



Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина - Скопје
Школа за докторски студии
Безбедност на Храна



Ристо Узунов, ДВМ

**МУЛТИРЕЗИДУАЛНА АНАЛИЗА НА β -АГОНИСТИ ВО БИОЛОШКИ
МАТРИКСИ СО ПРИМЕНА НА LC-MS/MS МЕТОД**

Докторска дисертација

Ментор: Проф. д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу

Скопје, 16 Април 2019

Ментор: Проф. д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу, редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје

Датум на одбрана: 16.04.2019 година

Членови на Комисија за одбрана:

1. Проф. д-р Велимир Стојковски, претседател, редовен професор на Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје
2. Проф. д-р Павле Секуловски, член, редовен професор на Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје
3. Проф. д-р Анета Димитровска, член, редовен професор на Фармацевтски факултет Скопје, Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје
4. Проф. д-р Деан Јанкулоски, член, вонреден професор на Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје
5. Проф. д-р Сања Костадиновиќ Величковска, член, вонреден професор на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

Лабораториските истражувања во оваа докторска дисертација во целост беа изработени во Лабораторијата за резидуи и контаминенти, при Институтот за храна на Факултет за ветеринарна медицина - Скопје.

Благодарница

На мојата менторка и професорка, проф. д-р Зехра Хајрулаи-Муслиу и изразувам огромна благодарност за искрената соработка, несебичната помош и безрезервната поддршка во текот на целокупното мое стручно и научно усовршување, како и за поддршката, стручните совети и насоки при изработката на докторската дисертација.

На проф. д-р Велимир Стојковски му благодарам за сите совети и предлози дадени во текот на изработката на дисертацијата, за лектурата на дисертацијата и за техничката помош при подготовката на презентацијата.

На проф. д-р Павле Секуловски му благодарам за поддршката и советите од почетокот на моите докторски студии до одбраната на дисертацијата.

На проф. д-р Анета Димитровска и благодарам за сите стручни совети и предлози при изработката на финалната верзија на дисертацијата.

На проф. д-р Деан Јанкуловски му благодарам за поддршката и стручните совети при изработката на дисертацијата.

На проф. д-р Сања Костадиновиќ Величковска и благодарам што прифати да биде дел од Комисијата за одбрана.

На проф. д-р Агим Шабани му благодарам за техничката обработка на хемиските формули.

На д-р Елизабета Димитриеска-Стојковиќ, виш научен соработник, и благодарам за корисните предлози и стручни совети при изработката на дисертацијата.

На д-р Билјана Стојаноска-Димзоска, научен соработник, и благодарам за корисните совети при подготовката на финалната верзија на дисертацијата.

Благодарност до д-р Radeck Wolfgang од Европската и Национална референтна лабораторија “Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit” (Федерална канцеларија за заштита на потрошувачите и безбедност на храна) за β -агонисти, антихелминтици, анти-кокцидиостатици вклучувајќи ги и нитроимидазолите, како и

нестероридни анти-воспалителни лекови која се наоѓа во Берлин, Германија, за донацијата на стандардите и интерните стандарди.

Огромна благодарност до Факултетот за ветеринарна медицина - Скопје што ми овозможи да го реализирам ова истражување.

Најголема благодарност им должам на моите родители Марија и Томе, за огромната поддршка која ми ја даваа во целокупниот мој образовен процес.

На мојата сопруга Викторија и на мојот син Горјан им должам огромна и неизмерна благодарност за разбирањето, трпението и безусловната поддршка во текот на изработката на докторската дисертација.

МУЛТИРЕЗИДУАЛНА АНАЛИЗА НА β -АГОНИСТИ ВО БИОЛОШКИ МАТРИКСИ СО ПРИМЕНА НА LC-MS/MS МЕТОД

ИЗВАДОК

β -агонистите се синтетички произведени супстанции кои се користат во терапија на пулмонални обструктивни заболувања кај луѓето и домашните животни, а кај домашните животни исто така се користат и како срцеви тоници и токолитици. Покрај тоа β -агонистите може да се користат како промотори на раст кај многу животински видови за производство на месо. Апликацијата на 5-10 пати повисоки дози од одобрените терапевтски дози кај животните за производство на месо резултира со значително зголемување на мускулната маса, подобро искористување на храната, подобар состав на трупот и значително намалување на телесните масти.

По употреба кај фармските животни, остатоци од β -агонистите се депонираат во ткивата и се потенцијален ризик по здравјето на луѓето. Постојат многу документирани случаи каде конзумирањето на месо и црн дроб кои содржат β -агонисти довеле до сериозни интоксикации кај луѓето. Поради тоа, со Директивата 96/22/ЕС, Европската Унија ја забранува употребата на β -агонисти кај фармски животни, додека со Директивата 96/23/ЕС, Европската Унија ги пропишува мерките за следење на овие супстанции во животните и производите од животинско потекло.

Целта на ова истражување беше да се оптимизира и валидира потврден LC-MS/MS метод за определување на β -агонисти во урина, мускул и црн дроб и да се мониторира присуството на овие супстанции во наведените матрикси во периодот од 2014-2016 година. Со оптимизација на LC-MS/MS методот беа оптимизирани хроматографските услови и условите на масениот детектор. За секој β -агонист, со масениот детектор со користење на ESI+ јонизација, беа утврдени главните јони и по три продукт јони. Валидацијата на методот беше извршена според Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС и при тоа беа утврдени следните валидациски параметри: линеарност, ССа, СС β , специфичност/селективност, точност и прецизност. Во истражувањето беа анализирани вкупно 525 примероци, од кои 274 урина, 150 мускул и 101 примерок црн дроб. Од добиените податоци од валидацијата може да се заклучи дека истите се во согласност со барањата од Одлуката на Комисијата

2002/657/ЕС. Според тоа во истражувањето е оптимизиран и валидиран линеарен, специфичен, селективен, точен и прецизен потврден LC-MS/MS метод за определување на β -агонисти во урина, мускул и црн дроб кои потекнуваат од животни кои се користат во исхраната на луѓето. Во анализираните примероци не беа детектирани β -агонисти во концентрација над утврдената вредност за ССа, што практично значи дека резултатите укажуваат на нулта инциденца на нелегална или случајна употреба на β -агонисти и дека примероците се слободни од овие штетни супстанции.

Клучни зборови: β -агонисти, биолошки матрикси, оптимизација, валидација, LC-MS/MS.

MULTIRESIDUE ANALYSIS OF β -AGONISTS IN BIOLOGICAL MATRICES USING LC-MS/MS METHOD

ABSTRACT

β -agonists are synthetically produced substances that are used in the treatment of pulmonary obstructive diseases in humans and domestic animals. In domestic animals are also used as heart tonics and tocolytics. In addition, β -agonists can be used as growth promoters in many animal species for meat production. Application of 5-10 times higher doses than the approved therapeutic doses in animals for meat production results in significant increase of muscle mass, better utilization of food, improved carcass composition and significant reduction of body fat.

After application in farm animals, residues of β -agonists are accumulated in the tissues and are a potential risk to human health. There are many documented cases where the consumption of meat and liver containing β -agonists has led to serious intoxications in humans. Therefore, with Council Directive 96/22/EC, the European Union prohibits the use of β -agonists in farm animals, whereas with Council Directive 96/23/EC, the European Union prescribes the measures for monitoring these substances in animals and products of animal origin.

The aim of this study was optimization and validation of confirmatory LC-MS/MS method for determination of β -agonists in the urine, muscle and liver and monitoring the presence of these substances in the above matrices, in the period of 2014-2016. With optimization of the LC-MS/MS method the chromatographic conditions and the conditions of the mass detector were optimized. For each β -agonist with the mass detector, with ESI +, were determined the parent ions and three daughter ions. The validation of the method was carried out in accordance with the Commission Decision 2002/657/EC and the following validation parameters were established: linearity, CC α , CC β , specificity/selectivity, accuracy and precision. . In this study a total of 525 samples were analyzed, from which 274 urine samples, 150 muscle samples and 101 liver samples.

From the data obtained from the validation it can be concluded that they are in accordance with the requirements of the Commission Decision 2002/657/EC. Therefore, in this study, was optimized and validated a linear, specific, selective, accurate and precise confirmatory LC-MS/MS

method for the determination of β -agonists in the urine, muscle and liver derived from animals used in human nutrition. In the analyzed samples the β -agonists residues at a concentration above the CC α were not detected, which practically means that the results indicate a zero incidence of illegal or accidental use of β -agonists and that the samples are free of these harmful substances.

Key words: β -agonists, biological matrices, optimization, validation, LC-MS/MS

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

Кратенка	Значење на кратенката
ДЕС	Диетилстилбестрол
ЕУ	Европска Унија
ИС	Интерен стандард
КЕ	Енергија на колизија
П	Прилог
РВ	Ретенционо време
РМ	Република Македонија
САД	Соединетите Американски Држави
СИС	Соодветен интерен стандард
Сор.	Соработници
Сл.	Слично
СТД	Стандард
СТДМФ	Стандарди во мобилна фаза
СТДМ	Стандарди во матрикс
тм	Телесна маса
ФВМС	Факултет за ветеринарна медицина Скопје
АТР	Аденозин трифосфат
$^{\circ}\text{C}$	Степен целзиусов
cAMP	Цикличен аденозин монофосфат
CC α	Decision limit – Лимит на одлучување
CC β	Detection capability – Способност за докажување
CI	Chemical ionization – хемиска јонизација
CRL	Community reference laboratories – Референтни лаборатории на ЕУ
CRM	Сертифициран референтен материјал
CV	Коефициент на варијација
ЕС	European Commission – Европска Комисија
FDA	Food and drug administration - Управување со храна и лекови
EFSA	European Food Safety Authority –Европска агенција за безбедност на храна
EI	Electron impact – електронски удар
ELISA	Enzyme-linked immune sorbent assay
ESI	Electrospray Ionization-јонизација со електроспреј
FAB	Fast Atom Bombardment-бомбардирање со брзи атоми
FD&FI	Field desorption/ionization- десорпција/јонизација во јако поле
GC-ECD	Gas chromatography with electron capture detector –гасна хроматографија со детектор со електронски зафат
GC-MS	Gas chromatography with mass spectrometry – гасна хроматографија со масена спектрометрија
GC-MS/MS	Gas chromatography tandem mass spectrometry – гасна хроматографија тандем масена спектрометрија
HPLC-UV	High pressure liquid chromatography with ultraviolet detector – високоефикасна течна хроматографија со ултравиолетов детектор

LC-MS	Liquid chromatography with mass spectrometry – течна хроматографија со масена спектрометрија
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry – течна хроматографија тандем масена спектрометрија
M	mol
mg/kg	Милиграм/килограм
ml/min	Милилитар/минута
mm Hg столб	Милиметар на живин столб
MRL	Maximum residue limit (максимално дозволено ниво на остатоци)
MRM	Multiple reaction monitoring – повеќекратно следење на реакцијата
MRPL	Minimum required performance limit (Минимална потребна граница на ефикасност)
m/z	Маса на јонот/број на полнежи на јонот (маса/полнеж)
ng/g	Нанограми/грам
ng/kg	Нанограми/килограм
ng/ml	Нанограми/милилитар
PCB	Полихлорирани бифенили
ppb	Parts per billion
PT	Proficiency test
RIA	Radioimmuno assay
rpm	Revolutions per minute
SD	Стандардна девијација
UDP	Uridine 5'-diphospho
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography – ултра високо ефикасна течна хроматографија
V	Волумен
μ g/kg	Микрограми/килограм
μ g/l	Микрограми/литар
μ l	Микролитар

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД.....	1
2. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА.....	5
2.1. Историски осврт.....	5
2.2. Дефиниција, хемиска структура и претставници.....	6
2.3. Механизам на дејство.....	8
2.4. Метаболизам.....	11
2.5. Употреба на β -агонистите во терапевски цели и како промотори на раст.....	17
2.6. Остатоци од β -агонисти во ткивата на третираните животни.....	19
2.7. Несакани ефекти кај луѓето.....	24
2.8. Законски регулативи, MRL, MRPL и препорачани концентрации.....	26
2.9. Контрола на безбедноста на храната во однос на присуство на β -агонисти.....	28
2.10. Аналитички методи за определување на β -агонисти.....	29
2.10.1. Скрининг методи.....	30
2.10.2. Потврдни методи.....	30
2.10.3. Течна хроматографија тандем масена спектрометрија (LC-MS/MS).....	31
2.10.3.1. Течна хроматографија.....	31
2.10.3.2. Масена спектрометрија.....	32
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	36
4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА РАБОТА.....	38
4.1. Примероци за анализа.....	38
4.2. Реагенси.....	39
4.2.1. Реагенси и растворувачи.....	40
4.2.2. Подготовка на раствори.....	41
4.2.3. Стандарди и интерни стандарди.....	41
4.2.3.1. Стандарди.....	41
4.2.3.2. Интерни стандарди.....	41
4.2.3.3. Подготовка на стандардни раствори.....	42
4.2.3.3.1. Подготовка на стандардни раствори за матрикс урина.....	43
4.2.3.3.2. Подготовка на стандардни раствори за матрикс мускул.....	46
4.2.3.3.3. Подготовка на стандардни раствори за матрикс црн дроб.....	47

4.3. Лабораториска опрема.....	48
4.3.1. Лабораториска опрема, прибор и стакларија.....	48
4.3.2. LC-MS/MS опрема.....	49
4.4. Методи.....	49
4.4.1. Подготовка на примероци.....	49
4.4.1.1. Подготовка на примероци урина.....	49
4.4.1.2. Подготовка на примероци црн дроб и мускули.....	50
4.4.2. LC-MS/MS метод.....	52
4.4.2.1. Хроматографски услови.....	52
4.4.2.2. MS/MS услови.....	52
4.4.3. Валидација на аналитичките методи за определување на β -агонисти.....	53
4.4.3.1. Линеарност.....	53
4.4.3.2. Лимит на одлучување – ССа.....	55
4.4.3.3. Способност за докажување – СС β	55
4.4.3.4. Специфичност/селективност.....	56
4.4.3.5. Точност.....	57
4.4.3.6. Прецизност.....	57
4.4.4. Споредба на ефикасноста помеѓу два типа колони.....	58
4.4.5. Контрола на квалитет.....	58
5. РЕЗУЛТАТИ.....	60
5.1. Оптимизација на LC-MS/MS метод.....	60
5.2. Линеарност на методот.....	61
5.2.1. Линеарност на методот за детекција на β -агонисти во урина.....	61
5.2.2. Линеарност за методот за детекција на β -агонисти во мускул.....	62
5.2.3. Линеарност за методот за детекција на β -агонисти во црн дроб.....	63
5.3. Специфичност и селективноста на методот.....	63
5.4. Определување на ССа и СС β	66
5.4.1. Определување на ССа и СС β во урина.....	66
5.4.2. Определување на ССа и СС β во мускул.....	67
5.4.3. Определување на ССа и СС β во црн дроб.....	68
5.5. Точност на методот.....	68

5.5.1. Точност на методот за матрикс урина.....	68
5.5.2. Точност на методот за матрикс мускул.....	69
5.5.3. Точност на методот за матрикс црн дроб.....	70
5.6. Прецизност на методот.....	72
5.6.1. Прецизност на методот за матрикс урина.....	72
5.6.2. Прецизност на методот за матрикс мускул.....	75
5.6.3. Прецизност на методот за матрикс црн дроб.....	78
5.7. Споредба на ефикасноста на два типа колони за цврсто-фазна екстракција преку параметрите прецизност и точност.....	81
5.7.1. Споредба на параметрите прецизност и точност од два типа колони за цврсто-фазна екстракција кај матрикс урина.....	81
5.7.2. Споредба на параметрите прецизност и точност од два типа колони за цврстофазна екстракција кај матрикс мускул.....	82
5.7.3. Споредба на параметрите прецизност и точност од два типа колони за цврстофазна екстракција кај матрикс црн дроб.....	83
5.8. Контрола на квалитет.....	84
5.9. Анализа на примероци.....	87
6. ДИСКУСИЈА.....	89
6.1. Оптимизација на LC-MS/MS метод.....	90
6.2. Линеарност на методот.....	92
6.3. Специфичност и селективност на методот.....	93
6.4. Определување на $CC\alpha$ и $CC\beta$	94
6.5. Точност на методот.....	95
6.6. Прецизност на методот.....	97
6.7. Споредба на ефикасноста на два типа колони за цврсто-фазна екстракција преку параметрите прецизност и точност.....	99
6.8. Контрола на квалитет.....	100
6.9. Анализа на примероци.....	101
7. ЗАКЛУЧОК.....	106
8. ЛИТЕРАТУРА.....	121
9. ПРИЛОЗИ.....	135

1. ВОВЕД

Производството на храна од животинско потекло (месо, млеко, јајца и мед) е неопходно за одржување на човештвото. Со оглед на тоа што популацијата на луѓе во светот е во постојан пораст, постои зголемена побарувачка за производство на храна, а условите и просторот се недоволни за да се постигне сето тоа. Од друга страна, пак, зголемената побарувачка на храна доведува до максимизирање на количината на прехранбени производи и истовремено намалување на трошоците, поради што новите практики во одгледувањето на животни се дизајнирани преку контролирање на различни фактори како што се генетика, исхрана, здравје, управување и услови на животната средина.

Со цел да се овозможи зголемено производство на храна од животинско потекло, покрај другото, во производството се вклучени интензивни практики на одгледување, кои опфаќаат употреба на дозволени и забранети ветеринарно-медицински препарати кои се администрираат рутински како дел од процесот на хранење или пак во форма на инјекции, импланти и сл. Ветеринарно-медицинските препарати се користат како за превентивни и терапевтски цели, така и како промотори за раст, за интензивно одгледување на животните.

Овој процес на употреба на ветеринарно-медицински препарати во сточарското производство стана составен дел на сточарството. И додека со нивната употребата се постигнува зголемено производството на храна и намалена загуба на животните поради болест, тие истовремено претставуваат ризик по здравјето на луѓето поради можноста од појава на остатоци од ветеринарно-медицински препарати во храната, кои може да се појават во оригиналната форма или пак како метаболити и/или коњугати (Cronly, 2011; Marilena, 2015).

Според Директивата 96/23/ЕС ветеринарно-медицинските препарати се поделени во две групи и тоа: група А во која спаѓаат супстанциите кои имаат анаболички ефекти и се забранети за употреба кај животните кои се употребуваат во исхраната на луѓето, и група Б во која спаѓаат ветеринарни лекови (дозволени за употреба) и контаминентите од околината (Табела 1).

Табела 1. Класификација на ветеринарно-медицински препарати според Директивата 96/23/ЕС

Група А	
A1	Стилбени
A2	Тиреостатици
A3	Стероиди
A4	Деривати на резорцилната киселина, вклучувајќи го и зеранолот
A5	Бета агонисти
A6	Хлорамфеникол, нитрофурани, нитроимидазоли, дапсон, хлорпромазин, (според Директивата 2377/90/ЕЕС)
Група Б	
B1	Антибактериски супстанци, вклучувајќи ги и сулфонамидите и кинолоните
B2	Други ветеринарни лекови
	B2а - антихелминтици
	B2б –кокцидиостатици
	B2ц – карбамати и пиретроиди
	B2д - седативи
	B2е – нестероидни антиинфламаторни лекови
B2ф – други фармаколошки активни супстанци	
B3	Други супстанци и контаминенти од околината
	B3а – органохлорни пестициди, вклучувајќи и РСВ
	B3б – органофосфорни пестициди
	B3ц – хемиски елементи
	B3д - микотоксини
	B3е – бои
B3ф – други	

Супстанците од А група се познати уште како промотори на раст и при употреба кај животните за тов доведуваат до зголемен раст, особено кај телиња и свињи, а главната цел е на легален или нелегален начин да се добие што повеќе мускулно ткиво за помали финансиски средства, што значи дека улогата на економијата е клучна. Употребата на тиреостатиците како промотори на раст, на пример, е доста профитабилна бидејќи водата која се врзува во мускулното ткиво поради употребата на овие супстанци им се продава како месо на потрошувачите (Stephany W.R., 2010). Според досегашните истражувања вкупниот ефект од примената на анаболиците како промотори за раст се гледа во подобро искористување на храната, зголемување на вкупната маса на животните, зголемена мускулна маса, зголемен дневен прираст, подобра структура на труповите на закланите животни, намалено депо на масти, прераспределба на хранливи материи од масното во мускулното ткиво и скратен период на тов (Spiric и соp., 2001; Pleadin и соp., 2011; Uzunov

и сор., 2013). Администрацијата на тиреостатици кај говедата доведува до намалување на базалниот метаболизам, намалување на подвижноста на желудочно-цревниот тракт и екстраклеточно задржување на водата. Затоа абнормалното зголемување на телесната тежина при употреба на овие супстанции се состои од зголемена количина на храна во желудочно-цревниот тракт и зголемено задржување на водата во мускулното и поткожното ткиво кај животните. Месото од животните третирани со тиреостатици е многу влажно и послабо обоено (Courtheyn и сор., 2002; Le Bizet и сор., 1997, Vanden Bussche; 2010). Стилбените и нивните деривати доведуваат до подобрена конверзија на храната и подобрување на растот, зголемен метаболизам на протеините и намалување на мастите (Taşci, 2014). Анаболичките стероиди пак доведуваат до подобро искористување на храната, подобрување на растот и зголемена мускулна маса која се јавува како резултат на зголемена синтеза на протеините и намалување на нивната деградација. Болденонот, покрај претходно наведените ефекти, доведува и до задржување на водата во мускулното ткиво. (Dayton и White, 2013, Gabr Faten и сор., 2009). Зеранолот при употреба како промотор за раст кај фармски животни доведува до зголемен раст, зголемен просечен дневен прираст, подобрена конверзија на храна за 3-8 %, зголемување на финалната телесна тежина за 4-15% (Song и Choi, 2001), додека β -агонистите го подобруваат растот со стимулирање на β адренергичните рецептори на површината на клетките. Во мускулното ткиво β агонистите ја забрзуваат синтезата на протеините и клеточната хипертрофија со инхибиција на протеолизата, а во масното ткиво ја забрзуваат липолизата, со што може да се постигне намалување на масното ткиво на трупот до 40 % и зголемување на протеините до 40 % (Courtheyn и сор., 2002).

По употребата на промоторите за раст голем дел од нив остануваат во месото и внатрешните органи, поради што се појавуваат несакани ефекти кај луѓето кои конзумираат таква храна. Тиреостатиците имаат канцерогено и тератогено дејство врз здравјето на луѓето. Анаболиците се потенцијален ризик за канцер на гради и матка кај жените, бенигни и малигни тумори на црн дроб, продлабочен глас кај жените, гинекомастија, атрофија на тестиси, стерилитет, кардиоваскуларни заболувања, појава на хермафродитизам кај диви животни и тн. (Bing и сор., 2005; Uzunov и сор., 2013). Зеранолот пак има мутагени, тератогени, карциногени и генотоксични својства, додека стилбените имаат мутагени, тератогени и канцерогени својства (Wang и сор., 2007; Han и сор., 2013). β агонистите при

акутни труења доведуваат до тремор, тахикардија, нервни симптоми, повраќање, пролив и слично, а во хронични случаи доведуваат до промени во кардиоваскуларниот систем.

Органите и телата за безбедност на храната во повеќето земји во светот имаат воспоставено програми за следење и контрола на примената на ветеринарно-медицинските препарати кај животните кои се користат во исхраната на луѓето и имаат изготвено проценка на ризик за голем број супстанции врз основа на научни податоци. Лабораториите во кои се врши анализа на примероци храна претставуваат јадро на таквите програми, при што овозможуваат релевантни докази за злоупотреба на ветеринарно-медицинските препарати, врз основа на кои органите и телата за безбедност на храната донесуваат одлуки (Kumar, 2014).

Поради несаканите ефекти кои се појавуваат кај луѓето по конзумирање на храна од животинско потекло која содржи остатоци од промоторите за раст (стилбени и нивни деривати, анаболички стероиди, тиреостатици, β -агонисти) Европската Унија ја забрани употребата на овие супстанции кај животните кои се користат во исхраната луѓето со Директивата 96/22/ЕС од 1996 година, а со Директивата 96/23/ЕС Европската Унија ги утврди мерките кои земјите треба да ги превземат со цел следење на овие супстанции кај животните. Во Република Македонија исто така е забранета употребата на овие супстанции кај животни кои се користат за исхрана на луѓето, поради што секоја година се спроведува мониторинг и контрола на присуство на остатоци и контаминенти во живи животни и храната од животинско потекло од животни од Република Македонија и од увоз. Начинот на вршење на мониторинг и контролата на присуството на остатоци и контаминенти се врши според „Правилник за начинот на вршење на мониторинг и контрола на присуството на резидуи и контаминенти во живите животни и храната од животинско потекло, начинот на вршење на официјалните контроли и постапките за мониторинг и контрола на резидуи и недозволен супстанции и мерките кои се преземаат во случај на сомнение и на позитивен наод на присуство на резидуи и недозволен супстанции” донесен од страна на Агенцијата за храна и ветеринарство во 2011 година и истиот е во согласност со Директивите 96/23/ЕС и 96/22/ЕС.

2. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА

2.1 Историски осврт

Употребата на хормоните како промотори на раст во сточарското производство има подолга историја. Уште во триесетите години на минатиот век сточарите сфатиле дека кравите даваат повеќе млеко доколку кај нив се инјектира материјал добиен од хипофизата кај кравите. Подоцна е утврдено дека говедскиот хормон на раст е одговорен за таа појава. Меѓутоа во тоа време технологијата се уште не била доволно развиена за да се произведе голема количина на материјал за широка употреба кај животните. Подоцна, во осумдесетите години на минатиот век, почнал да се произведува чист хормон на раст со користење на рекомбинантна ДНК технологија. Со ова било овозможена поширока употреба на овој хормон, а веќе во 1993 година Управата за храна и лекови (Food and drug administration, FDA) ја одобрила употребата на овој хормон кај млечните крави. Производителите на хормонот на раст неодамна процениле дека 30 % од млечните крави во САД се третираат со овој хормон (Gandhi и Snedeker, 2000; Raun и Preston, 2002).

Исто така, во триесетите години на минатиот век било утврдено дека женскиот полов хормон естроген влијае на стапката на раст кај говедата и живината. Со откривањето на хемиската структура на овој хормон, истиот почнал да се произведува синтетички како резултат на што во раните 50-ти години на минатиот век сточарите почнале да ги користат синтетичките естрогени за зголемување на растот кај говедата и пилињата. Диетилстилбестролот (ДЕС) бил еден од првите синтетички естрогени кој се користел во тој период на пилињата. Подоцна било утврдено дека овој хормон е канцероген поради што во доцните 70-ти била забранета неговата употреба во производството на храна (Gandhi и Snedeker, 2000; Raun и Preston, 2002). Во 1956 година од страна на FDA исто така биле одобрени хормонските импланти кои содржат естрадиол бензоат/прогестерон за зголемување на растот и подобро искористување на храната. Подоцна биле произведени и одобрени импланти кои содржат зеранол, тренболон ацетат, тестостерон, 17β -естрадиол или комбинации од истите и нивната употреба во сточарското производство се зголемила во седумдесетите години од минатиот век (Doyle, 2000; Johansson, 2004).

Во 1965 година Cunningham објавил податоци кои укажувале на можноста за менување на растот кај цицачите со администрација на супстанции како што се кофеин, теофин, никотин и епинефрин, кои директно или индиректно би можеле да функционираат со менување на интрацелуларната концентрација на cAMP (Mersmann, 1998; Cunningham, 1965).

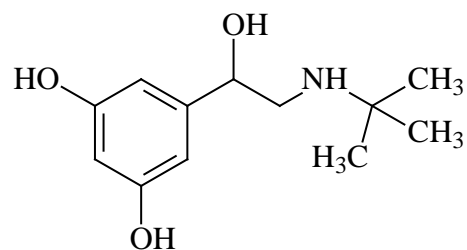
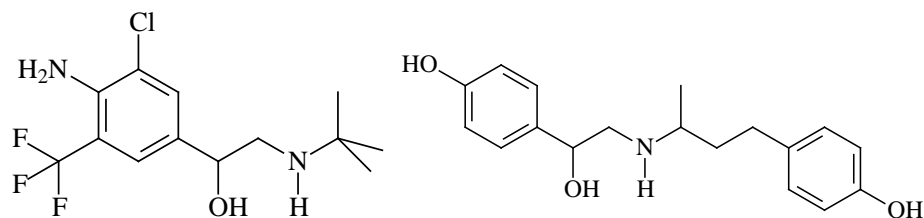
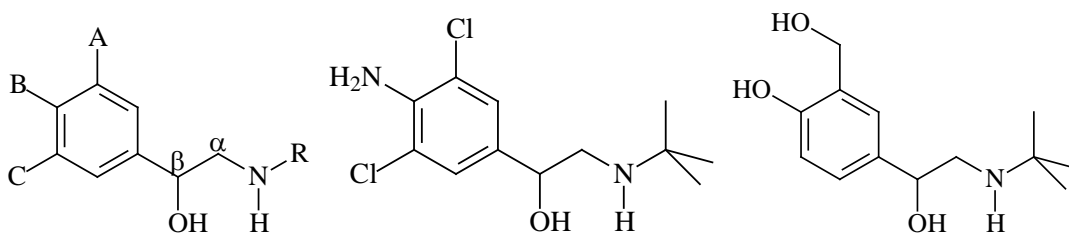
Првата документирана употреба на кленбутерол била во 1978 година кога германска компанија со одобрение од страна на FDA го тестирала својот нов стимулативен лек за терапија на респираторни болести кај коњи (Wood и сор., 2010).

Ricks и сор., 1984, објавиле податоци за модулација на растот на животните хранети со кленбутерол. Кленбутеролот кој се администрирал орално кај говеда, кокошки, свињи и овци предизвикал зголемување на мускулната маса и намалување на масното ткиво, а во некои случаи дошло до зголемување на телесната тежина и зголемено искористување на храната. Во наредните години неколку други β -агонисти (циматерол, рактопамин, салбутамол) биле користени во исхраната на различни видови домашни животни, а ефектите кои ги предизвикале биле слични со оние на кленбутеролот (Ricks и сор., 1984). Во 1988 година инспекторите за храна се сомневале во употреба на кленбутеролот во сточарското производство во САД и Канада, додека во Тексас кленбутеролот се користел кај животните при изведување на претстави со животни. Во Квебек пак кленбутеролот бил пронајден во телешко месо. Поради употребата на кленбутеролот во претстави со животни во Тексас во 1989 г. било иницирано истражување за аналитичко испитување на остатоци од кленбутерол. Покрај кленбутеролот истражувањето требало да ги опфати и циматеролот, салбутамолот и фенотеролот во црн дроб кај свињи и телиња, а методот бил финализиран во 1991 година (Wood и сор., 2010). И покрај тоа што не се сметаат за хормони, во деведесеттите години, β -агонистите биле воведени како ветеринарни лекови и промотори на раст (Ricks и сор., 1984; Кау и сор., 2017).

2.2 Дефиниција, хемиска структура и претставници

β -агонистите се деривати на катехоламините, како што се епинефрин и норепинефрин, а нивната структура ја сочинува шесточлен ароматичен прстен, хидроксилна група врзана за β -јаглерод, позитивно наелектризиран азот во страничниот

ланец на етиламин и супституент на алифатичниот азот (Слика 1, а-ѓ). Оваа структура е заедничка за сите β -адренергични фенетаноламини, со исклучок на големите групи на алифатичниот азот кои се присутни на природните адренергични невротрансмитери (Smith и сор.,1998; Кау и сор., 2017). Хемиските супституенти на ароматичниот прстен значително влијаат на долговечноста на β -агонистот во ткивото на цицачот и ефикасноста на соединението на рецепторот (Smith, 1998).



Слика 1. Хемиска структура на β -агонисти

Според хемиската структура β -агонистите може да се класифицираат во 3 групи: анилини (кленбутерол), резорциноли (тербуталин, фенотерол) и феноли (салбутамол, рактопамин, ритодрин) (Dürsch и Meyer, 1992; Smith, 1998).

Резорцинолите се карактеризираат со две хидроксилни групи во мета позиција на ароматичниот прстен и затоа во неутрални и алкални услови хидроксилните групи дисоцираат, молекулата се јонизира и станува растворлива во воден раствор. Спротивно на тоа, кленбутеролот и другите анилини во алкални услови, го губат позитивниот полнеж на алифатичната амино група, остануваат без полнеж и се хидрофобни. Во кисели раствори алифатичната амино група на резорцинолите, салбутамолот и кленбутеролот – како соединенија се во иста состојба на позитивна јонизација на алифатичната амино група и немаат полнеж на ароматичниот прстен. Поради оваа позитивна јонизација, β -агонистите не можат да бидат екстрахирани од примероците со органски растворувачи и треба да бидат прочистени со цврсто-фазна екстракција (Dürsch и Meyer, 1992).

Хидроксилираните прстенести β -агонисти, како што се салбутамол и рактопамин, брзо се деактивираат со ензими во црниот дроб и цревата, додека β -агонистите супституирани со халоген се отпорни на овие ензими. Сепак, халогените не го инхибираат врзувањето со рецепторот. Мабутерол и кленбутерол биле специјално дизајнирани за да се спротивстават на брзата метаболичка деградација од ензими активни кон ароматични хидроксилни групи (Morgan, 1990). Најпознати претставници на β -агонистите кои се употребуваат како промотори на раст се: кленбутерол, салбутамол, тербуталин, рактопамин, цимбутерол, зилпатерол и тн.

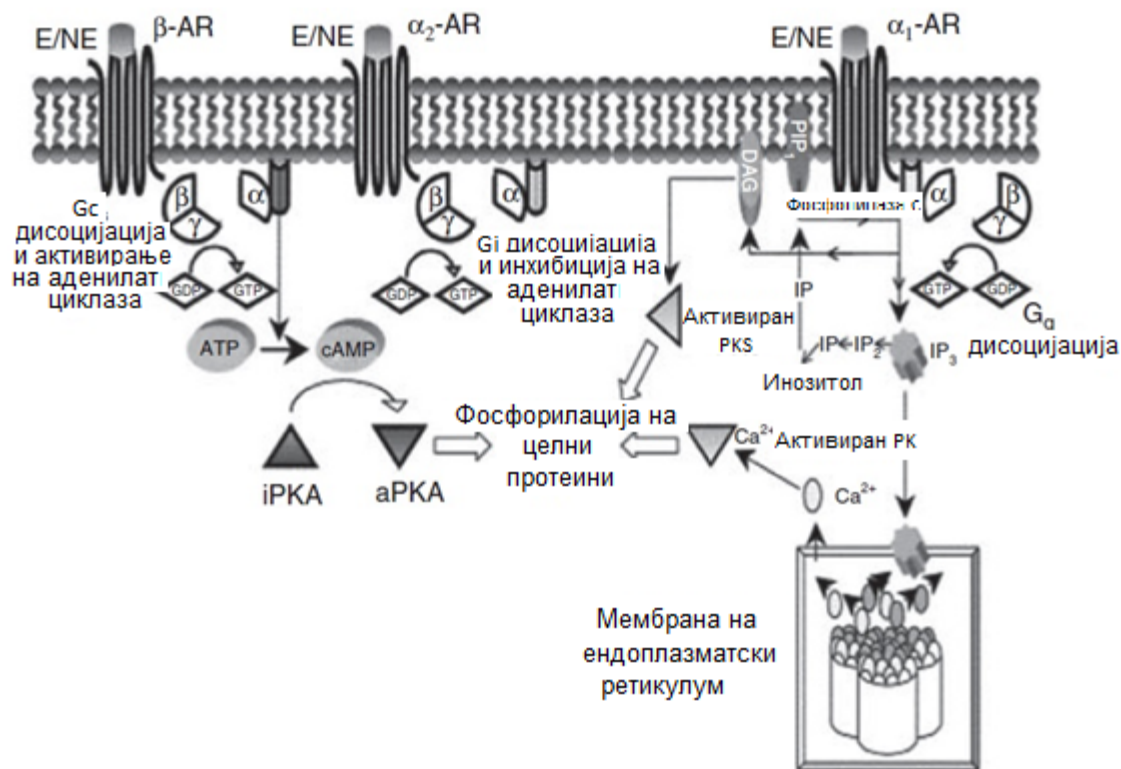
2.3 Механизам на дејство

Адренергичните рецептори се рецептори на клеточната мембрана, за разлика од другите хормони кои делуваат преку рецептори на јадрото или цитоплазмата (Fiems, 1987). Овие рецептори се присутни во сите ткива поврзани со растот, вклучувајќи ги клетките на скелетните мускули и масното ткиво, како и нервните и крвните клетки.

Постојат два типа адренергични рецептори: α и β . β -адренергичните рецептори се голема група рецептори кои се функционално разновидни. Нивната големина варира, но во просек се состојат од 400 аминокиселини кои содржат 7 трансмембрански хидрофобни

домени кои се прикачени за клеточната мембрана. Овие рецептори се врзуваат за нивните ефекторни протеини со помош на гванин нуклеотиди. β -адренергичните рецептори имаат два терминални краја од кои едниот содржи аминокиселинска група и се наоѓа на екстрацелуларната страна, а другиот содржи карбоксилна група и се наоѓа интрацелуларно. β -адренергичните рецептори кај цицачите ги вклучуваат подтиповите β_1 -, β_2 -, β_3 -, β_4 адренергични рецептори. β_1 -рецепторите ја стимулираат липолизата, активноста на срцевиот мускул и на мазната мускулатура во цревата, за разлика од β_2 -рецепторите кои предизвикуваат бронходилатација, вазодилатација и вазодепресија преку релаксација на мазната мускулатура, а исто така ја олеснуваат гликогенолизата во црниот дроб. β_1 -рецепторите се наоѓаат во срцевиот мускул и јукстагломеруларниот апарат, β_2 -рецепторите се локализирани во мазната мускулатурата на крвните садови, душникот, уринарниот систем, гениталниот систем, желудечно-цревниот систем, црниот дроб и скелетната мускулатура, β_3 -рецепторите се наоѓаат во кафеавото и белото масно ткиво, а имаат улога во липолизата и термогенезата, додека подтипот β_4 -адренергични рецептори може да бидат застапени во некои делови на кардиоваскуларниот систем и масното ткиво. Застапеноста на поединечните рецепторни подтипови е различно во секое ткиво или орган и зависи од видот на животното (Fiems, 1987; Suppadit, 2004; Johansson, 2004; Kay и соp., 2017; Du Toit, 2017).

β_2 -адренергичните агонисти во организмот делуваат преку серија биохемиски реакции (Слика 2) индуцирани со врзување на овие супстанции за специфични β_2 -адренергични рецептори лоцирани на клеточните мембрани во ткивата на цицачите. β_2 -адренергичните рецептори се директно поврзани со L типот калциумови канали и овој комплекс е поврзан со Gs протеинот со чија активација започнуваат биохемиските реакции. Трансдукцијата на сигналот вклучува активација на рецептор/аденилат циклаза систем од страна на Gs протеин, при што активираната аденилат циклаза ја катализира синтезата на цикличен 3,5-аденозин монофосфат (сАМФ) од аденозин трифосфат (АТФ). Потоа следи дополнително засилување преку ензимска каскада и активирање на протеинска синтеза преку митоген-активиран протеин киназа и другите кинази (анаболен ефект), како и инхибиција на деградација на протеините (антикатаболичен ефект). (Mersmann, 1998; Badino и соp, 2005; Rubensteinn и соp., 2006; Kay и соp., 2017).



Слика 2. Механизам на претворање на сигналот од β -адренергичен рецептор (Badino и сор., 2005)

Еден од најочигледните ефекти на орално администрирани β -агонисти кај говеда, свињи и овци е зголемувањето на мускулната маса. Поради тоа што постнаталниот раст на скелетните мускули првенствено е резултат на хипертрофија, со администрација на β -агонисти се очекува зголемување на синтезата на мускулни протеини, намалено разградување на истите или комбинација од двете што придонесува до стимулирано зголемување на мускулната маса (Mersmann, 1998). Според Johnson и сор., 2014, администрацијата на кленбутерол или циматерол кај преживарите доведува до зголемување на мускулната маса од 8-40%, а напречниот пресек на *musculus longissimus dorsi* се зголемил помеѓу 11-39%.

Во масното ткиво β -агонистите значително го стимулираат адипоцитниот деградативен липиден метаболизам. Активирањето на β -адренергичните рецептори предизвикува зголемување на cAMP што ја активира протеин киназата A, што пак ја фосфорилира липазата. Фосфорилирана липаза е активирана форма што го иницира деградативниот процес - липолизата. Масните киселини се произведуваат и во голема мера

се транспортираат од адипоцитите кои се користат како оксидативни горива од други ткива. Синтезата на масни киселини и естерификацијата на масните киселини во триацилглицерол, складирањето на примарната енергија на молекулите во адипоцитот, се инхибираат од страна на β -агонистите. Така, зголемувањето на катаболичките и намалувањето на анаболичките - метаболички процеси на липидите во адипоцитот би довеле до намалена хипертрофија на адипоцит со последователно намалување на депонирањето на масти, а со тоа и до намалување на масното ткиво на трупот (Valladares-Carranza, 2017; Mersmann, 2015).

Поради тоа што β -адренергичните рецептори се застапени во повеќе клетки и ткива, покрај дејството на скелетната мускулатура и масното ткиво, β -агонистите имаат и голем број на помалку изразени директни механизми *in vivo*. β -агонистите може да го зголемат протокот на крв во одредени делови на телото. При зголемување на протокот на крв во скелетната мускулатура се зголемува и испораката на супстрати и извори на енергија за синтеза на протеини со што се подобрува процесот на хипертрофија, додека зголемениот проток на крв доведува до забрзана работа на срцето. Со зголемување на протокот на крв во масното ткиво се зголемува присуството на неестерифицирани масни киселини со што се подобрува разградувањето на липидите. Покрај тоа β -агонистите доведуваат до забрзување на пулсот, дилатација на коронарните крвни садови, релаксација на бронхијалната мускулатура и мускулатурата на матката, го стимулираат лачењето на инсулин, гликогенолизата и гликогеногенезата во црниот дроб, како и гликогенолизата во скелетната мускулатура (Mersmann, 1998; Johansson, 2004; Yimlamai, 2004).

2.4 Метаболизам

Метаболизмот на β -агонистите опфаќа апсорпција, дистрибуција, биотрансформација и елиминација. Истражувањата покажуваат дека β -агонистите имаат висока орална биорасположливост, добра орална апсорпција и значителна екстраваскуларна дистрибуција од администрираната доза, бидејќи врзувањето за протеините на плазмата на повеќето β -агонисти е занемарливо. Главно апсорпцијата на повеќето β -агонисти се одвива во гастро-интестиналниот тракт. Истражувањата кај стаорци покажале дека мабутеролот се апсорбира по целата должина на тенкото црево,

тербуталинот се апсорбира во дванаесетпалачното црево кај луѓето, додека салбутамолот се апсорбира добро во целиот желудечно-цревен тракт кај луѓе. Елиминацијата после оралната администрација се одвива главно преку биотрансформација, додека по интравенска апликација, елиминацијата главно се одвива преку бубрезите, односно урината. Покрај тоа, β -агонистите се излучуваат и преку млекото, плунката, жолчката и фецесот. (Smith, 1998; Suppadit, 2004; Kay и сор., 2017).

Највисоката концентрација на β -агонистите во плазмата кај луѓето се јавува 1-3 часа по оралната администрација, а слична состојба е забележана и кај домашните животни. Максималната доза пак на најпознатиот β -агонист, кленбутеролот, во плазмата кај луѓе, кучиња, зајаци и глувци се јавува 2-3 часа по администрацијата. Кај телиња после третман со кленбутерол во доза од 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ на телесна маса, два пати дневно, кленбутеролот може да биде детектиран во плазмата по 20 минути до 1 час, а највисоката концентрација во плазмата се јавува по 5-7 часа од третманот и првиот ден изнесува 0.5 ng/ml, а третиот ден изнесува 0.7 ng/ml. Во последниот ден од третирањето со истата доза, односно 21-от ден, највисоката концентрација на кленбутерол во плазмата изнесува 1.1 ng/ml. Двократното зголемување на концентрацијата на кленбутерол е резултат на акумулација на кленбутеролот со тек на време. Концентрацијата на кленбутерол во урината на телињата за време на периодот на администрација се движел од 6 до 193 ng/ml. Елиминацијата на кленбутеролот била следена 3 недели по прекилот на третманот и утврдено е дека концентрацијата на кленбутеролот во урината е околу 40 пати повисока од концентрацијата во плазмата (Smith, 1998; Meyer и Rinke, 1991). Според експериментот на Stoffel и Meyer, 1993, изведен на крави во третиот стадиум од лактација, со хронична администрација на кленбутерол во доза од 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ на телесна маса, два пати дневно, кленбутеролот бил детектиран 2 часа по првата апликација, а највисоката концентрација на кленбутерол во плазмата од 5.0 ng/ml до 5.5 ng/ml се постигнала после 3-4 дена од администрацијата. Покрај концентрацијата во плазмата била следена и концентрацијата на кленбутеролот во млекото. Максималната концентрација од 12.5 ng/ml (5.5-22.5 ng/ml) била постигната 5-7 дена од почетокот на третманот. Пет дена по завршувањето на третманот концентрацијата била <0.05 ng/ml (Stoffel и Meyer, 1993). Кај со телињата третираны на истиот начин може да се забележи дека кленбутеролот во плазмата се детектира за 20 минути до 1 час по првата администрација, за разлика од кравите каде што иститот се детектира по 2 часа од првичната

администрација (Meuer и Rinke, 1991). Исто така може да се забележи дека максималната концентрација на кленбутеролот во плазмата од кравите е 3-4 пати повисока отколку концентрацијата кај телињата.

Кај телињата третирани со 10 mg/ден салбутамол кој бил додаван во млекото, во период од 10 дена, максимална концентрација била детектирана во третиот (4.78 ng/ml) и четвртиот час (3.98 ng/ml) по администрацијата на салбутамолот. Концентрацијата во урината пак се движела од 901.12 до 1923.87 ng/ml (Pou и сор., 1992).

Во истражувањето спроведено од Malucelli и сор., (2014), 160 бројлери биле поделени во 4 групи и биле третирани во период од 16 до 35 дена старост со: 1 mg/kg кленбутерол (прва група), со 10 mg/kg салбутамол (втора група), со 10 mg/kg тербуталин (трета група) и последната група била контролна. Концентрацијата на овие супстанции била детектирана на 0-тиот, 1-виот, 2-риот, 3-тиот, 7-миот, 14-тиот и 43-тиот ден по прекин на третманот во повеќе ткива и органи, а концентрација во плазмата изнесувала 1.20 ng/ml кленбутерол, 25 ng/ml салбутамол и 42.8 ng/ml тербуталин 0-тиот ден по прекин на третманот, додека 43-тиот ден по прекин на третманот, ниту една од овие супстанции не била детектирана во плазмата.

