

# Validacijski postupci u određivanju rafoksanida i oksiklozanida u mesu primjenom HPLC-MS/MS metode

---

**Konsuo, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:882050>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Marina Konsuo

970/USH

**VALIDACIJSKI POSTUPCI U  
ODREĐIVANJU RAFOKSANIDA I  
OKSIKLOZANIDA U MESU  
PRIMJENOM HPLC-MS/MS  
METODE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar iz Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i neposrednim voditeljstvom znanstvene savjetnice dr. sc. Nine Bilandžić.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svojoj mentorici, profesorici dr. sc. Mirjani Hruškar na pomoći, strpljenju i stručnim savjetima tijekom čitavog diplomskog studija te na konstantnoj želji i radu na unaprijeđenju studija i zadovoljstvu studenata.

Veliko hvala i članici Laboratorija za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji doc. dr. sc. Marini Krpan na uloženom vremenu i trudu tijekom pisanja ovog diplomskog rada te za uvijek ugodnu suradnju i strpljenje za brojna pitanja.

Zahvaljujem se znanstvenoj savjetnici dr. sc. Nini Bilandžić koja mi je omogućila izradu diplomskog rada u Laboratoriju za određivanje rezidua na Odjelu za veterinarsko javno zdravstvo Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu.

Također, zahvaljujem se dr. sc. Ivani Varenina na vođenju tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada kao i mag. primj. kem. Ines Varga za pomoć tijekom postupka pripreme uzoraka.

Hvala i mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na razumijevanju, strpljenju i podršci koju su mi pružili tijekom cijelog studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

## Validacijski postupci u određivanju rafoksanida i oksiklozanida u mesu primjenom HPLC-MS/MS metode

*Marina Konsuo, 970/USH*

**Sažetak:** Sve učestalija primjena antiparazitskih lijekova na životinjama koje se koriste za ljudsku prehranu može rezultirati ostacima tih lijekova u hrani zbog čega su kontrole prehrambenih proizvoda sve strože, a razvoj novih analitičkih metoda neophodan. Cilj ovog rada bio je odrediti validacijske postupke u određivanju antiparazitika rafoksanida i oksiklozanida u uzorcima mesa primjenom HPLC-MS/MS metode. Ključni validacijski parametri koji su se određivali su: specifičnost, linearnost, preciznost, ponovljivost, unutarlaboratorijska reproducibilnost te granične koncentracije tvari i sposobnost dokazivanja. Validacija odabranih parametara pokazala je da rezultati dobiveni primjenom ove metode zadovoljavaju zakonski postavljene kriterije prihvatljivosti donese uredbom Europske komisije 657/2002 te da je metoda prikladna za određivanje salicilanilida rafoksanida i oksiklozanida u mesu.

**Ključne riječi:** HPLC-MS/MS, oksiklozanid, rafoksanid, validacija

**Rad sadrži:** 56 stranica, 15 slika, 27 tablica, 32 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar

**Pomoć pri izradi:** Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Marina Krpan
2. Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar
3. Dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj.
4. Izv. prof. dr. sc. Sanja Vidaček Filipec (zamjena)

**Datum obrane:** 24. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Quality Control**  
**Laboratory for Food Quality Control**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **Validation procedures while determining Rafoxanide and Oxyclozanide residues in meat using HPLC-MS/MS method**

*Marina Konsuo, 970/USH*

**Abstract:** More frequent use of antiparasitic drugs on animals used for human consumption can result in the residues of these drugs in food, which is why the control of food products is getting more severe and the development of new analytical methods is indispensable. The aim of this study was to determine validation procedures for the determination of antiparasitics rafoxanide and oxyclozanide in meat samples using the HPLC-MS/MS method. Determined validation parameters were: specificity, linearity, precision, repeatability, intra-laboratory reproducibility, decision limit and detection capability. Validation of selected parameters has shown that the results obtained by this method meet the legally established eligibility criteria adopted by European Commission Regulation 657/2002 and that the method is suitable for the determination of salicylanilide rafoxanide and oxyclozanide in meat.

**Keywords:** HPLC-MS/MS, oxyclozanide, rafoxanide, validation

**Thesis contains:** 56 pages, 15 figures, 27 tables, 32 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Mirjana Hruškar, Full time professor

**Technical support and assistance:** PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor

#### **Reviewers:**

1. PhD. Marina Krpan, Assistant professor
2. PhD. Mirjana Hruškar, Full time professor
3. PhD. Nina Bilandžić, Scientific advisor
4. PhD. Sanja Vidaček Filipec, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 24 September 2018

# Sadržaj

1	UVOD .....	1
2	TEORIJSKI DIO .....	2
2.1	ANTIPARAZITICI .....	2
2.1.1	<i>Antiparazitska rezistencija</i> .....	3
2.1.2	<i>Salicilanilidi</i> .....	4
2.2	METODE ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA ANTIPARAZITIKA U HRANI.....	7
2.2.1	<i>UHPLC-MS/MS</i> .....	8
2.2.2	<i>UHPLC-TOF/MS</i> .....	8
2.2.3	<i>HPLC – MS/MS METODA</i> .....	8
2.3	VALIDACIJA METODE.....	11
2.3.1	<i>Parametri validacije</i> .....	13
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1	UZORCI .....	17
3.2	KEMIKALIJE .....	17
3.3	APARATURA I PRIBOR .....	17
3.4	METODA RADA.....	18
3.4.1	<i>Uzorkovanje mišića</i> .....	18
3.4.2	<i>Priprema otopina</i> .....	18
3.4.3	<i>Priprema standardnih otopina</i> .....	19
3.4.4	<i>Priprema standardne kalibracijske krivulje na otapalu</i> .....	20
3.4.5	<i>Priprema obogaćenog materijala za provjeru iskorištenja</i> .....	21
3.5	Postupak pripreme uzoraka .....	22
3.5.1	<i>Pročišćavanje uzoraka</i> .....	22
3.5.2	<i>SPE ekstrakcija</i> .....	23
3.6	Mjerenje na LC-MS/MS uređaju .....	23
3.6.1	<i>Kromatografski uvjeti</i> .....	24
3.6.2	<i>Uvjeti masene spektrometrije</i> .....	25
3.7	Kvalitativna procjena.....	26
3.8	Kvantitativna procjena.....	27
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	30
4.1	Specifičnost .....	30
4.2	Linearnost kalibracijske krivulje .....	32



4.3	Preciznost (ponovljivost i unutarlaboratorijska reproducibilnost) i točnost.....	43
4.4	Određivanje granične koncentracije (količine) analita i sposobnosti dokazivanja....	47
5	ZAKLJUČAK .....	53
6	LITERATURA.....	54

# 1 UVOD

Antiparazitici su jedna od najupotrebljivanijih skupina spojeva u veterinarskoj medicini diljem svijeta koji se koriste za prevenciju i terapijsku primjenu kod parazitskih infekcija životinja. Primjena antiparazitskih lijekova na životinjama koje se koriste kao hrana može rezultirati ostacima tih lijekova u hrani, osobito ako se pri liječenju ne slijedi uputstvo za doziranje lijeka, trajanje terapije te vrijeme karence. Stoga je u svrhu zaštite potrošača, ali i proizvođača mesa neophodno životinje, koje su namijenjene za prehranu ljudi, redovito kontrolirati na parazite odnosno nematode (obliće), cestode (trakavice) i trematode (metilje) (Cooper, 2012).

Također, zbog brojnih afera i prijevara povezanih s mesom, današnji potrošači sve manje vjeruju trgovačkim lancima i deklaraciji uvoznog mesa, a sve više se okreću domaćoj i organskoj proizvodnji, kupovanju mesa u mesnicama, ali i crnom tržištu koje često nije provelo nikakvu kontrolu i za koje sljedivost ne postoji. Kao posljedica toga može doći do pojave ostataka supstanci kojima su se životinje tretirale tijekom uzgoja iznad maksimalno dozvoljenih razina, a koje nitko nije zabilježio te samim time do potencijalne opasnosti za potrošača.

S obzirom na potencijalna toksična, teratogena i mutagena svojstva antiparazitika, nužno je utvrđivanje maksimalne dozvoljene razine njihovih rezidua u hrani animalnog podrijetla (mlijeko, mišić, jetra, bubreg i mast) u čiju svrhu se konstantno razvijaju nove, skuplje i učinkovitije analitičke metode. Lijekovi protiv parazita pripadaju različitim grupama kemijskih spojeva koji imaju i različite mehanizme djelovanja što je svakako izazov prilikom razvoja metoda za određivanje njihovih ostataka, a od kojih se kao najzastupljenija koristi tekućinska kromatografija u kombinaciji s tandemnom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) (Odluka Komisije 2002/657/EZ).

Cilj ovog rada bio je provesti validaciju postupka određivanja rafoksanida i oksiklozanida u mesu primjenom HPLC-MS/MS metode. Validacija metode provedena je prema Uredbi komisije (EZ) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla, prema normi Europske komisije HRN ISO/IEC 17025:2005 kojom su definirani opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija te prema Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (Odluka Komisije 2002/657/EZ; Pravilnik, 2005).

## 2 TEORIJSKI DIO

### 2.1 ANTIPARAZITICI

Antiparazitici ili kako se rjeđe nazivaju antihelminthici (grč. *helmins*, *helmentos* parazitski crv) pripadaju grupi lijekova koji se primjenjuju u borbi protiv postojećih i razvoju novih parazita, isključivo iz probavnog sustava, a svoju veliku primjenu nalaze kako u veterinarskoj tako i u humanoj medicini. Klasificiraju se prvenstveno prema svojim molekularnim strukturama, ali i ovisno o njihovom načinu djelovanja protiv parazita. Mogu se podijeliti u osam skupina na:

- imidazotiazole
- benzimidazole
- makrocikličke laktone
- difenilsulfide
- heksahidropirazine
- salicilanilide
- tetrahidropirimidine i na
- druge koji nemaju međusobne sličnosti.

Benzimidazoli su ujedno i najveća grupa antiparazitika koja se koristi za liječenje endoparazitskih bolesti domaćih životinja (Horvat, 2012). Unatoč njihovoj velikoj učinkovitosti u liječenju parazitskih infekcija tek je unatrag desetak godina otkriven i komercijaliziran velik broj lijekova iz ove skupine. Antiparazitici mogu djelovati ili tako da izazovu paralizu crva ili da oštete njegov sekundarni omotač pri čemu dolazi ili do djelomične probave ili do odbacivanja od imunološkog sustava domaćina. Osobine idealnih antiparazitika podrazumijevaju širok spektar djelovanja, netoksičnost za životinju, brzo izlučivanje, jednostavnost primjene i nisku cijenu. Također, da bi bili efikasni, antiparazitici moraju biti toksični isključivo za parazite, a ne i za ostale stanice, što je moguće jedino u slučajevima u kojima su stanice parazita osjetljivije na njih od stanica domaćina ili u slučaju postizanja odgovarajuće koncentracije lijeka samo na onom mjestu gdje se paraziti nalaze (Lanusse, 1993).

### 2.1.1 Antiparazitska rezistencija

Javnozdravstveni problem koji je još uvijek u začetcima, a javlja se s upotrebom antiparazitika jest pojava i širenje rezistentnih sojeva parazita. Nije poznato je li otpornost inducirana samim lijekom ili je uporaba lijeka dovela do selekcije otpornih sojeva koji su bili prisutni u početnoj populaciji, ali otpornost je zabilježena i među endo i ektoparazitima. Antiparazitska rezistentnost je široko rasprostranjena kod gastrointestinalnih nematoda ovaca i koza, a učinkovitost antihelminatika protiv *Haemonchus contortus*, najznačajnije gastrointestinalne nematode je drastično smanjena. Antihelminaska otpornost također prevladava i kod *Teladorsagia circumcincta*, nematoda prisutnih u ovaca te *Cooperia spp.* i *Trichostrongylus spp.* nematoda prisutnih u govedu (Vercruyse, 2007).

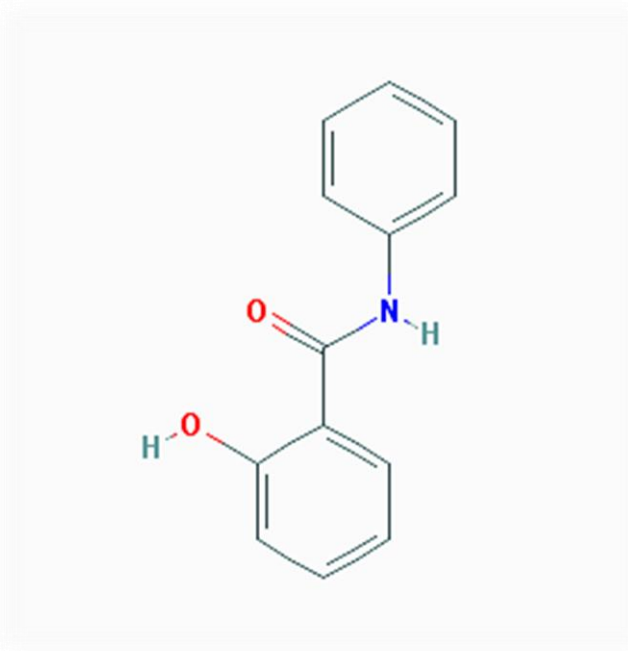
U istraživanju koje su 2011. godine objavili Cooper i suradnici, utvrđeno je kako su ostaci antihelmintskih lijekova u jestivim tkivima govedine općenito otporni na degradaciju tijekom pečenja ili prženja. Štoviše, potvrdili su da tijekom termičke obrade može doći i do povećanja koncentracije njihovih ostataka što može biti posljedica pretvorbe neidentificiranih metabolita u određene markere ostataka (Cooper, 2011). Whelan i suradnici su 2010. godine objavili istraživanje koje je pokazalo da određeni antihelminatici pronađeni u mlijeku mogu ostati stabilni tijekom perioda skladištenja te da na njih neće utjecati ni proces fermentacije. Također su zaključili da koncentracije ostataka antihelminatika u mliječnim proizvodima mogu biti veće od onih u kontaminiranom mlijeku koje se koristi za njihovu proizvodnju (Whelan i sur., 2010).

Ostaci antiparazitika neće predstavljati opasnost po zdravlje potrošača ako se sami antiparaziti primjenjuju pravilno i u skladu s preporučenim dozama. Međutim, ukoliko se apliciraju bez nadzora veterinaru, ako se primjenjuju jeftiniji generički proizvodi, ako se životinja tretira u razdoblju laktacije ili ako se ne poštuje vrijeme karence njihovi ostaci moći će se detektirati u hrani u koncentracijama većim od MRL vrijednosti (engl. *maximum residue level*, hrv. *NDK, najviša dopuštena količina*), a s obzirom na njihova svojstva koja uključuju embriotoksičnost, neurotoksičnost, teratogenost, mutagenost te hiperplaziju, predstavljaju potencijalni zdravstveni rizik za potrošače (Kinsella, 2009).

Zbog svega toga važno je konstantno razvijati nove, osjetljivije i preciznije multikomponentne analitičke metode koje su sposobne istovremeno detektirati veliki broj antiparazitika u vrlo niskim koncentracijama.

### 2.1.2 Salicilanilidi

Salicilanilidi su velika skupina spojeva koji su prvotno bili razvijeni kao fungicidi za lokalnu uporabu i kao antimikrobne tvari u sapunima. Kasnije su ti spojevi pokazali da posjeduju snažnu antihelmintičku aktivnost te se od tada sintetizira širok raspon srodnih halogeniranih salicilanilida koji su aktivni protiv helminta. Osnovna struktura salicilanilida se sastoji od prstena salicilne kiseline i prstena anilida. To su slabo kiseli fenolni spojevi, a mogu se pronaći i pod nazivom benzamidi ili salicilamidi.

