

Razvoj i validacija HPLC-MS/MS metode za određivanje pseudopostojanih onečišćivala u vodama

Batinić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:931490>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Batinić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Batinić

RAZVOJ I VALIDACIJA HPLC-MS/MS METODE ZA
ODREĐIVANJE PSEUDOPOSTOJANIH ONEŠĆIVALA U VODAMA

ZAVRŠNI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Danijela Ašperger
prof. dr. sc. Jelena Macan
doc. dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Petra Batinić**

Predala je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Jelena Macan, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 21. rujna 2023.

Ovaj rad je izrađen na Sveučilištu u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u
Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom prof. dr. sc. Danijele Ašperger
akademske godine 2022./2023.

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na stručnim savjetima i smjernicama, te pristupačnosti i pomoći prilikom izrade ovog završnog rada. Također, velike zahvale i Bruni Babić Visković, mag. ing. oecing. na ogromnoj pomoći tijekom i nakon izvedbe eksperimentalnog dijela završnog rada te vrlo ugodnoj radnoj atmosferi.

Želim se zahvaliti i tehničkim suradnicama Tanji Ivančić i Slavici Kos sa Zavoda za analitičku kemiju na susretljivosti u bilo kojoj situaciji, kao i ostatku osoblja na zavodu.

Zahvalu dugujem i svojoj obitelji, prvenstveno roditeljima, sestri i bratu, te svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene.

SAŽETAK

RAZVOJ I VALIDACIJA HPLC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE PSEUDOPOSTOJANIH ONEŠĆIVALA U VODAMA

Potrošnja vode zadnjih desetljeća uslijed rastućeg broja stanovništva, nekontrolirane urbanizacije i industrijalizacije znatno se povećala i danas predstavlja visokovrijedno dobro. Održivi razvoj u budućnosti u svom načelu mora kontrolirati i detektirati onešćivala svih sirovina a poglavito vode. Stoga razvoj i validacija metoda za određivanje pseudopostojanih onešćivala u vodama, ima veliki značaj u procesu očuvanja životne sredine. U pseudopostojana onečišćivala ubrajaju se svi spojevi koji se ne bi trebali nalaziti u okolišu, a u njega dospijevaju antropološkim putem. Razvoj i validacija metoda za pseudopostojana onečišćivala je nužna kako bi ih se moglo redovito pratiti u okolišu, ali i u otpadnim i pitkim vodama. Potpuna validacija metoda zahtijeva ispitivanje svih izvedbenih karakteristika metode, a one su: specifičnost/selektivnost, linearnost, točnost, istinitost, preciznost, granica detekcije i kvantifikacije, radno područje i robusnost. Najbolje metode za njihovo praćenje su kromatografske metode vezane na spektrometar masa kojima se omogućuje istovremena detekcija, identifikacija i kvantifikacija ispitivanih analita. Cilj ovog rada je bio validirati metodu za određivanje antibiotika, antiparazita, antireumatika i antivirusa (klozantel, gentamicin, baricitinib i ivermektin) te ispitati karakteristike i na temelju rezultata zaključiti zadovoljava li analitička metoda kriterije prihvatljivosti. Razvoj metode prvo je proveden na HPLC-DAD kromatografskom sustavu pri čemu su određivani sljedeći validacijski parametri: specifičnost/selektivnost, linearnost, osjetljivost, preciznost, iskoristivost, granica detekcije i kvantifikacija. Nakon toga metoda je transverirana na HPLC-MS/MS uređaj.

Ključne riječi: *validacija, HPLC-DAD, HPLC-MS/MS, kromatografija, klozantel, gentamicin, baricitinib, ivermektin*

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-MS/MS METHODS FOR THE DETERMINATION OF PSEUDO-PERSISTENT POLLUTANTS IN WATER

Water consumption has increased significantly in recent decades due to the growing population, uncontrolled urbanization and industrialization, and today it represents a high-value commodity. In principle, sustainable development in the future must control and detect pollutants in all raw materials, especially water. Therefore, the development and validation of methods for the determination of pseudo-persistent pollutants in water is of great importance in the process of environmental protection. Pseudo-persistent pollutants include all compounds that should not be found in the environment, but which reach it through anthropological means. The development and validation of methods for pseudo-persistent pollutants is necessary so that they can be regularly monitored in the environment, but also in waste and drinking water. Full method validation requires examination of all performance characteristics of the method, namely: specificity/selectivity, linearity, accuracy, truthfulness, precision, limit of detection and quantification, working area and robustness. The best methods for their monitoring are chromatographic methods connected to a mass spectrometer, which enable simultaneous detection, identification and quantification of the analyzed analytes. The aim of this work was to validate the method for determining antibiotics, antiparasitics, antirheumatics and antivirals (clozantel, gentamicin, baricitinib and ivermectin) and to examine the characteristics and based on the results to conclude whether the analytical method meets the acceptance criteria. The development of the method was first carried out on the HPLC-DAD chromatographic system, where the following validation parameters were determined: specificity/selectivity, linearity, sensitivity, precision, usability, detection limit and quantification. After that, the method was transferred to the HPLC-MS/MS device.

Key words: *validation, HPLC-DAD, HPLC-MS/MS, chromatography, closantel, gentamicin, baricitinib, ivermectin*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Farmaceutici u vodi	2
2.1.1. Klozontel	3
2.1.2. Gentamicin.....	3
2.1.3. Baricitinib	4
2.1.4. Ivermektin.....	5
2.2. Tekućinska kromatografija.....	6
2.3. Validacija	9
2.3.1. Specifičnost i selektivnost	9
2.3.2 Linearnost	9
2.3.3 Istinitost	10
2.3.4. Preciznost.....	10
2.3.5. Granica detekcije i kvantifikacije	10
2.4. R_s -vrijednost	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Korištene kemikalije, instrumenti, uređaji i pribor	11
3.2. Priprema otopina	13
3.3. Kromatografska analiza.....	13
3.4. Validacija	14
3.4.1. Linearnost i osjetljivost	14
3.4.2. Preciznost (ponovljivost/međupreciznost)	15
3.4.3. Iskoristivost	15
3.4.4. Granica detekcije i kvantifikacije	15
3.5. R_s -vrijednost.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Apsorpcijski spektri.....	17
4.2.1. Selektivnost / specifičnost	20
4.2.2. Linearnost	20
4.2.3. Osjetljivost.....	25
4.2.4. Preciznost.....	25
4.2.5. Iskoristivost	31
4.2.6. Granica detekcije i kvantifikacije	32

4.2.7. Radno područje.....	34
4.3. Faktor razlučivanja (R_s)	35
4.4. Transfer metode na HPLC-MS/MS instrument	36
5. ZAKLJUČAK.....	39
6. LITERATURA	40
7. DODATAK.....	43
7.1. Popis slika	43
7.2. Popis tablica	44
8. ŽIVOTOPIS.....	45

1. UVOD

Obzirom na svakodnevne ugroze životne sredine, kemijska analiza postaje neizostavna u svim segmentima detekcije i preveniranja štetnih pojava nekontroliranog deponiranja otpada različitog podrijetla (medicinski, farmaceutski, usljed prerade nafte i plina, industrije automobila, agronomije, prehrambeno-prerađivačke industrije, itd.). Stoga je važno svakodnevno raditi na razvoju i poboljšanju analitičkih metoda, kao i otkrivanju novih, kako bi dobili što pouzdanije i relevantnije rezultate analiza koji će biti od koristi u procesu očuvanja života na Zemlji. Zadnjih 50 godina kromatografija se naglo razvila i postala je najzastupljenija analitička tehnika, koja zbog svoje široke primjene iziskuje stalnu nadogradnju i provjeru učinkovitosti. Nažalost zbog sve većeg korištenja farmaceutika njihova koncentracija u okolišu je sve veća, te je potrebno razvijati i usavršavati pouzdane analitičke metode, kojima možemo kontrolirati njihov negativan utjecaj usljed nepravilnog odlaganja i skladištenja, a sve u korist ljudskog zdravlja, ali i biljnog i životinjskog.

Cilj ovoga rada je razvoj i validacija HPLC-DAD i HPLC-MS/MS metode u korist budućih istraživanja klozantela, gentamicina, baricitiniba, ivermektina u svrhu njihovog praćenja u okolišu te procjene njihovog utjecaja na okoliš.

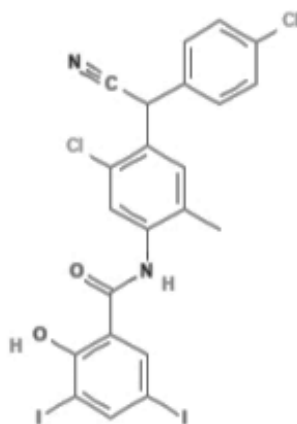
2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici u vodi

Voda je danas postala jedan od najznačajnijih životnih resursa. Njenom regeneracijom i recirkulacijom te učinkovitijom obradom posebice otpadnih voda prije ispuštanja u okoliš, pored zaštite zdravlja svih živih bića postizemo i pozitivan ekonomski učinak [1, 2]. Poseban problem u procesu očuvanja kvalitete vode predstavljaju farmaceutici, koji se već duži niz godina koriste za liječenje ljudi i životinja. Posljedica njihove svakodnevne upotrebe je stalna nazočnost u okolišu, uslijed svojih fizikalno-kemijskih svojstava vežu se za tlo ili sediment i tako sudjeluju u različitim procesima razgradnje. Industrijske i komunalne otpadne vode koje sadrže uz farmaceutike i toksične tvari organskog i anorganskog podrijetla predstavljaju posebnu opasnost za okoliš [3]. Zbog toga je kvaliteta industrijskih otpadnih voda i maksimalno dopuštene koncentracije opasnih toksičnih spojeva u vodama zakonski regulirana. Međutim, pored onečišćivala čije je unošenje u okoliš zakonodavno regulirano, postoji veliki broj spojeva među kojima se posebice ističu farmaceutski spojevi za koje nisu doneseni kriteriji za procjenu ekotoksikološkog rizika te njihova koncentracija u okolišu nije kontinuirano praćena. Brojni istraživači otkrili su da je uklanjanje farmaceutika u konvencionalnim uređajima često nepotpuno, te stoga dolazi do zagađenja vodotoka [4, 5, 6, 7, 8]. Nakon primjene, dijelovi lijeka u živom organizmu prolaze kroz različite metaboličke procese, a kao rezultat tih procesa stvaraju se metaboliti, koji su često polarniji od polaznog spoja. Zbog toga su topljivi u vodi i često opasniji od izvorne supstance [9]. Farmaceutici najčešće ulaze u okoliš prekomjernim korištenjem u zdravstvene svrhe, a najveći izvor su im bolnice, nepropisnim odlaganjem neiskorištenih lijekova, te putem farmi za uzgoj različitih životinja dodavanjem lijekova, posebice antibiotika u hranu radi stimulacije rasta, kao i za preveniranje bolesti i liječenje životinja [10, 11, 12]. Onečišćenje zemljišta se vrši i uporabom stajskog gnojiva, nakon čega antibiotici iz zemljišta ispiranjem ulaze u podzemne vode [13]. Ostatci lijekova i njihovi razgradni produkti su biološki aktivni spojevi, koji imaju funkciju da izazivaju biološke učinke pri vrlo malim koncentracijama, dovoljni su i tragovi farmaceutskih preparata za nepoželjno djelovanje na ljude i vodene organizme. Devedesetih godina prošlog stoljeća objavljena su prva znanstvena istraživanja o utjecaju farmaceutika na vodu, kad su znanstvenici otkrili masovnu pojavu "feminiziranih" riba mužjaka i to u područjima rijeka koje se nalaze nizvodno od postrojenja za obradu otpadnih voda [14]. Stoga i ovaj rad predstavlja mali doprinos u detektiranju nekih farmaceutika (klozantela, gentamicina, baricitiniba, ivermektina) i njihovog utjecaja na okoliš, a osobito na kvalitetu vode.

2.1.1. Klozontel

Klozantel je salicilanilidni anthelmintik, sintetski antiparazitski agens djelotvoran protiv jetrenih parazita, hematofagnih nematoda i stadija ličinaka nekih člankonožaca u ovaca i goveda. Preporučene doze jesu 2,5 mg ili 5 mg klozantela po kg tjelesne težine za goveda i ovce, ovisno o vrstama parazita i/ili životnom stadiju parazita u vrijeme liječenja [15]. Kombinira se s derivatima benzimidazola poput mebendazola, a najveća prednost klozantela je to što paraziti ne razvijaju rezistentnost prema njemu. Strukturna formula klozantela prikazana je na **Slici 1**.



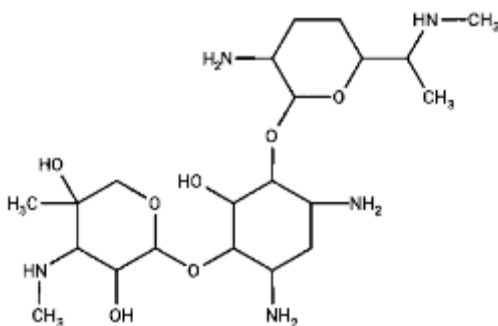
Slika 1. Strukturna formula klozantela [16].

Klozantel je dostupan kao bijelo–žuti prah netopljiv u vodi, a primjenjuje se oralno ili injekcijom. [16, 17].

2.1.2. Gentamicin

Gentamicin je aminoglikozidni antibiotik koji ima širok spektar baktericidnog djelovanja. Obično je djelotvoran protiv sljedećih uzročnika: *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococci*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* spp. i *Providencia* spp. Primjena gentamicin injekcija indicirana je u infekcijama urinarnog trakta, infekcijama dišnog sustava, bakterijemijama, septikemijama, teškim neonatalnim infekcijama i drugim sustavnim infekcijama uzrokovanim osjetljivim organizmima. Doziranje ovisi o težini infekcije, dobi bolesnika i bubrežnoj funkciji. Shema doziranja jednaka je za intramuskularnu i intravensku primjenu. Nakon primjene 70-85 % veže se za proteine plazme, dok se 90 %

izlučuje nepromijenjen putem urine [18]. Strukturna formula gentamicina prikazana je na **Slici 2**.



