

# Toorpiima kvaliteedistandardi näitajate paketi väljatöötamine kõrgema lisandväärtusega toodete arendamiseks

III osa, Mittesteroidsete põletiku- ja valuvastaste ravimite kasutamine, nende jääkide määramise võimalused toorpiimast, piimatööstuses kasutatavate kiirtestide tundlikkuse määramine enamkasutatavate mittesteroidsete põletiku- ja valuvastaste ravimite jääkide suhtes toorpiimas ning ravimijääkide võimalik mõju bakterikultuuridele piimatoodete valmistamisel.

## A. Mittesteroidsete põletiku- ja valuvastaste ravimite määramiseks toorpiimas kasutatavate meetodikate analüüs teaduskirjanduse põhjal

**Koostaja:** Torrosen OÜ

**Tellijaja:** MTÜ Piimaklaster



Euroopa Maaelu Arengu  
Põllumajandusfond:  
Euroopa Investeeringud  
maapiirkondadesse

**Tartu 2020**

## Sisukord

Sissejuhatus .....	4
Mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid: füsioloogiline toime, klassifikatsioon ja piirnormid piimas .....	6
Toorpiimas mittesteroidsete põletiku- ja valuvastaste ravimite määramiseks kasutatavate meetodikate analüüs .....	9
Laboratoorsed analüüsimeetodid.....	9
Proovide ettevalmistamine - toimeaine ekstraheerimine .....	9
Vedelik-vedelik ekstraktsioon (LLE).....	10
Tahke faasi ekstraktsioon (SPE) .....	12
Proovide ekstraheerimine QuEChERS meetodil.....	15
Vedelikkromatograafia .....	15
Kasutatavad detektorid .....	16
Kasutatavad eluendid .....	18
Gaaskromatograafia .....	19
Kapillaarelektroforees .....	19
Ensüüm-immuunsorbtsiooni meetod ( <i>ELISA</i> ) .....	20
Biosensorid.....	21
Kommertsiaalsed testid NSAID´de määramiseks piimas .....	23
Erinevate testide tööpõhimõtted.....	23
Charm FLUSBL test.....	23
Charm FLU test.....	23
Neogen'i fluniksiini test.....	24
BALLYA fluniksiini test.....	24
InfiniPlex piimatest .....	25
Informatsioon erinevate NSAID´de testide tarnijate ning hindade kohta .....	25
Erinevate NSAID´de määramismeetodite kokkuvõtlik võrdlus.....	26
Kirjanduse loetelu .....	37

## Sissejuhatus

Põletiku- ja valuvastases ravis kasutatakse veistel mittesteroidseid põletikuvastaseid aineid nn. NSAIDe (non-steroidal anti-inflammatory drugs). NSAIDe toimed vähenevad põletikutunnused, valu ning alaneb palavik. Seega on nende põletiku ja valuavastane ravi veistele sageli näidustatud ning kasutamine veiste ja vasikate haiguste ravis laialdane.

NSAID'de hulka kuuluvad erinevat tüüpi ravimid, mida jagatakse üheksaks rühmaks. Teatud ravimrühmade toimeainetel on kehtestatud piimakeeluaeg.

Veistel tohib kasutada fenamaatide rühmast tolfenaamhapet ja fluniksiini, millel on 24 tunnine piimakeeluaeg. Oksikaamide rühmast on kasutusel meloksikaam, mille piimakeeluaeg on 60 tundi. Äädikhappe derivaatidest on kasutusel diklofenak, millel on 6-päevane piimakeeluaeg. Lisaks NSAIDle toimub veiste haiguste ravi ka glükokortikosteroididega, mida kasutatakse küll harvem, kuid nt. deksmetasoonil on piimakeeluaeg 72 tundi.

Käesoleva projekti üldine eesmärk oli välja selgitada kas ja millised Eestis veiste haiguste ravis kasutavad NSAIDd on piimas pärast keeluaega lõppu detekteeritavad. Lisaks selgitab uuring, kas ja mil määral on NSAIDd piimas leitavad piimatööstuses peamised kiirteste kasutades.

Projekt koosnes kahest osast: olemasolevate andmete ja kirjanduse analüüs ning eksperimentaalne uuring.

Kokkuvõtlikult olid käesoleva projekti **uurimisküsimused ja tegevused** järgmised:

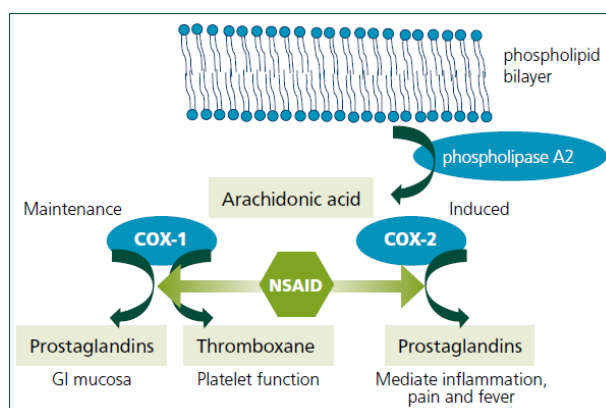
- A. Millised on meetodikad ja võimalused NSAID ühendite jääkide määramiseks piimas? Teaduskirjanduse põhjal koostati ülevaade olemasolevatest meetodikatest NSAID ühendite jääkide määramiseks piimas (põhimõtte, määramispiirid, tundlikkus jt. olulisemad näidikud).
- B. Kuidas ja millise meetodikaga on piimatööstustes korraldatud NSAIDi jääkide analüüs toorpiimast? Eesmärgi täitmiseks viidi läbi intervjuud ning küsitlus piimatööstuste laboritega, et uurida NSAIDde jääkide määramise protseduure tööstusesse tulevast toorpiimast.
- C. Kui palju ja milliseid põletiku- ja valuvastaseid toimeaineid farmides kasutatakse? Milliste haiguste korral on NSAIDe ravimrühm kasutusel? Eesmärgi täitmiseks analüüsiti 20 eesti lüpsikarja (loomade arv enam kui 100) eelmise aasta raviandmeid, et kindlaks määrata kasutatud NSAIDde toimeained, nende kogus ning kasutamise näidustus

- D. Kuidas võivad NSAID ühendite jäägid mõjutada piimatoodete valmistamisel kasutatavaid bakterikultuure? Teaduskirjanduse põhjal koostati ülevaade NSAID ühendite jääkide võimalike mõjude kohta erinevatele bakterikultuuridele.
- E. Eksperimentaaluuringu küsimuseks oli: Kas NSAID jäägid mõjutavad tavapäraselt piima analüüsimiseks kasutatavate testide tulemusi? Millised on NSAID ühendite kontsentratsioonid, millest alates on nende jäägid ravitud loomade piimas käesoleval hetkel piimatööstuses kasutusesolevate testidega tuvastatavad? Uuriti 3enamkasutatava toimeaine (fluniksiin, meloksikaam ja ketoprofeen) mõju 12le erinevale testile viiel erineval ravimijäägi kontsentratsioonil piimas, kõik analüüsid teostati kolmes korduses.
- F. Uuriti ravitud loomade piimas leiduvate NSAID jääkide mõju piima testidele , milleks analüüsiti erinevatel lahjendustel 10 ravitud lehma piimaproove.

## Mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid: füsioloogiline toime, klassifikatsioon ja piirnormid piimas

Mitte-steroidsete põletikuvastaste ravimite (lüh. RSPVA, ingl. k. *NSAID- Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) kasutamine on aastate jooksul järk-järgult suurenenud, kuna need on ilma kortikosteroidide immunosupressiivsete ja metaboolsete kõrvaltoimeteta ning samas efektiivsed valu ja põletiku leevendamisel. Tänapäeval kasutatakse NSAID´sid lisaks muudele raviskeemidele ka lehmade mastiidi raviks [1].

Enamik NSAID´sid toimivad ensüümi tsüklooksügenaasi mitteselektiivsete inhibiitoritena [1][2][3][4]. Eristatakse isovorme tsüklooksügenaas-1 (COX-1) ja tsüklooksügenaas-2 (COX-2) ning tsüklooksügenaas-3 (COX-3), mis on COX-1 variant ning millega seostatakse paratsetamooli analgeetilist toimet) (Joonis 1).



**Joonis 1.** Tsüklooksügenaas-1 (COX-1) ja tsüklooksügenaas-2 mehhanismid.

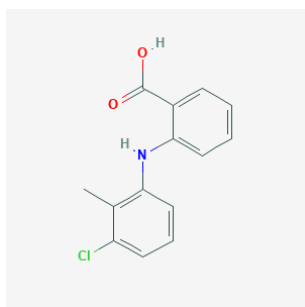
NSAID´sid jagatakse nende toime alusel selektiivseteks ja mitteselektiivseteks (Tabel 1)

**Tabel 1.** NSAID'ide jaotus toimemehhanismi kaudu

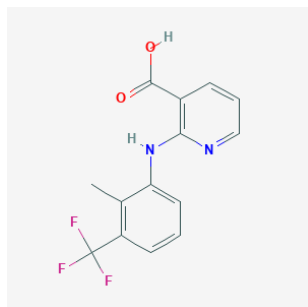
	<b>Mitte selektiivsed COX inhibiitorid</b>	<b>Eelistatult COX-2 inhibiitorid</b>	<b>Selektiivsed COX-2 inhibiitorid</b>	<b>Analgeetilised-antipüreetilised</b>
Ravim	Aspiriin Ketoprofeen Ibuprofeen Mefenaam hape Naprokseen Fluniksiin	Diklofenak Meloksikaam Nimesalide	Celecoxib Etoricoxib Parecoxib Karpoprofeen Tolfenaamhape	Paratsetamool Nefopam Metamizol

COX-1 esineb enamikus rakkudes ja kudedes, COX-2 indutseeritakse põletiku puhul, ent on peamiselt aktiivne neerukoos ning kesknärvisüsteemis. Tsüklooksügenaas katalüüsib prostaglandiinide ja tromboksaanide komplekteerimist. Prostaglandiinid toimivad kui teabemolekulid põletiku protsessis. Peamised kahjulikud mõjud on seotud limaskestast keemilise ärrituse ja seedetrakti haavanditega, mis tulenevad konstitutiivsete prostaglandiinide pärssimisest. Nendel põhjustel tuleks vältida NSAID'ide jääkide juhuslikku sattumist inimese toiduahelasse ning usaldusväärsed analüüsimeetodid nende samaaegseks määramiseks on üliolulised. Eestis on müügiluba suurel hulgal NSAID'idel paljudes erinevates ravimvormides [5][6].

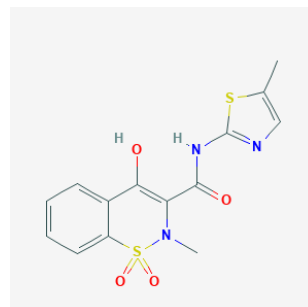
NSAID'id klassifitseeritakse vastavalt keemilisele struktuurile järgmistesse rühmadesse: salitsüülhappe derivaadid; aniliini ja p-aminofenooli derivaadid; pürasolooni derivaadid; oksikaamidid; arüüläädikhappe derivaadid; 2-arüülpropioonhapete derivaadid (profeenid); N-arüülantraniilhapped (fenamiinhapped); enoolhappe derivaadid ja koksibid; naftüülbutanooni derivaadid; sulfoonamiidid; bensoksasotsiini derivaadid. Veterinaarias enamkasutatavate ühendite struktuurid on toodud joonisel 2.



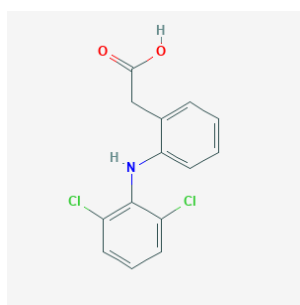
tolfenaamhape



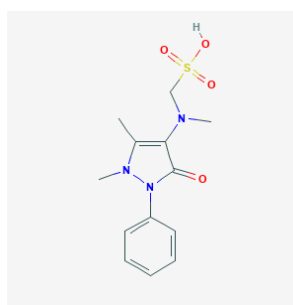
fluniksiin



meloksikaam



diklofenak



metamisool

**Joonis 2.** Veterinaarias enamkasutatavate NSAID'ide struktuurid, mille jääkide piimas sisaldumisel on ette nähtud piirnormid: tolfenaamhape, fluniksiin, meloksikaam, diklofenak ja metamisool

Enamik NSAID´sid on lipofiilsed nõrgad happed (pKa väärtus jääb vahemikku 3,0–5,0), haakuvad rakumembraaniga ja plasma valkudega ning mõjutavad neutrofiile ja T-lümfotsüütide talitlust [4]. Enamasti metaboliseeritakse NSAID´d maksas oksüdatsiooni ja konjugatsiooni teel inaktiivseteks metaboliitideks, mis erituvad uriiniga. Ainevahetus võib teatud haigusseisundite käituda aga ebatraditsiooniliselt ja akumulatsioon võib toimuda isegi tavalise annuse korral.

Euroopa Liidus on NSAID´de kasutamine põlumajandusloomadel reguleeritud alates 1990. aastast; mõned ravimitest on litsentseeritud. Osadel NSAID´del on fikseeritud jääkide piirnormid piimas (*MRL-Maximum Residue Level*) [7] (Tabel 2). Karprofeen on lüpsikarjade jaoks litsentseeritud ja piimas ei ole jääkide piirnorm kehtestatud. Ibuprofeen ja fenüülbutasoon ei ole lubatud veterinaarseks kasutamiseks toiduloomadel ja neil ei ole piimas jääkide piirnorme kehtestatud [8].

**Tabel 2.** Mitte-steroidsete põletikuvastaste ravimite maksimaalsed lubatud piirmäärad (MRL) piimas (ravimi nimetuse järel sulgudes markeraine)

Mitte-steroidsete põletikuvastaste ravimid	MRL (µg/kg)	Keeluaeg
diklofenak	0.1	-
tolfenaamhape	50	24 tundi
rafoksaniid	10	-
triklabendasool	10	-
klorsuloon	16	-
metüülprednisaloon	2	-
tilmikosiin	40	-
danofloksatsiin	30	-
moksidektiin	40	-
flumekiin	50	-
meloksikaam (4-metüülaminoantipüriin)	15	120 tundi (0.5 mg/kg IM) või 80 tundi (1mg/kg OS)
ketoprofeen	puudub	24 tundi
metamisool	50	9 päeva (IV) või 28 päeva (IM)
atsetaminofeen	puudub	
salitsüülhape	puudub	24 tundi
nimesuliid	puudub	-
fluniksiin (5-hüdrofluniksiin)	40	36-48 tundi
karprofeen	puudub	-
meklofenamiinhappe	puudub	-

\*MRL – maksimaalne lubatud piirmäär; OS – suukaudne manustamine; IV – veenisisene; IM – lihasesisene.

## Toorpiimas mittesteroidsete põletiku- ja valuvastaste ravimite määramiseks kasutatavate meetodikate analüüs

Peamiselt kasutatakse NSAID´de määramiseks piimas kromatograafilisi meetodeid nagu kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC) ja gaasikromatograafia (GC). Lisaks on kromatograafilisi meetodeid liidetud erinevate detektoritega: ultraviolet (UV-VIS) ja fluorents (FL), massispektromeetria (MS). Kromatograafilised meetodid on küll leidnud enim kasutust, kuid nende läbiviimine nõuab keerukaid ja kalleid seadmeid, töömahukaid proovide ettevalmistamise protseduure ja oskusi kromatograafiatehnikaga ümberkäimisel. Toorpiima kiireks kohapeaseks kontrolliks on NSAID´de määramiseks saadaval mõningad kiirtestid. Kirjandusest leiab viiteid ka biosensorite ja ELISA (ELISA-*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) kasutamise kohta, mida on samuti võimalik kasutada piima analüüsimiseks laudas kohapeal.