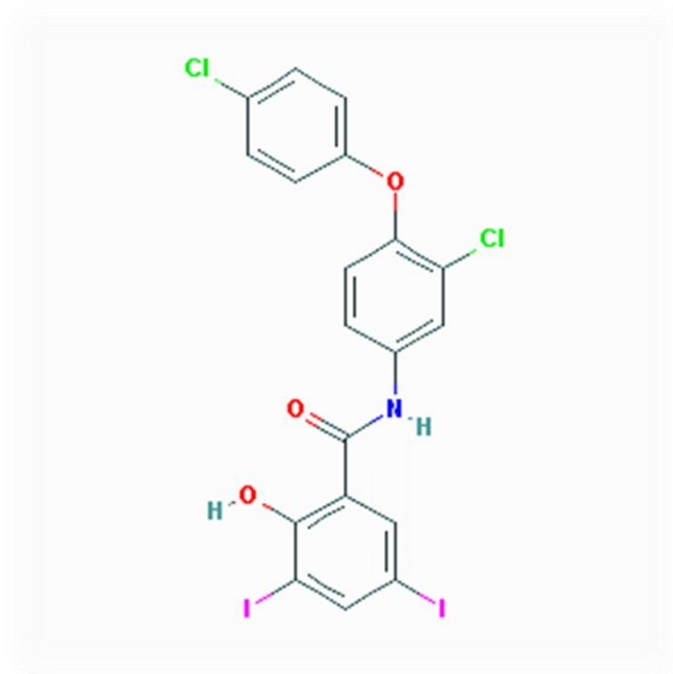


Slika 1. Osnovna struktura salicilanilida (NCBI, 2018c)

Istraživanja su pokazala kako je strukturni kriterij taj koji je odgovoran za protumetiljno djelovanje salicilanilida, odnosno posjedovanje elektron-odvlačećih skupina na salicilnom i anilidnom prstenu zajedno s nekom lipofilnom molekulom poput *tert*-butila na poziciji 3. Ovisno o raznim supstituentima koji mogu biti vezani na osnovnu jezgru, salicilanilidi se mogu podijeliti na brojne načine kao što su halogenirani i nehalogenirani salicilanilidi, acetilsalicilanilidi, diklorosalicilanilidi i benzoilsalicilanilidi. Svi salicilanilidi koji se koriste kao antiparazitici u liječenju životinja su halogenirani pa tako i rafoksanid i oksiklozanid. Halogenirani salicilanilidi su važni antihelmintici koji se širom svijeta upotrebljavaju u kontroli i liječenju zaraza i infekcija kod ovaca i goveda. Rafoksanid i oksiklozanid su klorirani derivati

salicilanilida koji se koriste kao flukicidi, antihelmintici koji djeluju protiv parazita iz razreda trematoda (Swan, 1999).

### 2.1.2.1 Rafoksanid



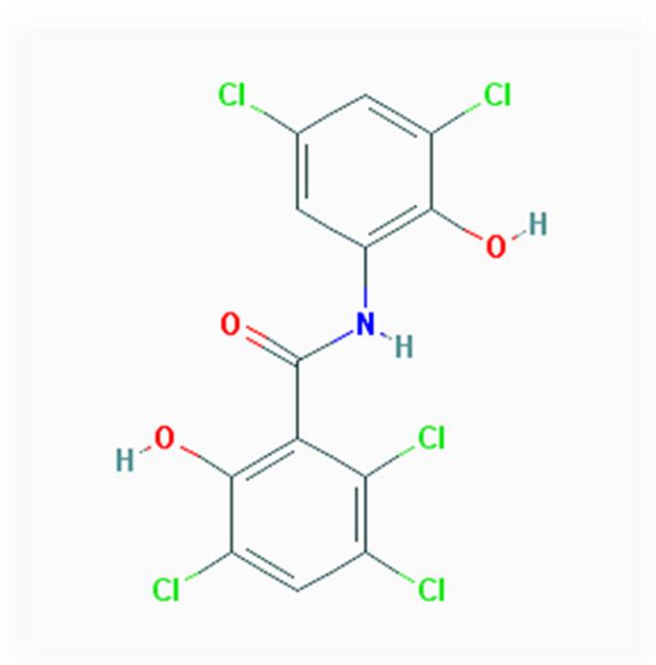
Slika 2. Rafoksanid (NCBI, 2018a)

Rafoksanid je halogenirani salicilanilid koji se koristi za liječenje metiljavosti goveda, ovaca, koza i konja. Rafoksanid je također djelotvoran i protiv gastrointestinalnih nematoda (*Haemonchus*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum* i *Gaigeria* vrsta) te protiv ličinki ovčjega štrka (*Oestrus ovis*) (EMEA, 1999).

Tablica 1. NDK vrijednosti za ostatke rafoksanida kod različitih životinjskih vrsta (Uredba komisije, 2010)

Farmakološki djelatna tvar	Marker rezidua	Životinjska vrsta	NDK ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ciljno tkivo	Ostale odredbe
Rafoksanid	Rafoksanid	Goveda	30 30 10 40	Mišić Mast Jetra Bubreg	/
		Ovce	30 30 10 40	Mišić Mast Jetra Bubreg	
		Goveda, ovce	10	Mlijeko	Privremeni NDK prestaje vrijediti 31. prosinca 2017.

#### 2.1.2.2 Oksiklozanid



Slika 3. Oksiklozanid (NCBI, 2018b)

Oksiklozanid je također halogenirani salicilanilid koji se koristi za liječenje i kontrolu metiljavosti kod goveda, ovaca i koza. Pripravlja se kao oralna otopina koja sadrži samo

oksiklozanid ili kombinaciju levamisol hidroklorida ili oksfendazola ili kao prašak koji se ugrađuje u hranu (EMEA, 1998).

Tablica 2. NDK vrijednosti za ostatke oksiklozanida kod različitih životinjskih vrsta (Uredba komisije, 2010)

Farmakološki djelatna tvar	Marker rezidua	Životinjska vrsta	NDK ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ciljno tkivo	Ostale odredbe
Oksiklozanid	Oksiklozanid	Sve vrste preživača	20 20 500 100 10	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg Mlijeko	/

## 2.2 METODE ZA ODREĐIVANJE OSTATAKA ANTIPARAZITIKA U HRANI

Velike razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima antiparazitskih lijekova protiv metiljavosti onemogućavale su njihovo objedinjenje u jednu multikomponentnu metodu, zbog čega su se za većinu njih još donedavno koristile metode za određivanje pojedinačnih rezidua. Te metode uključivale su visokodjelotvornu tekućinsku kromatografiju s ultraljubičastim ili fluorescentnim detektorom te detekcijom električne vodljivosti (HPLC-UV, HPLC-FLD, HPLC-ECD), plinsku kromatografiju (GC) te tekućinsku kromatografiju (LC) u kombinaciji s masenom spektrometrijom (MS). Kod analize velikog broja antihelmintika i njihovih metabolita mogu se pojaviti problemi sa selektivnošću što može biti riješeno primjenom tekućinske kromatografije (LC) u kombinaciji s masenom spektrometrijom (MS) (Stolker i Brinkman, 2005; Gentili i sur., 2016).

Pročišćavanje uzorka je najveći izazov tijekom razvijanja analitičkih metoda za određivanje ostataka lijekova u hrani životinjskog podrijetla. Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava svakog pojedinog spoja te složenosti bioloških matrica iz kojih je potrebno ekstrahirati te spojeve, metode za određivanje pojedinačnih ostataka veterinarskih lijekova podrazumijevaju uglavnom dugotrajne, naporne i skupe ekstrakcijske procedure kojima se proizvode velike količine otpadnog otapala. Za multikomponentne metode, prihvatljivi kriteriji su brza, jeftina i jednostavna izvedba, minimalna potrošnja kemikalija, prostora i materijala kao i postizanje visoke robusnosti i pokrivanja širokog raspona analita i matrica. Pročišćavanje uzorka se



provodi u nekoliko koraka koje je moguće dodatno optimizirati kako bi se dobili što bolji validacijski parametri poput preciznosti i točnosti metode.

Što se tiče detektora, UV i FLD su detektori koji su se najviše koristili u analitičkim metodama za detekciju antiparazitika, međutim nedostatak im je to što zahtjevaju opsežno pročišćavanje ekstrakata, mogu detektirati samo ograničeni broj analita i sklone su sadržavanju interferencija, a fluorescentna detekcija često zahtjeva i derivatizaciju analita. Kao rezultat razvoja novih tehnologija i ulaganja u razvoj analitičkih metoda, posljednjih godina se kvalitativno i kvantitativno određivanje rezidua antiparazitskih lijekova gotovo u potpunosti provodi pomoću HPLC-MS/MS, UHPLC-MS/MS te UHPLC-TOF/MS instrumenata (Stolker i Brinkman, 2005; Hiemstra i De Kok, 2007).

### 2.2.1 UHPLC-MS/MS

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC) predstavlja poboljšanu, moderniziranu verziju tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*) HPLC metode. Ima znatno poboljšane performanse te je posebno atraktivna za razvoj metoda u uvjetima kada je poželjno postići što kraće vrijeme analize te što brže uravnoteženje kolona. Također, uporaba UHPLC metode značajno povećava produktivnost u svim fazama razvoja metode, od inicijalnog ispitivanja, optimizacije, do kvalifikacije i validacije (Dong i Zhang, 2014).

### 2.2.2 UHPLC-TOF/MS

U novije vrijeme se sve više pojavljuju i analizatori u vremenu leta (engl. *Time-of-flight*) koji se odlikuju visokom osjetljivošću i sposobnošću brzog skeniranja. Jedna od prednosti primjene TOF/MS je široki raspon skeniranja velikog broja kontaminanata i ostataka u različitim vrstama uzoraka što omogućuje značajnu količinu korisnih informacija o ionizirajućim spojevima prisutnim u uzorku (Díaz i sur., 2012).

### 2.2.3 HPLC – MS/MS METODA

Do prije dvadesetak godina tekućinska kromatografija i spektrometrija masa su bile dvije potpuno odvojene tehnike. Međutim, sedamdesetih i osamdesetih godina je došlo do

povezivanja tih dvaju tehnika na područjima mehanizama desorpcije, otparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi, ionizacije pri atmosferskom tlaku i povezivanja ionizatora i analizatora, što je predstavljalo ogroman iskorak prema rutinskoj upotrebi takvog vezanog sustava.

### 2.2.3.1 Princip HPLC-MS/MS metode

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography* – HPLC) je visoko djelotvorna analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje otopljenih tvari. Tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju s čvrstom ili tekućom nepokretnom i tekućom pokretnom fazom zbog razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi među fazama ili veličini tvari koje se razdvajaju, te imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni. Kod HPLC-a nepokretna faza se sastoji od čestica vrlo malih dimenzija što omogućava veliku kontaktnu površinu i rezultira visokom moći razdvajanja (visokom djelotvornosti) po kojoj je metoda i dobila naziv (Rouessac i Rouessac, 2013).

Tekućinski kromatograf je sustav u kojem se provodi analiza većinom polarnih analita razdvajanjem ciljanog analita na kromatografskoj koloni i njegovom detekcijom uz pomoć pogodnih tehnika detekcije. Sastoji se od sustava za dobavu pokretne faze, injekcionog sustava, kućišta za kolonu te detektora. Sustav za dobavu pokretne faze i crpni sustav sastoji se od spremnika pokretne faze, proporcionalnog ventila, odzračivača i sustava dobave helija, pumpe, regulacionog ventila na ulazu i izlazu iz pumpe, sustava za ujednačavanje pulseva, ventila za ispiranje sustava, regulatora tlaka u sustavu te dinamičke ili statičke miješalice. Injekcioni sustav služi za unos uzorka, a sastoji se od injekcionog ventila, automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*), injekcijske igle i graduirane injekcije ili pumpe te kapilare određenog volumena. Kućište u kojem se nalazi kolona može i ne mora biti termostetirano, a kolone nose oznake prema vrsti nepokretne faze (C18, C8, C4, NH<sub>2</sub>, Ph-NH<sub>2</sub>, CN, grafitna, SiO<sub>2</sub>, gel-propusna itd.). Detektori koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji mogu biti UV/VIS – od jedne do četiri valne duljine ili multidiodni (DAD, PDA itd.), fluorescentni, detektori indeksa loma, raspršenja svjetla, elektrokemijski, amperometrijski, spektrometar masa (Ferrer i Thurman, 2003).

Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojem (engl. *interface*) koji ima višestruku ulogu: otparavanje tekućine, ionizacija neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator, a međufazni prijelazi koji se događaju u međuspoju su otparavanje i desorpcija.

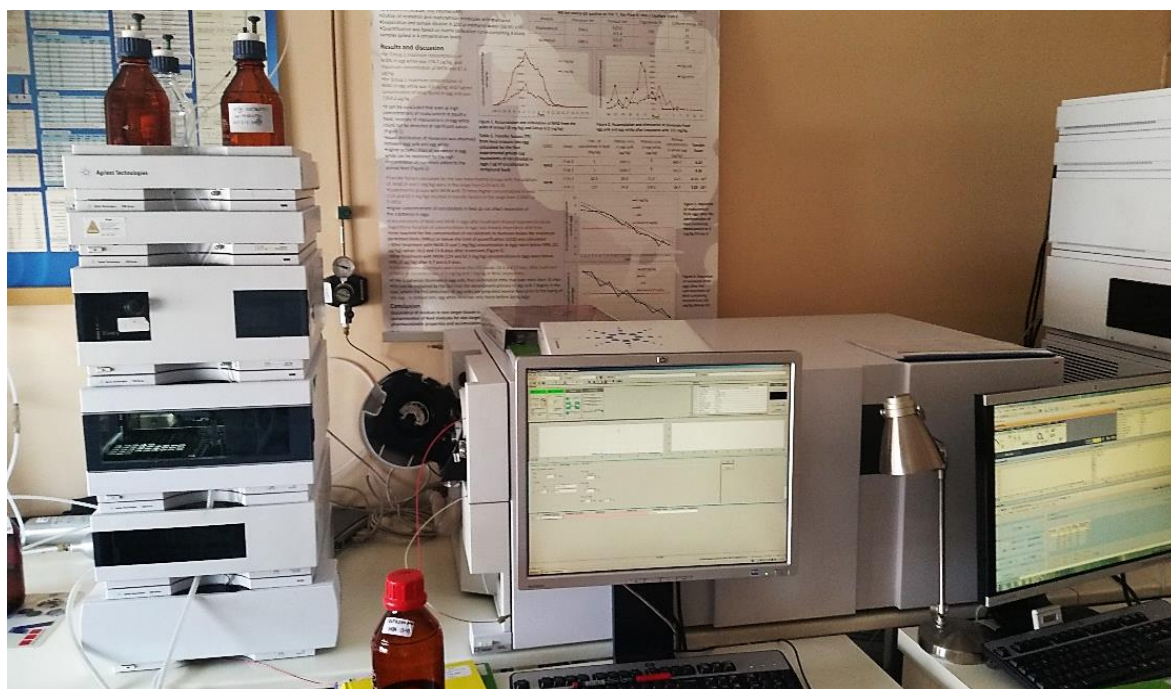
ESI (engl. *Electrospray Ionization*) je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS koji je kompatibilan sa svim analizatorima. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C i odvija se u struji dušika. Ionizacija se odvija tako da pokretna faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru (iglu), koja ujedno predstavlja elektrodu pod visokim naponom. Na vršku igle se formira maglica sastavljena od niza kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Kako otapalo otparava pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala (ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu), tako se kapljice smanjuju. Nakon što se dovoljno smanje da se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i kapljice se otparavaju ili se razbiju na manje kapljice. Analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu. Ioni analita u trenutku napuštanja površine nisu u potpunosti bez otapala, oko njih se, naime, stvara sfera uparenog otapala. Nakon otparavanja kapljica, otvor iza kojeg je visoki vakuum i analizator privlači tako formirane kvazimolekulske ione.

Analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Kvadrupol je jedan od najzastupljenijih analizatora, a sastoji se od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane; jedan par pri tome ima pozitivni, a drugi negativni polaritet. Dodatno su ti parovi još spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180 stupnjeva izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti  $m/z$  i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju, a mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule (Kiffe i sur., 2007; Ferrer i Thurman, 2003).

#### 2.2.3.2 Prednosti HPLC-MS/MS metode

Kombinacijom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s tandemnom masenom spektrometrijom (MS/MS) dobivena je visoko osjetljiva i selektivna tehnika pogodna za analizu velikog broja antihelmintika, čak i u kompleksnim matricama, čime je znatno pojednostavljena priprema samog uzorka (Baugros i sur., 2008). Spajanjem tih dvaju sustava u jedan, omogućena je analiza širokog spektra spojeva, spojeva s velikom molekulskom masom, termički nestabilnih analita bez derivatizacije kao i nehlapljivih analita (Malik i sur., 2010). Zbog visoke selektivnosti tandemne spektrometrije mase, pročišćavanje uzoraka se može pojednostaviti, no s obzirom da se u analizama ostataka antiparazitskih lijekova uobičajeno analiziraju kompleksne matrice poput jetre, bubrega i mišića, neophodno je provesti prikladno pročišćavanje tih uzoraka kako bi se smanjio matrični efekt tijekom ionizacije. Razvoj HPLC-

MS/MS otvorio je nove mogućnosti u određivanju ostataka veterinarskih lijekova, posebice kod multikomponentnih metoda koje uključuju supstance različitih kemijskih skupina. Metoda je postala najupotrebljavanija tehnika u modernoj analizi ostataka jer pruža mogućnost simultanog određivanja čak više od 100 analita u kratkom vremenskom periodu (Hiemstra i De Kok, 2007).