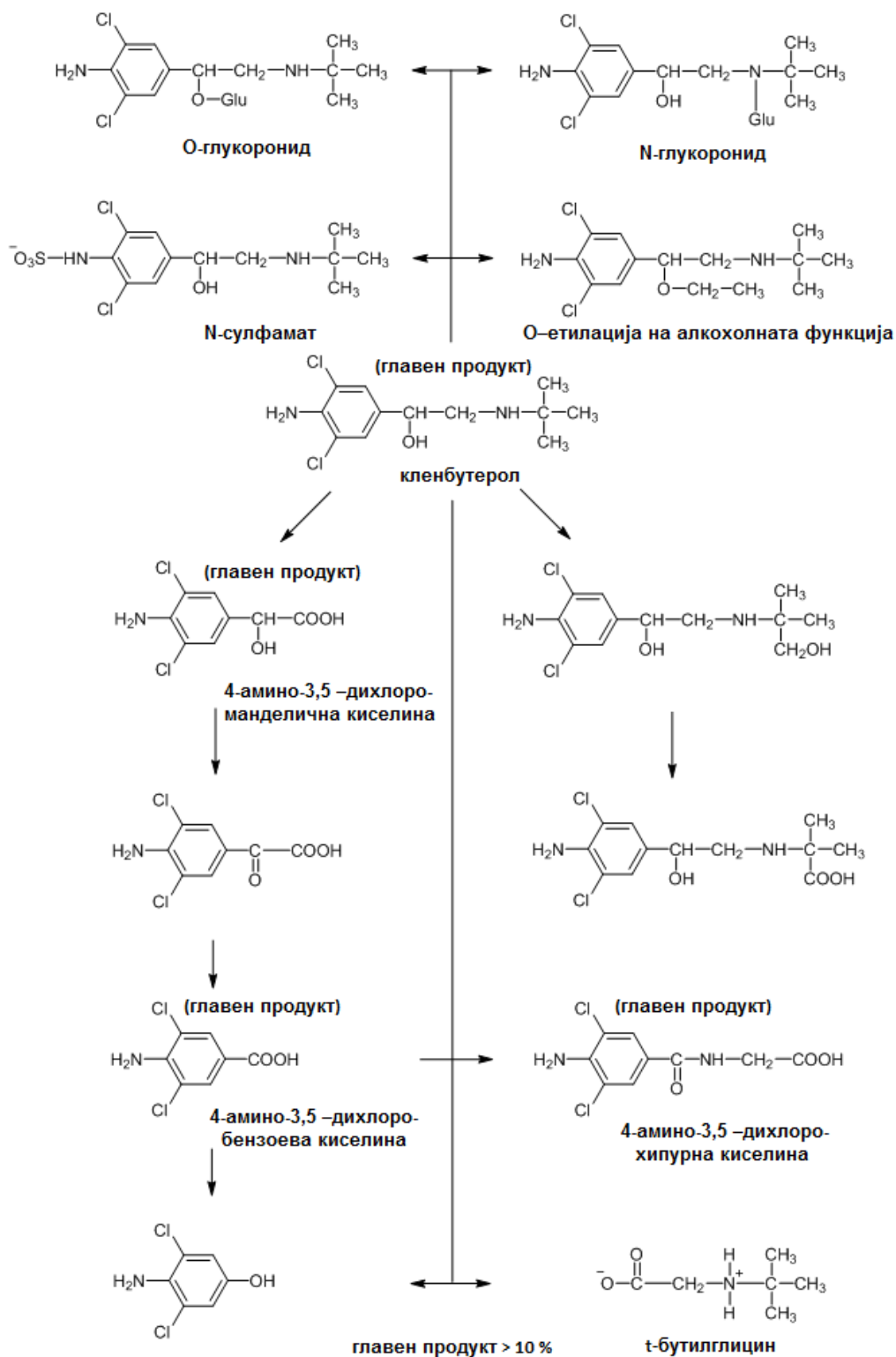
Иако присуството на β -агонисти во плазмата е веродостоен доказ за апсорпција, се смета дека не е добар начин за мерење на количината на апсорбираните лекови, па поради тоа се користи мерење на излачените радиоактивни изотопи од β -агонисти во урината по орална администрација, при што се одредува вкупната количина на апсорбираните β -агонисти. Кленбутеролот и рактопаминот се единствените β -агонисти за кои е објавено истражување за апсорпција кај домашните животни. Рактопаминот кај мисирките и свињите се апсорбира брзо и интензивно, а брза апсорпција има и кленбутеролот кај говедата во чија крв еден час по оралната администрација на изотопски обележан радиоактивен ^{14}C кленбутерол, во доза од 3 mg/kg телесна маса, била измерена концентрација од 160 ng/ml (еквивалентно на кленбутерол) (Smith, 1998).

Во истражувањето спроведено од стана на Smith и Paulson, (1997), следена е елиминација на радиоактивен ^{14}C кленбутерол преку урината и фецесот. Две телиња се третирани орално со ^{14}C кленбутерол, во доза од 3 mg/kg телесна маса, еднократно. По 48 часа од дозирањето помалку од 50% кај првото и помалку од 40% кај второто теле од внесената количина на кленбутерол биле елиминирани главно преку урината. Помалку од

3% од внесената количина на кленбутерол била елиминирана преку фецесот 48 часа после дозирањето. Елиминацијата преку жолчката пак е значајна за рактопаминот кај мисирките и изнесува 35-60 %, додека пак кај свињите позначајна е елиминацијата преку урината преку која се елиминира 88 % од орално внесената доза (Smith, 1998).

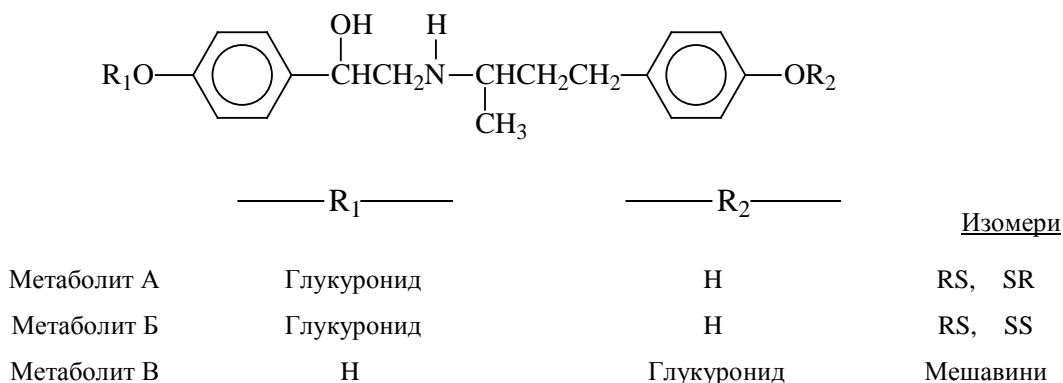
Метаболичките патишта на биотрансформација на β -агонистите со ароматична хидроксилна група, како што се салбутамол и рактопамин, се одвиваат преку коњугација со сулфат или глукуронска киселина. Со додавање на сулфат, глукуронска киселина или и двете, се олеснува брзото излучување во урината и жолчката. Коњугацијата на ароматични хидроксилни групи е единствено потврдено место на коњугативен метаболизам за β -агонистите кои имаат ароматична хидроксилна група. За соединенијата со ароматична хидроксилна група без бензил хидроксил коњугати, хидроксилниот ароматски прстен е многу подобар супстрат за уридин 5' дифосфо (UDP)-глукоронизил трансфераза отколку бензил хидроксил. Во отсуство на ароматична хидроксилна група, бета хидроксилната група може да послужи како супстрат за за UDP-глукоронизил трансфераза. Оксидативен метаболизам на β -агонистите кои содржат ароматична хидроксилна група, освен за салметеролот, не е потврден кај ниту еден животински вид (Zalko и соp., 1998; Smith, 1998; Johansson, 2004).

β -агонистите со ароматичен прстен кој содржи халогени атоми (кленбутерол, мабутерол) се отпорни на брза метаболичка деградација со коњугација со ензими (WHO, Food additives series: 53, 2004). Биотрансформацијата на кленбутеролот (Слика 3) кај говедата се одвива преку два главни метаболички патишта и тоа N-оксидација на примарниот амин и оксидативно цепање на бочниот синцир, проследено со коњугација на глицинот. Покрај тоа со сулфатната N-коњугација се произведува еден минорен уринарен метаболит SCL (CL 4-aminosulfonic acid) кој што е застапен и во фецесот.



Слика 3. Биотрансформација на кленбутерол, генерален аспект кај цицачи (WHO, Food additives series 38, 1996)

По третман со кленбутерол кај говедата главниот метаболит кој се излачува во урината е производ на оксидација на примарна аминска функција на кленбутеролот, кленбутерол-арилхидроксиламин со околу 40 % од излаченото соединение, додека 40% од излаченото соединение е во почетната форма (Zalco и соp., 1996; Smith, 1998; Johansson, 2004). Според Baillie и соp., (1980) и Hawkins и соp., (1993a) главниот метаболит во урината (28-52%) и во црниот дроб (50-80 %) по администрација на кленбутерол е кленбутерол во почетната форма, додека мала количина на 4-амино-3,5-дихлоробензоева киселина е детектирана во урина и во црниот дроб. Во урината е детектирана исто така и мала количина на 4-амино-3,5-дихлорохипурна киселина. Според Smith (1990a), во мускулите главна компонента е почетната форма на кленбутерол. Неактивната форма на салбутамолот е салбутамол сулфат кој се метаболизира во салбутамол во црниот дроб, а се излачува преку фецесот и урината како салбутамол и негов метаболизиран облик. Околу 75% од единечно администрираната доза се излачува преку урината за 72 часа, главно како салбутамол сулфат, а 4% се излачува преку фецесот (Suppadit, 2004). Истражувањето спроведено кај свињи кои биле хранети со ^{14}C рактопамин хидрохлорид покажале дека црниот дроб и бубрезите содржат три главни метаболита (метаболит А, Б и Ц) (Слика 4). Овие метаболити се формирани со коњугација на хидроксилната група во прстенот А или прстенот Б. Истите три метаболити се детектирани и во урината и се идентификувани како моноглюкорониди на рактопаминот. При тоа, во бубрезите биле детектирани 64% коњугати и 20-30% рактопамин во почетната форма (Dalidowicz и Babbitt, 1986).



Слика 4. Метаболити на рактопамин кај свињи, стаорци и куќиња

2.5 Употреба на β -агонистите во терапевски цели и како промотори на раст

Во хуманата медицина поради миорелаксирачкиот ефект, β -агонистите, се користат за терапија на хроничен бронхит, хронична опструктивна белодробна болест и астма. Во ветеринарната медицина овие супстанции се користат во терапевски цели како бронходилататори при белодробни заболувања и бронхоспазам, како срцеви тоници, а покрај тоа и како токолитици при превенција на предвремено породување на крави и кобили, на тој начин што доведуваат до релаксација на мускулите на матката и инхибиција на контракциите. Треба да се има во предвид дека долготрајната употреба на β -агонисти може да резултира со десензибилизација која е предизвикана од намалување на бројот на рецептори (Stoffel и Meyer, 1993; Jaipal, 2013; Pleadin и сop., 2014).

Со употреба во дози 5-10 пати повисоки од пропишаните, β -агонистите се користат како промотори на раст кај фармските животни. При тоа, доведуваат до значајно зголемување на мускулната маса и намалување на масното ткиво, подобро искористување на храната и зголемување на растот кај фармските животни (Granja и сop., 1998; Hajrulai-Musliu и сop., 2013; Pleadin и сop., 2014).

При тов на бројлери со додавање на циматерол и кленбутерол во храната утврдено е зголемување на телесната тежина. При тоа, најдобри резултати во тоов се постигнуваат при додавање на 0.25 mg/kg циматерол и 0.5 до 1.0 mg/kg кленбутерол. Покрај зголемување на телесната тежина се постигнува подобар прираст, подобра конверзија на храната, намалување на процентот на масно ткиво на месото од трупот и подобар рандман кај бројлерите третирани со овие β -агонисти во однос на контролната група (Fiems, 1987).

Во друго истражување спроведено кај бројлери третирани со тербуталин утврдено е дека нема промени во покачување на дневната телесна маса и дека има намалено искористување на храната во однос на контролната група, но по крајот на третманот кој траел од 21^{ви} ден на старост до 42^{ри} ден кај третираните бројлери со тербуталин, во доза од 5 mg/kg тм преку храната, утврдена е поголема тм, поголема тежина на трупот и подобар рандман во однос на контролната група и групите хранети со 10, 15 и 20 mg/kg тм тербуталин (Ansari-Pirsaraei и сop., 2007)

Кај телињата со администрација на кленбутерол во концентрација од 0.1 или 1 mg во 1 kg концентрат не доаѓа до зголемување на телесната тежина и подобрена конверзија

на храна, меѓутоа има зголемен рандман и редуцирање на масното ткиво (Fiems, 1987). Во друго истражување, бикови од расата Belgian White-blue 136 дена биле третираны со 60 μ г циматерол на килограм телесна маса. Циматеролот бил додаван во силажа од пченка. При тоа просечниот дневен прираст бил зголемен од 1.28 kg кај контролната група на 1.38 kg кај експерименталната група, додека тежината на трупот била зголемена од 497 kg на 514.6 kg. Покрај тоа, процентот на мускулното ткиво како во трупот така и во *musculus longissimus dorsi* бил зголемен од 75.2% на 79.4%, а додека содржината на масното ткиво била намалена од 12.2% на 8.2% (Boucque и сор., 1994).

Во истражувањето на Avendaño-Reyes и сор.,(2006) спроведено на бикови со орална администрација на зилпатерол хидрохлорид и рактопамин хидрохлорид преку храната во дози од 60 mg/бик/ден и 300 mg/бик/ден, соодветно, утврдена е зголемена финална телесна маса и тоа зголемена маса на трупот за 7% кај биковите третираны со зилпатерол хидрохлорид и за 5 % кај третираните со рактопамин хидрохлорид во однос на контролната група. Исто така е утврден и поголем рандман, додека промените во приносот на масното ткиво се незначителни. Третирањето со овие β -агонисти се одвивало последните 33 дена од тојот на биковите.

Кај јагниња третираны со циматерол додаден во храната (доза од 10 ppm) до 5^{та}-7^{ма} недела и до 10^{та}-12^{та} недела старост, утврден е зголемен дневен прираст и искористување на храната кај јагнињата кај кои се користел циматерол до 5-та недела, но овие промени не биле регистрирани кај втората група јагниња (третман од 10 до 12 недели). Кај двете групи јагниња било утврдено зголемување на површината на *musculus longissimus dorsi* за 26 и 32 %, соодветно, како и намалување на бубрежното и карличното масно ткиво за 34% и 44 %, соодветно (Veerman и сор., 1986). Кај овци третираны со тербуталин доаѓа до зголемување на финалната телесна маса и зголемување на мускулното ткиво (Nourozi и сор., 2005).

При тов на свињи со телесна маса од 32 kg до 84.5 kg со додавање на 3 mg/kg салбутамол во храната не е забележана разлика во стапката на раст кај третираните свињи во однос на контролната група, меѓутоа кај третираните свињи е постигната значително подобра маса на трупот за 2.4%, напречниот пресек на *musculus longissimus dorsi* бил зголемен за 10%, а дебелината на грбната сланина била намалена за 18%. (Warriss и сор., 1990).

Во истражувањето кај свињи со администрација на рактопамин во храната (20 mg/kg/храна) во периодот од 60-100 kg телесна маса забележано е зголемување на дневниот прираст за 30% (1.23 kg/ден/свиња – третирани; 0.94 kg – контролна група) и зголемување на мускулното ткиво за 44 %, додека во масното ткиво немало промени (Mitchell, 2008).

Истражувањето спроведено со администрација на циматерол на свињи со телесна маса од 64.5 – 103.7 kg, покажало дека кај третираните свињи се намалил внесот на храната, додека искористувањето на храната се зголемило, масното ткиво се намалило за 9,2-13,2 %, а *musculus semitendinosus* и *musculus biceps femoris* се зголемиле за 11.8 % и 8.9 % соодветно (Jones и сop., 1985).

β -агонистите се користат нелегално и како допинг агенси кај спортистите за подобрување на перформансите или поради нивните анаболички ефекти, иако се забранети за употреба кај спортистите од страна на Светската анти-допинг агенција (WADA), (Izquierdo-Lorenzo и сop., 2010).

2.6 Остатоци од β -агонисти во ткивата на третираните животни

Употребата на β -агонистите како промотори на раст резултира со акумулирање во ткивата на домашните животни во вид на остатоци. Тие се акумулираат во црниот дроб, белите дробови, мускулите, бубрезите како и секреторните органи, како што се панкреасот и надбубрежните жлезди, а покрај тоа и во ретината и другите обоени ткива (влакна, пердуви). Периодот во кој остатоците од овие супстанции може да се детектираат зависи од видот, полот, возраста, телесната маса, администрираната доза, времето на екпозиција како и видот на самото ткиво (Elliot и сop., 1993; Pleadin и сop., 2014). Постојат голем број истражувања за остатоците од овие супстанции во ткивата на домашните животни. Според истражувањето спроведено од Меуег и Rinke, 1991, по орално третирање на телиња со 5.0 $\mu\text{g/kg}$ телесна маса кленбутерол, два пати дневно, во тек на 21 ден, највисоки концентрации на кленбутерол биле детектирани во окото и тоа 107 пати повисоки од концентрацијата на кленбутерол во плазмата, 21-виот ден од третманот. Покрај тоа елиминацијата на кленбутеролот од окото е многу спора, 0-тиот ден од прекин на третманот детектирана е концентрација од 116 и 120 ng/g, 3.5 дена по прекин на третманот било детектирано 54 и 61 ng/g или 49 % од концентрацијата детектирана 0-тиот ден, односно 15.1 ng/g 14 дена по

прекин на третманот или 13 % од концентрацијата детектирана 0-тиот ден. Идентични нивоа на кленбутерол во очното ткиво пронајдени се кај различни животни, што укажува на многу конзистентен начин на дистрибуција и елиминација од ретината. Во истражувањето спроведено на свињи од Pleadin и сор., 2011, 0-тиот ден по прекин на третманот, кој траел 21 ден, два пати дневно, во концентрација од 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ телесна маса, концентрацијата на кленбутерол во ретината на окоото била 1874 ng/g , додека 45-тиот ден концентрацијата на кленбутерол изнесувала 73 ng/g . Акумулацијата на кленбутеролот во ретината во однос на другите ткива била повисока за 35 пати. Во истражувањето на Malucelli и сор. (2014), 160 бројлери биле поделени во 4 групи и биле третирани во период од 16^{ти} до 35^{ти} ден старост со: 1 mg/kg кленбутерол (прва група), со 10 mg/kg салбутамол (втора група), со 10 mg/kg тербуталин (трета група) и последната група била контролна. Концентрацијата на овие β -агонисти во окоото била анализирана на 0-тиот, 14-тиот и 43-тиот ден по завршувањето на третманот. Концентрацијата на кленбутерол (Табела 2) била 89.9 ng/g , 6.6 ng/g и 2.6 ng/g , соодветно, на салбутамолот 84.8 ng/g , 19.3 ng/g и 3.9 ng/g , соодветно, додека концентрацијата на тербуталин била 21.6 ng/g 0-тиот ден, а 14 и 43 ден концентрацијата на тербуталин била помала од лимитот на детекција (<1,8 ng/g). Elliot и сор. (1993), 0-тиот ден по прекин на третманот во ретината детектирале 1700 ng/g кленбутерол, 15-ти ден 149.5 ng/g , а 22.40 ng/g кленбутерол детектирале 140-тиот ден по прекин на третманот. Поради јаката акумулација и бавната елиминација, ретината на окоото може да се користи како најсигурен матрикс за докажување на присуство на β -агонисти, а негативниот резултат би бил гаранција дека остатоците не се присутни во ткивата кои се користат во исхраната на луѓето (Meuer и Rinke, 1991). Долготрајната акумулација на кленбутеролот и на другите β -агонисти, во обоените ткива, а особено во ретината се должи на интеракцијата помеѓу меланинот и β -агонистите. Оваа интеракција е резултат на електростатските сили кои настануваат помеѓу позитивно наелектризираните молекули на β -агонистите и полимерите на меланинот кои се со негативен електрицитет или Van der Waals-совите сили помеѓу ароматичниот прстен на β -агонистите и ароматичните индолни јадра на меланинот. Интеракцијата може да се базира и на пренос на полнеж од страна на β -агонистите поради тоа што тие се добри донори на електрони и можат да учествуваат во таков комплекс со слободниот радикал на меланинот (Gowik и сор., 2000). Покрај во ретината висока концентрација на β -агонисти е детектирана во пердувите и во влакната.

Malucelli и сор. (2014), детектирале 224 ng/g и 44 ng/g кленбутерол (табела 2), 1140 ng/g и 165 ng/g салбутамол и 1159 ng/g и 230 ng/g тербуталин во пердувите од бројлери 0-тиот и 43-тиот ден, соодветно. Pleadin и сор. (2012), во влакна од свињи детектирале 12.12 ng/g и 8.77 ng/g рактопамин, 1-виот и 8-миот ден по прекин на третманот, додека Li и сор. (2014), во влакна од говеда детектирале 55.15 ng/g, 147 ng/g, 104.44 ng/g и 100 ng/g кленбутерол, 0-тиот, 14-тиот, 42-риот и 70-тиот ден по завршување на третманот, соодветно. Во истражувањето пак спроведено на глупци, кленбутеролот и салбутамолот во влакната се детектираат до 30 дена по прекин на третманот (Vulic и сор., 2011).

Акумулацијата во внатрешните органи: црн дроб, бели дробови, бубрези и слезенка е 20-90 пати повисока во однос на плазмата, додека во мускулите и масното ткиво акумулацијата е повисока за 3-15 пати. После 3.5 дена концентрацијата во сите ткива била близу 10 пати пониска, а после 14 дена остатоците во сите ткива биле под лимитот на детекција (<0.08 ng/g), освен во црниот дроб и абдоминалното масно ткиво каде се детектирани значајни концентрации на кленбутерол, 0.63 и 0.15 ng/g, соодветно. Кленбутеролот во плазмата пак бил детектиран до 132 часа по прекин на третманот, а во урината до 2.5 дена по прекин на третманот. При тоа концентрацијата во урината била 40 пати повисока од плазмата (Meuer и Rinke, 1991). Во урина кај свињи третирани 28 дена со кленбутерол (10 μ g/kg телесна маса) и рактопамин (100 μ g/kg телесна маса), истите се детектирани во урината до 7-ми ден по прекин со третманот (Pleadin и сор., 2011). Elliot и сор., 1993a, кленбутеролот во црниот дроб од крави го детектирале дури 56-тиот ден по прекин на третманот во концентрација од 0.4 ng/g, додека 15-тиот ден по прекин на третманот концентрацијата во ова ткиво била 2.5 ng/g. Кравите биле третирани со кленбутерол во концентрација 1.6 μ g/kg телесна маса, во период од 30 дена. Во истражувањето кај овци, при третман со кленбутерол во концентрација 1.6 μ g/kg телесна маса, во период од 30 дена, во црниот дроб детектиран е кленбутерол во концентрација од 20.2; 2.1; 0.7 и 0.6 ng/g во 0-тиот, 5-тиот, 10-тиот и 15-тиот ден по завршувањето на третманот. Концентрацијата во бубрезите, детектирани во истиот период, била 16.4; 1.2; 0.1 и 0.1 ng/g (Elliot и сор., 1993; Smith, 1998). Во истражувањето спроведено од Malucelli и сор. (2014), добиени се слични резултати. Концентрацијата на кленбутерол во црниот дроб и бубрезите била 19-74 пати повисока од концентрацијата во плазмата, за разлика од мускулите и масното ткиво каде што концентрацијата на кленбутерол била повисока 0-2

пати во однос на концентрацијата во плазмата (табела 2). Како што може да се забележи од табела 2, покрај во пердувите и ретината, висока концентрација на кленбутерол е детектирана и во бубрезите и црниот дроб 0-тиот ден, а може да се забележи дека кленбутеролот во овие ткива е детектиран и 14-тиот ден, но од друга страна во овие ткива не перзистира како во пердувите и окото, до 43-тиот ден. За разлика од овие ткива пак концентрацијата на кленбутерол во плазмата и мускулите е ниска и нагло опаѓа, така што 24-48 часа по прекин на третманот не е детектиран (Табела 2).

Табела 2. Концентрација на кленбутерол (ng/g) во ткива од бројлери, Malucelli и сор., 2014

Ткиво	Ден на анализа на примероците по завршување на третманот						
	0	1	2	3	7	14	43
Црн дроб	66.6	22.2	13.1	7.1	10.8	2.3	<0.07
Бубрези	24.3	2.6	2.0	1.2	1.5	0.2	<0.07
Мускул	1.6	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	на*
Масно	2.5	0.6	0.4	0.6	0.2	<0.08	на*
Пердуви	224	250	162	155	145	115	44
Ретина	89.9	на*	на*	на*	на*	6.6	2.6
Плазма	1.20	0.06	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	на*

*на -не е анализирано

Во истото истражување биле вклучени и салбутамол и тербуталин. Концентрацијата на салбутамол 0-тиот ден по прекин на третманот била повисока за 45, 12, 3 и 2 пати во пердувите, црниот дроб, бубрезите и очите, соодветно, во однос на концентрацијата во плазмата. 43-тиот ден салбутамолот бил детектиран единствено во очите и пердувите, а додека од останатите ткива салбутамолот е детектиран само во црниот дроб 14-тиот ден. Највисока концентрација на тербуталин е детектирана во пердувите и црниот дроб и тоа 26 и 3 пати повеќе во однос на плазмата, 0-тиот ден. 43-тиот ден тербуталинот е детектиран единствено во пердувите, а 14-тиот ден, покрај во пердувите и во црниот дроб. Во плазмата овие два β -агонисти се детектираат до 2-риот ден по прекин на третманот (Malucelli и сор., 2014).

Hung и сор. (2010), извршиле истражување на остатоци од салбутамол кај свињи, при што свињите биле третирани 14 дена, со 3 ppm салбутамол во храната. Првиот ден по прекин на третманот најголема концентрација на салбутамол е детектирана во урината (145.12 ng/ml), а истиот е детектиран во урината (1.6 ng/ml) и 30-тиот ден по прекин на третманот. За разлика од урината, салбутамолот во ткивата перзистирал многу кратко и тоа во црниот дроб, белите дробови и мозокот бил детектиран до 4-тиот ден по прекин на третманот, а во бубрезите и мускулите до 2-риот ден по прекин на третманот, иако концентрацијата детектирана првиот ден по прекилот во црниот дроб, белите дробови и бубрезите била доста висока односно изнесувала 70.42 ng/g, 26.06 ng/g и 31.88 ng/g, соодветно.

Во истражувањето пак спроведено кај албино морски прасиња со орална апликација на рактопамин (3.5 mg/kg телесна маса, 7 дена по ред) утврдено е дека првиот ден после прекилот на третманот најголема количина на рактопамин е акумулирана во белите дробови (55.80 μ g/kg), потоа во бубрезите (21.85 μ g/kg), слезината (12.59 μ g/kg), масното ткиво (10.17 μ g/kg), срцето (9.73 μ g/kg), црниот дроб (5.58 μ g/kg), а најниска концентрација е утврдена во мускулите (2.21 μ g/kg). Рактопаминот во белите дробови е детектиран и 30-тиот ден по прекин на третманот (1.03 μ g/kg), додека во другите ткива е детектиран до 10-тиот ден по прекин на третманот што значи дека елиминацијата на рактопаминот од белите дробови е многу поспора (Pleadin и сор., 2013). Кај патки, мисирки, овци и говеда третирани 7 дена со 20 mg/kg телесна маса рактопамин во храната, висока доза на рактопамин е детектирана во црниот дроб 0.3 и 7 ден по прекин на третманот, со исклучок на овците каде 7-миот ден концентрацијата била под лимитот на детекција (<0.1 μ g/kg). Кај говедата и овците следена е и акумулацијата во ретината при што концентрацијата на рактопаминот во ретината е пониска отколку во црниот дроб (Churchwel и сор., 2002). Рактопаминот во високи дози е детектиран и во ретината кај свињи 1-виот, 3-тиот и 8-миот ден по прекин на третманот кој траел 28 дена при што на свињите им бил администриран рактопамин орално во концентрација од 0.51 mg/kg телесна маса (Vulic и сор., 2012).

Генерално, од погоре наведените истражувања, може да се заклучи дека остатоците од β -агонисти, по прекин на третманот, најкратко може да се детектираат во плазмата и урината, подолго во ткивата, а најдолго во ретината, влакната и пердувите.

2.7 Несакани ефекти кај луѓето

Месото контаминирано со β -агонисти претставува ризик за здравјето на луѓето и особено придонесува за срцеви заболувања и зголемен крвен притисок. Во зависност од концентрацијата на β -агонисти во месото кое што е конзумирано од страна на луѓето, симптомите може да бидат акутни и хронични. Во акутни случаи симптомите се манифестираат во вид на труења, па така во 1990 година во Франција, поради конзумирање на црн дроб од телиња кој содржел кленбутерол се затруле 22 луѓе, а истата година во неколку региони во северна Шпанија се затруле 135 луѓе, а причината била иста како со случајот во Франција (Salleras и сор., 1995). По две години, во првите три месеци од 1992 година, во Шпанија биле регистрирани 232 случаи на труење, од кои 113 случаи биле регистрирани во Каталонија, а причината била конзумирање на црн дроб од теле контаминиран со β -агонисти. Од 113 случаи, 52 пациенти биле жени и 61 мажи, на возраст од 8-73 години. Најчести симптоми кај затруените луѓе биле нервоза, забрзана работа на срце, болка во мускули, мускулен тремор и главоболка. Симптомите се јавиле во период од 15 минути до 6 часа по конзумирањето, а траеле од 90 минути до 6 дена и ниту еден пациент не бил под терапија со адренергични агонисти или антагонисти. Исто така од сите 113 пациенти дури 91 биле хоспитализирани како итни случаи, а 6 пациенти пак биле дополнително хоспитализирани, при што 3 пациенти биле само под надзор, 2 пациенти примале терапија за тахикардија, а еден пациент, поради сомнеж, бил под третман за труење со јаглероден моноксид. По неколку часовен третман, од приемот во болница, пациентите се опоравиле и ниту еден случај немал летален исход. Од хоспитализираните пациенти биле анализирани 47 примероци урина и 2 примероци серум. Во урината бил детектиран кленбутерол во концентрација од 11-486 ppb, а серумите биле негативни. Покрај тоа биле анализирани 16 примероци од телешки црн дроб при што во 9 примероци бил детектиран кленбутерол во концентрација од 19-5395 ppb. Студијата исто така покажала дека 52 пациенти биле од 32 фамилии, 33 од нив јаделе во ист ресторан, а 28 пациенти јаделе во кујна од некоја компанија. Во сите случаи пациентите конзумирале телешки црн дроб, приготвен на различни начини, освен во една фамилија каде што труењето најверојатно настанало со конзумирање на телешки јазик (Salleras и сор., 1995). Во Италија, во 1995, исто така се затруле 15 луѓе после конзумација на месо со остатоци од β -агонисти. Клиничките

симптоми биле дистален мускулен тремор, главоболка, диспнеја, умерена хипергликемија, хипокалемија, гадење, повраќање, леукоцитоза, а симптомите се јавиле од половина до 3 часа по јадењето и траеле од 3 до 5 дена. Биле анализирани два примероци говедско месо, а концентрацијата на кленбутерол во истите била 1140 и 1480 ppb. Во 7 од вкупно 15 примероци урина, земени од затруените пациенти по 36 часа од јадењето на контаминираното месо, бил детектиран кленбутерол во концентрација од 2-8 ppb (Brambilla и сор., 2000). Следната година повторно во Италија се затруле вкупно 62 луѓе од телешко месо контаминирано со кленбутерол, а симптомите биле исти како и во претходниот случај. Во овој случај биле анализирани 6 примероци месо кои биле земени од замрзнувачите од затруените фамилии, а концентрацијата на кленбутерол се движела од 800-7400 ppb (Soprano и сор., 1998). Во Португалија пак во 1998 година 10 луѓе се затруле од јагнешко месо кое содржело остатоци од кленбутерол, во 2000 година двајца се затруле од говедски црн дроб, во 2001 година се затруле 34 луѓе од говедско месо и црн дроб, а во 2002 година 4 луѓе се затруле од говедско месо. И во последните три случаи станува збор за труење со кленбутерол. Труењето се карактеризирало со следните симптоми: тахикардија, дистален тремор, стомачни болки, гадење, дијареа, покачена телесна температура, главоболки и вртоглавици, повраќање и хипертензија. Симптомите се појавиле по 1.5-15 часа од јадењето, а траеле од 1-5 дена. Биле анализирани примероци од месо и црн дроб земени од домовите на затруените пациенти. Во сите примероци бил детектиран кленбутерол со концентрација од 300 ppb во јагнешкиот црн дроб, 1400 ppb во телешкиот црн дроб во првиот случај, а 1200 ppb во вториот случај, додека во телешкиот мускул концентрацијата била 1200 ppb (Barbosa и сор., 2005). Во 2003 година во Кина, 32 луѓе се затруле со конзумација на свинско месо кое содржело кленбутерол, а 29 од нив побарале лекарска помош за третман на погоре наведените симптоми вклучувајќи и неконтролирани грчеви и акутна жед (Woodward, 2005).

Во хронични случаи при исхрана на луѓето со храна која содржи остатоци од β -агонисти се јавуваат голем број на несакани ефекти како што се: вртоглавица, замор, поспаност, импотенција, намалено либидо, намалена функција на миокардот, затајување на срцето, лупање на срцето, аритмија, тахикардија, ангина пекторис, неконтролирани грчеви на мускулатурата, зголемено ниво на гликоза во крвта, ниско ниво на калиум во крвта, промена на расположението, несоница, потење, а поретко и алергии проследени со

отежнато дишење, осип на лицето, усните, јазикот или грлото, како и депресија, забрзана работа на срцето, жолтица (Jaipal, 2013).

2.8 Законски регулативи, MRL, MRPL и препорачани концентрации

Поради негативните ефекти кои се јавуваат кај луѓето по конзумација на храна која содржи β -агонисти Европската Унија (ЕУ) ја забрани нивната употреба како промотори на раст кај фармските животни. Имено, во 1996 година по предлог на Советот на Европа, Европската Комисија објавила две Директиви кои сеуште се применуваат за контрола на остатоците во храна од животинско потекло. Со Директивата 96/22/EC (Council Directive 96/22/EC) се забранува употребата на β -агонисти и одредени супстанции кои имаат хормонално или тиреостатско дејство кај фармските животни (говеда, овци, кози, свињи, домашни копитари, живина, зајаци, како и диви животни од овие видови и диви преживари кои се одгледуваат фармски, а исто така и во аквакултурата). Покрај тоа со оваа Директива се забранува увоз на месо од трети земји кај кои е дозволена употребата на овие супстанции кај фармските животни. Со Директивата 96/23/EC (Council Directive 96/23/EC) се утврдуваат мерките кои земјите членки на ЕУ треба да ги преземат за следење на супстанците и остатоците од истите во животните и производите од животинско потекло.

Покрај ЕУ и други држави како што се Русија, Кина, Тајван имаат ограничена или строго ограничена употреба на β -агонисти. За разлика од нив постојат и земји каде е дозволена примената на некои β -агонисти. Во САД дозволена е употреба на рактопамин во храната за свињи од 1999 година, кај крави од 2003 и мисирки од 2008 година, а од 2007 година кај крави дозволена е и употребата на зилпатерол хидрохлорид. Рактопаминот е дозволен за употреба и во Канада и Бразил, а зилпатеролот кај крави во Мексико и Јужна Африка. Покрај β -агонистите во повеќе од 30 земји меѓу кои и САД, Јужна Африка, Канада, Австралија, Нов Зеланд, Јапонија и Чиле дозволена е употребата на анаболички хормони во вид на импланти (Doyle, 2000; Courtheun и соp., 2002; Toit., 2017).

Во Република Македонија забранета е употребата на овие супстанции кај фармските животни и аквакултурата со „Решение за забрана за производство, поседување, продажба, снабдување и/или употреба на одредени видови ветеринарно-медицински препарати”.

(Службен весник број 132, 2010). Со ова Решение исто така се забранува терапевтски и зоотехнички третман на животни кои се користат во исхраната на луѓето, освен во одредени случаи кога може да се аплицираат исклучиво од доктор по ветеринарна медицина.

Поради тоа што станува збор за супстанции кои се забранети за употреба кај фармските животни β -агонистите немаат максимално дозволено ниво (MRL - Maximum residue limit - Максимално дозволени концентрации) на остатоци во ткивата. Според European Medicines Agency MRL претставува максималната концентрација на остатоци прифатена од ЕУ во прехранбени производи добиени од животни кои примиле ветеринарски лек или биле изложени на биоциден производ за употреба во сточарството. Исклучок кај β -агонистите претставува кленбутеролот кај говеда и копитари кој има дозволена MRL вредност, поради тоа што може да се користи во терапевтски цели за индукција на токолиза кај крави и кобили и за лекување на респираторни заболувања кај крави и копитари кои не се користат за производство на месо. MRL вредноста за мускул кај говеда и копитари изнесува 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, додека за црн броб и бубрези изнесува 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. За кравјо млеко пак MRL вредноста е 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Council Directive 96/22/EC; Commission Regulation (EU) no 37/2010). За супстанците кои се забранети за употреба според Одлуката на Комисијата 2002/657/EC се определува MRPL (minimum required performance limit). MRPL претставува минималниот удел на анализот во примерокот кој треба да се детектира и потврди, а служи за да се усклади аналитичката ефикасност на методот за оние аналити за кои не е утврдена дозволена граница. За жал, за повеќето забранети супстанции, меѓу кои се и β -агонистите, оваа вредност сеуште не е утврдена (Commission Decision 2002/657/EC). Со цел да се подобрат и хармонизираат перформансите на аналитичките методи за супстанции за кои нема MRL, Референтните лаборатории во 2007 година објавиле водич “CRL (Community reference laboratories) guidance paper” (CRL, 2007), во кои се наведени препорачаните концентрации на забранетите супстанции на кои што треба да се валидираат методите и MRPL вредности за оние супстанции за кои истите се утврдени. Вредностите за $\text{CC}\beta$ за скрининг методите и $\text{CC}\alpha$ за потврдните методи треба да бидат пониски од препорачаните концентрации. Во Табела 3 се дадени препорачаните концентрации за β -агонистите.

Табела 3. Препорачани вредности за β -агонисти според “CRL guidance paper”

β -агонист	Матрикси	Препорачана концентрација (ppb)
Кленбутерол, Бромбутерол	Урина, црн дроб	0.2
Хлорбромбутерол, Мабутерол	Ретина, влакна	2.0
Мапентерол, Тулобутерол	Мускул	0.1
Хидроксиметилкленбутерол	Бубрег, фецес, плазма, вода за пиење	0.2
Кленпентерол, Кленпроперол	Урина, црн дроб, мускул, бубрег, фецес, плазма, вода за пиење	0.5
Циматерол, Цимбутерол	Ретина, влакна	5.0
Изоксуприн, Ритодрин		
Рактопамин, Кленциклохексерол	Урина, црн дроб, мускул, бубрег, фецес, плазма, вода за пиење	1.0
	Ретина, влакна	10.0
Салбутамол, Салметерол, Зилпатерол, Фенотерол	Урина	1.0
	Црн дроб, мускул, бубрег, фецес, плазма, вода за пиење	5.0
	Ретина, влакна	10.0
Тербуталин	Урина	3.0
	Црн дроб, мускул, бубрег, фецес, плазма, вода за пиење, ретина, влакна	10.0
Орципреналин	Урина, црн дроб, мускул, бубрег, фецес, плазма, вода за пиење, ретина, влакна	10.0
Сите β -агонисти	Добиточна храна	50.0

2.9 Контрола на безбедноста на храната во однос на присуство на β -агонисти

Согласно Директивата 96/23/ЕС сите земји членки во ЕУ мора да освојат и реализираат Национален мониторинг план за специфични групи на остатоци. Секоја држава мора да ја довери задачата за реализацијата на мониторинг планот на централен јавен оддел или тело, кое ќе биде одговорно за изготвување на национален план, координирање на

активноста на централни и регионални одделенија одговорни за следење на различни остатоци, собирање на податоци и испраќање на резултатите од мониторингот до Европската Комисија секоја година, до 2017 година. Од оваа година резултатите од мониторингот се испраќаат до EFSA. β -агонистите се контролираат во живи животни, нивниот измет, телесните течности и ткивата, производите од животинско потекло, храната и водата за пиење за животните (Council Directive 96/23/EC).

Националниот мониторинг план за безбедноста на храната во РМ го организира Агенцијата за храна и ветеринарство врз основа на годишна програма за мониторинг, која ја донесува Владата на Република Македонија на предлог на Директорот на Агенцијата за храна и ветеринарство (Закон за безбедност на храна, Службен весник на РМ бр. 157, 2010, стр. 38), а според Правилникот за начинот на вршење на мониторинг и контрола на присуството на резидуи и контаминенти во живите животни и храната од животинско потекло, начинот на вршење на официјалните контроли и постапките за мониторинг и контрола на резидуи и недозволени супстанции и мерките кои се преземаат во случај на сомнение и на позитивен наод на присуство на резидуи и недозволени супстанции (Службен весник на РМ бр. 80/2011) кој е во согласност со Директивите на Советот 96/23/EC и 96/22/EC како и одлуките 97/747/EC и 98/179/EC (Службен весник на РМ бр. 80/2011).

Контролата на β -агонистите во живите животни и храната од животинско потекло, од домашно производство и од увоз, ја врши Лабораторијата за резидуи и контаминенти, при Институт на храна на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје со акредитиран скрининг ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) метод. Покрај тоа, во гореспоменатата лабораторија се врши контрола и на другите на остатоци и контаминенти во храна од животинско потекло.

2.10 Аналитички методи за определување на β -агонисти

Ниската концентрација ($\mu\text{g/kg}$ или ng/kg) на остатоците од ветеринарни лекови во ткивата кои се користат во исхраната на луѓето ја подразбира потребата од развој и примена на многу осетливи аналитички методи за детекција, идентификација и квантификација на остатоците во различни матрикси (Daeseleire и сор., 2017). Како последица на ова во изминатите декади се развиени и валидирани многу аналитички методи за определување на

остатоците од β -агонисти во биолошките матрикси. Аналитичките методи кои се користат може да бидат скрининг и потврдни методи и истите треба да бидат валидирани согласно Одлуката на Комисијата 2002/657/EC.

2.10.1 Скрининг методи

Скрининг методите се квалитативни или полуквантитативни методи кои се користат за анализа на остатоци од хормони и ветеринарни лекови. Најчесто користени скрининг тестови за анализа на β -агонисти во минатото биле RIA (Radioimmuno assay-RIA) тестовите, додека денеска најкористени се ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) тестовите. RIA тестовите се стабилни и сигурни тестови, кои може да ги задоволат перформансите на методот за осетливост и специфичност, меѓутоа имаат висока цена бидејќи се користат радиоактивни елементи (Granja и соp., 2008; Kay и соp., 2017). ELISA тестовите се лесни за користење, времето за анализа е кратко, погодни се за анализа на поголем број на примероци, имаат добра селективност и ниска цена. Негативна страна на овие тестови често пати може да биде деградација на реагенсите (особено ензимскиот коњугат) поради несоодветен транспорт и несоодветни услови на чување што резултира со слаби перформанси (IAEA, 2003; Granja и соp., 2008). Според Estrada-Montoya и соp. (2008) друг недостаток на овие тестови се вкрстените реакции кои се јавуваат како резултат на реакција со други соединенија со слична хемиска структура што резултира со појава на лажно позитивни резултати. Примероците за кои се добиваат позитивни резултати со скрининг методите, мора да се анализираат со потврдни методи.

2.10.2 Потврдни методи

Потврдните методи даваат потполни и дополнителните информации и овозможуваат недвосмислена идентификација, а по потреба и квантификација на супстанцата. Кај забранетите супстанции од А групата, главниот фокус е на идентификација на остатоците во голем број на матрикси на што е можно пониска концентрација. Како потврдни методи се користат хроматографските методи во комбинација со различни детектори. Историски гледано, во раните 70^{ти} години на минатиот век тенкослојната хроматографија била техника

за анализа на забранети супстанции, а алтернативна техника со прифатлив лимит на детекција во тој момент била гасната хроматографија со детектор со електронски зафат (GC-ECD). Во средните 70-ти години на минатиот век била воведена течна хроматографија со високи перформанси со ултравиолетов детектор (HPLC-UV) меѓутоа техниката била многу скапа, не била робусна и не ги задоволувала лимитите на детекција за А група. Подоцна бил воведен и флуоресцентниот детектор, на почетокот на 90-тите години била воведена гасната хроматографија со масена спектрометрија (GC-MS) и при крај на деведесетите години од минатиот век била воведена течната хроматографија со масена спектрометрија (LC-MS). Воведувањето на масената спектрометрија се смета за револуција во аналитиката, поради својата исклучителна специфичност и осетливост. Овие техники (GC-MS и LC-MS) се користеле за определување на супстанции од А и од Б група. Негативната страна за гасната хроматографија била дериватизацијата на поларните функционални групи (-OH, -NH₂). Дериватизација всушност е процес на "хемиска модификација" на одредено соединение за да се произведе ново соединение кое има својства кои се погодни за анализа со помош на гасна хроматографија. Денес најзастапени техники за определување на остатоците од ветеринарни лекови се гасна хроматографија тандем масена спектрометрија (GC-MS/MS) и течна хроматографија тандем масена спектрометрија (LC-MS/MS). Предност се дава на течната хроматографија поради тоа што се избегнува чекорот на дериватизација (De Wacsh и сop., 1998; Marilena, 2015; Daeseleire и сop., 2017).

2.10.3 Течна хроматографија тандем масена спектрометрија (LC-MS/MS)

2.10.3.1 Течна хроматографија

Течната хроматографија е аналитичка техника која се користи за развојување на компоненти од сложени смеси. Супстанците од растворот во различен степен стапуваат во интеракција со стационарната и мобилната фаза поради разлика во апсорпцијата, јонската измена, дистрибуцијата меѓу различни фази или големината на супстанците кои се раздвојуваат, поради што имаат различно време на задржување на хроматографската колона (Allwood и Goodacre, 2009; Cindric и сop., 2009). Анализите кои што се растворени во соодветниот растворувач се пропуштаат низ хроматографската колона под висок притисок.

Аналитите кои формираат појака врска со стационарната фаза отколку со мобилната поспоро се елуираат од колоната и имаат подолго ретенционо време, за разлика од аналитите кои имаат поголем афинитет кон мобилната фаза и имаат пократко ретенционо време. За хроматографското раздвојување да биде успешно потребно е да се направи соодветна комбинација од повеќе аспекти и тоа: состав и проток на мобилната фаза, соодветна колона што подразбира соодветни должина, полнење (стационарна фаза), големина на честички, големина на пори и температура на колоната. Постојат повеќе класификации на течната хроматографија. Според поларноста на хроматографскиот систем се разликува нормално-фазна и реверзно-фазна хроматографија. Кај нормално-фазната хроматографија стационарната фаза е поларна, а мобилната е неполарна. Поларните аналити подолго се задржуваат на поларната површина (во случајов стационарната фаза) и се елуираат за подолго време. Кај реверзно-фазната хроматографија имаме обратен редослед, односно неполарна стационарна фаза и поларна мобилна фаза и во овој случај подолго ретенционо време ќе имаат аналитите со помала поларност. Според механизмот на раздвојување разликуваме адсорпциона, партициона, јоноизменувачка и ексклузивна хроматографија, додека според физичката состојба на фазата, кај течната хроматографија, разликуваме адсорпциона, јонска и ексклузивна хроматографија. Поларноста на аналитот е најважен параметар за сите врсти хроматографија. Елуирањето може да биде изократско чија што карактеристика е мобилна фаза со константен состав за време на целата анализа, и градиентно кое се карактеризира со постепено менување на составот и јачината на мобилната фаза во текот на анализата (Radishic, 2013; Ciric, 2014). Во ова истражување користена е реверзно-фазна хроматографија со градиентно елуирање, а по хроматографското раздвојување аналитите се детектираат со MS/MS детектор.

Течниот хроматограф се состои од следните делови: резервоари за мобилна фаза, бинарна пумпа (обезбедува постојан проток), инјектор (го внесува примерокот во системот), термостат за колона (одржува константна температура на колоната) колона за раздвојување на аналитите, детектор (во ова истражување MS/MS детектор), како и систем за собирање и обработка на податоците (Ciric, 2014).

