

# Kvalitativno i kvantitativno određivanje ibuprofena i karbendazima pomoću UHPLC-DAD-MS/MS

---

**Delaš, Bruna**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:534353>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-27**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE IBUPROFENA I  
KARBENDAZIMA POMOĆU UHPLC-DAD-MS/MS**

**DIPLOMSKI RAD**

**BRUNA DELAŠ**

**Matični broj: 190**

**Split, listopad 2024.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**  
**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE**  
**IBUPROFENA I KARBENDAZIMA POMOĆU**  
**UHPLC-DAD-MS/MS**

**DIPLOMSKI RAD**

**BRUNA DELAŠ**

**Matični broj: 190**

**Split, listopad 2024.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**MASTER STUDY OF CHEMISTRY**  
**ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF  
IBUPROFEN AND CARBENDAZIM USING UHPLC-DAD-MS/MS**

**DIPLOMA THESIS**

**BRUNA DELAŠ**

**Parent number: 190**

**Split, October 2024**

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet  
Diplomski studij kemije – organska kemija i biokemija

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE IBUPROFENA I KARBENDAZIMA  
POMOĆU UHPLC-DAD-MS/MS**

Bruna Delaš, 190

**Sažetak:**

Ovaj rad pruža teorijski uvid u biološki aktivne tvari ibuprofen i karbendazim, te način njihovog dospijevanja u okoliš. Također, opisani su osnovni principi kromatografskih tehnika s naglaskom na UHPLC-DAD-MS/MS te razvoj instrumentalne metode.

Kao otapalo za pripremu standardnih otopina ibuprofena i karbendazima odabran je metanol. Eksperimentalno je odabrana kolona te sastav pokretne faze za tekućinsku kromatografiju. Uz to optimiziran je protok, gradijent pokretne faze, temperatura kolone i volumen injektiranja. Na trostrukom četveropolnom spektrometru masa određene su vrijednosti  $m/z$  iona prekursora i produkata, odnosno prijelazi karakteristični za svaki analit te pripadajuće vrijednosti energija sraza. Optimiziran je i tlak inertnog plina koji omogućuju disocijaciju molekuskog iona kao i ostali parametri spektrometrije masa. Metoda je u konačnici vrednovana određivanjem: specifičnosti, linearnog dijela krivulje umjeravanja, granica dokazivanja i određivanja, točnosti, preciznosti, prikladnosti sustava, robusnosti i stabilnosti otopine analita.

Naposljetku, na temelju dobivenih rezultata, donesen je zaključak o prikladnosti metode za korištenje pri analizi realnih uzoraka.

**Ključne riječi:** ibuprofen, karbendazim, UHPLC-DAD-MS/MS, vrednovanje

**Rad sadrži:** 63 stranice, 33 slike, 17 tablica, 5 priloga, 45 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:**

- |                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| 1. prof. dr. sc. Ivica Blažević     | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Ivona Nuić    | član        |
| 3. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul | mentor      |

**Datum obrane:**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology  
Master study of chemistry – organic chemistry and biochemistry

**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Chemistry  
**Supervisor:** Assoc. Prof. Franko Burčul, PhD

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF IBUPROFEN AND  
CARBENDAZIM USING UHPLC-DAD-MS/MS**

Bruna Delaš, 190

**Abstract:**

This paper provides a theoretical insight into the biologically active substances ibuprofen and carbendazim and how they enter the environment. Additionally, the basic principles of the chromatography techniques in particular UHPLC-DAD-MS/MS are described, as well as the development of the instrumental method. To prepare standard solutions of ibuprofen and carbendazim, methanol was selected as a solvent. The column and the composition of the mobile phase for the liquid chromatograph were selected experimentally. Additionally, the flow, mobile phase gradient, column temperature and injection volume were optimized too. On the triple quadrupole mass spectrometer, the  $m/z$  values of precursor ions and product ions, characteristic transitions for each analyte, and the corresponding collision energy values were determined. Inert gas pressure that enables the dissociation of the molecular ions as well as other mass spectrometry parameters were optimized too. The method was validated by determining specificity, the linear part of the calibration curve, limits of detection and quantification, accuracy, precision, system suitability, robustness, and analyte solution stability.

Finally, based on the obtained results, a conclusion about the suitability of the method for use in real samples analysis was made.

**Key words:** ibuprofen, carbendazim, UHPLC-DAD-MS/MS, validation

**Thesis contains:** 63 pages, 33 figures, 17 tables, 5 supplements, 45 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:**

1. Prof. Ivica Blažević, PhD chair person
2. Assoc. Prof. Ivona Nuić, PhD member
3. Assoc. Prof. Franko Burčul, PhD supervisor

**Defence date:**

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposed** in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Franka Burčula i neposrednim vodstvom asistentice Ane Vučak, mag. chem., u razdoblju od travnja do listopada 2024. godine.*



*Zahvaljujem se mentorima, izv. prof. dr. sc. Franku Burčulu i asistentici Ani Vučak, mag. chem. na izuzetnom angažmanu i strpljivom rješavanju svih mojih nedoumica tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojim prijateljima i kolegama koji su mi pružali riječi podrške kada je to bilo potrebno.*

*Hvala cijeloj mojoj obitelji, a najviše mami, tati i sestri što su uvijek bili moja mirna luka, podrška i vjerovali u mene.*

*Dio opreme korištene u ovom radu financiran je iz projekta EU „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“, KK. 01.1.1.02.0018.*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je razviti metodu za odijeljivanje ibuprofena i karbendazima iz smjese te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti, s detektorom s nizom dioda, spregnutom s tandemskom spektrometrijom masa. Razvoj metode uključuje:

- pripravu standardnih otopina;
- optimizaciju parametara spektrometra masa i definiranje karakterističnih  $m/z$  iona prekursora i iona produkata za pojedini analit;
- proučavanje UV-Vis apsorpcijskih spektara snimljenih na detektoru s nizom dioda (DAD);
- optimizaciju parametara tekućinskog kromatografa koji omogućuju što bolje razdvajanje analita i odziv na detektoru;
- vrednovanje metode.

## SAŽETAK

Ovaj rad pruža teorijski uvid u biološki aktivne tvari ibuprofen i karbendazim, te način njihovog dospijevanja u okoliš. Također, opisani su osnovni principi kromatografskih tehnika s naglaskom na UHPLC-DAD-MS/MS te razvoj instrumentalne metode.

Kao otapalo za pripravu standardnih otopina ibuprofena i karbendazima odabran je metanol. Eksperimentalno je odabrana kolona te sastav pokretne faze za tekućinsku kromatografiju. Uz to optimiziran je protok, gradijent pokretne faze, temperatura kolone i volumen injektiranja. Na trostrukom četveropolnom spektrometru masa određene su vrijednosti  $m/z$  iona prekursora i produkata, odnosno prijelazi karakteristični za svaki analit te pripadajuće vrijednosti energija sraza. Optimiziran je i tlak inertnog plina koji omogućuju disocijaciju molekuskog iona kao i ostali parametri spektrometrije masa. Metoda je u konačnici vrednovana određivanjem: specifičnosti, linearnog dijela krivulje umjeravanja, granica dokazivanja i određivanja, točnosti, preciznosti, prikladnosti sustava, robusnosti i stabilnosti otopine analita.

Naposljetku, na temelju dobivenih rezultata, donesen je zaključak o prikladnosti metode za korištenje pri analizi realnih uzoraka.

**Ključne riječi:** ibuprofen, karbendazim, UHPLC-DAD-MS/MS, vrednovanje

## ABSTRACT

This paper provides a theoretical insight into the biologically active substances ibuprofen and carbendazim and how they enter the environment. Additionally, the basic principles of the chromatography techniques in particular UHPLC-DAD-MS/MS are described, as well as the development of the instrumental method.

To prepare standard solutions of ibuprofen and carbendazim, methanol was selected as a solvent. The column and the composition of the mobile phase for the liquid chromatograph were selected experimentally. Additionally, the flow, mobile phase gradient, column temperature and injection volume were optimized too. On the triple quadrupole mass spectrometer, the  $m/z$  values of precursor ions and product ions, characteristic transitions for each analyte, and the corresponding collision energy values were determined. Inert gas pressure that enables the dissociation of the molecular ions as well as other mass spectrometry parameters were optimized too. The method was validated by determining specificity, the linear part of the calibration curve, limits of detection and quantification, accuracy, precision, system suitability, robustness, and analyte solution stability.

Finally, based on the obtained results, a conclusion about the suitability of the method for use in real samples analysis was made.

**Key words:** ibuprofen, carbendazim, UHPLC-DAD-MS/MS, validation

# SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Ibuprofen	2
1.2. Karbendazim	3
1.3. Fizikalna i kemijska svojstva ibuprofena i karbendazima	4
1.4. Kromatografija	5
1.4.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti	7
1.4.2. Detektori	10
1.4.3. Kromatogram	12
1.5. Spektrometrija masa	14
1.5.1. Vrste ionizatora	16
1.5.2. Vrste analizatora masa	18
1.6. Vrednovanje metode	20
2. EKSPERIMENTALNI DIO	22
2.1. Korištene kemikalije	22
2.2. Korištena oprema	23
2.3. Priprema otopina	25
2.3.1. Odabir otapala	25
2.3.2. Standardne otopine	25
2.3.3. Otopine za optimizaciju parametara spektrometra masa	25
2.3.4. Otopine za optimizaciju UHPLC metode	26
2.3.5. Otopine za krivulju umjeravanja	26
2.3.6. Otopine za vrednovanje metode	27
2.4. Optimizacija parametara spektrometra masa	27
2.5. Optimizacija UHPLC metode	28

3.	REZULTATI I RASPRAVA	29
3.1.	Optimizacija parametara spektrometra masa	29
3.1.1.	Pozitivan ili negativan način rada	29
3.1.2.	Tlak plina za disocijaciju izazvanu sudarom	30
3.1.3.	Prijelazi ion prekursor → ion produkt	31
3.1.4.	Ostali parametri	33
3.2.	Identifikacija analita na DAD detektoru	35
3.3.	Optimizacija UHPLC metode	37
3.3.1.	Odabir otapala i modifikatora pokretne faze	37
3.3.2.	Odabir kolone	40
3.3.3.	Optimizacija temperature kolone	41
3.3.4.	Optimizacija volumena injektiranja	41
3.3.5.	Vrijeme zadržavanja	42
3.4.	Vrednovanje metode	44
3.4.1.	Specifičnost	44
3.4.2.	Raspon i linearnost	44
3.4.3.	Granice dokazivanja i određivanja	46
3.4.4.	Točnost	47
3.4.5.	Preciznost – ponovljivost i srednja preciznost	48
3.4.6.	Prikladnost sustava	49
3.4.7.	Robusnost	50
3.4.8.	Stabilnost	51
4.	ZAKLJUČAK	53
5.	POPIS KRATICA I SIMBOLA	55
6.	LITERATURA	57
7.	PRILOZI	62

## UVOD

Ibuprofen je farmakološki aktivna tvar s protuupalnim djelovanjem, lako dostupna javnosti, što rezultira njenom značajnom upotrebom. Koristi se za liječenje ljudi i životinja, odnosno u medicini i veterini. Slično tomu, karbendazim je također aktivna tvar iz skupine pesticida fungicidnog djelovanja na širok spektar gljivičnih nametnika. Ima minimalan utjecaj na ljudski i životinjski organizam te zahvaljujući tome primjenu pronalazi u suzbijanju i eliminaciji gljivičnih parazita na plodovima biljaka i samim biljkama.

Tekućinska kromatografija koristi se za odjeljivanje komponenti iz smjese, a za kvalitativno i kvantitativno dokazivanje spregnuta je sa spektrometrijom masa koju odlikuje vrlo visoka osjetljivost i mogućnost identifikacije raznih analita. Detekcija molekula odvija se na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) iona koji nastaju iz spomenute čestice. Detektor s nizom dioda ukomponiran u tekućinski kromatograf omogućuje dodatnu potvrdu pri identifikaciji analita.

Razvoj metode za odijeljivanje, kvalitativno i kvantitativno dokazivanje tvari tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemskom spektrometrijom masa zahtijeva optimizaciju parametara na uređaju te naposljetku vrednovanje metode ispitivanjem otopina s poznatom količinom tvari. Vrednovanjem se dobije informacija o prikladnosti metode za upotrebu u analizi realnih uzoraka.

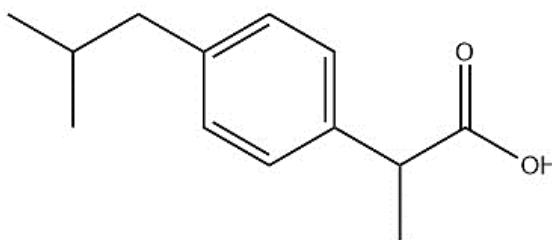
Zbog učestale uporabe ibuprofen i karbendazim lako dopijevaju u vodeni okoliš. Stoga je u ovom radu razvijena i vrednovana metoda za njihovo odijeljivanje iz smjese te kvalitativno i kvantitativno dokazivanje pomoću UHPLC-DAD-MS/MS tehnike.



# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Ibuprofen

Ibuprofen (slika 1) je biološki aktivna tvar iz skupine nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *Nonsteroidal anti-inflammatory drug*, NSAID) i podskupine derivata propanske kiseline.<sup>1</sup>



**Slika 1.** Struktura ibuprofena.

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) na listu esencijalnih lijekova svrstala ga je 2010. godine.<sup>2</sup> Kao i ostali NSAID, na ljudski i životinjski organizam djeluju protuupalno, analgetički i antipiretički. Prikladan je za oralno i intravenozno korištenje te se brzo distribuira u tijelu zbog gotovo stopostotnog vezanja za albumin krvne plazme.<sup>3</sup> Djelovanje ove skupine lijekova temelji se na inhibiciji enzima ciklooksigenaza (COX), koji su odgovorni za katalizu prve reakcije od niza kemijskih reakcija sinteze prostaglandina iz arahidonske kiseline. Ibuprofen je neselektivan prema ciklooksigenazama, odnosno djeluje jednako na obje vrste – COX-1 i COX-2. COX-1, osim što kao i COX-2 djeluje na mjestu upale, sudjeluje i u stvaranju zaštitnog sloja želučane sluznice.<sup>1</sup>

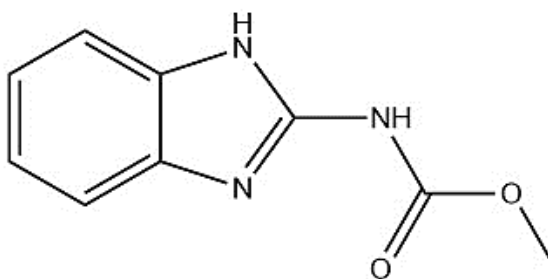
Ibuprofen je jedan od poznatijih lijekova u svijetu te se koristi u medicini, odnosno za liječenje ljudi i u veterini za liječenje životinja. Također je vrlo lako dostupan široj populaciji jer za njegovu nabavu nije potreban liječnički recept. Nakon oralne konzumacije dolazi do metaboličke razgradnje ove biološki aktivne tvari, pri čemu se dio izluči u izvornom, konjugiranom ili hidroksiliranom obliku.<sup>3</sup>

Zbog široko rasprostranjene uporabe lako dospijeva u vodeni okoliš, kao produkt metaboličke razgradnje pri čemu se dio derivata ibuprofena vrati u izvorno stanje ili se transformira u neki toksični oblik. Drugi način dospijevanja u okoliš, općenito, pa tako i

u vodeni okoliš je nesavjesnim odlaganjem proizvoda kojima je istekao rok trajanja od strane samog korisnika ili, u nepovoljnijem slučaju, od farmaceutskih tvrtki.<sup>3</sup> Vrijeme polu-života ibuprofena u vodama uz prisutnost bakterija je oko 20 dana.<sup>4</sup>

## 1.2. Karbendazim

Karbendazim (slika 2) je aktivna tvar iz skupine pesticida s fungicidnim djelovanjem. Zahvaljujući benzimidazolnom prstenu u strukturi ubraja se u skupinu benzimidazolnih fungicida.<sup>5</sup>



Slika 2. Struktura karbendazima.

Djeluje na širok spektar gljivičnih nametnika te se koristi za tretiranje ratarskih usjeva, voća, povrća, ukrasnog i ljekovitog bilja prije žetve ili branja, ali i za tretiranje plodova nakon branja. Osim fungicidnog djelovanja na biljke, kod ljudi i miševa može imati antikancerogeno djelovanje.<sup>6</sup>

Uporaba pesticida u svijetu na godišnjoj razini doseže vrijednost od 2 milijuna tona, od čega 45 % pripada Europi.<sup>6</sup> Stoga je Svjetska zdravstvena organizacija ispitala toksično djelovanje karbendazima na ljudski i životinjski organizam te ga na temelju toga uvrstila u skupinu pesticida s malom vjerojatnošću akutne opasnosti.<sup>7</sup>

Tretiranjem poljoprivrednih površina karbendazim se širi u okolišu, a zalijevanjem i oborinskim vodama vrlo lako protječe u vodeni okoliš (rijeke, mora, jezera, podzemne vode i sl.). Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) vrijeme polu-života u tlu mu je 6 – 12 mjeseci, dok se u vodi polovica početne koncentracije raspadne za 2 – 25 dana.<sup>8</sup>

### 1.3. Fizikalna i kemijska svojstva ibuprofena i karbendazima

U tablici 1 prikazani su IUPAC nazivi ibuprofena i karbendazima, njihove molekulske formule te fizikalna i kemijska svojstva ovih dvaju spojeva.