Slika 4. HPLC Agilent Tech. 1200 i Triple Quad LC/MS 6410 (vlastita fotografija)

### 2.3 VALIDACIJA METODE

Validacija metode se jako brzo razvila tijekom posljednjih pedesetak godina, od jednog zanemarenog područja mnogih znanstvenih disciplina, do široko priznatog procesa koji se koristi za potvrdu analitičkih postupaka te njihove prikladnosti za namjeravanu uporabu. (Araujo, 2009).

Da bi se rezultati dobiveni analizom nekom od razvijenih analitičkih metoda mogli smatrati vjerodostojnima i primjeniti, metodu je potrebno validirati. Validacija (lat. *validus* jak, snažan, moćan) je postupak kojim dokazujemo da metoda služi svojoj namjenjenoj svrsi, a potrebna je kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Razlikuju se postupci validacije metode kojom određujemo analit koji preteže u uzorku i one kojom se određuju tragovi u kompleksnoj matrici. Prema tome, isti postupci validacije ne primjenjuju se na sve analitičke

metode već se svakoj metodi pristupa individualno i procijenjuje što sve treba napraviti kako bi se dokazala njezina svrha. Osam osnovnih parametara validacije:

- specifičnost/selektivnost
- linearnost
- radno područje
- preciznost
  - *ponovljivost*
  - *obnovljivost*
  - *intermedijarna preciznost*
- točnost
- granica kvantifikacije
- granica detekcije
- postojanost/robusnost

je prihvaćeno od strane struke, regulative i zakonodavstva te se kombinacijom tih parametara oblikuje plan validacije za svaku analitičku metodu (Lazarić, 2012).

Postizanje brzih, točnih i vjerodostojnih rezultata analize je osnovna zadaća svakog analitičkog laboratorija zbog čega je analitičke metode potrebno opisati u onom obliku i opsegu kako bi se njihovom primjenom dobili točni i pouzdani rezultati. Najbolji način da se izbjegnu problemi tijekom izvedbe metode jest provođenje njezine validacije. Iako sama validacija ne može predvidjeti sve probleme koji se mogu javiti tijekom primjene metode, postupci razvoja i validacije metode upućivat će na one najčešće. Laboratorij mora provesti validaciju:

- nenormiranih metoda
- metoda razvijenih u samom laboratoriju
- normiranih metoda koje se koriste izvan svoje namijenjene uporabe te
- proširenja i preinake normiranih metoda.

Prije same provedbe validacije definiraju se parametri validacije i kriteriji njihove prihvatljivosti, a odabir parametara validacije radi se prema vrsti i namjeni metode (Lavanya i sur., 2013).

Postupak validacije se sastoji od nekoliko koraka, a to su odabir analitičke metode, način uzorkovanja, priprema uzoraka, provođenje eksperimenata i statistička obrada podataka. Priprema uzoraka mora biti točno dokumentirana jer je ona ključna za uspješnu validaciju metode, a izbor

određenog postupka pripreme ovisi o prirodi i koncentraciji analita, matriksu uzorka, veličini uzorka i instrumentalnoj tehnici. Provođenje eksperimenata se odnosi na dobivanje kvalitativnih ili kvantitativnih informacija iz uzoraka s prihvatljivom razinom mjerne nesigurnosti, a analiza podataka sastoji se od matematičkih i statističkih postupaka iz kojih će se moći izvesti smislene informacije i zaključci o eksperimentu i validaciji metode u cjelini (Araujo, 2009).

### 2.3.1 Parametri validacije

Parametri validacije koji se najčešće koriste za potvrdne metode LC-MS/MS su:

- Specifičnost
- Linearnost
- Preciznost
  - repetibilnost (ponovljivost),
  - reproducibilnost (obnovljivost)
- Točnost/istinitost
- Granična koncentracija tvari ( $CC\alpha$ )
- Sposobnost dokazivanja ( $CC\beta$ ) (Vodič, 2018).

#### 2.3.1.1 *Specifičnost*

Specifičnost je važan parametar u analitičkim metodama kojim se dokazuje sposobnost razlučivanja metode između analita i njima srodnih tvari (izomeri, metaboliti, produkti degradacije, endogene tvari, ostale komponente matriksa, i sl.). Dakle, to je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod prethodno utvrđenim uvjetima ispitivanja. Prilikom određivanja specifičnosti analiziraju se i uspoređuju slijepi uzorci s obogaćenim uzorcima kako bi se otkrila prisutnost mogućih interferenata i procijenio njihov učinak, a njihov broj mora biti minimalno 20 (Odluka Komisije 2002/657/EZ).

#### 2.3.1.2 *Linearnost*

Linearnost je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U praksi se linearnost određuje

mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referencijskog materijala (preporučuje se najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja). Procjenjuje se matematički i grafički. Matematički se preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca ( $y=kx+l$ ) i izračuna koeficijent korelacije ( $r$ ). Nagib pravca ( $k$ ) je parametar koji izravno ukazuje na osjetljivost metode, a odsječak pravca ( $l$ ) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij  $r \geq 0,99$  dok se za vrlo niske koncentracije prihvaća i kriterij  $r \geq 0,98$  (Lazarić, 2012).

### 2.3.1.3 Preciznost

Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima u kratkom vremenskom periodu. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikujemo:

- *Ponovljivost*

Ponovljivost je preciznost u uvjetima ponovljivosti, odnosno uvjetima pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istom laboratoriju, dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima. Određuje se tako da se uzorci matriksa podijele u tri skupine uz provedbu najmanje šest mjerenja pa se svakoj skupini dodaju analiti u količini koja je 1, 1,5 i 2 puta veća od minimalno zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode, odnosno koja je 0,5, 1 i 1,5 puta veća od dozvoljene granice (Pravilnik, 2005).

- *Unutarlaboratorijska obnovljivost*

Unutarlaboratorijska obnovljivost je preciznost dobivena u istom laboratoriju pod unaprijed određenim uvjetima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okoliš) u definiranim vremenskim razmacima. Uzorci se podijele u tri skupine s najmanje šest mjerenja pa se svakoj skupini dodaju analiti u količini koja je 1, 1,5 i 2 puta veća od najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode, odnosno koja je 0,5, 1 i 1,5 puta veća od dopuštene količine. U analizi uzoraka koraci se ponavljaju najmanje dva puta, s različitim analitičarima i u različitim uvjetima okoliša (npr. različite serije reagensa, otapala, različite sobne temperature, različiti instrumenti) (Odluka Komisije 2002/657/EZ).

#### 2.3.1.4 Istinitost/Točnost

Istinitost predstavlja podudarnost između srednje vrijednosti dobivene iz velikog niza rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti, a obično se izražava kao mjerno odstupanje (engl. *bias*). To je zapravo iskorištenje.

Iskorištenje (engl. *recovery*) je postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka, a određuje se tijekom vrjednovanja metode, ako potvrdni referentni materijal nije dostupan. Ako ne postoji potvrdni referentni materijal, za određivanje iskorištenja koristi se isti princip analize uzoraka kao za ponovljivost.

Kod analitičkih metoda točnost predstavlja stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti, a utvrđuje se utvrđivanjem istinitosti (iskorištenja) i preciznosti (Odluka Komisije 2002/657/EZ).

#### 2.3.1.5 Granična koncentracija tvari (CC $\alpha$ )

Granična koncentracija (količina) analita (CC $\alpha$ ) je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost  $\alpha$  pogreške da je uzorak pozitivan.  $\alpha$  pogreška je vjerojatnost da je ispitani uzorak negativan, iako su dobiveni pozitivni mjerni rezultati (lažno pozitivan rezultat).

U slučaju tvari za koje nije utvrđena dozvoljena granica, CC $\alpha$  se može utvrditi:

- Pomoću kalibracijske krivulje. Analizira se slijepi uzorak koji se obogaćuje na razinu minimalno zahtijevane granice učinkovitosti ili iznad nje, a rezultati se prikazuju grafički. Granična koncentracija je jednaka pripadajućoj koncentraciji u točki sjecišta s ordinatom  $y$  plus 2,33 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti. Ovaj način izračuna je primjenljiv jedino za kvantitativna ispitivanja. ( $\alpha = 1\%$ ).
- Analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, kako bi izračunali omjer signal-šum u kojemu se očekuje analit, a kao granična koncentracija uzima se trostruka vrijednost omjera signal-šum. Ovo je primjenljivo i za kvantitativna i kvalitativna ispitivanja.

U slučaju tvari za koje je utvrđena dozvoljena granica, CC $\alpha$  se može utvrditi:

- Pomoću kalibracijske krivulje koja se od gore navedene razlikuje u tome što se u ovom slučaju slijepi uzorak obogaćuje oko dozvoljene granice, a granična koncentracija jednaka je koncentraciji na dozvoljenoj granici plus 1,64 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti ( $\alpha = 5\%$ ).



- Analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, obogaćenih jednim ili više analita na razinu dozvoljene granice, a  $CC\alpha$  je jednaka koncentraciji na dozvoljenoj granici plus 1,64 puta odgovarajuća standardna devijacija ( $\alpha = 5 \%$ ) (Odluka Komisije 2002/657/EZ).

#### 2.3.1.6 Sposobnost dokazivanja ( $CC\beta$ )

Sposobnost dokazivanja ( $CC\beta$ ) je najmanji udio tvari koji je moguće metodom dokazati, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost  $\beta$  pogreške.  $\beta$  pogreška je vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno pozitivan, iako su dobiveni negativni mjerni rezultati (lažno negativan rezultat).

U slučaju tvari za koje nije utvrđena dopuštena količina,  $CC\beta$  je:

- najniža koncentracija koja se može dokazati sa statističkom sigurnošću od  $1 - \beta$  u kontaminiranom uzorku.

U slučaju tvari za koje je utvrđena dopuštena količina,  $CC\beta$  je:

- koncentracija koja se može dokazati, sa statističkom sigurnošću od  $1 - \beta$ , uz ustanovljenu dopuštenu koncentraciju.

$\beta$  pogreška je vjerojatnost lažno negativne odluke te je ograničena na 5 % (Odluka Komisije 2002/657/EZ).

## **3 EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1 UZORCI**

U procesu validacije metode analizirano je 6 uzoraka mesa (goveda, svinje i peradi po 2 paralelne probe za svaki uzorak). Uzorci su obogaćivani na 4 različite koncentracijske razine tijekom 3 dana, od strane 3 različita analitičara.

### **3.2 KEMIKALIJE**

- Aceton (LC čistoće, Merck)
- Acetonitril (LC-MS čistoće, Merck)
- Metanol (LC-MS čistoće, Merck)
- Mravlja kiselina, 98-100 % (LC-MS čistoće, Sigma Aldrich)
- Ultračista voda
- N-heksan (Merck)
- Glicerol (Merck)
- Amonijak, 25 % (Merck)

Standardi:

- Oksiklozanid (Sigma Aldrich)
- Rafoksanid (Sigma Aldrich)

Interni standard:

- Benzoylring-13C6 (Sigma Aldrich)

### **3.3 APARATURA I PRIBOR**

- Staklene epruvete 15 mL
- Precizna analitička vaga (Ohaus)
- Precizne analitičke pipete volumena od 10 µL do 5 mL (Eppendorf)
- Centrifuga s max 4600 o/min (Hettich)
- Centrifuga s max 15000 o/min (Thermo)
- Sustav za otparavanje s dušikom (Organomation)

- Vortex homogenizator (Ika)
- Vakuum sustav za SPE – Ekstraktor u čvrstoj fazi od 24 mjesta (Supelco)
- SPE kolonice Oasis PRiME HLB Cartridge 6cc/200mg (Waters)
- Epruvete za ultracentrifugu volumena do 2 mL (Eppendorf)
- Aparati LC-MS/MS: HPLC Agilent Tech. 1200 i Triple Quad LC/MS 6410 (ili ekv.) opremljen s ESI sustavom za ionizaciju, s uređajem za samouzorkovanje povezani s računalom sa softverom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka (ili ekv.) – Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS G6410A (laboratorijska oznaka I-2 053/7), LC/MS degasser G1379B (I-2 053/1), LC/MS BINpump G1312A (I-2 053/2), LC/MS Hip-ALS G1367B (I-2 053/3), LC/MS FC/ALS Therm G1330B (I-2 053/4), LC/MS TCL G1316A (I-2 053/5), LC/MS DAD G1315B triplequad (I-2 053/5)
- Kromatografska kolona: Xbridge C18 2,1 x 150 mm, 3,5 µm (Waters)

### 3.4 METODA RADA

#### 3.4.1 Uzorkovanje mišića

Uzorci koji su doneseni u laboratorij na analizu pohranjuju se u hladnjak na temperaturu od 2 do 8 °C na 24 sata ili se homogeniziraju te se mogu čuvati do tri mjeseca na temperaturi od -18 °C. Prije analize homogenizirani uzorak se ostavi na sobnoj temperaturi da se temperira. Za analizu u epruvetu od 15 mL odvaže se 1g uzorka homogeniziranog mišića.

#### 3.4.2 Priprema otopina

Mobilna faza A

- Mravlja kiselina (0,3 %)

Kao mobilna faza A u ovoj metodi se koristi 0,3 % mravlja kiselina. Priprema se tako da se u tikvicu od 1L doda oko 500 mL ultračiste vode i 3 mL mravlje kiseline visoke čistoće te se nadopuni vodom do oznake.

## Mobilna faza B

- Acetonitril

Kao mobilna faza B u ovoj metodi se koristi organska mobilna faza, acetonitril. Acetonitril je najprikladnija mobilna faza za izdvajanje antiparazitika jer se time dobivaju najčišći ekstrakti.

## Otopina za ekstrakciju

- Acetonitril + Aceton (3:2)

U bocu od 1L pomoću menzure doda se 300 mL acetonitrila i 200 mL acetona (otopina se priprema svježa prije svake analize).

- Otopina amonijaka (1,25 %)

U tikvicu od 100 mL doda se oko 60 mL vode i 5 mL 25 % amonijaka te nadopuni vodom do oznake.

- Otopina glicerina (10 %)

U tikvicu od 100 mL odvaže se 9,2 g glicerina i otopi metanolom te nadopuni do oznake.

- Standardne otopine MS i RS

Bazne otopine standarda kao i radne otopine pripremaju se u metanolu.

### 3.4.3 Priprema standardnih otopina

Bazne otopine (MS) standarda pripremaju se odvagom standarda (10 mg) u tikvicu od 10 mL nakon čega se otapaju u metanolu. Dobivena koncentracija bazne standardne otopine je 1 mg mL<sup>-1</sup> te služi za pripremu radnih otopina. Radne otopine (RS) služe za obogaćivanje kontrolnih uzoraka tj. pripremu matriks kalibracijske krivulje.

Postupak pripreme standardnih otopina prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Postupak pripreme standardne mješavine supstanci antiparazitika za analizu mišića

Oznaka polaznog standarda:	Volumen bazne otopine konc. 1 mg mL <sup>-1</sup> u volumenu od 25 mL (mL)	Koncentracija radne otopine (μg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija radne otopine
RS-ANTIPAR-MIŠ-S1		S1	S2
		(μg mL <sup>-1</sup> )	(μg mL <sup>-1</sup> )
<b>Oksiklozanid</b>	0,1	4	0,4
<b>Rafoksanid</b>	0,15	6	0,6

Mješavine standarda S1, S2 pripremaju se u acetonitrilu.

Postupak pripreme mješavine internih standarda prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Postupak pripreme mješavine internih standarda antiparazitika za analizu mišića

Oznaka internog standarda:	Volumen bazne otopine (mL) u volumenu od 25 mL	Koncentracija radne otopine S1 (μg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija radne otopine S2 (μg mL <sup>-1</sup> )
RS- ANTIPAR-IS1			
		(μg mL <sup>-1</sup> )	(μg mL <sup>-1</sup> )
<b>Oksiklozanid (benzoylring-13C6)</b>	0,1	4	0,4
<b>Rafoksanid (benzoylring-13C6)</b>	0,15	6	0,6

#### 3.4.4 Priprema standardne kalibracijske krivulje na otapalu

Za kontrolu linearnosti odziva instrumenta te stabilnosti standardnih otopina priprema se kalibracijska krivulja na otapalu. Kalibraciju je potrebno napraviti u pet točaka, odnosno na pet različitih koncentracijskih razina (L1-L5) kako je prikazano u Tablici 5. U svakodnevnim analizama provjerava se odziv standarda razine L3.