### Laboratoorsed analüüsimeetodid

#### Proovide ettevalmistamine - toimeaine ekstraheerimine

NSAID´de eraldamiseks piimaproovidest on pakutud erinevaid ekstraheerimise- ja puhastamise eeskirju, kuna nende erinevad keemilised omadused ei võimalda ühtse eeskirja väljatöötamist. Näiteks võib vajalik olla kasutada eelnevalt hüdrolüüsimist. Samuti on väga erinevad nende aktiivsed farmakoloogilised kontsentratsioonid ja lubatud jääkide piirnõrmed. Lisaks tuleb arvestada ka ravimite metaboliseerumist, näiteks metamisool läbib ulatusliku metabolismi ning aine määramise seisukohast on oluline määrata hoopis 4-metüülaminoantipüriini mis on üks metamisooli olulisemaid markereid. Oluliseks probleemiks on ravimite metaboliitide kõrge polaarsus, mis võib põhjustada suhteliselt madalaid ekstraheerimise saagiseid ja suhteliselt halba reprodutseeritavust. Vedelik-vedelik ekstraheerimist (LLE) kui ka tahkefaas ekstraheerimist (SPE) on kasutatud piimast NSAID´de ekstraheerimiseks ja/või eelkontsentreerimiseks. LLE meetodi suurimateks plussideks on, et anorgaanilised soolad on üldiselt kergesti eemaldatavad ning proovi ettevalmistusaeg on lühike. LLE´ga seotud puudusteks on näiteks emulsiooni moodustumine, suured proovide mahud ja mürgiste orgaaniliste lahustite kasutamine. SPE meetodi suurimateks plussideks on aeg, meetod on võrreldes LLE kiirem ja vajab vähem lahusteid, olemas on komertsiaalsed kolonnid, mis lihtsustavad ja võimaldavad protsessi automatiseerimist. Puuduseks on aga konkreetsete



protokollide puudumine ja nende optimeerimine on aega nõudev protsess. Ekstraheerimise efektiivsust mõjutavad proovilahuse happelisus, ekstraheerimislahusti tüüp ja maht, ning ekstraheerimise aeg. On leitud, et atsetonitriili kasutamine võimaldab tõhusat ekstraheerimist ja üsna puhaste valguvabade ekstraktide saamist. Metanooli kasutatakse harvemini, ehkki ka see on efektiivne. Enamik kromatograafilisi meetodeid nõuab enne kromatograafilist analüüsi puhastusetappi, mis põhineb kas tahke faasi ekstraheerimisel või vedeliku-vedeliku ekstraheerimisel heksaaniga või mõlema kombinatsioonil. Varasemalt on teada, et proovide hapestamine enne atsetonitriiliga ekstraheerimist suurendab NSAID´de ekstraheerimise efektiivsust [9]. Happe lisamisega tagatakse karboksüülrühmate protoneerimine. Püüd vähendada ekstraheerimisel kasutatavate lahustite kasutamist on viinud mikroekstraktsiooni tehnikate väljatöötamiseni, näiteks tahke faasi mikroekstraktsioon (SPME) ja vedelfaasiline mikroekstraktsioon (LLME). Üha populaarsemaks muutub proovide ettevalmistamisel dispersiivne SPE (dSPE), mida sageli nimetatakse ka "QuEChERS" meetodiks. QuEChERS´i korral ekstraheeritakse proovid kõigepealt segunevate vesilahustitega suures koguses soola ja/või puhverdavate ainete juuresolekul, millele järgneb tahke faasi ekstraktsiooni (SPE) kasutamine puhastamiseks. QuEChERS´i puhul kasutatakse SPE sorbenti maatriksi komponentide mitte analüüstava aine absorbeerijana. Detailsem ülevaade kirjandusest leitavatest ekstraheerimise meetodikate eeskirjadest on toodud käesoleva peatüki lõpus tabelites 3-5.

### Vedelik-vedelik ekstraktsioon (LLE)

Van Pamel et al. [10] kasutasid NSAID´de ekstraheerimiseks atsetonitriili (ACN) ilma täiendava puhastamiseta. Saagise protsent piimas jäi vahemikku 79–118%, korratavuse protsent 1–17% vahele. Piimas otsustamispiir ja avastamisvõime jäid vastavalt vahemikku 0,12-55 µg/kg ja 0,14-61 µg/kg. Britzi ja Schwartsburd [8] lisasid piimaproovidesse enne ekstraheerimist askorbiinhappe ja leidsid, et see aitab oluliselt kaasa fenüülbutasooni ja 4-metüülaminoantipüriini korratavuse ja intensiivsuse paranemisele. Meetodi täpsus oli vahemikus 89-108% ja päevase täpsuse hindamise variatsioonikordajad varieerusid vahemikus 3-16%. Alshana et al. [11] pakkusid välja dispersiivse vedelik-vedelik mikroekstraktsiooni (DLLME), mis ühendati kapillaarelektroforeesiga viie NSAID määramiseks piimas ja piimatoodetes. Uuringus kasutati väljasoolamist (SOE) ja mikroekstraktsiooni (DLLME) vastavalt proovi puhastamiseks ja analüüdi eelkontsentreerimiseks. Esmalt optimeeriti nii SOE kui ka DLLME tingimused. SOE efektiivsust mõjutavate muutujate hulka kuuluvad proovilahuse happesus, ekstraheerimislahusti tüüp ja maht, soola tüüp ja kogus ning

ekstraheerimise aeg. Ekstraheerimise efektiivsuse parandamiseks lisati proovile kontsentreeritud fosforhapet enne atsetonitriiga ekstraheerimist. Lisaks uuriti erinevate soolade mõju ekstraheerimise saagisele. Tulemustest selgus, et NaCl lisamine parandab ekstraheerimise efektiivsust. Viimasena optimeeriti ekstraheerimise aega, milleks valiti 1 minut, kuna aja pikendamisel ei ilmnenud olulist analüütiliste signaalide kasvu. DLLME kõige olulisemad parameetrid on ekstraheerimis lahustite ning dispergeerivate lahustite maht ja tüüp, ioonitugevus ja ekstraheerimise aega. DLLME korral kasutatakse enamasti vees suurema tihedusega lahusteid. Parimad tulemused saadi kui ekstraheerimislahustina kasutati kloroformi ning dispergeeriva lahustina atsetonitriili. LLE's korral lisatakse proovilahustesse NaCl et, parandada ioontugevust ja polaarsust, mis võib väljasoolamise efekti tõttu parandada hüdrofoobsete analüütide jaotumist vesifaasi ja orgaanilise faasi vahel. Soola lisamisel ei märgatud olulist mõju ekstraheerimise efektiivsusele kuni 8,0%. Neid tähelepanekuid arvesse võttes määrati järgmistes katsetes lisatava NaCl kontsentratsiooniks 6,0%. Reaalsete proovide korral saadi analüütide avastamispiirid vahemikus 3,0-13,1 µg/kg. Kalibreerimisgraafikud näitasid head linearsust ja suhtelised standard hälbed oli vahemikus 0,6–6,2% (n = 5). Kõigi analüüsitud NSAID-de saagised toorpiimas oli vahemikus 86–109%. Shishov et al. [12] töötasid välja mikroekstraktsiooni meetodi nelja NSAID-d efektiivseks eelkontsentreerimiseks piima proovidest. LLME etapid: (a) DEP (ing.k *deep eutectic solvents*) *in situ* teke sulanud mentooli ja NSAID-de vahel; (b) orgaanilise faasi tahkumine krüostaadis (moodustati veefaasi peale tahked orgaanilise faasi kiled). Ekstraheerimis etapi efektiivsuse parandamiseks uuriti leeliselisse hüdrolüüsi kasutamist. Leiti, et pärast piima proovide kuumutamist NaOH lahusega temperatuuril 40°C suurenesid ekstraheerimise efektiivsus 80-90%-ni. Samas ligikaudu 99% NSAID-dest dissotseerub vees lahustuvateks anioonvormideks leeliselises lahuses. Seega pärast leeliselist hüdrolüüsi oli vaja leida optimaalne pH LLME jaoks. Tulemustest selgus, et madalama pH juures (pH ≤ 4) saavutati parimad ekstraheerimise tulemused. Kuna mentooli kogus mängib olulist rolli eutektiliste lahustite tekkel, uuriti erinevaid vahemikus mentooli koguseid ning tulemustest selgus, et mentooli optimaalne kogus on 25 mg. Selle massi edasine suurenemine viis analüütilise signaali vähenemiseni suurema ekstraheerimisfaasi mahu moodustumise tõttu. Kasutades optimaalseid tingimusi saadi diklofenaki lineaarseks mõõtevahemikuks 0,03-200 µg/kg, ketoprofeeni puhul 0,03-200 µg/kg, flurbiprofeeni puhul 0,03-300 µg/kg ja mefenamiinhappe puhul 0,1-250 µg/kg. Pimekatse põhjal arvatud 3σ põhjal saadud LOD olid diklofenaki puhul 0,01 µg/kg, ketoprofeeni puhul 0,01 µg/kg, mefenamiinhappe puhul 0,01 µg/kg ja flurbiprofeeni 0,03 µg/kg. Proovi eeltötlusprotseduur

võttis aega alla 15 min. Meetodi päevasisene korratavus oli 3,5-4,6% ja päevane korratavus oli alla 7%.

### Tahke faasi ekstraktsioon (SPE)

Gentili et al. [13] kirjeldavad tõhusat ekstraktsiooniprotseduuri, millega on võimalik eraldada ja määrata 15 NSAID´d toorpiimast kahe etapina: (a) ekstraheerimine orgaanilise solvendiga, mis on oluline keskmise dielektrilise konstandi alandamiseks ja seetõttu analüütide vabastamiseks maatriksist; (b) tahke faasi ekstraheerimine. Käesoleva uuringu jaoks valitud analüüdid kuuluvad kõik COX-mitteselektiivsete inhibiitorite rühma ja neid kasutatakse kõige rohkem just veterinaarmeditsiinis. Selle töö üheks eesmärgiks oli töötada välja ekstraheerimisprotseduur, mis suudaks lõhkuda NSAID´de ja toiduvalkude vahelised tugeva interaktsioonid ning mida oleks võimalik kasutada toorpiima maatriksis. Rasvade eemaldamiseks proovist töötas kõige efektiivsemalt tsentrifuugimine 0°C juures. Kaufmann et al. [14] uurimistöö eesmärk on välja töötada meetod, mis võimaldaks määrata 3 aluselist NSAID´d ning 14 erinevat steroidi kasutades vaid ühte ekstraheerimise ja puhastamise etappi. Hinnati järgmiste tegurite mõju: proovi kogus, lisatud antioksidandi lahuse maht, lisatud naatriumhüdrosiidi lahuse maht, lisatud ammooniumsulfaadi kogus, hüdrolüüsi ajaperiood, aurustumistemperatuur ja SPE kasseti elueerimise maht (7-faktoriline Plackett-Burman test). Oma töös kasutasid nad katioonivahetusega SPE kolonne (OASIS MCX). Piima proovid, mida analüüsiti oli erinevalt kuumtöödeldud, mis täheldas, et piimade rasvasisaldus oli erinev. Asjaolu, et jääkide piirnормid on väga erinevad, kasutati valideerimisprotseduuril suhteliselt suurt kontsentratsioonivahemikke (kuni 100 µg/kg). Kasutatav üheastmeline SPE meetod (sega režiimis katioonivahetus) võimaldab määrata nii steroidide kui NSAID´de peamisi metaboliite: metamisooli metaboliitide korral oli määramispiiriks 100 µg/kg. Väljatöötatud ja optimeeritud ekstraheerimis- ja puhastamisetapid ei võimaldanud siiski eraldada happelisi NSAID´sid. Happeliste NSAID´de jaoks ei ole sobilik kasutada katioonset SPE materjali kuna vastavad ained ei seonu piisava tugevusega kolonni, mida kinnitas mõningate ühendite saagis, mis oli alla 50%. Jedziniak et al. [15] töötasid välja meetodi nii „happeliste“ NSAID´de kui ka „aluseliste“ NSAID´de (neli metamisooli metaboliiti) analüüsimiseks. Analüüdid ekstraheeriti piimaproovidest atsetonitriiliga ammooniumatsetaadi juuresolekul. Ekstrakti ühte osa analüüsiti otseselt metamisooli metaboliitide olemasolu suhtes; teine osa puhastati amino-kolonne kasutades. Piimaproovides on kõrge vee- ja valgusisaldus. Leiti, et ekstraheerimine atsetonitriiliga NaCl juuresolekul tagas valgu sadestumise ning orgaanilise ja veefaasi hea eraldamise pärast tsentrifuugimist madalamal temperatuuril. Vaatamata lahuse efektiivsusele,

võib naatriumsoolade kasutamine proovi ettevalmistamisel soodustada analüütide naatrium- aduktide moodustumist ja vähendada meetodi tundlikkust. Seetõttu testiti ammooniumatsetaati, tulemustest selgus, et orgaanilise ja vee faasi eraldamine oli võrreldav Käesolevas töös testiti ka erinevaid tahke faasi ekstraheerimiskolonne: C18, Oasis HLB, Strata screen-A, BondElut Cerify II, tugev katioonivahetus. Ehkki C18 sorbent võimaldas kõigi analüütide määramist, oli enne kolonni laadimist vaja atsetonitriili ekstrakt aurutada ja lahustada vee-happe lahuses. See pikendas analüüsi aega ja põhjustas mõnede analüütide degradatsiooni. Sel põhjusel testiti amino-sorbenti, mis võimaldab atsetonitriili ekstrakti otsest laadimist ja analüütide elueerimist 5% sipelghappe lahusega atsetonitriilis. Esialgu oli tulemuste korratavus kehv; mõne proovi puhul ei täheldatud analüüte ja teiste (samast proovipartiist) saagised olid kõrged. Kahjuks ei püsinud metasooli metaboliidid amino-sorbendis. Sel põhjusel otsustati jagada atsetonitriili ekstrakt kaheks osaks. Esimene aurustati kuivaks ja pärast liikuvat faasis lahustamist analüüsiti metamisooli metaboliitide olemasolu. Teine osa, mis oli ette nähtud happeliste mittesteroidsete põletikuvastaste ravimite analüüsiks, puhastati amino-kolonnis. Pärast elueerimist lisati aurustumise vältimiseks väheke DMSO´d. Proovile DMSO lisamine ei mõjutanud analüüdi signaali ega piigi kuju. Pealegi oli lõplik ekstrakt selge ja täiendavat filtreerimist ei olnud vaja teha, mis vähendas veelgi proovi ettevalmistamise aega. Ghorbani et al. [16] töötasid välja meloksikaami ja piroksikaam eelkontsentreerimiseks ja mõõtmiseks magnetilise dispergeeriva tahkefaasi mikroekstraktsiooni (SPME) meetodi. Analüütide ekstraheerimiseks valmistati samaaegse sadestamise ja sool-geeli meetodi põhjal efektiivne ja uus kapseldatud magnetiline sorbent. Ekstraheerimisel ja määramisel optimeeriti mitmeid tegureid, nagu proovilahuse pH, sorbendi kogus, proovilahuse maht, dispersiooniaeg, ekstraheerimise aeg ja desorptsiooniaeg. Mikroekstraktsioonimeetodi väljatöötamiseks valiti aktseptor-faasiks kolm orgaanilist lahustit (metanool, etanool ja atsetonitriil). Parimad tulemused saadi metanooli korral. Selle põhjuseks võib olla vesiniksideme moodustumine metanoolis oleva hüdroksüülrühma ning NSAID´de hüdroksüül- ja amiinrühmade vahel. Lisaks, hüdroksüülrühma polaarsus metanoolis on suurem kui etanoolis. Peamiste tegurite (proovilahuse pH, sorbendi kogus, proovilahuse ruumala, dispersiooniaeg, ekstraheerimisaeg, aktseptori faasi ruumala ja desorptsiooniaeg) uurimiseks loodi Plackett-Burmani disainil põhinev ortogonaalne rida. Analüüsist selgus, et optimeerida oleks vaja kolme olulist tegurit (proovilahuse pH, dispersiooniaeg ja sorbendi kogus). Optimaalsetes tingimustes (proovilahuse pH = 7,4; dispersiooniaeg 5,3 min; sorbendi kogus = 36 mg) olid veeproovide standardkõverad vahemikus 0,3-180 ja 0,3-160 ng/ml veeproovides REL-ruuduga vastavalt 0,9949 ja 0,9941. Päeva sisesed ja erinevate päevased suhtelised standardhälbed (n=5) olid vastavalt <5,7 ja 7,6%. Meetodit rakendati edukalt ka ainete

