kg}$ (LOQ).....</i>	120
Slika 32:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom avermektinov koncentracije 4,0 $\mu\text{g/kg}$...</i>	121

Slika 33:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov eprinomektina v slepih vzorcih mlečnih izdelkov s standardnim dodatkom avermektinov koncentracije 4,0 µg/kg...</i>	122
Slika 34:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca</i>	143
Slika 35:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca</i>	144
Slika 36:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca s standardnim dodatkom na koncentracijskem nivoju LOQ (tabela 58)</i>	145
Slika 37:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) slepega vzorca s standardnim dodatkom na koncentracijskem nivoju LOQ (tabela 58)</i>	146
Slika 38:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) standardov v topilu na koncentracijskih nivojih odgovarjajočih vrednostim LOQ v krvni plazmi (tabela 58)</i>	147
Slika 39:	<i>Značilni kromatogrami ugotavljanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku – kromatogrami (skupni za oba ionska prehoda za vsak analit) standardov v topilu na koncentracijskih nivojih odgovarjajočih vrednostim LOQ v mleku (tabela 58)</i>	148

SEZNAM GRAFOV

Graf 1:	<i>Letni pregled števila nesteroidnih protivnetnih učinkovin in njihovih metabolitov (analitov) v obdobju 2005–2008, ki jih je v živilih živalskega izvora nadzirala posamezna država članica EU (CRL, 2007b; 2008a; 2009)</i>	48
Graf 2:	<i>Časovni potek koncentracij ivermektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	102
Graf 3:	<i>Časovni potek koncentracij doramektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	103
Graf 4:	<i>Časovni potek koncentracij ivermektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	104
Graf 5:	<i>Časovni potek koncentracij doramektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	105
Graf 6:	<i>Časovni potek koncentracij ivermektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	106
Graf 7:	<i>Časovni potek koncentracij doramektina v krvni plazmi posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	107
Graf 8:	<i>Časovni potek koncentracij ivermektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	108
Graf 9:	<i>Časovni potek koncentracij doramektina v mleku posamično za vsako ovco ($n = 6$) po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	109
Graf 10:	<i>Časovni potek povprečij koncentracij ivermektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v krvni plazmi ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli ivermektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (IVM), in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg ivermektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (IVM+VER).....</i>	110
Graf 11:	<i>Časovni potek povprečij koncentracij doramektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v krvni plazmi ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli doramektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (DOR), in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg doramektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (DOR+VER).....</i>	110
Graf 12:	<i>Časovni potek povprečij koncentracij ivermektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v mleku ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli ivermektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (IVM), in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg ivermektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (IVM+VER).....</i>	111
Graf 13:	<i>Časovni potek povprečij koncentracij doramektina v linearnem in semilogaritemskem prikazu z označenimi standardnimi odmiki v mleku ovc ($n = 6$), ki smo jim podkožno vnesli doramektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (DOR), in ovc ($n = 6$), ki smo jim poleg doramektina podkožno vnesli še verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (DOR+VER).....</i>	111
Graf 14:	<i>Regresijska premica eprinomektina v albuminski skuti v koncentracijskem območju 15–0,5 μg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk</i>	123
Graf 15:	<i>Regresijska premica eprinomektina v svežem siru v koncentracijskem območju 15–0,5 μg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk.....</i>	124