Tablica 5. Standardna krivulja na otapalu za mišić

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>Slijepa proba</b>
	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )
<b>H<sub>2</sub>O (mL)</b>	500	500	500	500	500	500
<b>Acetonitril (mL)</b>	350	300	250	200	100	500
<b>RS-ANTIPAR-S2</b>	50	100	150	200	300	-
<b>RS-ANTIPAR-IS2</b>	100	100	100	100	100	-
<b>Koncentracija</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )						
<b>Oksiklozanid</b>	0,02	0,04	0,06	0,08	0,12	-
<b>Rafoksanid</b>	0,03	0,06	0,09	0,12	0,18	-

Standard razine 3 se priprema u svakoj analizi kao kontrola stabilnosti metode i sustava LC-MS/MS-a.

#### 3.4.5 Priprema obogaćenog materijala za provjeru iskorištenja

U svakoj analizi priprema se kontrola iskorištenja na način da se materijal obogati na koncentracijsku razinu pri postavljenom MRL-u.

U tri slijepa uzorka dodati redom 25, 50 i 75  $\mu\text{L}$  otopine RS-ANTIPAR-S2 kako bi se postigli maseni udjeli analita u uzorku kako je prikazano u Tablici 5.

U svrhu provođenja validacije uzorke je potrebno obogatiti na slijedeće koncentracijske razine:

##### *Određivanje prve razine validacije $C_0$*

$C_0$  je minimalna koncentracija pri kojoj metoda daje kvalitativne i kvantitativne rezultate.

##### *Određivanje razina validacije*

Postoje 3 razine validacije ovisno o tome da li je za supstancu postavljen MRL, MRPL ili je zabranjen.

U ovoj analizi za supstancu je postavljena MRL vrijednost jednaka za sve životinjske vrste, stoga se određuju:

- C<sub>0</sub>
- 0,5 MRL- ta razina može predstavljati C<sub>0</sub>
- 1 MRL
- 1,5 MRL

Tablica 6. Obogaćenje matriksa mišića pri C<sub>0</sub>, ½ MRL, MRL i 1,5 MRL

	Volumen otopine RS-ANTIPAR-MIŠ-S2 Obogaćenje uzorka od 1g				
	MRL (µg kg <sup>-1</sup> )	C <sub>0</sub> (µg kg <sup>-1</sup> )	½ MRL M1 (µg kg <sup>-1</sup> )	MRL M2 (µg kg <sup>-1</sup> )	1,5 MRL M3 (µg kg <sup>-1</sup> )
Antiparazitici					
<b>Oksiklozanid</b>	<b>20</b>	5	10	20	30
<b>Rafoksanid</b>	<b>30</b>	7,5	15	30	45

C<sub>0</sub>, M1, M2 i M3 predstavljaju 4 različite koncentracijske razine na koje su uzorci mišića obogaćeni.

### 3.5 POSTUPAK PRIPREME UZORAKA

#### 3.5.1 Pročišćavanje uzoraka

U svrhu pročišćavanja uzoraka, potrebno je odvagati 1 g uzorka (mišića) u epruvetu, dodati 50 µL radne otopine internog standarda (RS-ANTIPAR-IS2), 4 mL otopine za ekstrakciju (mješavina acetonitrila i acetona (3:2)) te sve skupa dobro protresti i miješati 30 minuta na rotacijskoj miješalici. Nakon toga, uzorke je potrebno centrifugirati 10 minuta pri 3600 g na sobnoj temperaturi. Gornju fazu (acetonitril + aceton) potrebno je prenijeti u novu epruvetu od 15 mL (koja sadrži 500 µl reakcijske vode i 50 µl 25 % otopine amonijaka) te dodati 2 mL n-heksana (za odmašćivanje) i miješati uzorke 10 minuta na rotacijskoj miješalici. Uzorci se zatim ponovo centrifugiraju na sobnoj temperaturi 10 minuta pri 3600 g nakon čega se supernatant (n-heksan) usisa i baci. Dobiveni ekstrakt se potom otpari do manje od 0,9 g na 40 °C te se doda 4 mL 1,25 % amonijaka pripremljenog u vodi.

### 3.5.2 SPE ekstrakcija

Pročišćavanje uzoraka se provodi na SPE kolonama (Oasis PRiME HLB), bez vakuma. Punilo u kolonama je najprije potrebno aktivirati s 2 mL mješavine acetonitrila i acetona (3:2) te dodati 2 mL 1,25 % otopine amonijaka nakon čega se na kolonice iz epruveta kvantitativno prenese uzorak ekstrakta. Kolone se zatim ispiru s 3 mL 1,25 % otopine amonijaka i 3 mL vode te se suše 30 minuta na 600 mbara nakon čega se analit eluira u epruvete 3 puta s po 3 mL mješavine acetonitrila i acetona (3:2). Nakon eluacije u uzorak se dodaje 200  $\mu$ L 10 % otopine glicerola (za zakiseljavanje) te se vorteksira. Uzorak se zatim nježno upari do suha u struji dušika pri 40 °C, a zaostatak je potrebno otopiti s 230  $\mu$ L mješavine acetonitrila i acetona (3:2), zatvoriti, miješati na vorteksu, dodati 250  $\mu$ L vode, vorteksirati i otopiti dodatno u ultrazvučnoj kupelji 5 minuta. Nakon toga, sadržaj se prebacuje u plastične mikroeprovete (Eppendorfice) koje se onda ultracentrifugiraju pri 15000 rpm, sadržaj se potom prebacuje u HPLC bočice (viale) te je spreman za injektiranje.



Slika 5. Pročišćavanje uzoraka na SPE kolonama Oasis PRiME HLB (vlastita fotografija)

### 3.6 MJERENJE NA LC-MS/MS UREĐAJU

Instrumentalna analiza se provodi na instrumentu oznake I-2 053, MassHunter Acquisition *software*.



Injektiranje uzoraka za validaciju treba biti prema sljedećem rasporedu:

- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza
- Standardna kalibracijska krivulja
- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza
- Slijepi uzorci različitih životinjskih vrsta
- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza
- Uzorci 1. konc.razine (ponovljivost)
- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza
- Uzorci 2. konc.razine (ponovljivost)
- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza
- Uzorci 3. konc.razine (ponovljivost)
- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza
- Uzorci 4. konc.razine (ponovljivost)
- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza
- Standardna kalibracijska krivulja
- Slijepi kontrolni uzorak → mobilna faza

### 3.6.1 Kromatografski uvjeti

Odvajanje se izvodi na koloni Xbridge C18 2,1 x 150mm, 3,5 $\mu$ m, Waters, pri 50 °C.

Mobilna faza se sastoji od otopine (A) 0,3 % mravlja kiselina (pH= 3,5) i otopine (B) acetonitril. Analiza tekućinske kromatografije provodi se gradijentnom eluacijom, što znači da se udio mobilne faze B postupno povećava kako bi se analiti eluirali, a onda se ponovo vraća na početne parametre kako bi se kolona stabilizirala kako je i prikazano u Tablici 7.:

Tablica 7. Gradijent kromatografske analize

Vrijeme (min)	% B
0	50
10	100
12	100
13	50
20	50

Protok mobilne faze je 0,3 mL min<sup>-1</sup>.

Vrijeme jedne kromatografske analize je 20 minuta, te se kolona stabilizira dodatnih 3 minute protokom mobilne faze u početnom stanju.

Kolona treba biti termostatirana na 50 °C.

Volumen injektiranja je 20 µL za mišić uz ispiranje (mješavinom metanola, acetonitrila, izopropanola i vode) igle u poziciji za pranje (*FlushPort*) kroz 5 sek.

### 3.6.2 Uvjeti masene spektrometrije

Ionske tranzicije snimaju se MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) tipom skeniranja, snimanje jednog prekursora s dvije tranzicije u produkt ione ili 2 prekursora, svaki s jednom tranzicijom, te su navedene u Tablici 8. zajedno sa naponom fragmentatora i kolizijskom energijom. U Tablici 9. navedeni su parametri izvora koji utječu na proces ionizacije i prijenos iona kroz maseni analizator.

Tablica 8. Parametri procesa ionizacije i prijenos iona

Tvar	Segment	ISTD	Ion prekursor	Ion produkt	Fragmentor (V)	Kolizijska energija CE (eV)
Oksiklozanid	1	Oksikloz-13C6	400	<u>382</u> 364	190	20 20
Rafoksanid	2	Rafoks-13C6	624	<u>345</u> 127	210	35 50
Oksiklozanid-13C6	1	-	406	<u>370</u>	190	20
Rafoksanid-13C6	2	-	630	<u>351</u>	210	35

Najzastupljenija tranzicija je podcrtana i pomoću nje se provodi kvantifikacija.

Tablica 9. Parametri izvora

Parametar	Segment 1 i 2
Temperatura plina	150 °C
Protok plina	5 L min <sup>-1</sup>
Nebulizer (tlak)	45 psi
Napon kapilare	4000 V

Prije početka instrumentalne analize provodi se optimizacija kolone protokom mobilne faze kroz pola sata, dok na trenutnom prikazu stanja linija tlaka pumpe ne postane stabilna, a struja unutar kapilare (*Capillary Current*) ne postigne konstantnost pri  $40 \pm 5$  nA.

### 3.7 KVALITATIVNA PROCJENA

Kvalitativna procjena glede prisutnosti određenog analita, utvrđena analizom LC-MS/MS, izvodi se usporedbom retencijskih vremena (RT) pikova eventualno prisutnih u otopini uzorka. U slijepom kontrolnom uzorku, negativnom kontrolnom uzorku otapala i negativnom kontrolnom uzorku matriksa ne smiju biti prisutni pikovi koji su u području retencije analita  $RT \pm 2,5$  %.

U slučaju kada se u otopini uzorka ne pojave pikovi koji posjeduju RT usporedivi s retencijom analita iz kalibracije, uzimajući kao interval pouzdanosti vrijednosti  $\pm 2,5$  %, uzorak se smatra negativnim, a rezultat se prikazuje kao sukladan.

U slučaju da postoji sukladnost između RT-a, potrebno je procijeniti prisutnost iona prekursora ili iona produkta karakterističnih za taj analit analize.

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

$$R = \frac{An2}{An1} \times 100$$

gdje je:

An1 - površina ionske tranzicije intenzivnijeg iona u otopini uzorka;

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

Ionski odnos dobiven za otopine uzorka mora biti uspoređen sa ionskim odnosom matriks kalibracijske krivulje.

Izračunati devijaciju ionskog odnosa  $\Delta R$  sa slijedećom formulom:

$$\Delta R = \frac{R \text{ uzorka} - R \text{ kal. uz.}}{R \text{ kal. uz.}} \times 100$$

gdje je:

R uzorka - ionski odnos 1° i 2° tranzicije analita u otopini uzorka;

R kal.uz. - ionski odnos 1° i 2° tranzicije analita u otopini uzoraka matriks kalibracijske krivulje.

Odnos izmjerenih intenziteta iona produkata mora odgovarati uvjetima prikazanim u Tablici 10.

Tablica 10. Maksimalna dozvoljena odstupanja relativnih intenziteta

Relativni intenzitet (% baznog pika)	LC-MS <sup>n</sup>
> 50 %	± 20 %
od 20 % do 50 %	± 25 %
od 10 % do 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

Navedeni kvalitativni parametri prate se i uz pomoć računalnog programa instrumenta MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.03.01.

### 3.8 KVANTITATIVNA PROCJENA

Za kvantitativnu procjenu potrebno je rezultate proračunati s kalibracijske krivulje otapala, što uključuje potrebu izražavanja rezultata uz korekciju iskorištenja internog standarda. Kalibracijska krivulja je grafički prikaz odnosa relativnog odgovora (engl. *Relative response*) izmjerene površine analita i odgovarajućeg internog standarda i teoretske koncentracije kalibracijske točke te uključuje i točku T(0,0). U slučaju nedostupnosti internog standarda, kalibraciju je potrebno provesti pomoću matriks kalibracijske krivulje.

Proračun rezultata se izvodi pomoću računalnog programa instrumenta MassHunter Quantitative analysis for QQQ version B.04.00 koji preračunava koncentracije ispitnih uzoraka prema dobivenoj kalibracijskoj krivulji.

Ukoliko se ne koristi navedeni program potrebno je:

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

$$R_{\text{fin}} = \frac{A_n^1 * c_{\text{istd}}}{A_{\text{istd}}^1 * c_n}$$

gdje je:

$A_n^1$  - površina pika najzastupljenije tranzicije standarda

$c_n$  – koncentracija standarda u matriks kalibraciji

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

$c_{istd}$  – koncentracija internog standarda u matriks kalibraciji

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

$$CV\% = \frac{SD_{RFn}}{RF_n} \times 100$$

gdje je:

$SD_{RFn}$  – standardna devijacija RF vrijednosti za standarde

$RF_n$  – srednja vrijednost RF za standarde

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

Izračunati koncentraciju analita  $C_n$  u otopini uzorka izražena u  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) s navedenom formulom:

$$C_n = \frac{c_{istd} * A_n^1}{A_{istd}^1 * \overline{RF}_n}$$

gdje je:

$A_n^1$  - površina pika najzastupljenije tranzicije standarda

$c_n$  – koncentracija analita u uzorku

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

$c_{istd}$  – koncentracija internog standarda u uzorku

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

Faktor koncentriranja uzoraka  $f$  za uzorke mišića:  $f = 0,5$

Za koncentracije analita izvan kalibracijskog područja potrebno je izvesti produljenje krivulje umjeravanja kako bi uvjeti lineariteta bili zadovoljeni, ili razrijediti uzorak u dano područje linearnosti.

Izraziti konačan rezultat u  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Za pozitivne uzorke na analit, potrebno je izvesti najmanje dvije analize, prikazujući konačan rezultat kao srednju vrijednost pojedinih rezultata.

Rezultat analize se smatra pozitivan ukoliko je koncentracija premašila graničnu koncentraciju analita  $CC\alpha$  (engl. *Decision limit*), dok se rezultat analize smatra negativan ukoliko koncentracija nije premašila graničnu koncentraciju analita  $CC\alpha$ .

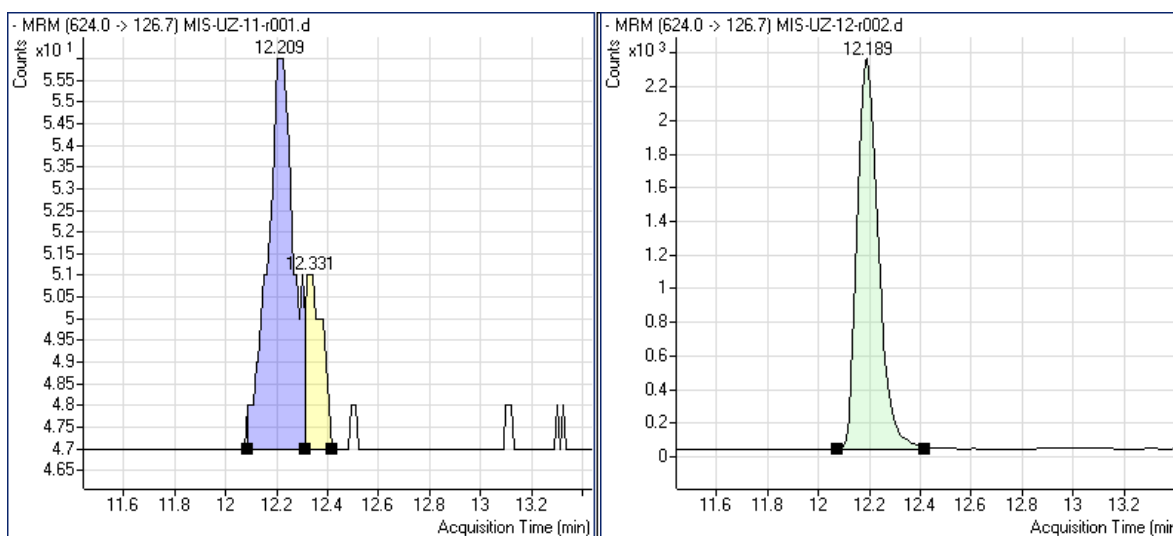
Mjerna nesigurnost je već uračunata u  $CC\alpha$  vrijednost te ju je potrebno izražavati samo ukoliko je to izrazito traženo od strane vanjske osobe (Analitička metoda, 2018).