määramiseks piima proovides ning proovide keskmine saagis oli 87,9%. Xue et al. [17] valmistasid magnetilise melamiin-formaldehüüdvaigu (MMFR) kolonni vesi/õli emulgeerimismeetodi abil, sidudes tuumaks  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetilised nanoosakesed. Magnetvaigu valmistamist optimeeriti polüetüleenglükool 20000 ja  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoosakeste kogust, katalüsaatori (vesinikkloriidhape) kontsentratsiooni, samuti mehaanilist segamiskiirust. Valmistatud materjalile oli iseloomulik suurepärane anioonivahetusvõime, hea veemärgavus ja korralik magnetilisus. Selle kasutamist demonstreeriti NSAID´de magnetilise tahke-faas ekstraheerimisega. NSAID´de sidumist MMFR´le mõjutavaid mitmed tegureid, näiteks proovilahuse pH, soola lisamine, desorptsiooni tingimused (eluendi koostis ja happesus). Proovi pH võib mõjutada NSAID´de sidumist. Ehkki melamiin-formaldehüüdvaik oli kogu pH vahemikus stabiilne, kitsendati uuritava proovi pH väärtust 3-11, pidades silmas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  südamikuga stabiilsust. Kui proovi pH oli vahemikus 3-5, olid NSAID´d peamiselt neutraalses olekus, kuna nende pKa väärtused varieeruvad vahemikus 3,66-4,84. Proovi pH suurenemisel deprotoneeritakse ühendid ning selle tulemusena võiks ioniseeritud analüütide ja protoneeritud MMFR´i vahel suureneda elektriatraktiivne interaktsioon, mis tooks kaasa suurema ekstraheerimise efektiivsuse. Kuid kui pH on liiga kõrge, võib MMFR protonatsioon olla teatud määral pärsitud, mis omakorda põhjustab ekstraheerimise efektiivsuse langust. Soola kontsentratsioon omab olulist mõju NSAID´de sidumisel vaigule. Tulemustest selgus, et soola kontsentratsiooni kasvades vähenesid kõikide piikide pindalad. Siiski täheldati, et karprofeen ja indometatsiin on vähem tundlikud NaCl kontsentratsiooni suhtes kui teised NSAID´d. Seda nähtust võib seletada järgnevalt: (a)  $\text{Cl}^-$  võivad konkureerida MMFR´i sidumiskohtadele; (b) NSAID´de lahustuvust vees väheneb NaCl tõttu; (c) NaCl suurendab proovilahuse viskoossust ja see võib mõjutada MMFR hajutatust. Optimaalsete tingimuste (proovilahuse pH = 7, soola ei lisatud, ekstraktsiooni aeg = 45 min, desorptsiooni aeg = 30 min) korral oli lineaarseks vahemikuks 1–5000 ng/ml, päevasisene ja päevade vahelised reprodutseeritavused olid vastavalt 12,4% ja 9,7%. Väljatöötatud meetodit kasutati edukalt ravimite määramiseks piimaproovides. Magnetiline melamiin-formaldehüüdvaik on paljutöötav happeliste analüütide eeltöötlemiseks anioonivahetus-interaktsioonide kaudu. Arroyo et al. [18] proovisid samaaegselt määrata piimas seitset NSAID´d (ibuprofeen, naprokseen, ketoprofeen, diklofenak, flufenamiinhape, tolfenaamhape ja meklofenamiinhape) kasutades proovide eeltöötlemiseks tahke faasi mikroekstraktsiooni (SPME). Ekstraheerimisprotsessi läbiviimiseks sobivaima SPME-kiudude leidmiseks võrreldi kolme liiki kiude: polüakrülaad, polüdimetüülsiloksaan/divinüülbenseen ja polüdimetüülsiloksaan. Parimad tulemused saadi polüdimetüülsiloksaan kiuga. Eksperimentaalse töö optimeerimiseks kasutati D-optimaalset

mudeldamist (mudeldamine võimaldab parameetrite osakaalusid hinnata), optimeeriti 8't eksperimentaalset tegurit (5 on seotud tahke faasi mikroekstraktsiooni protsessiga ja 3 derivatiseerimise reaktsiooniga). Mudeldamine võimaldas uurida ja optimeerida kõiki parameetreid etteantud vahemikus viidi läbi 14 eksperimenti 512 asemel. Saadud määramispiirid olid kõik väiksemad kui 2010/37/EC poolt paika pandud piirid.

### Proovide ekstraheerimine QuEChERS meetodil

Rúbies et al. [19] töötasid välja QuEChERS meetodi NSAID´de eraldamiseks. Et parandada reprodutseeritavust ja tundlikkust, asendati NaCl ammooniumatsetaatiga ekstraheerimislahuses, millega saavutati madalamad baasmürad, võimaldades seeläbi ka madalamaid avastamisiire. Lineaarse ala hindamiseks kasutati korrelatsioonikordajat ja punkt-punkti hälvet. Tulemusteks saadi kõigi analüütide jaoks hea lineaarsuse: ning ekstraheerimise ja puhastamise etappide absoluutsed saagised on vahemikus 78,1–97,1%. Kõikide ravimite korral oli madalaimaks detekteerimise piiriks 0,7 µg/kg: prekursori ioone oli võimalik tuvastada isegi madalamatel kontsentratsioonidel (0,1 µg/kg).

### Vedelikkromatograafia

Kromatograafia on üldmõiste mitmesuguste laboratoorsete füüsikalise-keemiliste meetodite kohta, mida kasutatakse uuritavate ainete segu komponentide lahutamiseks. Lihtsustatult: ainete segu süstitakse kromatograafilisse kolonni, edasi kantakse see läbi sorbendi (liikumatu faas) sobiva vedeliku vooluga (liikuv faas). Segu komponentide spetsiifilise sorptsiooni ja desorptsiooni tulemusena toimub nende jaotumine liikumatu ja liikuva faasi vahel vastavalt jaotuskoefitsientidele. See viib ainete lahutumisele ning moodustuvad kiiremini ja aeglasemalt liikunud komponentide tsoonid. Kromatograafiline analüüs nõuab väga väikseid ainekoguseid. Oluline on aga eelnev teave proovi päritolu, saamise ja võimaliku koostise kohta. Analüütide määramise tõesuse tõstmiseks on mitmeid võimalusi. Näiteks kasutatakse etalonaineid, sise- ja välisstandardeid, analüüsi tingimuste varieerimist, sealhulgas erineva polaarsusega kolonnid. Tundmatu proovi korral on tihti lisaks vajalikud spektraaluuringud. Proovi eeltöötlus kromatografeerimiseks peab olema adekvaatne ja silmas tuleb pidada võimalikke vigu nagu mittepüsivad protseduuri tingimused, analüütide termiline või katalüütiline lagunemine protsessi käigus, piikide kattumine, analüüdi liiga väike sisaldus proovis jt. Proovi kvantitatiivne analüüs põhineb kromatogrammil piikide pindalade mõõtmisel. Põhimõtteliselt on aine sisaldus proportsionaalne temale vastava piigi pindalaga. Mitmekomponentsete segude korral saab üksikute piikide pindalade põhjal leida komponentide suhtelise sisalduse proovis.

Kontsentratsiooni leidmiseks kasutatakse kalibreerimisandmeid või kindla hulga standardühendi lisamist. Kromatograafiline analüüse on võimalik läbi viia vaid laboratoorsetes tingimustes kohapeal, kuna aparatuur on suur. Detailsem ülevaade kirjandusest leitavatest vedelikkromatograafia eeskirjadest on väljatoodud tabelis 3.

### Kasutatavad detektorid

UV-detektorid on kõige enam kasutatavad LC puhul. Pidevalt mõõdetakse kolonnist väljunud eluaadi UV absorptsiooni kas ühel kindlal või mitmel lainepikkusel. Massispektromeeter on universaalne detektor LC jaoks. MS-i tööpõhimõte seisneb selles, et molekulid ioniseeritakse ning tekkinud ioonid sorteeritakse massi ja laengu suhte ( $m/z$ ) alusel. Sellele järgneb ionide kvantitatiivne tuvastamine. Kaks põhilist komponenti selles protsessis on ionallikad, mis ioniseerivad molekule, ja massianalüsaator, mis sorteerib ioone. MS võimaldab madalaid avastamisiire (vähim analüüdi sisaldus proovis, mida saab usaldusväärselt detekteerida ja identifitseerida), lisaks saab analüüte identifitseerida ja hinnata kromatograafiliste piikide puhtust (kas piik sisaldab peale analüüdi ka teisi aineid). Van Pamel et al. [10] uuring kirjeldab LC-MS/MS meetodit 15 NSAID samaaegseks tuvastamiseks, identifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks piimas. Sise-standarditena kasutati flunitsiin-d3, diklofenak-d4, 4-aminoantipüriin-d3 ja fenüülbutasoon-d10. Piimas avastamisiir ja avastamisvõime jäid vastavalt vahemikku 0,12-55 µg/kg ja 0,14-61 µg/kg. Britzi ja Schwartsburd [8] töötasid välja suure jõudlusega LC-MS/MS meetodi kaheksa NSAID samaaegseks identifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks piimas. Meetodi täpsus oli vahemikus 89-108% ja päevase täpsuse hindamise variatsioonikordajad varieerusid vahemikus 3-16%. Gentili et al. [13] kasutasid identifitseerimiseks LC-MS/MS süsteemi. Korratavus oli väga hea: taastumine varieerus vahemikus 97-100%. Ioonide paaristamise RP kromatograafia koos negatiivse ESI tuvastamisega suutis saavutada kõigi analüütide madala detekteerimisvõime ( $CC\beta$ ). Meetodit valideeriti vastavalt komisjoni otsusele 2002/657/EÜ. Valideerimise käigus oli retentsiooniaja suhteline standardhälve  $\pm 2,5\%$  piires ja ionide suhe kahe SRM-i ülemineku vahel oli kõigi analüüsides puhul komisjoni otsuses 2002/657/EÜ soovitatud taluvuse piires. Ioonide paaristamise RP kromatograafia koos negatiivse ESI tuvastamisega osutus tõhusamaks kui ionide pärssiv RP kromatograafia koos kahepolaarse ESI tuvastamisega kõigi analüütide ja eriti diklofenaki madalate määramisiiride saavutamisel. Gallo et al. [20] pakkusid välja meetodi, kus kvantitatiivne analüüs viidi läbi kasutades pöörd-faasilist HPLC ning LC/ESI-MS/MS. Kasutati nii positiivse kui negatiivse iooni režiimil LC/ESI-MS/MS. Kõik uuritud ravimid, va. salitsüülhape, eraldamine saavutati HPLC kolonnil kasutades mittepolaarset

otsakorki, mida iseloomustas kõrge selektiivsus mittepolaarsete hüdrofoobsete ühendite suhtes. Pea kõiki ravimeid saab ESI-MS abil tuvastada nii positiivses kui ka negatiivses iooni režiimis, va. meklofenamiinhape ja salitsüülhape on tuvastatavad ainult negatiivse iooni režiimis. Lisaks, negatiivse iooni režiim on efektiivsem flurbiprofeeni ja ibuprofeeni analüüsimiseks, kuna positiivse iooni spektris on naatrium-adukte. Teiselt poolt on oksüfenbutasooni ja suxibutasooni analüüsiks positiivse iooni režiim sobivam. LC/ESI-MS/MS meetodi lineaarset ala kontrolliti kontsentratsioonivahemikus 25–1600 ng/ml. NSAID kromatogrammide võrdlemisel nii lahustis kui ka maatriksis täheldati nikotiinhappe derivaatide, pürasolidindioonide ja antraniilhappe derivaatide mõningast signaali suurenemist. Samas salitsüülhape, arüülpropioonihappe derivaatide puhul oli näha signaali mõningast võimendamist. Flurbiprofeeni puhul oli signaali vähenemine märkimisväärne. Meetodi usaldusväärsust väljendab eksperimentide saagis, mis enamasti oli vahemikus 69,0–96,7%, välja arvatud salitsüülhape ja 5-hüdroksüfluniksiini korral, vastavalt siis 17,6–25,3% ja 42,6–49,5%. See võib olla tingitud ühendite tugevat polaarusest, mis vajavad tõenäoliselt teistsugust tahke faasi puhastamisstrateegiat, näiteks pöördfaasi asemelioonivahetust.

