

Praćenje farmakološki aktivnih tvari u mlijeku u Europskoj uniji



N. Bilandžić*, I. Varenina, B. Solomun Kolanović, Đ. Božić Luburić i I. Varga

Sažetak

Proizvodnja sigurnog i kvalitetnog mlijeka ključni je aspekt pravilnog javnog zdravlja u Europskoj uniji (EU). Česta uporaba farmakološki aktivnih tvari u kliničkoj praksi na govedarskom farmama uzrokuje pojavu njihovih ostataka u različitim prehrambenim proizvodima uključujući mlijeko. Najčešće korišteni lijekovi u mliječnoj industriji su antibiotici tetraciklini i beta-laktami protiv patogenih uzročnika mastitisa. Primjena veterinarskih lijekova mora biti pažljivo optimizirana kako bi se zaštitilo zdravlje potrošača od mogućih štetnih toksičnih učinaka. Također, veliki problem je i razvoj rezistencije u potrošača koji uzrokuje neuspjeh antibiotskih terapija, posebice protiv opasnih patogenih sojeva mikroorganizama. Danas većina članica EU pokazuje tendenciju povećanja proizvodnje mlijeka. Najveći proizvođači mlijeka u EU su Njemačka, Francuska i Ujedinjeno Kraljevstvo. U Hrvatskoj je u zadnje 3 godine vidljiva tendencija pada proizvodnje mlijeka. Članice EU teže kontroli ostataka farmakološki aktivnih tvari u mlijeku primjenom selektivnih, osjetljivih i preciznih analitičkih metoda. Tekućinska kromatografija povezana s tandemskom kromatografijom spektrometrijom (LC-MS/MS) je najčešće korištena instrumentalna analitička tehnika za

određivanje ostataka tih tvari u mlijeku. Danas su razvijene multimetode primijenom LC-MS/MS koje omogućuju identifikaciju 160 i više spojeva. U svrhu zaštite zdravlja potrošača članice EU provode kontrolu farmakološki aktivnih tvari u mlijeku u okviru nacionalnih planova praćenja njihovih ostataka (NPPR). Kontrola farmakološki aktivnih tvari temelji se na definiranim najvećim dopuštenim količinama ostataka tih tvari (NDK). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) prikuplja podatke kontrole svih članica EU analiziranih u okviru NPPR te svake godine prilaže zajedničko izvješće. U okviru planova NPPR država članica EU tijekom 2015., 2016. i 2017. ustvrđeno je 0,115 %, 0,128 % i 0,304 % nesukladnih rezultata za farmakološki aktivne tvari. Najveći broj nesukladnih rezultata odnosio se na skupinu antibakterijskih tvari (B1) i nesteroidnih protuupalnih lijekova (B2e). U skupini antibakterijskih tvari ustvrđeno je ukupno 48,2 % nesukladnih tvari beta-laktama u sve tri godine ukupno. U 2017. godini najveći broj nesukladnih rezultata se odnosio na nesteroidne protuupalne lijekove (54,5 %), odnosno u toj skupini lijekova 90,5 % nesukladnih je ustvrđeno za salicilnu kiselinu.

Ključne riječi: farmakološki aktivne tvari, veterinarski lijekovi, mlijeko, kontrola mlijeka, Europska unija

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ*, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, dr. sc. Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., dr. sc. Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., Đurđica BOŽIĆ LUBURIĆ, dipl. ing. biotehnol., Ines VARGA, mag. prim. kem., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

Uvod

U suvremenoj veterinarskoj praksi, farmakološki aktivne tvari se primijenjuju u životinja koje proizvode hranu u svrhu liječenja bolesti, za spriječavanje mogućih bolesti odnosno preventivno ili u svrhu postizanja bržeg prirasta u svojstvu promotora rasta. Njihova primjena u uzgoju životinja i veterini rezultirala je zdravijim i produktivnijim domaćim životinjama te osigurala dobrobit i zdravlje životinja. Danas je više stotina različitih tvari u opticaju u veterinarskoj medicini te djeluju kao antibiotici, antiparazitici, kokcidistatici, fungicidi ili protuupalni lijekovi (Song i Guo, 2014., Bessaire i sur., 2018.).

Među veterinarskim lijekovima više od 70 % korištenih su antibiotici (Song i Guo 2014.). Njihova globalna potrošnja raste te se smatra da će sa 63 151 tona u 2010. godini porasti na 105 596 tona do 2030. (Van Boeckel i sur., 2015.). Najčešće primjenjivane skupine antibiotika u veterinarskoj medicini su beta-laktami, tetraciklini, sulfonamidi, fluorokinoloni, makrolidi, linkozamidi i aminoglikozidi (Jank i sur., 2017.).

U mliječnoj industriji najčešće korišteni antibiotici su antimikrobni lijekovi koji se koriste protiv patogenih uzročnika mastitisa (Fisher i sur., 2011.). Goveđi mastitis je endemska bolest te jedna je od najčešćih bolesti koja pogađa mliječno govedo i smanjuje kakvoću mlijeka (Leslie i Petersson-Wolfe, 2012.). Na farmama mliječnih goveda visoka učestalost kliničkog mastitisa te subkliničkog mastitisa predstavlja gospodarski i socijalni problem (Halasa i sur., 2007., Getaneh i sur., 2017.). Povezana je s djelovanjem raznih bakterija što rezultira upalom mliječnih žlijezda. Uporaba antimikrobnih lijekova tijekom razdoblja dojenja je česta pojava u mliječnom govedarstvu (Magon i sur., 2018.). U tu svrhu u proizvodnji mlijeka u svrhu spriječavanja i kontrole mastitisa koriste se tetraciklini te beta-laktamski antibiotici, odnosno penicilini i cefalos-

porini (Bourin i Clénet, 2014.). Najčešće se koriste tetraciklini zbog niskih troškova i širokog spektra djelovanja (Kuang i sur., 2009.).