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 SPECIFIČNOST

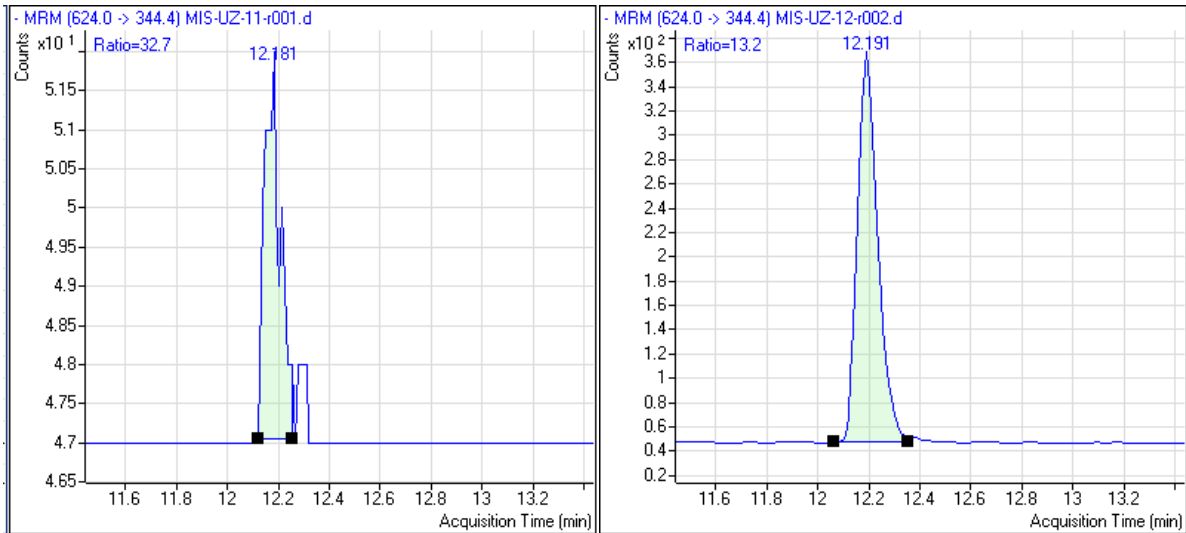
Za analitičke metode je važna sposobnost razlučivanja između analita i njima srodnih tvari te je stoga nužno provesti analizu odgovarajućeg broja reprezentativnih slijepih uzoraka ( $n \geq 20$ ) te provjeriti interferencije (signale, pikove, tragove iona) u području u kojemu očekujemo otpuštanje dokazivanog analita.

U svrhu utvrđivanja specifičnosti, analizirani su slijepi matriks uzorci mišića (uzorci koji ne sadrže zaostatke ispitivanih analita) te se na kromatogramima pratila pojava mogućih pikova proizašlih od matriksa koji bi mogli biti na mjestu analita tj. interferirati s pikom analita. Potrebno je utvrditi je li metoda sposobna razlučiti pozitivne od negativnih uzoraka. U tu svrhu su uspoređeni kromatogrami analize rafoksanida i oksiklozanida u slijepom i obogaćenom uzorku.

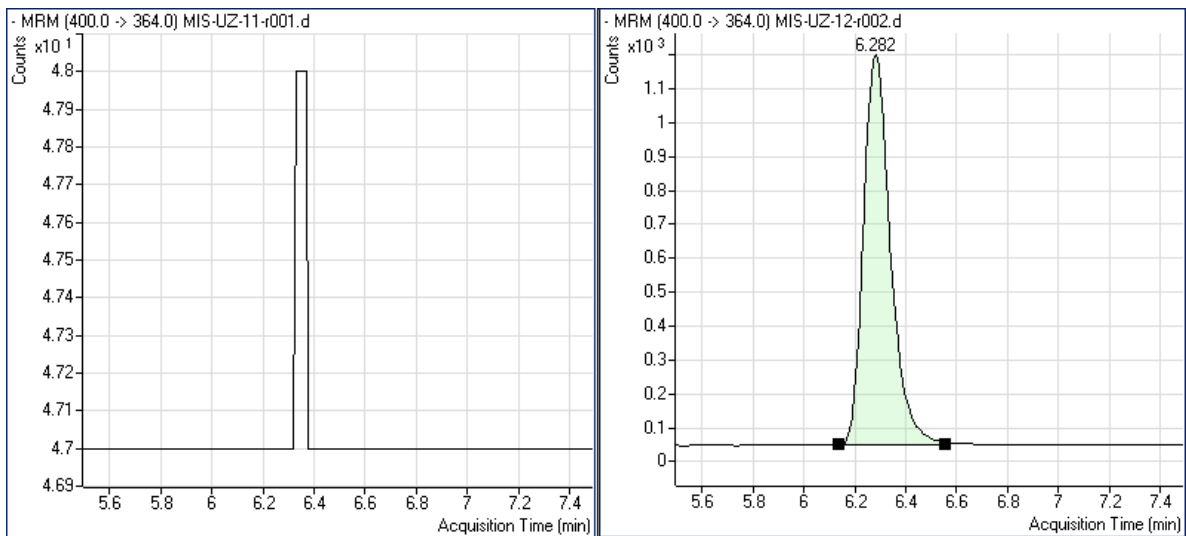


Slika 6. Prikaz kromatograma rafoksanida slijepi uzorak i uzorak obogaćen na MRL vrijednost (1. tranzicija)

Na kromatogramu slijepog uzorka rafoksanida prisutan je šum što se vidi iz izmjerene omjera signal-šum u vremenskom intervalu u kojem se očekuje analit, a koji iznosi  $S/N = 6,51$ . Prema analitičkoj praksi laboratorija, svi pikovi koji su ispod  $S/N = 10$  se ne integriraju.

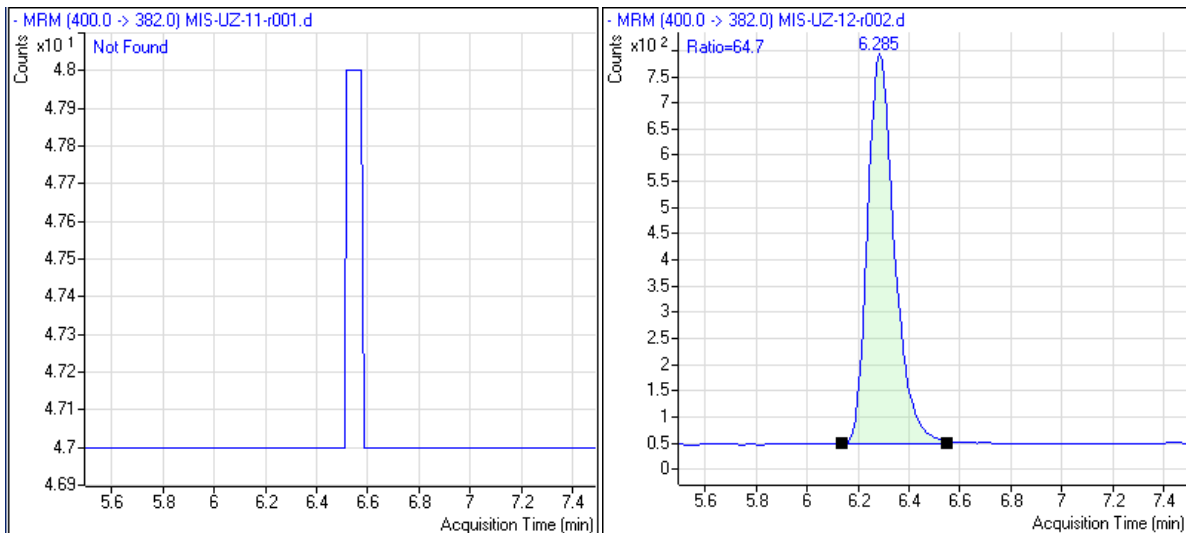


Slika 7. Prikaz kromatograma rafoksanida slijepi uzorak i uzorak obogaćen na MRL vrijednost (2. tranzicija)



Slika 8. Prikaz kromatograma oksiklozanida slijepi uzorak i uzorak obogaćen na MRL vrijednost (1. tranzicija)





Slika 9. Prikaz kromatograma oksiklozanida slijepi uzorak i uzorak obogaćen na MRL vrijednost (2. tranzicija)

Analizirano je 20 slijepih uzoraka te niti u jednom uzorku nisu detektirani pikovi koji bi mogli interferirati s pikovima analita. Slijepi uzorci ne sadrže pikove u vremenu zadržavanja specifičnom za rafoksanid i oksiklozanid, dok obogaćeni uzorci sadrže. Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da je metoda sposobna razlučiti pozitivne od negativnih uzoraka, odnosno da je specifična.

Kinsella i suradnici su u svom istraživanju (2009) LC-MS/MS metodom analizirali 20 slijepih uzoraka mlijeka i jetre te su ustvrdili da slijepi uzorci ne sadrže pikove u vremenu zadržavanja specifičnom za ispitivane analite rafoksanid i oksiklozanid, čime su dokazali specifičnost metode te sukladnost rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (Kinsella i sur., 2009).

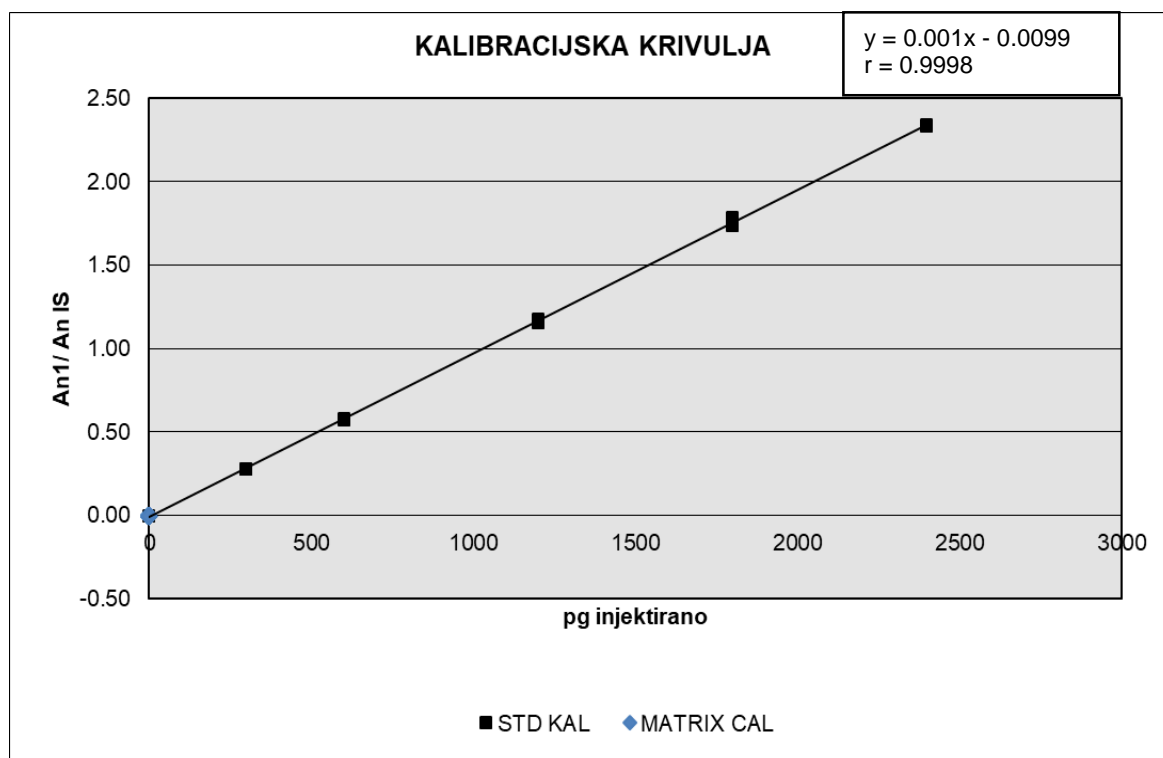
## 4.2 LINEARNOST KALIBRACIJSKE KRIVULJE

Definicija opsega linearnosti je sredstvo za testiranje odgovora instrumenta u području određivanja. Kalibracijske krivulje u otapalu se izračunavaju linearnom regresijom ovisnosti omjera površina pikova analita i internog standarda ( $A_{n1}/A_{nIS}$ ) i inicijalne mase injektiranog analita (pg).

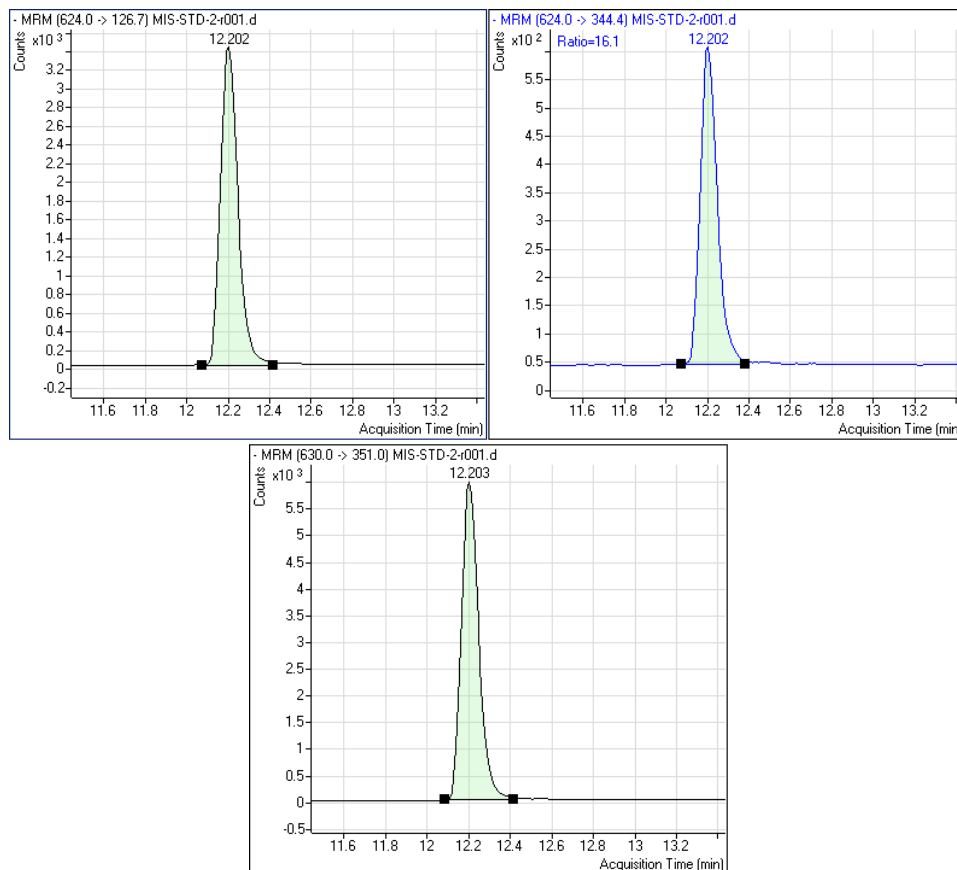
Tablica 11. Prikaz faktora linearnosti za mišić

Analit	r	k	l	RT ± 2,5 % (min)			IR ± 20 %		
				min RT	RT	max RT	min IR	IR	max IR
Oksiklozanid	0,9999	0,0008	0,0003	6,32	6,48	6,64	0,58	0,72	0,86
Rafoksanid	0,9998	0,001	-0,0099	12,16	12,47	12,78	0,26	0,33	0,39

Iz kalibracijskih krivulja je vidljiva linearna ovisnost koncentracije analita u uzorku i omjera površine pika analita i internog standarda s koeficijentom korelacije r od 0,9998 za rafoksanid, odnosno 0,9999 za oksiklozanid.