**Tablica 1.** Fizikalna i kemijska svojstva ibuprofena<sup>9</sup> i karbendazima<sup>10</sup>.

	<b>IBUPROFEN</b>	<b>KARBENDAZIM</b>
<b>IUPAC naziv</b>	2-[4-(2-metilpropil)fenil]- -propanska kiselina	metil- <i>N</i> -(1 <i>H</i> -benzimidazol- -2-il)karbamat
<b>Molekulska formula</b>	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
<b>Molarna masa [g/mol]</b>	206,28	191,19
<b>Topljivost u vodi [mg/L] na 25 °C pri pH 7</b>	21	8
<b>Topljivost u etanolu [mg/mL] na 25 °C</b>	60	0,3
<b>p<i>K</i><sub>a</sub></b>	4,45	4,29
<b>Temperatura tališta [°C]</b>	76	-*
<b>Temperatura vrelišta [°C]</b>	157	-

\*karbendazim ne prelazi iz čvrstog agregatnog stanja u tekuće, već se pri temperaturi od 300 °C raspada

## 1.4. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja komponenti smjese na temelju njihove raspodjele između pokretne i nepokretne faze.<sup>11</sup> Ruski botaničar i kemičar Mihail S. Cvet prvi je put opisao u svom radu 1906. godine kada je razdvajao biljni pigment klorofil na pojedinačne sastavnice. Usku cijev napunio je čvrstim kalcijevim karbonatom (nepokretna faza), zatim na vrh postavio klorofil i na to dolijevao tekući eter (pokretna faza) koji je otapao klorofil i omogućio protjecanje pigmenta kroz punjenje.<sup>12</sup> Iako na početku kromatografija nije dobila pozornost ostalih znanstvenika, s vremenom je doživjela ubrzan razvoj te danas podrazumijeva analitičku instrumentalnu tehniku koja se izvodi na uređaju – kromatografu.<sup>11</sup>

Uzevši u obzir razne faktore postoji nekoliko vrsta podjele kromatografije, a jedna od njih je na temelju agregatnog stanja pokretne faze. Prema tome može biti:

- plinska kromatografija – pokretna faza je inertni plin, a uzorak se prevodi u plinovito stanje nakon injektiranja i prije prolaska kroz kolonu;
- tekućinska kromatografija – pokretna faza je u tekućem agregatnom stanju, a uzorak je krutina topljiva u pokretnoj fazi ili tekućina koja se s njom miješa;<sup>11</sup>
- kromatografija pri superkričnim uvjetima – pokretna faza je superkrični fluid, najveću primjenu ima CO<sub>2</sub> čija kritična točka je pri temperaturi 31 °C i tlaku 72,9 atm.<sup>13</sup>

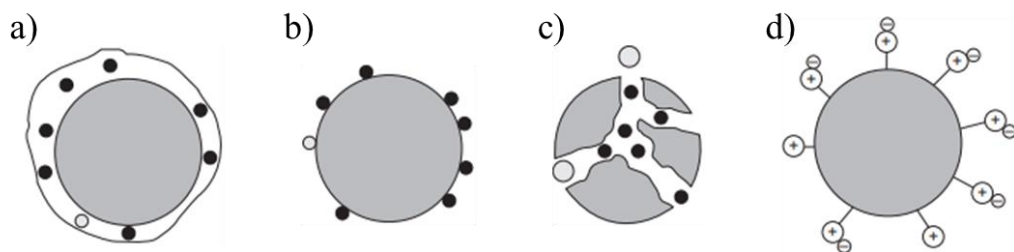
Sljedeća podjela temelji se na obliku nepokretne faze i ostvarivanja kontakta s pokretnom fazom, pa se razlikuju:

- kolonska kromatografija – nepokretna faza je u obliku stupca (Cvet ju je opisao u svom eksperimentu);
- plošna kromatografija – nepokretna faza je kromatografski papir ili sloj sorbensa nanesen na čvrstu pločicu od inertnog materijala.<sup>11</sup>

Obzirom na ravnotežu između pokretne i nepokretne faze, kromatografija se dijeli na:

- razdjelnu kromatografiju – ravnoteža se uspostavlja između dviju tekućina ili između tekućine i plina, budući da je nepokretna faza tekućina nanesen na inertni čvrsti nosač, a pokretna može biti tekućina ili plin (slika 3.a);

- adsorpcijska kromatografija – nepokretna faza je čvrsta tvar, dok je pokretna tekuća ili plinovita, stoga ravnoteža se uspostavlja između čvrste i tekuće ili plinovite tvari (slika 3.b);
- afinitetna kromatografija – na površini krute nepokretne faze nalaze se funkcijske skupine te se razdvajanje temelji na ostvarivanju nekovalentnih interakcija analita s tim skupinama;
- kromatografija isključenjem – pore u nepokretnoj fazi imaju određene dimenzije pa se razdvajanje odvija na osnovu razlike u molekularnoj masi i volumenu molekula analita (slika 3.c);
- kromatografija ionskom izmjenom – kao i kod afinitetne kromatografije na nepokretnoj fazi nalaze se funkcijske skupine, ovog puta elektrostatski nabijene. Shodno tome razdvajanje se zasniva na ostvarivanju elektrostatskih interakcija s analitom (slika 3.d).<sup>11,13</sup>



**Slika 3.** Prikaz čestice nepokretne faze za: a) razdjelnu kromatografiju, b) adsorpcijsku kromatografiju, c) kromatografiju isključenjem i d) kromatografiju ionskom izmjenom.<sup>13</sup>

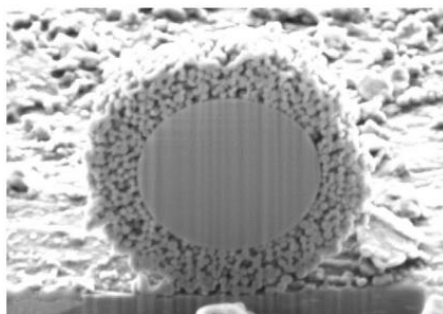
U slučaju kada na nepokretnoj fazi nema funkcijskih skupina ili ona ne djeluje kao molekularno sito (razdjelna i adsorpcijska kromatografija) razdvajanje počiva na razlici u polarnosti pokretne i nepokretne faze. Analit će favorizirati onu fazu s kojom ima sličniju polarnost. Prema tome razlikuju se:

- kromatografija normalnih faza – nepokretna faza je polarnija od pokretne faze;
- kromatografija obrnutih faza – nepokretna faza je manje polarna u odnosu na pokretnu.<sup>11,14</sup>

#### 1.4.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

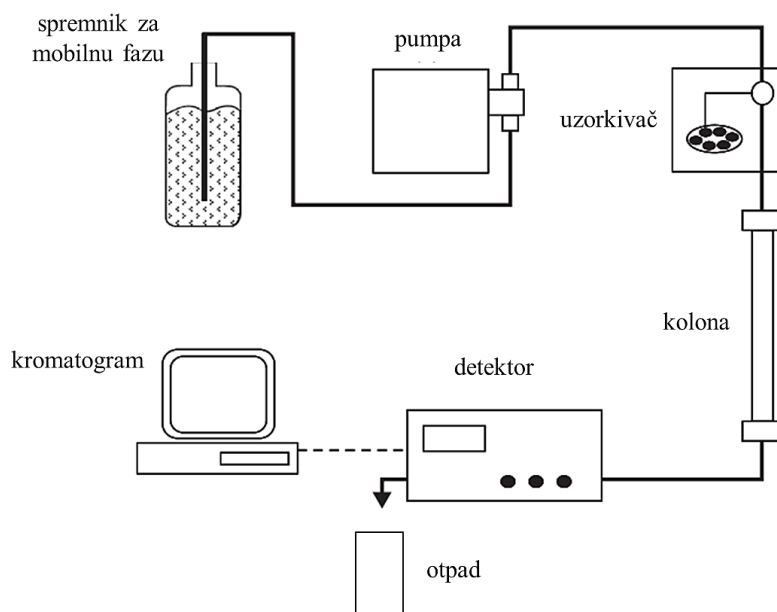
Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) predstavlja naprednu instrumentalnu tehniku koja se razvila kako bi se unaprijedile radne karakteristike standardne fizikalne metode tekućinske kromatografije. Ideja na kojoj počiva razvoj ove tehnike je smanjenje promjera čestica punjenja kolone do oko 2  $\mu\text{m}$ , čime se povećava dodirna površina, odnosno mogućnost interakcija s komponentama smjese te rezultira boljim razdvajanjem. Budući da smanjenje čestica proporcionalno utječe i na brzinu protoka pokretne faze, da bi ona protjecala optimalnom brzinom kroz kolonu, potrebno je primijeniti povišeni tlak.<sup>15</sup>

Kolone za UHPLC uređaje mogu biti punjene trima vrstama čestica: česticama koje su cijelim volumenom porozne, česticama čiji volumen je u cijelosti neporozan te onima s neporoznom jezgrom i poroznim omotačem (engl. *core-shell nanoparticles*). Potpuno porozne čestice po kemijskoj strukturi su silicijev dioksid, metalni oksidi ili neki polimer. Takve kolone su specifične po tome što mogu izdržati tlak do 1300 bara. Međutim najveću primjenu imaju čestice čija jezgra je neporozna, a omotač porozan (slika 4). Kolone punjene ovom vrstom čestica, za razliku od onih punjenih potpuno poroznim česticama, mogu podnijeti nešto manje tlakove – 600 ili 1000 bara. Bez obzira na to njihova primjena je velika jer omogućavaju dobre performanse odvajanja. Nasuprot njima, potpuno neporozne čestice nisu pronašle svoje mjesto u ovoj tehnici zbog male dodirne površine što dovodi do ograničenog vezanja komponenti smjese velike molekulske mase.<sup>16</sup> Idući cilj u razvoju tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti, odnosno kolona za njenu primjenu, je njihov što manji unutarnji promjer (nekoliko milimetara) kako bi se toplina oslobođena prolazom mobilne faze, nastala zbog velikog otpora protjecanju, što lakše prenijela u okolinu i punjenje termostatiralo na zadanu temperaturu.<sup>15</sup>



Slika 4. Presjek *core-shell* čestice.<sup>17</sup>

Na osnovi prethodno navedenog izrađeni su uređaji za UHPLC koji uključuju spremnik za mobilnu fazu, pumpu, uzorkivač, kolonu, detektor i računalni program za obradu podataka i konstruiranje grafičkog prikaza – kromatograma (slika 5).



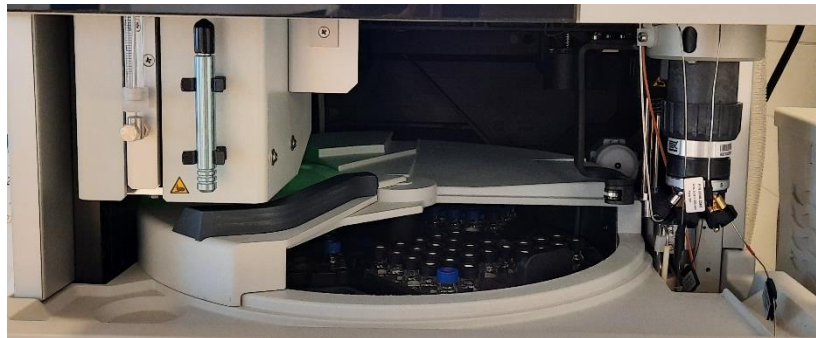
**Slika 5.** Shematski prikaz uređaja za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti.<sup>18</sup>

Moderni kromatografi sadržavaju četiri boce s pokretnim fazama, tj. otapalima (slika 6), međutim moguće je koristiti i više od četiri otapala na način da se u jednoj boci pomiješaju dva ili više otapala, čime se omogućuje razvoj metode s vrlo visokim performansama razdvajanja. Također moguće je podesiti izokratni protok što znači da protječe samo jedno otapalo ili više otapala sa stalnim omjerom. S druge strane je gradijentni protok gdje dvije ili više komponenti pokretne faze, koje se najčešće razlikuju po polarnosti, tijekom trajanja mjerenja protječu u različitim, zadanim, omjerima.<sup>19</sup>



**Slika 6.** Boce s pokretnim fazama/otapalima.

Nadalje, pumpe za UHPLC instrument odlikuje generiranje vrlo visokog tlaka koji će omogućiti protok od 0,1 do 10 mL/min. Isto tako moraju osigurati kontinuiran protok bez odstupanja većih od 0,5 % od zadanog. Nakon što se uspostavi protok pokretne faze moguće je injektirati uzorak, pri čemu se on nastavlja kretati u struji već spomenute faze. Za uzorkovanje i injektiranje uzorka zadužen je automatski uzorkivač (slika 7) te može uzorkovati od 1 do 100  $\mu$ L uzorka. Bočice sa uzorcima su smještene u postolju predviđenom za njih, odnosno u prostoru kojem je moguće pomoću računalnog programa podesiti temperaturu.<sup>19</sup>



**Slika 7.** Postolje s bočicama i sustav za automatsko uzorkovanje.

Potom uzorak i pokretna faza prolaze kroz kolonu. Obično, za ovu namjenu, koriste se kolone dužine 10 – 15 cm i promjera 3 – 5 mm te se nalaze u dijelu uređaja termostatiranom na zadanu temperaturu (slika 8). Nerijetko prije kolone nalazi se kraća pretkolona, čija svrha je uklanjanje nečistoća iz tekuće faze, da se izbjegne onečišćenje skupljih, glavnih kolona, a time i njihova češća zamjena. Nakon toga pokretna faza odnosi komponente razdijeljene smjese do detektora, a na računalu se dobiju grafički i numerički podaci. Eluat naposljetku odlazi u otpad, ukoliko se ne radi o preparativnoj kromatografiji kada se komponente skupljaju u posude predviđene za to.<sup>19</sup>



**Slika 8.** Kolona u termostatiranom prostoru.



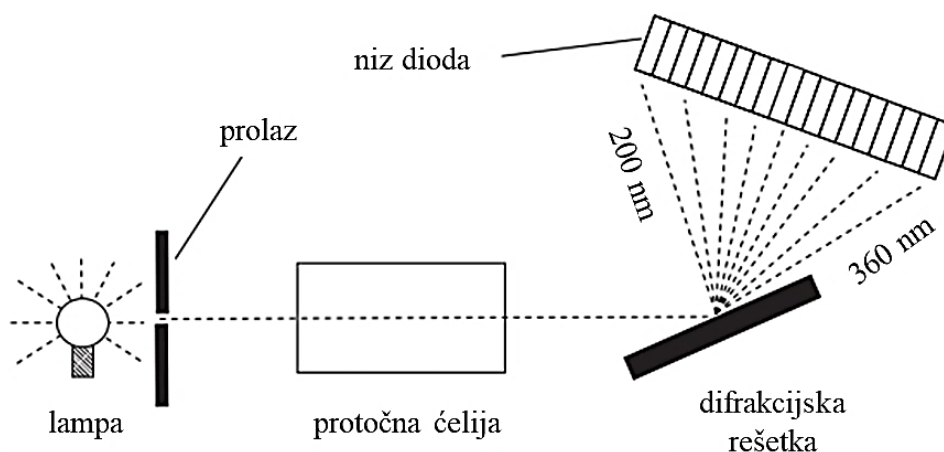
### 1.4.2. Detektori

Kromatografska istraživanja, osim razdvajanja komponenti smjese, često zahtijevaju njihovo kvalitativno i kvantitativno dokazivanje, što omogućuje detektor. Detektor može biti integralni dio uređaja za kromatografiju ili zaseban uređaj povezan (spregnut) s kromatografom. Dobre detektore odlikuje: visoka osjetljivost ( $10^{-15}$  do  $10^{-8}$  g analita po sekundi), jednostavnost upotrebe, brzi odziv, linearan raspon za nekoliko redova veličine i dobra ponovljivost.<sup>20</sup>

Slijedom navedenog detektori se dijele ovisno o tehnici na kojoj se temelji njihov rad, a neki od važnijih za UHPLC su:

- detektori apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog dijela elektromagnetskog zračenja (engl. *Ultraviolet and Visible emissions*, UV-Vis) – koncentracija analita je proporcionalna količini apsorbirane svjetlosti, odnosno ta vrijednost se pretvara u analitički signal; razlikuju se tri vrste ovih detektora, ovisno mjere li pri fiksnoj ili promjenjivoj valnoj duljini ili imaju niz dioda za mjerenje;
- detektori fluorescencije – tvari koje fluoresciraju, izložene UV-Vis zračenju, emitiraju svjetlost većih valnih duljina, što se detektira i pretvara u signal;
- elektrokemijski detektori – na elektrodama analiti s redoks svojstvima se oksidiraju ili reduciraju, odnosno uzrokuju promjene u vrijednostima struje što se pretvara u analitički signal;
- detektori indeksa loma – signal se dobiva na temelju razlike u vrijednostima indeksa loma same pokretne faze i one u kojoj je prisutan analit;<sup>21</sup>
- detektor raspršenja svjetlosti isparavanjem (engl. *Evaporative Light Scattering*, ELS) – eluat se inertnim plinom rasprši u fini sprej, potom se zagrije do temperature koja osigurava isparavanje mobilne faze te se pošalje snop svjetlosti čije raspršenje na česticama analita se detektira i prevodi u analitički signal;<sup>20,21</sup>
- spektrometrija masa – o ovom detektoru više u odlomku 1.5.