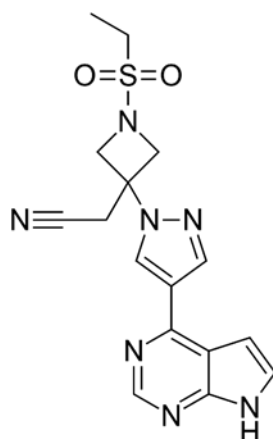
Slika 2. Strukturna formula Gentamicina [19].

Gentamicin je inkompatibilan i s furosemidom, heparinom, natrijevim hidrogenkarbonatom (u kiselom pH području otopine gentamicin može osloboditi ugljični dioksid) i nekim otopinama za parenteralnu prehranu. Reakcija je moguća s preparatima koji imaju alkalni pH ili s lijekovima nestabilnima u kiselom mediju. Zbog moguće inkompatibilnosti, gentamicin se ne smije miješati s drugim preparatima, niti se smije davati istim putem intravenozno. Kada se daju s beta-laktamskim preparatima, injekcije ne smiju biti na istoj strani tijela [18].

2.1.3. Baricitinib

Baricitinib je vrsta imunosupresiva (lijeka koji smanjuje aktivnost imunskog sustava). Djeluje blokiranjem djelovanja enzima naziva *Janus kinaze*. Ti enzimi imaju važnu ulogu u upalnim procesima i oštećenjima koji nastaju zbog reumatoidnog artritisa, atopijskog dermatitisa i alopecije areate. Blokirajući te enzime baricitinib ublažava upalu zglobova, kože i folikula dlake, kao i druge simptome tih bolesti. Najčešće nuspojave lijeka, kad se primjenjuje samostalno ili u kombinaciji, koje se mogu javiti u više od 1 na 100 osoba, jesu povišena razina kolesterola u krvi, infekcije nosa i grla, glavobolja, herpesne infekcije i infekcije mokraćnog sustava [20].

Strukturna formula baricitiniba prikazana je na **Slici 3**.



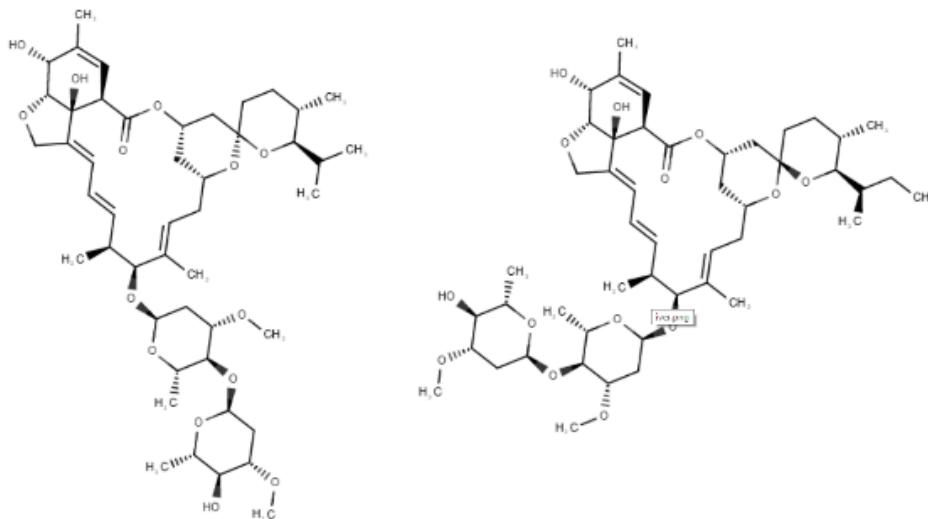
Slika 3. Strukturna formula barcitiniba [21].

Lijek se ne smije primjenjivati u bolesnika s aktivnom tuberkulozom kao ni u bolesnika s abnormalnim razinama crvenih krvnih stanica ili određenih bijelih krvnih stanica. Osim toga, se ne smije primjenjivati u bolesnika sa znatno smanjenom funkcijom jetre kao ni u trudnica i dojilja. Žene u reproduktivnoj dobi moraju koristiti kontracepciju tijekom terapije lijekom i još najmanje tjedan dana nakon prestanka terapije [20].

2.1.4. Ivermektin

Ivermektin je po svojoj strukturi dihidro derivat avermektina, koji je prirodni fermentacijski metabolit bakterije *Streptomyces avermitilis*, a spada u farmakološku skupinu antiparazitskih lijekova širokog spektra djelovanja. U veterinarskoj uporabi koristi se za liječenje određenih parazitskih bolesti dok se u humanoj medicini koristi u liječenju parazitskih bolesti uzrokovanih unutarnjim i vanjskim parazitima poput helminta, nematoda i grinja te za kožna oboljenja poput rozaceje. Osim navedenog, ivermektin pokazuje antivirusno i protuupalno djelovanje te se zbog svoje sigurnosti, financijske pristupačnosti i dostupnosti od početka pandemije koronavirusa počeo istraživati radi moguće prenamjene za potencijalno liječenje COVID-19 bolesti uzrokovane SARS-CoV-2 virusom [22].

Strukturna formula ivermektina prikazana je na **Slici 4**.



Slika 4. Strukturna formula ivermektina [23].

Ivermektin u ekskretima zadržava svoju insekticidnu aktivnost. Eliminiran putem fecesa tretiranih životinja ostaje toksičan kako za odrasle, tako i za larvene oblike kukaca koji se mogu naći u organskom otpadu i balegi. Ivermektin je slabo topljiv u vodi. Čvrsto se veže za tlo, tako da mu je ograničeno širenje u različitim dijelovima ekosustava. Potencijalni utjecaj ivermektina na životnu sredinu je promijenljiv i uglavnom ovisi od zemljopisnog područja, klime, nazočnih vrsta kukaca i godišnjeg doba. Ivermektin se brzo razgrađuje pod djelovanjem sunčeve svjetlosti. Preparat ne smije dospjeti u vodene tokove jer je izrazito štetan za ribe i druge vodene organizme [24].

2.2. Tekućinska kromatografija

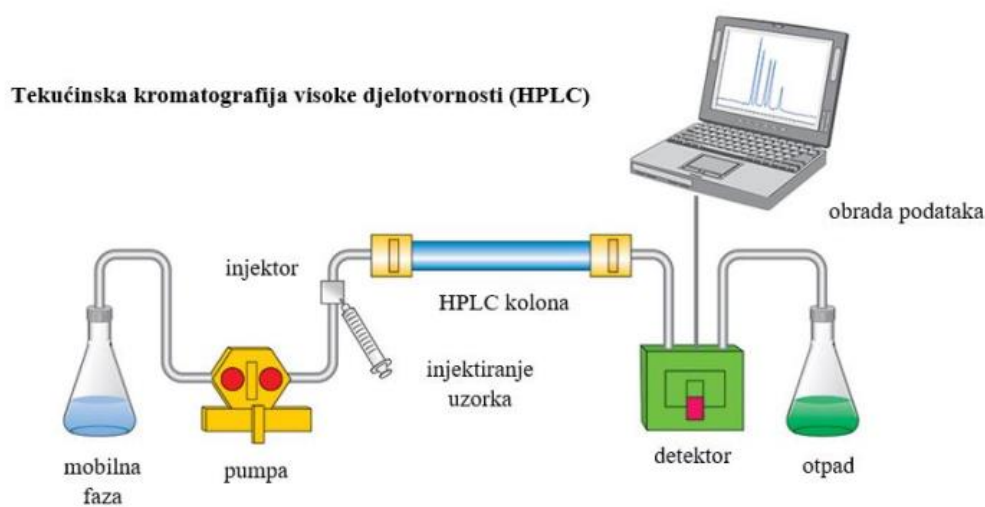
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornost (**eng.** *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) spada obzirom na pakiranje nepokretne faze u kolonske tekućinske kromatografije. Primjena tlaka zbog kojeg pokretna faza brže prolazi kroz kolonu razlikuje HPLC od obične tekućinske kromatografije. Ova metoda zahtijeva složeniju opremu zbog uporabe viših tlakova. Suvremeni uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti prikazan je na **Slici 5**.



Slika 5. Suvremeni uređaj za tekućinsku kromatografiju [25].

HPLC uređaj radi na principu prolaska analiziranog spoja ili smjese kroz stupac pumpanjem tekućine odnosno pokretne faze pod visokim tlakom. Pokretne faze koje se koriste kod ove vrste tekućinske kromatografije uključuju svaku moguću mješljivu kombinaciju vode i organskog otapala od kojih su najčešća acetonitril i metanol, pri čemu vodena komponenta pokretne faze može sadržavati i mali udio kiseline kao što su mravlja, fosforna ili trifluorocetna kiselina. U sustav odnosno tok pokretne faze ubrizgava se mali volumen uzorka koji se na osnovu specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija različito zadržava unutar same kolone [26]. Unutar same kromatografske kolone dolazi do separacije sastojaka ispitivanog uzorka [25]. Kako bi molekula mogla preći iz jedne faze u drugu potrebno je savladati određenu energijsku barijeru između dviju faza, a kako bi se prekinule veze između istih potrebna je određena količina energije koja može nastati zahvaljujući slučajnim sudarima s drugim molekulama. Ukoliko se molekule nalaze u pokretnoj fazi one će lakše prelaziti energijsku barijeru jer su veze između molekule i pokretne faze obično slabije nego što je to slučaj njezine veze s nepokretnom fazom. Poboljšavanje ili narušavanje procesa separacije kontrolira se

promjenom protoka ili sastava pokretne faze ili promjenom temperature. Kako bi se smanjile ili uklonile promjene u eluiranju, crpka odnosno pumpa mora održavati konstantnu brzinu protoka otapala i uzorka kroz kolonu bez pojave impulsa. Kada ispitivani uzorak dođe do kraja kromatografske kolone potrebno je registrirati prisutnost različitih komponenata uzorka pomoću odgovarajućeg detektora. On omogućuje detekciju i/ili identifikaciju te kvantifikaciju pojedinačnih komponenti ispitivanog uzorka. HPLC uređaj povezan je s računalom na čijem se ekranu, kao rezultat ispitivanja, prikazuje kromatogram. Kromatogram predstavlja prikaz kromatografskog razdvajanja postignutog u HPLC sustavu, a crta ga računalna podatkovna stanica. Shematski prikaz HPLC uređaja prikazan je na **Slici 6**.



Slika 6. Shematski prikaz HPLC uređaja [27].

Srce kromatografskog uređaja je kolona jer se u njoj dešava kromatografski proces, međutim sve što je separirano tijekom kromatografskog procesa mora se na neki način detektirati ili identificirati, u tu svrhu koriste se detektori.

HPLC detektori mogu se podijeliti u dvije kategorije:

- nespecifični (ili univerzalni) – mjeri se refrakcijski indeks (RI) ili dielektrična konstanta uzorka,
- specifični – fizikalna ili kemijska svojstva se mjere pod idealnim uvjetima, npr. UV apsorpcija, spektrometrija masa (MS).

Neki od najčešćih detektora vezanih na kromatografski sustav su: refrakcijski detektor (RI) za mjerenje refrakcijskog indeksa, UV/Vid detektori (koji se dijele na one s fiksnom valnom

duljinom, s promjenjivom valnom duljinom i s nizom dioda (DAD)), fluorescentni detektor (FLD), konduktometrijski detektor i spektrometar masa (MS).

Neke od karakteristika koje detektori moraju imati su: mali pomak i šum kod snimanja bazne linije, visoka osjetljivost, brzi odziv, mali „mrtvi“ volumen (što znači minimalno širenje kromatografske krivulje), neosjetljivost na promjenu vrste otapala, protoka i temperature.

Najčešći u upotrebi je DAD detektor, no kod indentifikacije najbitniji je MS detektor, a u novije vrijeme i MS/MS detektori. Metode se često razvijaju na robusnim HPLC-DAD sustavima koji su cjenovno dostupniji i poželjniji za rutinske analize, no ograničeni su jer mogu provoditi detekciju ali ne i indentifikaciju spojeva poput MS/MS sustava. [28]

2.3. Validacija

Validacija analitičkih metoda je postupak kojim se osiguravaju točni, precizni i reproducibilni rezultati tijekom dugoročnog korištenja metode. Također, validacijom se mogu utvrditi uzroci mogućih problema tijekom izvođenja metode čime se postiže veliki stupanj pouzdanosti i primjenjivosti metode. Parametri koji se ispituju tijekom validacije analitičke metode su selektivnost, specifičnost, linearnost, istinitost, točnost, preciznost, granica detekcije i kvantifikacije i robusnost.

2.3.1. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost i selektivnost su svojstvo metode da uz visoku točnost specifično odredi željenu komponentu u prisutnosti ostalih komponenti. Iako često poistovjećena, ova dva svojstva metode su različita. Specifična metoda je metoda koja određuje samo jedan specifičan analit, dok selektivna metoda može odrediti više komponenti istodobno koje međusobno ne utječu jedna na drugu. U validaciji selektivnost je jedan od ključnih i nezaobilaznih parametara.

2.3.2 Linearnost

Linearnost je sposobnost metode da unutar određenog područja, daje ispitne rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određuje se pripremom najmanje pet koncentracijskih razina s tri ponavljanja te mjerenjem odziva metode na poznate koncentracije [28].

2.3.3 Istinitost

Istinitost nam govori koliko se slažu referentna vrijednost i srednja vrijednost beskonačnog broja ponovljenih mjerenja. Pošto je nemoguće provesti beskonačan broj mjerenja, istinitost ne može biti mjerena, ali se može procijeniti. Procijeniti se može na razne načine kao npr. usporedbom rezultata metode koju smo ispitivali sa referentnom metodom, analizom uzorka poznate koncentracije (referentni uzorak) ili analizom obogaćenog uzorka [29].