Prisutnost ostataka antibiotika u mlijeku stvara poteškoće u proizvodnji te narušava kvalitetu proizvoda (Mishra i sur, 2011.). Ostatci antibiotika u hrani životinjskog podrijetla stvaraju potencijalnu prijetnju izravnom toksičnošću za ljude. Glavni javno zdravstveni rizici povezani s izlaganjem veterinarskim lijekovima su reakcije preosjetljivosti, karcinogenost, mutagenost, teratogenost i poremećaj normalne flore crijeva (Desmarchelier i sur., 2018.).

Prečesta niska razina izloženosti antibiotcima rezultira izmjenom mikroflore i mogućim razvojem rezistencije koji prouzroče neuspjeh antibiotske terapije u kliničkim situacijama (Mishra i sur, 2011., Hassan i sur., 2014.). Naime, danas su infekcije prouzročene bakterijama otpornim na antibiotike u porastu, a otpornost na antibiotike vjerojatno je glavni javno zdravstveni problem. Uporaba ili zlouporaba antibiotika u veterinarskoj medicini, ponajprije na velikim farmama dovela je do nastanka otpornih bakterija u životinjskom staništu. Taj se rezervoar otpornosti može izravno ili neizravno prenijeti na ljude putem konzumacije hrane i izravnim ili neizravnim kontaktom. Otporne bakterije mogu prouzročiti ozbiljne zdravstvene učinke izravno ili prenošenjem svojstava rezistentnosti na antibiotike na patogene, uzrokujući teško liječenje bolesti i zbog toga viši stupanj obolijevanja i smrtnosti (Economou i Gousia, 2015.). Projekcija smrtnih slučajeva koji su posljedica antimikrobne otpornosti mikroorganizama na razini EU spominje brojku od 25 000 svake godine (Desmarchelier i sur., 2018.).

Stoga je zaštita javnog zdravlja od mogućih štetnih učinaka ostataka veterinarskih lijekova od prioriteta za kontrolna tijela Europske unije (EU).

Neprestano se radi na poboljšanjima analitičkih kapaciteta članica EU potrebnih za praćenje ostataka lijekova od uzgajališta, odnosno od sirovine do gotovih proizvoda, odnosno stola u kućanstvima.

Proizvodnja mlijeka u Europskoj uniji

U različitim zemljama svijeta potrošnja mlijeka i mliječnih proizvoda

određena je zemljopisnim položajem i gastronomskim tradicijama kao i tržišnim i gospodarskim uvjetima (Fejzuli i sur., 2018.). Danas su najveći svjetski proizvođači mlijeka SAD-a koji je na prvom mjestu, a slijede ga Kina, Indija, Rusija, Brazil, Turska te zemlje EU (Magon i sur., 2018.). Od zemalja EU u 10 zemalja s najvećom proizvodnjom na svijetu ubrajaju se Njemačka, Francuska i Ujedinjeno Kraljevstvo. U Tabeli 1. prikazana je proizvodnja mlijeka u zemljama članicama EU u 2015., 2016. i

Tabela 1. Proizvodnja mlijeka (tone) u 2015., 2016. i 2017. u zemljama članicama EU (EFSA, 2017., 2018., 2019.).

Članica EU	2015.	2016.	2017.
Njemačka	30 380 817	31 457 454	31 565 955
Francuska	24 425 788	np	24 566 911
Ujedinjeno Kraljevstvo	14 611 308	14 850 189	15 270 310
Nizozemska	12 716 300	13 467 400	14 616 286
Poljska	12 607 301	12 859 447	12 867 163
Italija	11 071 383	11 037 367	11 159 207
Španjolska	6 927 836	6 574 721	6 794 063
Irska	5 900 705	6 361 528	955 974
Danska	4 500 000	4 613 123	3 591 207
Belgija	3 299 539	3 464 609	3 563 796
Švedska	2 932 000	2 921 000	2 921 000
Češka	2 856 000	2 973 000	2 990 000
Finska	2 288 500	2 364 900	2 359 000
Rumunjska	1 900 107	964 612	915 338
Grčka	1 892 333	1 915 170	1 897 642
Portugal	1 847 975	2 000 286	1 935 177
Litva	1 392 429	1 483 490	1 409 456
Slovačka	1 262 123	1 263 676	1 252 218
Letonija	915 000	972 000	978 000
Mađarska	872 541	687 687	945 230
Estonija	771 632	805 165	783 172
Hrvatska	738 917	720 440	674 200
Bugarska	531 304	569 839	447 680
Slovenija	505 536	530 985	499 965
Luksemburg	287 000	287 000	350 000
Cipar	164 000	163 000	200 00
Austrija	150 915	150 915	146 928
Malta	45 142	44 274	45 910

np – nisu prikazani

2017. godini (EFSA, 2017., 2018., 2019.). Njemačka ima najveću proizvodnju mlijeka od 31,56 milijuna tona u 2017. godini, a slijede je Francuska s 24,56 milijuna tona te Ujedinjeno Kraljevstvo s 15,27 milijuna tona mlijeka. Te zemlje imaju stalnu tendenciju porasta proizvodnje mlijeka. Porast proizvodnje mlijeka vidljiv je i u Nizozemskoj, Poljskoj, Italiji, Španjolskoj, Danskoj, Belgiji i Mađarskoj. S druge strane pad proizvodnje zabilježen je za zemlje: Danska, Švedska, Bugarska, Rumunjska, Austrija, Slovenija i Hrvatska.