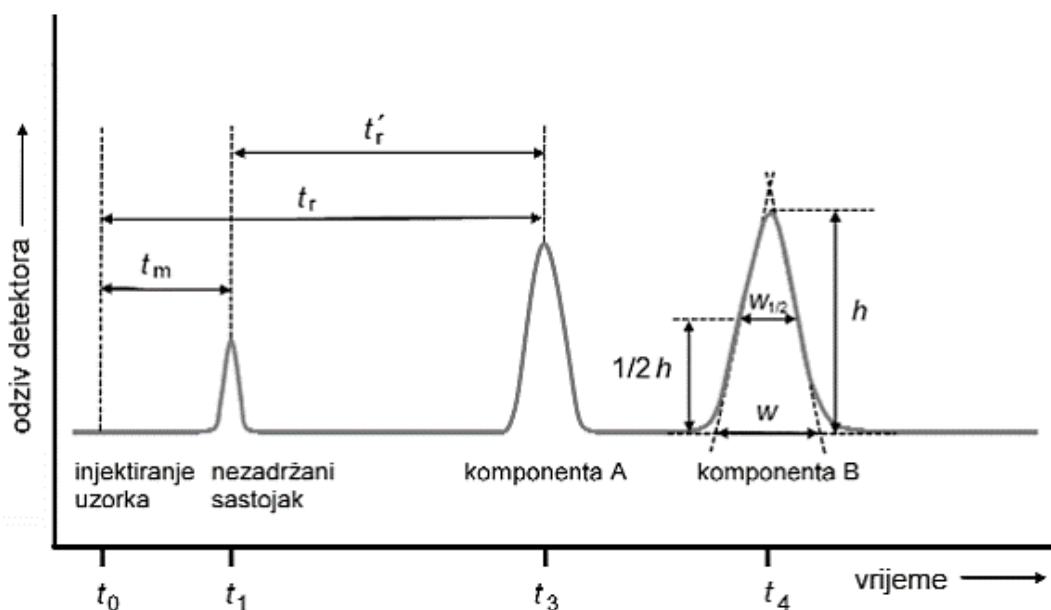
Često korišten je detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) i spektrometar masa. Rad DAD-a zasniva se na mjerenju apsorpcije UV-Vis svjetlosti, odnosno na spektrofotometriji. U svezi s time naziv duguje nizu od 512 ili 1024 dioda(e), ovisno o modelu i proizvođaču, koje mjere intenzitet svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak. Dakle može se mjeriti intenzitet svjetlosti više određenih valnih duljina, kao i cijelog spektra, u isto vrijeme, što detektori iz ove skupine koji mjere pri fiksnoj ili promjenjivoj valnoj duljini ne mogu. Osim toga detektorima koji mjere pri promjenjivim valnim duljinama svjetlost emitirana iz lampe prvo odlazi na difrakcijsku rešetku, zatim se zadana valna duljina filtrira i potom prolazi kroz protočnu ćeliju, odnosno uzorak, dok u slučaju DAD-a svjetlost emitirana iz lampe prolazi kroz uzorak, a zatim se raspršuje na difrakcijskoj rešetki i naposljetku intenzitet se svjetlosti detektira na nizu dioda (slika 9).<sup>18</sup>



**Slika 9.** Shematski prikaz detektora s nizom dioda u UV području elektromagnetskog zračenja.<sup>18</sup>

### 1.4.3. Kromatogram

Informacije dobivene na detektoru računalmim se programom prevode u informaciju razumljivu analitičaru – kromatogram (slika 10), drugim riječima to je grafički prikaz ovisnosti količine tvari, iskazane u određenoj mjernoj veličini, o vremenu ili volumenu eluiranja. Podaci dobiveni u kromatogramu omogućuju identifikaciju komponente eluirane s kolone. Osim identifikacije komponenti iz kromatograma je također moguće dobiti informaciju i o količini prisutnog analita, na temelju površine ispod krivulje.<sup>11</sup>



**Slika 10.** Primjer kromatograma za uzorak s dvije komponente i kromatografski parametri.<sup>11</sup>

Iz kromatograma moguće je očitati vrijednosti za:

- zadržano vrijeme ( $t_m$ ) – vrijeme koje je potrebno nezadržanoj komponenti (pokretna faza) za prolazak kroz kolonu;
- ukupno vrijeme zadržavanja ( $t_r$ ) – vrijeme proteklo od injektiranja uzorka u kolonu do maksimalnog odziva komponente;
- prilagođeno vrijeme zadržavanja ( $t'_r$ ) – ukupno vrijeme zadržavanja pojedine komponente umanjeno za zadržano vrijeme, tj. vrijeme koje je komponenta provela vezana za nepokretnu fazu;
- visina kromatografske krivulje ( $h$ );
- širina kromatografske krivulje ( $w$ ) i širina kromatografske krivulje na polovici visine ( $w_{1/2}$ ).<sup>11</sup>

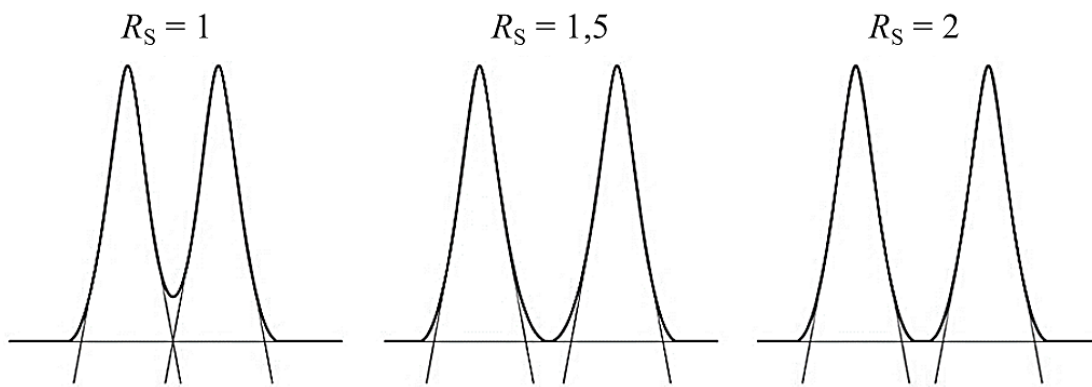
Za dobivanje što vjerodostojnijih rezultata bitno je da se signali za dvije ili više komponenta ne preklapaju, stoga je to jedan od ciljeva pri razvoju metode. Mjera koja opisuje uspješnost odjeljivanja naziva se razlučivanje ( $R_s$ ) te je za neometanu kvantitativnu analizu bitno da ta vrijednost bude veća od 1,5 (slika 11).

Jednadžba kojom se računa vrijednost razlučivanja je:

$$R_s = \frac{2 \cdot \{(t_R)_B - (t_R)_A\}}{w_A + w_B}$$

A je kraće zadržana komponenta, a B duže zadržana komponenta.

Prema tome, razlučivanje se može poboljšati povećavanjem razlike u vremenu zadržavanja ili smanjivanjem širine kromatografskih krivulja, što se postiže smanjenjem koncentracije analita.<sup>11</sup>

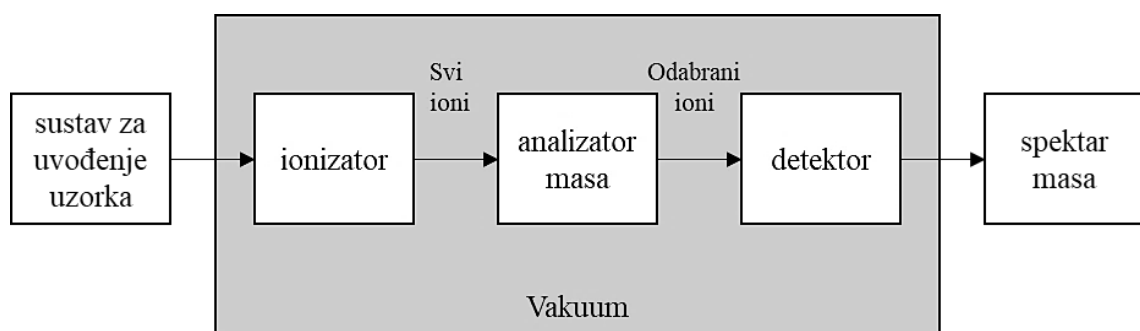


**Slika 11.** Osnovni prikaz kromatografskih krivulja s različitim vrijednostima razlučivanja.<sup>22</sup>

## 1.5. Spektrometrija masa

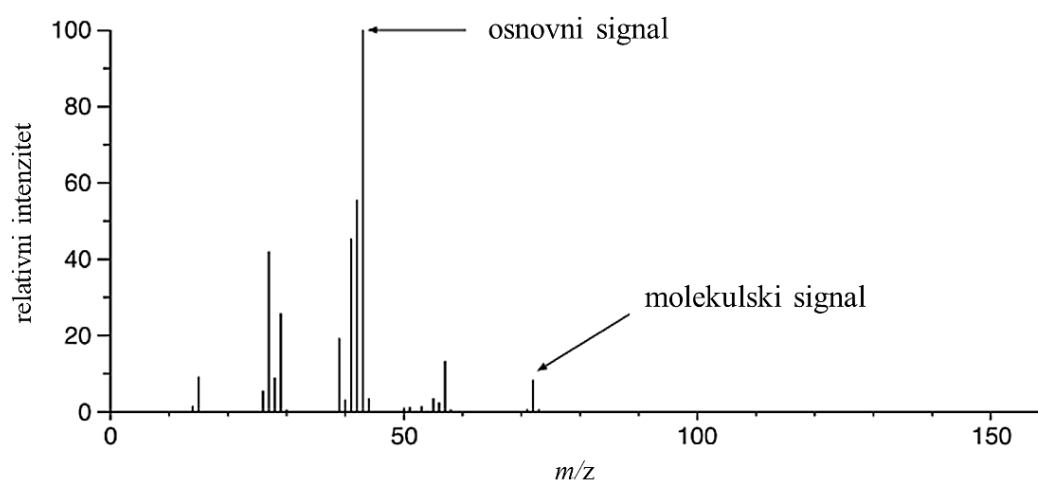
Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je analitička tehnika za proučavanje atomskih masa atoma ili molekulske mase molekula te njihovih fragmenata.<sup>23</sup> Odlikuje se vrlo visokom osjetljivošću, kao i vrlo niskim granicama određivanja i dokazivanja, brzinom i mogućnošću uporabe za različita ispitivanja.<sup>24</sup> Osnovu za razvoj spektrometrije masa postavio je engleski fizičar Joseph J. Thomson kada je 1987. godine svojim instrumentom, čiji rad se temeljio na odbijanju katodnih zraka, mjerio omjer naboja i mase ( $e/m$ ) osnovne čestice – elektrona. Dvije godine kasnije, uz pomoć suradnika E. Everetta Evansa razvio je instrument za istovremeno mjerenje  $e/m$  i naboja ( $e$ ) što je omogućilo mjerenje mase elektrona. Nakon toga je Thomson uz pomoć suradnika Francisa W. Astona razvio instrument u kojem su se električnim pražnjenjem plina stvarali ioni, koji su prolazili kroz paralelna električna i magnetska polja. Putanja iona je bila parabolična, a na kraju su detektirani na fotografskoj ploči.<sup>25</sup>

Danas se uređaj za spektrometriju masa naziva spektrometar masa. Osnovni dijelovi uređaja su sustav za uvođenje uzorka, ionizator, analizator masa, detektor i računalo za obradu podataka zabilježenih na detektoru (slika 12). U ionizatoru analiti se pretvaraju u elektrostatski nabijene čestice, odnosno ione, budući da se u analizatoru masa ubrzavaju i odvajaju na temelju omjera mase i naboja (engl. *mass-to-charge ratio*,  $m/z$ ). Nakon što se u analizatoru masa ioni razdvoje, odlaze do detektora gdje se bilježi broj nabijenih čestica određenog  $m/z$ . S ciljem izbjegavanja interakcija iona i komponenti zraka, analizator masa, detektor i neki ionizatori moraju se nalaziti u uvjetima visokog vakuuma.<sup>23,26</sup>



**Slika 12.** Shematski prikaz spektrometra masa.

Obradom podataka s detektora, na računalu se ispisuje grafički prikaz – spektar masa, kojem je na apscisi omjer mase i naboja čestice, a na ordinati relativni intenzitet tih čestica (slika 13). Svaka molekula pri određenim uvjetima ima specifično cijepanje na različite ione, što omogućuje njenu kvantifikaciju. Najviši signal na spektru predstavlja ion kojeg se najviše stvorilo pri ionizaciji molekule te se on zove osnovni signal, dok se količina ostalih komponenata računa na temelju visine signala te komponente u odnosu na osnovni signal. Nadalje, odziv na najvećoj vrijednosti  $m/z$  naziva se molekulski signal jer pripada ionu molekule, odnosno onom koji se nije pocijepao. Uzevši u obzir način ionizacije, iz vrijednosti  $m/z$  molekulskog signala može se izračunati molekulsku masu analizirane molekule.<sup>23,26</sup>



**Slika 13.** Osnovni prikaz spektra masa.<sup>22</sup>

U prošlosti se koristila spektrometrija masa niske rezolucije spregnuta s kromatografijom u svrhu dokazivanja poznate molekule. Zahtjevi eksperimenata počeli su uključivati identifikaciju nepoznatih molekula, što dovodi do razvoja spektrometrije masa visoke rezolucije. Ova vrsta spektrometrije masa može razlikovati i stvarati zasebne signale za ione čija je razlika u molekulskim masama 0,0001 Da ili u nekim slučajevima i manja. Glavna komponenta spektrometra masa zaslužna za visoku rezoluciju je pravilan izbor analizatora masa i osjetljiviji detektor.<sup>27</sup>

### 1.5.1. Vrste ionizatora

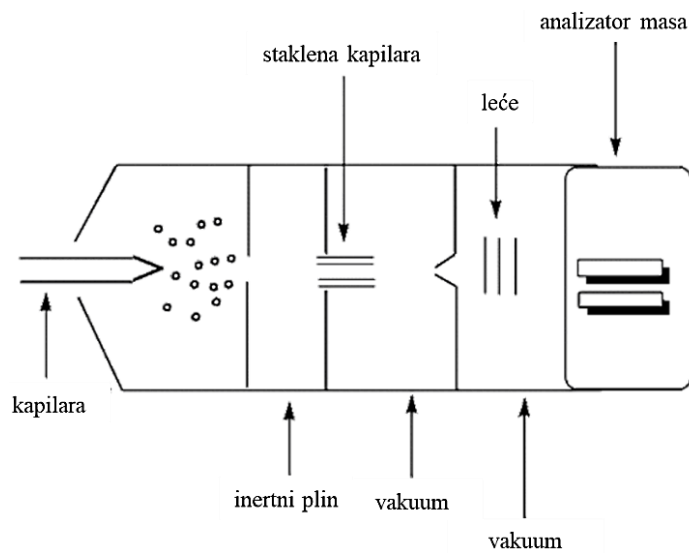
Često se kromatografske tehnike, pa tako i UHPLC sparuju sa spektrometrijom masa s namjerom kvalitativnog i kvantitativnog dokazivanja analita. Međutim postoji nekoliko razlika između uvjeta rada tekućinskog kromatografa i spektrometra masa. Kako je već navedeno, UHPLC radi pod uvjetima povišenog tlaka i s tekućim, nehlapljivim uzorcima, dok MS zahtijeva analite u plinovitom agregatnom stanju i uvjete visokog vakuuma. Način na koji se te razlike nadilaze je izbor prikladnog ionizatora.<sup>24</sup> Izbor ionizatora ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima analita, kao što je agregatno stanje, toplinska stabilnost te molekulska masa.<sup>28</sup> Vrste ionizacije kompatibilne s tekućinskom kromatografijom su: ionizacija elektroraspršenjem, kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, APCI), fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI), induktivno spregnuta plazma (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) i maticom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI).<sup>26</sup>

Osnovna podjela je na snažnu i slabu ionizaciju. Pri snažnoj ionizaciji (engl. *hard ionization*) visoka potencijalna energija se prenosi na analit, što rezultira cijepanjem na veliki broj fragmenata. Ovim načinom dobiju se informacije o molekulskoj strukturi i prisutnosti funkcijskih skupina u molekuli. Slaba ionizacija (engl. *soft ionization*) prenosi nižu energiju na molekule te dolazi do slabijeg cijepanja. Na ovaj način dobije se podatak o molekulskoj formuli spoja.<sup>28</sup>

#### Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI)

Ionizatori čiji se rad temelji na ionizaciji elektroraspršenjem zahtijevaju nastanak molekulskih iona prije dolaska u taj dio uređaja (slika 14). Stoga se u pokretnu fazu kromatografije dodaju modifikatori (organske kiseline ili soli i anorganske soli) u malim količinama. Primjerice, kada je modifikator kiselina mogu nastati pozitivni ioni protoniranjem molekule ( $M + H^+$ ) ili negativni ( $M - H^+$ ) deprotoniranjem molekule.<sup>28</sup>

Pokretna faza s analitom iz tekućinskog kromatografa zajedno s inernim plinom za stvaranje fine maglice ulazi u ionizator kroz kapilaru. Na izlazu iz kapilare pod utjecajem razlike u naponu s grijanom komorom za prskanje i pomoćnog plina za stvaranje fine maglice nastaje fini aerosol. U tom dijelu kapljice se razlažu na manje, a zatim zbog odbojnih sila nabijene čestice oslobađaju se u pojedinačne ione u plinovitom agregatnom stanju. Zbog elektrostatskog privlačenja ulaze u staklenu kapilaru i odlaze u područje vakuuma. Ponovna razlika u naboju konusnog dijela i leće uzrokuje ubrzanje iona, pri čemu se oni sudaraju i potencijalno cijepaju na manje fragmente. Što je ta razlika manja stvorit će se manje fragmenata i obrnuto. Nakon toga ioni se lećama usmjeravaju na analizator masa.<sup>23</sup>



**Slika 14.** Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem.<sup>29</sup>

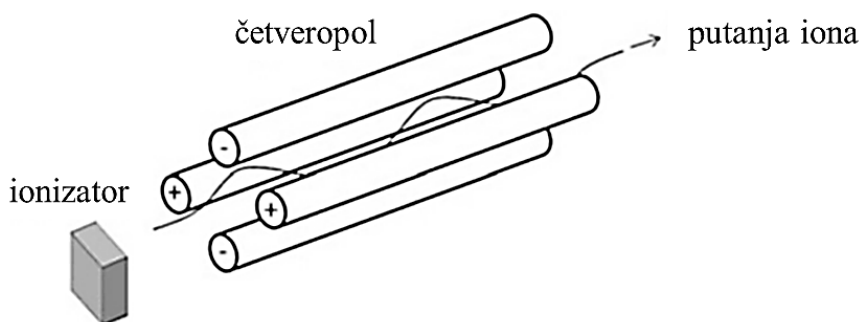


### 1.5.2. Vrste analizatora masa

Analizatori masa, ione nastale u ionizatoru razdvajaju na temelju  $m/z$ , pri čemu se primjenjuju magnetsko polje i/ili električno polje. Na temelju kombiniranja i korištenja tih polja se razlikuju analizatori. Pet značajki se promatra za određivanje radnih karakteristika analizatora mase: raspon mase (unutar kojeg analizator razdvaja ione), brzina razdvajanja, prijenos (omjer broja iona koji dođu do detektora i onih koji uđu u analizator mase), točnost mase (razlika između teoretskog i izmjerenog  $m/z$ ) i razlučivanje (sposobnost da analizator razdvoji dva iona s malom razlikom  $m/z$ ). Više analizatora mase može se povezati u niz, s ciljem povećanja mogućnosti eksperimenta.<sup>24</sup>

#### Četveropolni analizator (engl. *Quadrupole*, Q)

Četveropolni analizator masa trenutno je jedan od najpopularnijih u uporabi, a često se koriste u tandemu dva ovakva analizatora ili u kombinaciji s analizatorom vremena leta. Promatra se kao filter mase zbog sposobnosti razlikovanja i filtriranja iona različitih  $m/z$ . Sastoji se od četiri, međusobno povezane, cilindrične šipke (slika 15). Kombinacijom potencijala izmjenične struje i radio frekvencijskog potencijala ioni određenog  $m/z$  imaju stabilnu putanju, a ostali udaraju u šipku. Jakost ovih potencijala je promjenjiva te se na taj način odvajaju ioni i dobije se spektar masa za uzorak ili analit.<sup>30</sup>



**Slika 15.** Shematski prikaz četveropolnog analizatora masa.<sup>30</sup>

### Trostruki četveropolni analizator (engl. *Triple Quadrupoles*, QqQ)

Trostruki četveropolni analizator masa tvore, kako mu samo ime kaže, tri četveropola u nizu (slika 16). Povezivanjem ovih analizatora masa u niz povećane su mogućnosti praćenja nastajanja i cijepanja iona te je povećana specifičnost metoda. Prema tome, u prvi četveropol ulaze ioni nastali u ionizatoru, tzv. ioni prekursori ili roditeljski ioni te se razdvajaju i propuštaju ioni s vrijednostima  $m/z$  zadanim u računalnom programu. Nakon toga odlaze u drugi četveropol, odnosno kolizijsku ćeliju gdje se odvija disocijacija izazvana sudarom (engl. *Collision Induced Dissociation*, CID), utjecajem radiofrekventnog napona i dotoka inertnog plina, na fragmente, drugim riječima ione produkte ili ione kćeri. Potom novonastali ioni odlaze u treći četveropol, gdje se kao u prvom odvajaju na temelju  $m/z$  i odabrani putuju do detektora. Budući da se u ovom analizatoru masa odvajanje na temelju  $m/z$  odvija dva puta, tehnika se naziva tandemaska spektrometrija masa (MS/MS).<sup>31</sup>