Slika 10. Kalibracijska krivulja otapala – rafoksanid

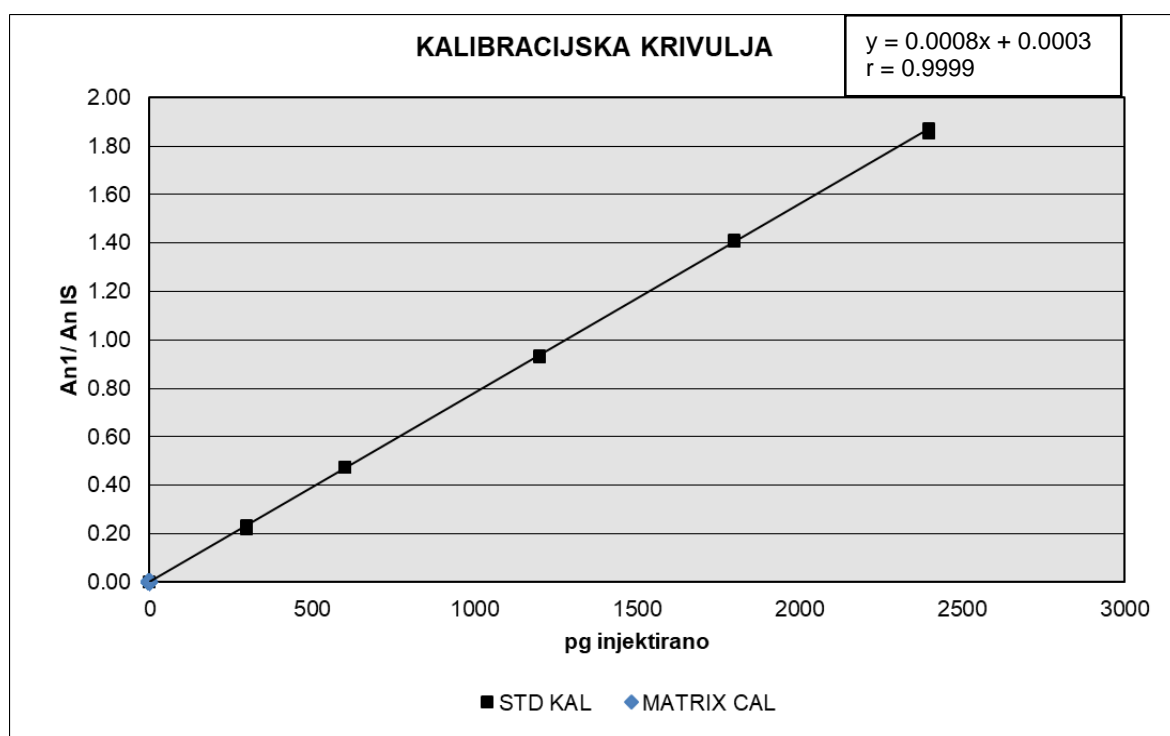


Slika 11. Kromatogrami prve tranzicije, druge tranzicije i internog standarda za srednju točku – rafoksanid

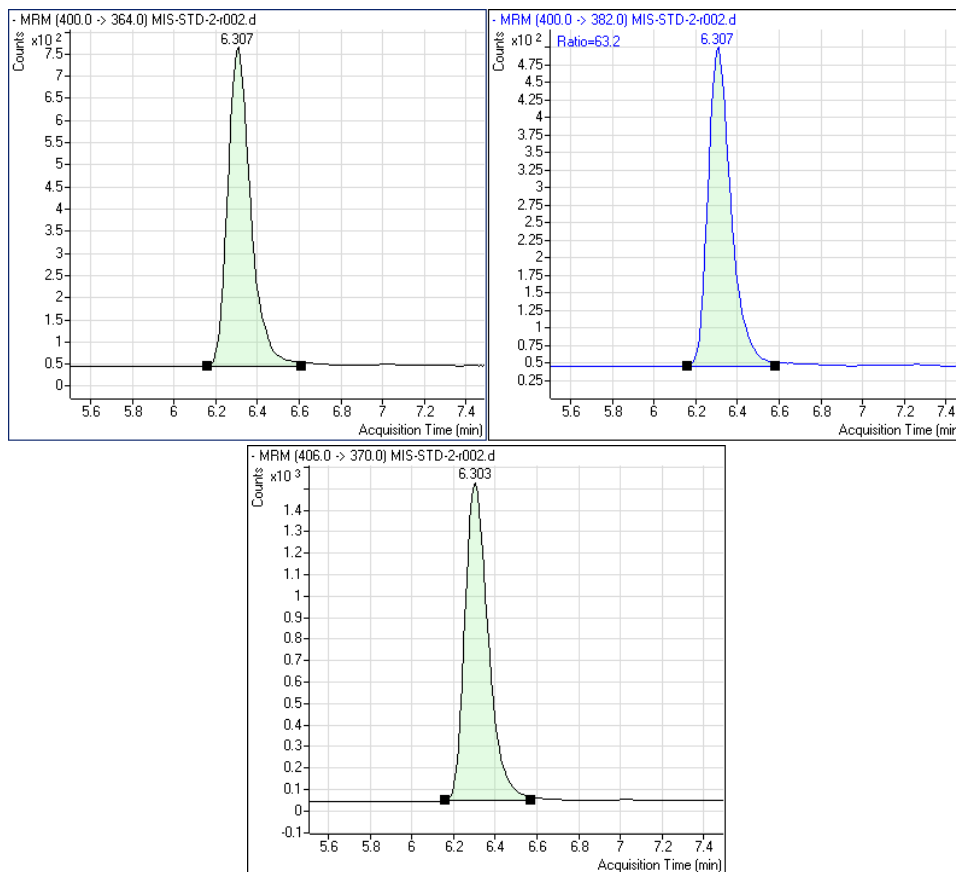
Svaka analiza mora imati kontrolni uzorak stanja instrumenta i stabilnosti standardnih otopina zbog čega se priprema kalibracijska krivulja na otapalu (Slika 10). U redovnim analizama srednja točka se uzima kao kontrola odziva standarda da se vidi stabilnost standarda ili kao provjera osjetljivosti instrumenta ili slično.

Tablica 12. Podaci uzeti za izračun kalibracijske krivulje otapala – rafoksanid

Rafoksanid rezultati				Qualifier (624.0 → 344.4) rezultati		Rafoksanid 13C6 (ISTD) rezultati	
RT	Konačna konc.	Površina	S/N	IR	Površina	RT	Površina
12.48	34.49	8311.05	52.21	31.28	2599.28	12.48	17699.07
12.47	34.59	7216.21	46.52	31.30	2258.85	12.47	15283.86
12.48	56.76	12623.36	50.69	30.67	3872.10	12.47	12707.07
12.50	59.26	13433.64	60.29	33.90	4553.77	12.49	12767.11
12.50	89.54	16003.39	95.00	34.18	5469.71	12.49	9069.12
12.49	91.62	15465.25	35.30	34.96	5405.90	12.48	8528.59
12.49	122.41	18656.65	40.88	34.54	6444.83	12.48	7352.27
12.49	121.11	17997.71	45.03	31.54	5676.79	12.48	7179.01
12.49	190.60	22757.28	104.48	32.06	7297.06	12.45	5494.84
12.48	177.77	21418.08	32.57	31.62	6772.79	12.44	5578.08



Slika 12. Kalibracijska krivulja otapala – oksiklozanid



Slika 13. Kromatogrami prve tranzicije, druge tranzicije i internog standarda za srednju točku – oksiklozanid

Tablica 13. Podaci uzeti za izračun kalibracijske krivulje otapala - oksiklozanid

Oksiklozanid rezultati				Qualifier (400.0 → 382.0) rezultati		Oksiklozanid 13C6 (ISTD) rezultati	
RT	Konačna konc.	Površina	S/N	IR	Površina	RT	Površina
6.49	19.19	2670.01	65.91	76.25	2035.97	6.49	7446.04
6.47	19.15	2505.64	71.18	77.63	1945.19	6.47	7002.62
6.48	40.51	4953.46	75.01	78.81	3903.60	6.48	6649.94
6.50	40.65	6011.12	86.40	73.82	4437.39	6.50	8043.98
6.51	60.93	7927.88	57.02	70.48	5587.62	6.51	7111.50
6.49	60.84	7715.18	52.51	69.80	5384.82	6.49	6931.01
6.48	79.76	9805.68	50.16	68.57	6723.41	6.48	6734.41
6.46	81.63	9472.75	50.00	70.39	6667.41	6.47	6358.46
6.46	118.60	13424.76	58.36	67.09	9006.56	6.46	6216.06
6.46	118.49	13159.37	52.29	66.79	8789.09	6.46	6098.41

Ioni nabijene molekule analita se ioniziraju u ionskom izvoru te se unutar kolizijske ćelije raspadaju na svoje specifične fragmente koji onda služe za kvantifikaciju. Prema odluci Komisije 2002/657/EZ, relativna zastupljenost dokazanih iona, izražena kao omjer zastupljenijeg iona An1 (quantifier) prema manje zastupljenom An2 (qualifier), mora odgovarati zastupljenosti istih kod baždarnog standarda, zbog čega je i bilo potrebno utvrditi ionski odnos u standardnoj kalibraciji, uz tolerancije prikazane u Tablici 10.

Omjer dvaju produkt iona analita IR (Ion Ratio), odnosno fragmenata analita An2/An1 mora biti uvijek približno jednak bez obzira na koncentraciju analita. Usporedbom relativnih intenziteta obogaćenih uzoraka (Tablice 14., 15. i 16.) s njihovim baždarnim standardom (Tablica 11.) može se vidjeti da se većina uzoraka nalazi unutar datog raspona odstupanja od  $\pm 20\%$  što potvrđuje prisutnost ispitivanog analita te dokazuje dobro izmjereni rezultat. Dobivene tranzicije su postojane i takve tranzicije i takvi ionski odnosi moraju biti zastupljeni i u uzorcima da bi se rezultat prihvatio ukoliko uzorak sadrži analit.

Prema odluci Komisije 2002/657/EZ omjer između kromatografskog vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja unutarnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora odgovarati vremenu zadržavanja baždarne otopine uz toleranciju od  $\pm 2,5\%$  za LC.

Usporedbom retencijskih vremena obogaćenih uzoraka rafoksanida i oksiklozanida (Tablice 14., 15. i 16.) s retencijskim vremenima njihovih baždarnih otopina (Tablica 11.) može se vidjeti da se većina uzoraka nalazi unutar datog raspona odstupanja od  $\pm 2,5\%$ . Takva retencijska vremena moraju biti zastupljena i u uzorcima da bi se rezultat prihvatio ukoliko uzorak sadrži analit.

Tijekom procesa validacije analizirano je 6 uzoraka mesa na 4 različite koncentracijske razine tijekom 3 dana te je obogaćenjem tih 18 uzoraka također utvrđena zadovoljavajuća linearnost što se iz matriks kalibracijskih krivulja za oksiklozanid i rafoksanid može i vidjeti (Slika 14. i 15.)

Kinsella i suradnici su u svom istraživanju (2009) LC-MS/MS metodom na uzorcima mlijeka i jetre dokazali linearnost pomoću matriks kalibracijske krivulje uz vrijednost koeficijenta korelacije  $r$  većim od 0,99 za oba analita te su dobiveni rezultati zadovoljavajući i u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (Kinsella i sur., 2009).

Također, usporedbom retencijskih vremena kao i ionskih odnosa obogaćenih uzoraka s njihovim standardima, Kinsella i suradnici su dobili rezultate unutar zakonski propisanih raspona uz toleranciju odstupanja od  $\pm 2,5\%$  za retencijska vremena, odnosno  $\pm 20\%$  za ionske odnose. Njihovi rezultati u skladu su s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, HPLC-MS/MS metodom (Kinsella i sur., 2009).

Tablica 14. Prikaz relativnih intenziteta i retencijskih vremena 1. analize

Razina	Oksiklozanid rezultati	Qualifier (400.0 → 382.0) rezultati		Rafoksanid rezultati	Qualifier (624.0 → 344.4) rezultati	
	Konačna koncentracija	IR	RT	Konačna koncentracija	IR	RT
C <sub>0</sub>	4.44	66.22	6.42	14.07	31.28	12.45
	4.45	65.96	6.44	13.84	31.87	12.45
	4.74	69.64	6.45	14.57	31.47	12.46
	4.87	66.46	6.43	14.40	33.21	12.45
	4.98	67.07	6.43	15.03	31.35	12.43
	4.98	68.05	6.43	15.06	31.99	12.44
	4.74	70.20	6.42	15.05	32.84	12.43
	5.00	65.61	6.40	15.16	31.71	12.43
	4.65	69.87	6.42	15.12	33.34	12.42
	4.66	65.86	6.40	15.46	32.67	12.43
	4.52	65.14	6.41	15.57	32.20	12.41
	4.46	70.61	6.41	15.43	33.13	12.41
M1	9.09	68.51	6.41	23.25	32.86	12.42
	9.26	69.68	6.40	23.47	32.79	12.42
	9.32	68.33	6.40	23.73	32.22	12.41
	9.39	67.97	6.39	23.90	32.75	12.41
	9.11	70.09	6.40	24.81	32.90	12.41
	8.94	70.53	6.40	24.70	32.29	12.41
	9.33	69.70	6.40	24.52	31.67	12.41
	9.05	69.46	6.39	24.99	33.14	12.41
	9.23	65.25	6.40	24.64	33.81	12.41
	9.00	70.58	6.39	24.84	32.34	12.40
	9.00	69.74	6.40	25.33	32.85	12.40
	9.21	67.94	6.40	25.18	32.92	12.41
M2	18.16	71.12	6.38	43.93	32.26	12.40
	18.26	69.96	6.38	44.16	33.39	12.40
	17.90	71.71	6.38	44.23	32.17	12.40
	17.48	70.76	6.38	44.54	32.08	12.37
	18.88	68.11	6.39	45.36	33.00	12.36
	18.69	69.87	6.38	46.09	33.58	12.36
	18.08	72.27	6.37	44.96	33.49	12.35
	17.67	71.71	6.38	45.38	33.76	12.36
	16.44	72.11	6.37	45.47	33.69	12.35
	16.95	68.72	6.38	45.37	33.31	12.34
	18.17	71.93	6.36	45.07	33.00	12.35
	17.94	72.56	6.37	44.92	33.15	12.34
M3	27.55	69.26	6.38	63.31	32.88	12.35
	30.42	84.08	6.37	44.54	33.04	12.39
	30.10	87.16	6.39	42.49	33.09	12.40
	29.95	88.06	6.40	41.32	32.78	12.41
	30.77	90.45	6.41	40.63	31.77	12.43
	30.59	88.84	6.44	43.54	33.38	12.46
	29.27	83.56	6.45	48.30	33.83	12.46
	28.89	81.85	6.44	51.34	32.15	12.46
28.43	80.99	6.41	52.94	32.70	12.45	