Rúbies et al. [19] töötasid välja QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) meetodi koos LC-MS/MS. Esmalt kasutati ainete eraldamiseks LC-QqQ-MS/MS meetodit. QqQ - kolmekordne kvadрупoolne massispektromeetria on tandem-massispektromeetria, mis koosneb kahest järjestikulisest kvadрупooli massianalüsaatorist, raadiosagedusega - nende vahel on ainult kvadрупool, mis toimib lahtrina kokkupõrkest põhjustatud dissotsiatsioonil. Teise meetodina kasutati ainete eraldamiseks LC-Q-Orbitrap-MS/MS meetodit. Orbitrap ioonlõksude massanalüsaator, mis püüab ioone orbiidi liikumises spindli ümber. Lineaarse ala hindamiseks kasutati korrelatsioonikordajat ja punkt-punkti hälvet. Tulemusteks saadi kõigi analüütide jaoks hea lineaarsuse: ning ekstraheerimise ja puhastamise etappide absoluutsed saagised on vahemikus 78,1–97,1%. Lisaks testiti UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS/MS süsteemi sub- $\mu\text{g}/\text{kg}$  tasemel. Kõikide ravimite korral oli madalaimaks detekteerimise piiriks 0,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : prekursori ioone oli võimalik tuvastada isegi madalamatel kontsentratsioonidel (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Paljud analüütilised protseduurid hõlmavad ka näiteks fluorestsentsi kasutamist. Meetodi kõrge tundlikkuse tõttu on võimalik mõõta väga madalaid kontsentratsioone ja seda kasutatakse jälgede määramisel. Fluorestsentsi saab kasutada ka kromatograafias detektorina. Fluorestsentsi iseloomust tulenevalt on tegemist väga selektiivse detektoriga (nähaakse ainult fluorestseeruvaid analüüte). Võrreldes vedelikukromatograafias kõige levinuma UV-Vis detektoriga on fluorestsentsdetektor oluliselt tundlikum (avastamispiir on ligikaudu tuhat korda



madalam, ulatudes ppm'ide ja ppb'ide suurusjärku). Gallo et al. [21] proovisid NSAID'ide määramiseks piimas kasutada HPLC-FLD (fluoresents detektor). Iga ravimi jaoks testiti selektiivseid ergastuse ja kiirguse lainepikkusi, et määrata parimad katsetingimused fluorestsentsi määramiseks. Tulemusena selgus, et vaid 9/18st NSAID'st on määratavad vajalikus kontsentratsioonide vahemikus: karprofeen, flurbiprofeen, naprokseen ja vedaprofeen (arüülpropioonhappe derivaadid); mefenaamhape, meklofenaamhape ja tolfenaamhape (antraniilhappe derivaadid); niflumiinhape ja 5-hüdroksüfluniksiin (nikotiinhappe derivaadid). Selgus, et fluorestsentsi emissiooni intensiivsust tõstavad molekulide resonantsstruktuurid: aroomaatnetuum või lämmastikuaatom. Kuna meloksikaamil, ketoprofeenil ja ibuprofeenil puuduvad sellised struktuurid molekulaarstruktuuris, on nende ainete korral fluorestsentsi intensiivsused suhteliselt madalad. Nende tulemuste põhjal võib öelda, et FLD on hea alternatiiv UV-vis detektorile. Eelkõige võimaldab see tuvastada 5-hüdroksü-fluniksiini ja tolfenaamhapet lubatud jääkide piirnormidest madalamatel kontsentratsioonidel. Lisaks, karprofeeni puhul on FLD detektorit kasutades määramispiirid madalamad kui UV-vis detektoriga määrates.

### **Kasutatavad eluendid**

Gentili et al. [13] kasutasid identifitseerimiseks LC-MS/MS süsteemi. Kromatograafiline eraldamine jaotati kaheks, et parandada atsetaminofeeni ja salitsüülhappe eraldumist ja tundlikkust. Peamine raskus ravimite eraldamisel maatriksist on enamasti seotud nende erinevate pKa väärtustega (3-9,5). Piikide sabetamist täheldati meloksikaami ja salitsüülhappe puhul, kasutades aga ioonpaari moodustava ainenäite ammooniumformiaati või atsetaati (1–5 mM), vähenes piigi saba ulatus, negatiivse iooni režiimis S/N suhe paranes, kuid samas halvenes kromatograafiline selektiivsus. Teravad ja sümmeetrilised piigid saavutati kui kasutati dibutüülamiini, samas diklofenaki ja meklofenamiinhappe eraldamiseks oli vaja selektiivsemat orgaanilist modifikaatorit. Parima kompromissi kromatograafilise eraldusvõime ja S/N suhte osas saavutati, kui kasutati metanooli ja atsetonitrili segu 50:50 (mahu järgi) B faasina ja kui lisati dibutüülamiini mõlemasse liikuvasse faasi. Samuti pandi tähele, et aspiriini metaboliseerub kiiresti ja jaotub rakuvälisesse vedelikku nagu piim; mistõttu ei ole aspiriini lubatud kasutada loomade raviks, kelle toodang (näiteks piim) läheb inimtoiduks. Rúbies et al. [19] kasutasid ainete eraldamiseks ja identifitseerimiseks LC-MS/MS meetodit. Et parandada kromatograafiliste piikide reprodutseeritavust, tuli liikuvasse faasi lisada sipelghapet. 0,006 M askorbiinhappe lisamine atsetonitrili ekstraheerimislahusele parandas märkimisväärselt

fenüülbutasooni ja oksüfenbutasooni tulemusi ega põhjustanud negatiivses režiimis jälgitavate ühendite tundlikkuse kadu.

### Gaaskromatograafia

Gaaskromatograafia on laialdaselt levinud kromatograafiline tehnika, mida kasutatakse analüütilises keemias ühendite lahutamiseks ja analüüsimiseks. Lahutatav proov viiakse aurustisse ja sealt edasi kolonni gaasilisel kujul kandegaasi vooluga. Seega sel meetodil saab lahutada aineid, mis aurustuvad ilma lagunemiseta. Arroyo et al. [18] proovisid samaaegselt määrata piimas seitset NSAID´d (ibuprofeen, naprokseen, ketoprofeen, diklofenak, flufenamiinhape, tolfenaamhape ja meklofenamiinhape) kasutades selleks gaasikromatograafiat koos massispektromeetriaga (GC/MS). Eksperimentaalse töö optimeerimiseks kasutati D-optimaalset modelleerimist (modelleerimine võimaldab parameetrite osakaalusid hinnata), optimeeriti 8´t eksperimentaalset tegurit (5 on seotud tahke faasi mikroekstraktsiooni protsessiga ja 3 derivatiseerimise reaktsiooniga). Modelleerimine võimaldas uurida ja optimeerida kõiki parameetreid etteantud vahemikus viidi läbi 14 eksperimenti 512 asemel. Saadud määramispiirid olid kõik madalamad kui 2010/37/EC poolt paika pandud piirid. Detailsem ülevaade eeskirjast on toodud tabelis 4.

### Kapillaarelektroforees

Kapillaarelektroforees (CE) on alternatiivne tehnoloogia LC´le ja GC´le, kuna seda peetakse nn. roheliseks analüüsimeetodiks, kuna kasutatud reaktiivide kogused on väikesed, meetod ise on efektiivne, lühike analüüsiaeg. Sellegipoolest on enamik kaubanduslikke CE-seadmeid varustatud UV-detektoritega, mille tundlikkus on madal. Selle tundlikkusprobleemi ületamiseks on välja töötatud mitmed eelkontsentratsiooni strateegiad. Alshana et al. [11] kasutasid viie NSAID määramiseks piimas ja piimatoodetes „field-amplified sample stacking“ (FASS) kapillaarelektroforeesi. See põhineb ideel, et ioonid, mis elektroforeetiliselt migreeruvad madala juhtivusega lahuse (proov) kaudu suure juhtivusega taustalektrolüüti, aeglustuvad kahe lahuse piiril dramaatiliselt. Kasutades FASS kapillaarelektroforeesi, langes detekteerimispiir (LOD, arvutatuna signaali ja müra ( $S/N$ ) suhte 3 alusel;  $N$  on baasjoone müra) 4,5–9,4 korda võrreldes tavapärase kapillaarelektroforeesiga. Detailsem ülevaade eeskirjast on toodud tabelis 5.

## Ensüüm-immuunsorbtsiooni meetod (ELISA)

ELISA meetodi etapid: (1) Märjastamata antikeha inkubeeritakse tema antigeeni (proovi) juuresolekul; (b) omavahel seotud antikeha-antigeen kompleksid lisatakse antigeeniga kaetud kaevukesse; (c) plaat pestakse, et eemaldada sidumata jäänud antikehad. Mida rohkem on antigeeni proovis, seda rohkem antigeeni-antikeha komplekse moodustub, mille tulemusena on vähem sidumata jäänud antikehasid, mis oleksid võimelised seonduma antigeeniga kaevukeses; (d) lisatakse primaarse antikeha spetsiifiline sekundaarne antikeha. Teine antikeha haagib end ensüümi külge; (e) lisatakse substraat ja alles jäänud ensüümid kutsuvad esile värvimuutuse või fluorestseeriva signaali; (f) reaktsioon peatatakse, et ära hoida edaspidist signaali küllastumist. Chen et al. [22] kasutasid 5-hüdrofluniksiini määramiseks piimas konkureerival ELISA<sup>1</sup> (icELISA) baseeruvat meetodit. Konkureeriva ELISA korral konkureerib primaarse antikeha sidumissaitide pärast proovis märjastama antigeeniga. Mida vähem on antigeeni proovis, seda rohkem märjastatud antigeeni säilitatakse kaevukeses ja seda tugevam on signaal. Uuringus ühendati fluniksiin kandjavalguga ja pärast küülükute immuniseerimist sünteesitud immunogeenidega saadi polüglonaalsed antikehad. Toodetud antikehade põhjal konstrueeriti icELISA 5-hüdroksüfluniksiini jääkide tuvastamiseks. Lisaks püüti kiire ja lihtsa skriiningmeetodi loomiseks lihtsustada aeganõudvat proovi ettevalmistamist. icELISA meetodi tulemusi võrreldi LC-MS/MS meetodiga. Proovi ekstraheerimiseks lisati  $1,0 \pm 0,01$  ml piimale 4,0 ml 0,5% vesinikkloriidhappega (HCl) atsetonitriili. Proove töödeldi ultraheliga 5 minutit ja seejärel tsentrifugeeriti 10 minutit 5000 g juures. Seejärel koguti 2 ml supernatanti ja aurustati lämmastikuvoorus 55°C juures kuivaks. Pärast lahustamist 500 µl analüüsipuhvris analüüsiti proovi icELISA meetodil. Sobivad analüüsi tingimused olid järgnevad: (a) lähtudes  $A_{max}$  (puhvri neelduvus) väärtusest on antigeeni ja antikeha katmiseks sobivaim lahjendussuhe 1:2000; (b) arvestades  $A_{max}$  väärtust ja testi tundlikkust (IC<sub>50</sub>), on puhvri jaoks eelistatud kergelt happeline pH (pH 6,5); NaCl kontsentratsioon 0,05 M oli optimaalne, arvestades  $A_{max}$  väärtust ja tundlikkust (IC<sub>50</sub> oli minimaalne ja samal ajal oli  $A_{max}/IC_{50}$  maksimaalne). Analüüsi tulemuste korratavus jäi vahemikku 3,5-6,8%. Lineaarne vahemik oli 0,076-16,3 ng/ml. Esines vähesel määral ristreaktiivsus (<0,1%) teiste sarnaste NSAID'idega. Piimas tehtud katsete korral jäi keskmine saagis vahemikku 81–105%. Väljatöötatud icELISA meetodi LOD piima 5-hüdroksüfluniksiini korral 0,78 µg/kg. Tulemuste analüüsimiseks kulus 120 minuti. IcELISA tulemused näitasid vähe olulisi erinevusi LC-MS/MS tulemustest. Detailsem ülevaade eeskirjast on toodud tabelis 6 (toodud peatüki lõpus).

## Biosensorid

Biosensorid on analüüsivahendid, mis muudavad bioloogilise signaali mõõdetavaks signaaliks (nt. elektriliseks, optiliseks jt. ja/või mõõdavad seda. Näiteks kasutab meditsiinimaailm biosensoreid viiruste tuvastamiseks verest või ka veresuhkru taseme mõõtmiseks. Biosensorite eelisteks võrreldes traditsiooniliste meetoditega nagu kromatograafia on kõrge selektiivsus (antigeen-antikeha, ensüüm-substraat jm.), kiired tulemused (minutites), kompaktsus ja kasutaja sõbralikkus (ei vaja spetsiaalselt väljakoolitatud personaali), *on-line* analüüside võimalikkus. Suurimaks puuduseks hetkel on nende stabiilsus ja tundlikkus. Käesoleval ajal on kõige laialdasemalt kasutuses olev biosensor glükomeeter – glükoosi monitooring diabeedihaigetel – väike, lihtne kasutada ning annab kiire ja adekvaatse vastuse. Campanella et al. [23] pakkusid välja kiireks määramiseks biosensor süsteemi, mis põhineb tsüklooksügenaasi ensüümi inhibeerimisel NSAID´de poolt. Immobiliseerimine: COX ensüüm lahustati puhvril; seejärel kasteti lahusesse eelnevalt valmistatud kappakarrageeni membraan ja lasti seista üleöö. Mõõtesüsteemi optimeerimiseks kasutati COX-1. Selgus, et parim tundlikkus ja täpsus saavutatakse substraadi kontsentratsioonide korral, mis ületavad  $7,5 \times 10^{-4}$  M. Inkubatsiooniajaks valiti 30 minutit. Selleks, et hinnata, milline kahest ensüümi iso-vormidest sobiks paremini: COX-1 ja COX-2 abil saadud andmete võrdlus näitab, et iga testitud ravimite lineaarsused, tundlikkused ja LOD-väärtuste vahemikud jäid kõik samasse suurusjärku. Kuid COX-1 süsteemi kasutusaeg on pikem kui COX-2 korral. Uuriti ka biosensori reprodutseeritavust (n=5). RSD saadi 6%. Säilitamiseks hoiti valmistatud elektroode 4°C juures 0,1 M Tris-HCl puhvril (pH = 8,0). Elektroode testiti ka piimaproovides, määramise täpsus jäi 90-93% vahele. Rau et al. [24] töötasid välja märgisevaba optilise biosensorsüsteemi piimas diklofenaki tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks. Optimeeritud meetodi abil oli võimalik maatriksiefekte edukalt vältida, mistõttu ei vaja väljatöötatud immunosensor proovide eeltöötlust. Võimalik on mõõta otse lahjendamata piimas. See on suur eelis võrreldes piimas diklofenaki tuvastamise ja kvantifitseerimise standard meetoditega, näiteks vedeliku- või gaasikromatograafia koos massispektromeetriaga, mis vajavad proovi ulatuslikku eeltöötlemist, näiteks ekstraheerimist ja puhastamist. Koostisosade mitmekesisuse ja nende võimaliku interferentsi tõttu anduri pinnal oli vajalik siiski suurendada pinna pesemise aega ja regenereerimislahuse kogust, mille tulemusena pikenes analüüsi aeg 20 minuti võrra. Vaatamata sellele ei vaja süsteem proovi ettevalmistamiseks aega, nagu näiteks traditsioonilisemad meetodid, mille korral on vajalik proovide eeltöötlemine, mis võib võtta vähemalt 50 minutit. Piima kalibreerimiskõvera tõus on oluliselt väiksem kui puhvril, seda saab

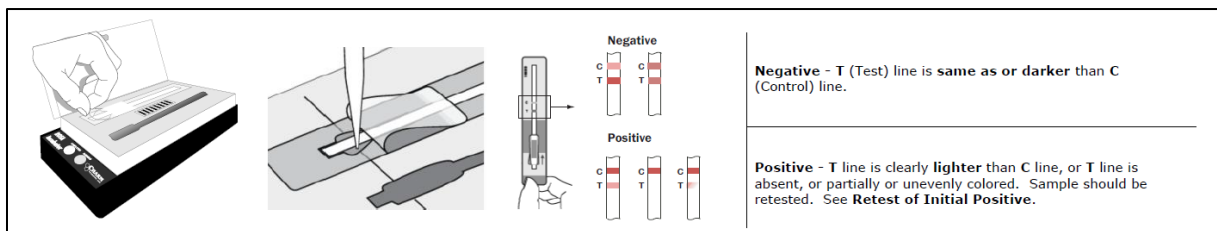
seletada asjaoluga, et antikehad käituvad erinevates maatriksites erinevalt. Määramispiiriks piimas saadi 0,112 µg/l ja täpsus jäi 105-120% vahele. Lin et al. [25] töötasid välja immunokromatograafilise ribatesti fluniksiin meglumiini (FM) tuvastamiseks piimas. Ribatestide tööpõhimõte seisneb proovis sisalduva FM ja kolloidse kullaga märgistatud FM mAb (antikeha) konkureerimisel pinnal olema antigeeni sidumiskohtade üle. FM-positiivsetes proovides konkureerib FM pinnal olevate antikehadega, mis on konjugeeritud kolloidse kullaga. Analüüdi kontsentratsiooni suurenedes muutub testjoone värvitugevus nõrgemaks, kuni see lõpuks kaob. Testjoone värvitugevuse ja proovis oleva FM kontsentratsiooni vahel on proportsionaalne pöördvõrdeline seos. Immunokromatograafilise ribatest on lihtne, kiire, kaasaskantav ja tundlik meetod FM tuvastamiseks piimas. Põhjalikum ülevaade eeskirjadest on toodud tabelis 7 (toodud peatüki lõpus).