**Slika 16.** Shematski prikaz trostrukog četveropolnog analizatora masa.<sup>30</sup>

Najkorišteniji način razdvajanja i detektiranja iona je praćenjem odabranih reakcija fragmentacije (engl. *Selected Reaction Monitoring*, SRM). SRM/MRM načinom kvantificiraju se analiti iz smjese, na način da prvi četveropol propušta vrijednost  $m/z$  iona prekursora, dok treći propušta samo vrijednosti omjera mase i naboja, ali iona produkta. Osim ovog načina koriste se analiza iona produkta (engl. *Product ion scan*), analiza iona prekursora (engl. *Precursor ion scan*) i analiza neutralnog gubitka (engl. *Neutral loss scan*).<sup>30</sup>

## 1.6. Vrednovanje metode

Nakon razvoja analitičke metode za dobivanje traženih podataka, potrebno je vrednovati tu metodu. Vrednovanje (validacija) je proces dokazivanja prikladnosti metode za namjeravanu uporabu, odnosno dobivanje dokumentiranih dokaza koji pružaju visok stupanj sigurnosti da će određena metoda dosljedno dati točne rezultate ispitivanja.<sup>32</sup>

Prvo je potrebno napraviti mjerenja za otopine širokog raspona količina analita u uzorku (nekoliko redova veličina) i odrediti linearno dinamičko područje (LDP), odnosno raspon nezavisnih mjernih veličina na kojima je krivulja linearna. Nakon toga odrede se četiri vrijednosti koncentracija pri kojima se ispituju parametri za definiranje valjanosti metode:

1. vrijednost (engl. *Low Limit Of Quantitation*, LLOQ) – najniža iz LDP-a;
2. vrijednost (engl. *Low Quality Control*, LQC) – tri puta veća od LLOQ;
3. vrijednost (engl. *Medium Quality Control*, MQC) – nalazi se u rasponu 30 – 50 % od najviše vrijednosti koja pripada LDP;
4. vrijednost (engl. *High Quality Control*, HQC) – iznad 75 % od najviše vrijednosti iz LDP.<sup>33</sup>

Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) propisala je kriterije koje metoda treba ispuniti i koje pri validaciji treba ispitati:<sup>34,35</sup>

- Specifičnost (engl. *Specificity*) – sposobnost nedvosmislenog mjerenja analita u prisustvu drugih komponenti;
- Raspon (engl. *Range*) – interval između najmanje i najveće (uključujući i njih) količine analita za koji je dokazano da metoda ima dostatnu razinu linearnosti, preciznosti i točnosti;
- Linearnost (engl. *Linearity*) – sposobnost metode da se u određenom rasponu dobije signal izravno proporcionalan količini analita u uzorku;
- Granica dokazivanja (GD, engl. *Limit of Detection*) – najniža količina analita koja se može detektirati, ali nije moguće određivanje točne vrijednosti;
- Granica određivanja (GO, engl. *Limit of Quantitation*) – najniža količina analita koja se može kvantitativno odrediti uz prihvatljivu preciznost i točnost;

- Točnost (engl. *Accuracy*) – izražava blizinu slaganja stvarne i izmjerene vrijednosti;
- Preciznost (engl. *Precision*) – izražava blizinu slaganja rezultata dobivenih nizom mjerenja uzoraka pripremljenih na isti način. Može se promatrati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost:
  - Ponovljivost (engl. *Repeatability*) – promatra se kao preciznost pri istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu;
  - Srednja preciznost (engl. *Intermediate precision*) – izražava odstupanja unutar jednog laboratorija, ukoliko se mjeri različitim danima, drugom opremom, novi analitičar i slično;
  - Obnovljivost (engl. *Reproducibility*) – određuje preciznost između različitih laboratorija;
- Robusnost (engl. *Robustness*) – svojstvo metode da ostane nepromijenjena pri malim namjernim promjenama parametara, što omogućuje njenu pouzdanost prilikom normalne uporabe;
- Stabilnost (engl. *Stability*) – izražava promjenu količine analita u standardnoj otopini i otopinama za mjerenje tijekom određenog vremenskog perioda, te za različite uvjete pri kojima je pohranjen uzorak u tom vremenskom intervalu;
- Prikladnost sustava (engl. *System Suitability*) – uzastopna mjerenja iste otopine prikazuju raspon pogreške sustava i metode, bez utjecaja analitičara.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Korištene kemikalije

U tablici 2 prikazani su podaci o korištenim standardima za razvoj metode kojom će se određivati analiti ibuprofen i karbendazim.

**Tablica 2.** Popis korištenih standarda

Naziv	Čistoća	Proizvođač
Ibuprofen	$\geq 98,0 \%$	SIGMA ALDRICH (Saint Louis, USA)
Karbendazim	$\geq 98,0 \%$	SIGMA ALDRICH (PESTANAL <sup>®</sup> , Saint Louis, USA)

Tablica 3 sadrži podatke o otapalima i modifikatorima koji su korišteni za pripravu otopina standarda te kao mobilna faza u UHPLC uređaju.

**Tablica 3.** Popis korištenih otapala i kemikalija

Naziv	Čistoća	Proizvođač
Metanol	$\geq 99,9 \%$	Honeywell (Njemačka)
Acetonitril	$\geq 99,9 \%$	Honeywell (Njemačka)
Octena kiselina	99,0 %	Grammol (Hrvatska)
Mravlja kiselina	$\geq 99,0 \%$	VWR Chemicals
Amonijev acetat	$\geq 98,0 \%$	Merck (Njemačka)

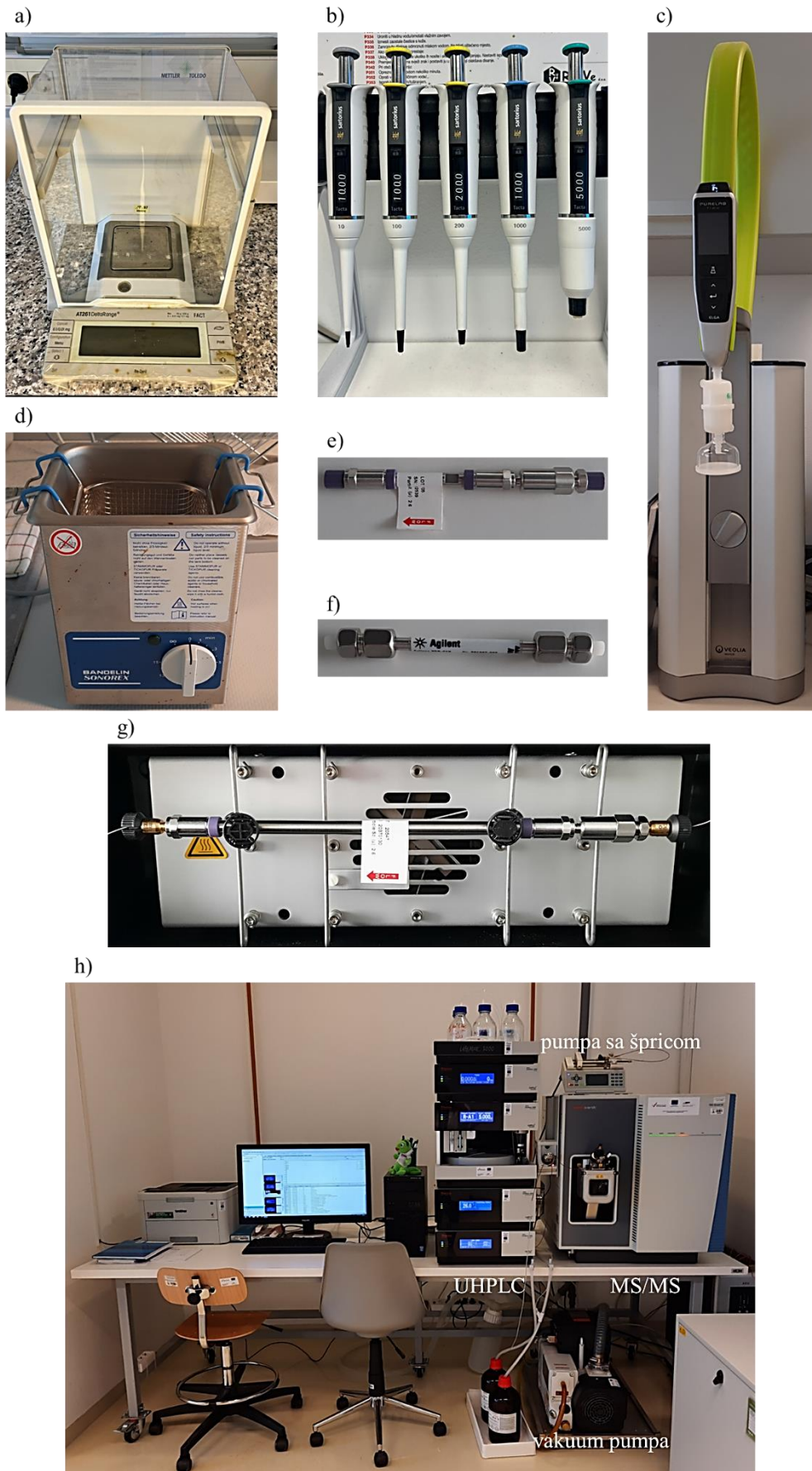
Osim otapala prikazanih u tablici 3 korištena je i voda pročišćena u uređaju za tu namjenu, do razine čistoće prikladne za UHPLC-MS/MS uređaj.

## 2.2. Korištena oprema

Oprema korištena za izradu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada je:

- analitička vaga (slika 17.a) – AT261 DeltaRange (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD);
- pipete (slika 17.b)– Tacta (Sartorius, Göttingen, Njemačka);
- uređaj za pročišćavanje vode (slika 17.c) – Purelab Flex 3 (18.2 MΩ, UV 185/254 nm, TOC <5 ppb, Tip 1, Elga, Pariz, Francuska);
- ultrazvučna kupelj (slika 17.d) – JP-010, (Digital Pro, Kina);
- kolona 1 (slika 17.e) – ZORBAX Eclipse XDB-C18, 100 mm × 3,0 mm, veličina čestica 3,5 μm (Agilent Technologies, SAD);
- kolona 2 (slika 17.f) – Accucore™ C8, 50 mm × 2,1 mm, veličina čestica 2,6 μm (Thermo Fisher Scientific, SAD);
- kolona 3 (slika 17.g) – Accucore™ C18, 150 mm × 2,1 mm, veličina čestica 2,6 μm (Thermo Fisher Scientific, Litva);
- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti (slika 17.h) – UltiMate 3000RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- pumpa sa špricom (slika 17.h) – F100T2 (Chemyx, Stafford, Teksas, SAD);
- spektrometar masa s trostrukim četveropolom (slika 17.h) – TSQ Quantis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

Za upravljanje UHPLC-DAD-MS/MS uređajem i analizu dobivenih podataka korišten je računalni program Chromeleon (Chromeleon 7.2.10., ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Uz ovaj program za obradu podataka dobivenih s ciljem vrednovanja metode korišten je Microsoft Excel.



Slika 17. Korištena oprema za izradu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

## **2.3. Priprema otopina**

### **2.3.1. Odabir otapala**

Standardi ibuprofena i karbendazima nalaze se u krutom agregatnom stanju, stoga ih je potrebno otopiti za mjerenja koja slijede. Obzirom da su oba analita organske molekule očekivano je da će se slabije otapati u vodi, a bolje u organskim otapalima (kako je prikazano u tablici 1). Najučestalije organsko otapalo koje ima dobra svojstva otapanja polarnih i nepolarnih molekula te se vrlo dobro miješa s vodom i ostalim organskim otapalima je metanol.<sup>36</sup> Budući da molekule ibuprofena i karbendazima u svojoj strukturi sadrže polarni i nepolarni dio, metanol je odabran kao pogodno otapalo.

### **2.3.2. Standardne otopine**

Nakon odabira otapala slijedi priprava standardnih otopina. Za tu svrhu odvagano je 50,50 mg ibuprofena te otopljeno u 10 mL metanola. Koncentracija te standardne otopine iznosi 5,05 mg/mL. Potom je odvagano 51,27 mg karbendazima i otopljeno u 250 mL metanola, na ultrazvučnoj kupelji, budući je topljivost ovog spoja manja nego ibuprofena. Novonastala otopina sadrži 205,08 µg/mL karbendazima. Ove otopine služe za pripravu razrijeđenih otopina čija svrha je optimizacija parametara na UHPLC i MS/MS dijelu uređaja te za pripremu otopina za krivulju umjeravanja i vrednovanje metode.

### **2.3.3. Otopine za optimizaciju parametara spektrometra masa**

Otopine za optimizaciju parametara na MS/MS dijelu uređaja pripravljene su tako da je prvo određeni volumen standardne otopine ibuprofena pipetom prenesen u bočicu, a ostatak do ukupnog volumena od 5 mL dopunjen je metanolom. Tako pripravljena otopina sadrži 0,1 mg/mL ibuprofena. Nakon toga, na isti način u drugu bočicu prenesen je volumen standardne otopine karbendazima koji će u konačnom volumenu od 5 mL osigurati koncentraciju otopine 0,1 mg/mL tog analita.



### 2.3.4. Otopine za optimizaciju UHPLC metode

Kada su optimizirani parametri na MS/MS dijelu uređaja slijedi priprava otopina za optimizaciju na UHPLC dijelu uređaja. Kao i prethodno iz pojedinačnih standardnih otopina analita pripravljene su razrijeđenije otopine konačnog volumena 1 mL. Prva otopina je sadržavala 0,1 mg/mL ibuprofena, druga istu koncentraciju karbendazima, a u trećoj su bila oba analita s koncentracijama od 0,05 mg/mL.

### 2.3.5. Otopine za krivulju umjeravanja

Izrada krivulje umjeravanja zahtjeva mjerenja na otopinama različitih koncentracija (slika 18). Za tu svrhu u odmjernu tikvicu od 25 mL pripravljena je početna otopina koncentracije 10,00  $\mu\text{g/mL}$  ibuprofena te jednake koncentracije karbendazima. Zatim su u bočicama od 1,5 mL napravljene otopine koncentracije 10,00  $\mu\text{g/mL}$ , 7,50  $\mu\text{g/mL}$ , 5,00  $\mu\text{g/mL}$ , 2,50  $\mu\text{g/mL}$ , 1,00  $\mu\text{g/mL}$ , 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , 0,50  $\mu\text{g/mL}$ , 0,25  $\mu\text{g/mL}$  i 0,10  $\mu\text{g/mL}$  svakog pojedinog analita, na način da je određeni volumen početne otopine kvantitativno prenesen pipetom, a ostatak do 1 mL dopunjen otapalom.

Nakon toga iz početne otopine pripravljene za izradu krivulje umjeravanja napravljena je nova otopina koncentracije 0,1  $\mu\text{g/mL}$  i volumena 5 mL. Iz te otopine na isti način kao i otopine viših koncentracija pripravljene su otopine koje sadrže 0,100  $\mu\text{g/mL}$ , 0,075  $\mu\text{g/mL}$ , 0,050  $\mu\text{g/mL}$ , 0,025  $\mu\text{g/mL}$  i 0,010  $\mu\text{g/mL}$  ibuprofena i istu koncentraciju karbendazima.



**Slika 18.** Otopine za krivulju umjeravanja (oznake: MIX – otopina ibuprofena i karbendazima, bročana vrijednost – koncentracija svakog pojedinog analita u otopini i ppm –  $\mu\text{g/mL}$ )

### 2.3.6. Otopine za vrednovanje metode

Na kraju potrebno je vrednovati razvijenu metodu. Za to su potrebne 4 otopine čije koncentracije su utvrđene nakon izrade konačne krivulje umjeravanja. Prvo, od standardne otopine ibuprofena, napravljena je nova otopina u odmjernoj tikvici od 10 mL, masene koncentracije 199,98 µg/mL. Potom od te otopine i standardne otopine karbendazima koncentracije 205,08 µg/mL u odmjernoj tikvici od 10 mL pripravljena je otopina koja sadrži 1 µg/mL oba analita u konačnom volumenu 10 mL. Nakon toga napravljene su razrjeđenije otopine koncentracija 0,01 µg/mL (LLOQ), 0,03 µg/mL (LQC), 0,30 µg/mL (MQC) i 0,80 µg/mL (HQC) te ukupnog volumena 1 mL.

### 2.4. Optimizacija parametara spektrometra masa

Optimizacija parametara spektrometra masa zahtijeva mjerenja samo na MS/MS dijelu uređaja, stoga se u špricu prvo postavi otopina karbendazima pripravljena na način opisan u odlomku 2.3.3., a brzina protoka od 0,05 mL/min iz šprice te 0,35 mL/min iz spremnika mobilnih faza zada se na računalu u programu Cromeleon. Iz jedne boce ide odabrano otapalo – metanol, a iz druge voda s modifikatorom mravljom ili octenom kiselinom. Prvo se postavi jedno mjerenje na negativnom načinu rada, a zatim na pozitivnom načinu rada. Kada se odabere optimalan način rada slijedi mjerenje s vrijednostima tlakova argona koji će izazvati disocijacije izazvane sudarom (engl. *Collision-Induced Dissociation*, CID) od 0,5, 1,5 i 3,0 mTorr.

Potom se u špricu postavlja otopina ibuprofena pripravljena na način opisan u istom odlomku kao i za karbendazim te se ispituje fragmentacija molekule pri pozitivnom i negativnom načinu rada. Zbog lošijih rezultata nego kod karbendazima u otopinu su dodani organski modifikatori te je protok postavljen na način da otopina samo sa šprice ide u MS/MS. Kada je odabran način rada, odabrane su vrijednosti ostalih parametara.

## **2.5. Optimizacija UHPLC metode**

Otopine pojedinačnih analita pripremljene na način opisan u odlomku 2.3.4. postavljene su u postolje za bočice te je pokrenuto mjerenje na računalnom programu. Cilj mjerenja ovih otopina jest vidjeti postoji li signal na kromatogramu te dobiti UV-Vis spektar i provjeriti slaganje s optimiziranim parametrima na spektrometru masa.

Nakon toga postavljena je otopina koja sadržava ibuprofen i karbendazim te se analiziraju rezultati mjerenja s različitim pokretnim fazama, protocima, gradijentima, kolonama, temperaturama kolone i volumenima injektiranja u svrhu razvoja metode sa što boljim performansama razdvajanja i što većim odzivom na detektorima.