U Hrvatskoj se bilježi trend pada proizvodnje mlijeka sa 738,9 tisuća tona u 2015. godini na 674,2 tisuće tona u 2017. (EFSA, 2017., 2018., 2019.). Državni zavod za statistiku RH objavio je da je u 2018. godini u RH prikupljena količina kravljeg mlijeka smanjena za 4,9 %, količina ovčjega mlijeka za 3,1 % u odnosu na 2017. (DZS, 2019.). Jedino je za kozje mlijeko utvrđen porast proizvodnje, odnosno količine prikupljenog mlijeka za 0,9 %. Ovi podatci o godišnjoj proizvodnji mlijeka i mliječnih proizvoda preuzeti su od Hrvatske poljoprivredne agencije odnosno od Središnjeg laboratorija za kontrolu mlijeka (SLKM) koji analizira otkupljeno mlijeko od četrdesetak mljekara (industrijske i registrirane male mljekare) od kojih ujedno prikuplja podatke o proizvodnji.

Suvremene metode u analizama veterinarskih lijekova u mlijeku

Po svojem sastavu mlijeko je složena namirnica koja sadrži masnoće i bjelančevine, što predstavlja problem u postupcima pripreme uzoraka jer mogu izazvati interakcije u analitičkim postupcima. Različita fizikalno-kemijska svojstva različitih veterinarskih lijekova otežavaju razvoj učinkovitog postupka ekstrakcije i pročišćavanja u postizanju

zadovoljavajućih rezultata iskorištenja pojedinačnih analita u složenim vrstama uzoraka (Bogialli i Di Corcia, 2009.). Postupci pripreme uzoraka namijenjenih analizi jedne porodice antibiotika sastojala se od primjene uobičajene ekstrakcije (Robert i sur., 2013., Chen i sur., 2016.). Jedan od najprihvaćenijih pristupa je razrjeđivanje uzorka mlijeka s otapalom poput acetonitrila, a zatim se centrifugira i upari dobiveni organski supernatant ekstrakt (Turnipseed i sur., 2011., Zhan i sur., 2012.). Razvoj metoda za analizu više porodica lijekova najčešće objedinjuje korake taloženja proteina i zatim centrifugiranje te primjenu ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE, engl. *solid phase extraction*) (Stolker i sur., 2008., Gaugain-Juhel i sur., 2009., Han i sur., 2015.). Do sada je SPE korišten kao najčešći i najsvestraniji način ekstrakcije u analizama velikog broja molekula u tkivima i mlijeku. U usporedbi s drugim metodama pripreme uzoraka SPE se još uvijek najviše koristi zbog značajki kao što su lako rukovanje, niski troškovi, mogućnost automatizacije i korištenje malih količina otapala. Može se smatrati višenamjenskom tehnikom, budući da se pročišćavanje i koncentracija događaju u istom koraku (Rocca i sur., 2017.).

Većina metoda koja se danas primjenjuju u pripremanju uzoraka za analizu ostataka lijekova koristi velike količine otapala (ekstrakcija tekuće/tekuće) te imaju višestruke korake pročišćavanja uzoraka (SPE) za koje je potrebno duže vrijeme analize, što u konačnici daje visoke troškove. Stoga se nastoje razviti metode pripreme uzoraka koje su jednostavne, jeftine i vremenski manje traju, a istovremeno omogućuju analizu različitih porodica lijekova kao i ostalih tvari, kao što su na primjer zabranjene tvari, beta-agonisti i nitroimidazoli (Robert i sur., 2013.) ili pesticidi (Imamoglu i Olgun, 2016.). Danas se sve češće primjenjuje nova metoda pripreme QuEChERS (engl.

Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) koja se bazira na primjeni kombinacija različitih soli. Njezina izvorna primjena je bila namijenjena pripremi uzoraka za analizu pesticida (Anastassiades i sur., 2003.), zatim započinje i njena

primjena u pripremi uzoraka za analizu veterinarskih lijekova u različitim vrstama uzoraka (Stubbings i Bigwood, 2009., Kaufmann i sur., 2014.). Nedostatak ovog postupka je nemogućnost postizanja zadovoljavajućih iskorištenja za polarne

Tabela 2. Suvremene analitičke metode koje omogućuju analizu ostataka različitih porodica antibiotika i drugih veterinarskih lijekova u mlijeku.

Skupina farmakološki aktivnih tvari	Postupak pripreme	Instrument	Referenca
amfenikoli, antihelmintici, linkozamidi, makrolidi, kinoloni, sulfonamidi, kokcidostatici, nesteroidni protuupalni lijekovi, nitrofurani, nitroimidazoli, sedativi, peptidni lijekovi	ekstrakcija tekuće/tekuće	UPLC-Q-ToF-MS	Amelin i sur., 2018.
beta laktami: penicilini i cefalosporini	QuEChERS	LC-MS/MS	Bessaire i sur., 2018.
amfenikoli, avermektini, benzimidazoli, linkozamidi, makrolidi, kinoloni, sulfonamidi, kokcidostatici, nesteroidni protuupalni lijekovi, salicitanilidi, sedativi	QuEChERS	LC-MS/MS	Desmarchelier i sur., 2018.
fluorokinoloni, ionofori, makrolidi, nitroimidazol, nesteroidni protuupalni lijekovi, β -laktami, penicilini, fenikoli, sulfonamidi, tetraciklini	ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	UHPLC/ESI Q-Orbitrap	Wang i sur., 2018.
cefalosporini, penicilini kinoloni, tetraciklini, makrolidi, sulfonamidi, i dr.	ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	UPLC-Q-ToF-MS	Jank i sur., 2017.
kinoloni, makrolidi, beta laktami, nitroimidazoli, sulfonamidi, linkomicini, kloramfenikoli, kinoksalini, tetraciklini, polipeptidi	ekstrakcija tekuće/tekuće potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	LC-MS/MS	Chen i sur., 2016.
kinoloni, tetraciklini, makrolidi, sulfonamidi	ekstrakcija tekuće/tekuće	LC-MS/MS	Imamoglu i Olgun, 2016.
kinoloni, tetraciklini, makrolidi, sulfonamidi, penicilini	ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	LC-MS/MS	Zhu i sur., 2016.
amfenikoli, cefalosporini, penicilini kinoloni, tetraciklini, makrolidi, sulfonamidi, linkozamini, i dr.	ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	UPLC-Q-ToF-MS	Daseneki i sur., 2015.
beta laktami, kinoloni, tetraciklini, makrolidi, sulfonamidi, linkozamini	ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	UPLC-MS/MS	Han i sur., 2015.
amfenikoli, beta-laktami, makrolidi, pirimidini, kinoloni, sulfonamidi, tetraciklini, beta-agonisti, kortikosteroidi, kokcidostatici, nitroimidazoli, nesteroidni protuupalni lijekovi, sedativi	ekstrakcija tekuće/tekuće	LC-MS/MS	Robert i sur., 2013.