## Kommertsiaalsed testid NSAID´de määramiseks piimas

### Erinevate testide tööpõhimõtted

#### Charm FLUSBL test

Charm (<http://www.charm.com>) tõi aastal 2012 turule testi beeta-laktaami ja 5-hüdroksüfluniksiini (FLUSBL test) jääkide üheaegseks määramiseks toorpiimas. Charm testikomplekt võimaldab meiereidel samaaegselt tuvastada 5 erinevat beeta-laktaami, samuti fluniksiini, kasutades selleks patenteeritud tehnoloogiat - ROSA (Rapid One Step Assay). Inkubeerimisaeg 8 min. ROSA ribade testitulemusi saab lugeda ja ametlikult registreerida, kasutades süsteemi Charm EZ või süsteemi Charm EZ Lite. Charm FLUSBL testi tulemusi saab ka visuaalselt tõlgendada kuid seda vaid mitteametlikult.



**Joonis 3.** Charm´i poolt pakutavate testide tööpõhimõte ja analüsaator.

Douglas et al. [26] uurisid 5-hüdroksüfluniksiini määramise võimalusi toorpiimas, kasutades selleks FLUSBL testi ning tulemusi võrreldi LC-MS/MS meetodiga. Teste kasutati vaid eelnevalt spaigitud piima proovides ravimi määramiseks. Pimekodeeritud proovid komplekteeriti ja jagati 10 iseseisva labori vahel. Kokkuvõtte tulemustest (lisatud kontsentratsioon ng/ml – positiivsed proovid/proove kokku): 0 – 0/60; 0.2 – 4/30; 0.4 – 1/30; 0.8 – 15/30; 1.2 – 17/30; 1.6 – 25/30; 2.0 – 30/30. Kokku tehti 240 pimekatset, millest 60 olid puhtad piima proovid ja 180 oli lisatud erinevates kontsentratsioonides 5-hüdroksüfluniksiini.

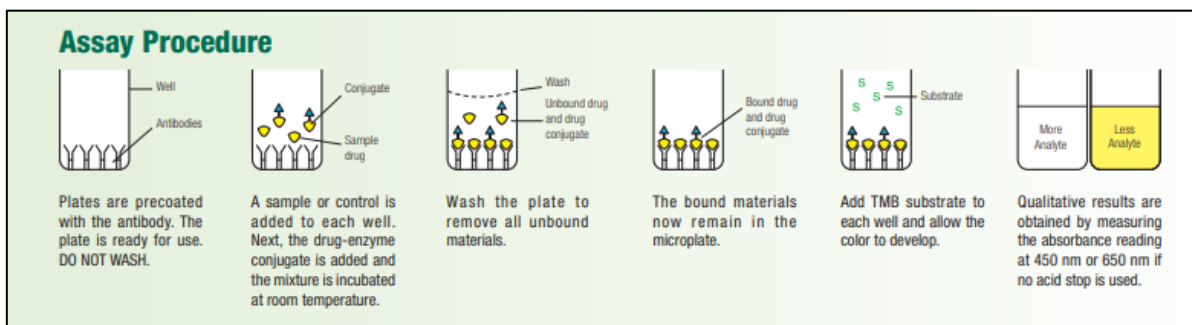
#### Charm FLU test

Charm 5-hüdroksüfluniksiini (FLU test) määramise testikomplekt baseerub immunoretseptoritel, mis kasutab samuti ROSA (Rapid One Step Assay) tehnoloogiat. Fluniksiin interakteerub testribas olevate värviliste helmestega. ROSA ribade testitulemusi saab lugeda ja ametlikult registreerida, kasutades süsteemi Charm EZ või süsteemi Charm EZ

Lite. Charm FLUSBL testi tulemusi saab samuti visuaalselt tõlgendada kuid seda vaid mitteametlikult.

### Neogen'i fluniksiini test

Neogen (<https://toxicology.neogen.com/>) Fluniksiini ELISA (ensüümidega seotud immunosorbentanalüüs) testikomplekt on kvalitatiivne üheastmeline komplekt, mis on ette nähtud kasutamiseks ravimite ja/või nende metaboliitide tuvastamiseks. Tööpõhimõte: testikomplekt toimib konkureerimisel proovis oleva ravimi või selle metaboliidi ja ravim/ensüümi konjugaadi vahel antikehade sidumiskohtade üle. Esiteks lisatakse proov mikroplaadile. Seejärel lahjendatud ravim/ensüümi konjugaat ja segu inkubeeritakse toatemperatuuril. Inkubatsiooni ajal seondub proovis olev ravim või ravim-ensüümi konjugaat mikroplaadi süvenditesse immobiliseeritud antikehaga. Pärast inkubeerimist pestakse plaatidelt seondumata proov või ravimi/ensüümi konjugaat maha. Seondunud ravim/ensüümi konjugaadi olemasolu tuvastatakse K-Blue® substraadi (TMB) lisamisega. Pärast 30-minutist inkubeerimist, reaktsioon peatatakse Red Stop lahuse lisamisega. Testi saab lugeda visuaalselt või mikroplaadilugejaga, mis on varustatud 650 nm filtriga.



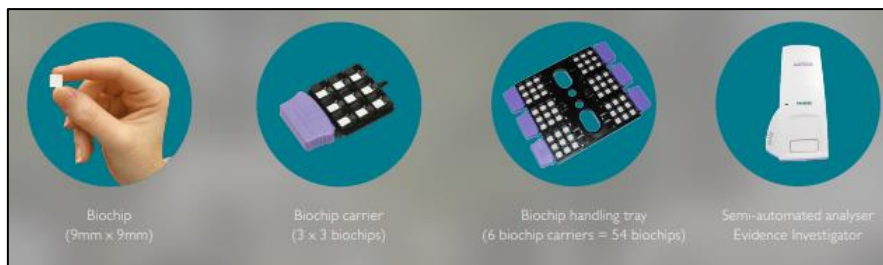
**Joonis 4.** Neogen'i poolt pakutavate testide tööpõhimõte.

### BALLYA fluniksiini test

Ballya Fluniksiini test (<https://ballyabio.com/>) on kiire test fluniksiini jääkide tuvastamiseks. Baseerub immunokromatograafia testi tehnoloogial kvalitatiivne test ning kasutatav vaid sõeluuringu eesmärgil. Ettevõtte soovitus: kui saadakse prooviga positiivne vastus, tuleks kasutada täiendava tuvastamise jaoks mõnda muud tuvastamismeetodit, näiteks ELISA, PCR jne.

## InfiniPlex piimatest

Randox Food Diagnostics (<http://www.randoxfood.com>) ja National Milk Laboratories (<https://www.nationalmilklaboratories.co.uk/>) pakuvad InfiniPlex (IPM) piimatestide süsteem, mis võimaldavad tuvastada piimas olevaid ravimijääke ja muid saasteaineid ([https://www.youtube.com/watch?v=3iwR4kQyRY&ab\\_channel=RandoxFood](https://www.youtube.com/watch?v=3iwR4kQyRY&ab_channel=RandoxFood)). Tegemist on kemiluminesentsil baseeruva immunotestiga, kus kasutatakse analüütide tuvastamiseks spetsiifilisi antikehasid [27]. See lühendab testimise aega neljale tunnile ja vaja on ainult väikest proovimahtu (25 µl). Test võimaldab tuvastada 11 erinevat põletikuvastast ühendit. InfiniPlexi test on väga tundlik, kuid ei ole kvantitatiivne. Teisisõnu annab see lihtsalt positiivse või tuvastamata (n.d) tulemuse. IPM® testikomplekt on valideeritud vastavalt Euroopa komisjoni otsusele EC/2002/657 ja vastavalt Euroopa skriinimismeetodite valideerimise juhendile (2010).



**Joonis 5.** Randox Food Diagnostics´i poolt pakutavate testide tööpõhimõte ja analüsaator.

## Informatsioon erinevate NSAID´de testide tarnijate ning hindade kohta

Neogen (<https://toxicology.neogen.com/>) hinna- ja tarneinfo: 96 kaevuga plaadi hind on 212,58 dollarit ja 480 kaevuga plaadi hind 998,55 dollarit. Saatmine ligikaudu 54 dollarit. Hetkel Eestis edasimüüja puudub, tarnitakse otse. Tarneaeg on umbes nädal. Olemas on Fluniksiini ELISA (tundlikkusega 2,2 ng/ml), Karprofeen ELISA (tundlikkusega 122 ng/ml) ja Ketoprofeen ELISA (tundlikkusega 24,8 ng/ml) testid.

Ballya (<https://ballyabio.com/>) hinna- ja tarneinfot ei olnud kahuks võimalik ettevõttega suheldes saada. Samuti ei olnud võimalik leida kusagilt infot nende testide tundlikkuse kohta.

Charm (<https://www.charm.com/>) teste tarnib Eestisse Läti ettevõtte APU Genesis. Olemas on FLU testiribad (tundlikkusega 40-50 ppb) ja FLUSBL testiribad (tundlikkusega 2 ppb).

Randox Food Diagnostics (<http://www.randoxfood.com>) tarneinfot ei olnud kahuks võimalik saada. Neil on olemas InfiniPlex piimatestide rida/süsteem (tundlikkusega 0,2-100 ppb, sõltuvalt analüüdist) hinnaga 55 naela.



**Tabel 8.** Informatsioon erinevate testide tarnijate ning hindade kohta (seisuga 1. detsember 2020)

Test	Tarnija	Pakendi suurus	Hind (1 test)	Tarnija kontaktandmed
<b>Fluniksiin test; Ketoprofeen test; Karprofeen test</b>	NEOGEN	96 kaevuplaat 480 kaevuplaat	2,2 \$ 2,1 \$	The Dairy School Auchincruive Ayr, KA6 5HU Scotland, UK +44 (0) 1292 439548 ContactEMEA@NEOGEN.com *DBaxter@neogen.com
<b>Fluniksiin test; Meloksikaam test</b>	BALLYA	25 sensorriba	-	5F, Building B, No. 241, ShangYe Road, Huadu, Guangzhou, China, 510800 +86 20 3947 9163 info@ballyabio.com *liang@ballyabio.cn
<b>Fluniksiin+<math>\beta</math>- laktaamide test; Fluniksiin test</b>	Charm Sciences, Inc.	100 testi	4,5 €	SIA APU GENESIS Ganību dambis 24d-715 Rīga, LV-1005 +371 29242092  659 Andover Street Lawrence, MA 01843-1032 USA 1.978.687.9200 info@charm.com
<b>Multitest: deksametasoon, hüdrofluniksiin, fluniksiin, meloksikaam, metamisool, methylprednisaloo, prednisaloon, phenüülbutasoon, tolfenaamhape</b>	National Milk Laboratories koostöös <i>Randox Food Diagnostics</i>	43 testi	1,3 £	National Milk Laboratories 01902 749920 milk@nationalmilkclabs.co.uk www.nationalmilkclabs.co.uk  http://www.randoxfood.com

## Erinevate NSAID´de määramismeetodite kokkuvõtlik võrdlus

Peamiselt kasutatakse NSAID´de määramiseks piimas kromatograafilisi meetodeid nagu vedelikkromatograafia (LC) ja gaasikromatograafia (GC), kusjuures on kasutatud erinevaid detektoreid: ultraviolet- (UV-VIS) ja fluorestsents- (FL), massidetektorit (MS). Kromatograafilised meetodid on küll leidnud enim kasutust, kuid nende läbiviimine nõuab tavaliselt keerukaid ja kalleid seadmeid, töömahukaid proovide ettevalmistamise protseduure ja oskusi kromatograafiatehnikaga ümberkäimisel. Lisaks on proovitud NSAID´sid määrata ka biosensorite ja ELISA abil. Biosensorite ja ELISA eelisteks võrreldes traditsiooniliste meetoditega nagu kromatograafia on kõrge selektiivsus (antigeen-antikeha, ensüüm-substraat

jm.), kiired tulemused (minutites), kompaktsus ja kasutajasõbralikkus (ei vaja spetsiaalselt väljakoolitatud personaali), *on-line* ja *on-site* analüüside võimalikkus. Toorpiima kiireks kohapealseks kontrolliks on NSAID´de määramiseks saadaval ka erinevaid kiirteste.

**Tabel 9.** Erinevate meetodite kokkuvõttev võrdlus

Meetod	LOD <sup>1</sup>	Hinnanguline analüüsi aeg (koos ekstraksiooniga)	Määratavad NSAID	Ligikaudne analüüsi hind
<b>HPLC</b>	0,01-15 µg/kg	5-6 tundi	Kõik	> 200 € <sup>2</sup>
<b>GC</b>	3,4-7,8 (CCα) µg/kg		Ibuprofeen, naprokseen, ketoprofeen, diklofenak, meklofenaamhape, tolfenaamhape	≈ 320 € <sup>3</sup>
<b>ELISA</b>	0,78 µg/kg	1,5 päeva analüüs	5-hüdrofluniksiin	-
<b>Kapillaarelektroforees</b>	4,8-13 µg/kg	2 tundi	Etodolak, naprokseen, ketoprofeen, flurbiprofeen, diklofenak	-
<b>Biosensorid</b>	0,5-5x10 <sup>-8</sup> M 0,09-113 µg/L	30 min analüüs	Naprokseen, diklofenak, ibuprofeen, tolmetiin, fluniksiin meglumiin,	-
<b>Kiirtestid (Charm FLUSBL jt.)</b>	25-30 µg/kg	5 min	Fluniksiin, meloksikaam, ketoprofeen, karprofeen, 5-hüdrofluniksiin	1,3-5€/test <sup>4</sup>

<sup>1</sup> LOD – määramispiir; <sup>2</sup> Veterinaarlabori hinnakirjas on teiste ravimijääkide määramine toidus; <sup>3</sup> ettevõtete hinnakirja alusel.