Graf 16:	<i>Regresijska premica eprinomektina v zorenem siru (30 dni) v koncentracijskem območju 15–0,5 µg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk</i>	125
Graf 17:	<i>Regresijska premica eprinomektina v zorenem siru (60 dni) v koncentracijskem območju 15–0,5 µg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk</i>	126
Graf 18:	<i>Regresijska premica eprinomektina v jogurtu iz surovega mleka v koncentracijskem območju 5–0,1 µg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk</i>	127
Graf 19:	<i>Regresijska premica eprinomektina v jogurtu iz termično obdelanega mleka v koncentracijskem območju 5–0,1 µg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk</i>	128
Graf 20:	<i>Regresijska premica eprinomektina v primarni sirotki v koncentracijskem območju 1–0,05 µg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk</i>	129
Graf 21:	<i>Regresijska premica eprinomektina v sekundarni sirotki v koncentracijskem območju 0,6–0,05 µg EPR B1a/kg; koncentracijske točke so povprečje dveh paralelk</i>	130
Graf 22:	<i>Časovni potek koncentracij eprinomektina v derivatiziranih slepih vzorcih mleka in mlečnih izdelkov z dodanimi standardnimi dodatki eprinomektina na nižjem koncentracijskem nivoju</i>	135
Graf 23:	<i>Časovni potek koncentracij eprinomektina v derivatiziranih slepih vzorcih mleka in mlečnih izdelkov z dodanimi standardnimi dodatki eprinomektina na višjem koncentracijskem nivoju</i>	136
Graf 24:	<i>Časovni potek koncentracij eprinomektina v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc (n = 30) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.</i>	139
Graf 25:	<i>Časovni potek deleža maščobe v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc (n = 30) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.</i>	139
Graf 26:	<i>Časovni potek deleža suhe snovi v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc (n = 30) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.</i>	140
Graf 27:	<i>Regresijska premica karprofena v topilu v koncentracijskem območju 1000–5 µg/L</i>	149
Graf 28:	<i>Regresijska premica diklofenaka v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,75 µg/L</i>	149
Graf 29:	<i>Regresijska premica fluniksina v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/L</i>	150
Graf 30:	<i>Regresijska premica 5-hidroksi-fluniksina v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/L</i>	150
Graf 31:	<i>Regresijska premica ketoprofena v topilu v koncentracijskem območju 1000–0,25 µg/L</i>	151
Graf 32:	<i>Regresijska premica meloksikama v topilu v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/L</i>	151
Graf 33:	<i>Regresijska premica oksifenbutazona v topilu v koncentracijskem območju 1000–5 µg/L</i>	152
Graf 34:	<i>Regresijska premica fenilbutazona v topilu v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/L</i>	152
Graf 35:	<i>Regresijska premica tolfenamske kisline v topilu v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/L</i>	153

Graf 36:	<i>Regresijska premica karprofena v mleku v koncentracijskem območju 1000–25 µg/kg.....</i>	154
Graf 37:	<i>Regresijska premica diklofenaka v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,5 µg/kg.....</i>	154
Graf 38:	<i>Regresijska premica fluniksina v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/kg.....</i>	155
Graf 39:	<i>Regresijska premica 5-hidroksi-fluniksina v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,1 µg/kg.....</i>	155
Graf 40:	<i>Regresijska premica ketoprofena v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,5 µg/kg.....</i>	156
Graf 41:	<i>Regresijska premica meloksikama v mleku v koncentracijskem območju 1000–0,5 µg/kg.....</i>	156
Graf 42:	<i>Regresijska premica oksifenbutazona v mleku v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/kg.....</i>	157
Graf 43:	<i>Regresijska premica fenilbutazona v mleku v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/kg.....</i>	157
Graf 44:	<i>Regresijska premica tolfenamske kisline v mleku v koncentracijskem območju 1000–2,5 µg/kg.....</i>	158
Graf 45:	<i>Regresijska premica karprofena v krvni plazmi v koncentracijskem območju 1000–25 µg/kg.....</i>	159
Graf 46:	<i>Regresijska premica diklofenaka v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–2 µg/kg.....</i>	160
Graf 47:	<i>Regresijska premica fluniksina v krvni plazmi v koncentracijskem območju 20–0,2 µg/kg.....</i>	160
Graf 48:	<i>Regresijska premica 5-hidroksi-fluniksina v krvni plazmi v koncentracijskem območju 20–0,5 µg/kg.....</i>	161
Graf 49:	<i>Regresijska premica ketoprofena v krvni plazmi v koncentracijskem območju 100–2,5 µg/kg.....</i>	161
Graf 50:	<i>Regresijska premica meloksikama v krvni plazmi v koncentracijskem območju 100–0,75 µg/kg.....</i>	162
Graf 51:	<i>Regresijska premica oksifenbutazona v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–15 µg/kg.....</i>	162
Graf 52:	<i>Regresijska premica fenilbutazona v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–15 µg/kg.....</i>	163
Graf 53:	<i>Regresijska premica tolfenamske kisline v krvni plazmi v koncentracijskem območju 200–10 µg/kg.....</i>	163
Graf 54:	<i>Stabilnost karprofena koncentracije 50 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	186
Graf 55:	<i>Stabilnost diklofenaka koncentracije 2 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	186
Graf 56:	<i>Stabilnost fluniksina koncentracije 1 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	186
Graf 57:	<i>Stabilnost 5-hidroksi-fluniksina koncentracije 1 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	186
Graf 58:	<i>Stabilnost ketoprofena koncentracije 2 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	186
Graf 59:	<i>Stabilnost meloksikama koncentracije 1 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	186
Graf 60:	<i>Stabilnost oksifenbutazona koncentracije 5 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	187
Graf 61:	<i>Stabilnost fenilbutazona koncentracije 5 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	187