lijekove kao što su tetraciklini, kinoloni i penicilini (Kaufmann i sur., 2014.). Danas se radi na optimizaciji ovog postupka u svrhu postizanja analize što većeg broja analita s prihvatljivim iskorištenjima (Desmarchelier i sur., 2018.).

Tehnologija koja se danas smatra zlatnim standardom u razvoju tzv. multimetoda (Tabela 2) koje omogućuju kvantifikaciju stotine aktivnih tvari je masena spektrometrija. Pri tome je tekućinska kromatografija povezana s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS) najprimjenjivanija tehnika (Desmarchelier i sur., 2018.). Najprimjenjiviji spektrometar masa je trostruki kvadrupol (QqQ) kojeg karakterizira mogućnost postizanja dobrih rezultata kvantifikacije analita te identificiranje ciljanih spojeva uz visoku selektivnost i specifičnost (Kaufmann i sur., 2011.), a koristi se i tekućinska kromatografija povezana s masenom spektrometrijom visoke razlučivosti (LC-HRMS) primjenom spektrometara kao što su: spektrometar vremena leta TOF (engl. *time-of-flight*) (Wang i Leung, 2012., Staub Spörri i sur., 2014., Daseneki i sur., 2015.) ili Orbitrap (Gómez-Pérez i sur., 2012., Wang i sur., 2018.).

Metode koje primjenjuju LC-MS/MS tehnologiju danas u uzorcima mlijeka omogućuju identifikaciju 88 (Zhu i sur., 2016.), 105 (Desmarchelier i sur., 2018.), 115 (Daseneki i Thomaidis, 2015.), 120 (Chen i sur., 2016.), 143 (Daseneki i sur., 2015.), 150 (Amelin i sur., 2018.) ili čak 160 farmakološki aktivnih tvari (Robert i sur., 2013.).

Kontrola ostatka farmakološki aktivnih tvari u mlijeku u EU

U kontroli ostataka veterinarskih lijekova izazov za kontrolna tijela EU te prehrambenu industriju je upravljanje s tri čimbenika, odnosno analiza velikog broja kemijskih spojeva (više stotina), raspon vrsta hrane koju treba nadgledati

(meso, mast, mlijeko, jaja, riba, plodovi mora, med) te legislativa koja definira zakonske okvire njihove zdravstvene ispravnosti (Bessaire i sur., 2018.).

U svrhu osiguranja sigurnosti potrošača, a na temelju studija procjena rizika EU je definirala najveće dopuštene količine ostataka (NDK) farmakološki aktivnih tvari u hrani životinjskog podrijetla uredbom Komisije (EZ) br. 37/2010 (EC, 2010.). Ovisno o vrsti veterinarskih lijekova koji su dopušteni za primjenu u mliječnim goveda NDK vrijednosti u mlijeku kreću se od na primjer 0,1 µg/kg za diklofenak, 4 µg/kg za ampicilin do na primjer 100 µg/kg za tetraciklin ili 200 µg/kg za spiramicin. Kada lijek nije dopušten za primjenu u govedima, odnosno ostalim preživačima koji proizvode mlijeko, vrijednosti ustvrđene tvari u mlijeku ne smiju biti iznad graničnih koncentracija analita koju neka metoda može postići. Ovi parametri određuju se validacijskim postupcima definiranih Odlukom Komisije 2002/657/EZ (EC, 2002.a).

Direktiva Vijeća 96/23/EZ definira kontrolu farmakološki aktivnih tvari članicama EU koje su obvezne provoditi njihovu kontrolu provođenjem nacionalnih planova praćenja ostataka lijekova (NPPR) u životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane odnosno mlijeku (EC, 1996.). Broj analiza na razini države određuje se prema proizvodnji mlijeka. Prema Direktivi, skupinu B, koja objedinjuje veterinarske lijekove, čine podskupine B1 antibakterijske tvari, uključujući sulfonamide i kinolone i B2 ostali veterinarski lijekovi koja je podijeljena na: B2a anthelmintici, B2b kokcidostatici, B2c karbamati i piretroidi, B2d sedativi, B2e nesteroidni protuupalni lijekovi, B2f ostale farmakološki aktivne tvari. Ova Direktiva je zamijenjena Uredbom 2017/625 o službenim kontrolama i drugim službenim aktivnostima kojima se osigurava primjena propisa o hrani i hrani za

životinje, pravila o zdravlju i dobrobiti životinja, zdravlju bilja i sredstvima za zaštitu bilja (EC, 2017.). Njena primjena započinje u prosincu 2019., no još do prosinca 2022. ostaju na snazi odredbe Direktive 96/23/EZ.

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) obvezna je prikupiti podatke kontrole farmakološki aktivnih tvari u mlijeku svih članica EU analiziranih u okviru NPPR prema Direktivi Vijeća 96/23/EZ te svake godine prilaže zajedničko izvješće. Izvještaj obuhvaća ukupnu proizvodnju mlijeka, broj analiziranih uzoraka te broj nesukladnih rezultata po pojedinoj analiziranoj tvari te ukupni broj nesukladnih rezultata pronađenih u mlijeku svih članica EU.