2.10.3.2 Масена спектрометрија

Масената спектрометрија е аналитичка техника која поради својата селективност, осетливост, брзина и лимит на детекција завзема водечко место во однос на другите аналитички техники. Масениот спектрометар е аналитички инструмент кој ги раздвојува наелектризираните честички според односот маса/полнеж (m/z).

Масениот спектрометар се состои од:

- систем за внесување на примероци
- јонски извор
- масен анализатор
- детектор

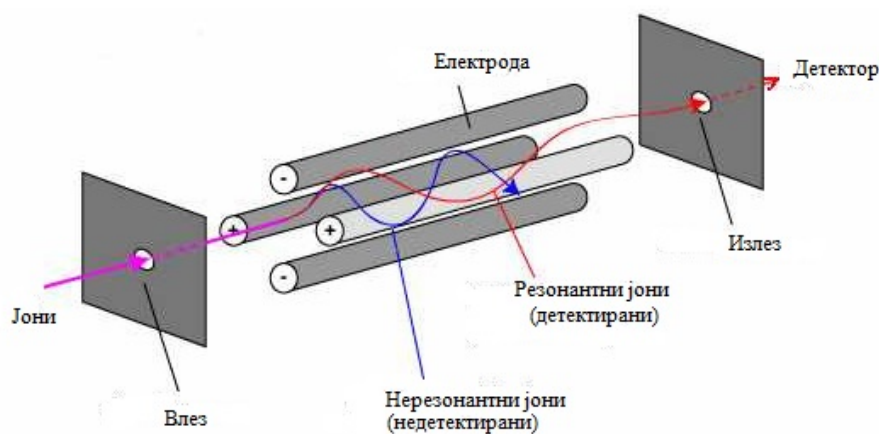
Во масениот спектрометар се случуваат следните процеси:

- создавање на јони од примерокот во јонизацискиот извор
- раздвојување на јоните според нивната m/z вредност во масениот анализатор
- фрагментирање на селектирани јони и анализа на нивни фрагментите во вториот анализатор
- детектирање на јоните кои настанале во вториот анализатор и мерење на нивниот интензитет со детектор кој ги конвертира јоните во електрични сигнали
- обработка на сигналот од детекторот со соодветен софтвер и контрола на инструментот со повратна информација.

Во јонскиот извор се формираат јоните на анализираните супстанции. Еден дел од јонот останува цел и во спектарот дава сигнал со највисока вредност на масата, а се нарекува молекулски јон и најчесто ја претставува моларната маса на молекулата. Постојат повеќе начини на јонизација: EI (Electron impact – електронски удар) јонизација; CI (Chemical ionization – хемиска јонизација); FD&FI (Field desorption/ionization- десорпција/јонизација во јако поле); FAB (Fast Atom Bombardment - бомбардирање со брзи атоми); MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption-ласерска десорпција на матриксот) и ESI (Electrospray Ionization- јонизација со електроспреј). Во оваа истражување е користена ES-јонизација која може да биде позитивна и негативна. Оваа јонизација овозможува анализа на големи и термолабилни поларни молекули и определување на аналити во ниски концентрации во комплексни матрикси. Овој тип на јонизација е компатибилен со сите типови анализатори

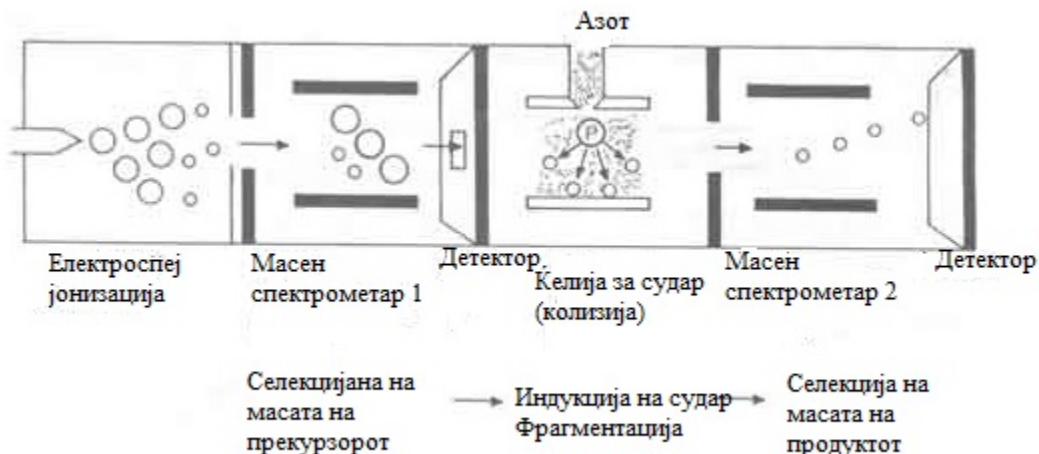
и го јонизира анализот во облик на раствор. Како растворувач се користи лесно испарлив растворувач (метанол, ацетонитрил или изопропанол) во комбинација со вода. При снимање во позитивна јонизација (ES+) се додава мала количина на оцетна или мравска киселина за подобрување на процесот на протонирање на молекулите, а при снимање во негативна јонизација (ES-) се додава мала количина амонијачен раствор или испарливи амини за депротонирање на молекулите. Растворот поминува до крајот на челична капилара каде што се применува висок позитивен или негативен електричен потенцијал. Кога растворот ќе стигне до крајот на капиларата, јакото електрично поле предизвикува моментално испарување (небулизација) во млаз спреј на многу мали наелектризирани капки раствор во пареите на растворувачот. Јонизацијата и небулизацијата се случуваат на атмосферски притисок (API), при оптималната температура од над 100 °C, во струја од азот. (Cindrich и сор., 2009; Chirich, 2014; Stojanovic, 2015).

Во масениот анализатор се врши раздвојување на јоните на основа на m/z односот. Тука доаѓа до дисоцијација на јоните индуцирана со судир (колизија). Јоните во масениот анализатор се раздвојуваат според нивната маса која што мора да биде определена, а се мери m/z вредноста. Постојат повеќе типови масени анализатори, кои се разликуваат според тоа дали користат статичко или динамичко, електрично или магнетно поле или пак нивна комбинација, а се делат на: континуирани (квадриполни и магнетни) и пулсни (ion-trap-јонска замка анализатори, анализатор на база на време на прелет (TOF-time of flight и анализатор со двојно фокусирање).



Слика 5. Шематски приказ на квадриполен анализатор

Во ова истражување е користен тандем квадриполен масен спектрометар со ESI+ (Слика 5). Тандем масената спектрометрија (MS/MS) користи две фази на масена анализа и тоа изолирање на јонот од интерес (молекулски или прекурзор јон) во првата фаза и анализа на настанатите фрагменти (продукт јони, ќерки јони) во втората фаза. Всушност се работи за два масени спектрометри кои се сервиски поврзани при што во првиот спектрометар се врши раздвојување на јоните, во вториот нивна анализа, а помеѓу двата се наоѓа ќелија за судир (колизија). Раздвојувањето се врши во делот кој се состои од 4 електроди (два пара меѓусебно паралелни електроди (две се позитивно и две негативно наелектризирани)), подредени во вид на квадрат, кои создаваат осцилирачко електрично поле. Јоните кои се добиени во процесот на јонизација се доведуваат во централниот простор помеѓу електродите кој е под вакуум. Само јоните со одреден сооднос m/z резонираат со квадриполната фреквенција односно имаат стабилна патека и се насочуваат према ќелијата за судар (колизија). Во оваа ќелија настанува судар помеѓу јоните со молекулите на неутралниот гас (најчесто азот, аргон или хелиум) во услови на висок притисок како резултат на што настанува фрагментација при што се формираат продукт јоните. Продукт јоните се насочуваат кон вториот квадрипол каде што се врши раздвојување според m/z односот, а потоа се насочуваат према детекторот (Vogeser и Parhofer², 2007; Cindrich 2009; Radisic, 2013).



Слика 6. Шематски приказ на MS/MS

3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Истражувањето е спроведено во два дела. Во првиот дел истражувањето опфаќа воспоставување, оптимизација и валидација на селективен, осетлив, прецизен и точен аналитички LC-MS/MS метод за мултирезидуална анализа на β -агонисти во биолошки матрикси. Во вториот дел, истражувањето опфаќа примена на методот за определување присуство на β -агонисти во примероци со потекло од Република Македонија и од увоз. Во истражувањето се вклучени десет β -агонисти кои најчесто се користат како промотори на раст и тоа: кленбутерол, бромбутерол, мабутерол, цимбутерол, кленпентерол, рактопамин, изоксуприн, салбутамол, зилпатерол и тербуталин.

Целите на докторската дисертација се:

- Оптимизација на соодветен аналитички метод за екстракција на β -агонисти од урина, мускул и црн дроб, со цел добивање на елуат кој ќе ги содржи целните аналити, а ќе се постигне со примена на колони за цврсто-фазна екстракција;
- Оптимизација и валидација на потврден LC-MS/MS метод за определување на β -агонисти во урина, мускул и црн дроб според барањата на Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС;
- Споредба на валидационите параметри од два типа колони за пречистување со цел утврдување на поефикасни колони кои би се користеле во рутинска анализа на примероци;
- Споредба на добиените резултати од валидацијата со резултатите добиени во светски рамки;
- Анализа на примероци урина, мускул и црн дроб од животни кои се користат во исхраната на луѓето, мострирани во периодот од 2014-2016 година од страна на официјални ветеринари, како дел од годишниот мониторинг план за резидуи и

контаминенти со цел проценка на безбедноста на храната во однос на присуство на β -агонисти. Примероците од урина се од животни од фармите од Р. Македонија, за разлика од примероците мускул и црн дроб кои се со потекло од фармите од Р. Македонија и од увоз;

- Споредба на добиените резултати од анализираните примероци со резултатите добиени во светски рамки;
- Примена на методите за определување на β -агонисти во рутинска контрола на примероци од урина, мускули и црн дроб со цел спроведување на државниот мониторинг план;
- Зајакнување на капацитетот на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, за поуспешно спроведување на анализите во однос на безбедноста на храната.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА РАБОТА

4.1 Примероци за анализа

Во истражувањето беа вклучени примероци од урина, мускул и црн дроб при што беа анализирани вкупно 525 примероци, од кои 274 примероци урина, 150 примероци мускул и 101 примерок црн дроб. Во Табела 4 даден е бројот на примероци за секој матрикс поединечно во текот на 3 години за урина и мускул, односно за период од 2 години за црн дроб. По приемот на примероците во лабораторијата за резидуи и контаминенти, во Институт за храна при Факултетот за ветеринарна медицина, истите беа зачувани на -20°C се до нивното анализирање.

Табела 4. Анализирани примероци по матрикси и години

Матрикс	Година на земање на примероците			Вкупно
	2014	2015	2016	
Урина	101	96	77	274
Мускул	41	65	44	150
Црн дроб	/	47	54	101
Вкупно	142	208	175	525

Примероците урина кои се користеа во истражувањето беа официјални примероци од годишниот мониторинг план за остатоци и контаминенти на Р. Македонија собирани во периодот од 2014 до 2016 година. Анализирани беа вкупно 274 примероци и тоа 101 за 2014 година, 96 за 2015 година и 77 примероци за 2016 година. Бројот на примероци по видови животни е дадено во Табела 5.

Табела 5. Анализирани примероци урина по видови животни во период 2014-2016 година

Вид на животно	Година на земање на примероците			Вкупно
	2014	2015	2016	
Говедо	32	29	28	89
Свиња	37	32	20	89
Јагне	32	35	29	96
Вкупно	101	96	77	274

Примероците мускули кои се користеа во истражувањето беа официјални примероци собирани во периодот од 2014-2016 година. Беа анализирани вкупно 150 примероци мускули и тоа 41 примерок за 2014 година, 65 примероци за 2015 и 44 примероци за 2016 година. Во Табела 6 даден е бројот на примероци по години и по видови животни.

Табела 6. Анализирани примероци мускул по видови животни во период 2014-2016 година

Вид на животно	Година на земање на примероците			Вкупно
	2014	2015	2016	
Говедо	4	12	7	23
Свиња	9	21	14	44
Кокошки	28	29	23	80
Мисирки	/	3	/	3
Вкупно	41	65	44	150

Примероците црн дроб се собирани во периодот од 2015 до 2016 година. Дел од примероците беа официјални примероци (42), а дел од примероците (59) беа од увоз и беа собрани од маркетите во Р. Македонија. Во Табела 7 се прикажани анализирани примероци од црн дроб по видови животни за 2015-2016 година.

Табела 7. Анализирани примероци црн дроб по видови животни во период 2015-2016 година

Вид на животно	Година на земање на примероците		Вкупно
	2015	2016	
Говедо	11	14	25
Свиња	13	16	29
Кокошки	23	24	47
Вкупно	47	54	101

4.2 Реагенси

4.2.1 Реагенси и растворувачи

- Етил ацетат, $C_4H_8O_2$, p.a., Carlo Erba
- Ацетонитрил, C_2H_3N , LC-MS чистота, Carlo Erba

- Метанол, CH_3OH , HPLC чистота, Carlo Erba
- Вода, H_2O , HPLC чистота, Carlo Erba
- Вода, H_2O , LC-MS чистота, Carlo Erba
- Хлороводородна киселина 37 %, HCl , Carlo Erba
- Мравска киселина, CH_2O_2 , 98-100 %, Merck
- Оцетна киселина, CH_3COOH , 99-100 %, Sigma-Aldrich
- Амониум хидроксид, NH_4OH , 32 %, p.a., Scharlau
- Калиум дихидроген фосфат, KH_2PO_4 , p.a., Алкалоид
- Калиум хидроксид, KOH , p.a., Merck
- Аскорбинска киселина, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, p.a., Алкалоид
- Натриум ацетат, p.a., $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, Carlo Erba
- β -глукоронидаза/арил сулфатаза од *Helix pomatia*, Sigma-Aldrich

4.2.2 Подготовка на раствори

- Натриум ацетатен пуфер, pH 5 (за урина)

Се мери 27 g натриум ацетат, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, и 1.7 g аскорбинска киселина, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, се додава 950 ml вода, H_2O , и се подесува pH на 5 со 1 M хлороводородна киселина, HCl , а потоа се дополнува со вода, H_2O , до 1 L. Овој пуфер може да употребува 1 месец ако се чува во фрижидер.

- Калиум фосфатен пуфер pH 5 (за црн дроб и мускул)

Се мери 13.6 g калиум дихидроген фосфат, KH_2PO_4 , и се додава 950 ml вода, H_2O , па се подесува pH на 5 со 1 M хлороводородна киселина, HCl . Потоа се дополнува со вода, H_2O , до 1 L. Овој пуфер може да употребува 1 месец ако се чува во фрижидер.

- Калиум фосфатен пуфер, pH 6

Се мери 13.6 g калиум дихидроген фосфат, KH_2PO_4 , и се додава 950 ml вода, H_2O , се подесува pH на 6 со 1 M калиум хидроксид, KOH . Потоа се дополнува со вода, H_2O , до 1 L. Овој пуфер може да употребува 1 месец ако се чува во фрижидер.

- Раствор за елуирање на примероците

Етил ацетат, $C_4H_8O_2$ и 30 % амониум хидроксид, NH_4OH , во сооднос 97:3, се мешаат 15 минути. Потоа се ставаат 3 минути во ултразвучна бања. Овој раствор мора да биде свеж и секогаш се подготвува истиот ден кога примероците се елуираат низ колоните.

- Мобилна фаза А, вода, H_2O , со 0.1 % мравска киселина, CH_2O_2

Во мензура од 1000 ml се полни 950 ml LC-MS/MS вода, H_2O , се додава 1 ml мравја киселина и се дополнува со LC-MS/MS вода, H_2O , до 1 L.

- Мобилна фаза Б, ацетонитрил, C_2H_3N , со 0.1 % мравска киселина, CH_2O_2

Во мензура од 1000 ml се полни 950 ml LC-MS/MS ацетонитрил, C_2H_3N , се додава 1 ml мравска киселина, CH_2O_2 , и се дополнува со LC-MS/MS ацетонитрил, C_2H_3N , до 1 L.

4.2.3 Стандарди и интерни стандарди

4.2.1.1 Стандарди

- Clenbuterol HCl, Sigma-Aldrich
- Brombuterol HCL, Witega
- MabuteroL HCl, Witega
- Clenpenterol HCl, Witega
- Cimbuterol, Witega
- Isoxsuprine HCl, Sigma-Aldrich
- Ractopamine HCl, Sigma-Aldrich
- Salbutamol, Riedel-de Haen
- Zilpaterol HCl, Toronto Research Chemicals Inc.
- Terbutalin hemisulfate salt, Sigma-Aldrich

4.2.3.2 Интерни стандарди

- Clenbuterol-d6 HCl, Witega
- Brombuterol-d9 HCL, Witega
- MabuteroL-d9 HCl, Witega
- Clenpenterol-d5 HCl, Witega
- Cimbuterol-d9, Witega
- Isoxsuprine-d5 hemifumarate, EURL, RIKILT

- Ractopamine-d6 HCl, EURL, RIKILT
- Salbutamol (Albuterol)-d9, Dr. Ehrenstorfer GmbH
- Zilpaterol-d7, Toronto Research Chemicals Inc.
- Terbutalin-d9 acetate hemihydrate, Sigma-Aldrich

* Стандардите и интерните стандарди кои се користени во оваа докторска дисертација се донирани од страна на Европската и Национална референтна лабораторија “Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit” (Федерална канцеларија за заштита на потрошувачите и безбедност на храна) за β -агонисти, антихелминтици, анти-кокцидиостатици вклучувајќи ги и нитроимидазолите, како и нестероидни анти-воспалителни лекови која се наоѓа во Берлин, Германија.

4.2.3.3 Подготовка на стандардни раствори

Во Табелата 8 е претставен начинот на подготовка на стандардите и интерните стандарди од β -агонисти, односно одмерена маса на истите, волуменот на растворувачот, како и пресметаната концентрација на растворите. Стандардите се измерени во одмерни колби од 10 ml и се дополнети со метанол до ознаката. Исклучок е интерниот стандард зилпатерол d7, кој е добиен во растворена состојба. Овие раствори се користат како основни раствори, а од нив понатаму се припремаат работни раствори за припрема на калибрациони криви за матрикси урина, мускул и црн дроб, како и работни раствори за збогатување на примероците.

Табела 8. Припрема на основни раствори на β -агонисти

Бр.	Стандард	Маса/mg	Волумен до кој се дополнува метанол/ml	Концентрација на основниот раствор - mg/ml
1	Brombuterol HCl	11.79	10	1.179
2	Cimbuterol	10.39	10	1.039
3	Clenbuterol HCl	11.85	10	1.185
4	Clenpenterol HCl	11.43	10	1.143
5	Isoxsuprine HCl	36.10	10	3.610
6	Mabuterol HCl	14.35	10	1.435
7	Ractopamine HCl	7.51	10	0.751
8	Salbutamol	10.58	10	1.058
9	Terbutaline hemisulfate salt	22.53	10	2.253

Табела 8. Припрема на основни раствори на β -агонисти - продолжение

10	Zilpaterol HCl	6.18	10	0.618
11	Brombuterol-d9 HCl	12.10	10	1.21
12	Cimbuterol-d9	7.49	10	0.749
13	Clenbuterol-d6 HCl	6.15	10	1.230
14	Clenpenterol-d5 HCl	4.42	10	0.884
15	Isoxsuprine-d5 hemifumarate	0.5	10	0.1
16	Mabuterol-d9 HCl	10.32	10	1.032
17	Ractopamine-d6 HCl	2.64	10	0.528
18	Salbutamol (Albuterol)-d9	2.50	10	0.500
19	Terbutaline-d9 acetate hemihydrate	5.58	10	1.116
20	Zilpaterol -d7	1 mg/ml	/	1 mg/ml

Табела 9. Припрема на мешавина од стандарди за развој на MS/MS метод

Бр.	Стандард	V*/ μ l	СЕ ДОПОЛНУВА СО МЕТАНОЛ ДО 10 ml
1	Brombuterol HCl	85	
2	Cimbuterol	96.25	
3	Clenbuterol HCl	85	
4	Clenpenterol HCl	87.50	
5	Isoxsuprine HCl	27.70	
6	Mabuterol HCl	70	
7	Ractopamine HCl	133.15	
8	Salbutamol	94.50	
9	Terbutaline hemisulfate salt	45	
10	Zilpaterol HCl	164	
11	Brombuterol-d9 HCl	82.64	
12	Cimbuterol-d9	133.50	
13	Clenbuterol-d6 HCl	81.30	
14	Clenpenterol-d5 HCl	113.10	
15	Isoxsuprine-d5 hemifumarate	1000	
16	Mabuterol-d9 HCl	96.90	
17	Ractopamine-d6 HCl	189.40	
18	Salbutamol (Albuterol)-d9	200	
19	Terbutaline-d9 acetate hemihydrate	89.60	
20	Zilpaterol -d7	100	

*V – волумен кој се зема од основниот раствор

4.2.3.3.1 Подготовка на стандардни раствори за матрикс урина

Калибрационата крива при оптимизација и валидација на методот, како и при анализа на примероците беше конструирана паралелно со серија на стандардни раствори растворени во мобилна фаза и со серија стандардни раствори во урина во шест точки.

Стандардните раствори во урина беа подготвени, така што стандардните раствори беа додавани во урината на почеток од подготовката по што урината се припремаше за анализа по методот по кој се подготвуваат и примероците – калибрација во матрикс). При тоа, опсегот на калибрационата крива беше различен за различни β -агонисти во зависност од препорачаните концентрации од CRL guidance paper (CRL, 2007). Врз основа на препорачаните концентрации во претходно споменатиот документ, β -агонистите беа групирани на начин што во секоја група припаѓаат β -агонисти со иста или слична препорачана концентрација (табела 10). Во истата група со стандардот припаѓа и соодветниот интерен стандард. Интерниот стандард е соединение кое покажува физичко-хемиски карактеристики слични на оние на аналитите од интерес, но во исто време генерира одговор кој може да се разликува од оној на аналитот. Кога станува збор за анализа на β -агонисти интерните стандарди се всушност молекули на β -агонисти во кои еден или повеќе Н-атоми се заменети со деутериум. Обично интерниот стандард се додава во еднакви количини во сите примероци што се анализираат, па поради тоа што и аналитите и интерните стандарди се изложени на исти загуби (неефикасност во екстракција, варење или јонизација), нивниот почетен сооднос не се менува. Со тоа интерниот стандард ги корегира варијациите во одговорот на аналитот предизвикан од варијабилноста на аналитичка постапка. При користење на масена спектрометрија, употребата на интерни стандарди е од апсолутно значење, поради релативно високата варијабилност на одговорот на детекторот кој има значителни ефекти врз интензитетот на сигналот поради јонизацијата. Ова е особено изразено кај најшироко користената јонизирачка техника, електроспреј јонизација, а е предизвикано од зони на ко-елуирачки матриксни компоненти кои влијаат врз ефикасноста на формирањето на јони. Во денешно време обично се користат изотопски обележани стандарди, кои се разликуваат од аналитите само во молекулската маса, а имаат исти физичко-хемиски својства, поради што се елуираат заедно со аналитот и ги корегираат ефектите од јонската супресија. Бидејќи изотопски обележаните стандарди се блиски по структурата на нивните неизотопски аналози, многу често неможе хроматографски да се раздвојат при анализа. Сепак, ова не е проблем за масената спектрометрија бидејќи произведените јони имаат различни m/z вредности. Во кратки црти, интерните стандарди ја зголемуваат прецизноста и точноста на аналитичките методи, при што е утврдено дека колку молекулската структура на аналитот и интерниот стандард е послична, толку е

поголема придобивката во прецизност и точност на методот за анализа (Ahuja и Rasmussen, 2007; Bronsema и сор., 2012).

Табела 10. Групи β -агонисти со ист опсег за калибрациона крива

Група	β -агонисти	Препорачана концентрација ng/ml	Соодветен интерен стандард
1	Бромбутерол Кленбутерол Мабутерол	0.2	Бромбутерол d9 Кленбутерол d6 Мабутерол d9
2	Кленпентерол Изоксуприн Цимбутерол	0.5	Кленпентерол d5 Изоксуприн d5 Цимбутерол d9
3	Рактопамин Салбутамол Зилпатерол	1.0	Рактопамин d6 Салбутамол d9 Зилпатерол d7
	Тербуталин	3.0	Тербуталин d9

Концентрацијата на работните раствори за конструирање на калибрационата крива се дадени во Табела 11. При тоа, треба да напомене дека концентрацијата на работните раствори во мобилна фаза е за 20 пати повисока од концентрацијата на стандардните раствори во матриксот, поради тоа што при припрема на примероците урина се врши 20-кратно концентрирање.

Табела 11. Концентрација на стандарди за конструирање калибрациона крива

Ознака на СТД*	Група 1		Група 2		Група 3	
	Концентрација на СТДМФ** ng/ml	Концентрација на СТДМ*** ng/ml	Концентрација на СТДМФ** ng/ml	Концентрација на СТДМ*** ng/ml	Концентрација на СТДМФ** ng/ml	Концентрација на СТДМ*** ng/ml
СТД 1	1.0	0.05	2.5	0.125	5	0.25
СТД 2	2.5	0.125	5.0	0.25	10	0.5
СТД 3	5.0	0.25	7.5	0.375	15	0.75
СТД 4	7.5	0.375	10	0.5	20	1.0
СТД 5	10	0.5	15	0.75	30	1.5
СТД 6	15	0.75	20	1.0	50	2.5

*СТД-стандард; ** СТДМФ- стандарди во мобилна фаза; ***СТДМ-стандарди во матрикс

Концентрацијата на интерните стандарди беше на ниво на стандардот 4 од калибрационата крива, соодветно за секоја група. Интерните стандарди се додаваат и во стандардните раствори и во примероците за анализа.

За збогатување на примероците урина со β -агонисти се користеа стандардни раствори со концентрација 100 ng/ml. Стандардите беа поделени повторно во три групи, како и за калибрационата крива, поради тоа што збогатувањето на примероците беше на различни концентрациски нивоа. За сите 3 групи на интерни стандарди концентрацијата за додавање во примероците за анализа беше исто така 100 ng/ml.

4.2.3.3.2 Подготовка на стандардни раствори за матрикс мускул

Калибрационата крива при оптимизација и валидација на методот, како и при анализа на примероците, беше конструирана паралелно со серија на стандардни раствори растворени во мобилна фаза и со серија стандардни раствори во мускул, во шест точки. При тоа стандардните раствори беа додавани во мускулот на почеток, по што мускулот се припремаше за анализа по методот како што се подготвуваат и примероците – калибрација во матрикс. При тоа, опсегот на калибрационата крива беше различен за различни β -агонисти во зависност од препорачаните концентрации од CRL guidance paper (CRL, 2007). Врз основа на препорачаните концентрации, во претходно споменатиот документ, β -агонистите беа поделени во групи, при што во секоја група припаѓаат β -агонисти со иста или слична препорачана концентрација, Табела 12.

Табела 12. Группи β -агонисти со ист опсег за калибрациона крива

Група	β -агонисти	Препорачана концентрација ng/g
1	Бромбутерол	0.1
	Кленбутерол	
	Мабутерол	
2	Кленпентерол	0.5
	Изоксуприн	
	Цимбутерол	
3	Рактопамин	1.0
	Салбутамол	5.0
	Зилпатерол	
	Тербуталин	10

Концентрацијата на работните раствори во мобилна фаза е за 50 пати повисока од концентрацијата на стандардните раствори во матриксот (калибрација во матрикс), поради тоа што при подготовка на примероците мускул примерокот се концентрира 50 пати. Концентрацијата на интерните стандарди беше на ниво 45 ng/g за стандардите во мобилна фаза и 0.9 ng/g за стандардите подготвени во матриксот како и во примероците за анализа. Интерните стандарди се додаваат и во стандардните раствори и во примероците за анализа.

Концентрацијата на работните раствори за конструирање на калибрационата крива за мускул се дадени во Табела 13.

Табела 13. Концентрација на стандарди за конструирање калибрациона крива

Ознака на СТД*	Група 1		Група 2		Група 3	
	Концентрација на СТДМФ** ng/g	Концентрација на СТДМ*** ng/g	Концентрација на СТДМФ** ng/g	Концентрација на СТДМ*** ng/g	Концентрација на СТДМФ** ng/g	Концентрација на СТДМ*** ng/g
СТД 1	2.5	0.05	10	0.2	25	0.5
СТД 2	5	0.1	15	0.3	37.5	0.75
СТД 3	10	0.2	20	0.4	50	1.0
СТД 4	30	0.6	30	0.6	62.5	1.25
СТД 5	45	0.9	45	0.9	75	1.5
СТД 6	67.5	1.35	67.5	1.35	100	2.0

*СТД-стандард; ** СТДМФ- стандарди во мобилна фаза; ***СТДМ-стандарди во матрикс

4.2.3.3 Подготовка на стандардни раствори за матрикс црн дроб

Калибрационата крива при оптимизација и валидација на методот, како и при анализа на примероците беше конструирана паралелно со серија на стандардни раствори растворени во мобилна фаза и со серија стандардни раствори во црн дроб (стандардните раствори беа додавани во црниот дроб на почеток по што црниот дроб се припремаше за анализа по методот како што се подготвуваат и примероците – калибрација во матрикс) во шест точки. Концентрацијата на работните раствори за конструирање на калибрационата крива за црн дроб се дадени во Табела 14. Концентрацијата на работните раствори во мобилна фаза е за 50 пати повисока од концентрацијата на стандардните раствори во матриксот (калибрација во матрикс) поради тоа што при припрема на примероците црн дроб примерокот се концентрира 50 пати. Концентрацијата на интерните стандарди беше на ниво 45 ng/g за стандардите во мобилна фаза и 0.9 ng/g за стандардите подготвени во матриксот

како и во примероците за анализа. Интерните стандарди се додаваат и во стандардните раствори и во примероците за анализа.

Табела 14. Концентрација на стандарди за конструирање калибрациона крива

Ознака на СТД*	Концентрација на СТДМФ** ng/g	Концентрација на СТДМ*** ng/g
СТД 1	5.0	0.1
СТД 2	10.0	0.2
СТД 3	15.0	0.3
СТД 4	30.0	0.6
СТД 5	45.0	0.9
СТД 6	67.5	1.35

*СТД-стандард; ** СТДМФ- стандарди во мобилна фаза; ***СТДМ-стандарди во матрикс

4.3 Лабораториска опрема

4.3.1 Лабораториска опрема, прибор и стакларија

- Аналитичка вага, Sartorius, d=0.0001 g
- Техничка вага, Sartorius, d=0.01 g
- Хоризонтална мешалка, IKA Labortechnik
- Вортекс, Heidolph
- Центрифуга со ладење, MPW medical instruments
- Азот евапоратор, Organomation
- Водена бања за азот евапоратор, Organomation
- Дигестор, ChemFree
- Дигестор, Grga I Melita laboratory furniture
- Ултразвучна бања со регулатор за време и температура, MRC
- Печка за сушење, Memmert
- pH метар, Sartorius
- Варијабилен едноканален пипетор, 100 – 1000 μ l, Eppendorf
- Варијабилен едноканален пипетор, 10 – 100 μ l, Eppendorf
- Одмерни тиквички, 10 ml
- Стаклени епрувети

- Пластични туби, 50 ml
- Темни стаклени виали, 2 ml, Supelco
- Стаклени инсерти за виали, 300 μ l, Supelco
- Колони за цврсто-фазна екстракција, Bond Elut-Certify, 500 mg, 6 ml, Agilent
- Колони за цврсто-фазна екстракција, Discovery® DSC-MCAX, 300 mg, 6 ml, Supelco
- Колони за цврсто-фазна екстракција, Strata Screen-C, 500 mg, 6 ml, Phenomenex
- Колона за течна хроматографија, C18, 50 x 2.1mm, 2.6 μ m, Phenomenex

4.3.2 LC-MS/MS опрема

LC-MS/MS инструментот се состои од течен хроматограф (Ultra High Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) и масен детектор. Течниот хроматограф се состои од бинарна пумпа (Waters, ser. no. C11UPB296A), аутосамплер (Waters, ser. no. C11UPA931M) и простор за колони (Waters, ser. no. C11UPM410G). MS/MS детекторот е троен квадрипол (Waters, ser. no. QBB1427).

4.4 Методи

4.4.1 Подготовка на примероци

Подготовката на примероците за определување на β -агонисти во урина се состои од 2 чекори (ензимска хидролиза и цврсто-фазна екстракција низ колони), додека подготовката на примероците црн дроб и мускули се состои од 3 чекори (екстракција, ензимска хидролиза и цврсто-фазна екстракција низ колони). Примероците се подготвени според методите од Европската референтна лабораторија во Берлин, Германија (BETA_013, 2003; BETA_014, 2006).

4.4.1.1 Подготовка на примероци урина

а) Ензимска хидролиза

- Се мери 10 ml урина во пластична туба од 50 ml.
- Се додава ИС (волуменот од ИС кој се додава, како и неговата концентрација, детално се опишани во точка 4.1.5.1).

- Се додава 5 ml натриум ацетатен пуфер, pH 5 (треба да се провери pH на примероците и ако е потребно треба да се подеси на 5 со 1 M оцетна киселина или 1M натриум хидроксид).
- Се додава 50 μ l β -glucoronidasa/aryl sulfatase from *Helix pomatia*
- Примероците се хомогенизираат на вортекс.
- Примероците се инкубираат на 37⁰C преку ноќ
- Примероците се ладат на собна температура
- Се додава 5 ml фосфатен пуфер, pH 6 (pH на примероците треба да се провери и ако е потребно треба да се подеси на 6 со 6 M KOH).
- Примероците се центрифугираат на +4⁰C, 4000 rpm, 10 min.
- Се зема супернатантот
- Се додава 200 μ l метанол.

б) Цврсто-фазна екстракција

Активирањето на колоните се врши со додавање на 2 ml метанол, по што се мијат со 2 ml вода и се неутрализираат со 2 ml фосфатен пуфер, pH 6. Треба да се внимава да не дојде до сушење на колоните по поминувањето на реагенсите низ нив. Потоа се додава супернатантот од центрифугираните проби, при што протокот не смее да биде поголем од 1 ml/min. Следен чекор е миење на колоните при што се додава 1 ml 1 M оцетна киселина, после што следи сушење на колоните 20 минути под вакуум (15 mm Hg столб), а потоа се додава 2 ml метанол и колоните повторно се сушат 10 минути под вакуум (15 mm Hg столб). Примероците се елуираат со 6 ml раствор за елуирање (етил ацетат и 30 % амоњак, во сооднос 97:3) при што протокот не смее да биде поголем од 1 ml/min. Елуатот се испарува под струја од азот на 35 ⁰C. Остатоците се раствораат со 200 μ l мешавина од мобилна фаза А и Б (95:5), се мешаат на вортекс, се префрлаат во вiali за автосамплер и се анализираат на LC-MS/MS.

4.4.1.2 Подготовка на примероци црн дроб и мускули

а) Екстракција

- 10 g ткиво се хомогенизира
- Се додава 20 ml фосфатен пуфер, pH 5

- Се додава ИС (волуменот од ИС кој се додава, како и неговата концентрација, детално се опишани во точка 4.1.5.2 и 4.1.5.3).
 - Примероците се хомогенизираат 15 секунди на вортекс
 - Се проверува рН која треба да биде 5.0 ± 0.3
 - Примероците се ставаат 20 минути во ултразвучна бања на $40\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Примероците се ладат на собна температура
 - Се проверува рН и доколку е потребно се подесува на 5.0 ± 0.3
 - Примероците се мешаат на вортекс 10 секунди
 - Примероците се центрифугираат на $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4000 rpm, 30 мин
 - Се зема супернатантот и се префрла во туба
 - Екстракцијата се повторува уште еднаш со 5 ml фосфатен пуфер рН 5
- Супернатантот се меша со супернатантот добиен од првата екстракција

б) Ензимска хидролиза

На супернатантот се додава 50 μl β -glucuronidasa/aryl sulfatase from *Helix pomatia* по што примероците се хомогенизираат на вортекс, а потоа хидролизираат 1 час на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. После хидролизата примероците се ладат на собна температура и се центрифугираат (30 минути, 5000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Се зема супернатантот и се додава 200 μl метанол.

в) Цврсто фазна екстракција

Активирањето на колоните се врши со додавање на 5 ml етилацетат, после што се додава 2 ml метанол. Колоните се мијат со 2 ml вода и се неутрализираат со 2 ml фосфатен пуфер, рН 6. Треба да се внимава да не дојде до сушење на колоните после поминувањето на реагенсите низ нив. Потоа се додава супернатантот од центрифугираните проби, при што протокот не смее да биде поголем од 1 ml/min. Следен чекор е миење на колоните при што се додава 1 ml 1M оцетна киселина, после што следи сушење на колоните 20 минути под вакуум (15 mm Hg столб), а потоа се додава 6 ml метанол и колоните повторно се сушат 10 минути под вакуум (15 mm Hg столб). Примероците се елуираат со 6 ml раствор за елуирање при што протокот не смее да биде поголем од 1 ml/min. Елуатот се испарува под струја од азот на $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Остатоците се раствораат со 200 μl мешавина од мобилна фаза А и Б (95:5), се мешаат на вортекс, се префрлаат во виали за автосамплер и се анализаат на LC-MS/MS.

4.4.2. LC-MS/MS метод

4.4.2.1 Хроматографски услови

Мобилната фаза А е вода (LC-MS чистота) со 0.1 % мравска киселина, а мобилна фаза Б е ацетонитрил со 0.1 % мравска киселина. Користена е C18 хроматографска колона од производителот Phenomenex, со димензии 50 x 2.1mm, 2.6 μ m. Температурата на колоната е 40°C, а температурата на автосамплерот е 10°C. Волуменот кој се инјектира во системот е 5 μ l. Со цел да се постигне добро раздвојување на β -агонистите, методот беше оптимизиран во нашите лабораториски услови со промена на соодносот на мобилните фази и промена на протокот. Раздвојувањето е градиентно, а соодносот на мобилните фази и протокот се дадени во Табела 15.

Табела 15. Сооднос на мобилните фази и протокот

Време (min)	Проток (ml/min)	Мобилна фаза А (%)	Мобилна фаза Б (%)
Почетно	0.8	95	5
1.0	0.8	80	20
4.0	0.8	60	40
8.0	0.8	95	5
12.0	0.8	95	5

4.4.2.2 MS/MS услови

Условите на MS/MS детекторот дадени се во Табела 16.

Табела 16. MS/MS услови

Тип на јонизација	ES+	Desolvation gas flow (L/Hr)	300
Capillary (kV)	3.0	LM 1 resolution	13.5
Cone (V)	40	HM 1 resolution	13.5
Extractor V	5.0	Ion energy 1	0.2
RF Lens 2	0.1	Entrance	1
Source temperature °C	150	LM 2 resolution	13.0
Desolvation temperature °C	400	HM 2 resolution	13.0
Cone gas flow (L/Hr)	100	Ion energy 2	1.8

За оптимизација на MS/MS методот во масениот детектор беше инјектирана мешавина од стандардите и соодветните интерни стандарди при што беше определен масениот спектар на β -агонистите и беа утврдени главниот-прекурсор јон (precursor ions) и

по три продукт јони (daughter ions) за стандардите, односно главниот-прекурсор јон и по 1 продукт јон за интерните стандарди. Концентрација на стандардите и интерните стандарди беше 10 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.3 Валидација на аналитичките методи за определување на β -агонисти

Основната цел на аналитичките методи е добивање на брзи, точни и веродостојни резултати, а за да се постигне сето тоа истите мора да се валидираат. Валидацијата на аналитичките методи претставува постапка со која се осигуруваат точни, прецизни и повторливи резултати при долгорочна примена на методот. Со валидацијата на аналитичкиот метод, се утврдува дали методот е соодветен за предвиденото испитување и се дефинира како “процес со кој се документира дека методот е соодветен за неговата намена” (ЕС, 657, 2002; Алуја и Rasmussen, 2007).

Валидацијата на методот беше извршена според Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС и при тоа беа определени следните параметри: линеарност на методот, лимит на одлучување (Decision limit – $CC\alpha$), способност за докажување (Detection capability – $CC\beta$), специфичност/селективност точност и прецизност изразена преку повторливост и репродуцибилност.

4.4.3.1. Линеарност

Линеарноста на методот претставува способност за добивање на резултати кои се директно пропорционални со концентрацијата на аналитот во примерокот, во рамките на даден опсег. Линеарноста се изразува преку конструирање на калибрациона крива со мерење на одзивот на методите на различни познати концентрации, најмалку во 5 точки, со најмалку 3 повторувања. Во ова истражување калибрационата крива беше конструирана од шест стандардни раствори со различна концентрација, а секој стандарден раствор беше инјектиран по шест пати. Проценка на линеарноста се врши со пресметување на коефициентот на корелација (r^2) кој треба да биде ≥ 0.98 . Коефициентот на корелација се пресметува за калибрационата крива за секој аналит одделно. Во оваа истражување коефициентот на корелација е пресметан посебно за калибрационите криви за секој β -

агонист во сите три матрикси, како за стандардите припремени во мобилната фаза, така и за стандардите припремени во матриксот.

Поради различните препорачани концентрации кај различните матрикси, линеарноста е утврдена посебно за методот за урина, мускул и црн дроб.

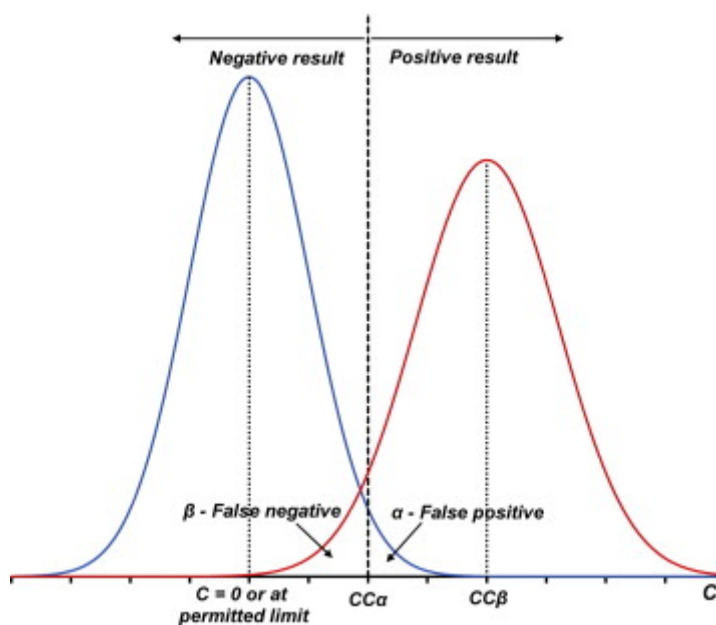
Линеарноста за методот за урината е утврдена преку конструирање на калибрациона крива од 6 точки со шест повторувања и тоа со стандарди подготвени во мобилна фаза и со стандарди во урина (калибрација во матрикс). Калибрационите криви за стандардите припремени во мобилна фаза беа во опсег 1.0-15.0 ng/ml за првата група β -агонисти, 2.5-20.0 ng/ml за втората и 5-50 ng/ml за третата група β -агонисти. Опсегот на калибрационите криви пак за стандардите подготвени во урина беа 0.05 - 0.75 ng/ml, 0.125 -1.0 ng/ml и 0.25 - 2.5 ng/ml соодветно за првата, втората и третата група. Сите точки за конструирање на калибрационите криви и групите на β -агонисти дадени се во делот “Подготовка на стандардни раствори за урина (4.1.5.1.)”.

Линеарноста за методот за мускулот е утврдена преку конструирање на калибрациона крива во 6 точки со шест повторувања и тоа со стандарди подготвени во мобилна фаза и со стандарди во мускул. Калибрационите криви за стандардите припремени во мобилна фаза беа во опсег 2.5 - 67.5 ng/g за првата група β -агонисти, 10.0 - 67.5 ng/g за втората и 25.0-100.0 ng/g за третата група β -агонисти. Опсегот на калибрационите криви пак за стандардите подготвени во мускул беа 0.05 - 1.35 ng/g, 0.2 -1.35 ng/g и 0.5 - 2.0 ng/g соодветно за првата, втората и третата група. Сите точки за конструирање на калибрационите криви и групите на β -агонисти се дадени во делот “Подготовка на стандардни раствори за мускул (4.1.5.2.)”

Линеарноста за методот за црниот дроб е утврдена преку конструирање на калибрациона крива во 6 точки со шест повторувања и тоа со стандарди подготвени во мобилна фаза и со стандарди во црн дроб. Калибрационите криви за стандардите припремени во мобилна фаза беа во опсег 5.0 - 67.5 ng/g, додека опсегот на калибрационите криви пак за стандардите подготвени во црн дроб беше 0.1 - 1.35 ng/g. Сите точки за конструирање на калибрационите криви дадени се во делот “Подготовка на стандардни раствори за црн дроб (4.1.5.3.)”.

4.4.3.2 Лимит на одлучување - $CC\alpha$

Лимит на одлучување претставува гранична концентрација на и над која може да се заклучи, со веројатност на α грешка дека примерокот е несоодветен. α грешка претставува веројатност дека испитаниот примерок е негативен, иако се добиени позитивни резултати (лажно позитивен резултат) и за супстанците од А група таа изнесува 1% (Слика 7). За забранети супстанции, според 2002/657/ЕС, $CC\alpha$ се определува со збогатување на одреден број негативни примероци со стандарди од аналитите на најниското ниво на ефикасност или над него, или пак со анализа на 20 негативни примероци и пресметување на односот сигнал-шум. Во оваа истражување користен е првиот начин за определување на лимитот на одлучување при што истиот се пресметува на следниот начин: соодветната концентрација + 2.33*стандардната девијација на интерлабораториската репродуцибилност.



Слика 7. Шематски приказ за $CC\alpha$ и $CC\beta$

4.4.3.3 Способност за докажување – $CC\beta$

Способност за докажување – $CC\beta$ претставува најниската концентрација на аналитот која може да се детектира, идентификува и/или квантифицира во примерокот со веројатност на β -грешка. β -грешка претставува веројатност испитаниот примерок дали е вистински позитивен, иако се добиени негативни резултати (лажно негативен резултат) и за супстанците од А група таа изнесува 5% (Слика 7). Се определува преку определена

вредност за $CC\alpha$ и се пресметува на следниот начин: определена вредност за $CC\alpha + 1,64^*$ стандардната девијација за интерлабораториската репродукцибилност (2002/657/EC).

$CC\alpha$ и $CC\beta$ беа определени за сите матрикси посебно. За определување на $CC\alpha$ и $CC\beta$ во урина, негативната урина беше збогатена со стандардите на ниво од $\frac{1}{2}$ или пониско од препорачаните концентрации според CRL guidance paper и тоа за првата група на ниво од 0.1 ng/ml, за втората група на ниво од 0.25 ng/ml и за третата група на ниво од 0.5 ng/ml. За секоја концентрација беа припремени по 18 репликати. Групите β -агонисти се прикажани во Табела 10. За определување на $CC\alpha$ и $CC\beta$ во мускул негативен примерок мускул беше збогатен со стандардите на ниво од $\frac{1}{2}$ или пониско од препорачаните концентрации според CRL guidance paper и тоа за првата група на ниво од 0.05 ng/g, за втората група на ниво од 0.2 ng/g и за третата група на ниво од 0.5 ng/g. За секоја концентрација беа припремени по 18 репликати. Групите β -агонисти се прикажани во Табела 12. За определување на $CC\alpha$ и $CC\beta$ во црн дроб, негативен примерок црн дроб беше збогатен со стандардите на ниво од $\frac{1}{2}$ или пониско од препорачаните концентрации според CRL guidance paper и тоа за првата група (кленбутерол, бромбутерол, цимбутерол и мабутерол) на ниво од 0.1 ng/g, за втората група (рактопамин, изоксуприн, кленпентерол и рактопамин) на ниво од 0.25 ng/g и за третата група (салбутамол и тербуталин) на ниво од 0.5 ng/g. За секоја концентрација беа припремени по 18 репликати.