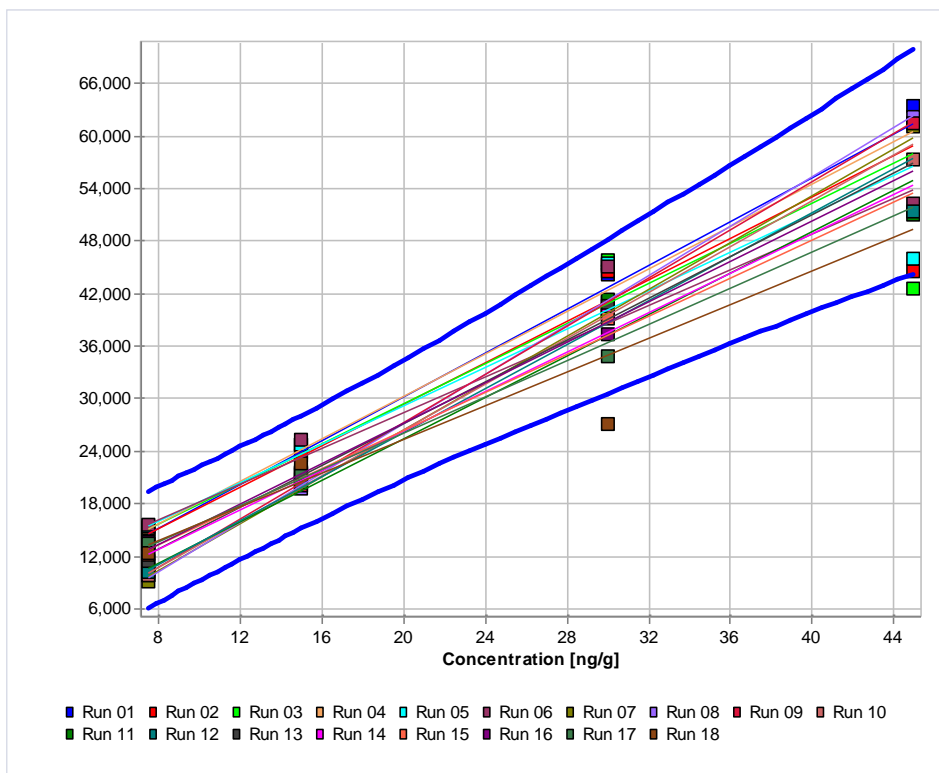


Tablica 15. Prikaz relativnih intenziteta i retencijskih vremena 2. analize

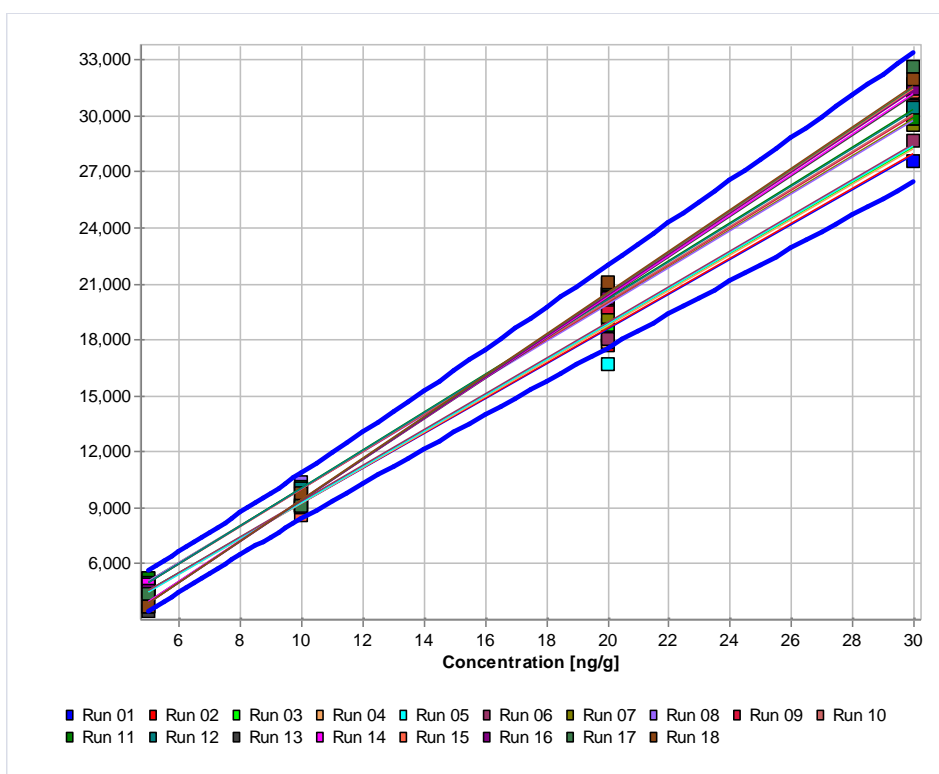
Razina	Oksiklozanid rezultati	Qualifier (400.0 → 382.0) rezultati		Rafoksanid rezultati	Qualifier (624.0 → 344.4) rezultati	
	Konačna koncentracija	IR	RT	Konačna koncentracija	IR	RT
C <sub>0</sub>	4.86	79.73	6.43	8.75	34.74	12.44
	4.99	75.76	6.44	9.41	33.89	12.43
	5.24	74.72	6.44	10.42	33.90	12.43
	5.18	77.93	6.43	10.58	33.40	12.43
	5.04	72.90	6.43	9.75	34.87	12.42
	4.97	76.65	6.43	9.93	33.12	12.43
	5.03	75.10	6.42	9.89	31.74	12.42
	4.88	78.39	6.41	9.80	33.15	12.41
	5.23	72.70	6.41	11.05	32.16	12.39
	5.15	81.49	6.39	10.58	33.38	12.39
	5.26	69.83	6.41	10.31	34.57	12.40
	4.67	83.63	6.39	9.95	33.76	12.40
	M1	10.24	76.56	6.40	20.08	33.95
9.77		78.19	6.40	19.98	34.30	12.41
10.11		80.63	6.39	19.44	31.31	12.39
10.58		77.88	6.40	20.05	30.62	12.40
9.99		80.12	6.40	19.82	30.70	12.39
10.03		80.48	6.39	20.31	32.79	12.39
9.85		82.95	6.40	21.22	32.96	12.38
9.94		81.82	6.40	20.20	33.76	12.38
10.02		76.61	6.40	20.06	33.03	12.38
10.09		81.01	6.40	20.83	34.15	12.39
10.09		81.22	6.39	20.55	33.37	12.37
9.94		81.71	6.40	20.32	33.00	12.35
M2		19.25	82.26	6.40	39.58	32.17
	19.08	84.44	6.39	39.56	31.18	12.38
	19.49	84.18	6.40	40.43	30.63	12.37
	20.21	82.38	6.40	40.06	31.61	12.37
	19.83	84.82	6.38	40.40	31.56	12.35
	19.63	84.33	6.39	41.71	32.18	12.37
	20.69	81.68	6.39	41.34	31.11	12.36
	20.07	86.86	6.38	40.46	31.99	12.36
	20.23	82.32	6.38	41.50	31.59	12.37
	20.59	82.15	6.38	40.93	31.23	12.35
	20.25	83.05	6.39	40.07	31.40	12.35
	20.75	79.74	6.39	39.56	31.42	12.37
	M3	29.41	81.24	6.39	61.47	31.18
29.63		81.58	6.40	60.43	31.44	12.37
29.72		82.88	6.40	62.72	30.50	12.38
29.97		86.61	6.38	61.53	30.32	12.37
29.89		84.84	6.39	62.35	30.32	12.32
30.25		83.48	6.38	60.43	32.14	12.33
29.75		90.70	6.37	57.84	31.84	12.33
31.26		90.20	6.38	56.49	32.30	12.33
29.85		93.73	6.39	52.82	31.88	12.36
29.79		93.42	6.38	48.88	33.18	12.37
29.95		95.24	6.39	51.41	32.28	12.38
30.93		93.53	6.40	51.13	32.36	12.38

Tablica 16. Prikaz relativnih intenziteta i retencijskih vremena 3. analize

Razina	Oksiklozanid rezultati	Qualifier (400.0 → 382.0) rezultati		Rafoksamid rezultati	Qualifier (624.0 → 344.4) rezultati	
	Konačna koncentracija	IR	RT	Konačna koncentracija	IR	RT
C <sub>0</sub>	3.49	76.39	6.42	11.43	33.29	12.35
	3.38	79.52	6.42	11.52	32.09	12.33
	4.85	75.90	6.41	13.35	32.80	12.33
	4.91	77.34	6.41	13.39	33.70	12.33
	3.83	75.68	6.41	12.09	31.63	12.32
	3.50	81.80	6.41	12.23	33.22	12.31
	4.56	82.08	6.40	13.42	31.02	12.31
	4.40	77.97	6.41	13.59	33.05	12.31
	4.47	72.70	6.39	13.23	33.03	12.30
	4.25	76.69	6.39	13.37	30.71	12.30
	3.51	76.61	6.39	12.48	30.98	12.31
	3.90	76.11	6.40	12.25	33.05	12.30
M1	9.20	78.07	6.40	21.09	33.84	12.30
	9.00	80.33	6.39	22.00	31.02	12.30
	9.13	79.47	6.39	21.51	32.73	12.30
	9.35	79.03	6.40	21.73	32.01	12.31
	8.80	80.36	6.39	21.33	32.09	12.29
	8.31	81.75	6.38	21.36	33.97	12.29
	8.94	79.96	6.39	21.28	32.37	12.28
	9.05	76.78	6.39	21.69	30.75	12.29
	9.36	81.79	6.38	21.52	32.08	12.29
	8.75	78.64	6.39	21.49	32.04	12.29
	9.51	81.06	6.38	22.52	33.46	12.28
	10.06	75.17	6.38	22.60	33.78	12.29
M2	20.22	82.16	6.39	40.53	32.10	12.29
	20.65	76.12	6.38	40.50	31.94	12.28
	19.79	80.07	6.38	40.23	32.61	12.29
	20.75	77.66	6.38	38.82	32.52	12.29
	20.11	76.43	6.38	38.83	31.88	12.29
	20.11	81.01	6.39	39.14	32.41	12.29
	19.88	82.22	6.39	37.60	32.04	12.29
	20.46	82.87	6.39	36.82	32.28	12.29
	20.59	82.13	6.39	37.49	32.58	12.29
	21.39	83.21	6.39	32.22	32.45	12.29
	20.90	91.55	6.41	27.65	31.72	12.31
	21.21	96.30	6.41	26.48	31.90	12.32
M3	31.70	101.31	6.47	36.11	31.24	12.39
	31.49	98.58	6.45	35.83	30.51	12.42
	31.22	101.08	6.46	36.22	30.78	12.42
	32.09	98.00	6.48	36.16	31.60	12.43
	31.38	102.42	6.48	34.63	31.63	12.43
	31.14	103.84	6.47	34.64	31.36	12.43
	31.33	103.92	6.48	34.71	30.64	12.42
	31.49	99.48	6.50	35.31	31.92	12.44
	32.51	99.38	6.50	36.99	33.08	12.42
	32.67	98.31	6.48	36.42	31.35	12.41
	32.15	100.78	6.48	35.43	32.10	12.42
	31.76	101.68	6.48	37.88	32.35	12.43



Slika 14. Matriks kalibracijska krivulja – rafoksanid



Slika 15. Matriks kalibracijska krivulja – oksiklozanid

### 4.3 PRECIZNOST (PONOVLJIVOST I UNUTARLABORATORIJSKA REPRODUCIBILNOST) I TOČNOST

Uzorci mesa (goveda, svinje i peradi) obogaćeni su na 4 različite koncentracije te po 18 ponavljanja na svakoj razini, što ukupno odgovara 72 testna uzorka. U Tablici 17. se nalaze rezultati preciznosti iskazani kao standardna devijacija. Standardna devijacija je mjera preciznosti analitičke metode i što je ona manja, metoda je preciznija.

Tablica 17. Rezultati preciznosti i točnosti za mišić

Analit	Obogaćenje ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	SD	CV	SD	CV	Iskorištenje (%)
		Ponovljivost ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ponovljivost (%)	(Unutarlab. reproduc.)	(Unutarlab. reproduc.) (%)	
Oksiklozanid	5	0,350	7,0	0,695	13,9	90,6
	10	0,459	4,6	0,730	7,3	96,0
	20	0,763	3,8	1,281	6,4	98,7
	30	1,095	3,7	1,998	6,7	99,6
<b>CV ukupni</b>					14,7	
Rafoksanid	7,5	0,694	9,3	2,260	30,1	169,2
	15	1,635	10,9	2,567	17,1	143,6
	30	3,590	12,0	3,816	12,7	130,9
	45	5,566	12,4	5,727	12,7	126,6
<b>CV ukupni</b>					30,9	

Prema odluci 2002/657/EZ za obogaćenja niža od  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  Horwitzova jednadžba daje neprihvatljivo visoke vrijednosti stoga CV za koncentracije niže od  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  moraju biti što je moguće manji.

Horwitzova jednadžba:

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

gdje je:

C maseni udio izražen kao potencija (eksponent) s bazom 10 (npr.  $1 \text{ mg g}^{-1} = 10^{-3}$ )

Tablica 18. Primjeri CV vrijednosti reproducibilnosti kvantitativnih metoda pri različitim rasponima frakcija masa.

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

Iz rezultata dobivenih statističkom obradom u Tablici 17. vidi se da preciznost kvantitativne metode zadovoljava uvjet da je ukupni CV manji od 23 % za oksiklozanid i da iznosi 14,7 %. Međutim, za rafoksanid ukupni CV iznosi 30,9 %. S obzirom da za najnižu koncentraciju od 7,5 ppb-a rafoksanida u mesu, CV iznosi 30,1 % logično da i ukupni CV premašuje vrijednost od 23 %. No, kako se radi o niskoj koncentraciji analita koja nije presudna za određivanje rafoksanida oko MRL vrijednosti, takva povišena vrijednost ne utječe na valjanost rezultata te se može zanemariti i izuzeti iz računanja ukupnog CV koji će onda zadovoljiti uvjet da bude manji od 23 %.

Tablica 19. Minimalna točnost kvantitativnih metoda

Koncentracija	Interval
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	od - 50 % do +20 %
od 1 $\mu\text{g/kg}$ do 10 $\mu\text{g/kg}$	od - 30 % do +10 %
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	od - 20 % do +10 %

Iz podataka prikazanih u Tablici 17. vidi se da rezultati dobiveni za oksiklozanid zadovoljavaju kriterij da za masene udjele od 1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  do 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  točnost kvantitativne metode mora biti unutar intervala -30 % do + 10 %, odnosno da za masene udjele veće ili jednake od 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , točnost kvantitativne metode mora biti unutar intervala -20 % do + 10 %.

Rezultati iskorištenja za rafoksanid su izvan granica za iskorištenje (70-110 % i 80-110 %). Iz toga bi se dalo zaključiti da imamo više analita nego što smo ga dodali, što je teoretski nemoguće. To može biti zbog matriksa koji pojačava signal iona unutar masenog spektrometra (odziv) na uređaju zbog čega su dobiveni rezultati iskorištenja malo veći. Navedeno odstupanje može se korigirati primjenom internog standarda na način da se njegovo iskorištenje uračunava u finalni rezultat.

U tablicama 20., 21., 22. i 23. vidljivi su podaci 3 analize koji su zatim obrađeni programom InterVal.

Tablica 20. Proračun preciznosti za oksiklozanid

		<b>C<sub>0</sub></b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
		5	10	20	30
<b>1. analiza</b>	Srednja vrijednost	4.709	9.160	17.884	29.440
	Standardna devijacija	0.215	0.112	0.694	0.900
	Koeficijent varijacije %	4.556	1.219	3.879	3.059
<b>2. analiza</b>	Srednja vrijednost	5.043	10.054	20.007	30.033
	Standardna devijacija	0.126	0.152	0.522	0.382
	Koeficijent varijacije %	2.499	1.512	2.607	1.273
<b>3. analiza</b>	Srednja vrijednost	4.085	9.122	20.506	31.744
	Standardna devijacija	0.566	0.399	0.416	0.476
	Koeficijent varijacije %	13.866	4.377	2.029	1.500

Tablica 21. Proračun unutarlaboratorijske reproducibilnosti za oksiklozanid

<b>Srednja vrijednost</b>	4.61	9.45	19.47	30.46	
<b>Standardna devijacija</b>	0.5285128	0.503729	1.28115	1.1537	
<b>Koeficijent varijacije %</b>	11.45924	5.33303	6.5815	3.7873	<b>CV ukupni</b>
					<b>14.745</b>

Tablica 22. Proračun preciznosti za rafoksanid

		<b>C<sub>0</sub></b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
		7.5	15	30	45
<b>1. analiza</b>	Srednja vrijednost	14.896	24.446	44.956	48.134
	Standardna devijacija	0.573	0.709	0.635	5.806
	Koeficijent varijacije %	3.847	2.900	1.413	12.061
<b>2. analiza</b>	Srednja vrijednost	10.035	20.238	40.465	57.292
	Standardna devijacija	0.603	0.351	0.689	5.125
	Koeficijent varijacije %	6.013	1.736	1.704	8.946
<b>3. analiza</b>	Srednja vrijednost	12.696	21.676	36.360	35.863
	Standardna devijacija	0.819	0.442	4.971	0.858
	Koeficijent varijacije %	6.450	2.037	13.672	2.394

Tablica 23. Proračun unutarlaboratorijske reproducibilnosti za rafoksanid

<b>Srednja vrijednost</b>	12.54	22.12	40.59	47.04	
<b>Standardna devijacija</b>	2.1406873	1.862863	4.53599	10.1734	
<b>Koeficijent varijacije %</b>	17.06809	8.42175	11.174	21.629	<b>CV ukupni</b>
					<b>30.9019</b>

U istraživanju koje su proveli Schneider i suradnici (2015) istom metodom HPLC-MS/MS na uzorcima mišića dobili su standardnu devijaciju ponovljivosti od 29 % za rafoksanid te 12 % za oksiklozanid, dok je standardna devijacija unutarlaboratorijske reproducibilnosti iznosila 33 % za rafoksanid i 40 % za oksiklozanid. Dobivena iskorištenja bila su 68 % za rafoksanid te 80 % za oksiklozanid. Rezultati preciznosti i iskorištenja koje su Schneider i suradnici dobili u svom istraživanju su niži od rezultata dobivenih u ovom istraživanju, što se može protumačiti odstupanjem rezultata trećeg dana validacije. S obzirom da se radi o multikomponentnoj metodi u kojoj je ispitivan 131 analit, uvjeti analize su bili optimizirani na tako veliki broj analita. Kako bi se postigli što precizniji rezultati bilo bi potrebno optimizirati uvjete za svaki pojedini analit, što je u ovom radu bilo neizvedivo te su napravljeni određeni kompromisi što se tiče optimalnih uvjeta analize (Schneider i sur., 2015).