U Tabeli 3 prikazani su nesukladni rezultati kontrole farmakološki aktivnih

tvari u mlijeku ustvrđenih u NPPR člani- ca EU u 2015., 2016. i 2017. godini (EFSA, 2017., 2018., 2019.). U okviru planova dr- žava članica EU u te tri godine broj anali- ziranih uzoraka mlijeka kretao se između 22 667 i 25 364 uzoraka. Ukupan postotak nesukladnih rezultata za farmakološki aktivne tvari u mlijeku za te tri godi- ne iznosio je 0,115 %, 0,128 % i 0,304 %. U 2017. godini ustvrđen je najveći broj nesukladnih rezultata za skupinu anti- bakterijskih tvari (B1) i nesteroidne pro- tuupalne lijekove (B2e). Ustvrđeni su i nesukladni rezultati i za skupinu antihel- mintika koji su na ukupni broj nesuklad- nih iznosili u te tri godine 25 %, 14,3 % i 15,1 %. Nisu ustvrđeni nesukladni re- zultati u skupinama kokcidiostatika, karbamata i piretroida, sedativa i ostalih farmakološki aktivnih tvari.

Tabela 3. Broj nesukladnih uzoraka ustvrđenih u mlijeku za farmakološki aktivnih tvari članica EU u okviru nacionalnih planova praćenja rezidua u 2015., 2016. i 2017. godini (EFSA, 2017., 2018., 2019.).

Oznaka skupine	Farmakološki aktivne tvari	2015.		2016.		2017.	
		Broj analiziranih uzoraka	Broj nesukladnih uzoraka	Broj analiziranih uzoraka	Broj nesukladnih uzoraka	Broj analiziranih uzoraka	Broj nesukladnih uzoraka
B1	Antibakterijske tvari, uključujući sulfonamide, kinolone	13 168	17	11 929	15	10 634	24
B2a	Anthelmintici	5 458	5	5 227	3	6 635	11
B2b	Kokcidiostatici	102	0	494	0	1 272	0
B2c	Karbamati i piretroidi	352	0	275	0	1 778	0
B2d	Sedativi	55	0	56	0	82	0
B2e	Nesteroidni protuupalni lijekovi	3 545	5	3 810	11	4 474	42
B2f	Ostale farmakološki aktivne tvari	838	0	876	0	489	0
	UKUPNO	23 518	27	22 667	29	25 364	77

Tabela 4. Nesukladeni rezultati farmakološki aktivnih tvari članica EU u mlijeku u okviru nacionalnih planova praćenja rezidua u 2015., 2016. i 2017. godini (EFSA, 2017., 2018., 2019.).

Skupina farmakološki aktivnih tvari	Aktivna tvar	NDK (µg/kg)	Broj nesukladnih rezultata		
			2015.	2016.	2017.
Antibakterijske tvari, uključujući sulfonamide, kinolone	Amoksicilin	4	2	1	2
	Ampicilin	4	2	1	
	Benzilpenicilin	4	2	2	3
	Cefaleksin	100	1		
	Cefkvinom	20	1		
	Cefalonij	20		1	1
	Cefazolin	50		1	
	Kloksacilin	30	3	1	3
	Danofloksacin	30		1	
	Ciprofloksacin	100			1
	Enrofloksacin	100	1		
	Gentamicin	100		2	
	Tilmikozin	50	2	2	1
	Linkomicin	150		1	
	Kanamycin	150	1		
	Spiramicin	200	1		
	Tetraciklin	100	1	2	1
	Doksiciklin	100			2
	Oksitetraciklin	100			1
	Trimetoprim	50			1
	Tulatromicin	nd			1
Florfenikol	nd			7	
Ukupno			17	15	24
Anthelmintici	Albendazol	100	1		
	Triklabendazol	10	1	1	
	Triklabendazol-sulfon	10			1
	Ketotriklabendazol	10			1
	Oksfendazolsulfon	10			1
	Klosantel	45	1		1
	Klorsulon	16			1
	Nitroksinil	20			1
	Ivermektin	nd	2	2	4
	Levamisol	nd			1
Ukupno			5	3	11
Nesteroidni protuupalni lijekovi	Diklofenak	0,1	5	10	4
	Salicilna kiselina	9		1	38
	Ukupno		5	11	42
UKUPNO			27	29	77

nd – nije dopušten

U Tabeli 4 prikazani su nesukladni rezultati pojedinih farmakološki aktivnih tvari utvrđenih u okviru NPPR članica EU (EFSA, 2017., 2018., 2019.). U skupini antibakterijskih tvari (B1) najveći broj nesukladnih tvari iznad NDK utvrđen je u 2017. U skupini antibakterijskih tvari utvrđeno je 27 nesukladnih rezultata beta-laktamskih antibiotika što čini ukupno 48,2 % nesukladnih tvari gledajući ukupno sve tri godine. U 2017. godini najveći broj nesukladnih se odnosi na skupinu nesteroidnih protuupalnih lijekova (54,5 %), odnosno u toj skupini lijekova 90,5 % nesuklađenih se odnosi na nesuklađene rezultate salicilne kiseline.

U okviru NPPR u Hrvatskoj su u 2017. godini utvrđeni nesukladni rezultati u po jednom mlijeku za amoksicilin, kloksacilin, levamizol i diklofenak te 35 nesukladnih rezultata za salicilnu kiselinu. Primjera radi za iste tvari u 2017. povišene vrijednosti utvrđene su za amoksicilin i kloksacilin u po jednom mlijeku iz Italije, te u po jednom mlijeku za diklofenak u Austriji, Estoniji i Njemačkoj. Povišene vrijednosti salicilne kiseline utvrđene su u jednom mlijeku iz Danske te u dva iz Nizozemske (EFSA, 2019.).