**Tabel 3. Vedelikkromatograafia määramisemeetodid**

NSAID	Piima proovide ettevalmistamine	Ekstraheerimine	Eraldamine	LDR, (µg/kg)	LOD, (µg/kg)	RSD, %	Saagis, %	Ref.
Flurbiprofen; ketoprofen; diclofenac sodium salt; mefenamic acid	Before analysis: milk samples were diluted 5 times by the ultra-pure water, then alkaline hydrolysis was carried out. 5 g of milk sample dilution was mixed with 2 mL of 3 M NaOH solution. The mixture was heated at 40°C for 5 min. Then centrifuged (6000 rpm, 5 min). The bottom phase was transferred and used further.	Liquid-liquid microextraction:  5 mL of sample solution was placed into a vial containing 25 mg of menthol and 2 mL of acetate buffer solution (pH 4.0). The mixture was heated to 50°C and mixed for 1 min. Thereafter, sample was centrifuged. Then the vial was placed in a cryostat at +1°C for 5 min. The solid extract was dissolved in 25 µL of methanol and filtered (0.45 µm), 20 µL of obtained solution was introduced into a HPLC-MS/MS system.	HPLC-MS/MS procedure:  Luna C18 column (250mm×2.0 mm, 5 µm) at 45°C.  Mobile phase: methanol and 0.05% aqueous solution of formic acid at a ratio of 3:1 (v/v) (0.4 mL/min) in isocratic mode.	0.03–300 0.03–200 0.03–200 0.1–250	0.01 0.01 0.01 0.03	3.5-4.6	96-107	[12]
Meloxicam; piroxicam	To separate the protein content from the milk samples, ammonium acetate (2.0 g) and ACN (10.0 mL) were added to fresh cow milk (10.0 mL) and was vigorously shaken for 3 min. The mixture was centrifuged at room temperature for 10 min at 8000 rpm. The unclear supernatant was transferred and its pH was adjusted to 2.0 by adding aqueous HCl (6.0 M, ≈6 mL). The sample was left for 10 min at room temperature and was then centrifuged for 15 min at 8000 rpm. The supernatant was separated and spiked 1.2 mL and 2.4 mL of working standard solutions at a concentration of 500 ng/mg and finally diluted to 30.0 mL with distilled water.	Solid Phase Extraction:  36 mg of sorbent was poured in 1.0 mL of distilled water and ultrasonically treated for 5.4 min. The resulting suspension was quickly injected into a solution including 30.0 mL of NSAID solution and 2.5 mL of phosphate buffer (pH 7.4). The obtained suspension was sonicated for 100 s. The sorbent was then separated with a strong magnet and the supernatant was discarded. Methanol (50 µL) was added to the sorbent and sonicated for 5.0 min. Finally, 10 µL of the supernatant phase was injected to HPLC	HPLC-MS/MS procedure:  Eurospheer 100/5C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 µm), temperature = 22 ± 0.5°C, mobile phase was an isocratic mixture of phosphate buffer (20 mM, pH 7.3) and methanol (60:40), flow rate = 0.8 mL/min, detector wavelength = 365 nm.	2.1-220 3.4-230	0.6 1.1	5.4-7.6 5.7-7.4	87-90	[16]

Indoprofen; naproxen; ketoprofen; carprofen; indomethacin; flufenamic acid; mefenamic acid; tolfenamic acid	Milk samples, were exposed to low heat for pasteurization and directly subjected to the SPE procedure without any pre-treatment  Preparation of MMFR: melamine (0.0248 mol) and PEG20000 (2.5 g) were dissolved in formaldehyde solution (37% wt, 0.2005 mol, 20 mL) in a three-necked bottle and stirred at 50°C until the solution was clear. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNPs were dispersed into water phase under agitation with the addition of HCl (9.0 mmol) and water (1 mL). Meanwhile, OB-2 (0.35 g) and Triton X-100 (0.35 g) were dissolved in petrol ether (49 mL) in another bottle. Finally, the oil phase was poured into the water phase for emulsification under mechanical agitation at a rate of 560 rpm and 50°C. After 8 h, the black solid was collected, washed with petrol ether, ethanol, and pure water consecutively and dried at 60°C for 5 h.	Solid Phase Extraction:  MMFR (20 mg) was added into a sample solution (4 mL). After being oscillated on an oscillator at 1000 rpm for 45 min, MMFR was quickly separated from the sample solution by attaching an Nd-Fe-B magnet (50 mm×50 mm×10 mm) to the bottom of the vial. The sample solution was decanted, and ultrapure water (200 µL) was added to wash the MMFR. After the water was decanted, filter paper was carefully dispatched to absorb the residual water. Subsequently, acetic acid-ACN (1.5/98.5, v/v, 100 µL) was used as the desorption solution to desorb the analyte from the MMFR under oscillation for 30 min.	HPLC-MS/MS procedure:  Welch Ultimate XB-C18 column (2.1×150 mm, 5 µm)  Flow rate = 0.3 mL/min; temperature = 45°C; injection volume = 10 µL  The mobile phase was a gradient prepared from ACN (component A) and 1% acetic acid aqueous solution (component B).  A gradient: 0–20 min, 65–62% B; 20–28 min, 62% B; 28–35 min, 62–55% B; 35–40 min, 55–60% B; 40–64 min, 60% B; 64–70 min, 65% B  The detection wavelength was 245 nm for ketoprofen, indomethacin, and carprofen, and 290 nm for the other studied NSAIDs	1-5000 5-5000 1-5000 1-5000 1-5000 5-5000 5-5000 5-5000	0.3 1.5 0.3 0.3 1.5 1.5 1.5	5-12	81–108	[17]
5-hydroxyflunixin	2 mL of a sample was transferred into a 50-mL centrifuge tube, 1.5 mL of 0.1 N HCl was added, and then the sample was vortexed for 3 min at high speed. The sample was then diluted to 30 mL with 50% acetone–ethyl acetate and vortexed for 1 min, sonicated for 30 s, and then centrifuged at a relative centrifugal force of 2,830 for 5 min at 20°C. The supernatant was transferred to a clean 15-mL test tube. The solvent		HPLC-MS/MS procedure:  Agilent Zorbax Extend-C18 column (100 by 2.1 mm) at 40°C.  Mobile phase A = 0.1% formic acid in water, phase B = 0.1% formic acid in ACN.  A gradient: t=0, A = 90% and B = 10%; 5 min, 10% A and 90% B; 6	1,9	15	90	[26]	

	was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 50°C. The residue was dissolved in 1 mL of 50% methanol-water, vortexed for 1 min, centrifuged at for 5 min at 20°C, and filtered through a 0.2 mm filter.		min, 100% B; 7 min, 100% B (flow rate = 0.4 mL/min)			
Negative ion mode: salicylic acid; naproxen; carprofen; flurbiprofen; ibuprofen; meclofenamic acid; niflumic acid; flunixin; 5-hydroxyflunixin in the;	5.00±0.01 g of milk were weighed, then added with 10mL ACN/methanol (90:10 v/v), mixed by vortex for 1min, then centrifuged at 1267 g for 10 min, and the supernatant collected. Then, 20 mL ascorbic acid buffer (0.010 mol/L pH 3.0 (AA buffer)) and 0.2mL HCl (1.0 mol/L) were added.	Solid Phase Extraction:  The sample was loaded at atmospheric pressure onto a C18 1 g SPE cartridge, previously rinsed with 3 mL n-hexane/diethyl ether (1:1 v/v), 3 mL methanol and 5 mL ascorbic acid buffer. After loading, the SPE cartridge was washed with 3 mL ascorbic acid buffer and 3 mL MilliQ water/methanol (90:10 v/v), then dried under vacuum for 30 min. Finally, the SPE cartridge was eluted with 3mL n-hexane/diethyl ether (1:1 v/v), and the eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at room temperature.	Max-RP 80A° Synergi stainless steel column 4mm particle 250x4.6mm; injection volume = 50 µL, at RT  Reversed-phase HPLC-DAD quantitative screening analysis:  Mobile phase A = 0.010 mol/L o-phosphoric acid, phase B = ACN  Linear gradient: from 35% B at time 0 to 65% B in 25 min; 100% B in 5min; holding for 5min; to 35% B in 2 min; the equilibrium time between analyses was 13 min. Flow rate = 1.2 mL/min  Ion-trap LC/ESI-MS/MS confirmatory analysis:  Mobile phase A = 0.1% (v/v) acetic acid in water, phase B = 0.1% (v/v) acetic acid in ACN  Linear gradient: from 35% B at time 0 to 70% B in 25 min; then to 100% B in 8 min; holding for 5min; to 35% B in 2 min; the equilibrium time	4 2 2 4 5 4 2 5 5  3 4 4 4 4 15 5  (*LOQ)	1.1-16 21-113	[20]
Positive ion mode: ketoprofen; suxibutazone; diclofenac; mefenamic acid; tolfenamic acid; phenylbutazone; oxyphenbutazone						

			between runs was 10 min. Flow rate = 0.3 mL/min.					
Flurbiprofen; carprofen; naproxen; vedaprofen; 5-hydroxyflunixin; niflumic acid; mefenamic acid,; meclofenamic acid; tolfenamic acid	5.00±0.01 g of milk were weighed, then added with 10mL ACN/methanol (90:10 v/v), mixed by vortex for 1min, then centrifuged at 1267 g for 10 min, and the supernatant collected. Then, 20 mL ascorbic acid buffer (0.010 mol/L pH 3.0) and 0.2mL HCl (1.0 mol/L) were added.	Solid Phase Extraction:  The sample was loaded at atmospheric pressure onto a C18 1g SPE cartridge, previously rinsed with 3mL n-hexane/diethyl ether 1/1 (v/v), 3mL methanol and 5mL ascorbic acid buffer. After loading, the SPE cartridge was washed with 3mL ascorbic acid buffer and 3mL MilliQ water/methanol (90/10, v/v), then dried under vacuum for 30min. Finally, the SPE cartridge was eluted with 3mL n-hexane/diethyl ether 1/1 (v/v), and the eluate was evaporated to dryness under a nitrogen stream at room temperature.	Max-RP 80A° Synergi stainless steel column 4mm particle 250x4.6mm; injection volume = 50 µL, at RT  Reversed-phase HPLC-FLD quantitative screening analysis:  Mobile phase A = 0.010 mol/L o-phosphoric acid, phase B = ACN  Linear gradient: from 35% B at time 0 to 65% B in 25 min; 100% B in 5min; holding for 5min; to 35% B in 2 min; the equilibrium time between analyses was 15 min. Flow rate = 1.2 mL/min	0.25 0.5 0.5 1.0 10.0 20.0 10.0 10.0 10.0	3.6-21.3	38-117	[21]	

NSAID	Piima provide ettevalmistamine	Ekstraheerimine	Eraldamine	CC $\alpha$ (MRL), µg/kg	CC $\beta$ (MRL), µg/kg	RSD, %	Saagis, %	Ref.
Carprofen; ibuprofen; tolfenamic acid; diclofenac; meloxicam; 5-hydroxyflunixin; phenylbutazone; 4- methylaminoantipyrine	An aliquot of 10 mL of milk was placed into a 50 mL polypropylene centrifuge tube, and 0.4 mL of ascorbic acid (100 mg/ml) was added into the tube. Samples were fortified with IS solution (50 µL) at levels corresponding to 5 ng/mL or 0.5 ng/mL	Liquid-liquid extraction:  Samples were vortexed, and 1 mL of glacial acetic acid was added to each sample followed by vortex mixing. ACN (10 mL) was added to each tube followed by vortex mixing. Then the entire content of extraction salts pouch MgSO <sub>4</sub> /NaCl (4 gr/1 gr) was added to each sample, which was immediately and vigorously vortexed. The samples were centrifuged (3900 rpm, 15 min,	HPLC-MS/MS procedure:  Kinetex XB-C18 column (2.6 µm, 100 Å 100 × 2.1 mm), column temperature = 40°C, injection volume = 2 µL  Mobile phase A = 0.1% formic acid in water; mobile phase B methanol (flow rate = 0.4 mL/ min).	0.15 5.0 62 0.12 16 46 2.50 53	0.17 7 74 0.13 18 51 3.0 56			[8]

20°C). An aliquot of 4 mL from the upper layer was transferred into a tube and evaporated under nitrogen at 60°C to dryness. The dried samples were reconstituted in 0.4 mL of methanol/water solution (1:1, v/v), transferred into 1.5 mL micro-centrifuge tubes and subsequently centrifuged (13500 rpm, 10 min, 20°C). The extracts in the micro-centrifuge tubes were left overnight at + 4°C. The samples were additionally centrifuged (13500 rpm, 10 min, 20°C)

The initial gradient: 0-12 min: 10-95% B, 12-12.5 min: 95-10% B, 12.5-15.5 10% B.

Carprofen; diclofenac; flufenamic acid; 5-hydroxyflunixin; ketoprofen; mefenamic acid; meloxicam; 4- methylaminoantipyrine; naproxen; niflumic acid; oxyphenbutazone; phenylbutazone; ramifenazone; salicylic acid; tolfenamic acid	A 4-mL of milk is aliquoted into a centrifuge tube and spiked with the internal standards and vortex mixed. The sample is left to equilibrate for 10 min.	Liquid-liquid extraction:  6 ml methyl cyanide is added. After vortex mixing and centrifugation for 10 min at 1912g, the supernatant is transferred into a graduated tube and concentrated to 4 mL under nitrogen at 60°C. Then filtrated through a 0.22-µm filter	HPLC-MS/MS procedure:  C18 column (2.1×150 mm) with 5 µm particle size and held at 25°C; temperature = 7°C, injection volume = 10 µL  Mobile phase A = H <sub>2</sub> O/ACN (95:5, v/v) + 0.1 % formic acid and phase B = ACN + 0.1 % formic acid  Gradient: eluent B held at 0% for 3.70 min, gradually increase to 45% in 0.10 min, continued with a linear increase to 65 % in 7.90 min, subsequent immediate increase to 100% in 1.10 min, decrease to 0% in 0.20 min, and finally re-equilibration at 0% for 7.20 min  Flow rate = 0.3 ml/min	35 0.12 2.4 45 11 2.2 17 55 2.3 2.2 2.2 2.4 25 33 54	39 0.14 2.8 51 12 2.4 18 61 2.5 2.3 2.4 2.7 31 35 57	1-23	79-110	[10]
--	---	--	--	--	--	------	--------	------