2.3.4. Preciznost

Preciznost je parametar validacije koji definira izraz slaganja između niza mjerenja provedenih iz istog homogenog uzorka. Dijeli se na preciznost pod uvjetima ponovljivosti (ponovljivost) i međupreciznost. Ponovljivost uključuje kratko razdoblje i uvjete kao što su: jedan analitičar, jedan laboratorij i ista aparatura. Međupreciznost se ostvaruje u duljem vremenskom periodu unutar istog laboratorija ali uz promjenu prethodno navedenih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, dobavljači, itd.) [29].

2.3.5. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati ali ne i kvantitativno odrediti dok granica kvantifikacije može kvantitativno odrediti najmanju količinu analita u uzorku uz dozu potrebne točnosti i preciznosti [30].

2.4. R_s -vrijednost

U kromatografiji stupanj razlučivanja dviju susjednih zona ili kromatografskih krivulja definira se kao R_s -vrijednost, odnosno omjer razmaka između dviju kromatografskih krivulja i njihove bazne širine. Daje informaciju o mogućnosti razlučivanja dvaju spojeva [31].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Korištene kemikalije, instrumenti, uređaji i pribor

Za potrebe eksperimenata, pripremane su temeljne standardne otopine farmaceutika: gentamicin (Acros organics, USA), ivermektin (Sigma, Njemačka), klozantel (Sigma- Aldrich, Njemačka), baricitinib (Combi-Blocks, USA).

Tablica 1 prikazuje popis svih kemikalija koje su korištene u istraživanju.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u istraživanju.

Naziv	Kemijska formula	Čistoća	Proizvođač
Metanol	CH ₃ OH	HPLC	J. T. Baker, Nizozemska
Voda	H ₂ O	Mili Q	FKIT, Zagreb

Uređaji korišteni u radu su: analitička vaga, ultrazvučna kupelj, HPLC kromatograf, HPLC-MS/MS kromatograf.

Na **Slici 7.** prikazana je analitička vaga (Mettler Toledo, AB 104, Švicarska), koja je korištena za vaganje farmaceutika.



Slika 7. Analitička vaga (Mettler Toledo, AB 104, Švicarska).

Bolje otapanje ispitivanih farmaceutika provodilo se u ultrazvučnoj kupelji SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin Njemačka 1200 W, prikazanoj na **Slici 8**. Na samom uređaju moguće je podešavati vrijeme, temperature i snagu ultrazvuka.



Slika 8. Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin Njemačka 1200 W.

Uzorci su analizirani na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti Varian ProStar, SAD, prikazan na **Slici 9**. Osnovni dijelovi kromatografa su: automatski injektor 410, pumpe, detektor sa nizom dioda, boca za pokretnu fazu i otpad i računalo kojim se upravlja sustavom i na kojem se očitavaju rezultati analiza. Za analizu su korištene kolone: Agilent-Eclipse, XDB-C18, 5 μ m, 4,6 \times 150 mm i Agilent, Zorbax, Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 2,1 \times 150 mm.



Slika 9. Kromatograf Varian ProStar, SAD.

Metoda je zatim prenešana na HPLC-MS/MS kromatograf (Agilent LC sistem 1260 Infinity – Agilent 6540 UHD Q-TOF) koji je prikaza na **Slici 10**. S radnim tlakom do 600 bara, kvaternarna pumpa 1260 Infinity II je kompatibilan s HPLC i UHPLC. Može nositi kolone od 2,1, 3 i 4,6 mm protoka u rasponu do 5 mL/min do 10 mL/min.



Slika 10. HPLC-MS/MS kromatograf (Agilent LC sistem 1260 Infinity, USA) [32].

Tijekom izvođenja eksperimenata korišteno je standardno laboratorijsko posuđe: odmjerne tikvice, tikvice sa okruglim dnom, stakleni štapići, lijevci i čaše, vijale, automatske pipete, kapaljke te metalne žlice za odvage.

3.2. Priprema otopina

U svrhu ovog rada unaprijed su pripravljene temeljne standardne otopine (TSO) klozantela, ivermektina, baricitiniba i gentamicina otapanjem točno poznate odvage u metanolu tako da je masena koncentracija iznosila 50 mg/L. TSO se priprema vaganjem standarda na analitičkoj vagi, prenošenjem odvage u odmjernu tikvicu i nadopunjavanjem do oznake metanolom. Pripravljene otopine čuvaju se u mraku pri temperaturi od 4 °C. TSO je dalje korištena za izradu radnih standardnih otopina (RSO) koje su se koristile tijekom validacije metode. One su pripravljene u rasponu koncentracija od 0,1 mg/L do 10 mg/L. RSO se pripremaju razrjeđenjem TSO s metanolom. Nakon toga iz RSO pomoću kapaljke otopina se prebacivala u vijale i koristila za analizu.

3.3. Kromatografska analiza

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u svrhu kvantitativnog i kvalitativnog određivanja farmaceutika provedena je na HPLC-DAD kromatografu.

Eksperimentalni uvjeti kromatografskog određivanja farmaceutika:

- Nepokretna faza: kromatografske kolone Agilent-Eclipse, XDB-C18, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm i Agilent, Zorbax,Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 2,1 \times 150 mm.
- Pokretna faza: (A) 0,01 % mravlje kiseline u MiliQ vodi, 0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu (B),
- Protok: 0,5 mL/min,
- Volumen injektiranja 30 μ L,
- Valne duljine određivanja farmaceutika: ivermektin (245 nm), gentamicin (215 nm), baricitinib (223 nm), klozantel (221 nm).
- Gradijent pokretne faze prikazan je u **Tablici 2**.

Tablica 2. Gradijent pokretne faze

<i>t</i> , min	Udio organske faze (B), %
0,00	10
2,30	30
6,00	50
15,00	80
18,00	95
27,00	100
28,06	100
33,00	10
35,00	10

Eksperimentalni uvjeti kromatografskog određivanja farmaceutika na HPLC-MS/MS su isti kao kod DAD detektora uz razliku nepokretne faze. Naime, kolona koja se koristila je Symmetry C18 5 μ m 4.6 \times 150mm (30 °C).

3.4. Validacija

3.4.1. Linearost i osjetljivost

Linearost se određuje izradom umjernog dijagrama. U tu svrhu pripremljeno je osam otopina farmaceutika različitih koncentracija (0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L, 7 mg/L i 10 mg/L). Nakon analize izmjerene su površine ispod kromatografske krivulje za svaku koncentraciju i svaku komponentu i određene jednadžbe pravaca koje opisuju ovisnost površine ispod krivulje o koncentraciji analita. Iz jednadžbi pravaca određena je osjetljivost metode koja je jednaka nagibu umjernog pravca.

3.4.2. Preciznost (ponovljivost/međupreciznost)

Za procjenu preciznosti pripremljena je otopina farmaceutika na tri različite koncentracije, koje pritom nisu korištene za izradu umjernog pravca, a nalaze se unutar radnog područja. Svaka koncentracija se priprema 5 puta i injektira jednom.

Ponovljivost se određuje na temelju ponovljenih mjerenja vremena zadržavanja i koncentracije analita za svaku koncentraciju, a iskazuje se kao relativno standardno odstupanje ponovljenih mjerenja (RSD, %).

Međupreciznost vremena zadržavanja i koncentracije određuje se iz rezultata ponovljenih mjerenja provedenih u dva različita dana. Rezultati se iskazuju kao RSD (%).

3.4.3. Iskoristivost

Iskoristivost rezultata mjerenja određuje se na temelju podataka dobivenih za ispitivanje ponovljivosti pri tri različite koncentracije. Iskoristivost izražava slaganje srednje vrijednost beskonačnog broja ponavljanja mjerenja i prave vrijednosti u realnom uzorku prema jednadžbi (1):

$$ISKORISTIVOST(\%) = \frac{\bar{x}}{X_{sd}} \times 100 \quad (1)$$

Gdje je \bar{x} aritmetička srednja vrijednost ponovljenih mjerenja, a X_{sd} dodana koncentracija analita.

3.4.4. Granica detekcije i kvantifikacije

Granicu detekcije (GD) i granicu kvantifikacije (GK) određujemo prema sljedećim jednadžbama (2) i (3):

$$GD = 3,3 \times s'_0 \quad (2)$$

$$GK = 10 \times s'_0 \quad (3)$$

s'_0 se izračunva prema sljedećoj jednadžbi (4):

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

gdje je s_0 procjena standardnog odstupanja n broj ponovljenih mjerenja koncentracije farmaceutika pri koncentracijama blizu nule.

3.5. R_S -vrijednost

R_S vrijednost izračunava se prema sljedećoj jednadžbi (5):

$$R_S = \frac{2\Delta Z}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (5)$$

gdje je ΔZ udaljenost središta dviju zona, a w_b širina zone. Kako bi razlučivanje bilo zadovoljavajuće vrijednost R_S mora biti $\geq 1,5$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

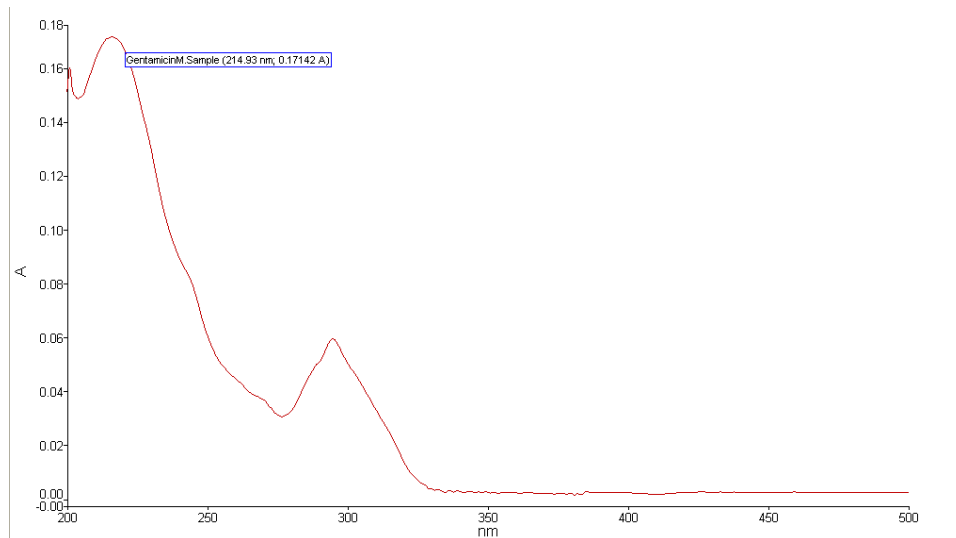
Za rutinsku analizu ispitivanih farmaceutika koristila se prvo HPLC-DAD metoda kao robusna i financijski prihvatljiva. Sama validacija metode provedena je na dvije kolone različite polarosti, obzirom na različita fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih komponenti prikazanima u **Tablici 3**. Glavni cilj bio je prebaciti optimiranu i validiranu HPLC-DAD metodu na HPLC-MS/MS kromatografski sustav koji je skuplji, sofisticiraniji, ali omogućava detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju pri značajno nižim koncentracijama.

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika.

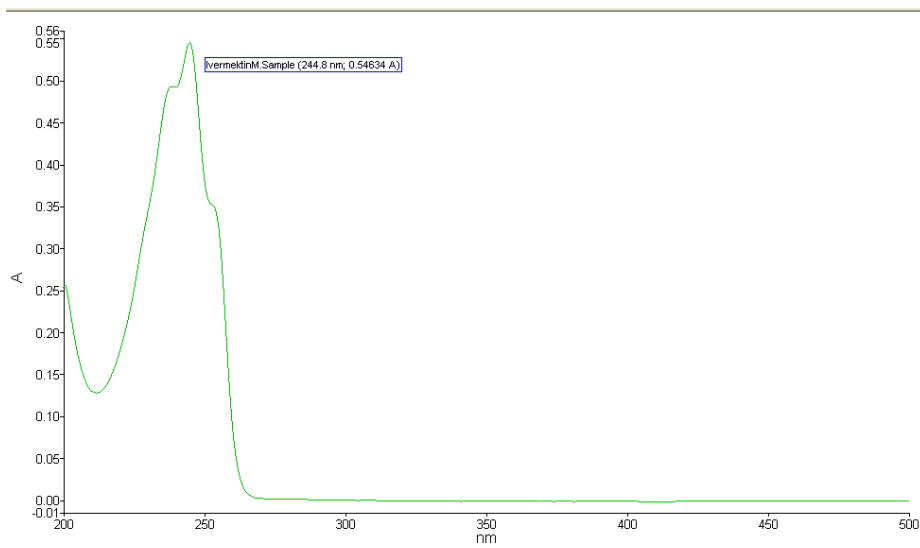
Farmaceutik	CAS broj	Formula	M_r g/mol	$LogK_{ov}$	Topljivost u vodi (mg/L)	Henry-jeva konstanta (Pa m ³ /mol)
Ivermektin	70288-86-7	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₄	861,09	4,11	8,877*10 ⁴	1,19*10 ⁻²²
Gentamicin	1403-66-3	C ₁₉ H ₃₈ N ₄ O ₆	418,54	-1,88	9,618*10 ⁵	9,91*10 ⁻²⁶
Klozantel	57808-65-8	C ₂₂ H ₁₄ Cl ₂ L ₂ N ₂ O ₂	663,08	8,11	1,519*10 ⁻⁵	1,95*10 ⁻¹¹
Baricitinib	1187594-09-7	C ₁₆ H ₁₇ N ₇ O ₂ S ₁	371,42	-0,58	380,9	3,23*10 ⁻¹⁵

4.1. Apsorpcijski spektri

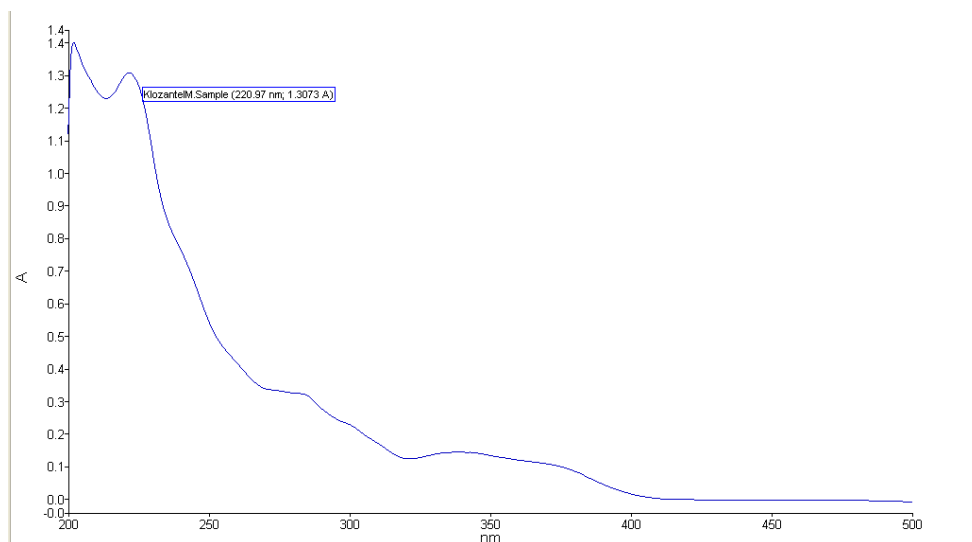
Na početku rada bilo je nužno snimiti apsorpcijske spektre farmaceutika (ivermektin, klozantel, baricitinib i gentamicin), kako bi se ustanovila valna duljina maksimalnog elektromagnetskog zračenja. **Slike 10-13** prikazuju valne duljine korištene pri određivanju farmaceutika.