4.4.3.4 Специфичност/селективност

Специфичност на методот е можност на методот да го детектира целниот аналит во присуство на други компоненти кои би можело да бидат присутни во примерокот. За аналитичките методи најважна е способноста за разликување на целниот аналит од неговите сродни супстанции (изомери, метаболити, продукти на деградација, компоненти од матриксот и сл.). Селективност на методот е способност на методот да разликува повеќе различни аналити, под услов тие аналити да не се мешаат меѓусебе, односно да го квантифицира аналитот во присуство на други аналити (Ahuja and Rasmussen, 2007; EC, 657, 2002). За да се потврдат специфичноста и селективноста на методот анализирани се 20 негативни примероци на урина, мускул и црн дроб, а потоа се анализирани по 20 збогатени примероци од урина, црн дроб и мускул со додадени стандарди од β -агонисти.

4.4.3.5 Точност

Точноста претставува степен на совпаѓање помеѓу резултатите добиени од анализата и прифатените референтни вредности. Точноста се определува со помош на сертифициран референтен материјал (CRM) во кој концентрацијата на аналитите е позната. Доколку не постои CRM точноста може да се определи преку збогатување на примероците со стандарди на три концентрациски нивоа, по што се пресметува аналитичкиот принос (Recovery, %) на следниот начин:

Аналитички принос (%) = $100 \times \text{измерена концентрација} / \text{додадена концентрација}$

За урина точноста на методот беше определена со збогатување на 18 примероци негативна урина со мешавина од стандарди од β -агонисти на три концентрациски нивоа и тоа 0.2, 0.3 и 0.4 ng/ml за првата група β -агонисти, 0.5, 0.75 и 1.0 ng/ml за втората група и 1.0, 1.5 и 2.0 ng/ml за третата група β -агонисти. На секое концентрациско ниво беа подготвени по 6 репликати. Сите збогатени примероци беа анализирани на LC-MS/MS инструментот по три пати. За мускул точноста на методот беше определена со збогатување на 18 негативни примероци мускул со мешавина од стандарди од β -агонисти на три концентрациски нивоа и тоа 0.05, 0.25 и 0.5 ng/g за првата група β -агонисти, 0.2, 0.5 и 0.75 ng/g за втората група и 0.5, 0.75 и 1.0 ng/g за третата група β -агонисти. На секое ниво на концентрација беа подготвени по 6 репликати. Сите збогатени примероци беа анализирани на LC-MS/MS инструментот по три пати. За црн дроб точноста на методот беше определена со збогатување на 18 негативни примероци црн дроб со мешавина од стандарди од β -агонисти на три концентрациски нивоа и тоа 0.25, 0.5 и 0.75 ng/g. На секое ниво на концентрација беа подготвени по 6 репликати. Сите збогатени примероци беа анализирани на LC-MS/MS инструментот по три пати.

4.4.3.6 Прецизност

Прецизноста е степен на совпаѓање на резултатите помеѓу серија мерења добиени под пропишани услови. Прецизноста на методот е определена преку повторливоста и

репродукцибилноста за секој матрикс посебно, на три концентрациски нивоа. Се пресметува преку релативната стандардна девијација (коефициент на варијација, %). Колку прецизноста е помала, релативната стандардна девијација е поголема. За урина, прецизноста на методот беше определена со збогатување на негативната урина на три концентрациски нивоа и тоа 0.2, 0.3 и 0.4 ng/ml за првата група β -агонисти, 0.5, 0.75 и 1.0 ng/ml за втората група и 1.0, 1.5 и 2.0 ng/ml за третата група β -агонисти. На секое ниво беа подготвени по 6 репликати и беа анализирани трикратно. Репродуцибилноста беше определена на истиот начин како прецизноста (иста аналитичка постапка, ист инструмент и исти примероци), но во друг ден. За мускул прецизноста на методот беше определена со збогатување на негативен примерок мускул на три концентрациски нивоа и тоа 0.05, 0.25 и 0.5 ng/g за првата група β -агонисти, 0.2, 0.5 и 0.75 ng/g за втората група и 0.5, 0.75 и 1.0 ng/g за третата група β -агонисти. На секое ниво беа подготвени по 6 репликати и беа анализирани трикратно. Репродуцибилноста беше определена на истиот начин како прецизноста но во друг ден. За црн дроб прецизноста на методот беше определена со збогатување на негативен примерок црн дроб на три концентрациски нивоа и тоа 0.25, 0.5 и 0.75 ng/g. На секое ниво беа подготвени по 6 репликати и беа анализирани трикратно. Репродуцибилноста беше определена на истиот начин како прецизноста но, во друг ден.

4.4.4 Споредба на ефикасноста помеѓу два типа колони

Споредбата на ефикасноста помеѓу два типа на колони за цврсто-фазна екстракција беше спроведена кај сите три матрикси при што кај урината и мускулот направена е споредба помеѓу различни колони за цврсто-фазна екстракција Discovery® DSC-MCAX, 300 mg /6 ml и Bond Elut-Certify, 500 mg / 6 ml, додека кај црниот дроб споредбата беше направена помеѓу колоните Discovery® DSC-MCAX, 300 mg / 6 ml и Strata Screen-C, 500 mg / 6 ml. Споредбата на ефикасноста беше оценета преку одредување на прецизноста и точноста со двата типа на колони, кај секој матрикс одделно. Збогатувањето на урината, мускулот и црниот дроб со стандарди од β -агонисти за одредување на прецизноста и точноста беше направено на три нивоа, исто ниво како и при валидацијата на методот, а за секое ниво беа подготвени по шест репликати.

4.4.5 Контрола на квалитет

Според Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС и Одлуката на Комисијата 98/179/ЕС сите лаборатории кои учествуваат во спроведување на годишните мониторинг планови и вршат контрола на квалитет и безбедност на храна мора да ја докажат својата компетентност со редовно и успешно учество на меѓународни тестови за оспособеност за изведување на методот (Proficiency test-PT) кои може да бидат организирани од национални или референтни лаборатории или пак од некои други независни тела како FAPAS, Progetto Trieste-TestVeritas, Muva Kempten итн. Меѓународни тестови за оспособеност за изведување на методот (Proficiency test) значи организација, изведба и оценка на испитувањето на ист примерок од страна на две или повеќе лаборатории согласно претходно одредени услови за одредување на успешноста на испитувањето. При тоа, лабораториите може да одберат сопствени методи со кои ќе го извршат испитувањето, а се препорачува да бидат методите кои лабораторијата ги користи во рутинска пракса. Стандардната девијација од PT може да се користи за процена на репродуцибилноста на методот (ЕС, 657, 2002). За методот опфатен во оваа дисертација, лабораторијата за резидуи и контаминенти при ФВМС, учествуваше на PT „Beta-Agonists in Bovine and Porcine Liver Proficiency Test BETA1116“ организиран од страна на Европската Референтна лабораторија за β -агонисти во Берлин, Германија. При тоа беа тестирани пет примероци на црн дроб со следните кодови: LIV0002, LIV0019, LIV0122, LIV0045, LIV0367. Примероците беа припремени за анализа според методот разработен во оваа дисертација и беа анализирани двојно.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 Оптимизација на LC-MS/MS методот

Со оптимизација на LC-MS/MS методот добиени се ретенционите времиња на β -агонистите, главниот јон и продукт јоните. Најважните параметри од оптимизацијата на LC-MS/MS методот за β -агонистите се дадени во табела 17, додека најважните параметри за соодветните интерни стандарди се дадени во табела 18. Идентификацијата и квантификацијата на β -агонистите се врши врз основа на ретенционите времиња и масениот спектар. Вкупното време за анализа изнесува 12 минути.

Табела 17. Параметри од оптимизација на LC-MS/MS методот за β -агонисти

Стандард	PВ* (min)	Главен јон	Продукт јони	КЕ**	СИС***
Кленбутерол	2.225	276.97	202.95 131.87 167.77	16 30 30	Кленбутерол-d6
Бромбутерол	2.545	366.90	292.84 211.42 57.00	20 34 38	Бромбутерол-d9
Мабутерол	2.660	310.95	236.99 216.96 57.00	18 26 30	Мабутерол-d9
Кленпентерол	2.600	291.00	202.92 131.89 167.79	16 30 28	Кленпентерол-d5
Изоксуприн	2.500	302.04	106.96 164.01 120.95	30 16 28	Изоксуприн-d5 хемифумарат
Цимбутерол	1.490	234.03	159.98 142.94 57.00	16 28 26	Цимбутерол-d9
Рактопамин	1.935	302.04	106.96 164.01 120.95	28 16 24	Рактопамин-d6
Салбутамол	1.265	240.03	147.96 165.98 56.94	20 14 24	Салбутамол (албутерол)-d9
Зилпатерол	1.305	262.03	185.01 202.05 156.98	24 22 32	Зилпатерол-d7
Тербуталин	1.255	226.00	152.00 106.97	14 30	Тербуталин-d9

*PВ – ретенционо време; ** - енергија на колизија; *** соодветен интерен стандард

Табела 18. Параметри од оптимизација на LC-MS/MS методот за интерните стандарди од β -агонисти

Стандард	PВ* (min)	Главен јон	Продукт јони	КЕ**
Кленбутерол d6	2.290	283.03	203.56	16
Бромбутерол-d9	2.490	375.93	293.87	18
Мабутерол-d9	2.650	320.07	237.94	18
Кленпентерол-d5	2.595	296.00	203.10	16
Изоксуприн-d5 хемифумарат	2.70	308.15	168.05	16
Цимбутерол-d9	1.510	243.07	160.96	16
Рактопамин-d6	1.985	308.10	168.05	16
Салбутамол (албутерол)-d9	1.290	249.08	148.59	20
Зилпатерол-d7	1.225	269.08	185.15	24
Тербуталин-d9	1.245	235.07	152.83	16

*PВ – ретенционо време; ** - енергија на колизија

Масените спектри од β -агонистите, од кои може да се видат јоните добиени со оптимизација на методот прикажани се во Прилог 1 од слика П-1 до слика П-10.

5.2 Линеарност на методот

5.2.1 Линеарност на методот за определување на β -агонисти во урина

Линеарноста на методот за определување на β -агонисти во урина е утврдена преку коефициентот на корелација добиен од конструирање на калибрациона крива во 6 точки од стандардни раствори во матрикс урина и стандардни раствори во мобилна фаза. Добиените податоци од двете калибрации за коефициентот на корелација како и равенката на калибрационата крива се дадени во Табела 19. Коефициентот на корелација изнесуваше од 0.985214 до 1.0 кај калибрацијата во матрикс, односно од 0.980204 до 0.997625 при конструирање на калибрационата крива од стандардни раствори во мобилна фаза. Калибрационите криви за сите β -агонисти се прикажани во Прилог 2а од слика П-11 до слика П-20.

Табела 19. Линеарност на методот за определување на β -агонисти во урина

β -агонисти	Калибрација во матрикс		Калибрација во мобилна фаза	
	Равенка	r^2	Равенка	r^2
Кленбутерол	1.62733x-0.053615	0.985214	1.58049x-0.761311	0.980204
Бромбутерол	1.42236x-0.012734	0.993479	1.038x-0.049946	0.995347
Мабутерол	1.29588x-0.003821	0.996597	1.32932x-0.11432	0.991890
Кленпентерол	1.83784x-0.000404	0.994935	1.71096x-0.06629	0.994573
Изоксуприн	2202.93x-46.9075	0.995103	1030.46-620.697	0.993244
Цимбутерол	1.11307x-0.00185	0.995858	1.44594x-1.09512	0.983342
Рактопамин	2623.64x-130.861	0.991147	441.11x-185.986	0.986733
Салбутамол	1x+1.11022e-016	1.000000	3.241155x-6.81913	0.994999
Зилпатерол	1148.45x-131.574	0.999523	2.13406x-7.65507	0.997625
Тербуталин	6115.2x-249.502	0.992348	1.06747x-1.36298	0.993518

5.2.2 Линеарност за методот за определување на β -агонисти во мускул

Во Табелата 20 прикажани се податоците за линеарност на методот за детекција на β -агонисти во мускул добиени со конструирање на калибрациона крива во 6 точки од стандардни раствори во матрикс мускул и стандардни раствори во мобилна фаза. Коефициентот на корелација се движеше во границите од 0.980204 до 0.998869 кај калибрационата крива во матрикс, додека кај калибрационата крива во мобилна фаза се движеше во границите од 0.981459 до 0.997686. Калибрационите криви за сите β -агонисти се прикажани во Прилог 2а од слика П-21 до слика П-30.

Табела 20. Линеарност на методот за определување на β -агонисти во мускул

β -агонистите	Калибрација во матрикс		Калибрација во мобилна фаза	
	Равенка	r^2	Равенка	r^2
Кленбутерол	37.0543x-0.375923	0.986696	0.660312X+0.17711	0.990882
Бромбутерол	63.3401x+0.479066	0.988598	1.20237X+0.305055	0.992602
Мабутерол	21.1764x-0.725245	0.998869	0.937332x+0.10605	0.993805
Кленпентерол	78.5469x+1.46173	0.994522	1.65565x+3.20641	0.987943
Изоксуприн	3528.95x+310.913	0.996212	150.312x+101.803	0.993234
Цимбутерол	54.897x-15.9381	0.981604	0.889435x-9.03619	0.992751
Рактопамин	2930.31x-853.887	0.980204	117.836X-297.277	0.990513
Салбутамол	871.939x-114.239	0.982904	176.997x+33.3223	0.981459
Зилпатерол	193.568x-62.9898	0.988118	2.39765-20.9735	0.997189
Тербуталин	165.286x-26.023	0.981765	1.60231x+22.5534	0.997686

5.2.3 Линеарност за методот за определување на β -агонисти во црн дроб

Од Табела 21 може да се забележи дека коефициентот на корелација се движи во граница од 0.985002 до 0.999179 во калибрација во матрикс, односно во калибрацијата во мобилна фаза се движи во граница од 0.986231 до 0.999681. Покрај коефициентот на корелација во Табела 21 дадени се и равенките на калибрационите криви. Калибрационите криви за сите β -агонисти се прикажани во Прилог 2а од слика П-31 до слика П-40.

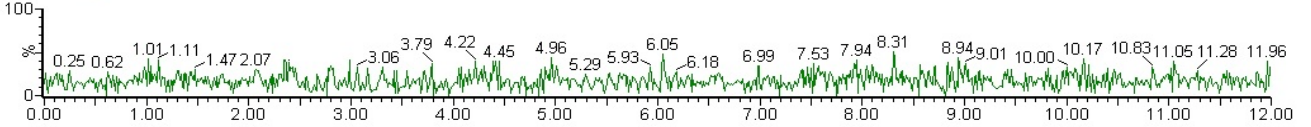
Табела 21. Линеарност на методот за определување на β -агонисти во црн дроб

β -агонистите	Калибрација во матрикс		Калибрација во мобилна фаза	
	Равенка	r^2	Равенка	r^2
Кленбутерол	$0.829287x-0.01627$	0.992187	$0.821437x-2.5213$	0.987473
Бромбутерол	$1.86018x-0.118837$	0.987390	$1.5678x-0.296973$	0.996060
Мабутерол	$1.47784x-0.015978$	0.999179	$1.44014x-1.01492$	0.999345
Кленпентерол	$2.07884x+0.041985$	0.989070	$2.09219x-1.71612$	0.999681
Изоксуприн	$2270.07x-89.6843$	0.990718	$207.297x+1175.1$	0.988776
Цимбутерол	$1.77519x+0.003824$	0.985947	$1.57052x-2.52981$	0.988365
Рактопамин	$2762.7x-72.2934$	0.992194	$225.451x-139.855$	0.991306
Салбутамол	$1208.24x-87.6185$	0.985002	$228.146x-404.32$	0.987889
Зилпатерол	$1.69813x+0.292062$	0.990243	$0.338261x+1.76738$	0.988364
Тербуталин	$1..28659x-0.05528$	0.988589	$1.39831x-1.29874$	0.986231

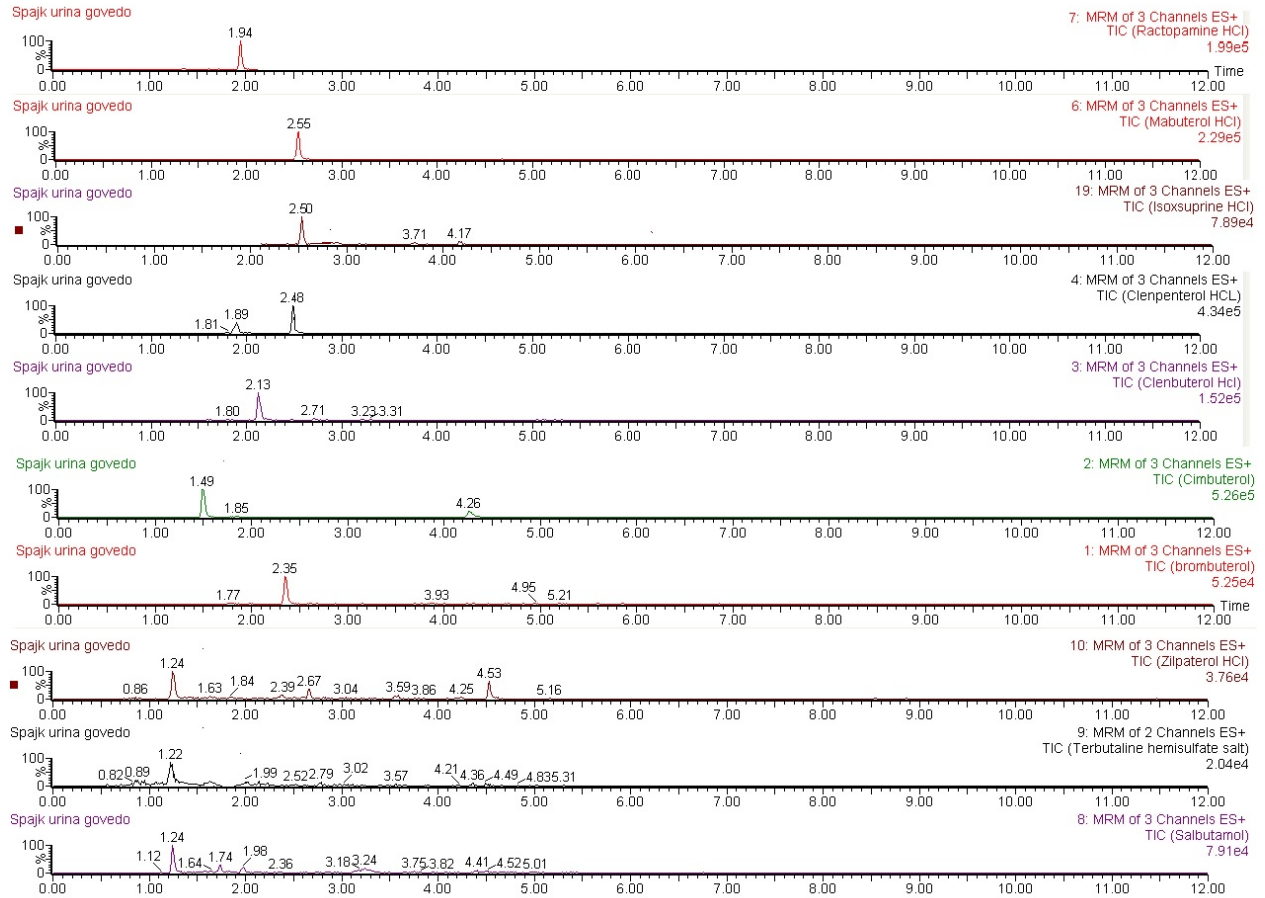
5.3 Специфичност и селективноста на методот

Специфичноста и селективноста на методот за определување на β -агонисти се прикажани на Сликите 11, 12, 13, 14, 15 и 16 каде што се дадени хроматограмите од негативни примероци на урина, мускул и црн дроб, како и збогатени примероци од претходно наведените матрикси. Од хроматограмите прикажани на Сликите 11 и 12 може да се заклучи дека пиковите за сите β -агонисти во урината се добро раздвоени и не се преклопуваат. Истото може да се заклучи и за матриксот мускул, што може да се потврди од хроматограмите на Сликите 13 и 14. На Сликите 15 и 16 пак прикажани се негативен примерок црн дроб и збогатен примерок на црн дроб со β -агонисти од што може да се заклучи дека нема преклопување на пиковите од една страна, а од друга страна развојувањето на пиковите за сите β -агонисти е добро.

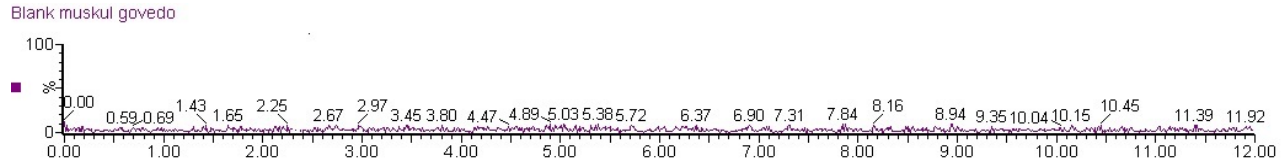
Blank urina-govedo



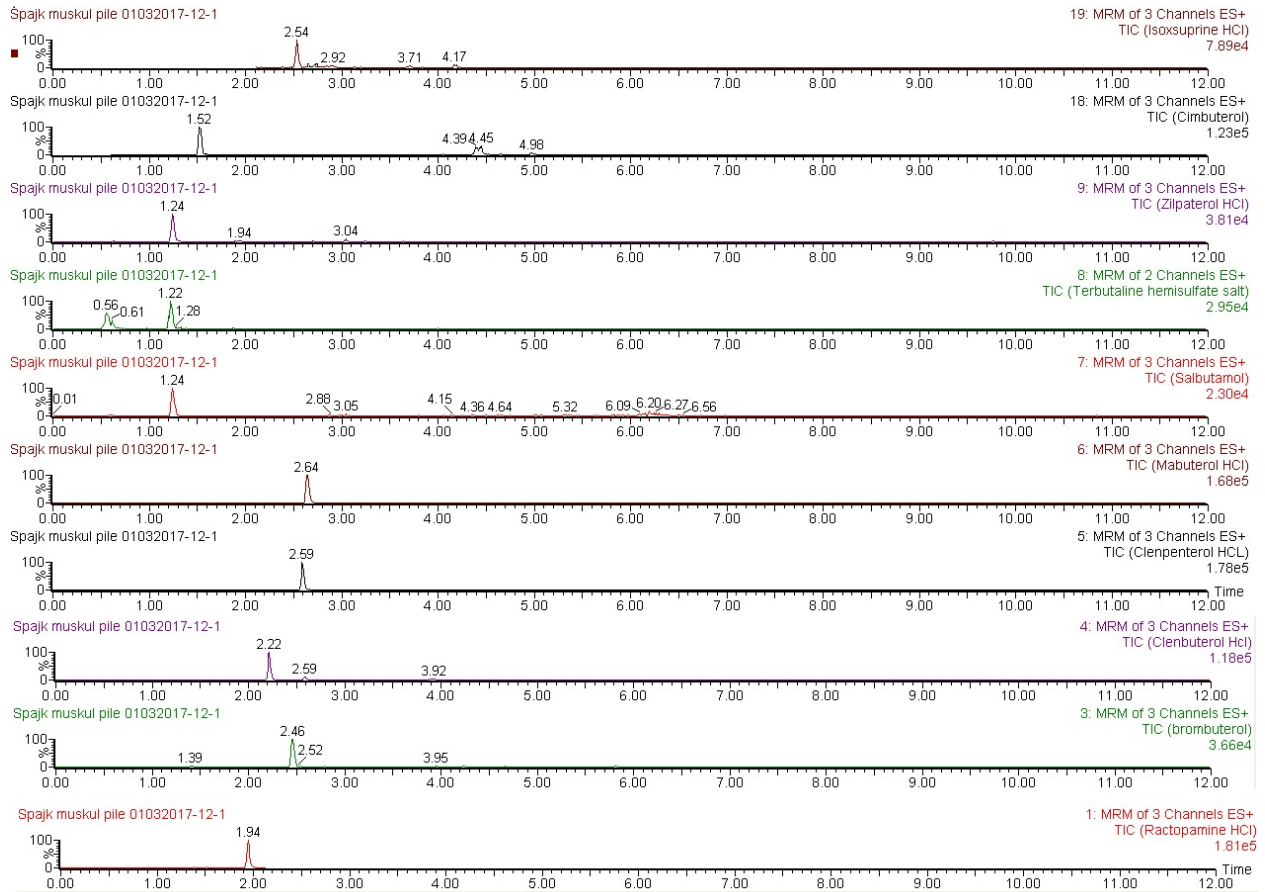
Слика 11. Хроматограм од негативна урина



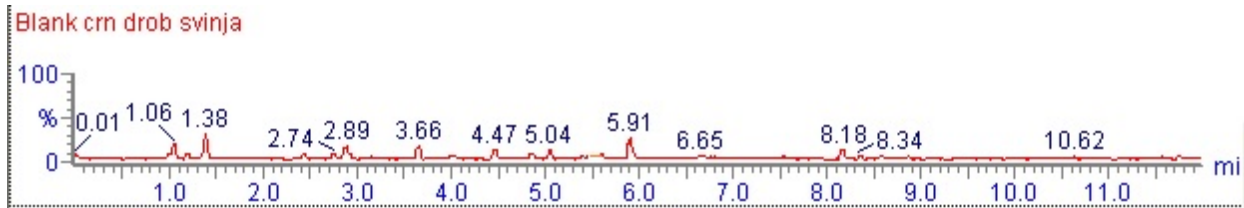
Слика 12. Хроматограми од урина збогатена со β -агонисти



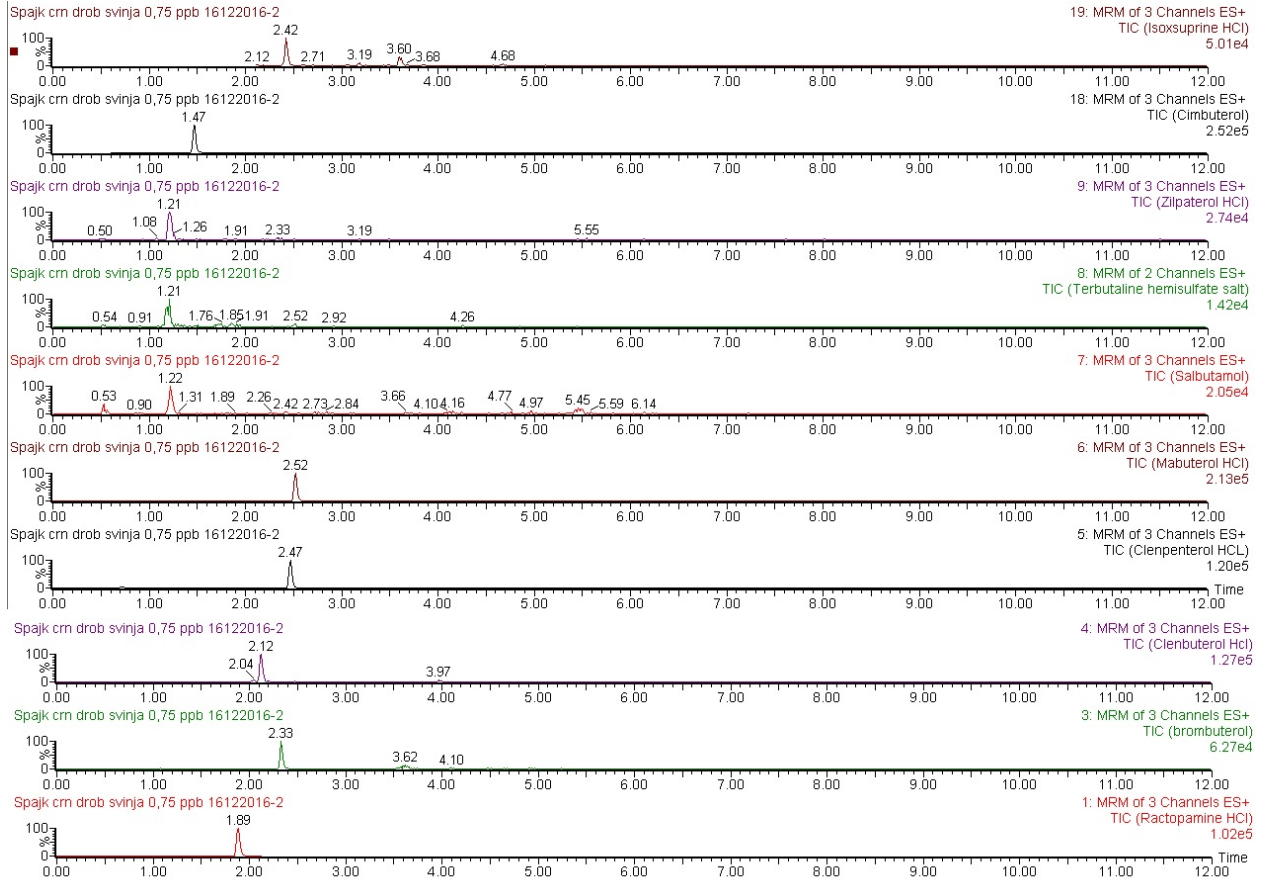
Слика 13. Хроматограм од негативен мускул



Слика 14. Хроматограми од мускул збогатени со β -агонисти



Слика 15. Хроматограм од негативен црн дроб



Слика 16. Хроматограми од црн дроб збогатени со β -агонисти

5.4 Определување на ССа и СС β

5.4.1 Определување на ССа и СС β во урина

Определените вредности за ССа и СС β во урина се прикажани во Табела 22. Вредностите за ССа беа во опсег од 0.127 до 0.646 ng/ml, додека вредностите за СС β беа во опсег од 0.140 до 0.739 ng/ml. Од резултатите во табелата може да се забележи дека добиените вредности за ССа и СС β се под препорачаните концентрации на кои што треба

да се валидираат методите за определување на β -агонистите, од што може да се заклучи дека во однос на овие параметри методот е соодветен за намената.

Табела 22. Резултати за ССа и СС β во урина

Матрикс	Урина		
	ССа (ng/ml)	СС β (ng/ml)	Препорачани концентрации (ng/ml)
Кленбутерол	0.158	0.188	0.2
Бромбутерол	0.144	0.170	0.2
Мабутерол	0.127	0.140	0.2
Кленпентерол	0.299	0.329	0.5
Изоксуприн	0.290	0.320	0.5
Цимбутерол	0.259	0.282	0.5
Рактопамин	0.577	0.619	1.0
Салбутамол	0.584	0.657	1.0
Зилпатерол	0.646	0.739	1.0
Тербуталин	0.565	0.702	3.0

5.4.2 Определување на ССа и СС β во мускул

Од Табелата 23 може да се забележи дека вредностите за ССа и СС β во мускул се движат од 0.067 до 1.083 ng/g, односно од 0.083 до 1.398 ng/g, соодветно, од што можеме да заклучиме дека истите се во опсег под пропишаните концентрации на кои што треба да се валидираат методите за определување на овие супстанции. Резултатите за ССа и СС β во мускул за сите β -агонисти се прикажани во Табела 23.

Табела 23. Резултати за ССа и СС β во мускул

Матрикс	Мускул		
	ССа (ng/g)	СС β (ng/g)	Препорачани концентрации (ng/g)
Кленбутерол	0.068	0.083	0.1 MRL
Бромбутерол	0.070	0.096	0.1
Мабутерол	0.067	0.091	0.1
Кленпентерол	0.298	0.421	0.5
Изоксуприн	0.313	0.422	0.5
Цимбутерол	0.300	0.413	0.5
Рактопамин	0.192	0.264	1.0
Салбутамол	1.083	1.398	5.0
Зилпатерол	0.677	0.945	5.0
Тербуталин	0.840	1.111	10.0

5.4.3 Определување на ССа и СС β во црн дроб

Вредностите за ССа во црн дроб се во опсег од 0.100 до 0.315 ng/g, додека вредностите за СС β се во опсег од 0.115 до 0.344 ng/g и истите се пониски од препорачаните концентрации за валидација на β -агонистите. Во Табелата 24 прикажани се поединечно резултатите за ССа и СС β во црн дроб за сите β -агонисти вклучени во оваа истражување.

Табела 24. Резултати за ССа и СС β во црн дроб

Матрикс	Црн дроб		
	ССа (ng/g)	СС β (ng/g)	Препорачани концентрации (ng/g)
β -агонист			
Кленбутерол	0.133	0.161	0.5 MRL
Бромбутерол	0.134	0.163	0.2
Мабутерол	0.151	0.181	0.2
Кленпентерол	0.176	0.215	0.5
Изоксуприн	0.315	0.344	0.5
Цимбутерол	0.167	0.207	0.5
Рактопамин	0.151	0.186	1.0
Салбутамол	0.100	0.115	5.0
Зилпатерол	0.151	0.192	5.0
Тербуталин	0.222	0.288	10.0

5.5 Точност на методот

5.5.1 Точност на методот за матрикс урина

Точноста на методот е определена преку аналитичкиот принос, со збогатување на примероците урина на 3 концентрациски нивоа. Аналитичкиот принос за урина се движи во граници од 70.06 до 118.80 %. Деталните резултати за аналитичкиот принос за сите β -агонисти, на 3 концентрациски нивоа се дадени во Табела 25. Хроматограмите со збогатените примероци од урина со стандарди β -агонисти, како и негативен примерок урина се прикажани во Прилог 3а, од слика П-41 до П-44.

Табела 25. Точност за методот за урина

β -агонист	Добиена вредност (ng/ml)	Додадена вредност (ng/ml)	Аналитички принос (%)
Кленбутерол	0.206	0.2	103.00
	0.292	0.3	97.33
	0.370	0.4	92.50
Бромбутерол	0.213	0.2	106.50
	0.305	0.3	101.67
	0.470	0.4	117.5
Мабутерол	0.198	0.2	99.00
	0.277	0.3	92.33
	0.365	0.4	91.25
Кленпентерол	0.474	0.5	94.80
	0.623	0.75	83.07
	1.188	1.0	118.80
Изоксуприн	0.385	0.5	77.00
	0.558	0.75	74.40
	0.993	1.0	99.30
Цимбутерол	0.503	0.5	100.60
	0.739	0.75	98.53
	1.122	1.0	112.2
Рактопамин	0.872	1.0	87.20
	1.321	1.5	88.07
	1.929	2.0	96.45
Салбутамол	0.849	1.0	84.90
	1.105	1.5	73.67
	1.815	2.0	90.75
Зилпатерол	0.712	1.0	71.20
	1.051	1.5	70.06
	1.782	2.0	89.10
Тербуталин	0.953	1.0	95.30
	1.490	1.5	99.33
	2.037	2.0	101.85

5.5.2 Точност на методот за матрикс мускул

Резултатите за точноста на методот за матрикс мускул се прикажани во Табела 26, од каде што можеме да утврдиме дека аналитичкиот принос се движи во граници од 76.00 до 116.20 %. Хроматограмите со збогатените примероци од мускули со стандарди β -агонисти, како и негативен примерок се прикажани во Прилог 36, од слика П-45 до П-49.

Табела 26. Точност за методот за мускул

β -агонист	Добиена вредност (ng/g)	Додадена вредност (ng/g)	Аналитички принос (%)
Кленбутерол	0.052	0.05	104.00
	0.263	0.25	105.20
	0.511	0.50	102.20
Бромбутерол	0.038	0.05	75.64
	0.220	0.25	92.01
	0.477	0.50	95.34
Мабутерол	0.038	0.05	76.00
	0.230	0.25	92.00
	0.477	0.50	95.40
Кленпентерол	0.175	0.2	87.50
	0.469	0.5	93.80
	0.716	0.75	95.47
Изоксуприн	0.177	0.2	88.50
	0.532	0.5	106.40
	0.765	0.75	102.00
Цимбутерол	0.177	0.2	95.47
	0.497	0.5	99.40
	0.709	0.75	94.53
Рактопамин	0.193	0.2	96.50
	0.522	0.5	104.40
	0.772	0.75	102.93
Салбутамол	0.540	0.5	108.00
	0.712	0.75	94.93
	0.836	1.0	86.60
Зилпатерол	0.407	0.5	81.40
	0.742	0.75	98.93
	0.911	1.0	91.10
Тербуталин	0.581	0.5	116.20
	0.699	0.75	93.20
	0.774	1.0	77.40

5.5.3 Точност за методот за матрикс црн дроб

Во Табела 27 прикажани се резултатите за точност на методот за црн дроб. Аналитичкиот принос изнесува од 75.20 % до 107.07 %. Во Прилог 3в, од слика П-49 до П-

52 прикажани се хроматограмите од збогатените примероци црн дроб со стандарди β -агонисти, како и негативен примерок црн дроб.

Табела 27. Точност за методот за црн дроб

β -агонист	Добиена вредност (ng/g)	Додадена вредност (ng/g)	Аналитички принос (%)
Кленбутерол	0.266	0.25	106.4
	0.547	0.5	109.4
	0.757	0.75	100.9
Бромбутерол	0.230	0.25	92.00
	0.412	0.5	82.40
	0.666	0.75	88.80
Мабутерол	0.230	0.25	92.0
	0.440	0.5	88.0
	0.684	0.75	91.2
Кленпентерол	0.245	0.25	98.0
	0.485	0.5	97.0
	0.763	0.75	101.73
Изоксуприн	0.244	0.25	97.6
	0.504	0.5	100.80
	0.692	0.75	92.27
Цимбутерол	0.227	0.25	90.80
	0.468	0.5	93.60
	0.703	0.75	93.73
Рактопамин	0.251	0.25	100.40
	0.512	0.5	102.4
	0.800	0.75	106.67
Салбутамола	0.189	0.25	75.60
	0.376	0.5	75.20
	0.701	0.75	93.47
Зилпатерол	0.248	0.25	99.20
	0.432	0.5	86.40
	0.687	0.75	95.41
Тербуталин	0.242	0.25	96.80
	0.509	0.5	101.80
	0.803	0.75	107.07

5.6 Прецизност на методот

5.6.1 Прецизност на методот за матрикс урина

Добиените резултати за прецизноста на методот за матриксот урина во два различни дена се прикажани во Табела 28. Прецизноста на методите се изразува преку коефициентот на варијација (CV, %). Од добиените резултати може да се заклучи дека коефициентот на варијација (CV, %) за повторливоста на методот се движи во граница од 1.619 % до 15.472 % првиот ден, додека вториот ден коефициентот на варијација се движи во граница од 2.695 % до 10.441 %. Коефициентот на варијација за репродуцибилноста (CV_R, %) на методот се движи во граница од 3.750 % до 16.225 %. Хроматограмите од збогатените примероци урина со стандарди β -агонисти, како и негативен примерок урина прикажани се во Прилог 2а, од слика П-31 до П-34.

Табела 28. Прецизност на методот за матрикс урина

β -агонист	Кленбутерол					
Ниво на збогатување	0.2 ng/ml		0.3 ng/ml		0.4 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.206	0.176	0.292	0.231	0.370	0.363
SD ng/ml	0.007	0.013	0.037	0.012	0.036	0.017
CV %	3.225	7.545	12.513	5.208	9.791	4.730
CV _R %	8.205		13.550		10.873	
β -агонист	Бромбутерол					
Ниво на збогатување	0.2 ng/ml		0.3 ng/ml		0.4 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.213	0.205	0.305	0.307	0.470	0.458
SD ng/ml	0.025	0.016	0.025	0.014	0.046	0.027
CV %	11.764	7.966	11.764	4.471	9.831	5.888
CV _R %	14.207		12.584		11.459	

Табела 28. Прецизност на методот за матрикс урина - продолжение

β -агонист	Мабутерол					
Ниво на збогатување	0.2 ng/ml		0.3 ng/ml		0.4 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.198	0.162	0.277	0.249	0.365	0.450
SD ng/ml	0.015	0.009	0.011	0.018	0.042	0.020
CV %	7.591	5.592	3.957	7.301	11.610	4.467
CV _R %	9.428		8.304		12.440	
β -агонист	Кленпентерол					
Ниво на збогатување	0.5 ng/ml		0.75 ng/ml		1.0 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.474	0.471	0.623	0.713	1.188	1.184
SD ng/ml	0.036	0.029	0.014	0.030	0.056	0.038
CV %	7.671	6.051	2.184	4.248	4.714	3.217
CV _R %	9.841		4.777		5.707	
β -агонист	Изоксуприн					
Ниво на збогатување	0.5 ng/ml		0.75 ng/ml		1.0 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.385	0.410	0.558	0.606	0.993	0.972
SD ng/ml	0.028	0.011	0.042	0.021	0.040	0.065
CV %	7.365	2.695	7.596	3.477	4.038	6.715
CV _R %	7.843		8.354		7.836	
β -агонист	Цимбутерол					
Ниво на збогатување	0.5 ng/ml		0.75 ng/ml		1.0 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.503	0.458	0.739	0.666	1.122	1.052
SD ng/ml	0.036	0.019	0.036	0.029	0.097	0.041
CV %	7.154	4.163	4.924	4.345	8.638	3.889
CV _R %	8.277		6.109		9.473	

Табела 28. Прецизност на методот за матрикс урина - продолжение

β -агонист	Рактопамин					
Ниво на збогатување	1.00 ng/ml		1.50 ng/ml		2.00 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.872	0.853	1.321	1.317	1.929	1.810
SD ng/ml	0.014	0.029	0.055	0.043	0.062	0.094
CV %	1.619	3.383	4.148	3.235	3.235	5.200
CV _R %	3.750		5.260		6.124	
β -агонист	Зилпаторол					
Ниво на збогатување	1.00 ng/ml		1.50 ng/ml		2.00 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.712	0.976	1.051	1.487	1.782	2.060
SD ng/ml	0.026	0.085	0.061	0.085	0.202	0.113
CV %	3.648	8.756	5.828	5.734	11.319	5.467
CV _R %	9.486		8.176		12.570	
β -агонист	Салбутамол					
Ниво на збогатување	1.00 ng/ml		1.50 ng/ml		2.00 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.649	0.873	1.105	1.275	1.815	1.998
SD ng/ml	0.055	0.046	0.063	0.125	0.281	0.100
CV %	8.402	5.296	5.676	9.789	15.472	4.985
CV _R %	9.932		11.316		16.225	
β -агонист	Тербуталин					
Ниво на збогатување	1.00 ng/ml		1.50 ng/ml		2.00 ng/ml	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/ml n=6	0.953	1.091	1.490	1.597	2.037	2.168
SD ng/ml	0.089	0.107	0.113	0.096	0.223	0.226
CV %	9.316	9.770	7.613	6.043	10.949	10.441
CV _R %	13.500		9.720		15.129	

5.6.2 Прецизност на методот за матрикс мускул

Добиените резултати за прецизноста на методот во два различни дена се прикажани во Табела 29. Коefициентот на варијација (CV, %) за повторливоста на методот во првиот ден се движи во опсег од 1.280 % до 25.931 %, додека во вториот ден се движи во опсег од 4.816 % до 22.130 %. Коefициентот на варијација за репродуцибилноста (CV_R, %) на методот се движи во граница од 5.310 % до 28.174 %. Хроматограмите од збогатените примероци од мускули со стандарди β -агонисти, како и негативен примерок се прикажани во Прилог 2б, од слика П-35 до П-39.

Табела 29. Прецизност на методот за матрикс мускул

β -агонист	Кленбутерол					
Ниво на збогатување	0.05 ng/g		0.25 ng/g		0.50 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност n=6	0.052	0.042	0.263	0.223	0.511	0.504
SD ng/g	0.003	0.007	0.011	0.012	0.074	0.039
CV %	5.547	15.533	4.279	5.577	14.057	7.749
CV _R %	16.494		7.029		16.051	
β -агонист	Бромбутерол					
Ниво на збогатување	0.05 ng/g		0.25 ng/g		0.50 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност n=6	0.038	0.046	0.220	0.225	0.477	0.483
SD ng/g	0.005	0.005	0.009	0.026	0.047	0.031
CV %	13.228	11.837	4.179	11.784	9.962	6.356
CV _R %	17.751		12.503		11.817	
β -агонист	Мабутерол					
Ниво на збогатување	0.05 ng/g		0.25 ng/g		0.50 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.038	0.046	0.230	0.241	0.477	0.501

Табела 29. Прецизност на методот за матрикс мускул - продолжение

SD ng/g	0.002	0.004	0.008	0.012	0.039	0.032
CV %	4.736	9.128	3.376	4.816	8.238	6.318
CV _R %	10.283		5.881		10.382	
β -агонист	Кленпентерол					
Ниво на збогатување	0.20 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.175	0.188	0.469	0.457	0.716	0.703
SD ng/g	0.033	0.037	0.024	0.025	0.010	0.065
CV %	18.788	19.728	5.242	5.438	1.370	9.266
CV _R %	27.243		7.553		9.367	
β -агонист	Изоксуприн					
Ниво на збогатување	0.20 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.177	0.214	0.532	0.513	0.765	0.736
SD ng/g	0.046	0.024	0.024	0.050	0.039	0.050
CV %	25.931	11.016	4.513	9.670	5.083	6.832
CV _R %	28.174		10.671		8.518	
β -агонист	Цимбутерол					
Ниво на збогатување	0.20 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.177	0.158	0.497	0.450	0.709	0.747
SD ng/g	0.02	0.02	0.05	0.05	0.08	0.10
CV %	9.890	12.570	10.27	10.350	11.330	13.510
CV _R %	15.994		14.580		17.632	
β -агонист	Рактопамин					
Ниво на збогатување	0.20 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2

Табела 29. Прецизност на методот за матрикс мускул - продолжение

Средна вредност ng/g n=6	0.193	0.197	0.522	0.505	0.772	0.778
SD ng/g	0.012	0.019	0.053	0.029	0.051	0.055
CV %	6.337	9.393	10.135	5.726	6.572	7.125
CV _R %	11.331		11.641		9.693	
β -агонист	Зилпатерол					
Ниво на збогатување	0.50 ng/g		0.75 ng/g		1.00 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.407	0.436	0.742	0.689	0.911	0.961
SD ng/g	0.042	0.065	0.067	0.096	0.078	0.141
CV %	10.325	15.314	8.995	13.881	8.568	14.687
CV _R %	18.770		16.541		17.003	
β -агонист	Салбутамол					
Ниво на збогатување	0.50 ng/g		0.75 ng/g		1.00 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.540	0.537	0.696	0.650	0.945	1.007
SD ng/g	0.063	0.048	0.154	0.138	0.142	0.140
CV %	11.660	8.997	22.130	11.271	15.030	13.916
CV _R %	14.728		24.834		20.483	
β -агонист	Тербуталин					
Ниво на збогатување	0.50 ng/g		0.75 ng/g		1.00 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.581	0.547	0.699	0.709	0.774	0.918
SD ng/g	0.010	0.028	0.120	0.118	0.050	0.147
CV %	1.280	5.162	16.830	16.578	6.100	15.965
CV _R %	5.310		23.624		17.091	

5.6.3 Прецизност на методот за матрикс црн дроб

Добиените резултати за прецизноста на методот во два различни дена се прикажани во Табела 30. Во првиот ден коефициентот на варијација за повторливоста на методот (CV, %) се движи во границите од 3.430 % до 15.565 %, додека во вториот ден истиот изнесува од 5.231 % до 17.082 %. Коефициентот на варијација за репродуцибилноста (CV_R, %) на методот се движи во граница од 7.257 % до 22.443%. Во Прилог 2в, од слика П-39 до П-42 прикажани се хроматограмите од збогатените примероци црн дроб со стандарди β -агонисти, како и негативен примерок црн дроб.