Članice EU također prijavljuju nesuklađene rezultate farmakološki aktivnih tvari u RASFF, centralni sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) (EC, 2002.b). U razdoblju od 2009. do 2019. godine prijavljen je mali broj nesukladnih uzoraka u mlijeku i mliječnim proizvodima. U 2009. godini u Italiji su utvrđene povišene vrijednosti penicilinskih antibiotika u mlijeku podrijetlom iz Austrije. U 2016. godini u Litvi utvrđene su koncentracije tetraciklina od 312 µg/kg u kravljem siru podrijetlom iz Rusije. U 2017. godini su u Italiji utvrđene povišene koncentracije kloksacilina (1685 µg/kg) u kozjem siru podrijetlom iz Italije. U kravljem siru podrijetlom iz Bosne i Hercegovine su iste

godine u Hrvatskoj utvrđene povišene vrijednosti salicilne kiseline (114,8 µg/kg) (RASFF, 2009. - 2019.).

Istraživanja u kojima su uzorci mlijeka analizirani na prisutnost farmakološki aktivnih tvari pokazuju male postotke nesuklađenih uzoraka. Analizom 500 uzoraka mlijeka u SAD utvrđen je samo jedan uzorak sa koncentracijom fluniksina (nesteroidni protuupalni lijek) većom od dopuštene granice od 2 µg/kg (Kissell i sur., 2013.). U mlijeku iz Turske utvrđeni su ostatci sulfadiazina u dva uzorka s koncentracijama između 75 i 125 µg/L, odnosno koncentracije tetraciklina između 15 i 100 µg/L u 4 uzorka mlijeka (Imamoglu i Olgun, 2016.). Istraživanja provedena u SAD u mlijeku pokazala su svega 1,15 % nesuklađenih rezultata veterinarskih lijekova (11 pozitivnih uzoraka na ukupno 953 analiziranih) (FDA, 2015.). U 247 uzorka mlijeka iz Brazila koji su analizirani na ostatke beta-laktama, povišene vrijednosti određene su za kloksacilin i cefapirin (Jank i sur., 2015.).

Provedeno je niz istraživanja u Hrvatskoj. U istraživanju koncentracija kinolona flumekina u mlijeku podrijetlom iz Hrvatske primjenom ELISA metode nisu utvrđene koncentracije iznad NDK vrijednosti od 50 µg/kg (Bilandžić i sur., 2015.). Također, istraživanje koncentracija levamizola primjenom LC-MS/MS u mlijeku pokazalo je da su sve koncentracije ispod granice kvantifikacije metode od 0,22 µg/kg (Bilandžić i sur., 2016.). Analiza 18 spojeva benzimidazola primjenom LC-MS/MS u mlijeku iz Hrvatske u 2016. godini također je pokazala da su vrijednosti svih spojeva ispod granica kvantifikacije metode (Denžić Lugomer i sur., 2017.). Tijekom 2017. godine analizirano je ukupno 50 uzoraka sirovog kravljeg mlijeka na ostatke aminoglikozida. U jednom uzorku mlijeka određene su koncentracije dihidrostreptomomicina iznad NDK, odnosno 300 µg/kg (Bilandžić i sur., 2018.).

Iako su ustvrđeni mali postotci nesukladnih rezultata farmakološki aktivnih tvari u kontrolama službenih uzoraka mlijeka na nivou EU ili u različitim istraživanjima, teži se razvoju metoda koje imaju visoku pouzdanost i selektivnost te omogućuju analizu velikog broja farmakološki aktivnih tvari. U svijetu je tendencija razvoja multimetoda koje omogućuju identifikaciju i kvantifikaciju više desetaka ili više od 100 tvari različitih skupina tvari od veterinarskih lijekova, zabranjenih tvari do kontaminanata, a sve u svrhu postizanja kriterija što bolje zaštite zdravlja potrošača.

Literatura

- AMELIN, V. G., N. M. FEDINA, I. V. PODKOLZIN and A. I. KOROTKOV (2018): Rapid Screening and determination of residual veterinary drugs in milk by ultrahigh performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 73, 576-585.
- ANASTASSIADES, M., S. J. LEHOTAY, D. STAJNBAHER and F. J. SCHENCK (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC Int.* 86, 412-431.
- BESSAIRE, T., C. MUJAHID, A. BECK, A. TARRES, M.-C. SAVOY, P.-M. WOO, P. MOTTIER and A. DESMARCHELIER (2018): Screening of 23 β -lactams in foodstuffs by LC-MS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction. *Food Addit. Contam. A* 35, 661-673.
- BILANDŽIĆ, N., B. KOS, J. ŠUŠKOVIĆ, M. VREBAC, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ i I. VARGA (2015): Kontrola rezidua flumekina u uzorcima mlijeka. *Vet. stn.* 46, 83-88.
- BILANDŽIĆ, N., Đ. BOŽIĆ LUBURIĆ, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, I. VARENINA and I. VARGA (2016): Control of levamisole residues in milk using a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Mljekarstvo* 66, 146-153.
- BILANDŽIĆ, N., L. FEJZULI, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, I. VARENINA, I. VARGA, Đ. BOŽIĆ LUBURIĆ, B. KOS i J. ŠUŠKOVIĆ (2018): Ostaci aminoglikozida u sirovom mlijeku. 43 Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem (Lovran 7.-10. studenog 2018.). Knjiga sažetaka, Zagreb: Hrvatska mljekarska udruha (66-67).
- BOGIALLI, S. and A. DI CORCIA (2009): Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 947-966.
- BOOTH, N. H. (1998): Toxicology of drug and chemical residues. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Ames Iowa: Iowa State University Press (1149-1205).
- BOURIN, M. and F. CLÉNET (2014): Regulation of the Risk of Exposure to Antibiotics in Milk. *Pharmaceut Reg Affairs* 3, e128.
- CHEN, D., J. YU, Y. TAO, Y. PAN, S. XIE, L. HUANG, D. PENG, X. WANG, Y. WANG, Z. LIU and Z. YUAN (2016): Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1017-1018, 82-88.
- DASENAKI, M. E. and N. S. THOMAIDIS (2015): Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 880, 103-121.
- DASENAKI, M. E., A. A. BLETSOU, G. A. KOULIS and N. S. THOMAIDIS (2015): Qualitative multiresidue screening method for 143 veterinary drugs and pharmaceuticals in milk and fish tissue using liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4493-4508.
- DENŽIĆ LUGOMER, M., D. PAVLIČEK, N. BILANDŽIĆ, M. KIŠ and D. MAJNARIĆ (2017): Determination of benzimidazole residues and their metabolites in raw milk in Croatia using high performance liquid chromatography-diode array detection. *Mljekarstvo* 67, 231-238.
- DESMARCHELIER, A., K. FAN, M. M. TIEN, M.-C. SAVOY, A. TARRES, D. FUGER, A. GOYON, T. BESSAIRE and P. MOTTIER (2018): Determination of 105 antibiotic, antiinflammatory, antiparasitic agents and tranquilizers by LC-MS/MS based on an acidic QuEChERS-like extraction. *Food Addit. Contam. A* 35, 646-660.
- DZS (2019): Proizvodnja mlijeka i mliječnih proizvoda u 2018. Državni zavod za statistiku, godina LVI, broj 1.1.25.. Dostupno na: https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2019/01-01-25_01_2019.htm. Pristupljeno 6.11.2019.
- EC (1996): Council Directive 96/23/EC of 29 of April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Commun.* L 125, 10-32.
- EC (2002a): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive