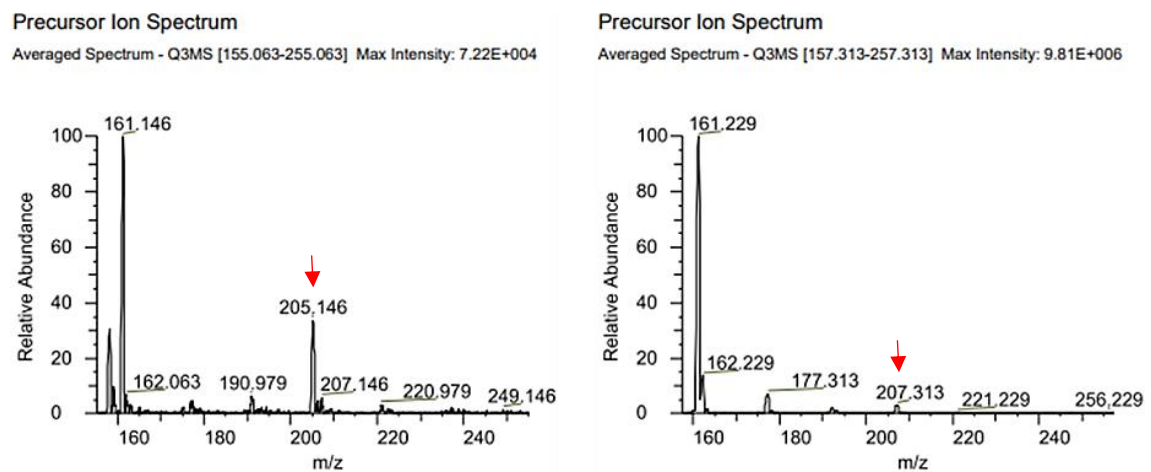
### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Optimizacija parametara spektrometra masa

Nakon što su pripravljene otopine i postavljene na mjerenje kako je opisano u odlomku 2.4. uslijedila je analiza rezultata te izbor vrijednosti parametara s ciljem što vjerodostojnijeg kvalitativnog i kvantitativnog dokazivanja analita na spektrometru masa.

##### 3.1.1. Pozitivan ili negativan način rada

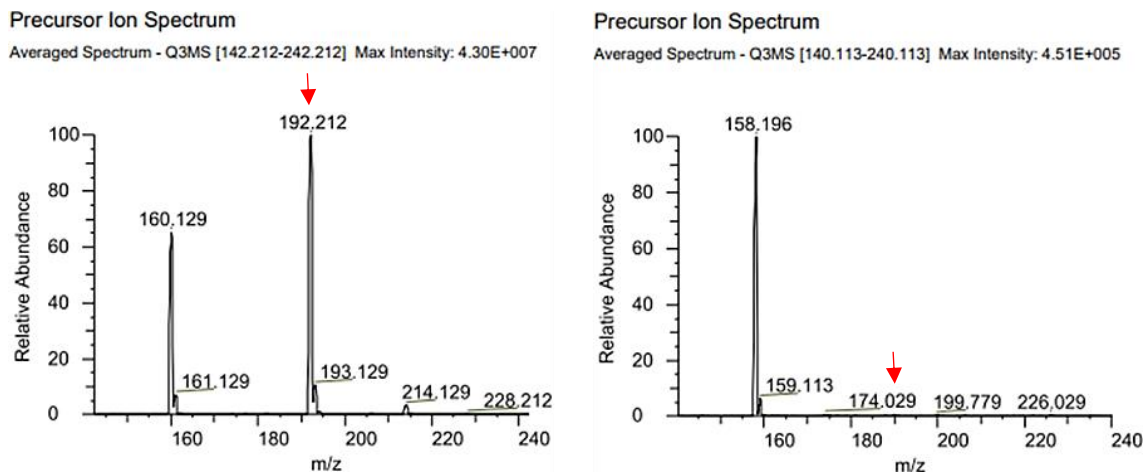
Spektri masa za ione prekursore u negativnom i pozitivnom načinu rada, odnosno ako se propuštaju i detektiraju samo negativno nabijeni ioni (deprotonirani) u prvom slučaju i pozitivno nabijeni ioni (protonirani) u drugom, uspoređuju se s ciljem pronalaska načina na koji će nastati više molekulskih iona. Za ibuprofen odabran je negativan način rada jer je relativni intenzitet molekulskog iona ( $m/z \approx 205$ ) veći nego pri pozitivnom načinu rada ( $m/z \approx 207$ ), prema tome veća količina molekulskih iona će biti raspoloživa za specifične disocijacije te omogućiti razvoj preciznije metode (slika 19).



**Slika 19.** Spektar masa iona prekursora ibuprofena za negativan (lijevo) i pozitivan (desno) način rada.

Imajući to na umu, za karbendazim je odabran pozitivan način rada budući da pri negativnom načinu rada nema signala za molekulski ion ( $m/z \approx 190$ ). Naime, na

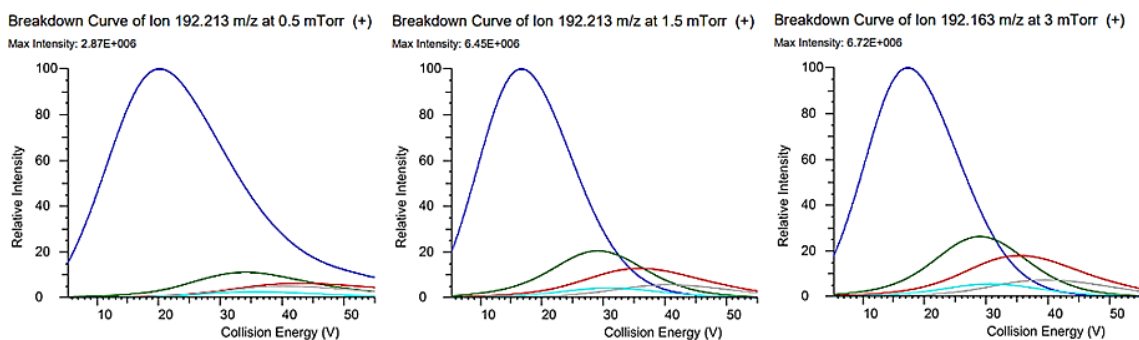
odabranom načinu rada molekularni signal ( $m/z \approx 192$ ) je najzastupljeniji, točnije rečeno ion nastao iz molekule poprilično je stabilan (slika 20).



**Slika 20.** Spektar masa iona prekursora karbendazima za pozitivan (lijevo) i negativan (desno) način rada.

### 3.1.2. Tlak plina za disocijaciju izazvanu sudarom

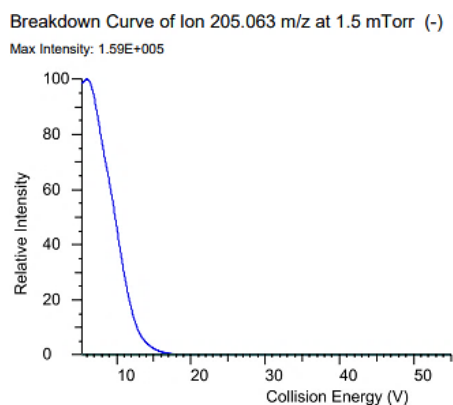
Krivulje disocijacije molekularnog iona karbendazima nastale mjerenjem pri različitim tlakovima inertnog plina argona prikazuju najslabiju fragmentaciju pri 0,5 mTorr. S druge strane pri 1,5 i 3,0 mTorr relativni intenziteti novonastalih iona vrlo je sličan, a energije sruza su jednake (slika 21). U sljedećem odlomku objašnjeno je za što, osim optimizacije tlaka plina, služe ove krivulje.



**Slika 21.** Prikaz krivulja disocijacije karbendazima pri tlaku redom 0,5 mTorr, 1,5 mTorr i 3,0 mTorr.

Kako je prikazano u prethodnom odlomku, molekularnog iona ibuprofena nastaje znatno manje nego karbendazima pri odabranom načinu rada, uz to ibuprofen se cijepa samo na

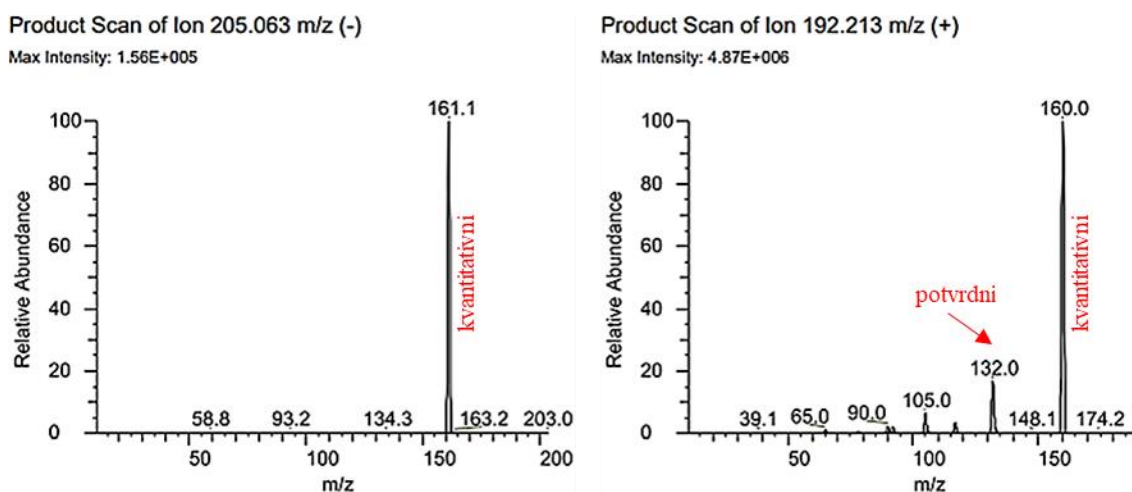
jedan fragment značajnog udjela, što je prikazano na krivulji disocijacije (slika 22). Budući da je količina fragmenata zadovoljavajuća, nije se mjerilo s tlakovima 0,5 i 3,0 mTorr, već je 1,5 mTorr, pri kojem je optimiziran način rada, smatran optimalnim. Karbendazim također pokazuje dobru fragmentaciju pri tom tlaku, stoga za daljnja mjerenja i razvoj metode razdvajanja i kvantifikacije ibuprofena i karbendazima korištena je vrijednost tlaka od 1,5 mTorr.



Slika 22. Prikaz krivulje disocijacije ibuprofena pri tlaku 1,5 mTorr.

### 3.1.3. Prijelazi ion prekursor → ion produkt

Svaki analit karakterizira disocijacija iona prekursora (molekulskog iona) na jedan ili više iona produkata (slika 23). Prema tome disocijacija se odvija pod posebnim uvjetima, odnosno osim karakteristične vrijednosti tlaka inertnog plina specifičan je i napon kolizijske ćelije, tzv. energija sraza, stoga je i taj parametar optimiziran.



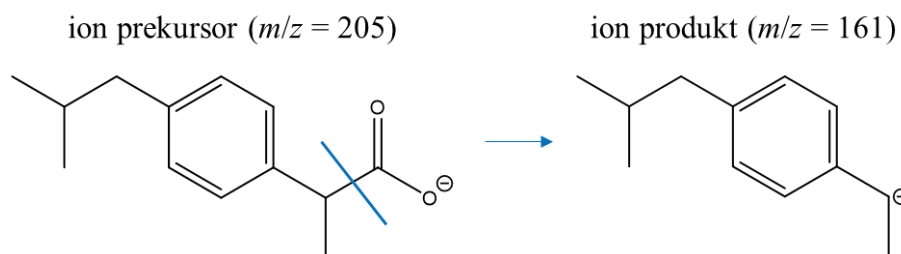
Slika 23. Spektar masa za ione produkte ibuprofena (lijevo) i karbendazima (desno).

Proučavanjem spektara masa iona produkata čiji prekursori su molekularni ion ibuprofena i karbendazima odabrane su  $m/z$  fragmenata, a na krivuljama iz prethodnog odlomka očitane su vrijednosti energija sraza te su u tablici 4 prikazane vrijednosti odabranih parametara koje će se detektirati SRM načinom tijekom optimiziranja parametara na UHPLC dijelu uređaja i u konačnoj metodi. Najviše zastupljen fragment predstavlja kvantitativni prijelaz, a onaj s manjom zastupljenošću potvrdni prijelaz. Spektar masa ibuprofena prikazuje da ibuprofen disocira samo na jedan ion što je spomenuto u prošlom odlomku te se podudara s pregledanom literaturom, stoga nema potvrdnog prijelaza.<sup>37,38</sup>

**Tablica 4.** Kvantitativni i potvrdni prijelaz za ibuprofen i karbendazim.

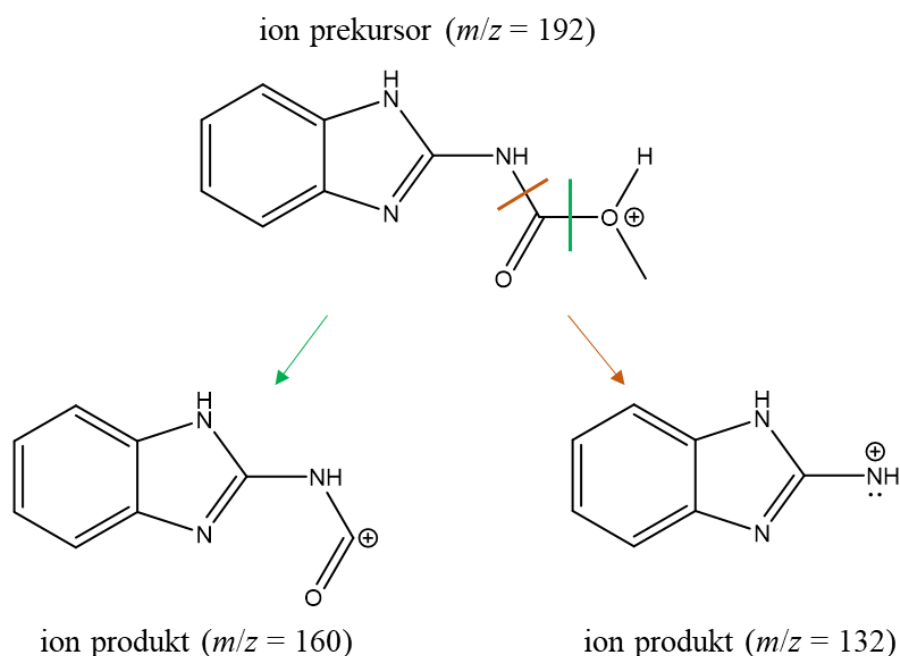
		IBUPROFEN	KARBENDAZIM
<b>Kvantitativni prijelaz</b>	$m/z$	205 → 161	192 → 160
	Energija sraza	6 V	17 V
<b>Potvrdni prijelaz</b>	$m/z$	-	192 → 132
	Energija sraza	-	29 V

Ibuprofen je prema strukturi karboksilna kiselina, odnosno građen je od benzenskog prstena s alkilnim supstituentom u *para*-položaju u odnosu na karboksilnu skupinu. Prema tome pretpostavlja se da otpuštanjem vodika iz -COOH skupine nastaje molekularni ion, a cijepanje se odvija između ugljikovog atoma karboksilne skupine i sljedećeg s kojim je vezan zbog veće polarности u odnosu na ostale C–C veze u molekuli (slika 24).



**Slika 24.** Ibuprofen – strukture iona prekursora i iona produkta.

Karbendazim sadrži aromatski benzimidazolni prsten koji se zbog svoje stabilnosti vrlo teško disocira, međutim na njega je supstituiran lanac sačinjen od ugljikovih, dušikovih i kisikovih atoma. Zbog njihove razlike u elektronegativnosti sadrži polarne veze koje se pri specifičnim uvjetima cijepaju (slika 25).



**Slika 25.** Karbendazim – strukture iona prekursora i iona produkata.

### 3.1.4. Ostali parametri

Uz spomenute parametre optimizirani su: radiofrekventni (RF) napon fokusirajuće leće, napon na kapilari (engl. *Spray Voltage*), protok plina za stvaranje fine maglice (engl. *Sheath Gas*), protok pomoćnog plina za stvaranje fine maglice (engl. *Auxiliary Gas*), protok plina za poboljšavanje stvaranja fine maglice (engl. *Sweep Gas*), temperatura kapilare za prijenos iona (engl. *Ion Transfer Tube Temperature*) i temperatura plina za stvaranje fine maglice (engl. *Vaporizer Temperature*); koji također pridonose preciznosti metode na spektrometru masa. Za svaki parametar dobivena je krivulja iz koje se očitala vrijednost na kojoj nastaje najviše iona te su za neke parametre usklađene. U tablici 5 prikazani su svi parametri spektrometra masa, a u priložima 1 – 5 prikazane su krivulje iz kojih su određeni pojedini parametri.