Табела 30. Прецизност на методот за матрикс црн дроб

β -агонист	Кленбутерол					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност n=6	0.266	0.209	0.547	0.407	0.757	0.634
SD ng/g	0.022	0.026	0.047	0.049	0.089	0.108
CV %	8.410	12.582	8.647	12.121	11.707	17.082
CV _R %	15.134		14.889		20.709	
β -агонист	Бромбутерол					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност n=6	0.230	0.252	0.412	0.426	0.666	0.699
SD ng/g	0.020	0.021	0.043	0.045	0.054	0.055
CV %	8.755	8.391	10.438	10.636	8.046	7.943
CV _R %	12.127		14.902		11.306	
β -агонист	Мабутерол					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.230	0.249	0.440	0.490	0.685	0.738
SD ng/g	0.020	0.019	0.035	0.029	0.041	0.039
CV %	8.696	7.825	8.055	6.015	6.061	5.231
CV _R %	11.698		10.053		8.006	

Табела 30. Прецизност на методот за матрикс црн дроб - продолжение

β -агонист	Кленпентерол					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.245	0.250	0.485	0.501	0.763	0.763
SD ng/g	0.018	0.023	0.048	0.035	0.026	0.049
CV %	7.338	9.020	9.959	6.972	3.430	6.395
CV _R %	11.628		12.157		7.257	
β -агонист	Изоксуприн					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.244	0.232	0.504	0.466	0.692	0.611
SD ng/g	0.038	0.038	0.038	0.055	0.053	0.102
CV %	15.372	16.352	7.524	11.779	7.650	16.627
CV _R %	22.443		13.975		18.302	
β -агонист	Цимбутерол					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.227	0.236	0.468	0.492	0.703	0.723
SD ng/g	0.022	0.022	0.032	0.043	0.050	0.080
CV %	9.883	9.407	6.767	8.833	7.102	11.024
CV _R %	13.644		11.127		13.114	
β -агонист	Рактопамин					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.251	0.233	0.512	0.439	0.800	0.752
SD ng/g	0.032	0.014	0.042	0.046	0.052	0.089
CV %	12.856	5.792	8.240	10.554	6.530	11.849
CV _R %	14.100		13.390		13.529	

Табела 30. Прецизност на методот за матрикс црн дроб - продолжение

β -агонист	Зилпатерол					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.248	0.276	0.432	0.455	0.687	0.673
SD ng/g	0.035	0.017	0.053	0.028	0.090	0.070
CV %	14.059	6.153	12.172	6.229	13.130	10.401
CV _R %	15.346		13.673		16.884	
β -агонист	Салбутамол					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.189	0.257	0.376	0.468	0.701	0.724
SD ng/g	0.024	0.027	0.055	0.075	0.109	0.110
CV %	12.835	10.336	14.667	16.094	15.565	15.128
CV _R %	16.479		16.543		21.705	
β -агонист	Тербуталин					
Ниво на збогатување	0.25 ng/g		0.50 ng/g		0.75 ng/g	
параметри	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2	Ден 1	Ден 2
Средна вредност ng/g n=6	0.264	0.269	0.532	0.515	0.803	0.794
SD ng/g	0.026	0.035	0.032	0.079	0.105	0.116
CV %	9.868	13.125	5.938	15.410	13.035	14.653
CV _R %	16.421		16.514		19.612	

5.7 Споредба на ефикасноста на два типа колони за цврсто-фазна екстракција преку параметрите прецизност и точност

5.7.1 Споредба на параметрите прецизност и точност од два типа колони за цврсто-фазна екстракција кај матрикс урина

Резултатите за прецизноста и точноста на двата типа колони за цврсто-фазна екстракција се прикажани во Табела 31.

Табела 31. Точност и прецизност на два типа колони кај матрикс урина

β -агонист	Додалена вредност (ng/ml)	Discovery® DSC-MCAX, 300 mg, 6 ml			Bond Elut-Certify, 500 mg, 6 ml		
		Добиена вредност (ng/ml)	Аналитички принос (%)	CV (%)	Добиена вредност (ng/ml)	Аналитички принос (%)	CV (%)
Кленбутерол	0.2	0.206	103.00	3.225	0.174	87.00	15.341
	0.3	0.292	97.33	12.513	0.285	94.93	18.773
	0.4	0.370	92.50	9.791	0.446	111.50	14.786
Бромбутерол	0.2	0.213	106.50	11.764	0.189	94.50	13.259
	0.3	0.305	101.67	11.764	0.286	95.28	10.587
	0.4	0.470	117.50	9.831	0.400	100.00	8.902
Мабутерол	0.2	0.198	99.00	7.591	0.203	101.64	13.103
	0.3	0.277	92.33	3.957	0.311	103.71	14.869
	0.4	0.365	91.25	11.610	0.436	109.014	3.646
Кленпентерол	0.5	0.474	94.80	7.671	0.537	107.38	6.014
	0.75	0.623	83.07	2.184	0.801	106.74	9.124
	1.0	1.188	118.80	4.714	1.133	113.24	10.913
Изоксуприн	0.5	0.385	77.00	7.365	0.353	70.58	13.380
	0.75	0.558	74.40	7.596	0.574	76.49	12.039
	1.0	0.993	99.30	4.038	0.758	75.82	10.974
Цимбутерол	0.5	0.503	100.60	7.154	0.386	77.18	5.130
	0.75	0.739	98.53	4.924	0.587	78.204	8.110
	1.0	1.122	112.20	8.638	0.836	83.63	13.153
Рактопамин	1.0	0.872	87.20	1.619	0.994	99.38	9.791
	1.5	1.321	88.07	4.148	1.457	97.13	5.751
	2.0	1.929	96.45	3.235	2.017	100.87	9.601
Салбутамол	1.0	0.849	84.90	8.402	1.082	108.18	14.274
	1.5	1.105	73.67	5.676	1.607	107.15	14.744
	2.0	1.815	90.75	15.472	2.094	104.74	18.066
Зилпатерол	1.0	0.712	71.20	3.648	0.760	76.00	6.031
	1.5	1.051	70.06	5.828	1.117	74.47	5.772
	2.0	1.782	89.10	11.319	1.848	92.40	13.547
Тербуталин	1.0	0.953	95.30	9.316	1.059	105.91	19.288
	1.5	1.490	99.33	7.613	1.614	107.98	8.544
	2.0	2.037	101.85	10.949	2.091	104.57	15.342

Аналитичкиот принос кај DSC-MCAX колоните се движи од 70.06 % до 118.80 %, а кај Bond Elut-Certify од 70.58 % до 113.24 %, додека коефициентот на варијација се движи

во граници од 1.619 % до 15.472 % кај DSC-MCAX колоните, додека кај колоните Bond Elut-Certify коефициентот на варијација се движи во граници од 3.646 % до 19.288 %.

5.7.2 Споредба на параметрите прецизност и точност од два типа колони за цврстофазна екстракција кај матрикс мускул

Резултатите за прецизноста и точноста на двата типа колони за цврсто-фазна екстракција се прикажани во Табела 32.

Табела 32. Точност и прецизност на два типа колони кај матрикс мускул

β -агонист	Додадена вредност (ng/g)	Discovery® DSC-MCAX, 300 mg, 6 ml			Bond Elut-Certify, 500 mg, 6 ml		
		Добиена вредност (ng/g)	Аналитички принос (%)	CV (%)	Добиена вредност (ng/g)	Аналитички принос (%)	CV (%)
Кленбутерол	0.05	0.052	104.00	5.547	0.045	90.00	11.694
	0.25	0.263	105.20	4.279	0.229	91.54	10.371
	0.50	0.511	102.20	14.057	0.461	92.10	11.214
Бромбутерол	0.05	0.038	76.00	13.228	0.052	104.00	12.531
	0.25	0.220	88.00	4.179	0.232	92.75	12.428
	0.50	0.477	95.40	9.962	0.490	97.94	9.920
Мабутерол	0.05	0.038	75.64	4.736	0.040	79.75	17.540
	0.25	0.230	92.01	3.376	0.234	93.71	8.219
	0.50	0.477	95.34	8.238	0.478	95.63	9.668
Кленпентерол	0.2	0.175	87.50	18.788	0.143	71.55	9.461
	0.5	0.469	93.80	5.242	0.413	82.62	9.169
	0.75	0.716	95.47	1.370	0.702	93.59	1.165
Изоксуприн	0.2	0.177	88.50	25.934	0.187	93.46	9.046
	0.5	0.532	106.40	4.513	0.543	108.50	8.070
	0.75	0.765	102.00	5.083	0.697	92.96	10.963
Цимбутерол	0.2	0.177	95.47	9.890	0.167	83.89	7.944
	0.5	0.497	99.40	10.270	0.464	92.77	8.104
	0.75	0.709	94.53	11.330	0.696	92.83	8.803
Рактопамин	0.2	0.193	96.50	6.337	0.170	85.14	2.336
	0.5	0.522	104.40	10.135	0.479	92.82	1.099
	0.75	0.772	102.93	6.570	0.725	96.61	1.444
Салбутамол	0.5	0.540	108.00	11.660	0.480	95.95	7.691
	0.75	0.712	94.93	22.136	0.766	102.07	4.460
	1.0	0.836	86.60	15.032	1.032	103.19	12.063
Зилпатерол	0.5	0.407	81.40	10.325	0.467	93.40	10.574
	0.75	0.742	98.93	8.995	0.692	92.27	9.946
	1.0	0.911	91.10	8.568	0.837	83.70	10.638
Тербуталин	0.5	0.581	116.20	1.28	0.553	110.96	10.775
	0.75	0.699	93.20	16.83	0.708	94.45	11.476
	1.0	0.774	77.40	6.10	0.887	88.73	8.802

Аналитичкиот принос кај DSC-MCAX колоните се движи од 75.64 % до 116.20%, а кај Bond Elut-Certify од 71.55 % до 110.96 %, додека коефициентот на варијација се движи во граници од 1.370 % до 25.934 % кај DSC-MCAX колоните, додека кај колоните Bond Elut-Certify коефициентот на варијација се движи во граници од 1.099 % до 17.540 %.

5.7.3 Споредба на параметрите прецизност и точност од два типа колони за цврстофазна екстракција кај матрикс црн дроб

Резултатите за прецизноста и точноста на двата типа колони за цврсто-фазна екстракција се прикажани во Табела 33.

Табела 33. Точност и прецизност на два типа колони кај матрикс црн дроб

β -агонист	Додадена вредност (ng/g)	Discovery® DSC-MCAX, 300 mg, 6 ml			Strata Screen-C, 500 mg, 6 ml		
		Добиена вредност (ng/g)	Аналитички принос (%)	CV (%)	Добиена вредност (ng/g)	Аналитички принос (%)	CV (%)
Кленбутерол	0.25	0.266	106.4	8.410	0.323	129.0	27.950
	0.5	0.547	109.4	8.647	0.594	118.8	19.364
	0.75	0.757	100.9	11.707	0.980	130.61	4.564
Бромбутерол	0.25	0.230	92.00	8.755	0.251	100.32	33.077
	0.5	0.412	82.40	10.438	0.443	88.68	33.572
	0.75	0.666	88.80	8.046	0.651	86.75	13.206
Мабутерол	0.25	0.230	92.0	8.696	0.297	118.72	8.502
	0.5	0.440	88.0	8.055	0.501	100.2	6.549
	0.75	0.684	91.2	6.061	0.841	112.08	5.819
Кленпентерол	0.25	0.245	98.0	7.338	0.254	101.68	6.485
	0.5	0.485	97.0	9.959	0.494	98.8	12.587
	0.75	0.763	101.73	3.430	0.703	97.73	10.513
Изоксуприн	0.25	0.244	97.6	15.732	0.268	107.00	11.367
	0.5	0.504	100.80	7.524	0.461	92.15	5.865
	0.75	0.692	92.27	7.650	0.728	97.07	5.396
Цимбутерол	0.25	0.227	90.80	9.883	0.230	92.08	8.729
	0.5	0.468	93.60	6.767	0.404	80.84	10.649
	0.75	0.703	93.73	7.102	0.680	90.61	7.298
Рактопамин	0.25	0.251	100.40	12.856	0.289	115.92	14.610
	0.5	0.512	102.4	8.240	0.466	93.12	5.579
	0.75	0.800	106.67	6.530	0.614	81.92	1.576
Салбутамол	0.25	0.189	75.60	12.835	0.287	114.9	26.529
	0.5	0.376	75.20	14.667	0.500	100.0	22.688
	0.75	0.701	93.47	15.656	0.704	93.87	25.674
Зилпатерол	0.25	0.248	99.20	14.059	нд*	/	/
	0.5	0.432	86.40	12.172	нд*	/	/
	0.75	0.687	95.41	13.130	нд*	/	/
Тербуталин	0.25	0.242	96.80	9.868	0.612	244.80	12.455
	0.5	0.509	101.80	5.938	1.379	275.76	20.843
	0.75	0.803	107.07	13.035	0.801	106.73	4.071

*нд - не е детектиран

Аналитичкиот принос кај DSC-MCAX колоните се движи од 75.20 % до 109.4 %. Кај Strata Screen-C за некои β -агонисти може да се забележи повисок аналитички принос. Кај кленбутеролот при збогатување со стандарди од β -агонисти на ниво 0.25 и 0.75 ng/g, аналитичкиот принос е 129.0 % и 130.61 %, соодветно, додека кај тербуталинот на ниво 0.25 и 0.5 ng/g, аналитичкиот принос е 244.80 % и 275.76 %, соодветно. Исто така може да се забележи дека зилпатеролот не е воопшто детектиран при прочистување на примероците црн дроб со овие колони. Коефициентот на варијација се движи од 3.430 % до 15.732 % кај DSC-MCAX колоните, додека кај вториот тип колони коефициентот на варијација се движи од 4.071% до 33.572 %.

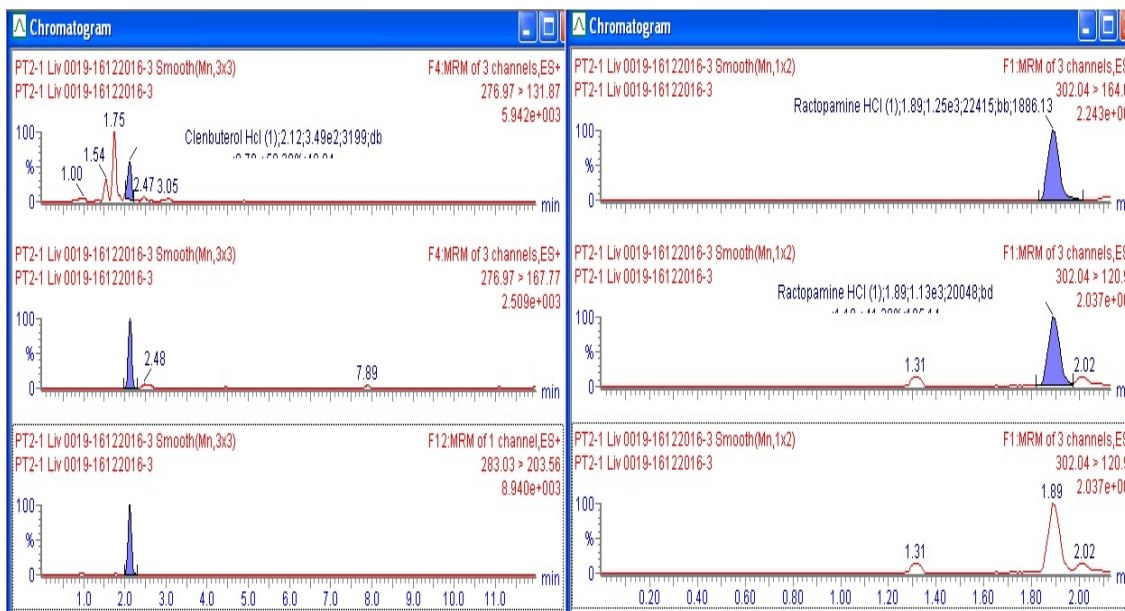
5.8 Контрола на квалитет

Резултатите од меѓународниот тест за оспособеност „ Beta-Agonists in Bovine and Porcine Liver Proficiency Test BETA1116“ се претставени во Табела 34.

Табела 34. Резултати од РТ за бета агонисти во говедски и свински црн дроб

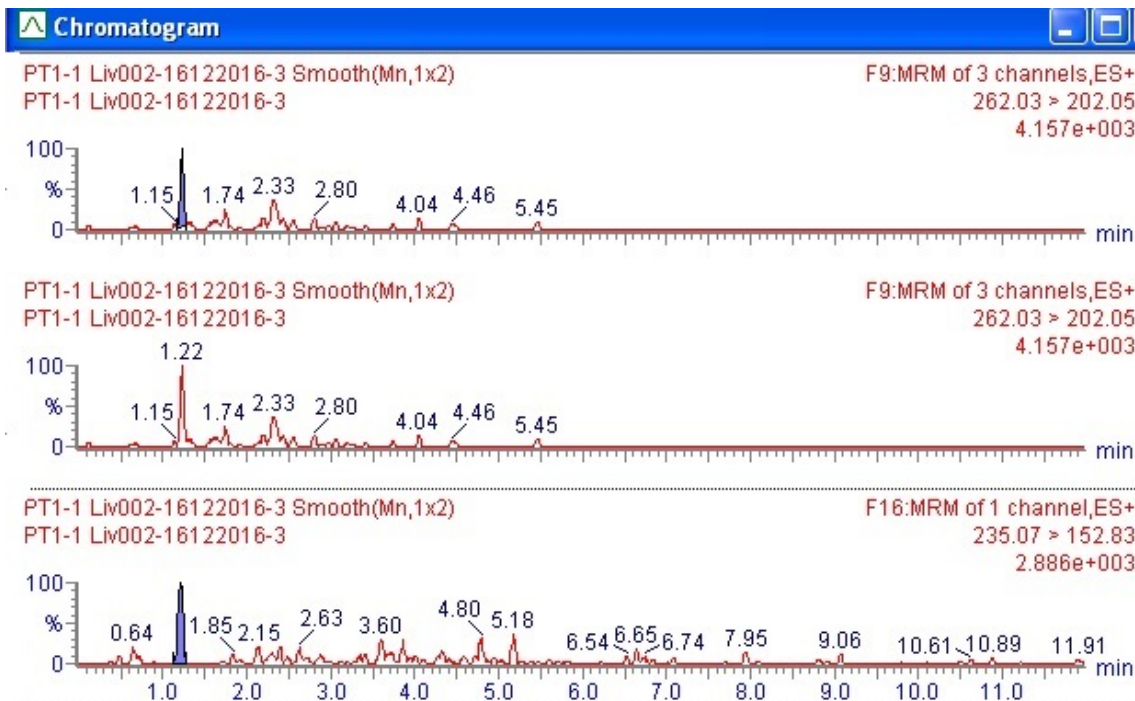
Код на примероците црн дроб	β -агонист	Декларирана вредност $\mu\text{g}/\text{kg}$	Добиена вредност $\mu\text{g}/\text{kg}$	Z-score
LIV0002	Зилпатерол	0.297	0.271	-0.263
LIV0019	Кленбутерол	0.335	0.469	+1.551
	Рактопамин	0.792	0.806	+0.038
LIV0122	Негативен	Не е детектиран	Не е детектиран	/
LIV0045	Рактопамин	1.427	1.331	-0.209
LIV0367	Кленбутерол	0.220	0.340	+2.050

Хроматограмите од примероците со детектираните β -агонисти се прикажани од Слика 17 до Слика 21. На Сликата 17 прикажани се хроматограмите за примерокот LIV0019 во кои беа детектирани кленбутерол и рактопамин.



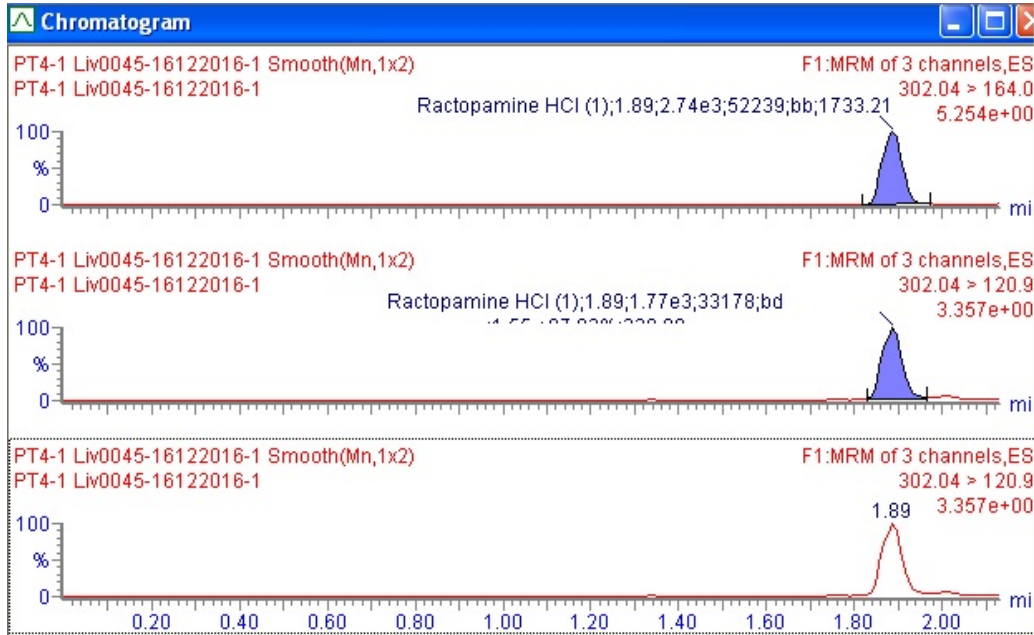
Слика 17. Хроматограми од LIV0019 со кленбутерол и рактопамин

На Сликата 18 е прикажан хроматограм за примерокот LIV0002 во кој беше детектиран зилпатерол.



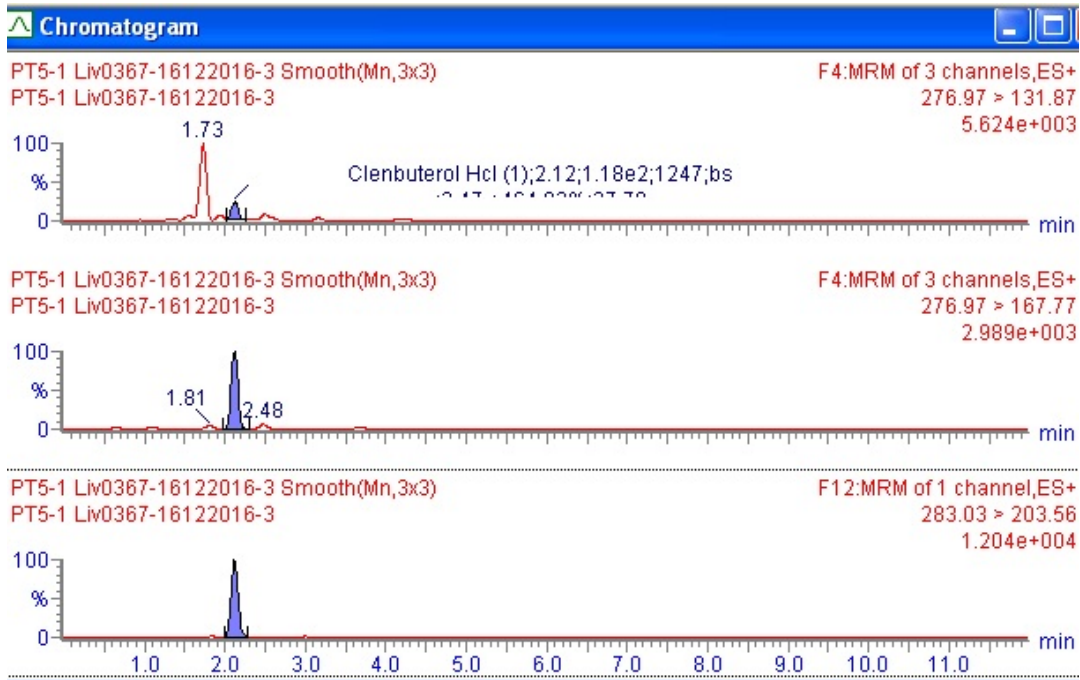
Слика 18. Хроматограм од LIV0002 со зилпатерол

На Сликата 19 е прикажан хроматограм за примерокот LIV0045 во кој беше детектиран рактопамин.



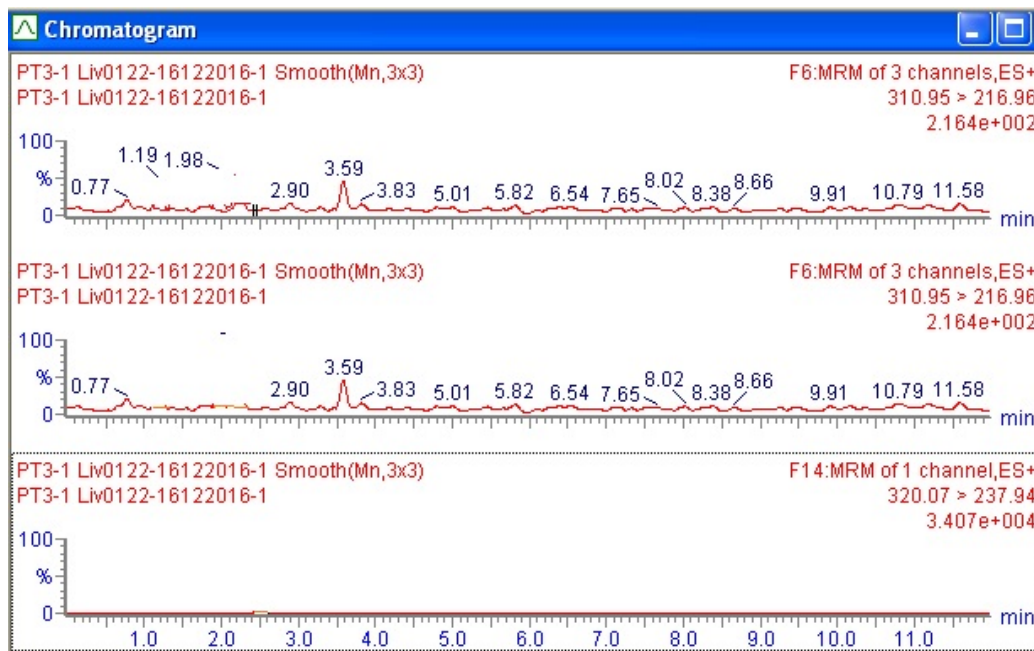
Слика 19. Хроматограм од LIV0045 со рактопамин

На Сликата 20 е прикажан хроматограм за примерокот LIV0367 во кој беше детектиран кленбутерол.



Слика 20. Хроматограм од LIV0367 со кленбутерол

На Сликата 21 е прикажан хроматограм за примерокот LIV122 во кој не беа детектирани β -агонисти.



Слика 21. Хроматограм од LIV0122 – негативен примерок

5.9 Анализа на примероци

Во текот на истражувањето беа анализирани вкупно 525 примероци од урина, мускул и црн дроб. Деталните податоци за примероците се дадени во Табелите со број: 4, 5, 6 и 7, во поглавјето материјали и методи. Во ниту еден од примероците не беше детектиран β -агонист во концентрација над утврдената вредност за ССа, односно немаше несообразен примерок. Резултатите од анализираниите примероци се претставени во Табелите 35, 36 и 37. Поради тоа што не е пронајден несоодветен примерок, односно примерок кој содржи некој од анализираниите β -агонисти, а земајќи го во обзир големиот број на примероци и анализи, резултатите се претставени во табели по матрикси, а се однесуваат на сите примероци од тој тип на матрикс.

Табела 35. Резултати од анализирани примероци урина

Матрикс	β -агонист	Резултат
Урина (резултатите се однесуваат за сите анализирани примероци урина (вкупно 274))	Кленбутерол	< 0.158 ng/ml
	Бромбутерол	< 0.144 ng/ml
	Мабутерол	< 0.127 ng/ml
	Кленпентерол	< 0.299 ng/ml
	Изоксуприн	< 0.290 ng/ml
	Цимбутерол	< 0.259 ng/ml
	Рактопамин	< 0.577 ng/ml
	Салбутамол	< 0.584 ng/ml
	Зилпатерол	< 0.646 ng/ml
Тербуталин	< 0.565 ng/ml	

Табела 36. Резултати од анализирани примероци мускул

Матрикс	β -агонист	Резултат
Мускул (резултатите се однесуваат за сите анализирани примероци мускул (вкупно 150))	Кленбутерол	< 0.068 ng/g
	Бромбутерол	< 0.070 ng/g
	Мабутерол	< 0.067 ng/g
	Кленпентерол	< 0.298 ng/g
	Изоксуприн	< 0.313 ng/g
	Цимбутерол	< 0.300 ng/g
	Рактопамин	< 0.192 ng/g
	Салбутамол	< 1.083 ng/g
	Зилпатерол	< 0.677 ng/g
Тербуталин	< 0.840 ng/g	

Табела 37. Резултати од анализирани примероци црн дроб

Матрикс	β -агонист	Резултат
Црн дроб (резултатите се однесуваат за сите анализирани примероци црн дроб (вкупно 101))	Кленбутерол	< 0.133 ng/g
	Бромбутерол	< 0.134 ng/g
	Мабутерол	< 0.151 ng/g
	Кленпентерол	< 0.176 ng/g
	Изоксуприн	< 0.315 ng/g
	Цимбутерол	< 0.167 ng/g
	Рактопамин	< 0.151 ng/g
	Салбутамол	< 0.100 ng/g
	Зилпатерол	< 0.151 ng/g
Тербуталин	< 0.222 ng/g	

6. ДИСКУСИЈА

Контролата на β -агонистите во биолошките матрикси игра многу значајна улога во безбедноста на храната и јавното здравје, бидејќи обезбедува превенција од внесување на овие супстанции кои според според Директивата 96/23/ЕС спаѓаат во А група супстанции и истите се забранети за употреба кај сите животни кои се користат во исхраната на луѓето поради негативните ефекти кои ги предизвикуваат кај нив (ЕС, 1996). Токму погоре споменатата Директива ги утврдува мерките кои треба да се преземат за следење на овие супстанции и остатоците од истите во животните и производите од животинско потекло. Тргувајќи од тој факт и од фактот дека не постои потврден метод за анализа на овие супстанции во РМ, а се со цел да придонесеме во зачувување на јавното здравје и обезбедиме побезбедна и поквалитетна храна, во оваа истражување се насочивме кон развој и валидација на аналитички LC-MS/MS метод за мултирезидуална анализа на β -агонисти во биолошки матрикси. Покрај тоа извршивме анализа на голем број примероци (урина, мускул и црн дроб) во период од три години за да утврдиме евентуално присуство на овие супстанции.

Идентификацијата и квантификацијата на аналитите беше извршена врз основа на ретенционото време, продукт јоните добиени со фрагментација на главниот јон, како и врз основа на критериумите пропишани во Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС (ЕС, 2002). Пред да се започне со валидација на методот беа оптимизирани MS/MS условите и хроматографските услови. Со оптимизација на MS/MS условите беа определени условите на масениот детектор врз основа кој беа одредени главните јони и продукт јоните. Покрај тоа, со оптимизација на хроматографските услови беа определени: соодветна мобилна фаза, градиентот, протокот и температурата на колоната. При валидацијата на методот беа опфатени следните параметри: линеарност на методот, специфичност и селективност, определување на $CC\alpha$ и $CC\beta$, точност и прецизност на аналитичкиот метод. Овие параметри на валидација беа евалуирани за сите аналити и во сите три матрикси опфатени во оваа истражување. Изборот на соодветни интерни стандарди беше направен врз основа на референтните методи и врз основа на литературните податоци, а употребата на истите доведува до зголемување на прецизноста и точноста на методот. Споредбата на добиените резултати е направена со пропишаните критериуми во Одлуката на Комисијата

2002/657/ЕС, како и со литературните податоци, па врз основа на споредбената анализа донесени се заклучоци за секој параметар поединечно и направена е проценка дали истиот е соодветен или несоодветен, односно дали ги исполнува или не ги исполнува критериумите.

6.1 Оптимизација на LC-MS/MS метод

За анализа на β -агонистите во оваа истражување беше користен LC-MS/MS систем, при што за раздвојување на аналитите користевме C18 колона за течна хроматографија со димензи 50 mm (должина) x 2.1 mm (внатрешен дијаметар) и големина на честиците од 2.6 μ m. При анализа на β -агонистите со LC-MS/MS метод, најчесто користена колона за раздвојување е C18 колоната, при што разликата од едно до друго истражување е во димензиите на колоната, што може да се заклучи од истражувањата спроведени од повеќе автори. De Wasch и сор., 1998 како и Li и сор., 2017, користат ист тип C18 колона со димензии 150 x 2.1 mm, 5 μ m, Van Hoof и сор., 2005, користат C18 колона со димензии 100 mm x 3.0 mm, 3 μ m, Niellen и сор., 2007 користат C18 колона со димензии 150 mm x 3.5 mm, 5 μ m и C18 колона со димензии 100 mm x 2.1-mm, 1.7 μ m, Liu и сор., 2009, користат C18 колона со димензии 50 mm x 4.6, 1.8 μ m, а додека Lin и сор., 2017, користат C18 колона со димензии 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m). Температура на колоната која се користи при раздвојувањето најчесто изнесува 30 или 40 °C. Хроматографските параметри, како што се избор и состав на мобилна фаза, услови на градиент и проток, температура на колоната, беа тестирани за да се добие оптимално раздвојување на аналитите. Оптимално раздвојување на аналитите при развој на овој метод беше постигнато со мобилната фаза А: вода со 0.1 % мравја киселина и мобилна фаза Б: ацетонитрил со 0.1 % мравја киселина, проток од 0.8 ml/min, градиентно раздвојување (прикажано во Табела 15) и температура на колоната од 40 °C, при што вкупното време за анализа изнесува 12 минути. Од литературните податоци може да заклучи дека при анализа на овие супстанции најчесто се користат следните мобилни фази: амониум формијат и ацетонитрил (Fesser и сор., 2005; Li и сор., 2017; Zhang и сор., 2009), вода со 0.1-0.2 % мравја киселина и ацетонитрил со 0.1-0.2 % мравја киселина (Niellen и сор., 2007, Jeong и сор., 2018), амониум формијат и метанол (Liu и сор., 2009), амониум ацетат и метанол (Lin и сор., 2017), вода со 0.1 % мравја киселина и метанол (Giannetti и

сор., 2016). За подобро раздвојување на аналитите во сите истражувања се користи градиентно раздвојување, а времетраењето на анализата се разликува во зависност од типот, производителот и температурата на колоната, мобилната фаза, протокот и градиентот, бројот на β -агонистите во методот и сл.

Табела 38. Споредба на продукт јоните добиени во ова истражување со продукт јони од различни автори и референтниот метод

Стандард	Главен јон	Продукт јони Узунов, 2018	Продукт јони Fesser и сор., 2005	Продукт јони Nielen и сор., 2007	Продукт јони Giannetti и сор., 2016	Продукт јони, Lin и сор., 2017	Продукт јони Референ- тен метод
Кленбутерол	276.97	202.95 131.87 167.77	259.0 202.9	203.0	203.0 259.0	203.0 259.0	259.0 203.0 132.0
Бромбутерол	366.90	292.84 211.42 57.00	348.6 292.7	290.9	293.0 349.0	Не е анализиран	293.0 349.0 214.0
Мабутерол	310.95	236.99 216.96 57.00	237.0 217.0	237.0	237.0 293.0	Не е анализиран	237.0 217.0
Кленпентерол	291.00	202.92 131.89 167.79	202.9 167.9	203.0	273.0 203.0	Не е анализиран	203.0 132.0
Изоксуприн	302.04	106.96 164.01 120.95	284.1 135.0	150.1	284.0 150.0	Не е анализиран	284.0 150.0
Цимбутерол	234.03	159.98 142.94 57.00	Не е анализиран	160.1	143.0 160.0	Не е анализиран	160.0 216.0 143.0
Рактопамин	302.04	106.96 164.01 120.95	164.0 107.0	164.1	164.0 284.0	284.0 107.0	164.0 284.0
Салбутамол	240.03	147.96 165.98 56.94	222.0 147.9	148.1	148.0 222.0	148.0 222.0	148.0 222.0 166.0
Зилпатерол	262.03	185.01 202.05 156.98	Не е анализиран	185.1	202.0 185.0	244.0 185.0	244.0 202.0 185.0
Тербуталин	226.00	152.00 106.97	151.7 124.7	107.0	152.0 125.0	152.0 125.0	152.0 125.0 107.0

При оптимизација на условите на масениот детектор беше користена позитивна електроспреј јонизација (ESI+), а за следење на главниот јон и продукт јоните се користеше

MRM (multiple reaction monitoring) модул. Добиените резултати од оптимизираниот метод се прикажани во Табела 16. За сите β -агонисти користени во оваа истражување беа утврдени главниот-прекурсор јон и по три продукт јони (освен за тербуталин каде што утврдивме 2 продукт јони), при што продукт јонот со најсилен сигнал беше избран како јон за квантификација, а останатите продукт јони се користат за идентификација (Табела 17). Според Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС во оној случај кога не се користи снимање на целокупниот спектар (full scan) соодветни потврдни методи за идентификација на супстанции од А група се оние методи кои содржат 4 точки за идентификација. Точките на идентификација во еден метод зависат од видот на техниките и комбинацијата на техниките кои се користат, како и јоните кои се користат. Според 2002/657/ЕС при употреба на LC-MS/MS техника, со утврдување на прекурсор јонот и два продукт јони се добиваат 4 точки за идентификација (1 точка за прекурсор јон и 1.5 за секој продукт јон). Според погоре наведеното, методот кој што се користи во оваа истражување ги задоволува критериумите за потврден метод за анализа на β агонисти во урина, мускул и црн дроб. Продукт јоните кои се добиени за β -агонистите се типични, што може да се потврди од литературните податоци од следните автори: Van Hoof и сор., 2005, Fesser и сор., 2005, Nielen и сор., 2007, Giannetti и сор., 2016, Lin и сор., 2017, како и со податоците добиени од референтниот метод (Табела 38).

6.2 Линеарност на методот

Линеарноста на методот за детекција на β -агонисти во урина, мускул и црн дроб е утврдена преку коефициентите на корелација добиени од конструирање на калибрациони криви во 6 точки за секој β -агонист вклучен во оваа истражување и тоа од стандардни раствори во матрикс (урина, мускул и црн дроб) и стандардни раствори во мобилна фаза. Концентрацискиот опсег за сите матрикси е прикажан во Табела 11, 13 и 14. Добиените резултати за линеарноста на методот (регресиона равенка и коефициент на корелација) се прикажани во Табела 19, 20 и 21. Од добиените резултати може да се забележи дека се добиени високи коефициенти на корелација, кои кај урината се движат од 0.985214 до 1.0 кај калибрацијата во матрикс, односно од 0.980204 до 0.997625 кај калибрација во мобилна фаза, кај мускул се движат од 0.980204 до 0.998869 кај калибрационата крива во матрикс и

од 0.981459 до 0.997686 кај калибрационата крива во мобилна фаза, додека кај црниот дроб коефициентот на корелација се движи во граница од 0.985002 до 0.999179 во калибрација во матрикс, односно во калибрацијата во мобилна фаза се движи во граница од 0.986231 до 0.999681. За да се задоволи критериумот за прифатливост на линеарноста за многу ниски концентрации, коефициентот на корелација треба да изнесува најмалку 0.98 (Dong, 2006; Marilena, 2015, Spisso и сор., 2000). Според ова може да заклучиме дека постои линеарна зависност помеѓу површината на пиковите од стандардните раствори и соодветните концентрации на стандардите, односно дека методот е линеарен и во двата случаи (калибрација во матрикс и калибрација во мобилна фаза).

6.3 Специфичност и селективност на методот

Резултатите за специфичноста и селективноста на методот за определување на β -агонисти се прикажани на Сликите 11-16 каде што се дадени хроматограмите од негативни примероци на урина, мускул и црн дроб, како и збогатени примероци со стандарди од β -агонисти од претходно наведените матрикси. Според 2002/657/ЕС за сите аналитички методи важна е способноста за разликување помеѓу целните аналити и разликување на аналитите од други сродни супстанции како што се изомери, метаболити, продукти на деградација, матрикс ефект и сл. Со споредба на хроматограмите од негативните и збогатените примероци може да се утврди дека пиковите за сите β -агонисти во збогатените матрикси се добро раздвоени, не се преклопуваат и не покажуваат интерференци од матриксот во значајното подрачје (ретенционото време) на кое очекуваме појава на пикови од целните аналити, од што може да се заклучи дека методот е селективен и специфичен и ги исполнува критериумите за овие параметри од 2002/657/ЕС, односно овозможува чиста идентификација и квантификација на аналитите од интерес во оваа истражување. Интерференците од матриксот кои се појавуваат кај урина при детекција на кленпентерол, зилпатерол, салбутамол и тербуталин, кај мускул при детекција на тербуталин и цимбутерол кај мускул и кај салбутамол, тербуталин и исоксуприн кај црн дроб, воопшто не влијаат на резултатот и се појавуваат надвор од подрачјето во кое се очекува појава на пиковите од овие супстанции. Покрај ова треба да се напомене и фактот дека MS/MS методот сам по себе има висок степен на специфичност и селективност поради можноста да работи

во MRM модул кој што одлично ги редуцира ефектите од интерференците на матриксот (Cronly, 2011).

6.4 Определување на ССа и СС β

Во Табелите 22-24 прикажани се резултатите за ССа и СС β за сите β -агонисти вклучени во ова истражување во матриксите урина, мускул и црн дроб. Имено, кај урината за β -агонистите (кленбутерол, бромбутерол и мабутерол) за кој препорачаната концентрација е 0.2 ng/ml, вредностите за ССа се движат 0.127-0.158 ng/ml, додека вредностите за СС β се движат 0.140-0.188 ng/ml. За кленбутерол, изоксуприн и цимбутерол препорачаната концентрација е 0.5 ng/ml, додека вредности за ССа и СС β се движат 0.259-0.299 ng/ml и 0.282-0.329 ng/ml, соодветно. Вредности за ССа се во границите 0.565-0.646 ng/ml и за СС β 0.619-0.702 ng/ml кај рактопамин, салбутамол и зилпатерол за кој препорачаната концентрација е 1.0 ng/ml, како и тербуталин за кој истата изнесува 3.0 ng/ml. Кај мускулот MRL за кленбутерол изнесува 0.1 ng/g, а исто толку изнесува и препорачаната концентрација за бромбутерол. Резултатите за ССа изнесуваат 0.068 ng/g за кленбутерол и 0.070 ng/g за бромбутерол, додека за СС β резултатите се 0.083 ng/g и 0.096 ng/g, соодветно. За кленпентерол, изоксуприн и цимбутерол препорачаната концентрација е 0.5 ng/g, а вредности за ССа и СС β се движат 0.298-0.313 ng/g и 0.413-0.422 ng/ml. ССа за рактопамин, чија препорачана концентрација е 1.0 ng/g изнесува 0.192 ng/g, додека СС β изнесува 0.264 ng/g. ССа за салбутамол и зилпатерол изнесува 1.083 ng/g и 0.677 ng/g, додека СС β изнесува 1.398 ng/g и 0.945 ng/g. Препорачана концентрација за овие два анализи е 5.0 ng/g. За тербуталинот пак препорачаната концентрација изнесува 10 ng/g, а добиени вредности за ССа и СС β се 0.840 ng/g и 1.111 ng/g. Кај црниот дроб MRL за кленбутерол изнесува 0.5 ng/g, колку што изнесува и препорачаната концентрација за кленпентерол, изоксуприн и цимбутерол. Вредности за ССа и СС β за овие β -агонисти се движат во границите 0.133-0.315 ng/g и 0.161 до 0.344 ng/g, соодветно. ССа и СС β за бромбутерол изнесуваат 0.134 ng/g и 0.163 ng/g, додека за мабутерол 0.151 ng/g и 0.181 ng/g, а препорачаната концентрација е 0.2 ng/g. ССа за рактопамин изнесува 0.151 ng/g, додека СС β изнесува 0.186 ng/g, а препорачана концентрација е 1.0 ng/g. Препорачана концентрација за салбутамол и зилпатерол е 5.0 ng/g, додека за тербуталинот изнесува 10 ng/g, а вредностите за ССа се движат од 0.100 ng/g до 0.222 ng/g и за СС β од 0.115 ng/g до 0.288 ng/g.

Од резултатите од валидацијата за ССа и СС β може да се забележи дека добиените вредности за овие параметри се под препорачаните концентрации на кои што треба да биде валидиран методот, па следствено на тоа може да потврдиме дека методот е соодветен за намената и е во согласност со критериумите од 2002/657/ЕС (ЕС, 2002).

Покрај тоа, резултатите добиени од ова истражување беа споредени со слични истражувања, со цел да имаме уште една потврда дека методот е соодветен за анализа на овие супстанции. Во истражувањето на Nielen и сор., 2007, кое е спроведено на говедска и свинска урина, добиточна храна и влакна, утврдените вредности за ССа кај урината се помали од 0.3 $\mu\text{g/L}$, а вредностите за СС β се помали од 0.5 $\mu\text{g/L}$, додека Versmann и сор., во 2011 година при валидација на метод за анализа на 24 β -агонисти во урина, утврдиле вредности за ССа кои се движеле во граница од 0.05 до 0.35 $\mu\text{g/l}$, додека за СС β вредностите се движеле од 0.13 до 0.70 $\mu\text{g/l}$. Вредностите за урина во нашето истражување се движат од 0.127 - 0.646 ng/ml за ССа, односно од 0.140 – 0.739 ng/ml за СС β . Karamolegou и сор., 2018, во своето истражување спроведено на мускул и црн дроб добиле вредности за ССа од 0.21 до 0.49 $\mu\text{g/kg}$ и за СС β од 0.60 до 0.69 $\mu\text{g/kg}$. Во нашето истражување ССа и СС β за мускул изнесуваат од 0.067 до 1.083 $\mu\text{g/kg}$ и од 0.083 до 1.398 $\mu\text{g/kg}$, соодветно, додека за црниот дроб истите изнесуваат од 0.100 до 0.315 $\mu\text{g/kg}$ и од 0.115 до 0.344 $\mu\text{g/kg}$, соодветно. Fesser и сор., 2005, имаат спроведено истражување за детекција на β -агонисти во црн дроб и ретина со LC-MS/MS метод, при што се опфатени 13 β -агонисти. Вредностите за ССа и СС β во црниот дроб се движат од 0.1 до 0.3 $\mu\text{g/kg}$ и од 0.2 до 0.5 $\mu\text{g/kg}$. Од споредбата на резултатите за овие параметри со истите параметри спроведени во слични истражувања може да се заклучи дека се добиени слични вредности, што претставува дополнителен доказ дека методот е соодветен за анализа на овие супстанции.

6.5 Точност на методот

Точноста на методот е определена преку аналитичкиот принос (%), со збогатување на примероците урина, мускул и црн дроб со стандарди на β -агонисти на 3 концентрациски нивоа (метод на стандарден додаток). Добиените резултати за аналитичкиот принос, како и нивото на стандарден додаток во сите три матрикси се прикажани во Табелите 25, 26 и 27. Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС има пропишани минимални критериуми за точност кои што треба да бидат исполнети за методот да биде прифатлив (Табела 39).