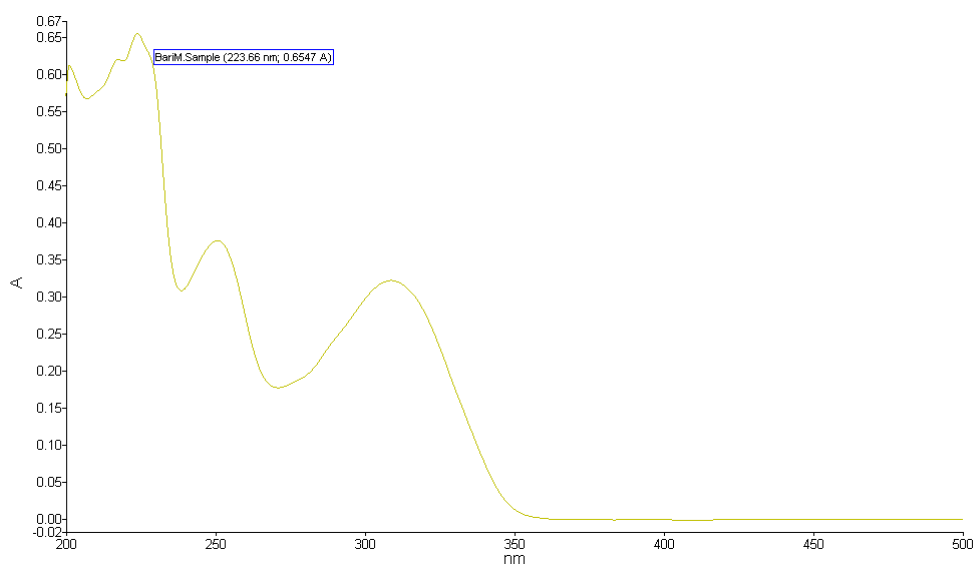
Slika 11. Apsorpcijski spektar gentamicina u metanolu.



Slika 12. Apsorpcijski spektar ivermektina u metanolu.



Slika 13. Apsorpcijski spektar klozantela u metanolu.



Slika 14. Apsorpcijski spektar baricitiniba u metanolu.

Iz prikazanih spektara očitane su valne duljine pojedinih farmaceutika. **Tablica 4** prikazuje očitane valne duljine u nanometrima korištene u nastavku rada.

Tablica 4. Prikaz valnih duljina i vremena zadržavanja

Farmaceutik	λ , nm	t_R , min
Gentamicin	215	/
Ivermektin	245	30,7
Klozantel	221	24,5
Baricitinib	223	9,2

4.2. Validacija

Prvi korak u validaciji metode je postavljanje kriterija prihvatljivosti za izabrane izvedbene značajke na temelju zakonskih zahtjeva, zahtjeva norme ili dobre laboratorijske prakse. Kriteriji validacije za HPLC–DAD metodu određivanja farmaceutika prikazani su u **Tablici 5**. Svi farmaceutici tijekom validacije bili su vidljivi na HPLC- u, osim gentamicina.

Tablica 5. Kriteriji prihvatljivosti

Izvedbena značajka	Kriterij
Selektivnost	informacija
Linearnost	$R^2 \geq 0,995$
Preciznost -ponovljivost -medupreciznost	RSD \leq 10 % RSD \leq 15 %
Iskoristivost	90-110 %
Granica detekcije	Informacija
Granica kvantifikacije	Informacija

4.2.1. Selektivnost/specifičnost

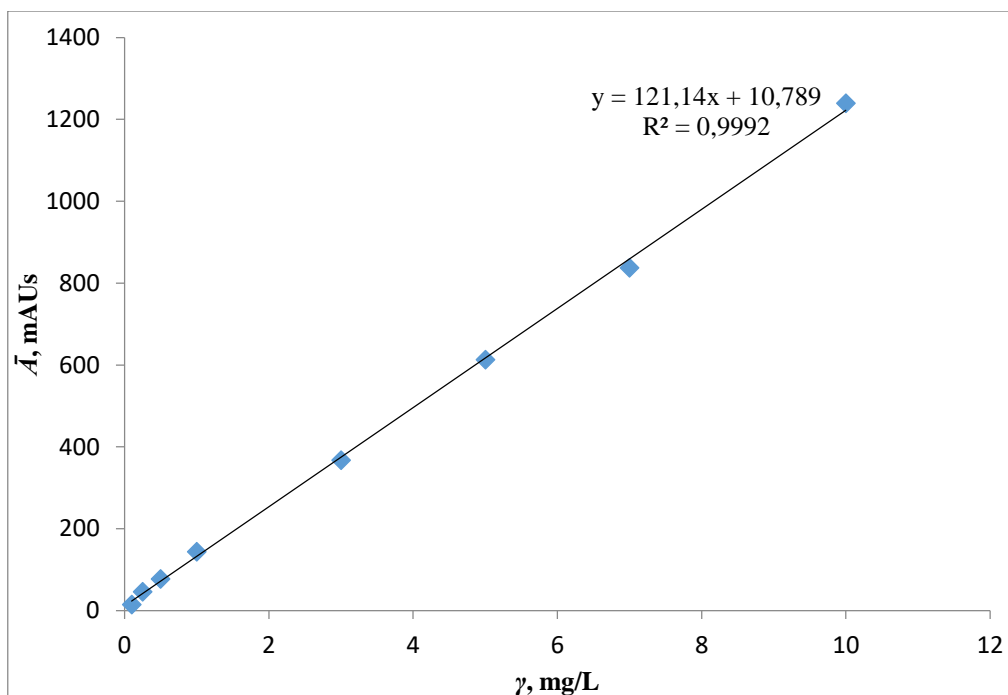
Budući da se nije radilo s realnim uzorcima selektivnost i specifičnost nije odrađena.

4.2.2. Linearnost

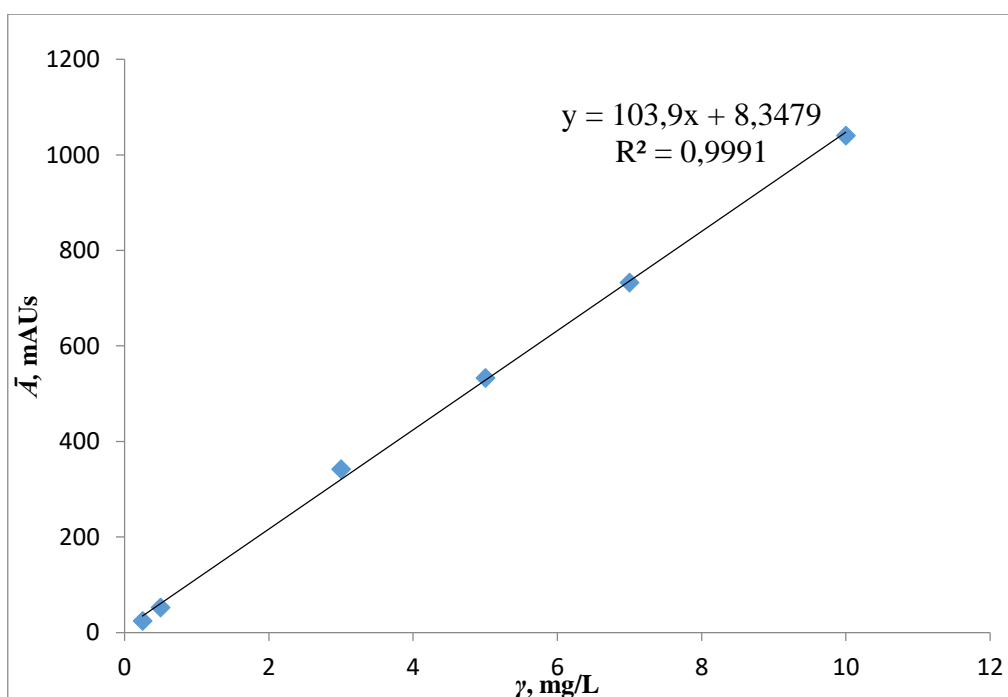
Linearnost se dobiva izradom umjernog pravca. Pripremom i analizom osam standardnih otopina koncentracija 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L, 7 mg/L, 10 mg/L, dobiveno je osam umjernih točaka za izradu pravca.

4.2.2.1. Ivermektin

Slika 15 i **16** prikazuju umjerni pravac ivermektina na koloni C18 i C8. Kako se može vidjeti iz dobivenih jednadžbi pravaca i vrijednosti koeficijenta determinacije kriterij je zadovoljen, čime je potvrđena linearnost za ivermektin na obje kolone.



Slika 15. Umjerni pravac ivermektina (kolona C18).

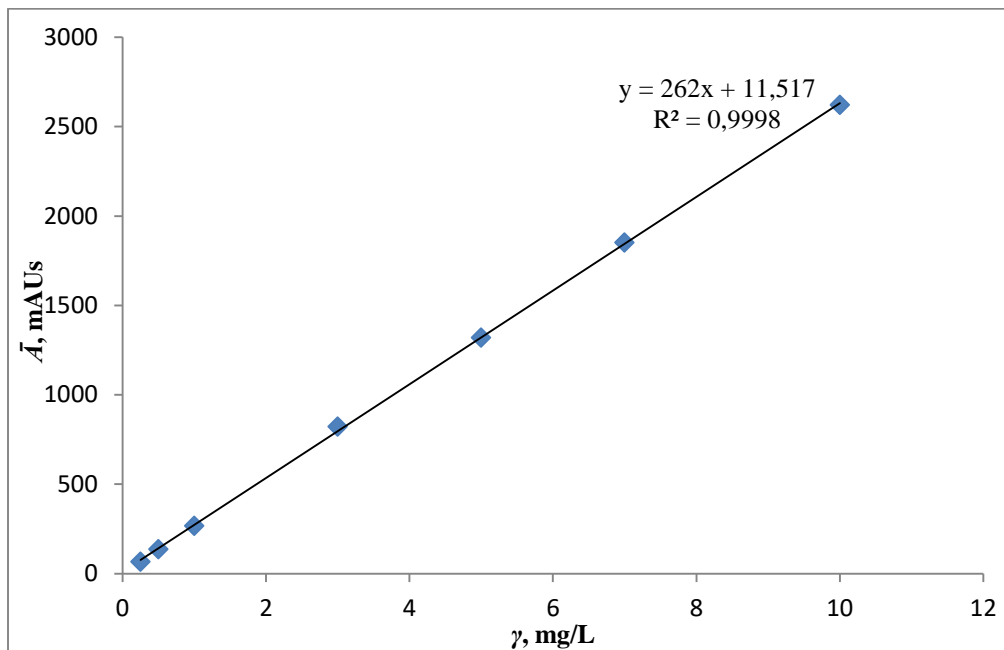


Slika 16. Umjerni pravac ivermektina (kolona C8).