**Tablica 5.** Optimizirani parametri spektrometra masa.

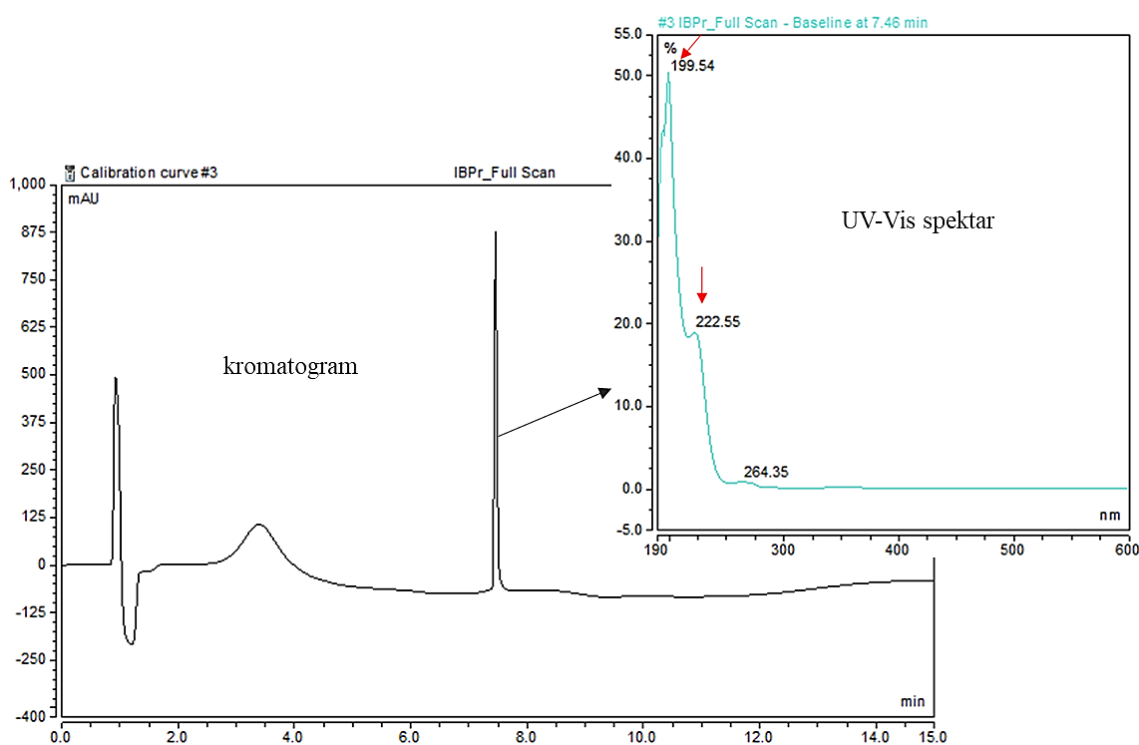
<b>Parametar</b>	<b>IBUPROFEN</b>	<b>KARBENDAZIM</b>
Način rada	Negativan	Pozitivan
Napon fokusirajuće leće (V)	47,0	68,0
Napon na kapilari (V)	4900	4490
Plin za stvaranje fine maglice (Arb.*)	21,3	
Pomoćni plin za stvaranje fine maglice (Arb.)	1,2	
Plin za poboljšavanje stvaranja fine maglice (Arb.)	3,3	
Tlak plina za disocijaciju izazvanu sudarom (mTorr)	1,5	
Temperatura kapilare za prijenos iona (°C)	325	
Temperatura plina za stvaranje fine maglice (°C)	350	

\*Arb. – proizvoljne (arbitrarne) jedinice

### 3.2. Identifikacija analita na DAD detektoru

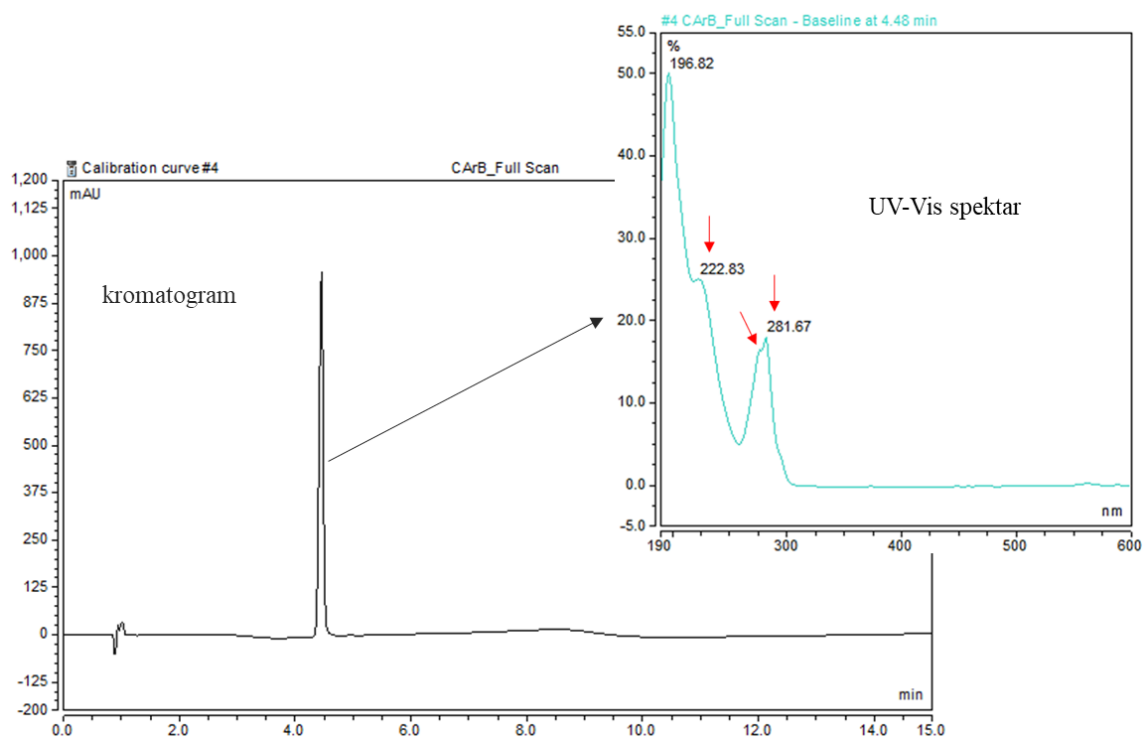
DAD detektor mjeri apsorbanciju analita u UV-Vis području elektromagnetskog zračenja, te na temelju tih vrijednost prikaže se spektar, točnije rečeno svaka molekula ima specifične vrijednosti valnih duljina svjetlosti koju apsorbira. Na taj način moguće je, uz preciznije podatke sa spektrometra masa, dobiti podatke koji su dodatna potvrda za identifikaciju analita. Pomoću računalnog programa postavljeno je snimanje na valnim duljinama 190 – 600 nm, a apsorpcija se mjerila otopinama pripremljenim za optimizaciju UHPLC dijela uređaja.

Prema dostupnoj literaturi ibuprofen apsorbira na 197 nm i 222 nm.<sup>39</sup> Spektar dobiven mjerenjem standarda ibuprofena prikazuje maksimume apsorpcijskih vrpca na 199,54 nm i 222,55 nm (slika 26) što potvrđuje da se radi upravo o toj molekuli.



Slika 26. Ibuprofen – kromatogram i UV-Vis apsorpcijski spektar.

Isti postupak ponovljen je za karbendazim, koji prema literaturi u protoniranom obliku maksimume apsorpcijskih vrhova postiže na 224, 274 i 281 nm.<sup>40</sup> Usporedbom tih vrijednosti s eksperimentalnim vrijednostima gdje su maksimumi dobiveni na 196,82 nm, 222,83 nm i 281,67 nm, te slabo vidljivi vrh na vrijednosti oko 274 nm (slika 27), može se zaključiti da je ispitivani analit uistinu karbendazim.



Slika 27. Karbendazim – kromatogram i UV-Vis apsorpcijski spektar.

### 3.3. Optimizacija UHPLC metode

Nakon odabira parametara na spektrometru masa karakterističnih za ibuprofen i karbendazim i proučenog UV-Vis spektra za oba analita može se razvijati kromatografska metoda koja će omogućiti odijeljivanje ovih analita iz smjese.

#### 3.3.1. Odabir otapala i modifikatora pokretne faze

Budući da uređaj radi na principu kromatografije obrnutih faza, pokretna faza mora biti polarnija u odnosu na nepokretnu. Sve tri raspoložive kolone su nepolarne, stoga je prvi korak pronaći omjer polarnog otapala – vode i manje polarnog metanola ili acetonitrila koji će se koristiti. Također, bitno je pronaći pogodan modifikator jer je spektrometar masa opremljen ESI ionizatorom.

Modifikatori su spojevi koji se dodaju u pokretnu fazu ili uzorak kako bi se poboljšalo odvajanje, detekcija ili ionizacija analita. Oni mogu značajno utjecati na osjetljivost metode, odnosno na sposobnost određivanja male koncentracije analita. To se odvija na nekoliko načina: promjena polariteta pokretne faze što utječe na interakciju između analita i nepokretne faze, a time na separaciju i povećanje osjetljivosti; formiranje adukta reakcijom analita i modifikatora što može povećati stabilnost i olakšati ionizaciju analita; umanjivanje supresije ionizacije od strane matrice (matriksa) kada postoje komponente matrice koje ometaju ionizaciju analita; i poboljšanje ionizacije posebice u ESI izvoru na način, općenito, da kiseli modifikatori protoniraju bazne analite ili da bazni modifikatori deprotoniraju kisele. Najčešći modifikatori su: kiseli – mravlja kiselina, octena kiselina, trifluorooctena kiselina; bazni – amonijak, amonijev format, trietilamin. Odabir odgovarajućeg modifikatora se vrši u ovisnosti od prirodi analita (polarnost, kiselost/baznost, veličina), vrsti tehnike (HPLC, LC-MS), vrsti detektora (UV/Vis, MS), matrica uzorka, i slično. Modifikatori su važni prilikom optimizacije metode s obzirom da mogu značajno povećati osjetljivost metode i separaciju te ionizaciju analita. Kako njihov utjecaj može biti složen i ovisi o mnogo karakteristika, njihov pažljiv odabir i optimizacija ključni su za postizanje najboljih rezultata.<sup>41,42</sup>

Pokretna faza u kromatografiji obrnutih faza najčešće je sastavljena od vode kao polarnog otapala, acetonitrila kao nepolarnog i/ili metanola kao manje nepolarnog otapala uz dodatak modifikatora. Uloga acetonitrila i metanola je poboljšanje otapanja pojedinih analita, promjena polarnosti i stvaranja povoljnog gradijenta pokretne faze što utječe na retenciju i separaciju analita. Isto tako ova dva otapala utječu i na: tlak u koloni – kombinacija vode i acetonitrila općenito pokazuje niži tlak u koloni što utječe na njenu trajnost; apsorpcija prilikom korištenja UV detektora za acetonitril je značajno niža na kraćim valnim duljinama; acetonitril pokazuje jaču eluciju tj. kraće vrijeme mjerenja; selektivnost kod razlučivanja – odabir otapala ovisi o prirodi analita; utjecaj na promjenu redoslijeda elucije; taloženje soli pufera – značajno se manje događa prilikom korištenja metanola. Optimalni uvjeti i omjeri te dodaci pokretnoj fazi se na kraju utvrđuju eksperimentalno u smislu što bolje osjetljivosti odnosno intenziteta signala.<sup>43</sup>

U tablici 6 prikazane su korištene kombinacije otapala i modifikatora.

**Tablica 6.** Popis kombinacije otapala i modifikatora.

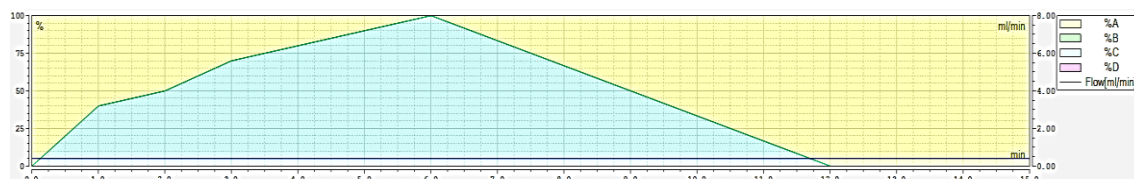
Otapalo A	Modifikator	Otapalo B	Modifikator
voda	-	metanol	-
voda	-	acetonitril	-
voda	0,1 % mravlje kiseline	metanol	-
voda	0,1 % mravlje kiseline	acetonitril	-
voda	0,05 % octene kiseline i 20 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	metanol	-
voda	0,05 % octene kiseline i 20 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	acetonitril	-
voda	0,1 % octene kiseline	metanol	-
voda	0,1 % octene kiseline	acetonitril	-
<b>voda</b>	<b>0,05 % octene kiseline</b>	<b>metanol</b>	-
voda	0,05 % octene kiseline	metanol	0,05 % octene kiseline

Analizom rezultata mjerenja s otapalima bez modifikatora, te ukoliko je modifikator mravlja kiselina, karbendazim ima povoljan odziv, dok je ibuprofen teško uočljiv na kromatogramu. Nakon toga ispituje se kombinacija u kojoj pokretnu fazu sačinjava vodena otopina s navedenom količinom pufera (octena kiselina i amonijevog acetata) te metanol ili acetonitril, što također nepovoljno utječe na signal ibuprofena. Zbog toga se te kombinacije odbacuju te se testira octena kiselina, volumnog udjela 0,1 %, u ulozi modifikatora u vodi, pri čemu su primijećeni bolji rezultati. Nakon toga, količina modifikatora smanjuje se na 0,05 %. Najbolji signali zapaženi su kombinacijom vode s 0,05 % octene kiseline i metanola. Bolji signal dobiven korištenjem metanola se može objasniti slabom polarnošću analita te mogućnošću stvaranja vodikovih veza sa spomenutim otapalom, dok niži postotak octene kiseline doprinosi boljoj ionizaciji ibuprofena u negativnom načinu i karbendazima u pozitivnom načinu rada.

Tijekom prethodnih mjerenja brzina protoka pokretne faze bila je 0,4 mL/min i bio je postavljen promjenjivi omjer otapala, tzv. gradijent, tijekom mjerenja. Uz taj gradijent ispitano ih je još nekoliko, a izabran je optimalan te je prikazan u tablici 7 i na slici 28.

**Tablica 7.** Izabrani gradijent otapala.

Vrijeme (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0	100	0
1	60	40
2	50	50
3	30	70
6	0	100
12	100	0
15	100	0



**Slika 28.** Grafički prikaz gradijenta otapala.

### 3.3.2. Odabir kolone

Nakon odabira otapala i modifikatora pokretne faze uslijedio je izbor kolone. U tablici 8 nalaze se dimenzije i vrste isprobanih kolona.

**Tablica 8.** Podaci o korištenim kolonama.

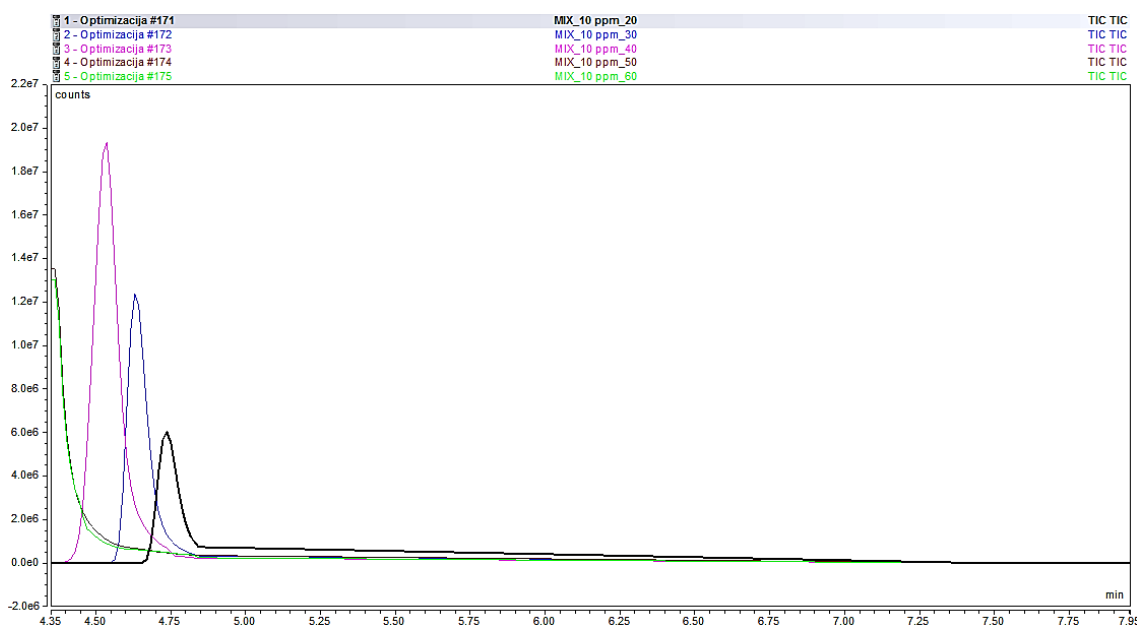
Naziv	Dimenzije kolone	Promjer čestica	Vrste čestica
Agilent™ Zorbax Eclipse XDB-C18	100 mm × 3,0 mm	3,5 μm	C18, potpuno porozne
Thermo Scientific™ Accucore™ C8	50 mm × 2,1 mm	2,6 μm	C8, neporozna jezgra porozan omotač
<b>Thermo Scientific™ Accucore™ C18</b>	<b>150 mm × 2,1 mm</b>	<b>2,6 μm</b>	<b>C18, neporozna jezgra porozan omotač</b>

Prva kolona navedena u tablici sadrži potpuno porozne čestice sa C18 alkilnim lancima za razliku od druge dvije koje sadrže čestice sa neporoznom jezgrom i poroznim omotačem jedna s C8, a druga s C18 alkilnim lancima. Analizom kromatograma dobivenih mjerenjem na sve tri kolone najbolje razlučivanje i odziv zapaženi su kada je korištena C18 kolona s neporoznom jezgrom i poroznim omotačem. Ova kolona ima jače hidrofobne interakcije u usporedbi s kolonom jednakih vrsta čestica s C8 lancima, te je za posljedicu postignuto jednoliko eluiranje pri povoljnom omjeru otapala, što je dovelo do užeg, simetričnijeg i višeg signala za ibuprofen. Usporedbom odabrane kolone s kolonom koja sadrži alkilne lance jednakih duljina (C18), ali sa potpuno poroznim česticama također je dobiven bolji signal u slučaju odabrane kolone. Takav rezultat se može objasniti činjenicom da ova kolona ima čestice manjeg promjera što povoljno utječe na učinkovitost, a osim toga čestice sa neporoznom jezgrom omogućuju brži prijenos mase čime se postiže koncentriranje analita u manjem volumenu pokretne faze što za rezultat daje uži i viši (povoljniji) signal. Kako dulji alkilni lanci osiguravaju hidrofobniju atmosferu i stvaraju jače interakcije s manje polarnim analitima, karbendazim se zadržava kraće vrijeme na koloni u odnosu na ibuprofen te je postignuto izvrsno razdvajanje ova dva analita.

### 3.3.3. Optimizacija temperature kolone

U računalnom programu moguće je podesiti temperaturu kolone, prema tome isprobane su vrijednosti od 20 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C, a pri 30 °C izvedena su prethodna mjerenja. Kromatogrami dobiveni mjerenjem pri navedenim temperaturama i snimani *Full Scan* načinom na spektrometru masa prikazuju samo signal za karbendazim, a signal za ibuprofen je vidljiv kada se dodatno poveća taj dio kromatograma, budući da je odziv znatno manji nego za karbendazim.

Usporedbom kromatograma vrlo lako uočljivo je da se najveći signal za karbendazim (i ibuprofen) dobije kada je temperatura kolone 40 °C (slika 29), stoga se ta temperatura koristila u daljnjim mjerenjima.



**Slika 29.** Kromatogrami dobiveni mjerenjem pri temperaturama kolone 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C.