Acetaminophen; salicylic acid; ibuprofen; diclofenac; 5-hydroxy-flunixin; nimesulide; phenylbutazone; meclofenamic acid; tolfenamic acid; meloxicam; carprofen; ketoprofen; naproxen; etodolac	An aliquot (5 mL) of milk was transferred into a 50 mL centrifuge tube, and 10 mL of ACN was added. The mixture was vortexed for 2 min, then placed in an ultrasound bath for 10 min, and centrifuged at 7,000 rpm for 10 min at 0°C. The supernatant was concentrated in a water bath at 30°C under a gentle nitrogen stream, until a final volume of 5 mL. The extract was centrifuged for 10 min at 7,000 rpm at 0°C.	Solid Phase Extraction:  The conditioning of the SPE cartridge: 6 mL methanol and 15 mL Milli-Q water were added to the extracts, diluted to 150 mL with Milli-Q water and loaded onto the cartridge. The cartridge was dried under vacuum for 10 min and washed with 6 mL of hexane. The elution was accomplished with 5 mL of methanol and 15 mL of acetone. The eluate was collected, concentrated to a volume of 500 µL at 30°C under a gentle stream of nitrogen, and adjusted to the final value of 1 mL with methanol. Finally, the extract was filtered (0.45 µm)	HPLC-MS/MS procedure:  XTerra-MS C18 column (150×4.6 mm I.D., 5 µm particle size, injection volume = 20 µL  Mobile phase A = ACN/methanol (50:50, v/v) and phase B water, both of them containing 0.2 M DBA as ion pairing agent.  The gradient: (t in min): t=0, A=0%; t=1, A= 0%; t=2, A=20%; t=20, A=75%; t=20, A=100%; t=25, A=100%.  The flow rate = 1 mL/min	84.2 196 4.56 11.2 3.55 7.85 0.14 0.18 48.7 55.2 0.45 0.74 0.71 1.23 1.46 3.36 55.9 61.7 22.3 29.8 3.68 13.4 1.08 2.12 1.24 2.76 0.33 0.69	97-100	[13]	
4-dimethylaminoantipyrin; methylaminoantipyrin; meloxicam;	5g of milk weighed into a 75 mL centrifugation tube. Add 30 mL ACN, 0.02 mL working IS solution (1 mg/L), 0.1 mL antioxidant solution, 0.5 mL 2 M sodium hydroxide, and 7.5 g solid ammonium sulphate.  Mixture was homogenized for 30 s and 10 mL hexane added. After 5 min, the mixture was centrifuged for 5 min (3500 rpm = 7500 g). The intermediate layer was transferred into a 250 mL A 0.5 mL amount of DMSO and 0.5 mL antioxidant solution were added The following evaporation step proceeded at 50°C and was stopped when it reached a final pressure of 50 mbar. The residues were dissolved in 3 mL	Solid Phase Extraction:  The conditioning of the SPE cartridge was done with 2 mL ACN, 2 mL water, and 2 mL McIlvain buffer. The extract were sucked though the cartridge. This was followed by a 2 mL water rinse step. The cartridges were allowed to run dry for about 1 min Elution was achieved with 3 mL elution solution. The eluate was placed into a conical vial that contained 0.1 mL antioxidant solution and 0.1 mL DMSO. Nitrogen was used to blow down the mixture at 50°C until a final volume of about 0.1 mL was obtained; 0.1 mL ACN and 0.3 mL purified water were added to the residue. The	HPLC-MS/MS procedure:  The column temperature = 25°C, the injection volume = 5 µL.  Linear gradient: 0–0.5 min 10% B (0.4 mL/min), 0.5–2 min: 10–40% B, 2–6 min: 40–50% B, 6–6.1 min: 50–99% B and flow 0.4–0.7 mL/min, 6.1– 7 min: 99% B, 7–7.1 min: 99–10% B (0.7–0.4 mL/min), and 7.1–8 min: 10% B.  DEX from BET: 0–2.0 min 10% B (0.4 mL/min), 2.0–13 min: 10–50%B, 13.0–13.1 min: 50–90% B (0.4–0.7 mL/min), 13.1– 14.0 min: 90% B (0.7 mL/min), 14.0–14.1 min:	50.79 (50) 52.41 53.0 (50) 59.71 19.3 (15) 22.2	4-16	87-105	[14]



	McIlvain buffer. The remaining residues were rinsed and dissolved for a second time, and the combined 6 mL was transferred and used for microextraction.	mixture was well shaken and then transferred into LC vials.	90– 10% B (0.7–0.4 mL/min), and 14.1–16 min: 10% B (0.4 mL/min)		
“Acidic” NSAIDs: carprofen; celecoxib; diclofenac; 5-hydroxyflunixin; firocoxib; flunixin; ibuprofen; ketoprofen; mefenamic acid; meloxicam; naproxen; oxyphenbutazone; phenylbutazone; rofecoxib; tolfenamic acid	Milk (10±0.01 g) was weighed into a tube. IS solution (20 µL) was added, and the sample was vortex mixed and left for 10 min. 10 mL ACN and 2 g ammonium acetate were added. The sample was mixed and centrifuged (4120g, 20 min, –5°C) and the supernatant was transferred into tube and used for microextraction.	Solid Phase Extraction: “acidic” NSAIDs: 5 mL supernatant was cleaned on a Sep-Pak NH <sub>2</sub> cartridge with an additional layer of sodium sulphate (ca 4 g was poured into a cartridge) and preconditioned with 5 mL ACN. Analytes were eluted with 6 mL 5% formic acid in ACN. Next, 0.25 mL DMSO was added to the elute, and the sample extract was evaporated to ca 0.25 mL (N <sub>2</sub> , 40°C), transferred to an autosampler vial, and analysed by LC–MS/MS  Metabolites: approximately 2.5 mL supernatant was evaporated to dryness in a nitrogen stream (at 40°C) and reconstituted in 0.5 mL mobile phase (MeOH/ACN 0.01 M ammonium formate 0.25:0.75:9). The sample was filtered through syringe filters, transferred into an autosampler vial, and analysed by LC–MS–MS.	HPLC-MS/MS procedure:  Luna C8 column (3 µm, 2.1 mm×150 mm) connected to a Luna C8 guard column (2.0 mm×4 mm)  The column temperature = 40°C, the injection volume = 20 µL  The mobile phase was a gradient prepared from MeOH/ACN 8:2 (v/v) (component A) and 0.01 M ammonium formate pH 5.0 (component B).  Metabolites the initial gradient: 0-2 min: 90% B (0.20 mL/min), 2-7 min: 90-40% B, 7-9 min: 40% B, 9-11 min: 40-90%, 11-13 min: 90% B.  NSAIDs the initial gradient: 0-2 min: 90% B (0.20 mL/min), 2-7 min: 90-20% B, 7-12 min: 20% B, 12-17 min: 20-90%, 17-19 min: 90% B.  the flow rate was 0.20 mL/ min, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 20 µL	5,1 6,1 0,13 43 5,3 5,2 3,1 5,3 4,8 15,2 5,9 2,7 2,9 5,4 54 55 5,2 6,3 5,9	5,5 7,4 0,15 49 6 5,9 3,6 6,8 6,3 15,7 6,7 3 3,2 6,3 65 61 5,3 6,8 6,5
“Basic” NSAIDs: metamizole metabolites: 4- Methylaminofenazone; 4- Formylaminofenzone; 4- Acetylaminofenazone; 4-Aminofenazone					71–116 [15]

Ketoprofen; niflumic acid; flufenamic acid; meclofenamic acid; flunixin; 5-hydroxyflunixin; oxyphenbutazone; phenylbutazone; diclofenac; meloxicam	5 g of milk sample was weighed in a centrifuge tube and 100 µL of a 20 mg/L solution of IS was added.	10 mL of 5% acetic acid in ACN, 1 g of ammonium acetate, 4 mL of ascorbic acid 0.02 M in HCl 0.24 M and 5 g of Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> were added. The sample was shaken for 5 min, sonicated for 5 min and centrifuged (3000 rpm, 10°C, 10 min). The supernatant was transferred to a tube containing 150 mg of C18 and 1 g of MgSO <sub>4</sub> and the mixture was shaken for 5 min, sonicated for 5 min, and centrifuged. Then, the supernatant was evaporated to around 250 µL under a N <sub>2</sub> stream at 40°C, diluted to 500 µL with 0.1% formic acid and filtered (0.22 µm).	LC-QqQ-MS/MS procedure:	0.4	0.8	3-16.9	78-97	[19]
				1.0	1.4			
			Phenomenex Kinetex Biphenyl column (2.6 µm, 100 × 2.1 mm);	0.8	1.2			
			temperature = 40°C; injection volume = 20 µL.	0.5	0.9			
			Mobile phase A = 0.1% formic acid/water phase B = 0.1 % formic acid/ACN (flow rate = 0.4 mL/min).	1.5	1.9			
			The gradient: (t in min): t=0, A=90%; t=10, A=45%; t=10.1, A=90%; t=14, A=90%.	41.2	42.3			
			LC-Q-Orbitrap-HRMS/MS procedure:	0.9	1.3			
			Mobile phase A = 0.1% formic acid/water phase B = 0.1 % formic acid/ACN hyper grade (flow rate = 0.3 mL/min).	0.4	0.8			
			Phenomenex Kinetex XB C18 column (1.7 µm, 100 × 2.1 mm);	1.5	1.9			
			temperature = 40°C; injection volume = 10 µL.	15.8	16.8			
			The gradient: (t in min): t=0, A=70%; t=10, A=45%; t=10.1, A=70%; t=12, A=70%.					

**Lühendid eesti keeles:** NSAID – mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid; LDR – lineaarne mõõteala; LOD - määramispiir; RSD – suhteline standarhälve, HPCL-MS/MS - kõrgefektiivne vedelikkromatograafia-tandem-massispektromeetria; ACN - atsetonitriil; SPE – tahkefaas ekstraktsioon; MMFR - magneetiline melamiin-formaldehüüd vaik; DMSO - dimetüüldulfoksiid; IS - sisestandard; CC<sub>α</sub> - avastamispiir; CC<sub>β</sub> – avastamisvõime; wt = massiprotsent; DBA - di-n-butüülammooniumatsetaat; DEX - deksametasoon; BET – beetametasoon; HRMS - kõrge eraldusvõimega massispektromeetria

**Abbreviations in English:** NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drugs; LDR - linear dynamic range; LOD - limit of detection; RSD - Relative standard deviation, HPCL-MS/MS – high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ACN - acetonitrile; SPE - solid phase extraction; MMFR - magnetic melamine-formaldehyde resin; DMSO – dimethyl sulfoxide; IS - internal standard; BSA – bovine serum albumin; DBA - di-n-butylammonium acetate; DEX – dexamethasone; BET – betamethasone; HRMS - High resolution mass spectrometry

\* CC<sub>α</sub> = MRL+1.64\*SD of 20 Fortified blanks at MRL

\*\* CC<sub>β</sub> = CC<sub>α</sub>+1.64\*SD of 20 Fortified blanks at CC<sub>α</sub>

CC<sub>α</sub> and CC<sub>β</sub> are calculated for the analyte-specific MRL (the MRL is stated within brackets). The coefficient of determination covers the range of the five spiking levels.

**Tabel 4.** Gaaskromatograafia määramisemeetod

NSAID	Piima proovide ettevalmistamine	Ekstraheerimine	Eraldamine	CC $\alpha$ (MRL), $\mu\text{g}/\text{kg}$	CC $\beta$ (MRL), $\mu\text{g}/\text{kg}$	RSD, %	Saagis, %	Ref.
Ibuprofen; flufenamic acid; naproxen; ketoprofen; tolfenamic acid; diclofenac; meclofenamic acid	10g of milk were placed into a 50 mL centrifuge tube.  Fortified samples were prepared by the addition of internal standard solution and NSAID working solution (to final concentrations at 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).	Solid Phase Extraction: Process was performed using a Triplus autosampler, equipped with an SPME module. Fortified samples were homogenized for 30 s and left to stand for 10 min. 10 mL of ACN and 2 g of NaCl were added. The tubes were shaken for 60 s and centrifuged at 5000 rpm for 15 min, at 5°C. The top layer was removed and placed into 15 mL tubes and 4 mL of n-hexane were added. The tubes were shaken and centrifuged under the same conditions. The top layer was removed and discarded. The ACN extracts were evaporated to dryness with a rotary evaporator at 50°C. The residues were finally reconstituted with 4 mL of EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1, v/v). After addition of V $\mu\text{L}$ of the derivatization mixture of EtOH/Py/ECF, the final volume was adjusted at 10 mL with MilliQ water and placed in a 10 mL glass autosampler vial and sealed. The vial was then immersed in an ultrasonic bath at room temperature.	GC/MS procedure:  J&W DB-5MS capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 $\mu\text{m}$ film thickness). Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a split-splitless injector; He as the carrier gas (flow rate = 1.0 mL/min; temperature = 250°C; transfer line temperature = 250°C; ion source temperature = 230°C; quadrupole temperature = 150°C; oven initial temperature = 50°C (for 3 min), and then increased to 250°C at steps of 20°C/min, and held at this temperature for 7.0 min.	7.75 3.38 3.36 4.77 3.38 5.07 5.47	14.80 6.52 6.50 9.21 6.54 8.47 10.51	1.3-3-1		[18]

**Lühendid eesti keeles:** NSAID – mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid; RSD – suhteline standardhälve, ACN - atsetonitril; SPME - tahke faasi mikroekstraktsioon; EtOH/Py/ECF – etanool/püridiin/etüülkloroformiaat; GC/MS - gaasikromatograafia-massispektromeetria

**Abbreviations in English:** NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drugs; RSD - Relative standard deviation, ACN - acetonitrile; SPME - Solid phase microextraction; EtOH/Py/ECF - ethanol/pyridine/ethyl chloroformate; GC/MS - gas chromatography-mass spectrometry

**Tabel 5. Kapillaarelektroforees**

NSAID	Piima proovide ettevalmistamine	Ekstraheerimine	Eraldamine	LDR, (µg/kg)	LOD, (µg/kg)	RSD, %	Saagis, %	Ref.
Etodolac; naproxen; ketoprofen; flurbiprofen; diclofenac	2 g (±0.01 g) of milk were transferred into 10 mL centrifuge tubes and NSAIDs. The samples were vortex-mixed for 1 min and allowed to rest for 10 min in a dark place. 100 µL concentrated phosphoric acid, 0.6 g sodium chloride and 4.0 mL ACN were added, respectively. The mixtures were centrifuged (5000 rpm, 10 min) and 3.5 mL upper phase were transferred into another test tube. 1 mL of n-hexane was used to defatten the extract. The n-hexane layer was discarded	Liquid-liquid microextraction:  2.0 mL of the ACN extract was transferring into a glass test tube and mixing it with 150 µL extraction solvent followed by rapid injection of this mixture into 8.0 mL of DI water in a glass tube. The mixture was vortex-mixed for 1 min. The sample was centrifugation (5000 rpm, 3 min) and quantitatively transferred into a 1.0-mL microtube	Capillary electrophoresis:  Capillaries were flushed with DI water (10 min), 1.0 M sodium hydroxide (20 min), DI water (10 min) and finally with the background electrolyte (BGE) for 20 min. At the end of each run, the capillary was flushed with DI water (1 min), 1.0 M sodium hydroxide (1 min), DI water (2 min) and the BGE (2 min).  The following separation occurred at 25 kV	43.7–5000 39.7–5000 41.3–5000 33.3–5000 16.0–5000	13.1 11.9 12.4 10.0 4.8	4,7-6,2 3,0-4,3 3,4-5,1 2,9-3,5 1,1-1,6	86-102 87-106 91-104 95-109 92-104	[11]

**Lühendid eesti keeles:** NSAID – mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid; LDR – lineaarne mõõteala; LOD - määramispiir; RSD – suhteline standarhälve, ACN - atsetonitril; DI- deioniseeritud vesi; BGE – tasutsignaali elektrod

**Abbreviations in English:** NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drugs; LDR - linear dynamic range; LOD - limit of detection; RSD - Relative standard deviation, ACN - acetonitrile; DI- deionised water; BGE - background electrolyte