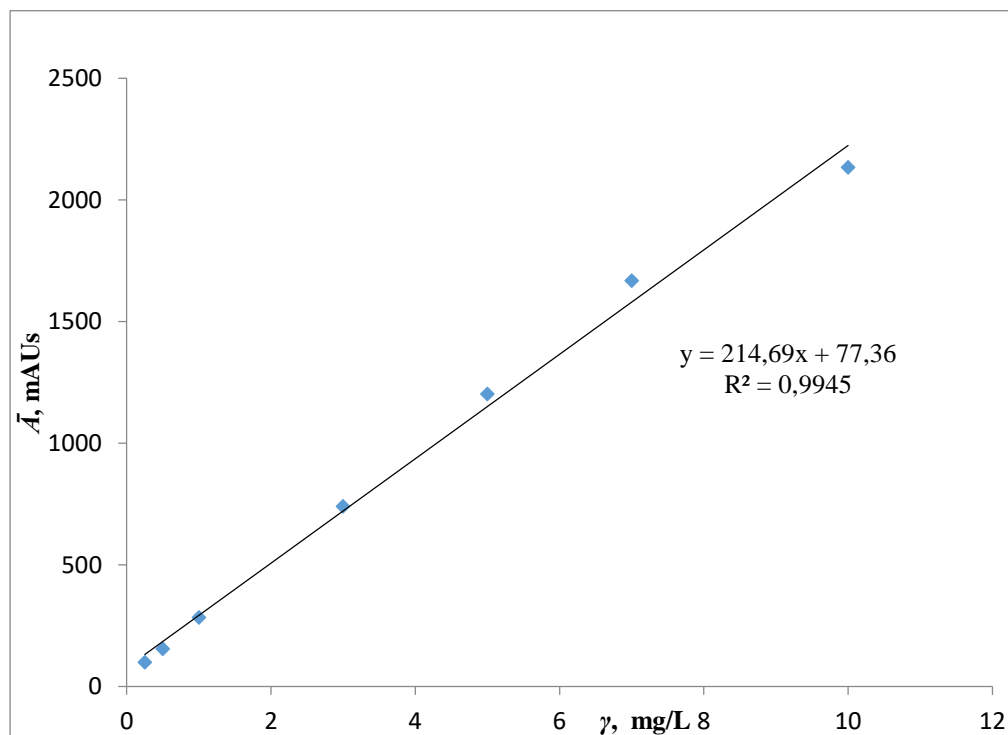
4.2.2.2. Klozantel

Slika 17 i 18 prikazuju umjerni pravac klozantela na koloni C18 i C8.

Kako se može vidjeti iz dobivenih jednadžbi pravaca i vrijednosti koeficijenta determinacije tj. određivanja kriterij je zadovoljen na koloni C18, dok je na koloni C8 $R^2 \leq 0,995$ čime nije potvrđena linearnost za klozantel na C8 koloni prema traženim kriterijima.



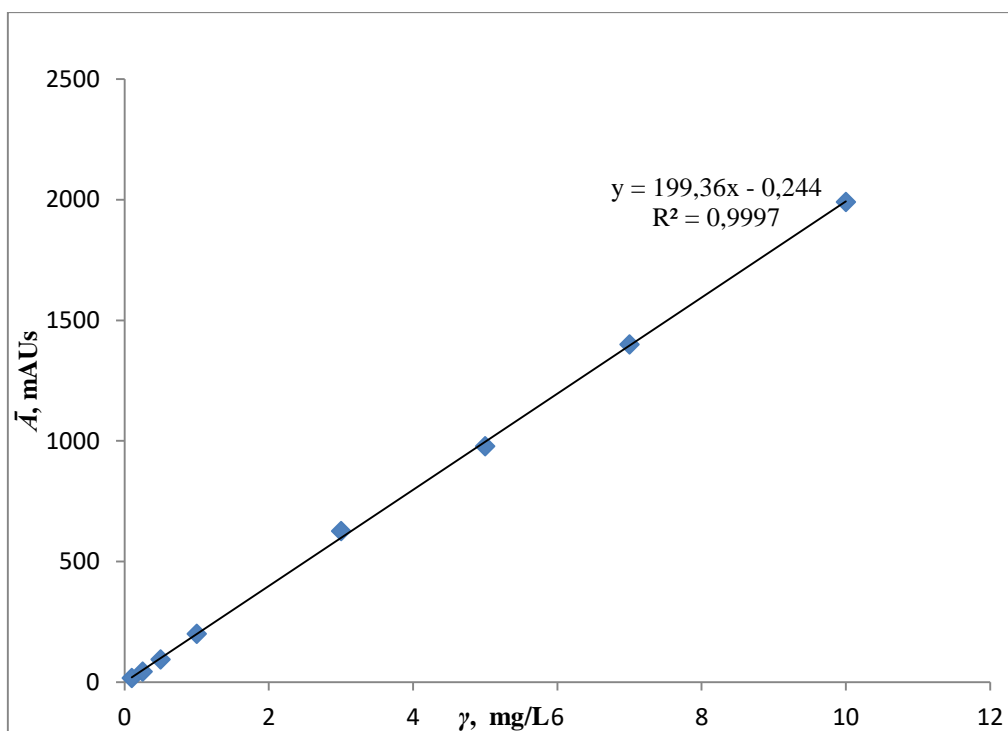
Slika 17. Umjerni pravac klozantela (kolona C18).



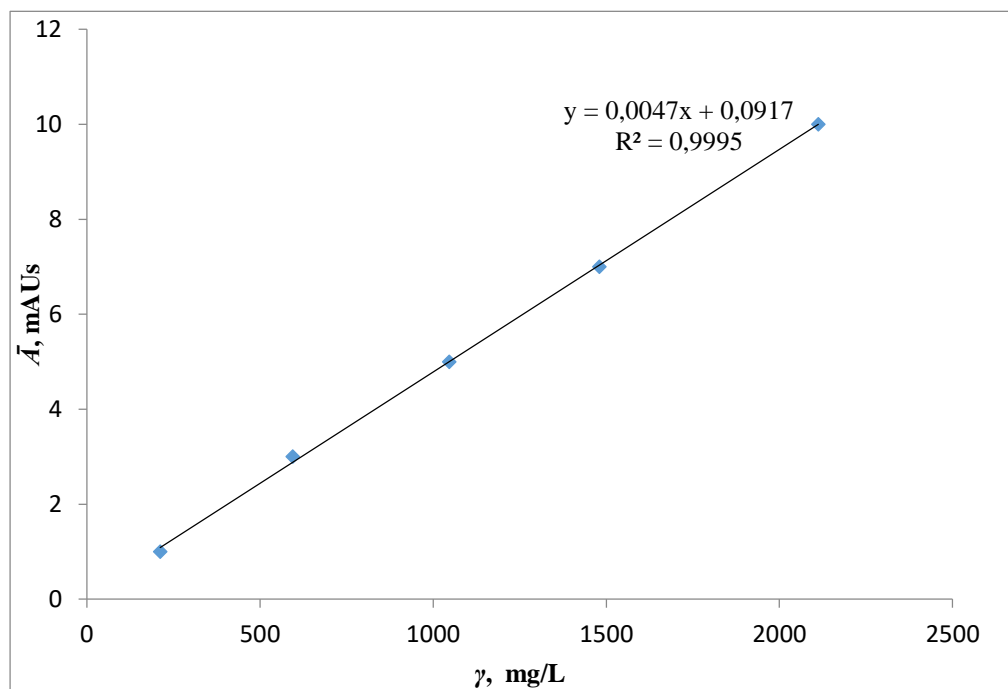
Slika 18. Umjerni pravac klozantela (kolona C8).

4.2.2.3. Baricitinib

Slika 19 i 20 prikazuju umjerni pravac baricitiniba na koloni C18 i C8. Kako se može vidjeti iz dobivenih jednadžbi pravaca i vrijednosti koeficijenta određivanja kriterij je zadovoljen, čime je potvrđena linearnost za baricitinib na obje kolone.



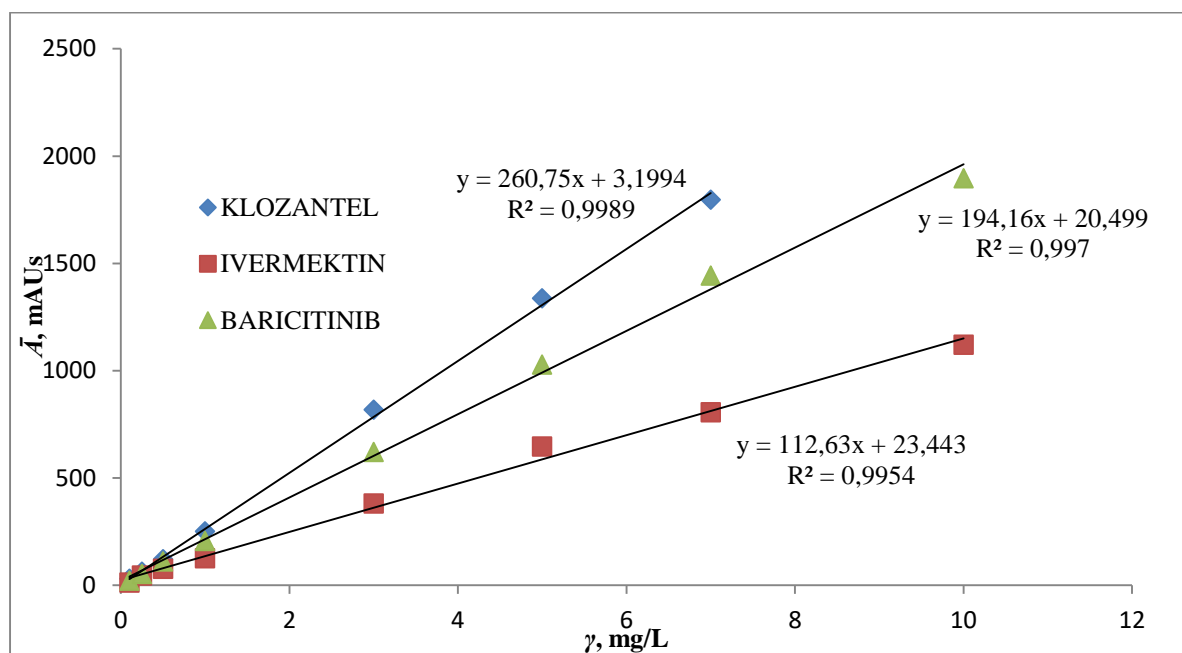
Slika 19. Umjerni pravac baricitiniba (kolona C18).



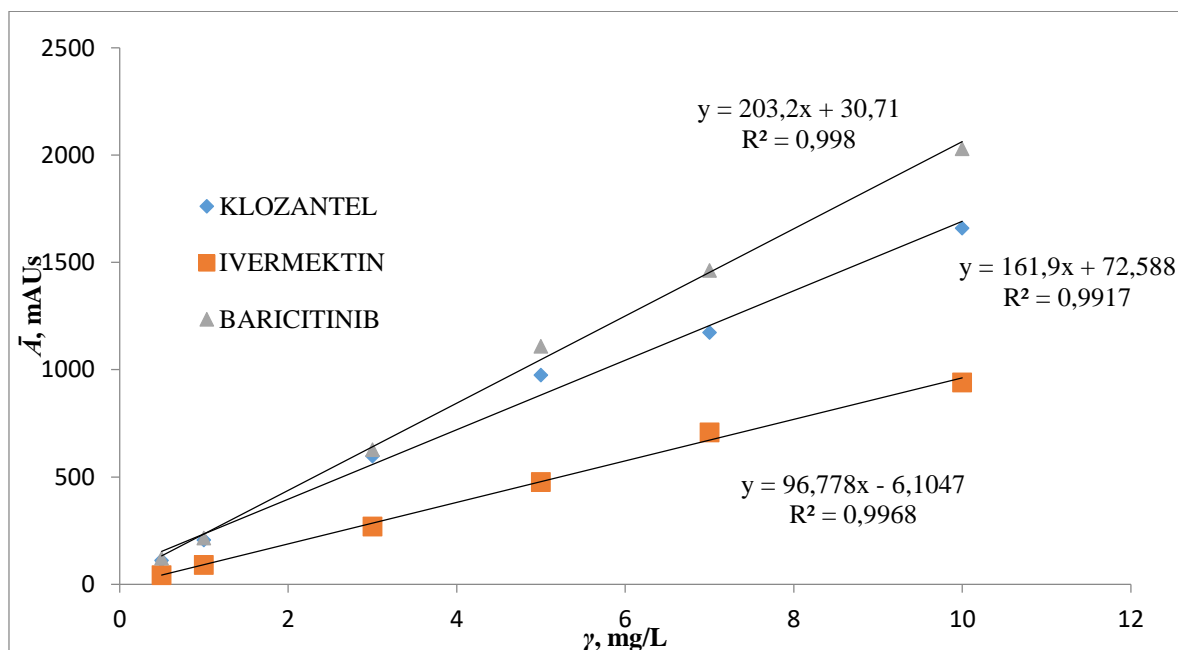
Slika 20. Umjerni pravac baricitiniba (kolona C8).

4.2.2.4. Smjesa

Slika 21 i 22 prikazuju umjerni pravac za smjesu ispitivanih komponenti na koloni C18 i C8. Kako se može vidjeti iz dobivenih jednadžbi pravaca i vrijednosti koeficijenta određivanja kriterij je zadovoljen na koloni C18, čime je potvrđena linearnost za smjesu na toj koloni. Međutim, na koloni C8 linearnost nije zadovoljena za klozantel $R^2 \leq 0,995$.



Slika 21. Umjerni pravac za smjesu (kolona C18).



Slika 22. Umjerni pravac za smjesu (kolona C8).

4.2.3. Osjetljivost

Iz jednadžbi pravca mogu se očitati koeficijenti smjera koji govore o osjetljivosti metode i prikazani su u **Tablici 6**. Iz dobivenih podataka uočava se da je veći nagib tj. veća osjetljivost prilikom korištenja C18 kolone.