- 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation Off. J. Eur. Commun. L 221, 8-28.
18. EC (2002b): Regulation (EC) No 178/2002 of the European parliament and of the council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Off. J. Eur. Commun. L31, 1-24.
19. EC (2010): Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Commun. L15, 1-72.
20. EC (2017): Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products. Off. J. Eur. Commun. L 95, 1-142.
21. ECONOMOU, V. and P. GOUSIA (2015): Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 8, 49-61.
22. EFSA (2017): Report for 2015 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2017: EN-1150.
23. EFSA (2018): Report for 2016 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2018: EN-1358.
24. EFSA (2019): Report for 2017 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2019: EN-1579.
25. FDA (2015): Milk drug residue sampling survey. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services. March 2015.
26. FEJZULI, L., B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, J. ŠUŠKOVIĆ, B. KOS i N. BILANDŽIĆ (2018): Aminoglikozidini antibiotici - primjena u veterinarstvu i kontrola u hrani životinjskog podrijetla. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutricion.* 13, 95-106.
27. FISHER, W. J., B. SCHILTER, A. M. TRITSCHER and R. H. STADLER (2011): Environmental contaminants. In: Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H.: *Encyclopedia of dairy science.* Elsevier, London/New York (898-905).
28. GAUGAIN-JUHEL, M., B. DEL'EPINE, S. GAUTIER, M.-P. FOURMOND, V. GAUDIN, D. HURTAUD-PESSEL, E. VERDON and P. SANDERS (2009): Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. *Food Addit. Contam. A* 26, 1459-1471.
29. GETANEH, A. M., S. A. MEKONNEN and H. HOGEVEEN (2017): Stochastic bio-economic modeling of mastitis in Ethiopian dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 138, 94-103.
30. GÓMEZ-PÉREZ, M. L., P. PLAZA-BOLAÑOS, R. ROMERO-GONZÁLEZ, J. L. MARTÍNEZ-VIDAL and A. GARRIDO-FRENICH (2012): Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography – Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1248, 130-138.
31. HALASA, T., K. HUIJPS, O. ØSTERÅS and H. HOGEVEEN (2007): Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 29, 18-31.
32. HAN, R. W., N. ZHENG, Z. N. YU, J. WANG, W. M. XU, W. Y. QU, S. L. LI, Y. D. ZHANG and J. Q. WANG (2015): Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS. *Food Chem.* 181, 119-126.
33. HASSAN, M. M. K. B. AMIN, M. AHADUZZAMAN, M. ALAM, M. S. A. FARUK and I. UDDIN (2014): Antimicrobial resistance pattern against *E. coli* and salmonella in layer poultry. *Res. J. Vet. Pract.* 2, 30-35.
34. IMAMOGLU, H. and E. O. OLGUN (2016): Analysis of Veterinary Drug and Pesticide Residues Using the Ethyl Acetate Multiclass/Multiresidue Method in Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* 2016, 17 pages.
35. JANK, L., M. T. MARTINS, J. B. ARSAND, R. B. HOFF, F. BARRETO and T. M. PIZZOLATO (2015): High-throughput method for the determination of residues of β -lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam.* 32, 1992-2001.
36. JANK, L., M. T. MARTINS, J. B. ARSAND, T. M. C. MOTTA, T. C. FEIJÓ, T. DOS SANTOS CASTILHOS, R. B. HOFF, F. BARRETO and T. M. PIZZOLATO (2017): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: development and validation. *Food Anal. Met.* 10, 2152-2164.
37. KAUFMANN, A., P. BUTCHER, K. MADEN, S. WALKER and M. WIDMER (2011): Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices. *Anal. Chim. Acta* 700, 86-94.
38. KAUFMANN, A., P. BUTCHER, K. MADEN, S. WALKER and M. WIDMER (2014): Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Anal. Chim. Acta* 820, 56-68.
39. KISSELL, L. W., R. E. BAYNES, J. E. RIVIERE and G. W. SMITH (2013): Occurrence of flunixin residues