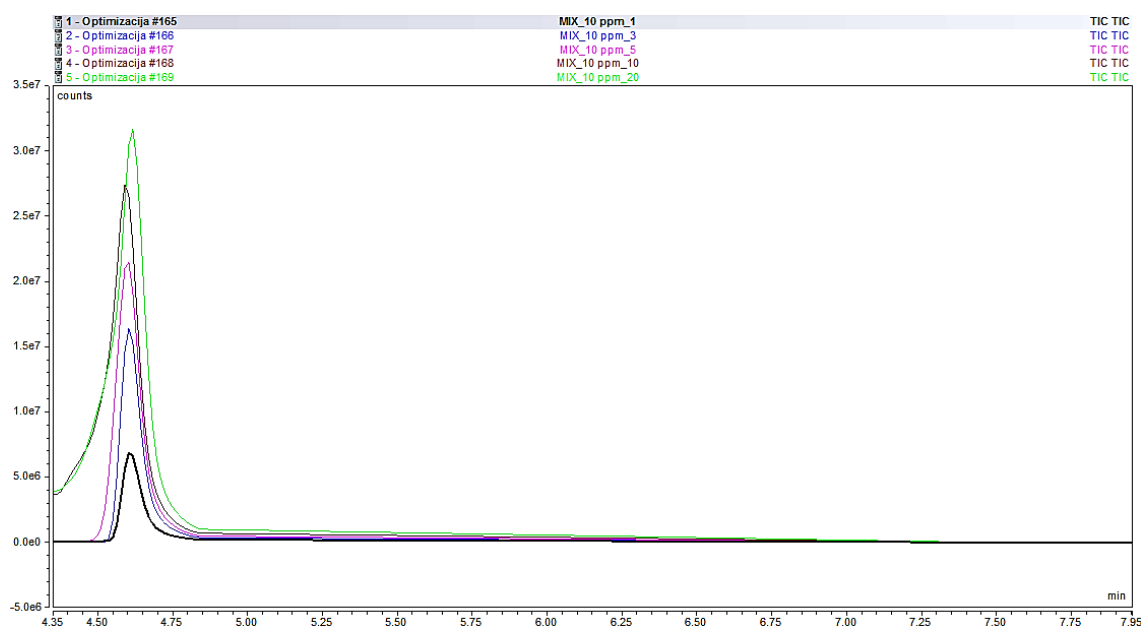
### 3.3.4. Optimizacija volumena injektiranja

Volumen injektiranog uzorka za prethodna mjerenja bio je 5  $\mu$ L. Nakon što su svi parametri optimizirani isprobana je promjena i ovog parametra. Prema tome, uz spomenuti volumen injektirani su još volumeni od 1, 3, 10 i 20  $\mu$ L. Kako je već spomenuto, cilj metode je što veći odziv, međutim bitno je da krivulja bude simetrična,



jer je asimetričnost pokazatelj prevelike količine analita u pokretnoj fazi. Kromatogrami dobiveni *Full Scan* načinom snimanja prikazuju samo odziv za karbendazim, što je objašnjeno u odlomku 3.3.3.

Promatrajući kromatograme može se zaključiti da je najveći odziv i simetrična krivulja dobivena kada je injektirani volumen uzorka 5  $\mu\text{L}$  (slika 30). Iako su signali za volumene injektiranja 10  $\mu\text{L}$  i 20  $\mu\text{L}$  viši, uslijed prevelike količine analita unesenog u kolonu došlo je do pojave poremećaja na prednjem dijelu kromatografske krivulje, tzv. pružanje (engl. *Peak Fronting*).<sup>11</sup>



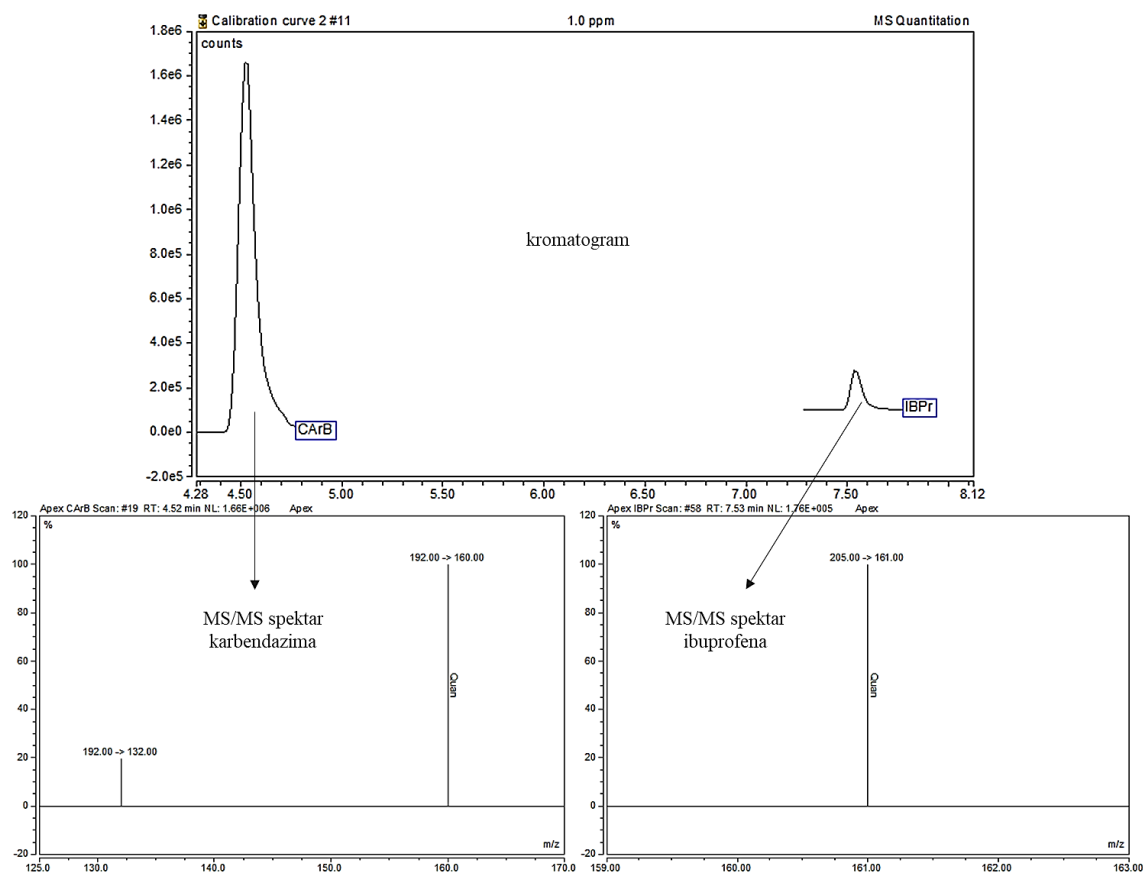
**Slika 30.** Kromatogrami dobiveni mjerenjem ako se injektira 1  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  i 20  $\mu\text{L}$ .

### 3.3.5. Vrijeme zadržavanja

Prethodnim mjerenjima na spektrometru masa bilo je zadano snimanje svih iona na prvom i trećem četveropolu (*Full Scan*), zatim je na kromatogramu odabrana krivulja kojoj su se proučavali UV-Vis spektri i spektri masa te je zaključeno o kojem analitu je riječ. Nakon toga odabran je vremenski raspon svake krivulje unutar kojeg je definirano praćenje disocijacije molekulskih iona na odabrane fragmente (SRM) opisane u odlomku 3.1. Kromatogrami dobiveni na ovaj način odražavaju količinu traženog analita, bez popratnih nečistoća. Iz takvog kromatograma (slika 31), kada su izabrane sve

komponente UHPLC uređaja i optimizirani svi parametri, može se odrediti točno vrijeme zadržavanja („retencijsko vrijeme“). Ovaj element još je jedan faktor koji će se, uz sve već spomenute, uzimati u obzir pri analizi rezultata mjerenja realnog uzorka.

Može se zamijetiti da je vrijeme zadržavanja ibuprofena 7,53 min, dok je za karbendazim 4,53 min.



**Slika 31.** Kromatogram dobiven SRM načinom snimanja na spektrometru masa i spektri masa iona nastalih iz molekularnih iona ibuprofena i karbendazima.

Također, uočljiv je manji odziv za ibuprofen u odnosu na karbendazim, iako je injektirana jednaka količina oba analita. Razlog tome je nastajanje velikog broja fragmenata čiji  $m/z$  je 161 u isto vrijeme kada nastaju molekularni ioni ibuprofena. Stoga pri SRM načinu snimanja, kada se propuštaju samo molekularni ioni analita, bude manja količina iona prekursora ibuprofena nego karbendazima.

### 3.4. Vrednovanje metode

Parametri koji određuju prikladnost metode ispitani su i uspoređeni s propisanim ICH smjernicama.<sup>35</sup> Prema tim smjernicama vrijednosti za točnost, preciznost, robusnost i prikladnost sustava trebaju se nalaziti u rasponu  $\pm 20\%$  za LLOQ te  $\pm 15\%$  za LQC, MQC i HQC otopine.<sup>44</sup> Mjerenja su izvedena na otopinama pripremljenim na način opisan u odlomku 2.3.6.

#### 3.4.1. Specifičnost

Metoda je razvijena na tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti opremljenom detektorom s nizom dioda (DAD) te spregnutim s tandemskim spektrometrom masa (MS/MS) čiji analizator masa je trostruki četveropolni analizator (QqQ). Spektrometar masa omogućuje izolaciju molekulskog iona pojedinog analita na prvom četveropolu ( $Q_1$ ), cijepanje u kolizijskoj ćeliji (q) pod određenim uvjetima te naposljetku na trećem četveropolu ( $Q_3$ ) izolaciju određenih iona fragmenata. Za promatrane analite u tablici 4 prikazani su karakteristični prijelazi. Osim toga, na DAD detektoru omogućeno je praćenje UV-Vis apsorpcijskih spektara, što je vidljivo na slikama 26 i 27 te je nakon optimizacije svih parametara određeno vrijeme zadržavanja za ibuprofen 7,53 min, a za karbendazim 4,53 min. Svi ovi parametri pridonose visokoj specifičnosti razvijene metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje ibuprofena i karbendazima.

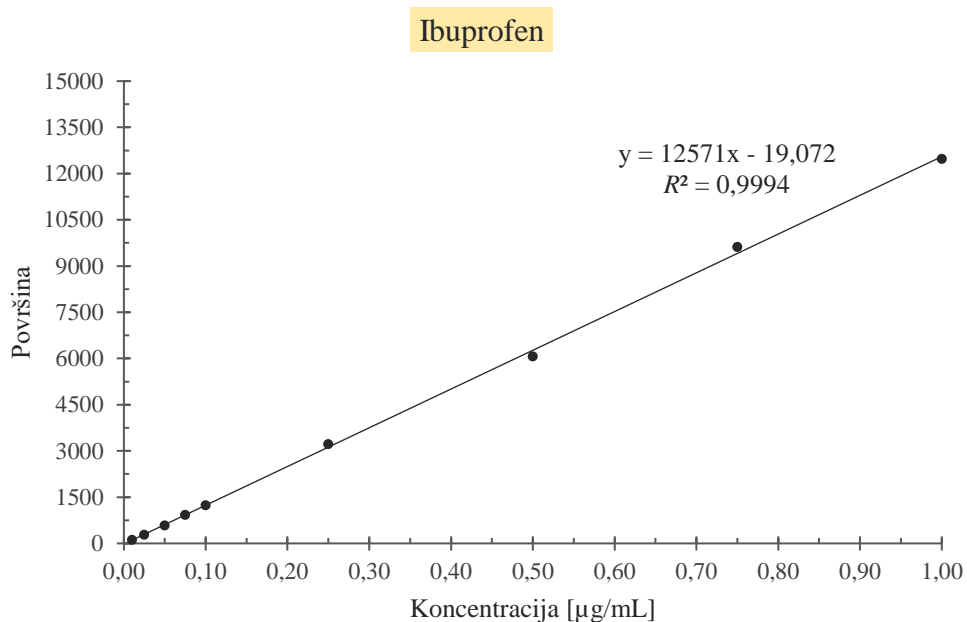
#### 3.4.2. Raspon i linearnost

Raspon, odnosno linearnost ispitana je mjerenjem otopina pripremljenih kako je opisano u odlomku 2.3.5. te su rezultati analizirani. Odstupanje od linearnosti izraženo je korelacijskim faktorom –  $R^2$ . Zahtjevi analitičke kemije za metode kvantitativnog dokazivanja analita zahtijevaju korelacijski faktor jednak ili veći od 0,999 te je potrebno da na linearnom dijelu krivulja uključuje 5 ili više točaka.<sup>35,45</sup> Analizirajući dobivene podatke za ibuprofen, vrijednost  $R^2$  iznosi 0,9994, a 9 točaka koje ispunjavaju taj uvjet nalaze se u rasponu 0,01 – 1,00  $\mu\text{g/mL}$  (slika 32). U jednakom rasponu i karbendazim

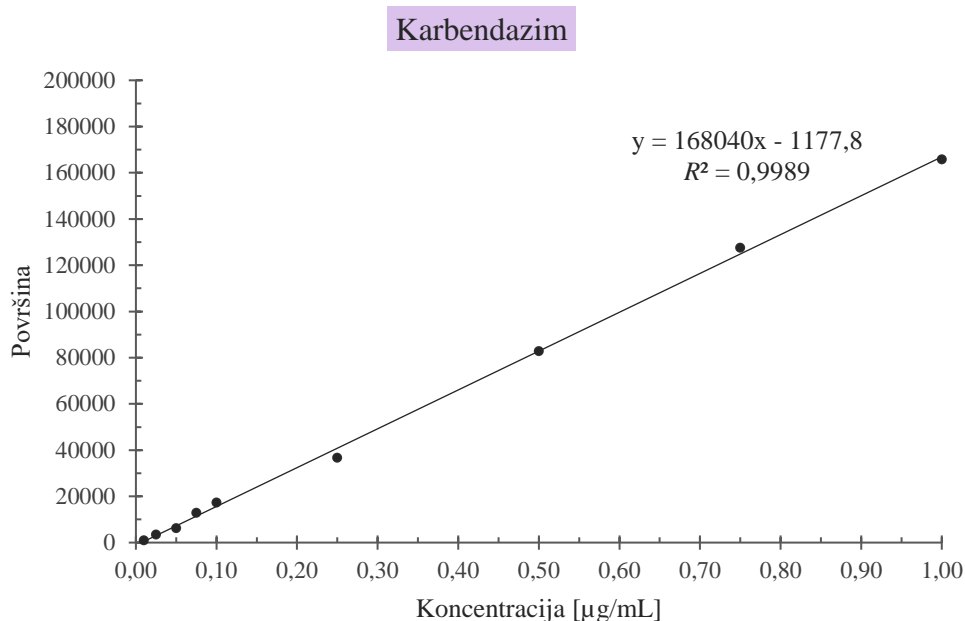
ima 9 točaka za koje je vrijednost  $R^2$  jednaka 0,9989, što se smatra prihvatljivim, budući da zaokruživanjem na tri decimale iznosi 0,999 (slika 33).

**Tablica 9.** Koncentracije pojedinih analita i površina ispod krivulje kromatograma.

	IBUPROFEN	KARBENDAZIM
Koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Površina	Površina
0,010	120	877
0,025	280	3403
0,050	585	6135
0,075	926	12825
0,100	1234	17316
0,250	3224	36679
0,500	6065	82705
0,750	9615	127498
1,000	12474	165752



**Slika 32.** Grafički prikaz ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji ibuprofena u linearnom području krivulje umjeravanja.



**Slika 33.** Grafički prikaz ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji karbendazima u linearnom području krivulje umjeravanja.

### 3.4.3. Granice dokazivanja i određivanja

Prema propisima za koncentraciju koja se smatra granicom dokazivanja omjer signala i šuma ( $S/N$ ) mora biti 3, dok za granicu određivanja mora biti 10. Imajući to na umu pripravljeno je 5 otopina koncentracije 0,01 µg/mL (najniža koncentracija iz raspona) te su mjereni signali. Iz vrijednosti tih signala dobivena je srednja vrijednost eksperimentalne koncentracije 0,018 µg/mL za ibuprofen, a 0,017 µg/mL za karbendazim. Srednja vrijednost  $S/N$  za ibuprofen pri toj koncentraciji je 24, a za karbendazim 26. Koristeći te podatke izračunate su GD i GO te prikazane u tablici 10.

Primjer izračuna granice određivanja za ibuprofen:

$$\left. \begin{array}{l} 0,018 \text{ µg/mL} \sim 24 \\ \text{GD (µg/mL)} \sim 3 \end{array} \right\} \text{GD} = \frac{0,018 \frac{\text{µg}}{\text{mL}} \cdot 3}{24}$$

$$\text{GD} = 0,0023 \text{ µg/mL}$$

$$\text{GD} = 2,3 \text{ ng/mL}$$

**Tablica 10.** Granice dokazivanja i određivanja za oba analita.

	<b>IBUPROFEN</b>	<b>KARBENDAZIM</b>
<b>Granica dokazivanja (ng/mL)</b>	2,3	2,0
<b>Granica određivanja (ng/mL)</b>	7,8	6,6

#### 3.4.4. Točnost

Točnost metode ispitana je pripravom otopina koncentracija koje pripadaju linearnom dijelu krivulje umjeravanja, mjerenjem te preračunavanjem dobivenih signala u eksperimentalne koncentracije preko jednadžbe pravca. Odstupanje od teorijske koncentracije izraženo je kao relativna pogreška u %, što je prikazano u tablici 11.

**Tablica 11.** Točnost metode.

<b>Teor. konc. (µg/mL)</b>	<b>IBUPROFEN</b>		<b>KARBENDAZIM</b>	
	<b>Eksp. konc. (µg/mL)</b>	<b>Pogreška (%)</b>	<b>Eksp. konc. (µg/mL)</b>	<b>Pogreška (%)</b>
0,010	0,011	<b>10,00</b>	0,012	<b>20,00</b>
0,025	0,024	<b>-4,00</b>	0,027	<b>8,00</b>
0,050	0,048	<b>-4,00</b>	0,044	<b>-12,00</b>
0,075	0,075	<b>0,00</b>	0,083	<b>10,67</b>
0,100	0,100	<b>0,00</b>	0,110	<b>10,00</b>
0,250	0,258	<b>3,20</b>	0,225	<b>-10,00</b>
0,500	0,484	<b>-3,20</b>	0,499	<b>-0,20</b>
0,750	0,766	<b>2,13</b>	0,766	<b>2,13</b>
1,000	0,994	<b>-0,60</b>	0,993	<b>-0,70</b>

Prema prikazanim rezultatima pogreške u rasponu od -4 do 10 % za ibuprofen te od -10 do 20 % za karbendazim ukazuju na optimalnu točnost razvijene metode za kvalitativno i kvantitativno dokazivanje ibuprofena i karbendazima.