Tablica 6. Osjetljivost metode

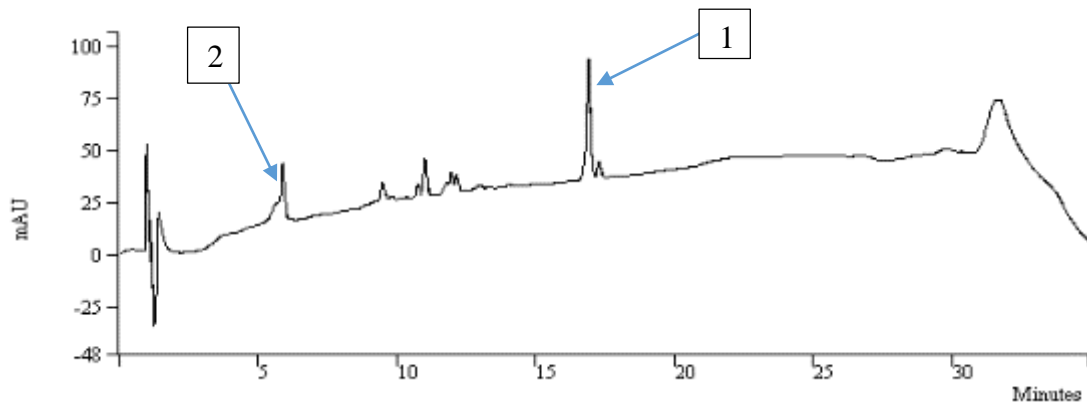
Farmaceutik	Osjetljivost metode (C18 kolona) L/mg	Osjetljivost metode (C8 kolona) L/mg
Klozotel	262	214,69
Ivermektin	121,14	103,9
Baricitinib	199,36	213,1
Smjesa		
• Klozotel	260,75	161,9
• Ivermektin	112,63	96,778
• Baricitinib	194,16	203,2

4.2.4. Preciznost

Analizirane otopine su pripravljene u metanolu gdje je koncentracija farmaceutika iznosila 0,6 mg/L, 2 mg/L i 8 mg/L. Svaka otopina priprema se pet puta i injektirala po jednom. Nakon dobivenih podataka o površini ispod kromatografske krivulje i vremena zadržavanja izračunate su srednje vrijednosti standardne devijacije i relativno standardno odstupanje.

4.2.4.1. Ponovljivost

Iz rezultata prikazanih u **Tablicama 7-10** kriterij je zadovoljen pri svim koncentracijama na obje kolone. Međutim, ponovljivost za smjesu na koloni C8 nije određena jer je došlo do preklapanja kromatografskih krivulja ivermektina i klozantela u vremenu od 16,7 min, što pokazuje **Slika 22**. Strelica 1 prikazuje poklapanje kromatografske krivulje ivermektina i klozantela, dok strelica 2 prikazuje krivulju koja pripada baricitinibu.



Slika 23. Prikaz kromatograma za smjesu pri 2mg/L.

Tablica 7. Rezultati ponovljivosti za otopinu ivermektina

IVERMEKTIN (C18)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	31,01	0,16	0,53
	γ , mg/L	7,22	0,17	2,34
2	t_R , min	30,93	0,01	0,03
	γ , mg/L	1,87	0,06	3,18
0,6	t_R , min	30,87	0,02	0,01
	γ , mg/L	0,56	0,026	4,60
IVERMEKTIN (C8)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	16,74	0,01	0,03
	γ , mg/L	8,33	0,31	3,76
2	t_R , min	16,75	0,01	0,06
	γ , mg/L	2,23	0,03	1,59
0,6	t_R , min	16,74	0,02	0,03
	γ , mg/L	0,57	0,01	2,38

Tablica 8. Rezultati ponovljivosti za otopinu klozantela.

KLOZANTEL (C18)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	24,66	0,02	0,06
	γ , mg/L	7,69	0,15	2,04
2	t_R , min	24,63	0	0
	γ , mg/L	1,90	0,04	1,92
0,6	t_R , min	24,63	0	0
	γ , mg/L	0,59	0,04	6,17
KLOZANTEL (C8)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	16,92	0,01	0,03
	γ , mg/L	3,11	0,09	3,14
2	t_R , min	16,92	0,01	0,06
	γ , mg/L	1,88	0,07	3,68
0,6	t_R , min	16,90	0,03	0,17
	γ , mg/L	0,33	0,02	4,80

Tablica 9. Rezultati ponovljivosti za otopinu baricitiniba.

BARICITINIB (C18)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	9,23	0,03	0,31
	γ , mg/L	8,15	0,18	2,19
2	t_R , min	9,24	0,04	0,48
	γ , mg/L	2,19	0,12	5,63
0,6	t_R , min	9,29	0,05	0,56
	γ , mg/L	0,61	0,02	3,03
BARICITINIB (C8)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	5,79	0,04	0,67
	γ , mg/L	277214,53	25029,63	9,03
2	t_R , min	5,78	0,03	0,60
	γ , mg/L	98108,15	3468,15	3,54
0,6	t_R , min	5,73	0,03	0,53
	γ , mg/L	23725,17	1416,13	5,97

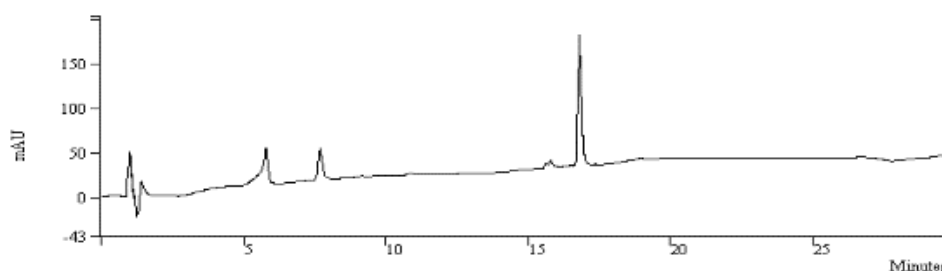
Tablica 10. Rezultat ponovljivosti za smjesu na koloni C18.

IVERMEKTIN				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	30,72	0,09	0,31
	γ , mg/L	7,94	0,22	2,77
2	t_R , min	30,74	0,03	0,11
	γ , mg/L	1,97	0,05	2,48
0,6	t_R , min	30,89	0,09	0,28
	γ , mg/L	0,52	0,01	1,65
KLOZANTEL				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	24,55	0,01	0,05
	γ , mg/L	7,24	0,27	3,69
2	t_R , min	24,57	0,01	0,05
	γ , mg/L	2,01	0,16	7,95
0,6	t_R , min	24,59	0,02	0,09
	γ , mg/L	0,58	0,04	6,75
BARICITINIB				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	9,08	0,03	0,36
	γ , mg/L	7,39	0,53	7,17
2	t_R , min	9,12	0,05	0,59
	γ , mg/L	1,92	0,12	6,19
0,6	t_R , min	9,15	0,03	0,29
	γ , mg/L	0,60	0,04	6,53

4.2.4.2. Međupreciznost

Za određivanje međupreciznosti korištene su iste koncentracije otopina kao i za određivanje ponovljivosti samo su pripremane i injektirane drugi dan.

Iz rezultata prikazanih u **Tablicama 11-14** kriterij međupreciznosti je zadovoljen ($RSD \leq 15\%$) za ivermektin, baricitinib (na obje kolone) i smjesu na koloni C18. U **Tablici 12** kriterij nije zadovoljen pri 0,6 mg/L jer i pri nižim koncentracijama i najmanja promjena koncentracije značajno utječe na vrijednost RSD. Također, kao i kod ponovljivosti, međupreciznost za smjesu na koloni C8 nije određena jer je došlo do preklapanja kromatografskih krivulja ivermektina i klozantela u vremenu od 16,7 min, što pokazuje **Slika 24**.

**Slika 24.** Prikaz kromatograma za smjesu pri 2 mg/L.

Tablica 11. Rezultat međupreciznosti za ivermektin.

IVERMEKTIN (C18)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	30,57	0,01	0,04
	γ , mg/L	7,32	0,32	4,38
2	t_R , min	30,59	0,01	0,04
	γ , mg/L	1,90	0,07	3,45
0,6	t_R , min	30,59	0,05	0,15
	γ , mg/L	0,56	0,04	7,39
IVERMEKTIN (C8)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	16,78	0,05	0,27
	γ , mg/L	7,71	0,26	3,37
2	t_R , min	16,75	0,01	0,07
	γ , mg/L	1,90	0,05	2,45
0,6	t_R , min	16,75	0,01	0,06
	γ , mg/L	0,51	0,03	5,83

Tablica 12. Rezultat međupreciznosti za klozantel.

KLOZANTEL (C18)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	24,76	0,39	1,56
	γ , mg/L	8,76	0,65	7,41
2	t_R , min	24,96	0,02	0,09
	γ , mg/L	2,59	0,24	9,24
0,6	t_R , min	24,54	0,02	0,09
	γ , mg/L	0,64	0,06	9,93
KLOZANTEL (C8)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	16,92	0,02	0,10
	γ , mg/L	8,17	0,25	3,11
2	t_R , min	16,95	0,02	0,14
	γ , mg/L	1,79	0,07	3,75
0,6	t_R , min	16,95	0,02	0,14
	γ , mg/L	0,37	0,08	21,58

Tablica 13. Rezultat međupreciznosti za baricitinib.

BARICITINIB (C18)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	9,20	0,04	0,42
	γ , mg/L	7,44	0,32	4,30
2	t_R , min	9,19	0,07	0,72
	γ , mg/L	2,03	0,10	5,00
0,6	t_R , min	9,19	0,05	0,56
	γ , mg/L	0,66	0,05	7,55
BARICITINIB (C8)				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	5,73	0,03	0,54
	γ , mg/L	350448,57	5153,59	1,47
2	t_R , min	5,76	0,07	1,25
	γ , mg/L	94235,81	3212,70	3,41
0,6	t_R , min	5,78	0,06	1,05
	γ , mg/L	30363,47	2460,19	8,10

Tablica 14. Rezultat međupreciznosti za smjesu na koloni C18.

IVERMEKTIN				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	32,29	0,02	0,07
	γ , mg/L	8,38	0,62	7,42
2	t_R , min	31,20	0,62	1,98
	γ , mg/L	2,03	0,21	10,33
0,6	t_R , min	30,67	0,02	0,05
	γ , mg/L	0,50	0,02	3,57
KLOZANTEL				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	24,92	0,03	0,10
	γ , mg/L	7,56	0,49	6,49
2	t_R , min	24,67	0,15	0,62
	γ , mg/L	1,96	0,10	4,89
0,6	t_R , min	24,55	0,01	0,05
	γ , mg/L	0,62	0,04	5,98
BARICITINIB				
γ , mg/L		X_{sr}	s	RSD, %
8	t_R , min	9,35	0,05	0,55
	γ , mg/L	7,27	0,71	9,83
2	t_R , min	9,22	0,05	0,51
	γ , mg/L	1,97	0,18	9,05
0,6	t_R , min	9,11	0,03	0,33
	γ , mg/L	0,56	0,05	9,87

4.2.5. Iskoristivost

Iskoristivost rezultata mjerenja odredili smo na temelju podataka korištenih za ispitivanje farmaceutika koji su prikazani u **Tablicama 7-10**.

Rezultati računanja iskoristivosti dobiveni su sukladno izrazu (1), a prikazani su u **Tablicama 15-18**.

Tablica 15. Iskoristivost ivermektina

IVERMEKTIN		
	C18 kolona	C8 kolona
γ , mg/L	Iskoristivost, %	Iskoristivost, %
8	90,25	104,07
2	93,29	111,86
0,6	93,32	95,98

Tablica 16. Iskoristivost klozantela.

KLOZANTEL		
	C18 kolona	C8 kolona
γ , mg/L	Iskoristivost, %	Iskoristivost, %
8	96,18	38,91
2	95,24	94,38
0,6	98,40	54,84

Tablica 17. Iskoristivost baricitiniba.

BARICITINIB		
	C18 kolona	C8 kolona
γ , mg/L	Iskoristivost, %	Iskoristivost, %
8	101,87	3465182
2	109,89	4905407
0,6	101,96	3954195

Tablica 18. Iskoristivost smjese.

C18 kolona		
Farmaceutik	γ , mg/L	Iskoristivost, %
Ivermektin	8	99,26
	2	98,45
	0,6	85,88
Klozantel	8	90,45
	2	100,71
	0,6	96,90
Barinitib	8	92,44
	2	96,24
	0,6	100,70

Iz gore prikazanih tablica vidljivo je da su rasponi iskoristivosti unutar kriterija (90 % - 110 %) za sve navedene farmaceutike analizirane na koloni C18. Odstupanje od kriterija javlja se kod svih farmaceutika analiziranih na koloni C8. Iz navedenog možemo zaključiti da je metoda istinita samo pri korištenju C18 kolone.

4.2.6. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) računati su na dva načina: računski prema izrazima (2) i (3) i grafički pomoću grafova linearnosti. Rezultati su prikazani u **Tablicama 19-22**.

Tablica 19. Računski rezultati izračuna granica detekcije i kvantifikacije.

Farmaceutik	Kolona C18		Kolona C8	
	GD, mg/L	GK, mg/L	GD, mg/L	GK, mg/L
Ivermektin	0,51	1,55	0,68	2,07
Klozantel	0,25	0,77	1,49	4,51
Baricitinib	0,32	0,99	/	/

Tablica 20. Računski rezultati izračuna granice detekcije i kvantifikacije za otopinu smjese farmaceutika .

Smjesa				
	C18		C8	
Farmaceutik	GD, mg/L	GK, mg/L	GD,mg/L	GK, mg/L
Ivermektin	1,25	3,79	1,26	3,83
Klozantel	1,79	5,42	2,05	6,22
Baricitinib	1,01	3,06	1,01	3,08

Za određivanje GD i GK korišteni su podaci sa **Slika 15-22**.

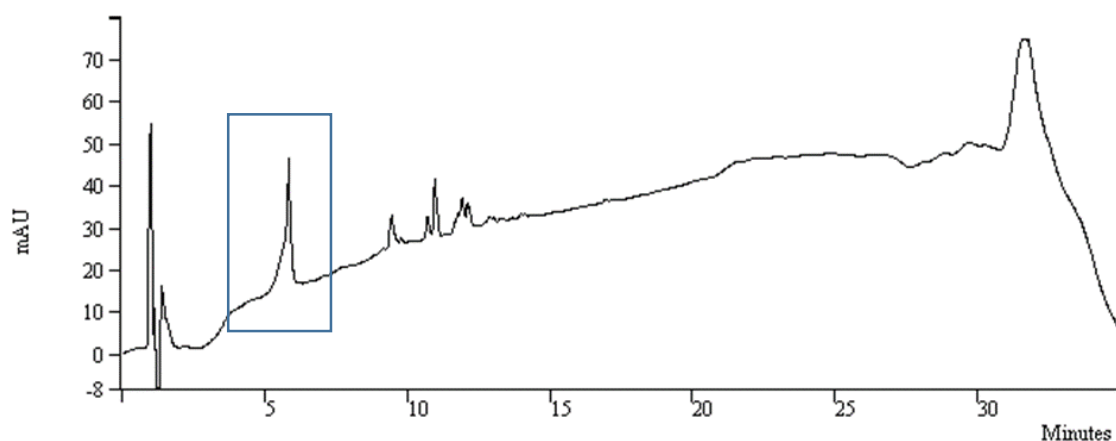
Tablica 21. Grafički određena granica detekcije i kvantifikacije.