- in bovine milk samples from the USA. *Food Addit. Contam. A* 30, 1513–1516.
40. KUANG, Y., H. JIA, K. MIYANAGA and Y. TANJI (2009): Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 135–142.
 41. LESLIE, K. E. and C. S. PETERSSON-WOLFE (2012): Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 28, 289–305.
 42. MAGON, T., R. DA SILVEIRA, M. B. GALUCH, E. P. FAGAN, A. F. D. FEITOZA, S. V. PALOMBINI, O. O. SANTOS and J. V. VISENTAINER (2018): Simultaneous determination of four antibiotics in raw milk by UPLC-MS/MS using protein precipitation as sample preparation: development, validation, and application in real samples. *J. Braz. Chem. Soc.* 29, 2441–2448.
 43. MISHRA, A., S. K. SINGH, Y. P. SAHNI, T. K. MANDAL, S. CHOPRA, V. N. GAUTAM and S. R. QURESHI (2011): HPLC determination of cloxacillin residue in milk and effect of pasteurization. *Res. J. Pharm. Bio. Chem. Sci.* 3, 11–16.
 44. RASFF (2009–2019): Rapid alert system for food and feed (RASFF). Dostupno na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>. Pristupljeno 28.10.2019.
 45. ROBERT, C., N. GILLARD, P.-Y. BRASSEUR, G. PIERRET, N. RALET, M. DUBOIS and P. DELAHAUT (2013): Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A* 30, 443–457.
 46. ROCCA, L. M., A. GENTILI, V. PÉREZ-FERNÁNDEZ and P. TOMAI (2017): Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LCMS based methods. *Food Addit. Contam. A* 34, 766–784.
 47. SONG, W. and M. GUO (2014): Applied manure and nutrient chemistry for sustainable agriculture and environment. Chapter 2, Residual veterinary pharmaceuticals in animal manures and their environmental behaviors in Soils. Dordrecht: Springer Science+Business Media. Pp. 23–52.
 48. STAUB SPÖRRI, A., P. JAN, E. COGNARD, D. ORTELLI and P. EDDER (2014): Comprehensive screening of veterinary drugs in honey by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Addit. Contam. A* 31, 806–816.
 49. STOLKER, A. A. M., P. RUTGERS, E. OOSTERINK, J. J. P. LASAROMS, R. J. B. PETERS, J. A. VAN RHIJN and M. W. F. NIELEN (2008): Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2309–2322.
 50. STUBBINGS, G. and T. BIGWOOD (2009): The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Anal. Chim. Acta.* 637, 68–78.
 51. TURNIPSEED, S. B., J. M. STOREY, S. B. CLARK and K. E. MILLER (2011): Analysis of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7569–7581.
 52. VAN BOECKEL, T. P., C. BROWER, M. GILBERT, B. T. GRENFELL, S. A. LEVIN, T. P. ROBINSON, A. TEILLANT and R. LAXMINARAYAN (2015): Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 5649–5654.
 53. WANG, J. and D. LEUNG (2012): The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* 4, 103–111.
 54. WANG, J., D. LEUNG, W. CHOW, J. CHANG and J. W. WONG (2018): Target screening of 105 veterinary drug residues in milk using UHPLC/ESI Q-Orbitrap multiplexing data independent acquisition. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 5373–5389.
 55. ZHAN, J., X.-J. YU, Y.-Y. ZHONG, Z. T. ZHANG, X. M. CUI, J. F. PENG, R. FENG, X. T. LIU and Y. ZHU (2012): Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 906, 48–57.
 56. ZHU, W., J. YANG, Z. WANG, C. WANG, Y. LIU and L. ZHANG (2016): Rapid determination of 88 veterinary drug residues in milk using automated Turbo Flow online clean-up mode coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 148, 401–411.

Monitoring of pharmacologically active substances in milk in the European Union

Nina BILANDŽIĆ*, PhD, Grad. Biotechnol. Eng., Scientific Advisor, Ivana VARENINA, PhD, Grad. Biotechnol. Eng., Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, PhD, Grad. Food Technol. Eng., Durđica BOŽIĆ LUBURIĆ, Grad. Biotechnol. Eng., Ines VARGA, Mag. Appl. Chem., Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

The production of safe, high quality milk is a key aspect of public health in the European Union (EU). Frequent use of pharmacologically active substances in clinical practice on cattle farms results in the appearance of their residues in a variety of food products, including milk. The most commonly used drugs in the dairy industry are the antibiotics tetracyclines and beta-lactams, used against the pathogenic agents of mastitis. The use of veterinary medicines must be carefully optimized to protect consumers from potential adverse toxic effects. Another major problem is the development of resistance in the consumer that causes the failure of antibiotic therapies, especially against dangerous pathogenic strains of microorganisms. Today, most EU Member States are increasing milk production. The largest milk producers in the EU are Germany, France and the United Kingdom, while over the past 3 years, milk production has been declining in Croatia. EU Member States are seeking to control residues of pharmacologically active substances in milk using selective, sensitive and precise analytical methods. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the most commonly used instrumental analytical technique for the determination of residues of these substances

in milk. Today, multi-methods have been developed using LC-MS/MS that allow for the identification of 160 or more compounds. In order to protect consumer health, EU Member States carry out controls on pharmacologically active substances in milk as part of their national residue monitoring plans (NRMP). The control of pharmacologically active substances is based on the defined maximum residue levels of those substances (MRL). The European Food Safety Authority (EFSA) collects control data from all EU Member States analysed under the NRMP and produces a joint report each year. Within the NRMP plans of EU Member States, non-compliant results of 0.115%, 0.128% and 0.304% were found for pharmacologically active substances in 2015, 2016 and 2017, respectively. Most of the non-compliant results pertain to the group of antibacterial substances (B1) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (B2e). In the antibacterial group, a total of 48.2% of non-compliant beta-lactams were detected in all three years. In 2017, the largest number of non-conforming results was related to non-steroidal anti-inflammatory drugs (54.5%), *i.e.* in this group 90.5% of non-compliant results were found for salicylic acid.

Key words: *pharmacologically active substances; veterinary drugs; milk; milk control; European Union*