**Tabel 6.** Ensüümiga seotud immunosorbentanalüüsi (ELISA) meetodid

NSAID	Konjugeerimine	Piimaproovi ettevalmistamine	ELISA	LDR, (µg/kg)	LOD, (µg/L)	RSD, %	Saagis, %	Ref.
5-hydroxyflunixin	<p>Conjugating 5-hydroxyflunixin with BSA through the carbodiimide: 5-hydroxyflunixin (11 mg) was dissolved in 800 µL of N,N-dimethylformamide, and then NHS (8 mg) and EDC (13 mg) were added to the mixture. Afterwards, the reaction mixture was added to a BSA solution (10 mg dissolved in 4 mL of borate buffer) and reacted at room temperature for another 12 h. The hapten-protein conjugates were then dialysed against 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) for 3 days at 4°C.</p> <p>The coating antigen: prepared using the same method, only difference is that the coating antigen was conjugated with OVA</p>	<p>1.0 ± 0.01 mL of milk was combined with 4.0 mL of 0.5% HCl/ACN. Samples were sonicated for 5 min and then centrifuged for 10 min at 5000 g. Then, 2 mL of the supernatant was collected and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 55°C. After reconstitution in 500 µL of assay buffer, the mixture was tested by the established icELISA</p>	<p>96-well microtiter plates were coated with the coating antigen (100 µL per well) at a dilution of 1:2000 in PBS, and then the plates were incubated at 4°C overnight. Then, the plates were coated with 3% skim milk for 1 h at 25°C. After blocking, 50 µL of standard solutions and 50 µL of diluted polyclonal antibody solutions were added to each well, and the plates were incubated for 30 min. Then, diluted horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-rabbit IgG was added to each well, and the plates were incubated for 30 min at 25°C. After another three washes, 100 µL of TMB substrate was pipetted, and the absorbance was measured after 50 µL of 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to stop the enzyme reaction.</p>	0.076-16.3	0.78	6.8-11.3	81-105	[22]

**Lühendid eesti keeles:** NSAID – mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid; LDR – lineaarne mõõteala; LOD - määramispiir; RSD – suhteline standarhälve, ACN - atsetonitriil; BSA – veise seerum albumiin; NHS - N-hüdrosüsuksinimiid; EDC - 1-ettüül-3-(3-dimetüülaminopropüül) karbodimiid; OVA – ovalbumiin; PBS - fosfaatpuhverdatud soolalahus; icELISA - ensüümiga seotud kaudne konkureeriv immunosorbentanalüüs; TMB - 3,3', 5,5'-tetrametüülbensidiin

**Abbreviations in English:** NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drugs; LDR - linear dynamic range; LOD - limit of detection; RSD - Relative standard deviation, BSA – bovine serum albumin; NHS - N-hydroxysuccinimide; EDC - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; OVA – ovalbumine; PBS – phosphate-buffered saline; icELISA - Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay; TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

**Tabel 7. Biosensorid**

NSAID	Biosensor süsteem	Mõõtemetoodika	Piimaproovi ettevalmistamine	LOD, (mol/L)	RSD, %	Saagis, %	Ref.
Naproxen; diclofenac; ibuprofen; tolmetin	<p>An amperometric electrode: 25 mL of COX (COX-1 or COX-2) enzyme (1000 U) immobilised in a gel-like k-carrageenan membrane. The gel containing the enzyme was in contact with the gas permeable membrane of the PTFE cap of electrode transducer. Nylon net and a PTFE O-ring were used to fix the gel-like enzymatic membrane to the cap itself, which was closed at one end by a PTFE gas permeable membrane. The prostaglandins are produced from the oxidation of arachidonic acid catalysed by COX.</p> <p>k-carrageenan membrane: 5 ml of the homogeneous solution ( 2% w/w) were poured into a 5 cm diameter glass vial and allowed to gel at 5°C overnight. 5 mm diameter diskettes were then cut from the gel, and immersed under gentle stirring in MilliQ water containing the small amount of NaN<sub>3</sub> that would fit on a spatula tip as anti-bacterial agent. After 2 h stirring the membranes were removed and allowed to dry at a temperature of 5°C for 48h.</p>	<p>The electrode was placed in a glass cell thermostated at 25°C containing 10.0 mL of Tris-HCl buffer (0.1 mol/L at pH=8.0) and allowed to stabilise under constant magnetic stirring. Once the signal has become constant, 1.0 mL of arachidonic acid aqueous solution of 7.5x10<sup>-4</sup> mol/L was added and the current was measured. The measuring cell was rinsed and dried and a new measurement was performed by dipping the biosensor in 10.0 mL of one of the various aqueous solutions containing different concentrations of the four considered NSAIDs.</p>	<p>1.0 mL of milk was added to 9.0 mL of Tris-HCl buffer.</p>	<p>5.0x10<sup>-8</sup> 5.0 x10<sup>-8</sup> 0.5 x10<sup>-8</sup> 0.5 x10<sup>-8</sup></p>	6	90-93	[23]

Diclofenac	<p>Antibody purification was performed by utilising an IgG spin purification kit.</p> <p>Biosensor setup: white light from a halogen light source is guided via a Y-optical fiber to the backside of the transducer, where it is partially reflected at each interface of the transducer and the sensitive layer. The reflected beams superimpose and are guided via the same optical Y-fiber to a diode array spectrometer. If the optical thickness of the sensitive layer changes, the interference pattern shifts in the wavelength domain.</p> <p>Sensitive layer: The transducers were cleaned in 6 M NaOH for 1 min, rinsed with ultrapure water and then activated by ultrasonication in a freshly prepared piranha solution (60 vol.% concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 40vol.% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 15 min. Afterwards, the transducers were rinsed with ultrapure water and dried in a nitrogen stream. For silanisation of the sensor surface, 12 µL of GOPTS was pipetted onto it and covered with another freshly activated transducer. After a reaction time of 60 min, the slides were rinsed with dry acetone and dried in a nitrogen stream. After silanisation, 30 µL of a 4g/L DAPEG-methylene chloride</p>	<p>As assay format: aceclofenac was immobilised onto the sensor surface. Samples containing defined concentrations of diclofenac are incubated with anti-diclofenac for 25 min. The antibody binds the analyte during the incubation step until the equilibrium of the reaction is reached. This mixture is pumped over the sensor surface. Only anti-diclofenac molecules with free-binding sites can bind to the immobilised aceclofenac on the surface. Thus, resulting measurement signals are inversely proportional to the diclofenac concentration in the sample.</p>	<p>For measurements in the complex matrix milk, no sample pre-treatment was done.</p>	112.7 (µg/L)	2.5	105-120	[24]
------------	---	--	---	--------------	-----	---------	------

solution were pipetted onto the surfaces. They were transferred into an oven and left there overnight at 75 °C. Afterwards, they were rinsed with ultrapure water and dried in a nitrogen stream. Then aceclofenac (1 mg, 2.8 mmol) and N,N'-diisopropylcarbodiimide (1.5 µL, approx. 10 µmol) were mixed with 10 µl of dry dimethylformamide, followed by pipetting 12 µL on the mixture onto a slide. After sandwiching two slides, they were left to react overnight in a saturated DMF atmosphere, rinsed with DMF and ultrapure water and then dried in a nitrogen stream. The transducers were stored at 4 °C in the dark.

Flunixin meglumine	<p>FM was conjugated to BSA: FM hapten (2.2 mg) was dissolved in 400 µL of DMF, and 1.6 mg of NHS and 2.6 mg of EDC were successively added to the mixture. The mixture was stirred at room temperature for 8 h and added to 10 mg of BSA in 4 mL of BB. The mixture was stirred at RT for 18 h, dialyzed against 0.01 M PBS for 3 d with six changes of dialysate, and stored at -20°C.</p> <p>Colloidal gold-labeled FM mAb: the pH of colloidal gold solution was adjusted to ~8.8 with 0.1 M</p>	The samples were spiked with FM and measured	<p>Immunochromatographic strip: polyvinyl chloride backing card, sample pad, absorption pad, and nitrocellulose membrane were assembled in layers. The NC membrane contained the control line and test line. Using a membrane dispenser, coating antigen (FM-EDC-BSA) was applied to form the test line and goat anti-mouse antibody was applied to form the control line (1 µL/cm). The strip was dried at 37°C and stored in a desiccator.</p>	0.087– 0.97 (µg/L)	0.1	[25]
--------------------	--	--	--	--------------------	-----	------



---

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Then, 1 mL of gold nanoparticle and 4 µL purified FM mAb 2H4 were continuously stirred at RT for 50 min. BSA (10% w/v, 40 µL) was added, and the mixture was incubated at RT for 2 h. Following centrifugation at 8000 rpm for 20 min for three times, the resulting pellet was washed with gold-labeled resuspension (20 mmol tris containing 0.1% polyethylene glycol, 0.1% tween, 5% sucrose, 5% trehalose, 0.2% BSA, and 5% PVP, pH 8.2). Colloidal gold-labeled FM mAb was re-suspended in PVP and stored at 4°C.

Standard FM (150 µL) was mixed with 50 µL colloidal gold-labeled FM mAb in a microtiter well. Following incubation at RT for 5 min, the mixture was added onto the sample pad, where it migrated to the absorption pad by capillary action. The results were visualized by the naked eye within 5 min.

---

**Lühendid eesti keeles:** NSAID – *mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid*; LOD - määramispiir; RSD – suhteline standarhälve; COX - tsüklooksügenaasi ensüüm; PTFE - polütetrafluoroetüleen; GOPTS - 3-glütsioksüpropüültrimetoksüsilaan; DAPEG - di-amino-polü(etüleenglükool); BSA - veise seerumi albumiin; NHS - N-hüdroksüsuksüinimiid; EDC - 1-etiül-3-(3-dimetüülaminopropüül) karbodiimiid; FM - fluniksiini meglumiin; RT - toatemperatuur; DMF - N, N-dimetüülformamiid, BB - boorhappe puhver; PVP - polüvinüülpürrolidoon

**Abbreviations in English:** NSAID - *non-steroidal anti-inflammatory drugs*; LOD - limit of detection; RSD - Relative standard deviation; COX - cyclooxygenase enzyme; PTFE – polytetrafluoroethylene; GOPTS - 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilane; DAPEG - di-amino-poly(ethylene glycol); BSA – bovine serum albumin; NHS - N-hydroxysuccinimide; EDC - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; FM – Flunixin meglumine; RT – room temperature; DMF – N,N-Dimethylformamide, BB - boracic acid buffer; PVP - polyvinyl pyrrolidone

## Kirjanduse loetelu

- [1] Breen J. The importance of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in mastitis therapeutics. *Livestock* 2017;22. doi:10.12968/live.2017.22.4.182.
- [2] Wyatt JE, Pettit WL, Harirforoosh S. Pharmacogenetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacogenomics J* 2012;12. doi:10.1038/tpj.2012.40.
- [3] Lipscomb J, Wong M, Birkel M. Management of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hypersensitivity reactions. *US Pharm* 2019;44.
- [4] Asirvatham S, Dhokchawle B V., Tauro SJ. Quantitative structure activity relationships studies of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. *Arab J Chem* 2019;12. doi:10.1016/j.arabjc.2016.03.002.
- [5] Irs A, Salupera R, Sinisalu V. Mittesteroidsete põletikuvastaste ravimite ohutu kasutamine. *Eesti Arst* 2010;89:417–22.
- [6] Bilandžić N, Varenina I, Kolanović BS, Luburić DB. Monitoring of pharmacologically active substances in milk in the European Union. *Vet Stanica* 2020;51. doi:10.46419/vs.51.1.3.
- [7] The European Commission. Commission Regulation (EU) N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union* 2010;L15.
- [8] Malka B, Frieda S. Development and Validation of a High-Throughput Method for the Determination of Eight Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Chloramphenicol in Milk, using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy. *Int J Anal Bioanal Methods* 2019;1. doi:10.35840/ijabm/2405.
- [9] Hu T, Peng T, Li XJ, Chen DD, Dai HH, Deng XJ, et al. Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1219. doi:10.1016/j.chroma.2011.11.009.
- [10] van Pamel E, Daeseleire E. A multiresidue liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the detection and quantitation of 15 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk. *Anal Bioanal Chem* 2015;407. doi:10.1007/s00216-015-8634-1.
- [11] Alshana U, Göğür NG, Ertuş N. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products. *Food Chem* 2013;138. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.121.
- [12] Shishov A, Nechaeva D, Bulatov A. HPLC-MS/MS determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk based on simultaneous deep eutectic solvents formation and its solidification. *Microchem J* 2019;150. doi:10.1016/j.microc.2019.104080.
- [13] Gentili A, Caretti F, Bellante S, Mainero Rocca L, Curini R, Venditti A. Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. *Anal Bioanal Chem* 2012;404. doi:10.1007/s00216-012-6231-0.
- [14] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M. Determination of corticosteroids, anabolic steroids, and basic nonsteroidal anti-inflammatory drugs in milk and animal tissues. *J AOAC Int* 2014;97. doi:10.5740/jaoacint.13-067.
- [15] Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Pietruk K, Ledziska E, Żmudzki J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2012;403.

- doi:10.1007/s00216-012-5860-7.
- [16] Ghorbani M, Aghamohammadhasan M, Shams A, Tajfirooz F, Pourhassan R, Bana Khosravi SR, et al. Ultrasonic assisted magnetic dispersive solid phase microextraction for preconcentration of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs in real water, biological and milk samples employing an experimental design. *Microchem J* 2019;145. doi:10.1016/j.microc.2018.12.019.
- [17] Xue SW, Li J, Xu L. Preparation of magnetic melamine-formaldehyde resin and its application to extract nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Anal Bioanal Chem* 2017;409. doi:10.1007/s00216-017-0251-8.
- [18] Arroyo D, Ortiz MC, Sarabia LA. Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2011;1218. doi:10.1016/j.chroma.2011.05.010.
- [19] Rúbies A, Guo L, Centrich F, Granados M. Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry: triple quadrupole versus Q-Orbitrap mass analyzers. *Anal Bioanal Chem* 2016;408. doi:10.1007/s00216-016-9679-5.
- [20] Gallo P, Fabbrocino S, Vinci F, Fiori M, Danese V, Serpe L. Confirmatory identification of sixteen non-steroidal anti-inflammatory drug residues in raw milk by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22. doi:10.1002/rcm.3430.
- [21] Gallo P, Fabbrocino S, Dowling G, Salini M, Fiori M, Perretta G, et al. Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 2010;1217. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.047.
- [22] Chen X, Peng S, Liu C, Zou X, Ke Y, Jiang W. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting flunixin and 5-hydroxyflunixin residues in bovine muscle and milk. *Food Agric Immunol* 2019;30. doi:10.1080/09540105.2019.1577365.
- [23] Campanella L, Di Persio G, Pintore M, Tonnina D, Caretto N, Martini E, et al. Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in milk and fresh cheese based on the inhibition of cyclooxygenase. *Food Technol Biotechnol* 2009;47.
- [24] Rau S, Hilbig U, Gauglitz G. Label-free optical biosensor for detection and quantification of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in milk without any sample pretreatment. *Anal Bioanal Chem* 2014;406. doi:10.1007/s00216-014-7755-2.
- [25] Lin L, Jiang W, Xu L, Liu L, Song S, Kuang H. Development of IC-ELISA and immunochromatographic strip assay for the detection of flunixin meglumine in milk. *Food Agric Immunol* 2018;29. doi:10.1080/09540105.2017.1364710.
- [26] Douglas D, Banaszewski K, Juskelis R, Al-Taher F, Chen Y, Cappozzo J, et al. Validation of a rapid lateral flow test for the simultaneous determination of  $\beta$ -lactam drugs and flunixin in raw milk. *J Food Prot* 2012;75. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-570.
- [27] Gaudin V, Hedou C, Soumet C, Verdon E. Multiplex immunoassay based on biochip technology for the screening of antibiotic residues in milk: validation according to the European guideline. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2018;35. doi:10.1080/19440049.2018.1538572.