Graf 62:	<i>Stabilnost tolfenamske kisline koncentracije 5 µg/L v topilu, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>187</i>
Graf 63:	<i>Stabilnost karprofena koncentracije 50 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>187</i>
Graf 64:	<i>Stabilnost diklofenaka koncentracije 2 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>187</i>
Graf 65:	<i>Stabilnost fluniksina koncentracije 1 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>187</i>
Graf 66:	<i>Stabilnost 5-hidroksi-fluniksina koncentracije 1 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>188</i>
Graf 67:	<i>Stabilnost ketoprofena koncentracije 2 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>188</i>
Graf 68:	<i>Stabilnost meloksikama koncentracije 1 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>188</i>
Graf 69:	<i>Stabilnost oksifenbutazona koncentracije 5 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>188</i>
Graf 70:	<i>Stabilnost fenilbutazona koncentracije 5 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>188</i>
Graf 71:	<i>Stabilnost tolfenamske kisline koncentracije 5 µg/kg v mleku, ovrednotena s časovnim spremljanjem ploščin kromatografskih vrhov.....</i>	<i>188</i>

SEZNAM TABEL

Tabela 1:	<i>Mejne vrednosti ostankov (MRL) nesteroidnih protivnetnih učinkovin kot jih določa zakonodaja EU (ES, 2009)</i>	46
Tabela 2:	<i>Število neustreznih vzorcev na ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin v EU v obdobju 2004–2007 (CRL, 2007b; 2008a; 2009)</i>	48
Tabela 3:	<i>Število neustreznih vzorcev na ostanke nesteroidnih protivnetnih učinkovin v EU v obdobju 2004–2007 posamično za vsako spojino (CRL, 2007b; 2008a; 2009) ...</i>	48
Tabela 4:	<i>Število držav članic EU, ki nadzirajo ostanke posameznih nesteroidnih protivnetnih učinkovin (CRL, 2007b; 2008a; 2009).....</i>	49
Tabela 5:	<i>Pregled nekaterih analiznih metod za določanje vsebnosti ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v živilih živalskega izvora in okoljskih vzorcih.....</i>	53
Tabela 6:	<i>Standardni dodatki eprinomektina v vzorcih mlečnih izdelkov za vrednotenje izkoristka in obnovljivosti</i>	79
Tabela 7:	<i>Stacionarne faze za ekstrakcijo na trdni fazi, preizkušene med razvijanjem metode določanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku</i>	86
Tabela 8:	<i>Stacionarne faze za kromatografsko analizo, preizkušene med razvijanjem metode določanja nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi in mleku</i>	87
Tabela 9:	<i>Koncentracija analitov po standardnih dodatkih za mleko in krvno plazmo.....</i>	94
Tabela 10:	<i>Pričakovane in izmerjene vrednosti CCa</i>	96
Tabela 11:	<i>Koncentracije ivermektina ($\mu\text{g H2B1a/L}$) v krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	102
Tabela 12:	<i>Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/L}$) v krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	103
Tabela 13:	<i>Koncentracije ivermektina ($\mu\text{g H2B1a/kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	104
Tabela 14:	<i>Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m.</i>	105
Tabela 15:	<i>Koncentracije ivermektina v ($\mu\text{g H2B1a/L}$) krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	106
Tabela 16:	<i>Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/L}$) v krvni plazmi posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	107
Tabela 17:	<i>Koncentracije ivermektina ($\mu\text{g H2B1a/kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	108
Tabela 18:	<i>Koncentracije doramektina ($\mu\text{g/kg}$) v mleku posamično za vsako od šestih ovc, dnevna povprečja, standardni odmiki in koeficienti variacije po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m.</i>	109
Tabela 19:	<i>Farmakokinetični parametri za krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (A) ter farmakokinetični parametri za</i>	