	C18		C8	
Farmaceutik	GD, mg/L	GK, mg/L	GD, mg/L	GK, mg/L
Ivermektin	0,125	0,25	0,125	0,25
Klozantel	0,05	0,1	0,125	0,25
Baricitinib	0,05	0,1	0,5	1

Tablica 22. Grafički određena granica detekcije i kvantifikacije za otopinu smjese farmaceutika.

Smjesa				
	C18		C8	
Farmaceutik	GD, mg/L	GK, mg/L	GD, mg/L	GK, mg/L
Ivermektin	0,05	0,1	0,25	0,5
Klozantel	0,05	0,1	0,25	0,5
Baricitinib	0,05	0,1	0,25	0,5

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako je metoda s kolonom C18 bolja od one s kolonom C8 jer su granice detekcije i kvantifikacije niže za sve promatrane analite i smjesu. Također primjećujemo kako nije bilo moguće računski odrediti GD i GK za baricitinib na koloni C8, kako se pokazalo u podacima za linearnost gdje nije bilo moguće pouzdano mjeriti koncentraciju analita ispod 1 mg/L. U prilog tomu govori **Slika 25**, koja jasno predočava širenje kromatografske krivulje na koloni C8. Općenito gledano, vrijednosti granica detekcije i kvantifikacije izračunate računski daju puno veće vrijednosti od onih određenih grafički.



Slika 25. Kromatogram za baricitinib na koloni C8 pri 2mg/L.

4.2.7. Radno područje

Radno područje se definira kao raspon između donje i gornje granice koncentracije analita unutar kojeg je moguće kvantificirati analit uz zadovoljavajuću linearnost, preciznost i točnost. Kao donja granica uzeta je GK, a kao gornja granica uzeta je najviša koncentracija analita koja pritom zadovoljava linearnost. Vrijednosti se nalaze u **Tablicama 23 i 24.**

Tablica 23. Radna područja farmaceutika.

Farmaceutik	C18		C8	
	Donja granica, mg/L	Gornja granica, mg/L	Donja granica, mg/L	Gornja granica, mg/L
Ivermektin	1,55	10	2,07	10
Klozantel	0,77	10	4,51	10
Baricitinib	0,99	10	/	10

Tablica 24. Radna područja unutar smjese.

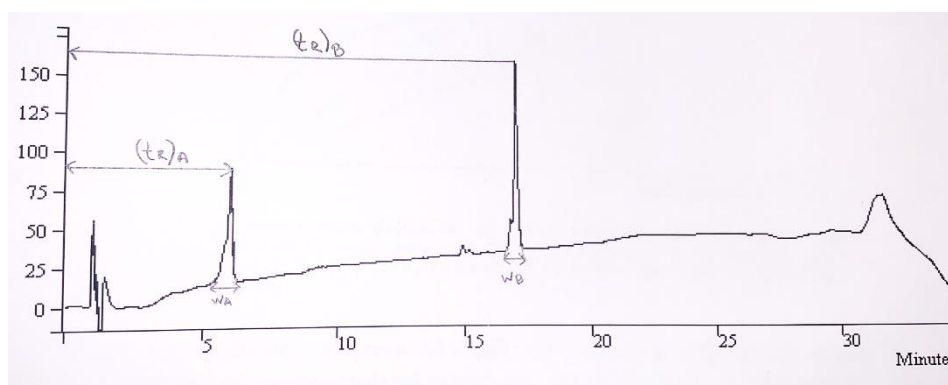
Farmaceutik	Smjesa			
	C18		C8	
	Donja granica, mg/L	Gornja granica, mg/L	Donja granica, mg/L	Gornja granica, mg/L
Ivermektin	3,79	10	3,83	10
Klozantel	5,42	10	6,22	10
Baricitinib	3,06	10	3,08	10

Kako je vidljivo u rezultatima kolona C18 pogodnija je za analizu budući da pruža veći raspon radnog područja u odnosu na kolonu C8.

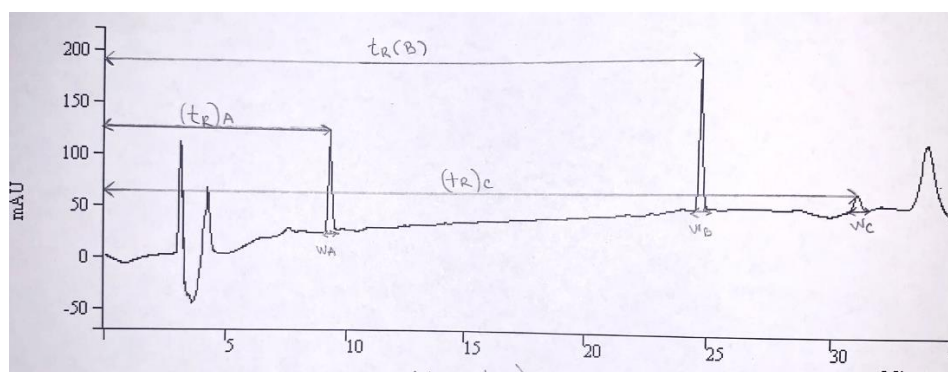
4.3. Faktor razlučivanja (R_s)

Stupanj razlučivanja dvije kromatografski krivulja definira se kao R_s -vrijednost, odnosno omjer između dviju susjednih krivulja i njihove bazne širine.

Na Slikama 26 i 27 prikazan je način određivanja R_s -vrijednosti pri valnoj duljini od 223 nm za obje kolone.



Slika 26. Određivanje R_s vrijednosti na koloni C8 pri valnoj duljini 223nm.

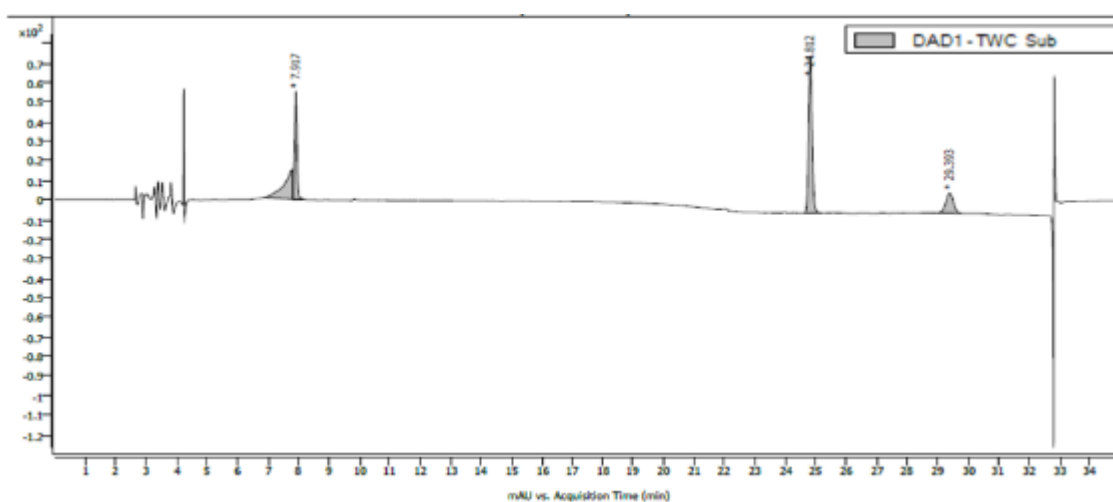


Slika 27. Određivanje R_s vrijednosti na koloni C18 pri valnoj duljini 223nm.

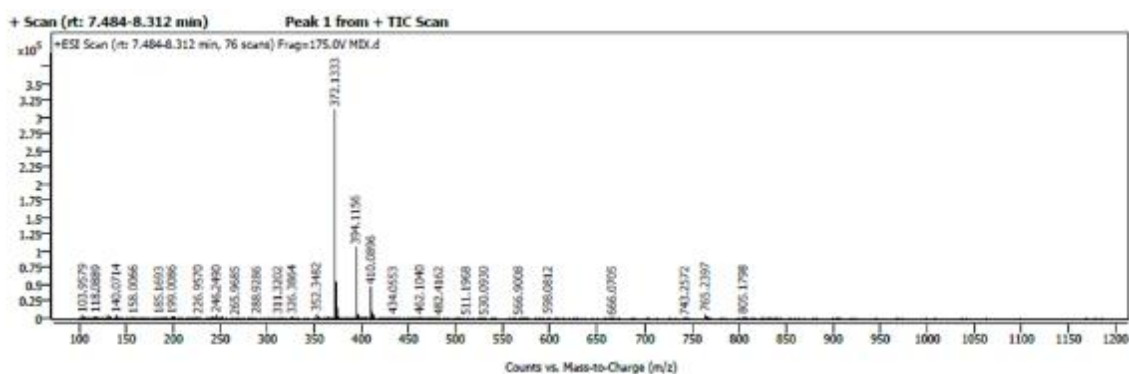
Iz izraza (5) dobivene su vrijednosti $R_{S1}=21$ i $R_{S2}=10$ za kolonu C18 te vrijednost $R_{S1}=17$ za kolonu C8. Može zaključiti kako je R_{S1} vrijednost na koloni C18 veći od R_{S1} vrijednosti na koloni C8. Budući da je došlo do preklapanja kromatografskih krivulja ivermektina i klozantela R_{S2} vrijednost nije bilo ni moguće odrediti na koloni C8. Stoga zaključujemo kako je metoda pri kojoj je korištena kolona C18 pogodnija za analizu farmaceutika zbog zadovoljenog kriterija $R_s \geq 1,5$.

4.4. Transfer metode na HPLC-MS/MS instrument

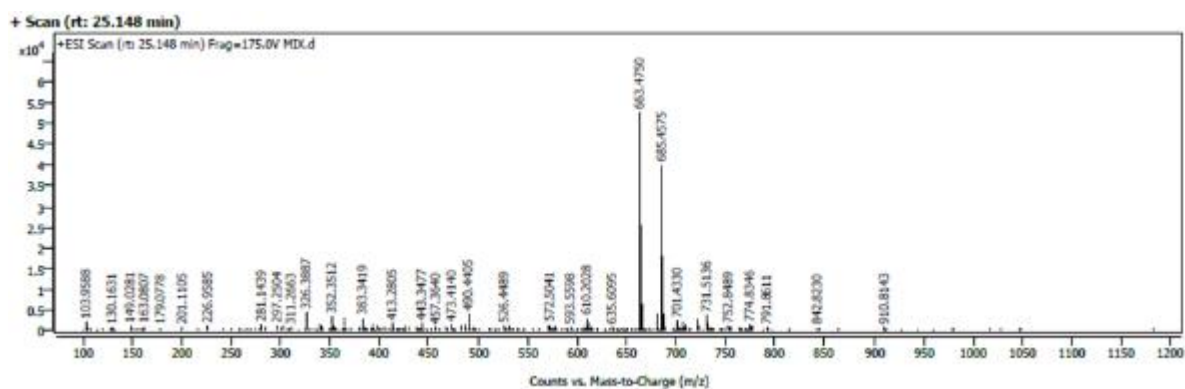
Nakon razvijene metode na HPLC-DAD instrumentu metoda je transverirana odnosno prenijeta sa potpunom istim uvjetima na HPLC-MS/MS instrument (Agilent LC sistem 1260 Infinity – Agilent 6540 UHD Q-TOF). Na ovdje prikazanom DAD kromatogramu (**Slika 28.**) krivulja na $t_R=7,92$ min pripada baricitinibu, krivulja na $t_R=24,81$ min pripada klozantelu, a krivulja na $t_R=29,39$ min ivermektinu što se poklapa s razvijenom metodom na HPLC-DAD instrumentu. Razlika između ovih dviju metoda, osim u detektoru je i u koloni, na HPLC-MS/MS kromatografskom sustavu koristila se Symmetry C18 5 μ m 4.6 \times 150mm (30 °C) kolona. Na **Slikama 29-31** prikazani su spektri masa za svaku komponentu, no metoda se mora optimirati za klozantel, jer nije moguće integrirati površinu krivulje na kromatogramu. Na HPLC-MS/MS sustavu vidljiv je gentamicin kojeg nije moguće vidjeti na HPLC-DAD sustavu.



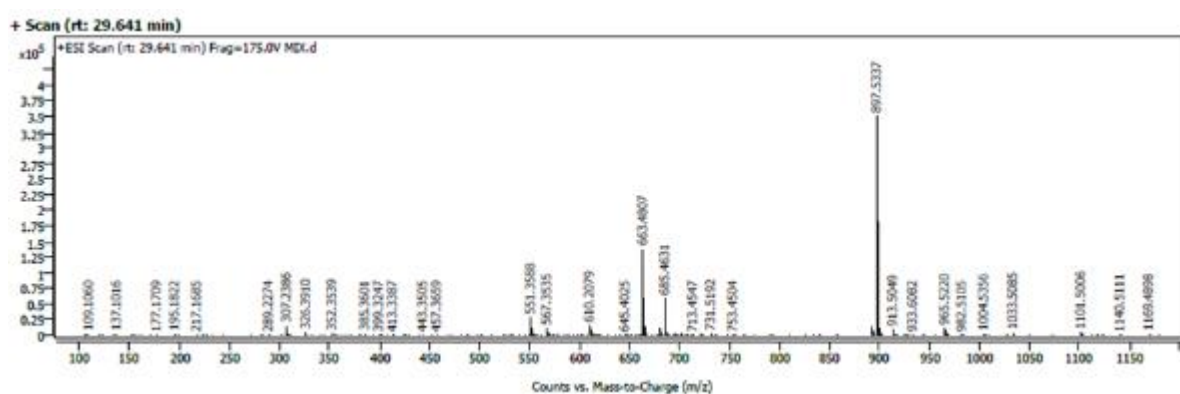
Slika 28. DAD kromatogram dobiven na HPLC-MS/MS Agilent kod istih uvjeta koji su korišteni na HPLC-DAD Varian ProStar kromatografskom sustavu.