Табела 39. Минимални критериуми за точност (2002/657/ЕС)

Концентрација	Опсег
$\leq 1.0 \mu\text{g/kg}$	од -50 % до +20 %
$> 1.0 - 10.0 \mu\text{g/kg}$	од -30 % до +10 %
$\geq 10.0 \mu\text{g/kg}$	од -20 % до +10 %

Ова практично значи дека аналитичкиот принос при концентрации $\leq 1.0 \mu\text{g/kg}$ треба да се движи од 50 до 120 %, при концентрации $> 1.0 - 10.0 \mu\text{g/kg}$ од 70 до 110 % и при концентрации $\geq 10.0 \mu\text{g/kg}$ од 80 до 110 %. Поради тоа што во ова истражување аналитичкиот принос за концентрации $\leq 1.0 \mu\text{g/kg}$ се движи во границите од 71.2 до 118.8 % кај урина (Табела 25), од 76.00 до 116.20 % кај мускул (Табела 26) и од 75.20 % до 107.07 % кај црн дроб (Табела 27) може да заклучиме дека методот ги исполнува критериумите за точност. Збогатување со концентрации во граници $> 1.0 - 10.0 \mu\text{g/kg}$ користено е само кај матрикс урина и во овој случај аналитичкиот принос изнесува од 70.6 до 101.85 %, што исто така е во согласност со критериумите од 2002/657/ЕС (ЕС, 2002). Со резултатите за точноста се потврдува дека методот на екстракција е ефикасен за добивање на соодветни елуати.

Nielen и сор., 2007, при валидација на методот за анализа на 21 β -агонисти во говедска и свинска урина, добиле аналитички принос од 85 до 111 %, при збогатување на негативни примероци на урина на ниво од 0.5 до 2.0 $\mu\text{g/l}$, додека во истражувањето на Van Noof и сор., 2005, аналитичкиот принос се движел од 50 до 120 %, на ниво на збогатување на урината од 1 $\mu\text{g/l}$. Во едно истражување пак за определување на рактопамин во говедска и овча урина, спроведено од Liu и сор., 2009, утврден е аналитички принос од 117 % и 108.4 %, на ниво на збогатување од 0.25 и 0.5 $\mu\text{g/l}$, соодветно. Sakai и сор., 2007, исто така анализираше рактопамин, но тие истражувањата ги извеле во говедски и свински мускул, црн дроб и масно ткиво, при што добиле аналитички принос од 99.5 до 100.8 % во свинските и 97-109.4 % во говедските ткива. Аналитички принос од 87.6 до 101.2 %, на ниво на збогатување од 1.5 и 3.0 $\mu\text{g/kg}$ во мускул, е објавено во истражувањето на Lin и сор., во 2017 година. Во истражувањето на Fesser и сор., 2005, аналитичкиот принос на β -агонистите во црн дроб се движи од 92 – 118 %, а за таа цел негативни примероци од црн дроб биле збогатени на ниво од 0.5; 1.0 и 2.0 $\mu\text{g/kg}$. На исто ниво на збогатување во матрикс црн дроб,

Karamolegou и сор., 2018, добиле аналитички принос од 83.1 до 118 %, меѓутоа во овој случај користена е техниката гасна хроматографија со масена спектрометрија, за разлика од сите претходни истражувања, каде што е користена течна хроматографија со масена спектрометрија. Од погоре наведените литературни податоци може да заклучиме дека добиените резултати во оваа истражување, покрај тоа што ги исполнуваат критериумите за точност од 2002/657/EC (EC, 2002), се во согласност со литературните податоци, што дава дополнителна сигурност за точноста на методот.

6.6 Прецизност на методот

Прецизноста на методот е определена преку повторливоста и репродуцибилноста за секој матрикс посебно, на три концентрациски нивоа, а истата е изразена преку коефициент на варијација. Според 2002/657/EC (EC, 2002) максималниот коефициентот на варијација се определува според равенката на Horwitz, а прифатливата вредност за истиот зависи од концентрацијата на аналитите (Табела 40).

Табела 40. Критериуми за прецизност (2002/657/EC)

Концентрација	Репродуцибилност, CV (%)
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	(*)
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	(*)
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	23
1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1 mg/kg)	16
* За масените фракции пониски од 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, примената на равенката на Horwitz дава неприфатливо високи вредности. Затоа CV за концентрации помали од 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ треба да биде колку што е можно понизок.	

Од Табела 40 може да се заклучи дека равенката на Horwitz не е применлива за концентрации помали од 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Во оваа истражување сите целни концентрации се под оваа вредност, па според тоа вредноста за CV треба да биде колку што е можно пониска. Анализите за повторливоста и репродуцибилноста се извршени во два различни дена. Резултатите се прикажани во Табела 28 за урина, во Табела 29 за мускул и во Табела 30 за

црн дроб. Поради големиот обем на податоци и со оглед на тоа што коефициентот на варијација се движи во пропишаните граници за проценка на прецизноста за секој матрикс земени се само минималната и максималната вредност за коефициентот на варијација, без при тоа да се прави споредба за секој β -агонист на секое концентрациско ниво. Деталните резултати се наведени во претходно споменатите табели. Од добиените резултати за урина може да се заклучи дека коефициентот на варијација (CV, %) за повторливоста се движи во граници од 1.619 % до 15.472 %, првиот ден од тестирањето, додека вториот ден истиот се движи во граници од 2.695 % до 10.441 %. Коефициентот на варијација за репродукцибилноста (CV_R, %) се движи во граница од 3.750 % до 16.225 %. Кај мускулот коефициентот на варијација за повторливоста се движи во опсег од 1.280 % до 25.931 % првиот ден, додека вториот ден истиот се движи во опсег од 4.816 % до 22.130 %. Коефициентот на варијација за репродукцибилноста (CV_R, %) , за овој матрикс, се движи во граница од 5.310 % до 28.174 %. Коефициентот на варијација за повторливоста кај црниот дроб се движи во границите од 3.430 % до 15.565 % и од 5.231 % до 17.082 %, првиот и вториот ден, соодветно. Коефициентот на варијација за репродукцибилноста (CV_R, %) на методот се движи во граница од 7.257 % до 22.443 %.

Иако равенката на Horwitz не е применлива за концентрации помали од 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ според Van Hoof и сор., 2005, вредноста за 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, односно 23 % може да се земе како граница за CV. Според ова може да се заклучи дека методот е прецизен бидејќи вредноста за CV за сите анализи, во сите матрикси, на сите три концентрациски нивоа беа под 23 %, освен кај изоксупринот кај мускул на ниво на збогатување од 0.20 ng/kg , каде што вредноста за CV изнесува 25.931 %. Повисоки вредности од 23 % за коефициентот на варијација за репродукцибилноста на методот се определени кај матриксот мускул и тоа кај кленпентерол (27.243 %, ниво на збогатување 0.20 ng/kg), изоксуприн (28.174 %, ниво на збогатување 0.20 ng/kg), салбутамол (24.834 %, ниво на збогатување 0.75 ng/kg) и кај тербуталин (23.624 %, ниво на збогатување 0.75 ng/kg), додека кај сите останати β -агонисти, на сите концентрациски нивоа на збогатување, коефициентот на варијација беше под 23 %.

Коефициентот на варијација кај урината во истражувањето на Nielen и сор., 2007, се движел од 3.0 – 26.0 %, а додека кај Van Hoof и сор., 2005, коефициентот на варијација се движи од 3.8-27.0 %. Во опсег од 0.9 до 5.64 % се движи коефициентот на варијација во резултатите објавени од Liu и сор., 2009. Во своето истражување Sakai и сор., 2007, при

валидација на методот за присуство на овие супстанции во говедски и свински ткива добиле коефициент на варијација од 0.1 до 9.5 %, додека вредноста за овој валидационен параметар кај Lin и сор., 2017, во мускул се движел во границите од 1.7-7.7 %. Во истражувањето спроведено од Fesser и сор., 2005, при валидација на методот за анализа на β -агонисти во црн дроб коефициентот на варијација се движи во граници од 7-18 %, а додека Karanolegou и сор., 2018, добиле 3.3-19 %. Кај првото истражување за анализа на β -агонисти авторите користат течна хроматографија со масена спектрометрија, а во вториот случај се користела гасна хроматографија со масена спектрометрија. Врз основа на споредбата на добиените резултати со критериумите за прецизност пропишани во 2002/657/EC (EC, 2002) и со резултатите од истражувањата од други автори, опишани погоре, може да заклучиме дека методот е прецизен и соодветен за анализа на аналитите од интерес во оваа истражување.

6.7. Споредба на ефикасноста на два типа колони за цврсто-фазна екстракција преку параметрите прецизност и точност

Кај урината и мускулот беше направена споредба помеѓу Discovery® DSC-MCAX, 300 mg/6 ml и Bond Elut-Certify, 500 mg/6 ml, додека кај црниот дроб споредбата беше направена помеѓу Discovery® DSC-MCAX, 300 mg/6 ml и Strata Screen-C, 500 mg/6 ml колоните за цврсто-фазна екстракција. Споредбата на ефикасноста беше оценета преку одредување на прецизноста и точноста со двата типа на колони, кај секој матрикс одделно. Добиените резултати се прикажани во табелите 31, 32 и 33.

Кај урината, аналитичкиот принос кај DSC-MCAX колоните се движи од 70.06 % до 118.80 %, а кај Bond Elut-Certify од 70.58 % до 113.24 %, додека коефициентот на варијација се движи во граници од 1.619 % до 15.472 % кај DSC-MCAX колоните и од 3.646 % до 19.288 % кај колоните Bond Elut-Certify. Аналитичкиот принос кај мускулите при прочистување со DSC-MCAX колоните се движи од 75.64 % до 116.20 %, а при прочистување со Bond Elut-Certify од 71.55 % до 110.96 %. Коефициентот на варијација е во граници од 1.370 % до 25.934 % кај DSC-MCAX колоните, додека кај колоните Bond Elut-Certify коефициентот на варијација е во граници од 1.099 % до 17.540 %. Од добиените резултати за прецизноста и точноста кај урина и мускул може да заклучиме дека се во согласност со критериумите од Одлуката на Комисијата 2002/657/EC и за двата типа на

колони. Според тоа двата типа колони покажуваат висока ефикасност и може да се користат при рутинска анализа на примероци.

Кај црниот дроб, аналитичкиот принос кај DSC-MCAX колоните се движи од 75.20 % до 109.40 %. Кај Strata Screen-C за некои β -агонисти може да се забележи значително висок аналитички принос. Кај кленбутеролот при збогатување со стандарди од β -агонисти на ниво 0.25 и 0.75 ng/g, аналитичкиот принос е 129.00 % и 130.61 %, додека кај тербуталинот на ниво 0.25 и 0.5 ng/g, аналитичкиот принос е 244.80 % и 275.76 %. Исто така, може да се забележи дека зилпатеролот не е воопшто детектиран при прочистување на примероците црн дроб со овие колони. Коефициентот на варијација се движи од 3.430 % до 15.732 % кај DSC-MCAX колоните, додека кај вториот тип колони коефициентот на варијација се движи од 4.071% до 33.572 %. Разликите во ефикасноста на двата типа колони се јавуваат поради разликата во фазите. DSC-MCAX колоните содржат C8 (octyl), додека Strata Screen-C колоните содржат C18 (octadecyl) фаза. При елуирањето на примероците C8 фазата не ги задржува аналитите од интерес, односно истата дозволува преминување на аналитите од интерес кои би можеле да бидат задржани при елуирање низ C18 фазата (Spisso и сор., 2000). Според добиените резултати за Strata Screen-C колоните може да заклучиме дека се несоодветни за употреба во нашиот метод, бидејќи не може да се определува зилпатерол и не ги исполуваат барањата за точност според 2002/657/EC за сите β -агонисти вклучени во ова истражување. Од друга страна, колоните DSC-MCAX ги исполнуваат барањата од 2002/657/EC, односно покажуваат висока ефикасност и може да се користат во рутинска анализа за определување на β -агонисти во урина, мускул и црн дроб.

6.8 Контрола на квалитет на методот

Тестовите за оспособеност се уште еден параметар со кој се изведува контролата на квалитетот, односно се докажува веродостојноста на резултатите, а бидејќи овие тестови се организираат од страна на акредитирани лаборатории и во нив земаат учество голем број на лаборатории, се сметаат како најрелевантна надворешна контрола на квалитетот на методите за тестирање. Резултатите од меѓународниот тест за оспособеност „Beta-Agonists in Bovine and Porcine Liver Proficiency Test BETA1116“ во кој учествувавме се претставени во Табела 34. За тестот за оспособеност за β -агонисти во кој учествувавме, вредноста за Z-score се движи од -0.263 до 2.0. Според стандардот EN ISO/IEC 17043:2010 евалуацијата на

тестовите за оспособеност се врши преку т.н. Z-score. Според овој стандард класификацијата е следна:

$|z| \geq 2$ - задоволителен

$2 < |z| \leq 3$ сомнителен

$|z| > 3$ незадоволителен

Од добиените резултати и од класификацијата согласно погоре наведениот стандард може да заклучиме дека добиените резултати се задоволителни, што претставува уште еден доказ дека методот кој е валидиран е соодветен за анализа на β -агонисти. Според „Правилник за барањата за учество во тестирања на оспособеноста и во меѓулабораториски споредби“, Р 06, од Институтот за Акредитација на РМ, тестовите на оспособеност претставуваат силна и ефективна алатка со која се потврдува способноста на определена лабораторија за изведувања на тестирања/калибрации (ИАРМ, 2010).

6.9 Анализа на примероци

Една од поставените цели на оваа истражување беше мониторинг на β -агонисти во урина, мускул и црн дроб во периодот од 2014 до 2016 година со цел проценка на безбедноста на храната во однос на присуство на претходно наведените супстанции. За таа цел во текот на истражувањето беа анализирани 274 примероци урина, 150 примероци мускул и 101 примероци црн дроб или вкупно 525 примероци (Табели 4-7). Сите примероци беа анализирани после оптимизација и валидација на аналитичкиот метод, со цел да се добијат точни и прецизни резултати. Резултатите од анализираниите примероци се претставени во Табелите 35, 36 и 37. Во анализираниите примероци не беа детектирани β -агонисти во концентрација над утврдената вредност за $CC\alpha$, односно немаше несообразни примероци, што практично значи дека резултатите укажуваат на нулта инциденца на нелегална или случајна употреба на β -агонисти и дека примероците се слободни од овие штетни супстанции. Добиените резултати во оваа истражување се споредливи со резултатите добиени од мониторингот на β -агонистите во ЕУ во периодот од 2014-2016 година, при што од 116477 испитани примероци несообразни биле 70 примероци или 0.06 %. При тоа, овие супстанции биле детектирани во осум земји членки на ЕУ, додека во останатите 20 земји присуството на овие супстанции не е детектирано. Овие податоци детално се објавени во извештаите на European Food Safety Authority (EFSA). Од извештаите на EFSA може да се

забележи дека во истиот период, од 2014 до 2016 година, во ЕУ се анализирани голем број примероци од говеда, свињи, овци, кози, живина и коњи. Во 2014 се анализирани 41322 примероци, во 2015 се анализирани 40331 примероци, а во 2016 година се анализирани 34824 примероци, при што за сите 3 години несообразни биле 70 примероци (37 примероци земени при таргетирано мострирање и 33 примероци земени при мострирање заради сомнение). Во 2014 година 17 примероци (0.04%) биле несообразни, при што во 16 примероци бил детектиран кленбутерол, а во еден примерок салбутамол. При тоа сите примероци биле од говеда, а резултатите се однесуваат на таргетирано мострирање. Во 30 примероци од говеда пак бил детектиран кленбутерол при мострирање заради сомнение (EFSA, 2016). Во 2015 година, при таргетирано мострирање, β -агонисти биле детектирани во 7 примероци (0.02 %) и тоа во 5 примероци од говеда и по еден примерок од свиња и коњ. Кај говедата во 4 примероци е детектиран кленбутерол, а во 1 примерок рактопамин, додека кај коњите и свињите е детектиран кленбутерол. Исто така спроведено е мострирање од сомнителни животни и при тоа во 2 примероци е детектиран кленбутерол. (EFSA, 2017). Во 2016 година се детектирани 13 несообразни примероци (0.04 %) при таргетирано мострирање и тоа 11 примероци од говеда и 2 примероци од свињи. Кај говедата во 10 примероци е детектиран кленбутерол, а во 1 примерок салбутамол, додека кај свињите и во двата случаи и детектиран кленбутерол. Покрај тоа, при мострирање заради сомнение детектиран е 1 несообразен примерок од говеда и истиот содржел кленбутерол (EFSA, 2018). Најголем број несообразни примероци во овој период бил детектиран во Португалија и тоа 62 примероци, по 2 примероци во Италија и Холандија, а по 1 примерок во Хрватска, Велика Британија, Франција и Ирска. Во останатите земји во ЕУ во овој период не биле детектирани несообразни примероци. Во извештајот на EFSA од 2018 година, дадени се податоци за несообразните примероци (изразени во %) за остатоци и контаминети за периодот од 2007 до 2016 година, при што за β -агонисти процентуалната застапеност се движи од 0.005 % во 2008 година, до 0.05 % во 2013 година (процентот се однесува на вкупен број анализирани примероци за β -агонисти).

Kuiper и сор., 1998, имаат објавено податоци за нелегална употреба на β -агонисти во ЕУ, при што од Табела 41 може да се забележи дека има голем број на несообразни примероци во периодот 1992 и 1993 година. Во истото истражување објавени се податоци и за Германија за 1994 и 1995 година, при што β -агонисти се детектирани во 109 примероци

од фарма во 1994 и 46 примероци во 1995 година, односно во 81 примерок земен при колење во 1994 и 32 примероци во 1995 година.

Табела 41. Несообразни примероци β -агонисти во ЕУ во 1992 и 1993 година

Држава	Примероците се земени од фарма				Примероците се земени при колење			
	1992		1993		1992		1993	
	АП*	НП**	АП*	НП**	АП*	НП**	АП*	НП**
Белгија	798	61	806	142	99	7	168	9
Данска	107	0	108	0	300	0	301	9
Германија	0	0	0	0	0	0	0	0
Грција	19	0	20	0	20	0	20	0
Шпанија	5294	59	3988	36	6515	268	7040	343
Франција	1013	1	0	0	953	40	0	0
Ирска	0	0	69	0	781	10	210	0
Италија	0	0	0	0	7121	264	5883	397
Луксенбург	0	0	0	0	24	0	20	0
Холандија	848	6	920	7	2069	20	2091	41
Португалија	132	0	97	0	1112	60	821	21
О. Кралство	156	0	175	0	509	2	1242	0
Вкупно	8367	127 (1.52%)	6183	185 (2.99%)	19233	671 (3.49%)	17796	820 (4.61%)

*АП-анализирани примероци, ** НП-несообразни примероци

Со споредба на оваа истражување и извештаите од EFSA од 2014-2016 година, може да заклучиме дека бројот на несообразни примероци на присуство на β -агонисти во ЕУ е значително намален, што е резултат на редовниот мониторинг на овие супстанции во животинските ткива.

Најчесто користен β -агонист во тој животински материјал е кленбутеролот, а покрај него доста често се детектираат и рактопамин, салбутамол, мабутерол, бромбутерол. Потврда за нивна детекција имаме од многубројните истражувања кои се спроведени како дел од редовен мониторинг план или пак како резултат на труење со храна.

При труење во Италија во 5 примероци црн дроб детектиран е кленбутерол во концентрација од 0.160-0.291 mg/kg, а покрај тоа во урината од 2 пациенти е детектиран кленбутерол во концентрација од 2.0 и 4.0 μ g/kg (Martínez-Navarro, 1990). При труење во Шпанија во 1992 година, од 16 анализирани примероци говедски црн дроб и 3 анализирани примероци од говедско месо, во 9 примероци црн дроб бил детектиран кленбутерол во концентрација од 0.019 mg/kg до 5.395 mg/kg, додека мускулите биле негативни (Salleras, 1995). Srogano и сор., 1998, детектирале кленбутерол во 6 примероци месо во концентрација од 0.8 mg/kg до 7.4 mg/kg, при труење на 62 луѓе во Италија. При 4 посебни труења во Португалија детектиран е кленбутерол во месо и црн дроб. Во првиот случај, неколку часа по хоспитализација на пациентите, земени се примероци од сварен говедски црн дроб од нивните фрижидери, при што е детектиран кленбутерол во концентрација од 1.2 mg/kg. Во вториот случај на труење, земени се примероци од говедско месо при што е детектиран кленбутерол, во иста концентрација како и во црниот дроб во претходниот случај. Во третиот случај татко и ќерка се затруле од говедски црн дроб и во истиот детектиран е кленбутерол во концентрација од 1.4 mg/kg, додека во четвртиот случај во јагнешко месо бил детектиран кленбутерол во концентрација од 0.3 mg/kg (Barbosa и сор., 2005). При труење на 50 луѓе во Италија, кои јаделе заедно, земени се за анализа 2 примероци црн дроб и при нивна анализа детектиран е кленбутерол во концентрација од 1.140 mg/kg и 1.480 mg/kg. (Brambila и сор., 2000). Од овие истражувања исто така може да се заклучи дека како резултат на редовниот мониторинг и намалувањето на употребата на овие супстанции во ЕУ, не се забележани масовни труења, како во претходно наведените случаи, на просторите на ЕУ во последните години.

За разлика од Европската Унија, каде што бројот на детектирани β -агонисти во последните години е намален и е на значително ниско ниво, постојат земји во светот каде што бројот на несообразни примероци е голем, што значи дека овие супстанции значително се употребуваат во тогот на животните. Многу е битно овие податоци да се знаат и да бидат јавно достапни, со цел да се спречи увоз на месо и производи од месо од овие земји, за да се заштити населението од внесување на истите.

Estrada-Montoya и сор., 2008, во Мексико, детектирале кленбутерол во 6 примероци говедско месо, а вкупниот број на анализирани примероци бил 50. Wu и сор., 2010, во Кина, од вкупно испитани 35 примероци, во еден примерок пилешко месо детектирале

рактопамин и кленбутерол. Suo и сор., 2013, во Кина, од вкупно 300 анализирани примероци добиточна храна, детектирале β -агонисти во 2 примероци и тоа рактопамин 22.4 mg/kg и кленбутерол 0.56 mg/kg. Исто така, Yodrasing и сор., 2015, анализирале 74 примероци добиточна храна во Тајланд (33 примероци биле храна за свињи, 18 примероци биле храна за говеда и 23 примероци биле храна за пилиња) и при тоа детектирале β -агонисти во сите примероци и тоа кленбутерол во 70, салбутамол во 55 и рактопамин во 39 примероци, што значи дека и покрај тоа што употребата на овие супстанции во Тајланд е забранета, некои од сточарите сеуште ги користат како промотори на раст при тов на животните. Ова истражување се потврдува, ако се земе во предвид дека 3 години претходно, во 2012 година, Norron и Noimaу од 261 испитани примероци свински мускул (131) и свински црн дроб (130) во 240 бил детектиран кленбутерол (114 мускул и 126 црн дроб). Sakai и сор., 2016, при анализа на 106 примероци на црн дроб (по 30 примероци говедски и свински и 36 примероци пилешки) од вкупно 14 β -агонисти кои биле вклучени во аналитичкиот метод, детектирале десет и тоа: салбутамол (1), цимбутерол (5), рактопамин (34), кленбутерол (12), бромбутерол (11), тилобутерол (10), мабутерол (36), хидрокси кленбутерол (21), кленпентерол (27) и мапентерол (5). Jeong и сор., 2018, во Кореа, анализирале вкупно 100 примероци од говеда (50 примероци црн дроб од домашно производство и 50 примероци мускул од увоз) на присуство на кленбутерол, рактопамин и зилпатерол, при што во 1 примерок од увоз е детектиран зилпатерол во концентрација 6.3 ng/g.

Добиените резултати по спроведувањето на ова истражување покажаа дека забраната за овие соединенија во РМ се почитува и второ, им дава доверба на потрошувачите дека животинските производи кои стигнуваат до трпезата се ослободени од овие штетни остатоци. Следењето на овие забранети супстанции продолжува и понатаму како дел од националниот мониторинг план за контрола на остатоци од ветеринарни лекови, за да се обезбеди постојана контрола на истите и да се спречи нивна злоупотреба и појава на негативни последици по човековото здравје.

7. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на поставените цели и целокупните резултати од истражувањето, ги донесовме следните заклучоци:

- Со оптимизација на хроматографските услови (избор и состав на мобилна фаза, услови на градиент и проток, тип на колона и температура на колоната) беше добиено оптимално раздвојување на β -агонистите вклучени во оваа истражување, како и пократко ретенционо време, во однос на другите методи каде што е користат подолги колони, со што се скратува времето за анализа на примероци.
- Квантификацијата и идентификацијата на β -агонистите беше извршена врз основа на ретенционото време, продукт јоните добиени со фрагментација на главниот јон, како и врз основа на критериумите пропишани во Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС. При добивање на јоните беше користена позитивна електроспеј јонизација (ESI+), а следењето на јоните се вршеше со MRM (multiple reaction monitoring) модул.
- Оптимизиран и валидиран е селективен, точен, прецизен и потврден LC-MS/MS метод за определување на 10 β -агонисти (кленбутерол, бромбутерол, мабутерол, цимбутерол, кленпентерол, рактопамин, изоксуприн, салбутамол, зилпатерол и тербуталин) во урина, мускул и црн дроб, согласно критериумите на Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС. Резултатите од параметрите вклучени во валидацијата: линеарност, специфичност/селективност, определување на $CC\alpha$ и $CC\beta$, точност и прецизност, ги задоволуваат критериумите на Одлуката на Комисијата 2002/657/ЕС, според што може да заклучиме дека методот е соодветен за намената.
- Задоволителните резултати од учеството на меѓународниот тест за оспособеност „Beta-Agonists in Bovine and Porcine Liver Proficiency Test BETA1116“ дополнително ја потврдуваат точноста на методот.
- Со споредбата на ефикасноста на два типа колони за цврсто-фазна екстракција преку параметрите прецизност и точност, утврдено е дека колоните Discovery® DSC-MCAX, 300 mg/6 ml и Bond Elut-Certify, 500 mg/6 ml се соодветни за определување на β -агонисти во урина и мускул.
- Со споредбата на ефикасноста на два типа колони за цврсто-фазна екстракција преку параметрите прецизност и точност, утврдено е дека колоните Discovery® DSC-

MСAX, 300 mg/6 ml, се соодветни за определување на β -агонисти во црн дроб, додека колоните Strata Screen-C, 500 mg/6 ml, не се соодветни за употреба во овој метод поради тоа што не се детектира зилпатеролот, а критериумите за точност не се исполнети поради тоа што вредностите за аналитичкиот принос за кленбутерол и тербуталин се над пропишаниот максимум.

- Анализата на примероците урина, мускул и црн дроб во период од 3 години (2014-2016) покажа дека забраната за употреба на β -агонисти во РМ се почитува што значи дека животинските производи кои стигнуваат до масата на потрошувачите се слободни од овие штетни остатоци.

Следењето на овие забранети супстанции продолжува и понатаму како дел од националниот мониторинг план за контрола на остатоци од ветеринарни лекови, за да се обезбеди постојана контрола на истите и да се спречи нивна злоупотреба и појава на негативни последици по човековото здравје.

Особено внимание треба да се посвети на увозот на месо и црн дроб, поради фактот што овие супстанции се дозволени за употреба во некои држави во светот, од една страна и поради тоа што постојат голем број на истражувања кои укажуваат на злоупотреби на овие супстанции во некои држави, иако се забранети за употреба, од друга страна.

Со оптимизација и валидација на овој метод Република Македонија доби современ, потврден LC-MS/MS метод за определување на β -агонисти во урина, мускул и црн дроб, кој ќе се акредитира и ќе се користи во рутинска анализа на примероци, а Факултетот за ветеринарна медицина Скопје, го зајакна својот капацитет за уште еден метод, кој е еден од низата на потврдни, современи методи кои се стреми да ги воведе, со цел да биде во чекор со најновите трендови од областа на аналитиката на храна во светски рамки.

8. ЛИТЕРАТУРА

- Ahuja S., Rasmussen H. 2007. "HPLC Method Development for Pharmaceuticals", Elsevier, Academic Press, London
- Allwooda J.W., Goodacre R. 2009. An introduction to liquid chromatography – mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Anal.* 21, 33–47
- Ansari-Pirsaraei Z., Abolghasemi A., Jafari-Sayadi A.R., Jalali-Hajjabadi M.-A. Effects of terbutaline feeding on some blood parameters and carcass characteristics in broiler chicks. 16th European Symposium on Poultry Nutrition. 26 – 30 August, 2007, Strasbourg, France. 483-486
- Avendano-Reyes L., Torres-Rodriguez V., Meraz-Murillo F.J., Perez-Linares C., Figueroa-Saavedra F., Robinson P.H. 2006. Effects of two β -adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 84: 3259–3265
- Badino P., Odore R., Re G. 2005. Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective. *Vet J.* 170: 163–174
- Barbosa J., Cruz C., Martins J., Silva J.M., Neves C., AlveS C., Ramos F., DA Silveira, M.I.N. 2005. Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food. Addit. Contam.* 22(6): 563–566
- Baillie H.W., Cameron B.D., Draffan G.H., Schmid J. 1980 Investigations of the placental transfer of ^{14}C -N-AB 365 CL in the cow. Unpublished report No. 111674 from Inveresk Research International. Submitted to WHO by Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany
- Beermann D.H., Hogue D.E., Fishell V.K, Dalrymple R.H., Ricks C.A. 1986. Effects of cimaterol and fishmeal on performance, carcass characteristics and skeletal muscle growth in lambs. *J. Anim. Sci.* 62 (2): 370-380
- Bing S., Rong Z., Juan M., Ying X., Guohua W. Jianying H., Xiaoming T. 2005. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 548 (1-2): 41–50

- Boucque Ch.V., Fiems L.O, Moermans R. J., Cottynl B.G., Sommer M. 1994. Effect of cimaterol on growth , carcass characteristics and eat quality in double-muscled Belgian White-blue bulls. Short communication. Can. J. Anim. Sci. 74: 707-709
- Brambilla G., Cenci T., Franconi F., Galarini R., Macri A., Rondoni F. 2000. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. Toxicol Lett. 114 (1-3): 47-53
- Bronsema K.J., Bischoff R, van de Merbel N.C. 2012. Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. (893-894): 1-14
- Cindrić, M., Marković A., Horvatić A. 2009. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. Medicina. 45 (3): 218-232
- Courtheyn D., Le Bizec B., Brambilla G.,De Brabander H.F., Cobbaert E., Van de Wiele M., Vercammena J., De Wasch K. 2002. Recent developments in the use and abuse of growth promoters. Anal. Chim. Acta. 473 (1-2): 71–82
- Churchwell I.M., C. Holder L., Little D., Preece S., Smith J.D., Doerge R.D. 2002. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric analysis of incurred ractopamine residues in livestock tissues. Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (13): 1261–126
- Commission Regulation (EU) no 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union L 15/1 from 20.01.2010
- Commission of the European Communities: European Commission Decision of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results (2002/657/EC), Off. J. Eur. Comm., L 221: 8-36
- Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990, laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. OJ L 224, 18.8.1990
- Cronly M. 2011. Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for the analysis of veterinary drugs in various biological and feed matrices utilizing efficient extraction protocols. Dublin Institute of Technology

- CRL guidance paper. 07.12.2007. CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans, 4-5
- Cunningham H. M. 1965. Effect of epinephrine and nicotine on protein and fat metabolism of pigs. In: K. L. Blaxter (Ed.) Energy Metabolism. pp 29–36. Academic Press, New York.
- Daeseleire E., Van Pamel E., Van Poucke C., Croubels S. 2017. Chemical contaminants and residues in food (Second Edition), Chapter 6 - Veterinary Drug Residues in Foods. ISBN: 978-0-08-100674-0, pp. 117-141
- Dayton W.R., White E.M. 2013. Mechanisms of anabolic steroid action in bovine skeletal muscle. Chapter 1. Cobb and Smith; Evaluating veterinary pharmaceutical behavior in the environment ACS symposium series; American Chemical Society: Washington, DC. P. 1-12
- Dalidowicz J.D., Babbitt G.E. 1986. Characterization of ^{14}C residues in tissues and excreta from swine fed ^{14}C -ractopamine HCl. Unpublished Report No. ABC-0355 from Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, Indiana, USA. Submitted to WHO by Elanco Products Company, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA
- Dong W.M. 2006. Modern HPLC for practicing scientists. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
- Doyle E. 2000. Human safety of hormone implants used to promote growth in cattle. A Review of the Scientific Literature. FRI Briefings. Food Research Institute University of Wisconsin Madison, USA
- Dürsch I., Meyer D. H. H. 1992. Multi-residue enzyme immunoassay for screening illegally used β -agonists. Food. Agric. Immunol. 4 (4): 211-218
- Pou K., Adam A., Lamothe P., Gravel P., Messier J., Gravel A., Ong H. 1992. Serum and urinary levels of salbutamol after chronic oral administration in a calf. Can. Vet. J. 33 (7): 467-468
- De Wasch K., De Brabandera H., Courtheyn D. 1998. LC-MS-MS to detect and identify four beta-agonists and quantify clenbuterol in liver. Analyst. 123: 2701–2705
- Du Toit R. 2017. The influence of R-Salbutamol on feedlot performance, carcass characteristics and meat quality in Dorper ram, wether and ewe lambs. Thesis. Stellenbosch University, South Africa

- EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA Supporting publications 2016; 13 (5): EN-923, pp 70
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017. Technical report of EFSA: Report for 2015 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publications 2017: EN-1150, pp 69. Available online, <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/1150e.htm>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Technical report of EFSA: Report for 2016 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publications 2018:EN-1150, pp 69. Available online, <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1358>
- Elliott C.T., Crooks S.R.H., McEvoy J.G.D., McCaughey W.J., Hewitt S.A., Patterson D., Kilpatrick D. 1993a. Observations on the effects of long-term withdrawal on carcass composition and residue concentrations in clenbuterol-medicated cattle. *Vet.Res. Commun.* 17 (6): 459-468
- EN ISO/IEC 17043:2010, Conformity assessment - General requirements for proficiency testing
- Estrada-Montoya M.C., González-Córdova A.F., Torrescano G., Camou J.P., Vallejo-Cordoba B. 2008. Screening and confirmatory determination of clenbuterol residues in bovine meat marketed in the Northwest of Mexico. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6 (2): 130-136
- European Union (1996). – Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of β -agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. *Off. J. Eur. Union*, L 125 of 23.5.1996
- European Union (1996). – Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Union*, L 125 of 23.5.1996
- European Union and National Reference Laboratory for Residues. Analytical method. Confirmatory method for the determination of beta-agonists in liver with LC-MS/MS. Code: BETA_013, 2003

- European Union and National Reference Laboratory for Residues. Analytical method. Confirmatory method for the determination of beta-agonists in urine with LC-MS/MS. Code: BETA_014, 2006
- European medicines Agency. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000165.jsp. 16.03.2018
- Fesser C.E.A, Dickson C.L, Macneil D.J, Patterson R.J., Lee S, Gedir R. 2005. Determination of β -Agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 88 (1): 61-69
- Fiems L.O. 1987. Effect of beta-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. *Ann. Zootech.* 36 (3): 271-290
- Gabr Faten I., Hassan T.A., El-Maaty A., Amal M., Aotifa, A.M.A. 2009. Effects of growth promoter Boldenone undecylenate on weaned male lambs. *Nature and Science.* 7 (3): 61-69
- Gandhi R., Snedeker M.S. 2000. Consumer concerns about hormones in food. Cornell University Program on Breast Cancer and Environmental Risk Factors in New York State (BCERF). Fact sheet #37
- Giannettia L., Ferretti G., Gallo V., Necci F., Giorgi A., Marini F, Gennuso E., Neria B. 2016. Analysis of beta-agonist residues in bovine hair: Development of a UPLC–MS/MS method and stability study. *J. of Chromatogr. B.* 1036: 76–83
- Gowik P., Jülicher B., Ladwig M., Behrendt D. 2000. Measurement of β -agonist residues in retinal tissue of food producing animals. *Analyst.* (125): 1103–1107
- Granja R.H.M.M., Montes Niño A.M., Rabone F., Montes Niño R.E, Cannavan A., Gonzalez Salerno A. 2008. Validation of radioimmunoassay screening methods for -agonists in bovine liver according to Commission Decision 2002/657/EC. *Food Addit. Contam.* 25 (12): 1475–1481
- Hajrulai-Musliu Z., Uzunov R., Stojkovski V., Dimitrieska-Stojkovic E., Stojanovska-Dimzoska B., Sekulovski P. Determination of clenbuterol in meat samples with ELISA and GC-MS Method. 1st Annual International Interdisciplinary Conference, AIIC, 24-26 April 2013, Azores, Portugal, Proceedings, 817-824

- Han H., Kim B., Lee S.G., Kim J. 2013. An optimised method for the accurate determination of zeranol and diethylstilbestrol in animal tissues using isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Chem.* 140 (1-2): 44–51
- Hawkins D.R., Elsom L.F., Dighton M.H., Kaur A., Cameron D.M. 1993. The pharmacokinetics, metabolism and residues of ^{14}C -clenbuterol (^{14}C -N-AB 365 CL) following intramuscular administration to calves. Unpublished report No. HRC/BOI 140/921418 from Huntingdon Research Centre. Submitted to WHO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany
- Hung M.J., Huang H.H., Chen L.C., Wu J.Y., Katie Marie Dixon M.K., Mao L.C. 2010. Salbutamol residues in swine tissues and body fluids after feeding. *Thai J. Vet. Med.* 40 (4): 399-404
- International Atomic Energy Agency (IAEA). 2003. Report of the Second Research Coordination Meeting of the Coordinated Research Project ‘development of strategies for the effective monitoring of veterinary drug residues in livestock and livestock products in developing countries’; [cited 2008 Jun 11]. Available from: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/fep/crp/2nd-rcmnov03.pdf/>. 22.04.2018
- Izquierdo-Lorenzo I., Sanchez-Cortes S., Garcia-Ramos J. V. 2010. Adsorption of beta-adrenergic agonists used in sport doping on metal nanoparticles: A Detection Study Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Langmuir.* 26 (18): 14663–14670
- Jaipal. 2013. Beta 2 Agonist: Therapeutic use exemption, misuse in sports and its adverse effect on health. *IJSR.* 2 (12): 220-223
- Jeong K., Hossain M.A., Park H.C., Son S.W., Kang J.W. 2018. Simultaneous determination of β -agonists and monitoring in bovine tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Acta Vet. Brno.* 87: 47-54
- Johansson M.A. 2004. Immunosensor methods for drug residue control of food. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. ISBN 91-576-6475-7
- Johnson J.B., Smith B.S., Yong Chung K. 2014. Historical overview of the effect of β -adrenergic agonists on beef cattle production. *Asian Australa. J. Anim. Sci.* 27 (5): 757-766

- Jones R.W., Easter R.A., McKeith F.K., Dalrymple R.H., Maddock H.M., Bechtel P.J. 1985. Effect of the β -Adrenergic agonist Cimaterol (CL 263,780) on the growth and carcass characteristics of finishing swine. *J. Anim. Sci.* 61 (4): 905-913
- Karamolegou F., Dasenaki M., Belessi V., Georgakilas V., Thomaidis N. 2018. Multi-residue determination of 7 β -agonists in liver and meat using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Anal. Methods.* 11 (10): 2925-2942
- Kay F.J., MacNeil D.J., Wang J. 2017. Chemical analysis of non-antimicrobial veterinary drug residues in food. John Wiley & Sonc, Inc., Hobocen, New Jersey, ISBN 978111932591, pp 141-244
- Kumar P. 2014. Methodologies for the analysis of veterinary drugs and growth promoters in the scope of food safety control. PhD thesis. Department of analytical chemistry, Faculty of chemistry, University of Barcelona
- Le Bizec B., Monteau F., Maume D., Montrade M. P., Gade C., Andre F. 1997. Detection and identification of thyreostats in the thyroid gland by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 340 (1-3): 201-208
- Li J., Chen Y., Su Y.O, Ding X.M., Xia W.S, Liu H.M., Zhang Y.B. 2017. Single-step multiresidue determination of β -lactam antibiotics and β -agonists in porcine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods.* 10 (7): 2185-2193
- Li L., Zhang J., Tang C., Zhao Q. 2014. Accumulation of clenbuterol residues in the hair of chinese simmental beef cattle during and after treatment. *J. Anal. Toxicol.*, 38: 52 –56
- Lin Y.P., Lee Y.L., Hung C.Y., Huang W.J., Lin S.C. 2017. Determination of multiresidue analysis of β -agonists in muscle and viscera using liquid chromatograph/tandem mass spectrometry with Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe methodologies. *J. Food Drug Anal.* 25 (2): 275-284
- Liu X., He X., Moore C., Wang G., Coulter C. 2009. Highly Sensitive and Specific Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Testing Ractopamine in Cow and Sheep Urine. *J. Anal. Toxicol.* 33 (6): 289-293
- Marilena D. 2015. Development of methods for the determination of veterinary drugs in food matrices by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. Doctoral thesis. National and Kapodistrian University of Athens, Greece

- Martínez-Navarro, J.F. 1990. Food poisoning related to the consumption of illicit β -agonists in liver. *The Lancet*. 336 (8726): 1311
- Mersmann H.J. 1998. Overview of the Effects of b-Adrenergic Receptor Agonists on Animal Growth Including Mechanisms of Action. *J. Anim. Sci.* 76 (1): 160-172
- Mersmann H.J. 2015. Beta-Adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. *J. Anim. Sci.* 80 (E. Suppl. 1): E24–E29.
- Mitchell A.D. 2009. Effect of ractopamine on growth and body composition of pigs during compensatory growth. *Animal*. 3 (1): 173–180
- Morgan D. J. 1990. Clinical pharmacokinetics of beta-agonists. *Clin. Pharmacokin.* 18 (4): 270-294
- Nielen M.W F., Lasaroms J.J.P., Essers M.L., Oosterink J.E., Meijer T., Sanders M.B., Zuidema T., Stolker A.A.M. 2008. Multiresidue analysis of beta-agonists in bovine and porcine urine, feed and hair using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (1): 199–210
- Noppon B., Noimay P. 2012. Monitoring of beta agonist residues in swine tissues from northeastern Thailand. *IJAS*. 5 (4): 151–155
- Nourozi M., Abazari M., Mohammadi M., Raisianzadeh M., ZareShahne A. 2005. Effect of two beta-adrenergic agonists on performance and carcass composition of an Iranian native breed of sheep. *PJN*. 4 (6): 384-388
- Pleadin J., Terzić S., Perši N., Vulić A. 2011. Evaluation of steroid hormones anabolic use in cattle in Croatia. *Biotech. Anim. Husbandry*. 27 (2): 147-158
- Pleadin J., Vulic A., Mitak M., Perši H., Milic D. 2011. Determination of clenbuterol residues in retinal tissue of food-producing pigs. *J. Anal. Toxicol.* 35 (1): 28-31
- Pleadin J., Vulic A., Perši H., Milic D. Vahcic N. 2011. Ractopamine and clenbuterol urinary residues in pigs as food-producing animals. *Food Technol. Biotechnol.* 49 (4): 517–522
- Pleadin J., Vulic A., Perši N., Radeck W. 2012. Determination of ractopamine residues in pigs by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. InTech. ISBN 978-953-51-0141-3. 331-354

- Pleadin J., Vulic A., Perši N., Terzić S., Andrišić M., Žarković I., Šandor K., Perak E. 2013. Comparison of ractopamine residue depletion from internal tissues. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35 (1): 88–92
- Pleadin J., Vulic A., Terzic S., Vahcic N., Sandor K., Perak E. 2014. Comparison of accumulation of clenbuterol and salbutamol residues in animal internal tissues, non-pigmented eyes and hair. *J. Anal. Toxicol.* 38 (9): 681-685
- Radišić M. 2013. Razvoj i primena metode tačne hromatografije–tandem masene spektrometrije za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu Tehnološko-Metalurški fakultet, Beograd, Srbija
- Raun P.A., Preston L.R. 2002. History of diethylstilbestrol use in cattle. American Society of Animal Science, Savoy, IL, USA. 1-7
- Ricks C.A., Baker P.K., Dalrymple R.H. 1984. Use of repartitioning agents to improve performance and body composition of meat animals. *Reciprocal Meat Conf. Proc.* 37: 5–11
- Rubenstein L.A., Zauhar R.J., Lanzara R.G. 2006. Molecular dynamics of a biophysical model for beta2-adrenergic and G protein-coupled receptor activation. *J. Mol. Graph. Model.* 25 (4): 396–409
- Sakai T., Hitomi T., Sugaya K., Kai S., Murayama M., Maitani T. 2007. Determination method for ractopamine in swine and cattle tissues using LC/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 48 (5): 144-147
- Sakai N., Sakai M., Haron D.E.M., Yoneda M., Mohd M.A. 2016. Beta-agonist residues in cattle, chicken and swine livers at the wet market and the environmental impacts of wastewater from livestock farms in Selangor State, Malaysia. *Chemosphere.* 165: 183-190
- Salleras L., Dominguez A., Mata E., Taberner J.L., Moro I., Salva P. 1995. Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Rep.* 110 (3): 338-342
- Schmid, J. 1990a. Plasma levels and residue analysis in cows and calves. Unpublished report No. U90-0092. Submitted to WHO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany
- Smith D.J., Paulson G.D. 1997. Distribution, elimination, and residues of [¹⁴C]clenbuterol hcl in holstein calves. *J. Anim. Sci.* 75 (2): 454–461

- Smith D. J. 1998. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.* 76 (1): 173–194
- Song K.M., Ho Choi S. 2001. Growth promoters and their effects on beef production – Review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 14 (1): 123-135
- Spiric A., Jankovic S., Radicevic T. 2001. The use of growth promoters in animal breeding, their influence on meat quality and the importance of residue control. *Meat technology, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade.* 42 (5-6): 295-307
- Stephany W. Rainer. 2010. Hormonal growth promoting agents in food producing animals. *Handbook of Experimental Pharmacology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.* 195: 355-367
- Sporano V., Grasso L., Esposito M., Oliviero G., Brambilla G., Loizzo A. 1998. Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.* 40 (3): 141-143
- Stoffel B., Meyer H.H.D. 1993. Effects of the β -Adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics, and residues. *J. Anim. Sci.* 71 (7): 1875-1881
- Stojanovic B. 2013. Validacija gasno-hromatografskih metoda za određivanje organskih zagađivaca, Master rad. Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju. Univerzitet u Nišu, Srbija
- Suppadit T. 2004. The effect of beta-agonist (salbutamol) residue in pork on consumer health. *J. Environ. Manage.* 1 (1): 1-11
- Taşçi F. 2014. Determination of diethylstilbestrol residue in raw meat sold in Burdur. *JABS.* 8 (3): 32-34
- Uzunov R., Hajrulai-Musliu Z., Dimitrieska-Stojkovic E., Stojanovska-Dimzoska B., Sekulovski P., Stojkovski V. 2013. Use of ELISA for preliminary screening of 19 nortestosterone anabolic steroid in cattle meat in Republic of Macedonia. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 19 (1): 173-177
- Uzunov R., Hajrulai-Musliu Z., Stojanovska-Dimzoska B., Dimitrieska-Stojkovic E., Todorovic A., Stojkovski V. 2013. Validation of screening method for determination of methyltestosterone in fish. *Mac. Vet. Rev.* 36 (1): 19-23