	<i>krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu ivermektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (B).....</i>	112
Tabela 20:	<i>Farmakokinetični parametri za krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. (A) ter farmakokinetični parametri za krvno plazmo in mleko posamično za vsako od šestih ovc, povprečne vrednosti in standardni odmiki po podkožnem vnosu doramektina v odmerku 0,2 mg/kg t. m. in sočasnem podkožnem vnosu verapamila v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. (B).....</i>	113
Tabela 21:	<i>Primerjava varianc in povprečij farmakokinetičnih parametrov skupin ovc, ki smo jim podkožno vnesli ivermektin oziroma doramektin v odmerku 0,2 mg/kg t. m., z ovcami, ki smo jim sočasno podkožno vnesli verapamil v treh odmerkih po 3 mg/kg t. m. Enakost varianc smo preverjali z Levenovim testom, enakost povprečnih vrednosti farmakokinetičnih parametrov pa s Studentovim (če sta bili varianci enaki) oziroma z Bahrens-Fisherjevim testom (če varianci nista bili enaki) glede na izračunane p-vrednosti</i>	114
Tabela 22:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v albuminski skuti v območju standardnih dodatkov 15–0,5 µg EPR B1a/kg.....</i>	123
Tabela 23:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v svežem siru v območju standardnih dodatkov 15–0,5 µg EPR B1a/kg.....</i>	124
Tabela 24:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v zorenem siru (30 dni) v območju standardnih dodatkov 15–0,5 µg EPR B1a/kg.....</i>	125
Tabela 25:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v zorenem siru (60 dni) v območju standardnih dodatkov 15–0,5 µg EPR B1a/kg.....</i>	126
Tabela 26:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v jogurtu iz surovega mleka v območju standardnih dodatkov 5–0,1 µg EPR B1a/kg.....</i>	127
Tabela 27:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v jogurtu iz termično obdelanega mleka v območju standardnih dodatkov 5–0,1 µg EPR B1a/kg.....</i>	128
Tabela 28:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v primarni sirotki v območju standardnih dodatkov 1–0,05 µg EPR B1a/kg.....</i>	129
Tabela 29:	<i>Linearnost meritev eprinomektina v sekundarni sirotki v območju standardnih dodatkov 0,6–0,05 µg EPR B1a/kg.....</i>	130
Tabela 30:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja eprinomektina v albuminski skuti, svežem siru (A) in zorenih sirih (30 in 60 dni) (B).....</i>	131
Tabela 31:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja eprinomektina v jogurtu iz surovega in jogurtu iz termično obdelanega mleka (A) ter v primarni in sekundarni sirotki (B)</i>	132
Tabela 32:	<i>Obnovljivost meritev ugotavljanja eprinomektina v albuminski skuti, svežem siru (A) in zorenih sirih (30 in 60 dni) (B), ovrednotena na osnovi ugotovljenih koncentracij (µg EPR B1a/kg)</i>	133
Tabela 33:	<i>Obnovljivost meritev ugotavljanja eprinomektina v jogurtu iz surovega in jogurtu iz termično obdelanega mleka (A) ter primarne in sekundarne sirotke (B), ovrednotena na osnovi ugotovljenih koncentracij (µg EPR B1a/kg)</i>	134
Tabela 34:	<i>Meja vrednotenja (LOQ) analizne metode določanja ostankov eprinomektina (µg EPR B1a/kg) v mlečnih izdelkih</i>	135
Tabela 35:	<i>Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov eprinomektina v mlečnih izdelkih</i>	137
Tabela 36:	<i>Koncentracije eprinomektina (µg EPR B1a/kg) v združenem dnevnem vzorcu mleka ovc (n = 30) in v proizvedenih mlečnih izdelkih po vnosu eprinomektina s polivom po koži v odmerku 1 mg/kg t. m.</i>	138