Kinsella i suradnici su u svom istraživanju (2009) LC-MS/MS metodom za uzorke mlijeka dobili standardnu devijaciju ponovljivosti od 12 % za rafoksanid i 36 % za oksiklozanid, dok

je standardna devijacija unutarlaboratorijske reproducibilnosti iznosila 11 % za rafoksanid i 40 % za oksiklozanid. Rezultati preciznosti za oksiklozanid dobiveni od strane Kinsella i suradnika su znatno niži od rezultata dobivenih ovim istraživanjem te su izvan zakonski prihvatljivih vrijednosti. Dobivena iskorištenja bila su 66 % za rafoksanid i 115 % za oksiklozanid. Iskorištenje od svega 66 % za rafoksanid ukazuje na pojavu određenog gubitka ispitivanog analita tijekom pripreme uzoraka, no s obzirom na zadovoljavajuće rezultate ponovljivosti, takav rezultat smatra se zadovoljavajućim. Standardna devijacija ponovljivosti u uzorcima jetre iznosila je 17 % za rafoksanid i 16 % za oksiklozanid, dok je standardna devijacija unutarlaboratorijske reproducibilnosti iznosila 15 % za rafoksanid i 19 % za oksiklozanid. Dobivena iskorištenja bila su 86 % za rafoksanid i 106 % za oksiklozanid. Rezultati za uzorke mlijeka, koje su Kinsella i suradnici dobili u svom istraživanju, generalno su bolji od rezultata dobivenih za uzorke jetre, što je vjerojatno posljedica složenosti matriksa jetre. Rezultati dobiveni LC-MS/MS metodom od strane Kinsella i suradnika su po svim parametrima (osim po preciznosti za oksiklozanid) sukladni rezultatima dobivenim u ovom istraživanju HPLC-MS/MS metodom (Kinsella i sur., 2009).

Cooper i suradnici su proveli istraživanje (2012) UHPLC-MS/MS metodom na uzorcima mišića u kojoj su dobili standardnu devijaciju ponovljivosti od 11,3 % za rafoksanid i 12,5 % za oksiklozanid, dok je standardna devijacija unutarlaboratorijske reproducibilnosti iznosila 25,9 % za rafoksanid i 7 % za oksiklozanid. Dobivena iskorištenja bila su 72 % za rafoksanid i 73 % za oksiklozanid (uz korekciju internim standardom 101 % i 95 %). Rezultati standardne devijacije ponovljivosti i unutarlaboratorijske reproducibilnosti dobiveni od strane Cooper i suradnika su niži u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, dok su vrijednosti iskorištenja u obje metode vrlo visoke i zadovoljavajuće (Cooper i sur., 2012).

#### **4.4 ODREĐIVANJE GRANIČNE KONCENTRACIJE (KOLIČINE) ANALITA I SPOSOBNOSTI DOKAZIVANJA**

$CC_{\alpha}$  je koncentracija analita iznad koje možemo zaključiti da uzorak sadrži analit iznad njegove propisane MRL vrijednosti i to s vjerotnošću pogreške od 5% (Pravilnik, 2005).

Proračun za  $CC_{\alpha, MRL}$ :

- $CC_{\alpha} = MRL + 1,64 \cdot S_{r, MRL}$



gdje je:

$S_{r,MRL}$  - standardna devijacija reproducibilnosti pri MRL vrijednosti

$CC_{\beta}$  je parametar koji nam služi kao granična koncentracija za orijentacijske analize na osnovu koje zaključujemo da uzorak sadrži analit koji pretražujemo te ćemo pristupiti potvrdnoj metodi.

Proračun za  $CC_{\beta,MRL}$ :

$$\bullet \quad CC_{\beta MRL} = CC_{\alpha MRL} + 1,64 \cdot S_{r,CC_{\alpha MRL}}$$

gdje je:

$S_{r,CC_{\alpha MRL}}$  - standardna devijacija inter lab. reproducibilnosti pri  $CC_{\alpha,MRL}$

$CC_{\alpha}$  i  $CC_{\beta}$  su određeni pomoću InterVal računalnog programa koji kreira rezultate s obzirom na zadane parametre.

Tablica 24. Granične koncentracije analita  $CC_{\alpha}$  i sposobnosti dokazivanja  $CC_{\beta}$  određene za mišić

Analit	n	Razina	$CC_{\alpha}$	$CC_{\beta}$	Iskorištenje	
					[%]	Rel $s_R$ [%]
					pri $CC_{\alpha}$	pri $CC_{\alpha}$
Oksiklozanid	72	$C_0=5$	-	<b>7,1</b>	90,6	13,9
		<b>MRL=20</b>	<b>22,2</b>	24,8	98,7	6,4
Rafoksanid	65	$C_0=7,5$	-	<b>18,7</b>	169,2	30,1
		<b>MRL=30</b>	<b>37,4</b>	> 45,0	130,9	12,7

Za oksiklozanid  $CC_{\alpha}$  iznosi 22,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a za rafoksanid 37,4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  što znači da se za sve rezultate dobivene mjerenjem ovom metodom, a koji su iznad tih vrijednosti, može sa sigurnošću zaključiti da prelaze MRL vrijednost propisanu za oksiklozanid, odnosno rafoksanid.

Za oksiklozanid  $CC_{\beta}$  iznosi 7,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a za rafoksanid 18,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  što znači da je za sve uzorke, koji sadrže analit u koncentraciji koja prelazi te vrijednosti, potrebno ponoviti analizu.

U tablicama 25. i 26. vidljivi su podaci 3 analize koji su zatim obrađeni programom InterVal.

Kinsella i suradnici (2009) su LC-MS/MS postupkom u uzorcima mlijeka dobili CC $\alpha$  vrijednost od 14  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za rafoksamid i 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za oksiklozanid, dok je CC $\beta$  iznosila 17  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za rafoksamid i 31  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za oksiklozanid. U uzorcima jetre CC $\alpha$  je za rafoksamid iznosila 11  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a za oksiklozanid 623  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , dok je CC $\beta$  iznosila 13  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za rafoksamid i 746  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za oksiklozanid (Kinsella i sur., 2009).

Cooper i suradnici (2012) su UHPLC-MS/MS metodom dobili CC $\alpha$  za rafoksamid 1,72  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a za oksiklozanid 1,99  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , dok je CC $\beta$  iznosila 2,90  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za rafoksamid i 3,37  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za oksiklozanid. Dobivene vrijednosti prikazuju da je korištena metoda vrlo osjetljiva te ima mogućnosti detekcije vrlo niskih koncentracija analita u uzorku. Vrijednosti dobivene istraživanjem Cooper i suradnika su izrazito niske u usporedbi s vrijednostima dobivenima u ovom istraživanju, što otvara daljnje mogućnosti za unaprjeđenje metoda (Cooper i sur., 2012).

Unatoč tome, vrijednosti dobivene za CC $\alpha$  i CC $\beta$  ukazuju na dovoljnu osjetljivost metode da detektira analite pri njihovoj MRL vrijednosti što je dokazano postupcima validacije provedenima u ovom radu te da se može uspješno primjenjivati u rutinskom određivanju rafoksamida i oksiklozanida u mesu u redovnim analizama unutar monitoringa ostataka.

Tablica 25. Podaci 3 analize korišteni za proračun  $CC\alpha$  i  $CC\beta$  za oksiklozanid

	<b>C<sub>0</sub></b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	
Teoretska koncentracija	5	10	20	30	
koncentracija ng g <sup>-1</sup> prema matriks krivulji	1.analiza	4.45	9.18	18.21	28.98
		4.80	9.35	17.69	30.03
		4.98	9.02	18.78	30.68
		4.87	9.19	17.87	29.08
		4.66	9.11	16.69	28.43
		4.49	9.11	18.05	
	2.analiza	4.93	10.00	19.16	29.52
		5.21	10.35	19.85	29.84
		5.00	10.01	19.73	30.07
		4.95	9.90	20.38	30.50
		5.19	10.06	20.41	29.82
		4.96	10.01	20.50	30.44
	3.analiza	3.43	9.10	20.44	31.60
		4.88	9.24	20.27	31.65
		3.66	8.55	20.11	31.26
		4.48	8.99	20.17	31.41
		4.36	9.06	20.99	32.59
		3.70	9.79	21.06	31.96
<b>Broj analiza</b>	18	18	18	17	
<b>Srednja vrijednost</b>	4.61	9.45	19.47	30.46	
<b>Standardna devijacija</b>	0.5285	0.5037	1.2811	1.1537	
<b>Varijanca</b>	0.2793	0.2537	1.6413	1.3310	
<b>Koeficijent varijacije %</b>	11.46	5.33	6.58	3.79	

Tablica 26. Podaci 3 analize korišteni za proračun  $CC\alpha$  i  $CC\beta$  za rafoksanid

	<b>C<sub>0</sub></b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	
Teoretska koncentracija	7.5	15	30	45	
<b>koncentracija ng/g prema matriks krivulji</b>	1.analiza	13.95	23.36	44.04	53.92
		14.48	23.81	44.38	41.90
		15.04	24.76	45.73	42.09
		15.10	24.76	45.17	49.82
		15.29	24.74	45.42	52.94
		15.50	25.25	44.99	
	2.analiza	9.08	20.03	39.57	60.95
		10.50	19.75	40.24	62.13
		9.84	20.06	41.05	61.39
		9.85	20.71	40.90	57.17
		10.82	20.44	41.21	50.85
		10.13	20.43	39.81	51.27
	3.analiza	11.48	21.54	40.52	35.97
		13.37	21.62	39.52	36.19
		12.16	21.34	38.99	34.64
		13.50	21.49	37.21	35.01
		13.30	21.50	34.85	36.71
		12.37	22.56	27.07	36.66
<b>Broj analiza</b>	18	18	18	17	
<b>Srednja vrijednost</b>	12.54	22.12	40.59	47.04	
<b>Standardna devijacija</b>	2.1407	1.8629	4.5360	10.1734	
<b>Varijanca</b>	4.5825	3.4703	20.5752	103.4973	
<b>Koeficijent varijacije %</b>	17.07	8.42	11.17	21.63	

Mjerna nesigurnost objedinjuje sva odstupanja unutar metode u jednu vrijednost, a za praćenje sukladnosti uzorka, smatra se već uračunatom u graničnu koncentraciju (količinu) analita (CC $\alpha$ ). Rezultat se izražava u odnosu na CC $\alpha$  vrijednost koja je određena validacijom metode. CC $\alpha$  vrijednost je granica za poduzimanje mjera i iznad koje se utvrđuje da uzorak ne udovoljava, a ukoliko uzorak ne udovoljava rezultat se izražava uz mjernu nesigurnost. Mjernu nesigurnost je potrebno izražavati samo ukoliko je potrebno izraziti točnu koncentraciju i odstupanje mjerne nesigurnosti vezane za točno taj rezultat.

Tablica 27. Mjerna nesigurnost za oksiklozanid i rafoksanid

<b>ANALIT</b>	<b>MRL <math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>	<b>Mjerna nesigurnost pri MRL vrijednosti %</b>
Oksiklozanid	20	10,6
Rafoksanid	30	21,2

## 5 ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je odrediti validacijske parametre HPLC-MS/MS metode za određivanje antiparazitika rafoksanida i oksiklozanida u uzorcima mesa.

Ključni validacijski parametri pri validaciji navedene metode bili su: specifičnost, linearnost, preciznost te granične koncentracije.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Pročišćavanjem uzoraka dobiveni su čisti ekstrakti bez tvari koje mogu interferirati s ispitivanim analitom i time je osigurano visoko i reproducibilno iskorištenje metode. Metoda je sposobna razlučiti pozitivne od negativnih uzoraka.
- Iz kalibracijskih krivulja na otapalu i matriksu utvrđena je zadovoljavajuća linearnost.
- Rezultati određivanja preciznosti zadovoljavaju uvjet da je ukupni koeficijent varijacije manji od 23 % za ispitivane analite te su dobiveni rezultati unutar granica prihvatljivosti, odnosno rezultati su ponovljivi.
- Rezultati iskorištenja su u prihvatljivim rasponima prema Odluci Europske Komisije 2002/657/EZ.
- Validirana metoda pruža mogućnost simultane analize velikog broja uzoraka u kompleksnim matricama u kratkom vremenskom periodu, te je ujedno jednostavnija od drugih metoda.

Validacijom odabranih parametara pokazalo se da metoda zadovoljava zakonski postavljene kriterije prihvatljivosti te da je prikladna za određivanje salicilanilida rafoksanida i oksiklozanida u mesu.

## 6 LITERATURA

- Analitička metoda: Određivanje antiparazitika B2A grupe metodom HPLC-MS/MS (2018), Hrvatski veterinarski institut, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Laboratorij za određivanje rezidua.
- Araujo, P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B*, **877**, 2224-2234.
- Baugros, J. B., Giroud, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M. F., Cren-Olivé, C. (2008) Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Anal Chim Acta*, **607**, 191-203.
- Cooper, K. M., Whelan, M., Danaher, M., Kennedy, D. G. (2011) Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef. *Food Addit Contam A*, **28**, 155-165.
- Cooper, K. M., Whelan, M., Kennedy, D. G., Trigueros, G., Cannavan, A., Boon, P. E., Danaher, M. (2012) Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. *Food Addit Contam A*, **29**, 746-760.
- Díaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Hernández, F. (2012) Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS. *Anal Methods*, **4**, 196-209.
- Dong, M. W. i Zhang, K. (2014) Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *Trends Anal Chem*, **63**, 21-30.
- Ferrer, I. i Thurman, E. M. (2003) Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *Trends Anal Chem*, **22**, 750-756.
- Gentili, A., Rocca, L. M., Caretti, F., Bellante, S. (2016) Antibiotics and Drugs: Residue Determination. U: *Encyclopedia of Food and Health* [online] (Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F., ured.), Elsevier Ltd., New York, str. 192-210, <<https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=O-t9BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=encyclopedia+of+food+and+health+pdf&ots=r>

WWr4eDic0&sig=tLEfxqkVA05V5T2AQnDwd1gkYPo&redir\_esc=y#v=onepage&q=encyclopedia%20of%20food%20and%20health%20pdf&f=false>.

- Hiemstra, M. i De Kok, A. (2007) Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1154**, 3-25.
- Horvat, A. J., Babić, S., Pavlović, D. M., Ašperger, D., Pelko, S., Kaštelan-Macan, M., Mance, A. D. (2012) Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends Anal Chem*, **31**, 61-84.
- Kiffe, M., Graf, D., Trunzer, M. (2007) Two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry set-up for structural elucidation of metabolites in complex biological matrices. *Rapid Comm Mass Spectrom*, **21**, 961-970.
- Kinsella, B., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R., Furey, A., Danaher, M. (2009) New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, **637**, 196-207.
- Lanusse, C. E. i Prichard, R. K. (1993) Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet Parasitol*, **49**, 123-158.
- Lavanya, G., Sunil, M., Eswarudu, M. M., Eswaraiah, M. C., Harisudha, K., Spandana, B. N. (2013) Analytical method validation: An updated review. *Int J Pharm Sci Res*, **4**, 1280-1286.
- Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda–osnovna načela. *Svijet po mjeri*, **1**, 61-64.
- Malik, A. K., Blasco, C., Picó, Y. (2010) Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. *J Chromatogr A*, **1217**, 4018-4040.
- NCBI (2018a) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, CID = 31475, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31475>>. Pristupljeno 19. srpnja 2018.
- NCBI (2018b) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, CID = 16779, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16779>>. Pristupljeno 19. srpnja 2018.
- NCBI (2018c) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, CID = 6872, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6872>>. Pristupljeno 19. srpnja 2018.



- Odluka Komisije 2002/657/EZ od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2005) *Narodne Novine* **2**, Zagreb. Pristupljeno 19. srpnja 2018.
- Rouessac, F. i Rouessac, A. (2013) *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*, 2. izd., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Schneider, M. J., Lehotay, S. J., Lightfield, A. R. (2015) Validation of a streamlined multiclass, multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **407**, 4423-4435.
- Stolker, A. A. M. i Brinkman, U. T. (2005) Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. *J Chromatogr A*, **1067**, 15-53.
- Swan, G. E. (1999) The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. *J S Afr Vet Assoc*, **70**, 61-70.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products, Rafoxanide Summary Report (1), EMEA/MRL/636/99-FINAL, 1999.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products, Oxyclozanide Summary Report (1), EMEA/MRL/340/98-FINAL, 1998.
- Uredba Komisije (EZ) br. 37/2010 o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla.
- Vercruyse, J., Schetters, T. P. M., Knox, D. P., Willadsen, P., Claerebout, E. (2007) Control of parasitic disease using vaccines: an answer to drug resistance? *Rev Sci Tech*, **26**, 105.
- Vodič za validaciju potvrđenih metoda – LC-MS/MS, (2018) Hrvatski veterinarski institut, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Laboratorij za određivanje rezidua.
- Whelan, M., Chirollo, C., Furey, A., Cortesi, M. L., Anastasio, A., Danaher, M. (2010) Investigation of the persistence of levamisole and oxyclozanide in milk and fate in cheese. *J Agric Food Chem*, **58**, 12204-12209.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Marina Konsuo

Marina Konsuo