- Valladares-Carranza B., Banuelos-Valenzuela R., Pena-Betancourt D.S., Velazquez-Ordenez V., Echavarría-Chairez G.F., Ortega-Santana C., Sanchez-Torres E.J., Lozano-Carbajal B. 2017. Effect of clenbuterol hydrochloride on weight gain and histological lesions in mice. *Rev. Med Vet.* 35: 129-136
- Vanden Bussche J., Vanhaecke L., Deceuninck Y., Verheyden K., Wille K., K. Bekaert, Le Bizec B., De Brabander H.F. 2010. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantifying thyreostats in urine without derivatisation. *J. of Chromatogr. A.* 1217 (26): 4285–4293
- Van Hoof N., Schilt R, Van Der Vlis E., Boshuis P., Van Baak M., Draaijer A., De Wasch K., Van De Wiele M., Van Hende J., Courtheyn D., De Brabander H. 2005. Detection of zilpaterol (Zilmax®) in calf urine and faeces with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 529 (1-2): 189–197
- Vogeser M. Parhofer K.G. 2007. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS / MS) – technique and applications in endocrinology. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 115: 559– 570
- Vulic A., Pleadin J., Perši N., Stojkovic R., Ivankovic S. 2011. Accumulation of β -agonists clenbuterol and salbutamol in black and white mouse hair. *J. Anal. Toxicol.* 35 (8): 566-570
- Vulic A., Pleadin J., Perši N., Milic D., Radeckc W. 2012. UPLC–MS/MS determination of ractopamine residues in retinal tissue of treated food-producing pigs. *J. Chromatogr. B Technol. Biomed. Life Sci.* 895– 896: 102– 107
- Wang S., Wang H. 2007. Analytical methods for the determination of zeranol residues in animal products: A review. *Food Addit. Contam.* 24 (6): 573–582
- Warriss P.D., Kestin S.C., Rolph T.P., Brown S.N. 1990. The effects of the beta-adrenergic agonist salbutamol on meat quality in pigs. *J. Anim. Sci.* 68 (1): 128-136
- WHO (2004). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. *Food additives series:* 53
- (WHO) (1996). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. *Food Addit Series:* 38

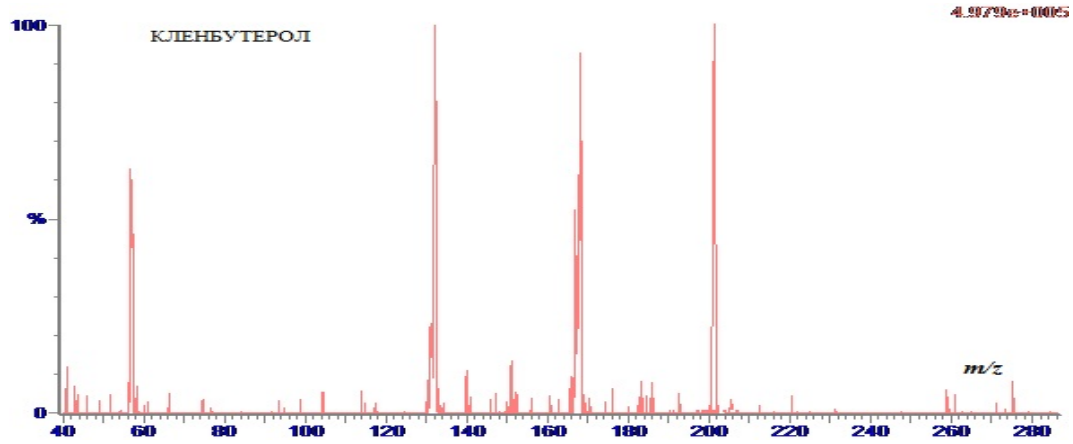
- Wood A., Foo K.T., Ahmad M., Fagan M.J. 2010. Clenbuterol: Effects and usage in livestock and show animals. Rutgers, the State University of New Jersey. 1-24. <https://doi.org/doi:10.7282/T3G73BNN>
- Woodward K.N. 2005. Veterinary pharmacovigilance. Part 2. Veterinary pharmacovigilance in practice – the operation of a spontaneous reporting scheme in a European Union country – the UK, and schemes in other countries. J. Vet. Pharmacol. Therap. 28 (2): 149–170
- Wu Y. N, Miao H., Fan S., Zhao Y., F. 2010. Determination of 23 β_2 -agonists and 5 β -blockers in animal muscle by high performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. Sci. China Chem. 53 (4): 832-840
- Yimlamai T. 2004. The effects of hindlimb unweighting and beta 2-agonist on the ubiquitin-proteasome pathway and insulin-like growth factor I. Doctoral thesis. University of Florida
- Yodrasing P., Boontanon N., Boontanon K.S., Polprasert C. 2015. Analysis of beta-agonists in animal feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and health risk assessment. International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015) April 7-8, 2015 Phuket (Thailand), 58-61
- Zalco D., Bories G., Tulliez J. 1996. Comparative metabolism of 3H-clenbuterol in the rat and bovine. Proceedings of the EuroResidue III Conference, Haagsma, N. & Ruiter, A. (Eds.), Utrecht, the Netherlands, 993-997
- Zhang L.Y., Chang B.Y., Dong T., He P.L., Yang W.J., Wang Z.Y. 2009. Simultaneous determination of salbutamol, ractopamine and clenbuterol in animal feeds by SPE and LC–MS. J. Chromatogr. Sci. 47 (4): 324-328
- Закон за безбедност на храна, Службен весник на Република Македонија, број 157, 2010, стр. 1-76
- „Правилник за барањата за учество во тестирања на оспособеноста и во меѓулабораториски споредби“, Р 06. Институтот за Акредитација на РМ, 2010.
- Правилник за начинот на вршење на мониторинг и контрола на присуството на резидуи и контаминенти во живите животни и храната од животинско потекло, начинот на вршење на официјалните контроли и постапките за мониторинг и контрола на резидуи и недозволен супстанции и мерките кои се преземаат во случај

на сомнение и на позитивен наод на присуство на резидуи и недозволен супстанции, Службен весник на Република Македонија, број 80, 2011, стр. 38-54

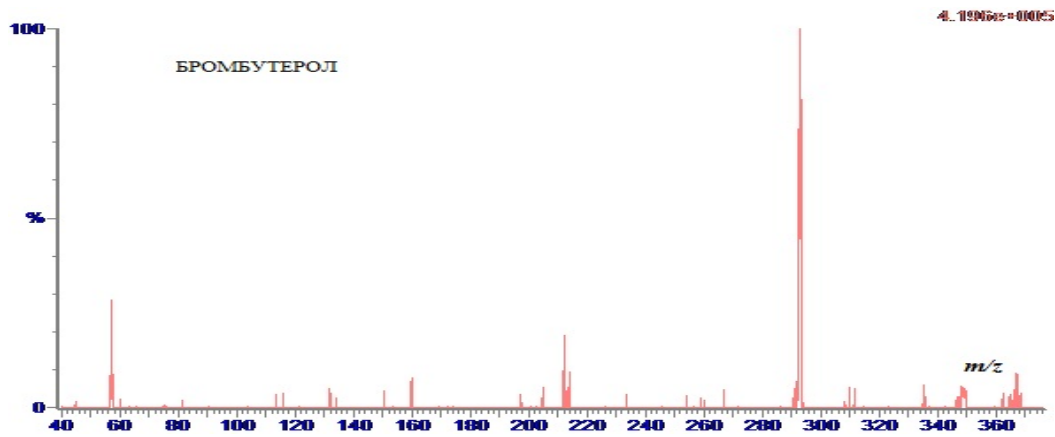
- Решение за забрана за производство, поседување, продажба, снабдување и/или употреба на одредени видови ветеринарно-медицински препарати, Службен весник на Република Македонија, број 132, 2010. стр.2-3
- Ѓирић А. 2014. Оптимизација и валидација течно-хроматографске методе за одређивање флаванона и нивових деривата у фармацевтским формулацијама и храни. Докторска дисертација. Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Србија

9. ПРИЛОЗИ

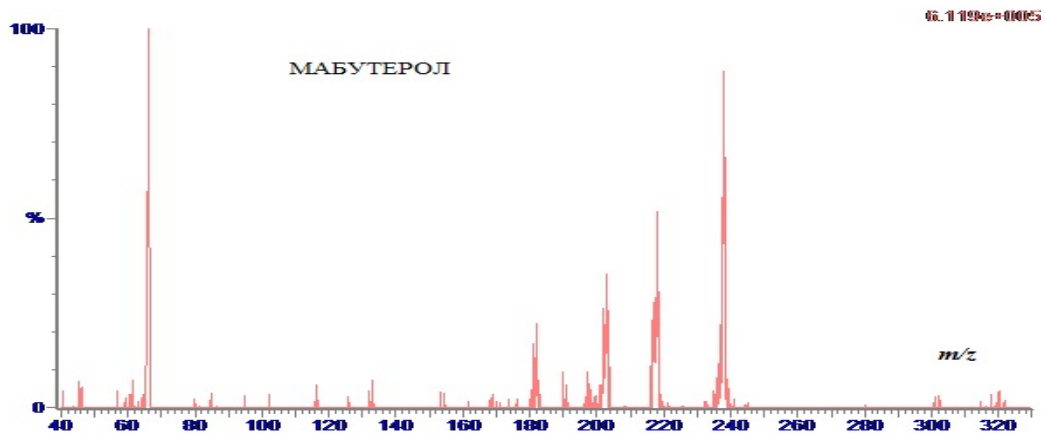
9.1 Прилог 1. Масени спектри од β -агонисти



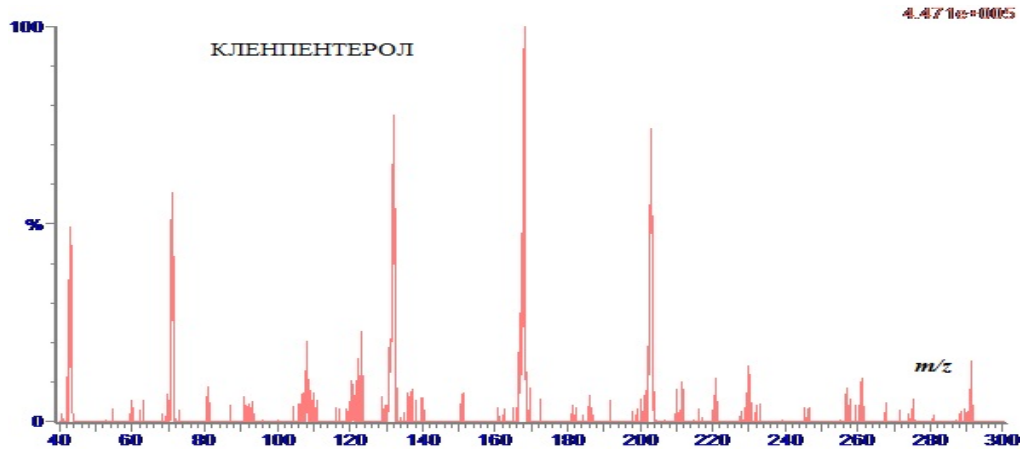
Слика П-1. Масен спектар кленбутерол



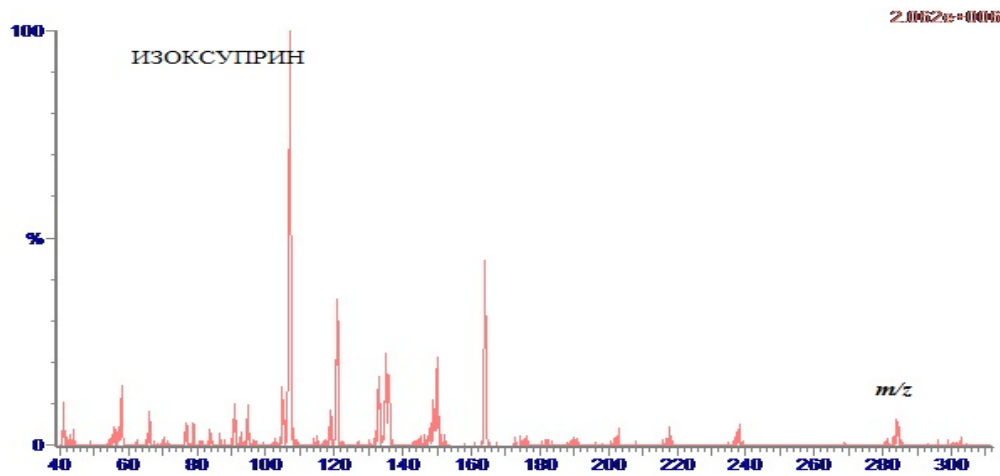
Слика П-2. Масен спектар бромбутерол



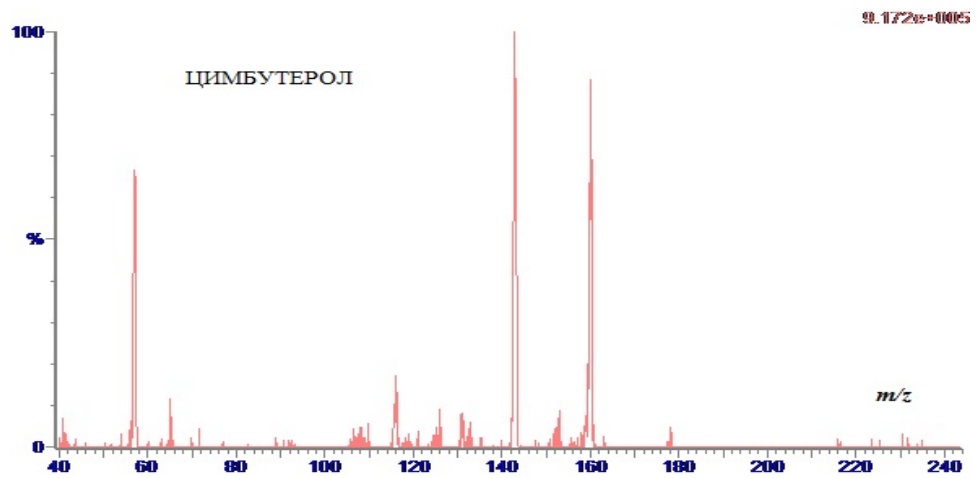
Слика П-3. Масен спектар мабутерол



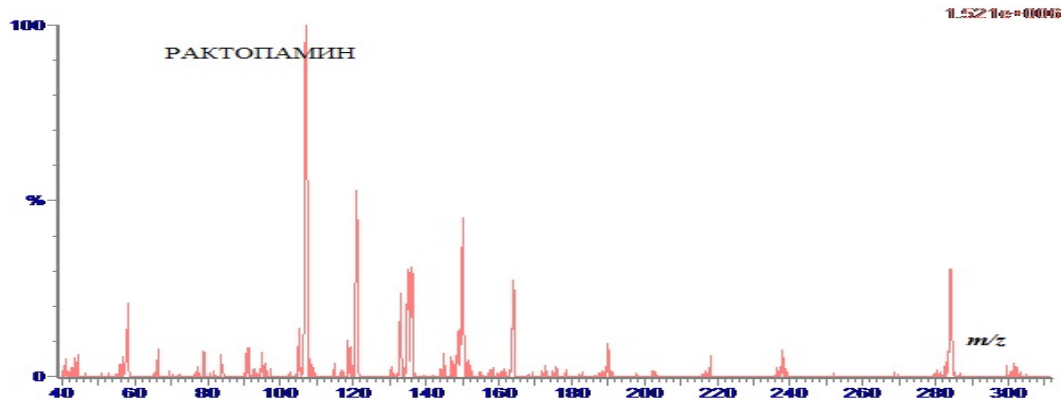
Слика П-4. Масен спектар кленпентерол



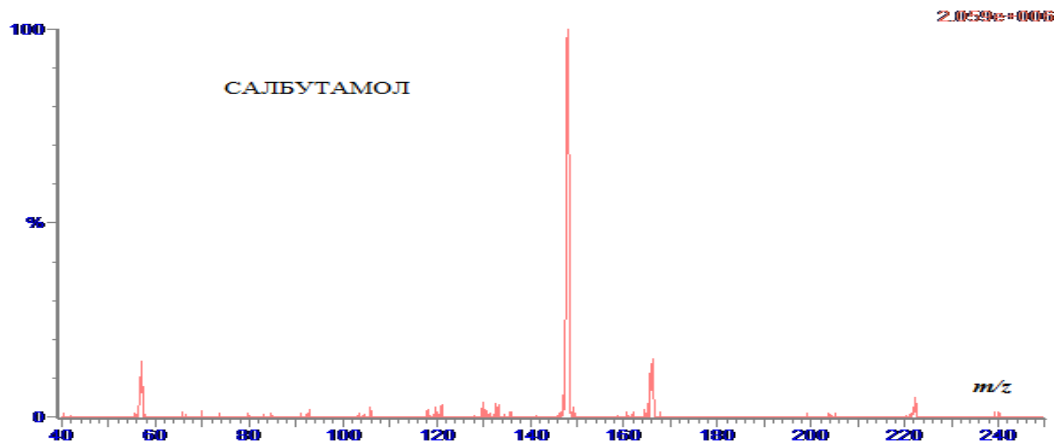
Слика П-5. Масен спектар изоксуприн



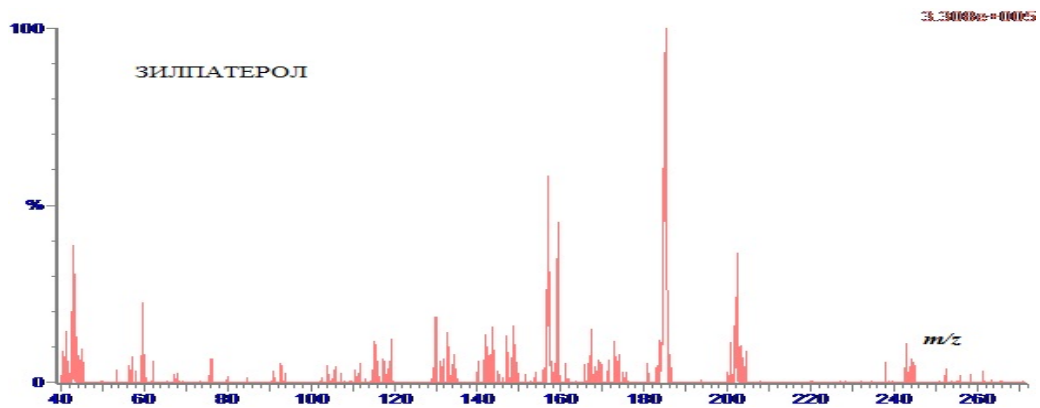
Слика П-6. Масен спектар цимбутерол



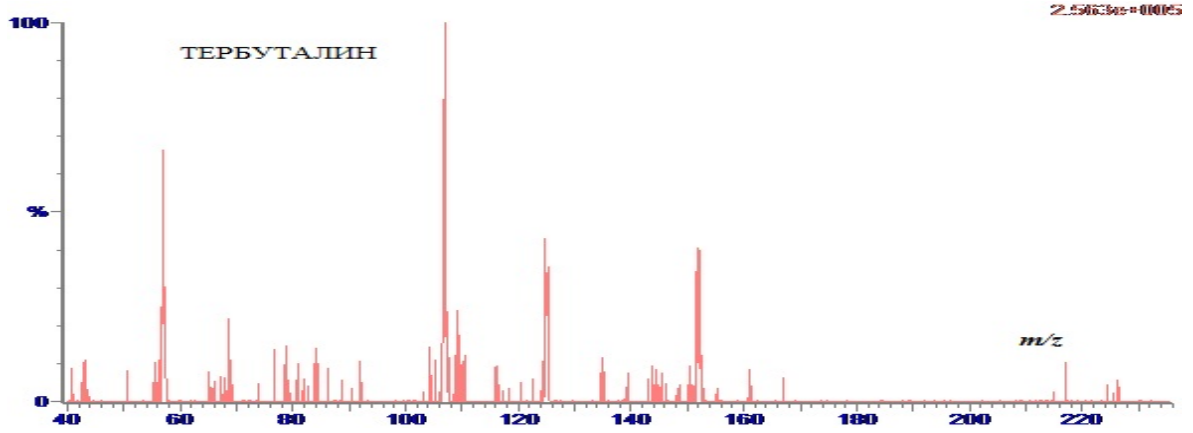
Слика П-7. Масен спектар рактопамин



Слика П-8. Масен спектар салбутамол



Слика П-9. Масен спектар зилпатерол



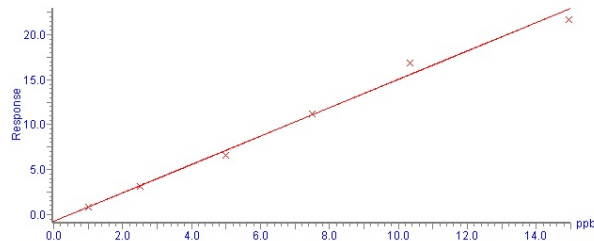
Слика П-10. Масен спектар тербуталин

9.2 Прилог 2. Линеарност на методот

9.2.1 Прилог 2а. Линеарност на методот урина

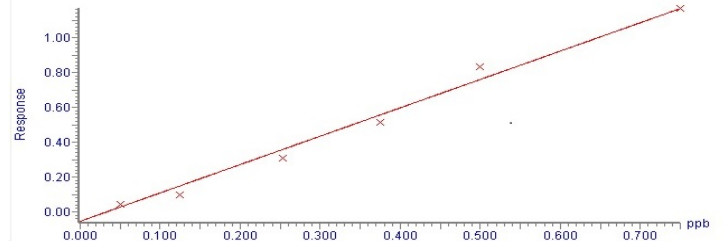
Compound name: Clenbuterol Hcl (1)
Correlation coefficient: $r = 0.990052$, $r^2 = 0.980204$
Calibration curve: $1.58049 * x + -0.761311$
Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Clenbuterol Hcl (1)
Correlation coefficient: $r = 0.992580$, $r^2 = 0.985214$
Calibration curve: $1.62733 * x + -0.0536149$
Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

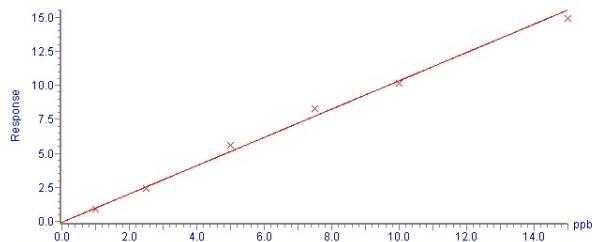
ММ



Слика П-11. Калибрациона крива на кленбутерол за урина во мобилна фаза и во матрикс

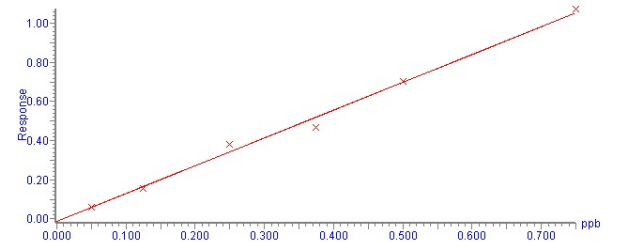
Compound name: brombuterol
Correlation coefficient: $r = 0.997671$, $r^2 = 0.995347$
Calibration curve: $1.038 * x + -0.0499458$
Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: brombuterol
Correlation coefficient: $r = 0.996734$, $r^2 = 0.993479$
Calibration curve: $1.42236 * x + -0.0127339$
Response type: Internal Std (Ref 12), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

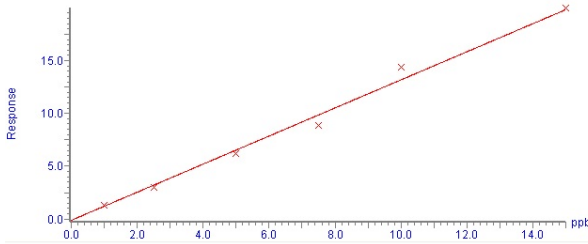
ММ



Слика П-12. Калибрациона крива на бромбутерол за урина во мобилна фаза и во матрикс

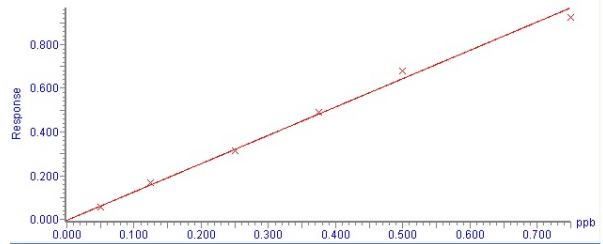
Compound name: Mabuterol HCl
 Correlation coefficient: $r = 0.995937$, $r^2 = 0.991890$
 Calibration curve: $1.32932 * x + -0.114321$
 Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Mabuterol HCl
 Correlation coefficient: $r = 0.998297$, $r^2 = 0.996597$
 Calibration curve: $1.29588 * x + -0.00382301$
 Response type: Internal Std (Ref 13), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

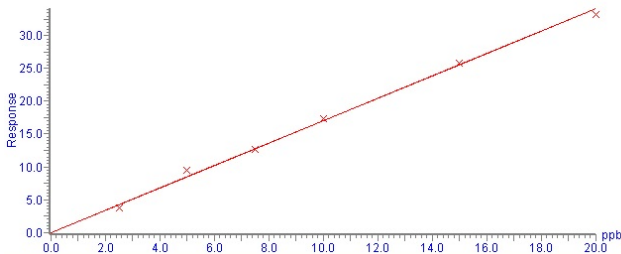
ММ



Слика П-13. Калибрациона крива на мабутерол за урина во мобилна фаза и во матрикс

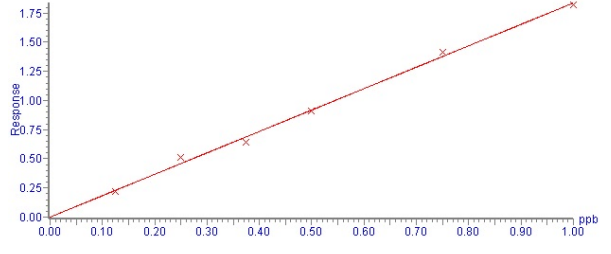
Compound name: Clenpenterol HCL
 Correlation coefficient: $r = 0.997283$, $r^2 = 0.994573$
 Calibration curve: $1.71096 * x + -0.0662866$
 Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Clenpenterol HCL
 Correlation coefficient: $r = 0.997464$, $r^2 = 0.994935$
 Calibration curve: $1.83784 * x + -0.000404138$
 Response type: Internal Std (Ref 16), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

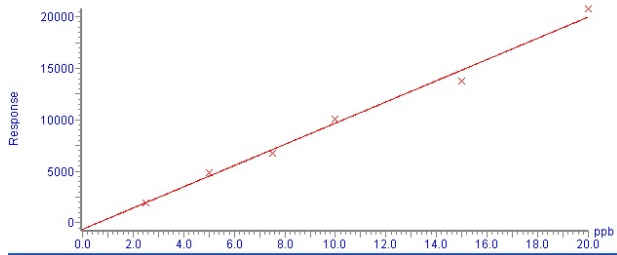
ММ



Слика П-14. Калибрациона крива на кленпентерол за урина во мобилна фаза и во матрикс

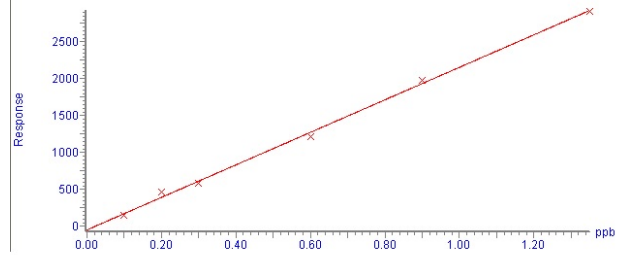
Compound name: Isoxsuprine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.996616$, $r^2 = 0.993244$
 Calibration curve: $1030.46 * x + -620.697$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Isoxsuprine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.997548$, $r^2 = 0.995103$
 Calibration curve: $2202.93 * x + -46.9075$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

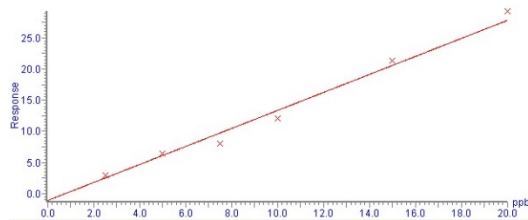
ММ



Слика П-15. Калибрациона крива на изоксуприн за урина во мобилна фаза и во матрикс

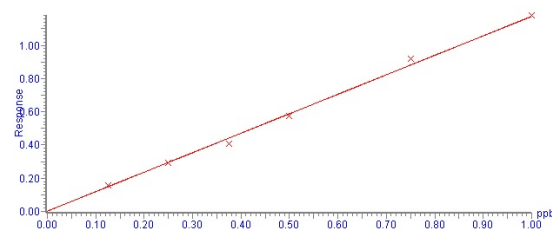
Compound name: Cimbuterol
 Correlation coefficient: $r = 0.991636$, $r^2 = 0.983342$
 Calibration curve: $1.44594 * x + -1.09512$
 Response type: Internal Std (Ref 14), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ

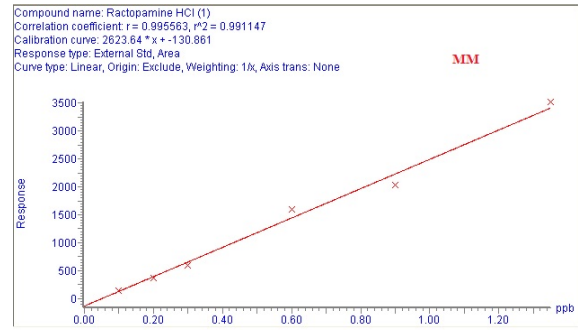
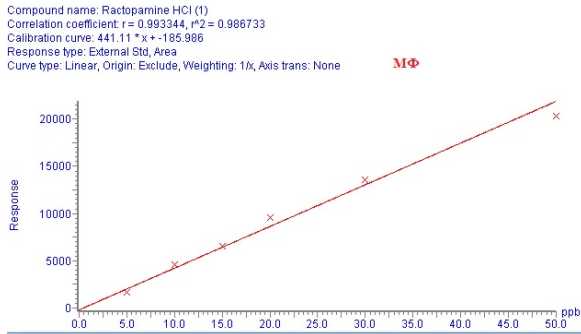


Compound name: Cimbuterol
 Correlation coefficient: $r = 0.997927$, $r^2 = 0.995858$
 Calibration curve: $1.17307 * x + 0.00185028$
 Response type: Internal Std (Ref 14), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

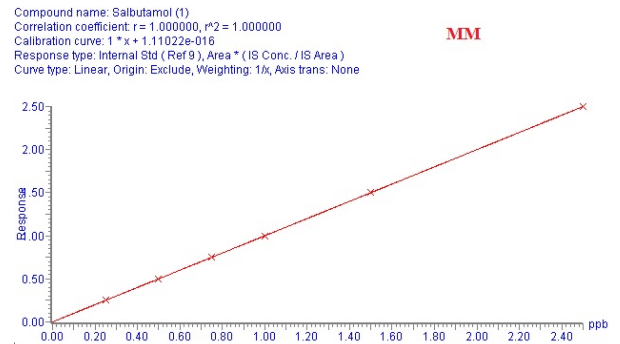
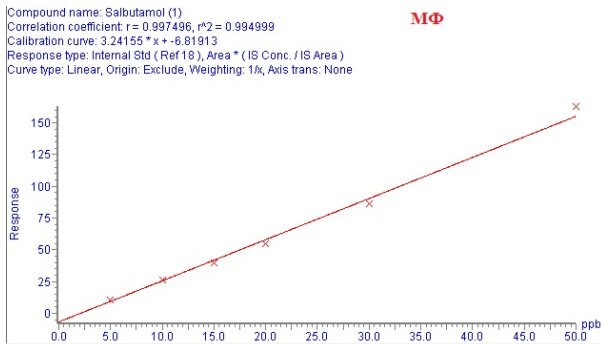
ММ



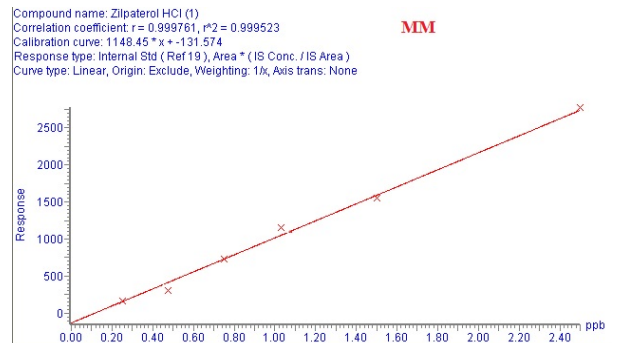
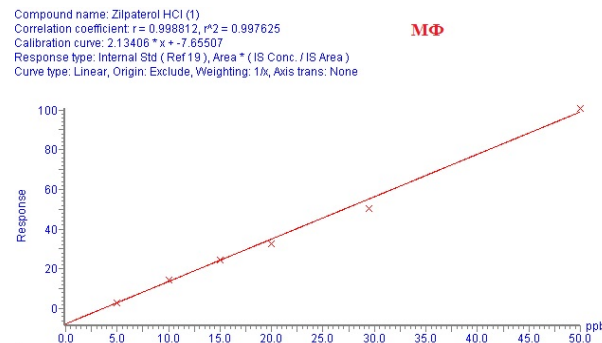
Слика П-16. Калибрациона крива на цимбутерол за урина во мобилна фаза и во матрикс



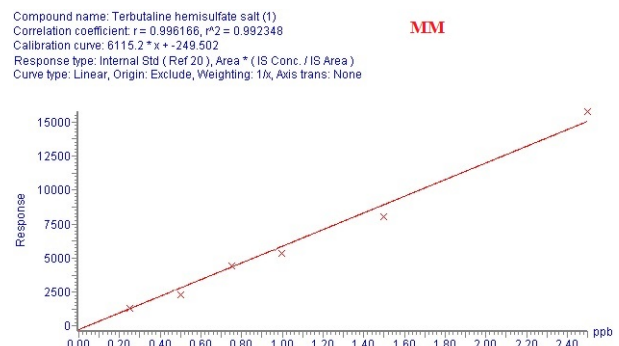
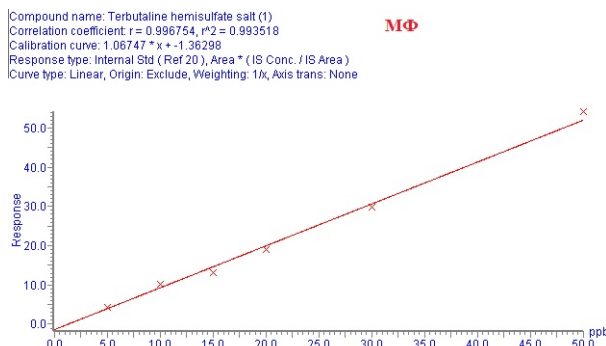
Слика П-17. Калибрациона крива на рактопамин за урина во мобилна фаза и во матрикс



Слика П-18. Калибрациона крива на салбутамол за урина во мобилна фаза и во матрикс

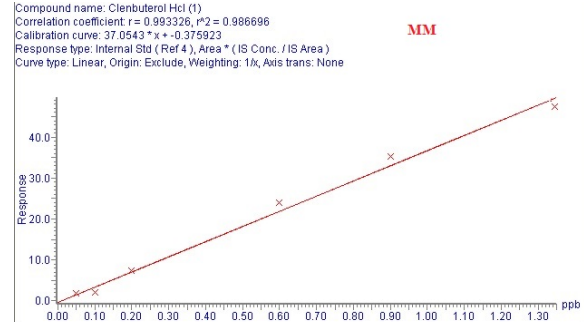
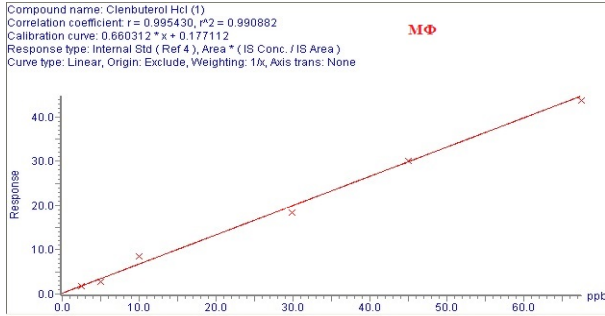


Слика П-19. Калибрациона крива на зилпатерол за урина во мобилна фаза и во матрикс

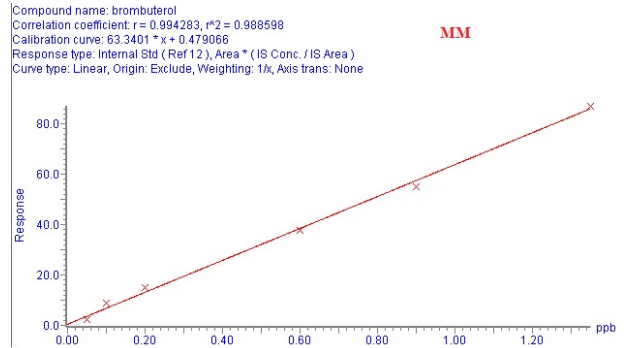
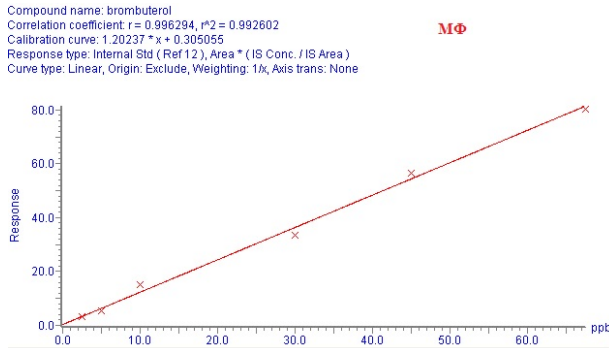


Слика П-20. Калибрациона крива на тербуталин за урина во мобилна фаза и во матрикс

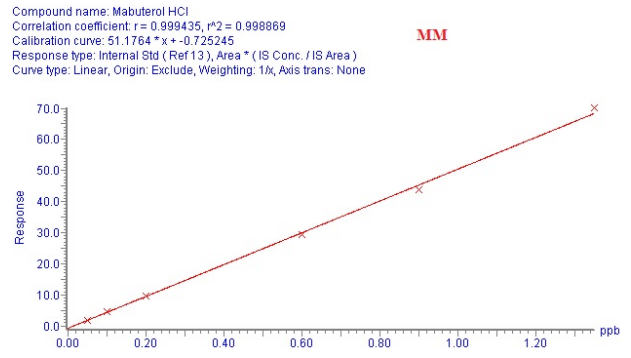
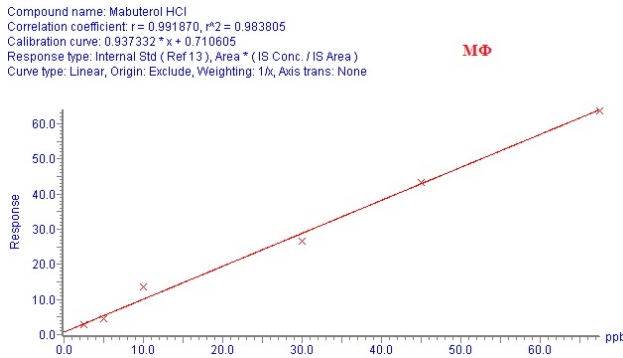
9.2.2 Прилог 2б. Линеарност на методот мускул



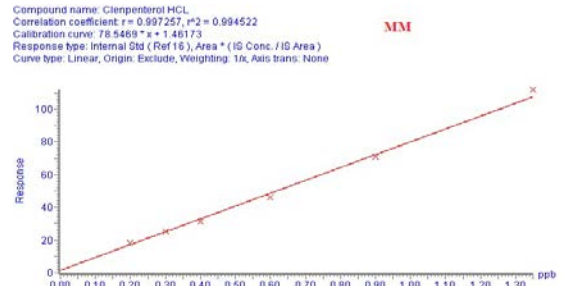
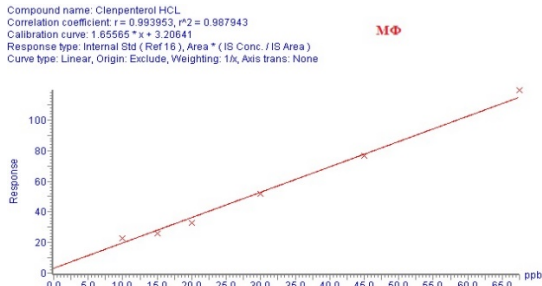
Слика П-21. Калибрациона крива на кленбутерол за мускул во мобилна фаза и во матрикс



Слика П-22. Калибрациона крива на бромбутерол за мускул во мобилна фаза и во матрикс

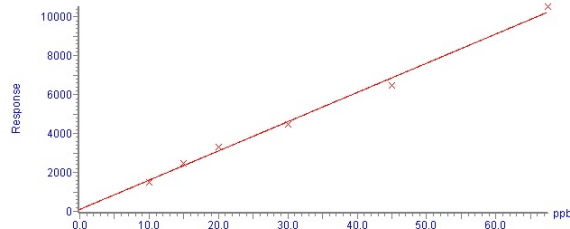


Слика П-23. Калибрациона крива на мабутерол за мускул во мобилна фаза и во матрикс

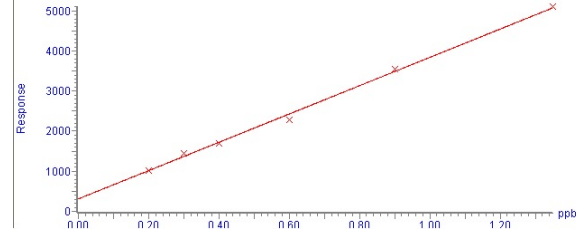


Слика П-24. Калибрациона крива на кленпентерол за мускул во моб. фаза и во матрикс

Compound name: Isosuprine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.996611$, $r^2 = 0.993234$
 Calibration curve: $150.312 * x + 101.803$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

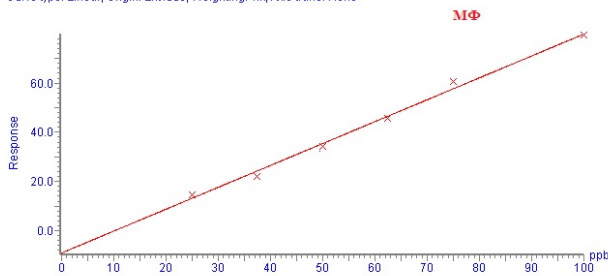


Compound name: Isosuprine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.998104$, $r^2 = 0.996212$
 Calibration curve: $3528.95 * x + 310.913$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

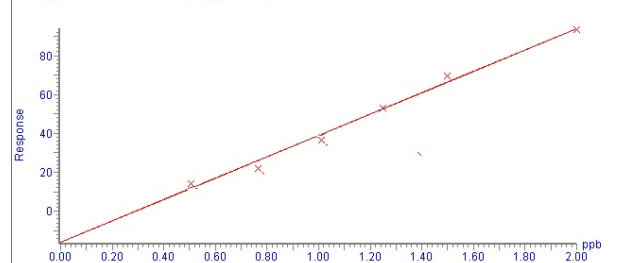


Слика П-25. Калибрациона крива на изоксуприн за мускул во мобилна фаза и во матрикс

Compound name: Cimbutoleol
 Correlation coefficient: $r = 0.996369$, $r^2 = 0.992751$
 Calibration curve: $0.889435 * x + -9.03619$
 Response type: Internal Std (Ref 14), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

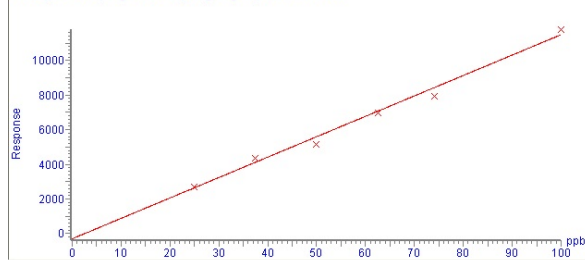


Compound name: Cimbutoleol
 Correlation coefficient: $r = 0.990759$, $r^2 = 0.981604$
 Calibration curve: $54.897 * x + -15.9381$
 Response type: Internal Std (Ref 14), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

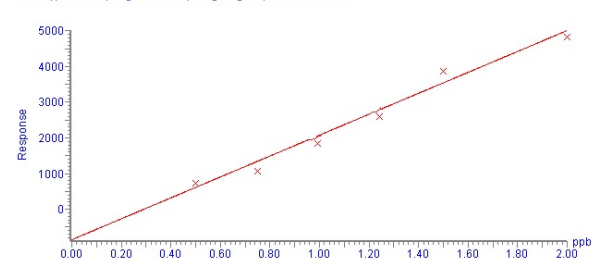


Слика П-26. Калибрациона крива на цимбутерол за мускул во мобилна фаза и во матрикс

Compound name: Ractopamine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.985245$, $r^2 = 0.990513$
 Calibration curve: $117.836 * x + -297.277$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

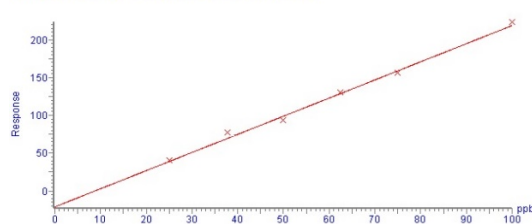


Compound name: Ractopamine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.990053$, $r^2 = 0.980204$
 Calibration curve: $2930.31 * x + -853.887$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

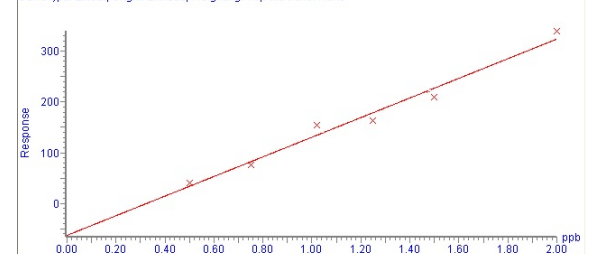


Слика П-27. Калибрациона крива на рактопамин за мускул во мобилна фаза и во матрикс

Compound name: Zipaterol HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.998594$, $r^2 = 0.997199$
 Calibration curve: $2.33765 * x + -20.9735$
 Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Zipaterol HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.994041$, $r^2 = 0.988118$
 Calibration curve: $193.569 * x + -52.8898$
 Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

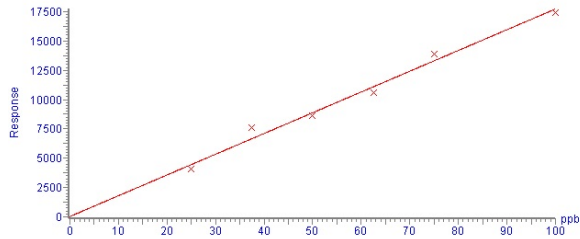


Слика П-28. Калибрациона крива на зилпатерол за мускул во мобилна фаза и во матрикс

Докторска дисертација - Мултирезидуална анализа на β -агонисти во биолошки матрикси со примена на LC-MS/MS метод

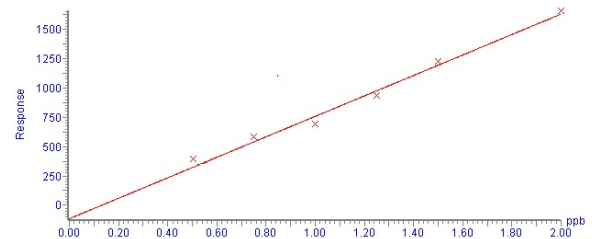
Compound name: Salbutamol (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.990686$, $r^2 = 0.981459$
 Calibration curve: $176.997 * x + 33.3223$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Salbutamol (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.991415$, $r^2 = 0.982904$
 Calibration curve: $871.939 * x + -114.239$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

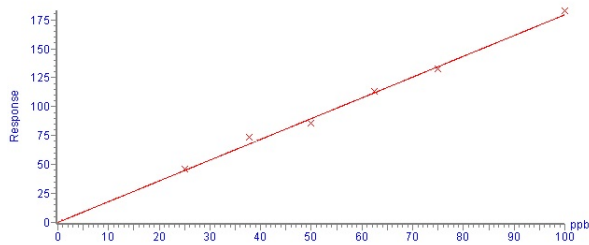
ММ



Слика П-29. Калибрациона крива на салбутамол за мускул во мобилна фаза и во матрикс