Tabela 37:	<i>Linearnost ploščin kromatografskih vrhov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku v območju standardnih dodatkov 1000–0,1 µg/kg</i>	153
Tabela 38:	<i>Linearnost ploščin kromatografskih vrhov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi v območju standardnih dodatkov 1000–10 µg/kg (CPF) in 200–2 µg/kg (DCL, OBZ, PBZ, TFA)</i>	158
Tabela 39:	<i>Linearnost ploščin kromatografskih vrhov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi v območju standardnih dodatkov 100–0,75 µg/kg (KPF, MLX) in 20–0,15 µg/kg (FLU, FLU-OH)</i>	159
Tabela 40:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v mleku</i>	164
Tabela 41:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v mleku</i>	165
Tabela 42:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v mleku</i>	166
Tabela 43:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v krvni plazmi</i>	167
Tabela 44:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v krvni plazmi</i>	168
Tabela 45:	<i>Izkoristek (%) ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v krvni plazmi</i>	169
Tabela 46:	<i>Ponovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v mleku</i>	170
Tabela 47:	<i>Ponovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v mleku</i>	171
Tabela 48:	<i>Ponovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v mleku</i>	172
Tabela 49:	<i>Ponovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v krvni plazmi</i>	173
Tabela 50:	<i>Ponovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v krvni plazmi</i>	174
Tabela 51:	<i>Ponovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v krvni plazmi</i>	175
Tabela 52:	<i>Obnovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v mleku</i>	176
Tabela 53:	<i>Obnovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v mleku</i>	177
Tabela 54:	<i>Obnovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v mleku</i>	178
Tabela 55:	<i>Obnovljivost ugotavljanja karprofena (CPF), diklofenaka (DCL) in fluniksina (FLU) v krvni plazmi</i>	179
Tabela 56:	<i>Obnovljivost ugotavljanja 5-hidroksi-fluniksina (FLU-OH), ketoprofena (KPF) in meloksikama (MLX) v krvni plazmi</i>	180
Tabela 57:	<i>Obnovljivost ugotavljanja oksifenbutazona (OBZ), fenilbutazona (PBZ) in tolfenamske kisline (TFA) v krvni plazmi</i>	181
Tabela 58:	<i>Meje vrednotenja (LOQ) za analizo metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku in krvni plazmi</i>	181
Tabela 59:	<i>Ugotovljene koncentracije (µg/kg) za vrednotenje meje odločitve (CC_α) za analizo metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku</i> .	182
Tabela 60:	<i>Ugotovljene koncentracije (µg/kg) za vrednotenje meje odločitve (CC_α) za analizo metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi</i>	183

Tabela 61: Ugotovljene koncentracije ($\mu\text{g/kg}$) za vrednotenje sposobnosti določitve ($\text{CC}\beta$) za analizno metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku .	184
Tabela 62: Ugotovljene koncentracije ($\mu\text{g/kg}$) za vrednotenje sposobnosti določitve ($\text{CC}\beta$) za analizno metodo določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi.....	185
Tabela 63: Robustnost analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku, ovrednotena s Studentovim t-testom glede na statistično značilne razlike med populacijami vzorcev, hidroliziranih pri različnih pogojih.....	189
Tabela 64: Robustnost analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v mleku, ovrednotena s Studentovim t-testom glede na statistično značilne razlike med populacijami vzorcev mleka različnih živalskih vrst, steriliziranega in pasteriziranega mleka.....	189
Tabela 65: Robustnost analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v krvni plazmi, ovrednotena s Studentovim t-testom glede na statistično značilne razlike med populacijami vzorcev krvne plazme različnih živalskih vrst....	190
Tabela 66: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – selektivnost	190
Tabela 67: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – specifičnost	190
Tabela 68: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – linearnost.....	191
Tabela 69: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – izkoristek (%)	191
Tabela 70: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – ponovljivost.....	192
Tabela 71: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – obnovljivost.....	192
Tabela 72: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – meja odločitve ($\text{CC}\alpha$), sposobnost določitve ($\text{CC}\beta$) in meja vrednotenja (LOQ).....	193
Tabela 73: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – stabilnost vzorcev, pripravljenih za meritev z LC-MS/MS.....	193
Tabela 74: Povzetek validacije analizne metode določanja ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin – robustnost	193