Slika 29. Maseni spektar baricitiniba.

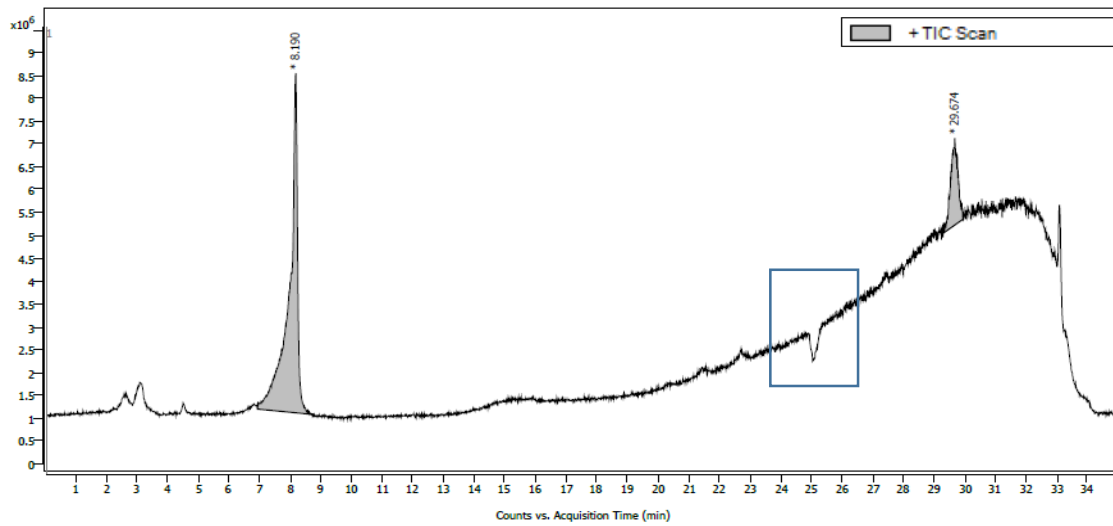


Slika 30. Maseni spektar klozantela.



Slika 31. Maseni spektar ivermektina.

Metoda se je s HPLC-DAD kromatografskog sustava koji je imao bolje rezultate na C18 koloni pokušala transferirati na HPLC-MS/MS sustav, no za transferiranje metode nužno je provesti ionizaciju klozantela na spektrometru masa u negativnom modu. Naime, prilikom prijenosa metode na HPLC-MS/MS na koloni Symmetry C18 5 μ m 4,6 x 150 mm dobiva se negativna kromatografska krivulja za klozantel (Slika 32.). Međutim, osim prilagodbe uvjeta na spektrometru masa za klozantel, nužno je optimirati i kromatografske uvjete na novoj kromatografskoj koloni HPLC-MS/MS sustava prije validacije metode, a to će biti tema idućeg istraživanja.



Slika 32. Prikaz pada mase za klozentel.

5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je razviti učinkovitu metodu za analizu pseudopostojanih onečišćivala u vodama. Metoda se prvo provodila na dvije kolone na HPLC-DAD uređaju i zatim se ju je pokušalo transverirati tj. prebaciti na HPLC-MS/MS kromatografski sustav. Iz obrađenih podataka dobivenih analizom pri kojoj je korištena kolona C18 svi parametri validacije su zadovoljeni kako za pojedinačne otopine farmaceutika tako i za njihovu smjesu. Selektivnost/specifičnost nije odrađena, budući da je cilj rada bio razviti zadovoljavajuću metodu. U ispitivanju nisu korišteni realni uzorci, te se nije mogla usporediti selektivnost i specifičnost. Kolona C8 nije zadovoljila parametre validacije na HPLC-DAD kromatografskom sustavu. Obradu podataka prilikom analize smjese za određivanja preciznosti nije bilo moguće odraditi budući da je prilikom detekcije dolazilo do preklapanja kromatografskih krivulja na istom vremenu zadržavanja, što je rezultat vrlo sličnih fizikalno-kemijskih svojstava ta dva farmaceutika. Također vrijeme zadržavanja baricitiniba bilo je previše blizu mrtvog vremena zbog čega izgled kromatografskih krivulja nije bio pogodan za određivanje površina i daljnju obradu podataka. Razvijena metoda na HPLC-DAD instrumentu je prebačena sa potpunom istim uvjetima na HPLC-MS/MS kromatografski sustav. Zaključeno je da je moguće dobiti spektre masa, no kromatografski uvjeti se moraju dodatno optimirati i obzirom na pokretnu fazu i obzirom na uvjete na spektrometru masa te stoga nije moguće validirati tu metodu.

6. LITERATURA

- [1] EPA: Profile of the pharmaceutical manufacturing industry, Office of Compliance Sector Notebook Project (1997).
- [2] A.P. Pollution Control Board, Hyderabad: Opportunities for waste minimization in bulk drug and dye intermediate industries. APPCB Information Bulletin, Publication 105, (1999) 1-4.
- [3] S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode, 24 (2016), 119 – 121.
- [4] C. S. McArdell; E. Molnar; M. J. F. Suter; W. Giger: Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland, *Environmental Science & Technology*, 37, (2003) 5479-5486.
- [5] C. Miège; J. M. Choubert; L. Ribeiro; M. Eusèbe; M. Coquery: Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157, (2009) 1721-1726.
- [6] M. Gros; M. Petrović; D. Barceló; Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, (2007) 1553–1562.
- [7] Y. Zhang; S.U. Geißen; C. Gal: Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73, (2008) 1151-1161.
- [8] S. K. Behera; H. W. Kim; H. S. Park: Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of the Total Environment*, 409, (2011.) 4351-4360.
- [9] B. Testa; A. Pedretti; G. Vistoli: Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug Discovery Today*, 17, (2012) 549-560.
- [10] E. Emmanuel; Y. Perrodin; G. Keck; J. M. Blanchard; P. Vermande: Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Material A*. 117, (2005) 1-11.

- [11] J. V. Holm; K. Rüge; P. L. Bjerg; T. H. Christensen: Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill. *Environmental Science and Technology*, 29, (1995) 1415-1420.
- [12] A. Pinheiro; R. M. R. Albano; T. C. Alves; V. Kaufmann; M. Rival da Silva: Veterinary antibiotics and hormones in water from application of pig slurry to soil. *Agricultural Water Management*, 129, (2013) 1–8.
- [13] L. J. Carter; E. Harris; M. Williams; J. J. Ryan; R. S. Kookana; A. B. A. Boxall A: Fate and uptake of pharmaceuticals in soil plant systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, (2014) 816-825.
- [14] S. Jobling; M. Nolan; C. R. Tyler; G. Brighty; J. P. Sumpter: Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*, 32, (1998) 2498–2506.
- [15] Klozantel,
<http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/vetMedPro/studeni%202019/Santiola> (preuzeto 31.08.2023).
- [16] A. Novobilský, J. Höglund: First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, Vol. 5, Issue 3, (2015), 172-173.
- [17] Closantel, <http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/CLOSANTEL.htm>, (preuzeto 01.09.2023).
- [18] Gentamicin, https://www.belupo.hr/media/products/Gentamicin_injekcijeUK5ZMNWC.pdf (preuzeto 01.09.2023).
- [19] Gentamicin, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00798>, (preuzeto 01.09.2023).
- [20] Baricitinib, https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/olumiant-epar-medicine-overview_hr.pdf, (preuzeto 01.09.2023).
- [21] Baricitinib,
https://en.wikipedia.org/wiki/Baricitinib#/media/File:Baricitinib_structure.svg, (preuzeto 01.09.2023).
- [22] Ivermektin, <https://recipe-cpsa.com/ivermektin-u-prevenciji-i-lijecenju-covid-19-bolesti-sto-kaze-znanost/>, (preuzeto 01.09.2023).

- [23] Ivermectin, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00602>, (pristup 02.09. 2023.).
- [24] Ivermektin, https://www.alims.gov.rs/doc_file/lekovi_veterina/pil/323-01-00389-21001.pdf, (preuzeto 02.09. 2023).
- [25] Tekućinska kromatografija, https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska_kromatografija_visoke_djelotvornosti, (preuzeto 02.09. 2023).
- [26] M. Vuković: Validacija HPLC –PDA metode za određivanje ciprofloksacina u vodi, Završni rad, (2021).
- [27] High Performance Liquid Chromatography, URL: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (preuzeto 02.09.2023.).
- [28] S. Lutteroti, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), URL: http://free-zg.tcom.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm (preuzeto 10.9.2023.).
- [29] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Svijet po mjeri*, 1 (2012) 61-64.
- [30] International Council for Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, European Medicines Agency, London, (1995), 4 - 7.
- [31] M. Kaštelan-Macan; M. Medić-Šarić; S. Turina: Plošna kromatografija, Farmaceutsko – biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2006), 54.
- [32] HPLC-MS/MS, <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-systems/analytical-hplc-systems/1260-infinity-ii-lc-system>, (preuzeto 02.09.2023.).

7. DODATAK

7.1. Popis slika

Slika 1. Strukturna formula klozantela.

Slika 2. Strukturna formula gentamicina.

Slika 3. Strukturna formula baricitiniba.

Slika 4. Strukturna formula ivermektina.

Slika 5. Suvremeni uređaj za tekućinsku kromatografiju.

Slika 6. Shematski prikaz HPLC uređaja.

Slika 7. Analitička vaga (Mettler Toledo, AB 104, Švicarska).

Slika 8. Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin Njemačka 1200 W.

Slika 9. Kromatograf Varian ProStar, SAD.

Slika 10. HPLC-MS/MS kromatograf (Agilent LC sistem 1260 Infinity, USA)

Slika 11. Apsorpcijski spektar gentamicina u metanolu.

Slika 12. Apsorpcijski spektar ivermektina u metanolu.

Slika 13. Apsorpcijski spektar klozantela u metanolu.

Slika 14. Apsorpcijski spektar baricitiniba u metanolu.

Slika 15. Umjerni pravac ivermektina (kolona C18).

Slika 16. Umjerni pravac ivermektina (kolona C8).

Slika 17. Umjerni pravac ivermektina (kolona C18).

Slika 18. Umjerni pravac klozantela (kolona C8).

Slika 19. Umjerni pravac baricitiniba (kolona C18).

Slika 20. Umjerni pravac baricitiniba (kolona C8).

Slika 21. Umjerni pravac za smjesu (kolona C18).

Slika 22. Umjerni pravac za smjesu (kolona C8).

Slika 23. Prikaz kromatograma za smjesu pri 2mg/L.

Slika 24. Prikaz kromatograma za smjesu pri 2mg/L.

Slika 25. Kromatogram za baricitinib na koloni C8 pri 2mg/

Slika 26. Određivanje R_S vrijednosti na koloni C8 pri valnoj duljini 223nm.

Slika 27. Određivanje R_S vrijednosti na koloni C18 pri valnoj duljini 223nm.

Slika 28. DAD kromatogram.

Slika 29. Maseni kromatogram baricitiniba.

Slika 30. Maseni kromatogram klozantela.

Slika 31. Maseni kromatogram ivermektin.

Slika 32. Prikaz pada mase za klozentel.

7.2. Popis tablica

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u istraživanju, njihove čistoće i njihova proizvođača.

Tablica 2. Gradijent pokretne faze.

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika.

Tablica 4. Prikaz valnih duljina i vremena zadržavanja.

Tablica 5. Kriteriji prihvatljivosti.

Tablica 6. Osjetljivost metode .

Tablica 7. Rezultati ponovljivosti za otopinu ivermektina.

Tablica 8. Rezultati ponovljivosti za otopinu klozantela.

Tablica 9. Rezultati ponovljivosti za otopinu baricitiniba.

Tablica 10. Rezultat ponovljivosti za smjesu na koloni C18.

Tablica 11. Rezultat međupreciznosti za ivermektin .

Tablica 12. Rezultat međupreciznosti za klozantel.

Tablica 13. Rezultat međupreciznosti za baricitinib.

Tablica 14. Rezultat međupreciznosti za smjesu na koloni C18.

Tablica 15. Iskoristivost ivermektina.

Tablica 16. Iskoristivost klozantela.

Tablica 17. Iskoristivost baricitiniba.

Tablica 18. Iskoristivost smjese.

Tablica 19. Računski rezultati izračuna granica detekcije i kvantifikacije.

Tablica 20. Računski rezultati izračuna granice detekcije i kvantifikacije za smjesu.

Tablica 21. Grafički određena granica detekcije i kvantifikacije.

Tablica 22. Grafički određena granica detekcije i kvantifikacije za smjesu.

Tablica 23. Radna područja farmaceutika.

Tablica 24. Radna područja unutar smjese.

8. ŽIVOTOPIS

Zovem se Petra Batinić, [REDACTED] Završila sam Opću gimnaziju fra Dominik Mandić. Trenutno sam studentica treće godine Fakultet kemijskog inženjerstva u Zagrebu. Pohađala sam Cezar radionice u sklopu fakulteta. Stručnu praksu sam odradila na Agronomskom i prehrambenom fakultetu u Mostaru , na zavodu za Pedologiju u svrhu određivanja fizikalno-kemijskih značajki tla.