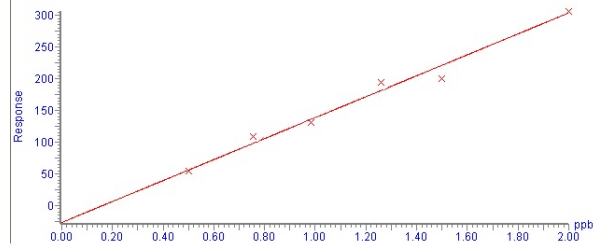
Compound name: Terbutaline hemisulfate salt (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.998842$, $r^2 = 0.997686$
 Calibration curve: $1.60231 * x + 22.5524$
 Response type: Internal Std (Ref 20), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Terbutaline hemisulfate salt (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.990841$, $r^2 = 0.981765$
 Calibration curve: $165.286 * x + -26.623$
 Response type: Internal Std (Ref 20), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

ММ



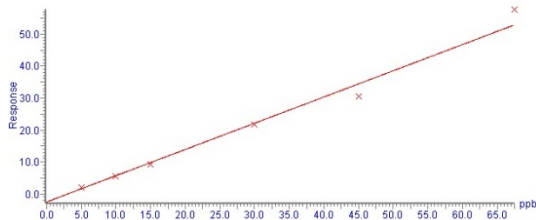
Слика П-30. Калибрациона крива на тербуталин за мускул во мобилна фаза и во матрикс

9.2.3 Прилог Зв. Линеарност на методот црн дроб

9.2.4

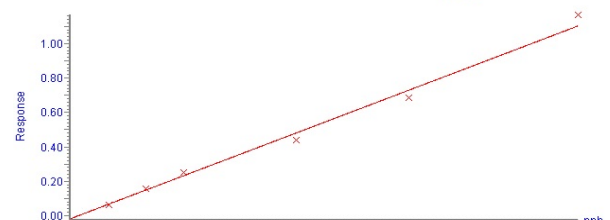
Compound name: Clenbuterol Hcl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.993717$, $r^2 = 0.987473$
 Calibration curve: $0.821437 * x + -2.5213$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Clenbuterol Hcl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.996086$, $r^2 = 0.992187$
 Calibration curve: $0.829287 * x + -0.0162659$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

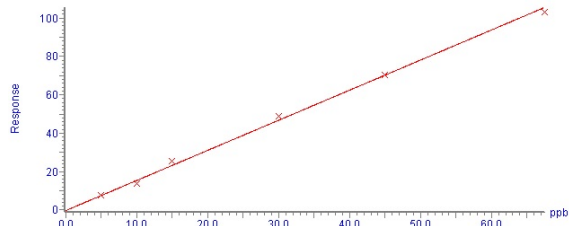
ММ



Слика П-31. Калибрациона крива на кленбутерол за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс

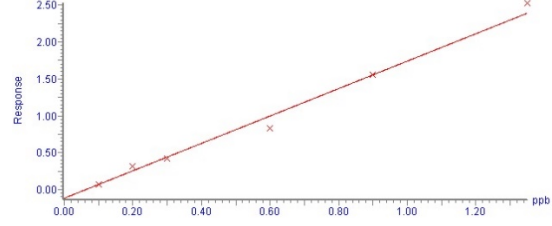
Compound name: brombuterol
 Correlation coefficient: $r = 0.998028$, $r^2 = 0.996060$
 Calibration curve: $1.5687 * x + -0.298973$
 Response type: Internal Std (Ref 12), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ

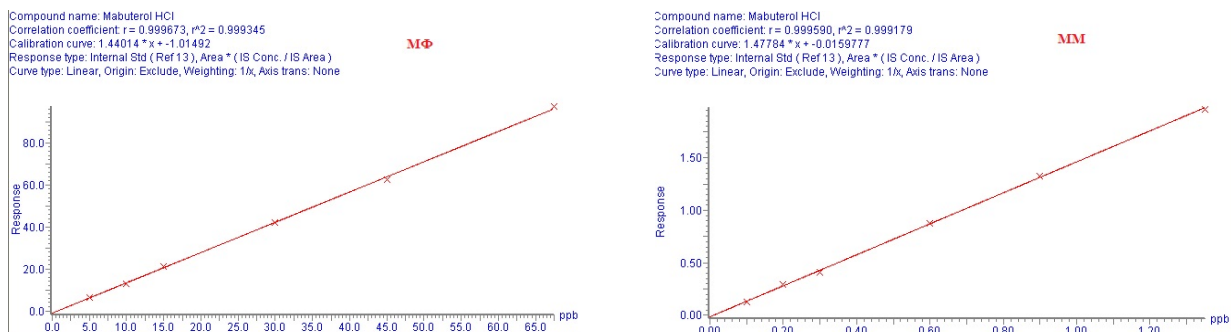


Compound name: brombuterol
 Correlation coefficient: $r = 0.993675$, $r^2 = 0.987390$
 Calibration curve: $1.95018 * x + -0.119837$
 Response type: Internal Std (Ref 12), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

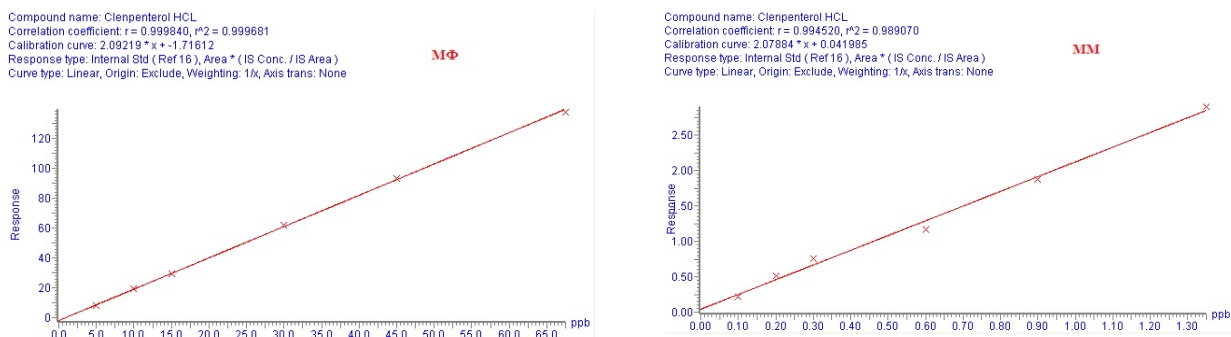
ММ



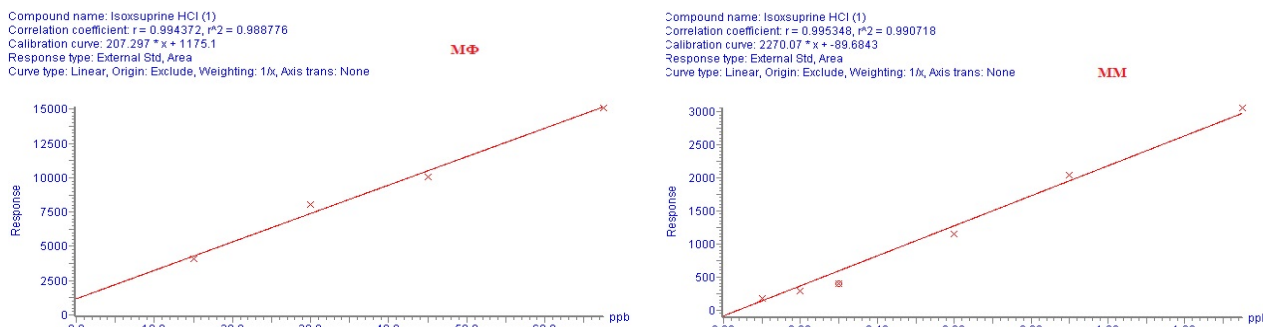
Слика П-32. Калибрациона крива на бромбутерол за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс



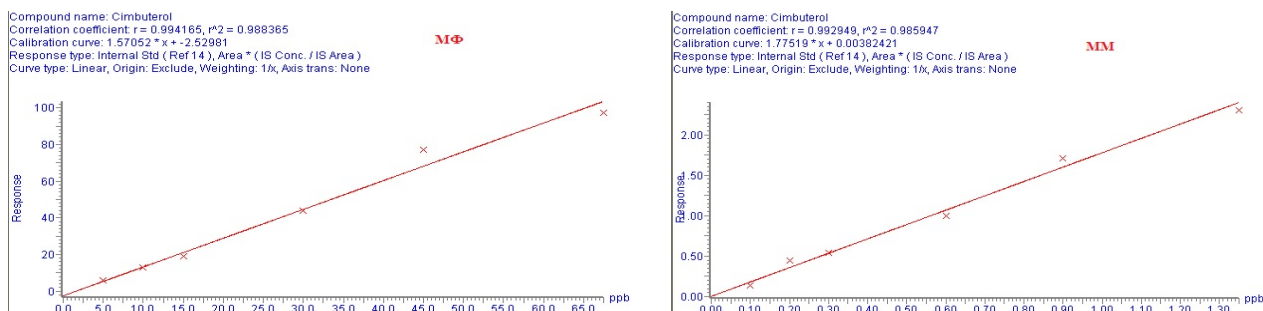
Слика П-33. Калибрациона крива на мабутерол за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс



Слика П-34. Калибрациона крива на кленпентерол за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс



Слика П-35. Калибрациона крива на изоксуприн за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс

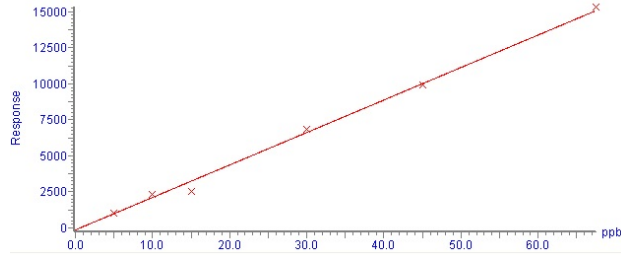


Слика П-36. Калибрациона крива на цимбутерол за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс

Докторска дисертација - Мултирезидуална анализа на β -агонисти во биолошки матрикси со примена на LC-MS/MS метод

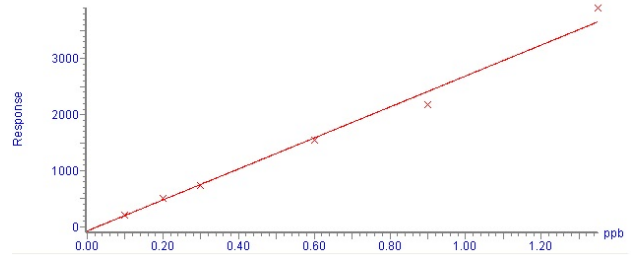
Compound name: Ractopamine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.995644$, $r^2 = 0.991306$
 Calibration curve: $225.451 * x + -139.855$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Ractopamine HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.996089$, $r^2 = 0.992194$
 Calibration curve: $2762.74 * x + -72.2934$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

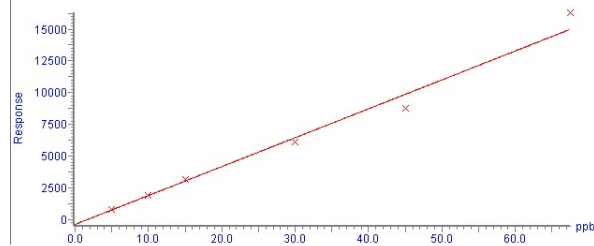
ММ



Слика П-37. Калибрациона крива на рактопамин за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс

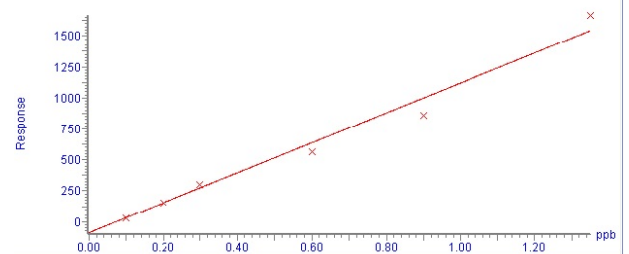
Compound name: Salbutamol (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.993926$, $r^2 = 0.987889$
 Calibration curve: $228.146 * x + -404.32$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Salbutamol (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.992473$, $r^2 = 0.985002$
 Calibration curve: $1208.24 * x + -87.6185$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

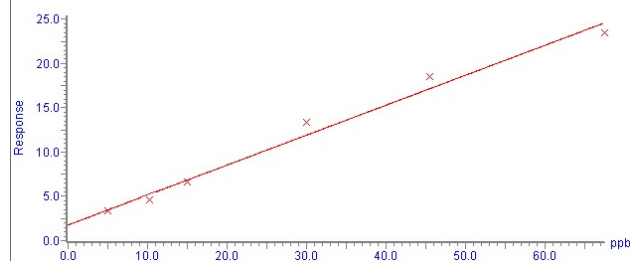
ММ



Слика П-38. Калибрациона крива на салбутамол за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс

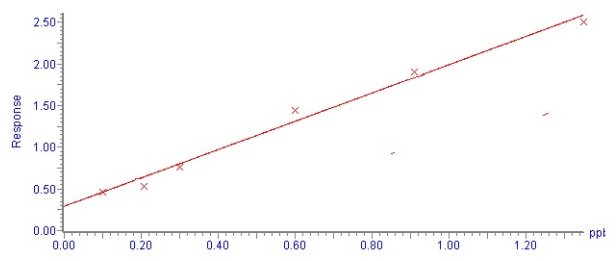
Compound name: Zilpaterol HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.994165$, $r^2 = 0.988364$
 Calibration curve: $0.338261 * x + 1.76738$
 Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Zilpaterol HCl (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.995109$, $r^2 = 0.990243$
 Calibration curve: $1.69813 * x + 0.292062$
 Response type: Internal Std (Ref 19), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

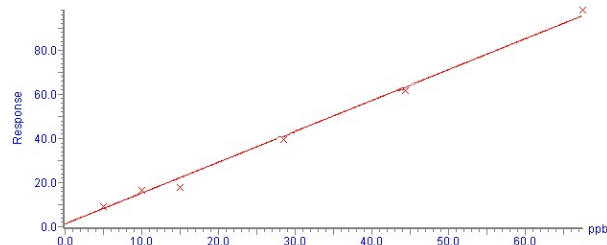
ММ



Слика П-39. Калибрациона крива на зилпатерол за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс

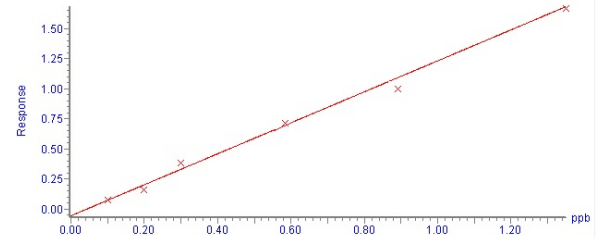
Compound name: Terbutaline hemisulfate salt (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.993092$, $r^2 = 0.986231$
 Calibration curve: $1.39831 * x + 1.29874$
 Response type: Internal Std (Ref 20), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

МФ



Compound name: Terbutaline hemisulfate salt (1)
 Correlation coefficient: $r = 0.994278$, $r^2 = 0.98589$
 Calibration curve: $1.28659 * x + -0.052798$
 Response type: Internal Std (Ref 20), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

ММ

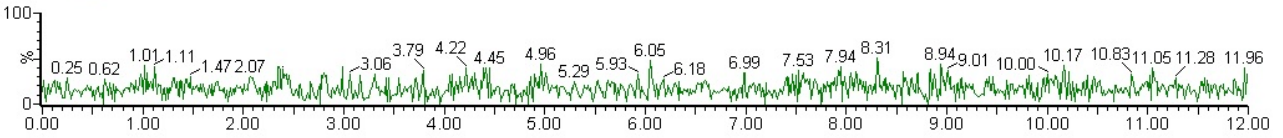


Слика П-40. Калибрациона крива на тербуталин за црн дроб во мобилна фаза и во матрикс

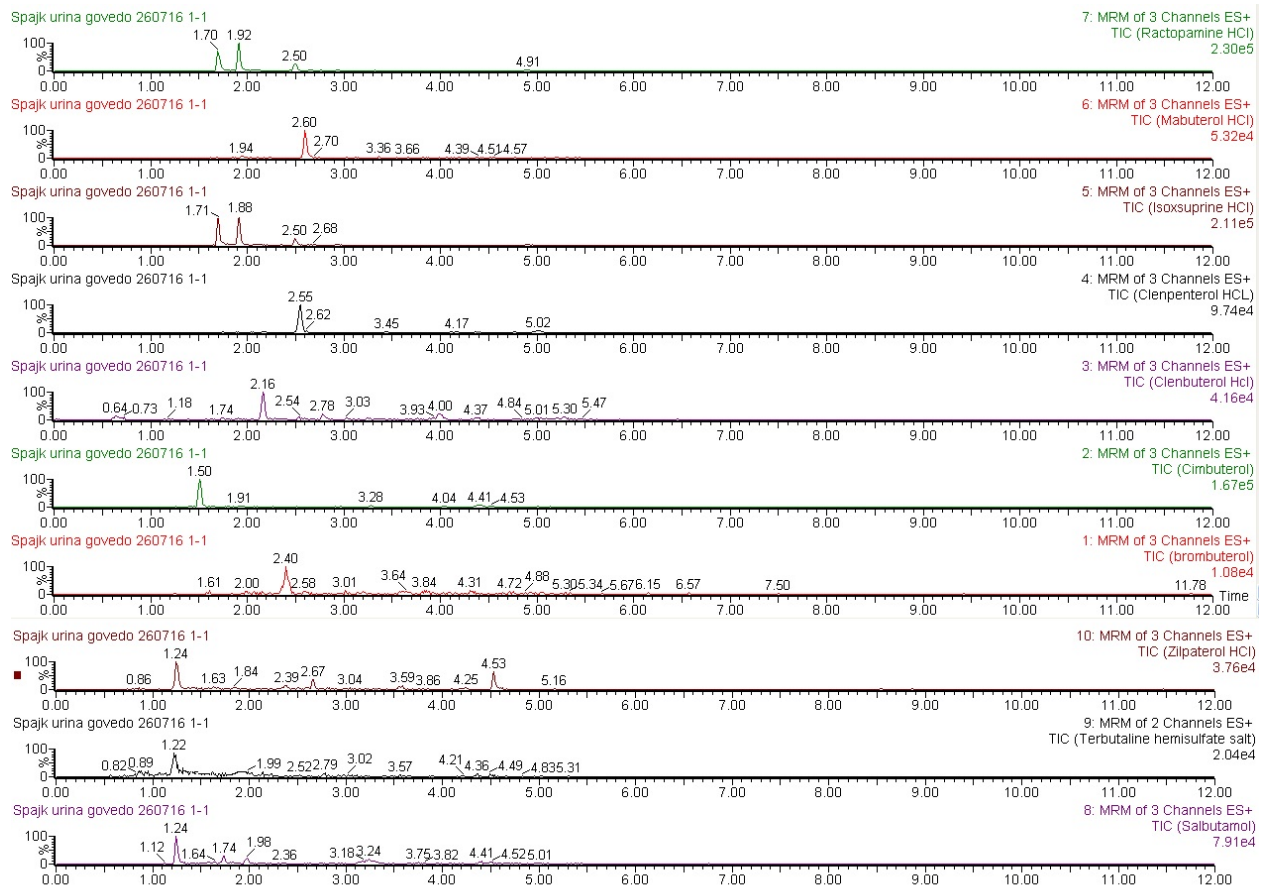
9.3 Прилог 3. Точност и прецизност на методот

9.3.1 Прилог 3а. Точност и прецизност на методот за урина

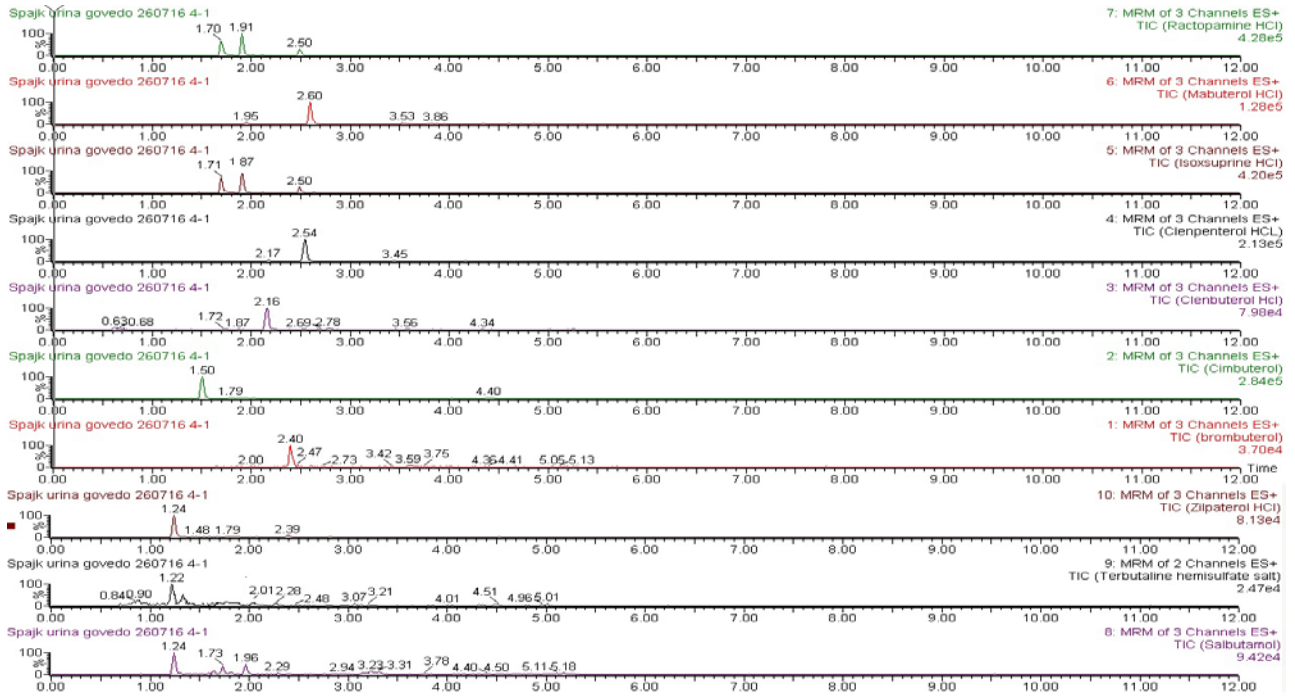
Blank urina-govedo



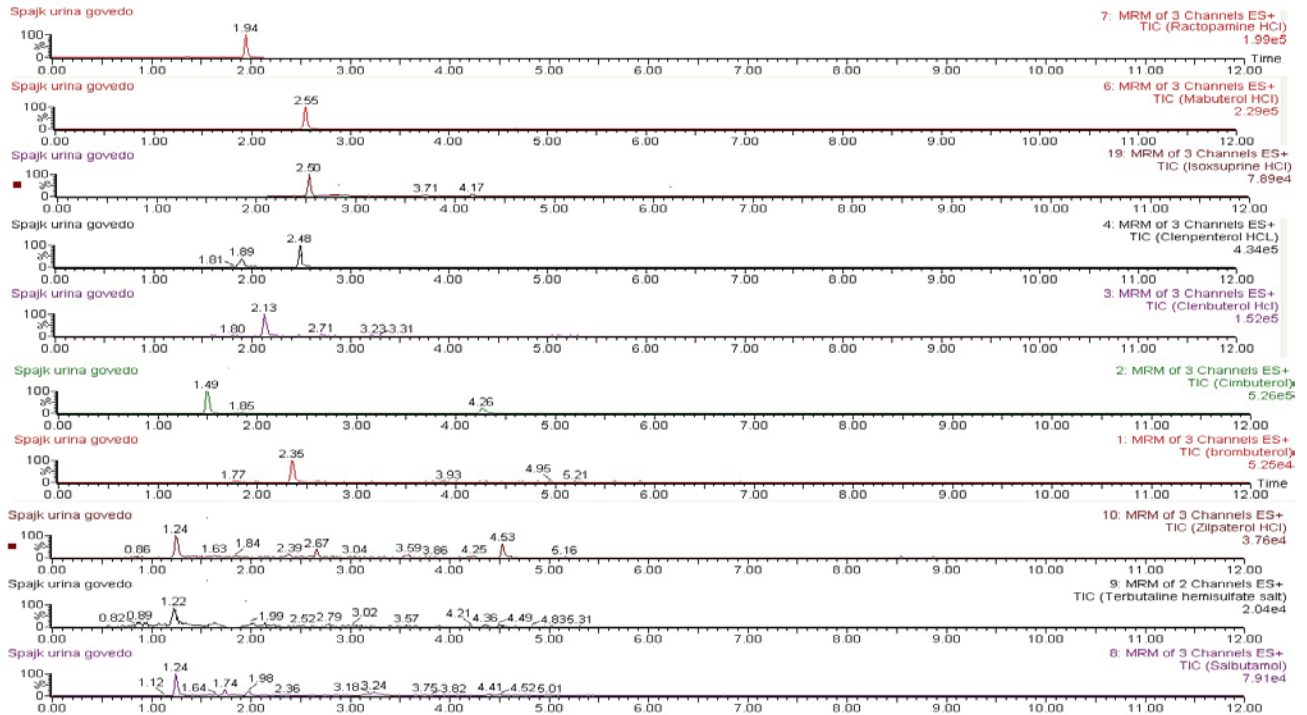
Слика П-41. Хроматограм – негативен примерок урина



Слика П-42 Хроматограм од збогатен примерок урина со стандарди β -агонисти на ниво 1 (концентрацијата за секој аналит посебно е прикажан во Табела 26)

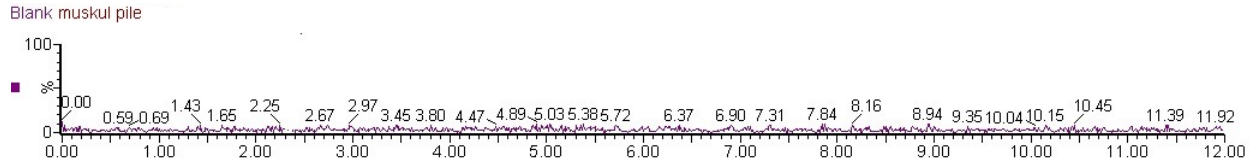


Слика П-43. Хроматограм од збогатен примерок урина со стандарди β -агонисти на ниво 2 (концентрацијата за секој аналит посебно е прикажан во Табела 26)

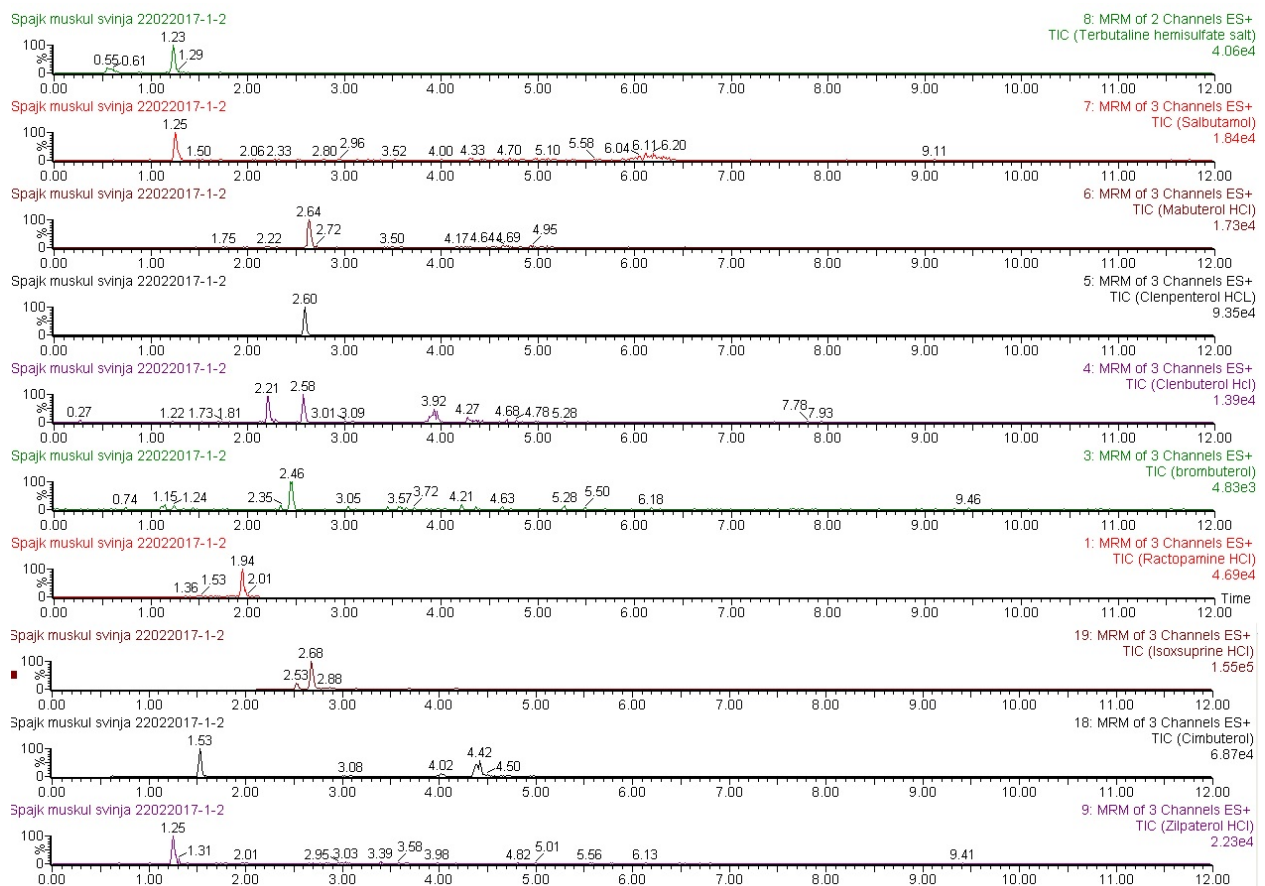


Слика П-44. Хроматограм од збогатен примерок урина со стандарди β -агонисти на ниво 3 (концентрацијата за секој аналит посебно е прикажан во Табела 26)

9.3.2 Прилог 3б. Точност и прецизност на методот за мускул

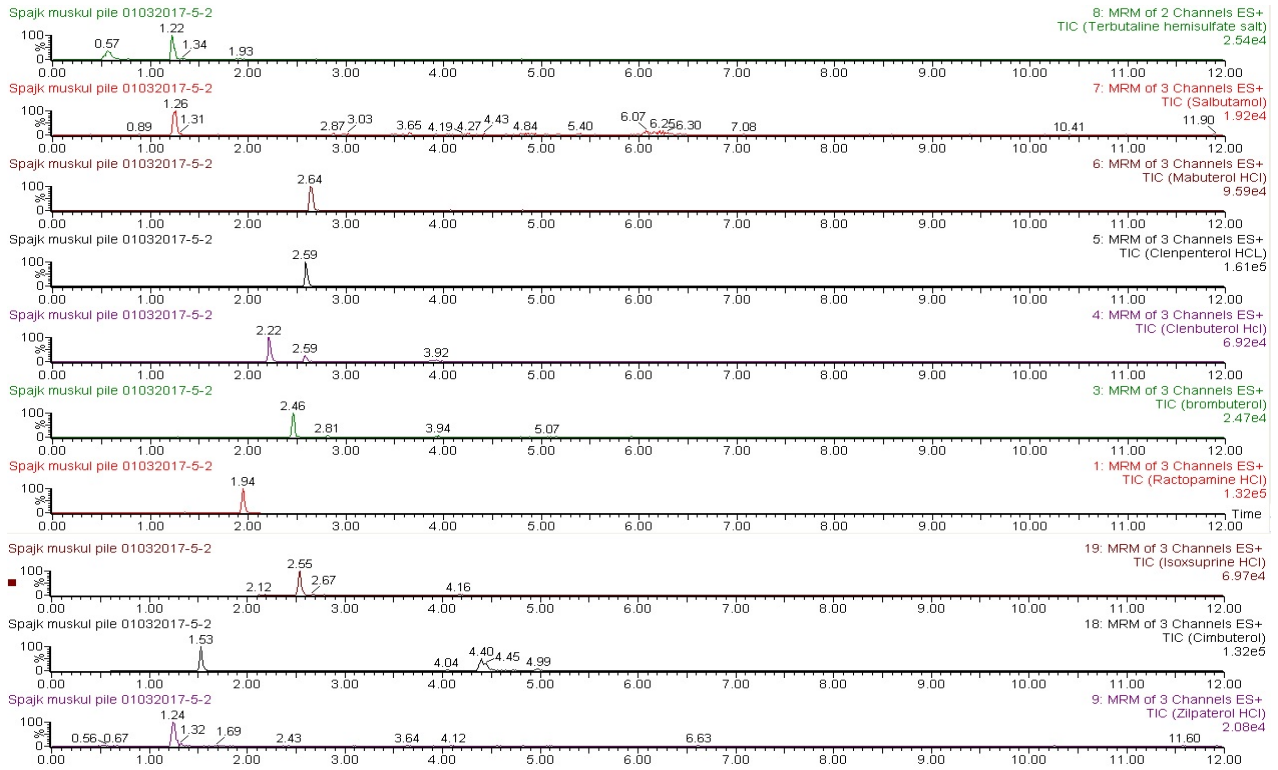


Слика П-45. Хроматограм од негативен примерок мускул

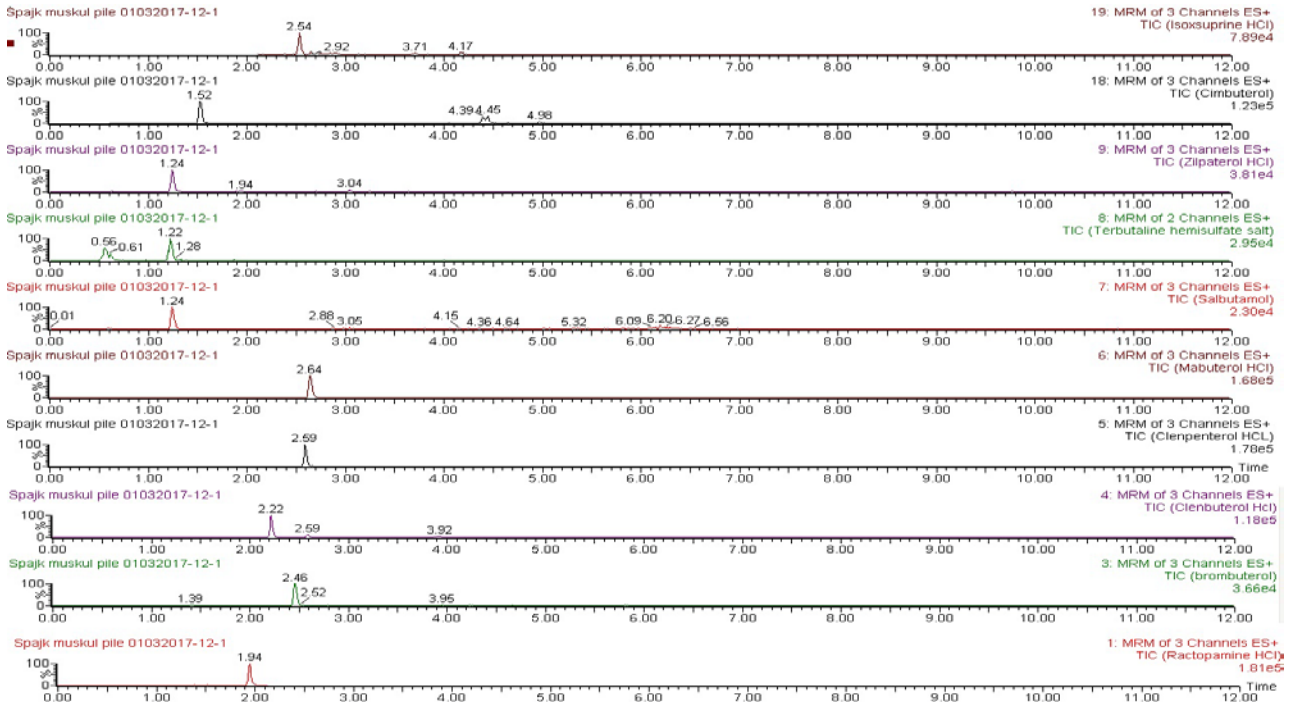


Слика П-46. Хроматограм од збогатен примерок мускул со стандарди β -агонисти на ниво 1 (концентрацијата за секој аналит посебно е прикажан во Табела 27)

Докторска дисертација - Мултирезидуална анализа на β -агонисти во биолошки матрикси со примена на LC-MS/MS метод

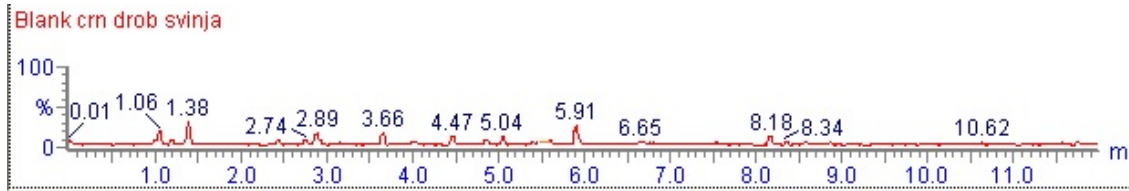


Слика П-47. Хроматограм од збогатен примерок мускул со стандарди β -агонисти на ниво 2 (концентрацијата за секој аналит посебно е прикажан во Табела 27)

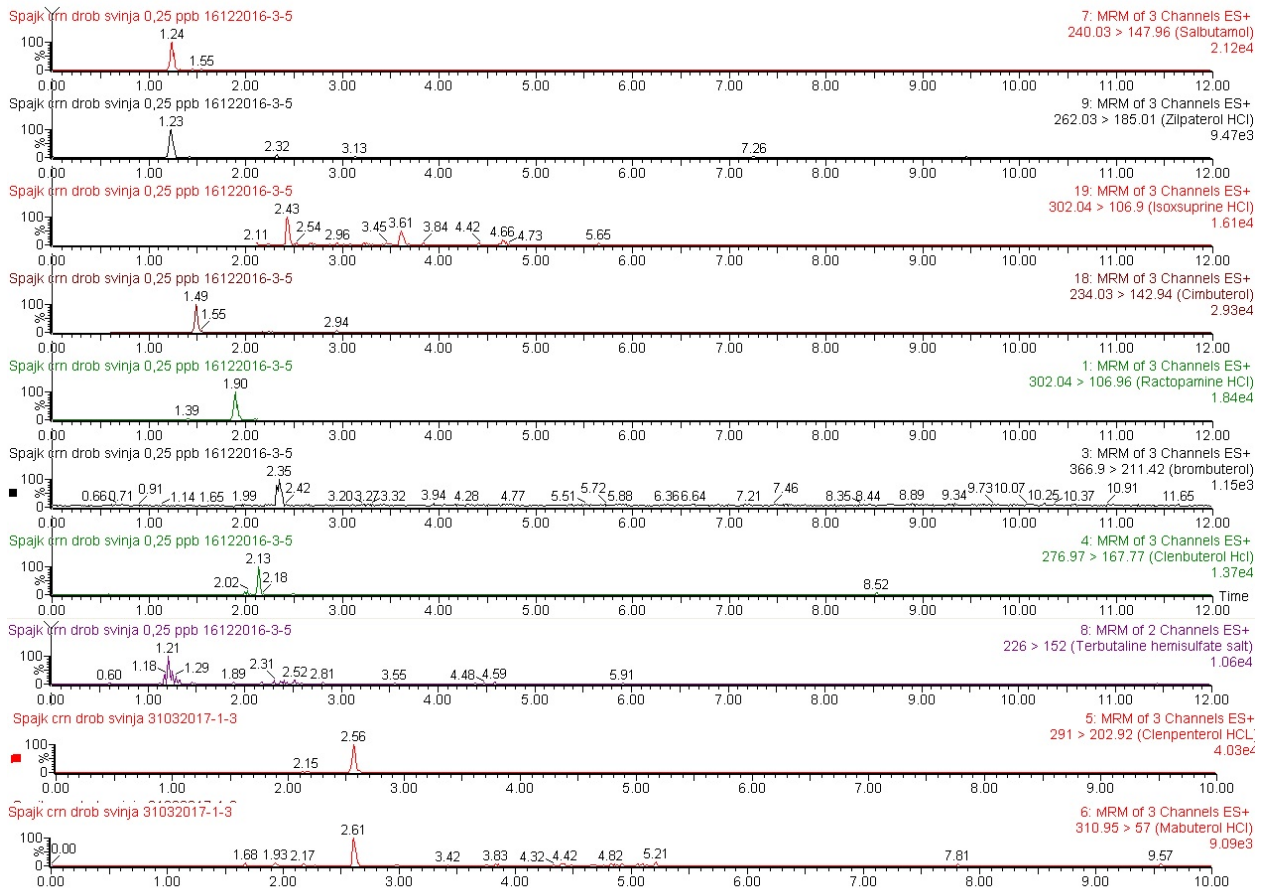


Слика П-48. Хроматограм од збогатен примерок мускул со стандарди β -агонисти на ниво 3 (концентрацијата за секој аналит посебно е прикажан во Табела 27)

9.3.3 Прилог 3в. Точност и прецизност на методот за црн дроб

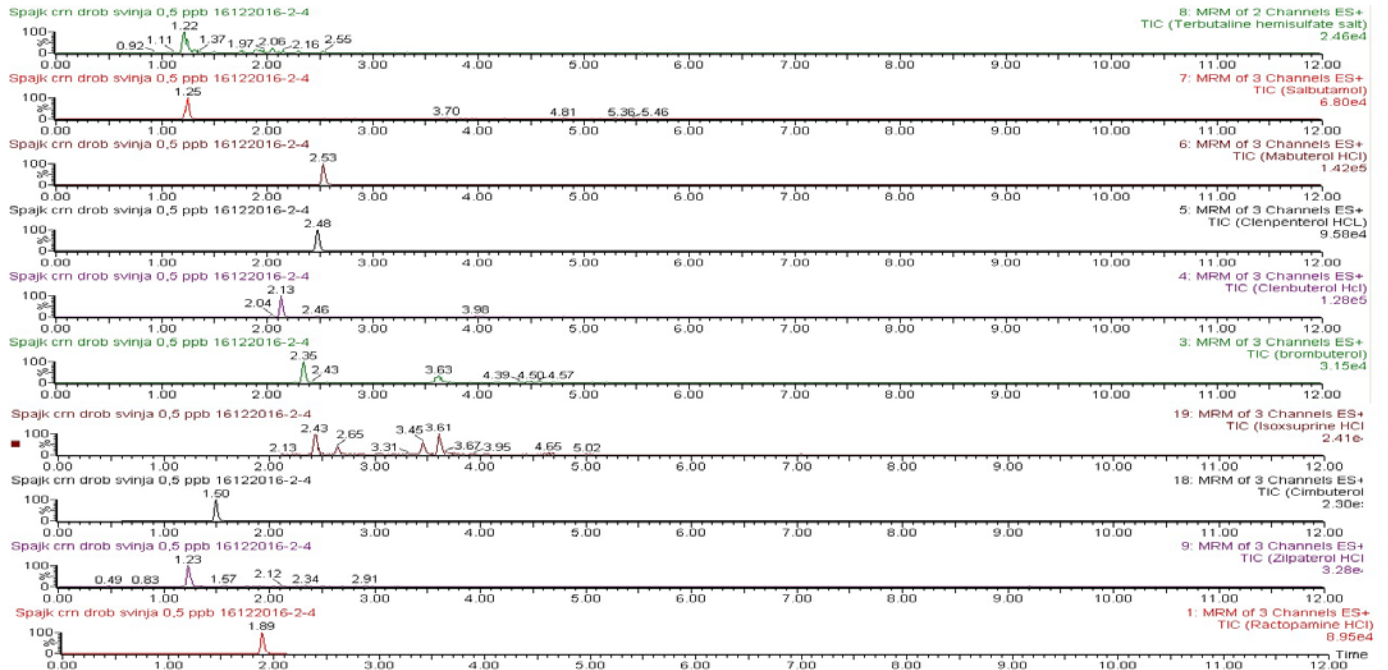


Слика П-49. Хроматограм од негативен примерок црн дроб

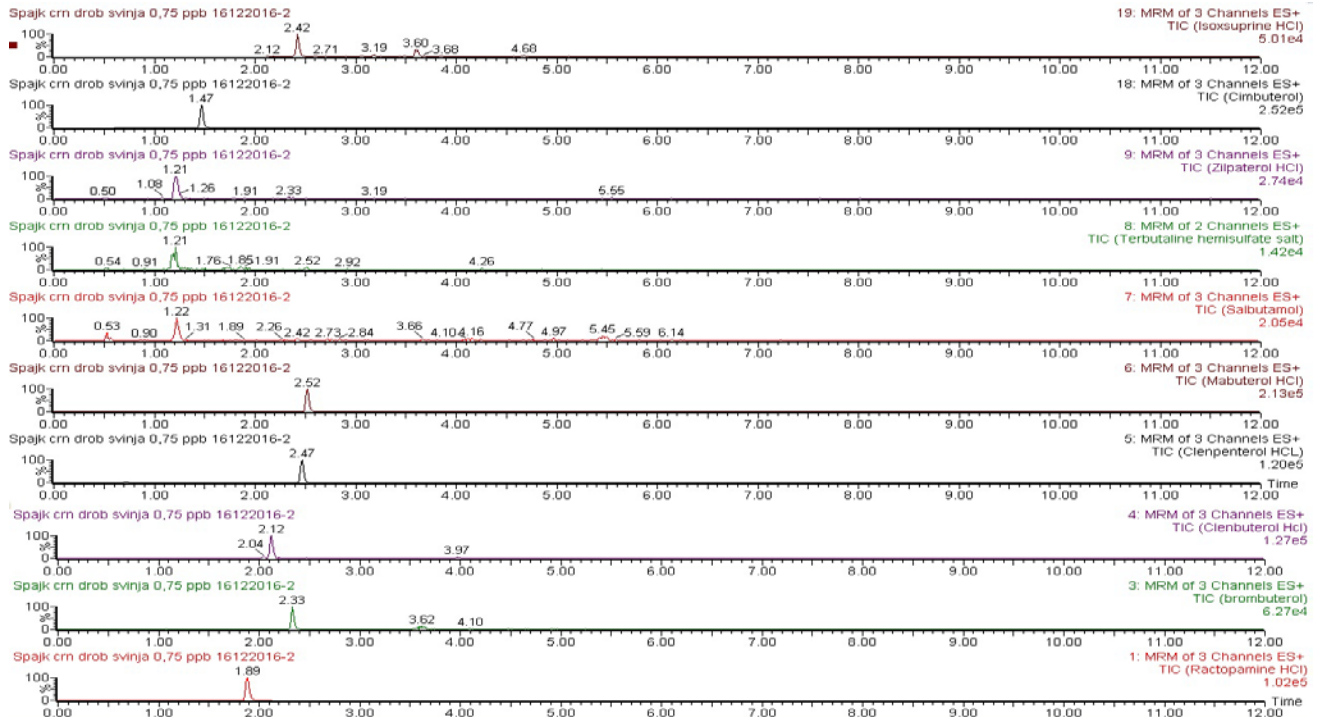


Слика П-50. Хроматограм од збогатен примерок црн дроб со стандарди β -агонисти, концентрација 0.25 ng/g

Докторска дисертација - Мултирезидуална анализа на β -агонисти во биолошки матрикси со примена на LC-MS/MS метод



Слика П-51. Хроматограм од збогатен примерок црн дроб со стандарди β -агонисти, концентрација 0.50 ng/g



Слика П-52. Хроматограм од збогатен примерок црн дроб со стандарди β -агонисти, концентрација 0.75 ng/g