### 3.4.5. Preciznost – ponovljivost i srednja preciznost

Ponovljivost je određena mjerenjem 5 otopina pripremljenih istog dana i od strane istog analitičara za svaku teorijsku koncentraciju od 0,010 µg/mL, 0,030 µg/mL, 0,300 µg/mL i 0,800 µg/mL. Nakon mjerenja preko jednadžbe pravca linearnog dijela dobivene su eksperimentalne vrijednosti koncentracija te je određena relativna standardna devijacija (RSD) prikazana u tablici 12.

**Tablica 12.** Ponovljivost.

<b>IBUPROFEN</b>				
<b>Srednja eksp. konc. (µg/mL)</b>	0,018	0,045	0,426	1,078
<b>RSD (%)</b>	<b>2,98</b>	<b>2,01</b>	<b>3,31</b>	<b>2,15</b>
<b>KARBENDAZIM</b>				
<b>Srednja eksp. konc. (µg/mL)</b>	0,017	0,046	0,363	0,899
<b>RSD (%)</b>	<b>8,62</b>	<b>0,98</b>	<b>2,52</b>	<b>2,06</b>

Vrijednosti RSD nalaze se ispod 4 %, osim za otopinu najmanje koncentracije karbendazima. Prema tome može se zaključiti da su razrjeđenja glavne otopine pri pripremi otopina za mjerenja napravljena precizno te na uređaju ne postoje znatne pogreške tijekom mjerenja. Razlika srednjih eksperimentalnih koncentracija od teoretskih može ukazivati na grešku pri pripremi otopine od 1 µg/mL ili ponavljanje iste greške prilikom pripreme otopina manjih koncentracija.

Vrijednosti RSD za određivanje srednje preciznosti dobivene su pripremom i mjerenjem otopina teorijskih koncentracija 0,010 µg/mL, 0,030 µg/mL, 0,300 µg/mL i 0,800 µg/mL tijekom četiri uzastopna dana. Drugi način je promjena analitičara koji priprema otopine i mjeri na uređaju. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 13 i tablici 14.

**Tablica 13.** Srednja preciznost – 4 dana.

<b>IBUPROFEN</b>				
<b>Srednja eksp. konc. (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,011	0,030	0,281	0,711
<b>RSD (%)</b>	<b>8,51</b>	<b>9,03</b>	<b>9,96</b>	<b>5,34</b>
<b>KARBENDAZIM</b>				
<b>Srednja eksp. konc. (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,016	0,040	0,341	0,814
<b>RSD (%)</b>	<b>3,17</b>	<b>3,77</b>	<b>8,06</b>	<b>9,35</b>

Analizom rezultata relativne standardne devijacije vidljivo je da se rezultati nalaze unutar 10 % odstupanja, što znači da su otopine pripravljene optimalnom preciznošću te da se rezultati mjerenja na istom uređaju tijekom nekoliko dana značajno ne razlikuju.

**Tablica 14.** Srednja preciznost – dva analitičara.

<b>IBUPROFEN</b>				
<b>Srednja eksp. konc. (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,011	0,032	0,305	0,727
<b>RSD (%)</b>	<b>12,86</b>	<b>2,24</b>	<b>1,63</b>	<b>3,31</b>
<b>KARBENDAZIM</b>				
<b>Srednja eksp. konc. (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,015	0,039	0,304	0,725
<b>RSD (%)</b>	<b>9,43</b>	<b>0,00</b>	<b>0,23</b>	<b>3,22</b>

Niske vrijednosti RSD, osim za najmanje koncentracije ibuprofena i karbendazima, ukazuju da su oba analitičara pripremila otopine i mjerila sličnom preciznošću.

#### **3.4.6. Prikladnost sustava**

Prikladnost sustava ispitana je uzastopnim injektiranjem otopine koncentracije 0,30  $\mu\text{g/mL}$  ibuprofena i isto toliko karbendazima, odnosno mjerenjem iste otopine pet puta. Dobiveni signali preračunati su u koncentracije, a zatim je izračunata RSD. Za



ibuprofen ta vrijednost je iznosila 2,20 %, dok je za karbendazim 2,75 %. Stoga možemo zaključiti da osim analitičareve pogreške tijekom pripreve otopine i na samom uređaju postoji malo odstupanje tijekom mjerenja.

### 3.4.7. Robusnost

Robusnost metode ispitana je mjerenjem otopina čije su teorijske koncentracije jednake onim za određivanje preciznosti. Stvorene su dvije nove metode, jedna u kojoj je temperatura kolone 20 % manja od odabranih 40 °C, a druga s 20 % većom temperaturom, tj. 32 °C i 48 °C. Odstupanja su iskazana relativnom standardnom devijacijom, što je vidljivo u tablici 15. Također, na isti način ispitana je promjena temperature kolone za 5 °C, tj. pri 35 °C i 45 °C, što je prikazano u tablici 16.

**Tablica 15.** Robusnost – promjena temperature kolone za 8 °C.

<b>IBUPROFEN</b>				
<b>Temperatura kolone (°C)</b>	<b>Ekperimentalna koncentracija (µg/mL)</b>			
32	0,009	0,020	0,196	0,499
40	0,010	0,026	0,246	0,684
48	0,008	0,019	0,202	0,497
<b>RSD (%)</b>	<b>11,11</b>	<b>17,47</b>	<b>12,72</b>	<b>19,18</b>
<b>KARBENDAZIM</b>				
<b>Temperatura kolone (°C)</b>	<b>Ekperimentalna koncentracija (µg/mL)</b>			
32	0,016	0,034	0,292	0,617
40	0,015	0,042	0,337	0,839
48	0,018	0,033	0,259	0,619
<b>RSD (%)</b>	<b>9,35</b>	<b>13,58</b>	<b>13,32</b>	<b>18,45</b>

**Tablica 16.** Robusnost – promjena temperature kolone za 5 °C.

<b>IBUPROFEN</b>				
<b>Temperatura kolone (°C)</b>	<b>Eksperimentalna koncentracija (µg/mL)</b>			
35	0,011	0,025	0,252	0,665
40	0,010	0,026	0,246	0,684
45	0,011	0,025	0,248	0,662
<b>RSD (%)</b>	<b>5,41</b>	<b>2,28</b>	<b>1,23</b>	<b>1,78</b>
<b>KARBENDAZIM</b>				
<b>Temperatura kolone (°C)</b>	<b>Eksperimentalna koncentracija (µg/mL)</b>			
35	0,021	0,041	0,338	0,840
40	0,015	0,042	0,337	0,839
45	0,016	0,041	0,340	0,839
<b>RSD (%)</b>	<b>16,66</b>	<b>1,40</b>	<b>0,45</b>	<b>0,07</b>

Usporedbom RSD kada je promjena temperature  $\pm 8$  °C i  $\pm 5$  °C vidljivo je da prilikom promjene od 5 °C dolazi do znatno manjih oscilacija koncentracija. Stoga, može se zaključiti da je metoda vrlo robusna za promjene temperature od 5 °C, iako se RSD za veće oscilacije ( $\pm 8$  °C) također nalazi unutar dopuštenih granica varijacije.

#### **3.4.8. Stabilnost**

Stabilnost ibuprofena i karbendazima ispitana je pripravljanjem početne otopine u kojoj je koncentracija svakog analita 1 µg/mL, a razrjeđenja i mjerenja su napravljena isti dan. Početna otopina se čuvala u zamrzivaču te su nakon tri i sedam dana ponovo pripravljene razrijeđene otopine. Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 17.

**Tablica 17.** Stabilnost otopine ibuprofena i karbendazima.

<b>IBUPROFEN</b>				
	<b>Eksperimentalna koncentracija (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>			
<b>Dan 1</b>	0,010	0,032	0,306	0,765
<b>Dan 3</b>	0,011	0,025	0,257	0,726
Degradacija (%) od 1. dana	-	<b>21,88</b>	<b>16,01</b>	<b>5,10</b>
<b>Dan 7</b>	0,011	0,024	0,246	0,628
Degradacija (%) od 1. dana	-	<b>25,00</b>	<b>19,61</b>	<b>17,91</b>
<b>KARBENDAZIM</b>				
	<b>Eksperimentalna koncentracija (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>			
<b>Dan 1</b>	0,016	0,039	0,368	0,888
<b>Dan 3</b>	0,015	0,032	0,348	0,865
Degradacija (%) od 1. dana	<b>6,25</b>	<b>17,95</b>	<b>5,43</b>	<b>2,59</b>
<b>Dan 7</b>	0,012	0,027	0,211	0,622
Degradacija (%) od 1. dana	<b>33,33</b>	<b>30,77</b>	<b>42,66</b>	<b>29,95</b>

Srednja vrijednost smanjenja koncentracije za ibuprofen nakon tri dana je 14,33 %, a nakon sedam dana 20,84 %. Koncentracija karbendazima nakon tri dana prosječno se smanji 8,06 %, a nakon sedam dana 34,18 %. Ove vrijednosti nisu zanemarive, pa ih treba uzeti u obzir prilikom analize realnih uzoraka ukoliko se analiti nalaze otopljeni u uzorku.

## 4. ZAKLJUČAK

Analizom rezultata mjerenja može se zaključiti sljedeće:

- Uspješno je razvijena metoda za odijeljivanje ibuprofena i karbendazima, te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje na uređaju za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti spregnutu sa spektrometrijom masa.
- Otopalo u kojem se dobro otapaju standardi ibuprofena i karbendazima je metanol.
- Za razdvajanje analita na kromatografu odabrana je Accucore™ C18 kolona s punjenjem promjera čestica 2,6  $\mu\text{m}$ , pokretna faza je voda s 0,05 % volumnog udjela octene kiseline te metanol. Pokretna faza protječe brzinom od 0,4 mL/min, zadanim gradijentom. Najoptimalnija temperatura kolone je 40 °C, a volumen injektiranja uzorka 5  $\mu\text{L}$ .
- Vrijednosti 199,54 nm i 222,55 nm apsorpcijskih maksimuma na UV-Vis spektru ukazuju na ibuprofen, a 196,82 nm, 222,83 nm, 281,67 nm te 274 nm karakteristični su za karbendazim.
- Na spektrometru masa kvantitativni i potvrdni prijelazi ( $m/z$ ) za karbendazim su redom: 192  $\rightarrow$  160 i 192  $\rightarrow$  132, a ibuprofen posjeduje samo jedan, kvantitativni prijelaz: 205  $\rightarrow$  161. Ibuprofen je sniman pri negativnom načinu rada, a karbendazim pri pozitivnom.
- Raspon koncentracija unutar kojih se uočava linearnost krivulje umjeravanja je za oba analita 0,010  $\mu\text{g/mL}$  – 1,000  $\mu\text{g/mL}$ , pri čemu je  $R^2$  za ibuprofen 0,9994; a za karbendazim 0,9989. Granice dokazivanja za ibuprofen i karbendazim su redom: 0,0023  $\mu\text{g/mL}$  i 0,0020  $\mu\text{g/mL}$ , a granice određivanja su: 0,0078  $\mu\text{g/mL}$  i 0,0066  $\mu\text{g/mL}$ , što ukazuje na neometanu kvantifikaciju ovih analita korištenjem jednadžbe pravca linearnog dinamičkog područja.
- Vrijeme zadržavanja ibuprofena je 7,53 min, a karbendazima 4,53 min, dok je konačno trajanje mjerenja 15 min kako bi se osiguralo ispiranje kolone od eventualnih zaostataka analita.

- Ostali parametri ispitani vrednovanjem metode: točnost, ponovljivost, srednja preciznost, prikladnost sustava i robusnost pokazuju prihvatljive, većinom vrlo male vrijednosti odstupanja od zadanih ili srednjih. Prema tome može se zaključiti da je metoda prikladna za ispitivanje realnih uzoraka.
- Stabilnost iskazuje značajne postotke razgradnje analita u razdoblju od 7 dana, stoga to treba uzeti u obzir ukoliko je uzorak otopina ibuprofena i karbendazima.
- U konačnici može se zaključiti da je razvijena metoda vrlo specifična zbog optimiziranih parametara koji su karakteristični svakom pojedinom analitu i izvrsnog razlučivanja.

## 5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

NSAID – nesteroidni protuupalni lijek (engl. *Nonsteroidal anti-inflammatory drug*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

COX – ciklooksigenaza (engl. *ciclooxigenasa*)

FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*)

IUPAC – Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

UHPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

UV-Vis – ultraljubičasti i vidljivi dio elektromagnetskog zračenja (engl. *Ultraviolet and Visible emissions*)

ELS – raspršenje svjetlosti isparavanjem (engl. *Evaporative Light Scattering*)

DAD – detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*)

MS – spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*)

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*)

APCI – kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*)

APPI – fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photoionization*)

ICP-MS – induktivno spregnuta plazma (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

MALDI – maticom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

Q – četveropolni analizator (engl. *Quadrupole*)

QqQ – trostruki četveropolni analizator (engl. *Triple Quadrupoles*)

CID – disocijacija izazvana sudarom (engl. *Collision Induced Dissociation*)

MS/MS – tandemaska spektrometrija masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*)

SRM – praćenje odabranih reakcija fragmentacije (engl. *Selected Reaction Monitoring*)

LDP – linearno dinamičko područje (engl. *Linear Dynamic Range*)

LLOQ – donja granica kvantifikacije (engl. *Low Limit Of Quantitation*)

LQC – kontrola kvalitete na niskoj koncentraciji (engl. *Low Quality Control*)

MQC – kontrola kvalitete na srednjoj koncentraciji (engl. *Medium Quality Control*)

HQC – kontrola kvalitete na visokoj koncentraciji (engl. *High Quality Control*)

ICH – Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*)

GD – granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*)

GO – granica određivanja (engl. *Limit of Quantitation*)

UHPLC-MS/MS – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

$pK_a$  – konstanta disocijacije kiseline

$t_m$  - zadržano vrijeme

$t_r$  – ukupno vrijeme zadržavanja

$t_r'$  – prilagođeno vrijeme zadržavanja

$h$  – visina kromatografske krivulje

$w$  – širina kromatografske krivulje;  $w_{1/2}$  – širina kromatografske krivulje na polovici visine

$R_s$  – razlučivanje

$m/z$  – omjer mase i naboja (engl. *mass-to-charge ratio*)

$R^2$  – korelacijskim faktorom

$S/N$  – omjer signala i šuma (engl. *Signal to Noise Ratio*)

## 6. LITERATURA

1. *B. Birmingham, A. Buvanendran*, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Acetaminophen, and COX-2 Inhibitors, u H. T. Benzon, C. L. Wu, C. E. Argoff, J. P. Rathmell, D. C. Turk, R. W. Hurley (ur.), Practical Management of Pain, 5. izdanje, Elsevier Inc., Philadelphia, 2014, 553 – 568, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08340-9.00040-2>.
2. World Health Organization Model List of Essential Medicines, 23. popis, 2023.
3. *J. Jan-Roblero, J. A. Cruz-Maya*, Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant, *Molecules* **28** (2023) 2097 – 2112, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28052097>.
4. *E. Makuch, P. Ossowicz-Rupniewska, J. Klebeko, E. Janus*, Biodegradation of L-valine alkyl ester ibuprofenates by bacterial cultures, *Materials* **14** (2021) 3180 – 3194, doi: <https://doi.org/10.3390/ma14123180>.
5. *H. Shao, Y. Zhang*, Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin, *Sci Rep* **7** (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>.
6. *S. Singh, N. Singh, V. Kumar, S. Datta, A. B. Wani, D. Singh, K. Singh, J. Singh*, Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim, *Environ Chem Lett* **14** (2016), 317 – 329, doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0566-2>.
7. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2019.
8. Pesticide Residues in Food 1997, FAO Plant production and protection paper, Rome, 1998.
9. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen> (23.7.2024.).
10. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbendazim> (23.7.2024.).
11. *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, Uvod u Analitičku Kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 628 – 663.



12. *M. S. Cvet*, 51. M. Tswett: Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen, *Ber Dtsch Bot Ges* **24** (1906) 316 – 323, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1906.tb06524.x>.
13. *D. Harvey*, *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, Boston, 2000, str. 543 – 621.
14. *T. E. Crowley*, *High-performance liquid chromatography u Purification and Characterization of Secondary Metabolites*, Academic Press, London, 2020, str. 49 – 58, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813942-4.00005-X>.
15. *S. Eeltink, J. De Vos*, *Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography u J. Reedijk (ur.)*, *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, Bruxelles, 2017, str. 261 – 269, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14268-4>.
16. *L. Nováková, P. Svoboda, J. Pavlík*, *Ultra-high performance liquid chromatography u S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole, M. L. Riekkola (ur.)*, *Liquid Chromatography*, 2. izdanje, Elsevier, Amsterdam, 2017, str. 719 – 769, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4>.
17. *B. M. Wagner, S. A. Schuster, B. E. Boyes, T. J. Shields, W. L. Miles, M. J. Haynes, R. E. Moran, J. J. Kirkland, M. R. Schure*, *Superficially porous particles with 1000Å pores for large biomolecule high performance liquid chromatography and polymer size exclusion chromatography*, *J Chromatogr A* **1489** (2017) 75 – 85, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.082>.
18. *L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan*, *Detection u Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3. izdanje, Wiley, New York, str. 147 – 197, doi: <https://doi.org/10.1002/9780470508183.ch4>.
19. *D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch*, *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9. izdanje, Mary Finch, Belmont, 2014, str. 912 – 934.
20. *P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, P. Serra-Mora*, *Liquid Chromatography—Instrumentation u P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró (ur.)*, *Encyclopedia of Analytical Science*, 3. izdanje, Elsevier, Amsterdam, 2018, str. 108 – 116, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14218-0>.

21. *M. E. LaCourse, W. R. LaCourse*, General instrumentation in HPLC u S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole, M. L. Riekkola (ur.), *Liquid Chromatography*, 2. izdanje, Elsevier, Amsterdam, 2017, str. 417 – 429 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8>.
22. *E. Stauffer, J. A. Dolan, R. Newman*, *Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry u Fire Debris Analysis*, Academic Press, Burlington, 2008, str. 235 – 293, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>.
23. *D. C. Harris*, *Quantitative Chemical Analysis*, 7. izdanje, W. H. Freeman and Company, New York, 2007, str. 474 – 500.
24. *E. de Hoffmann, V. Stroobant*, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 3. izdanje, Wiley, Chichester, 2007.
25. *J. Griffiths*, A Brief History of Mass Spectrometry, *Anal Chem* **80** (2008) 5678 – 5683, doi: <https://doi.org/10.1021/ac8013065>.
26. *L. Berdié, I. Casals, I. Fernández, O. Jáuregui, R. M. Marimon, J. Perona, P. Teixidor*, Basics of Mass Spectrometry, u J. R. Seoane, X. Llovet (ur.), *Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research*, Centres Científics i Tecnològics UB, Barcelona, 2012, ChT.5.
27. *M. A. Geer Wallace, J. P. McCord*, High-resolution mass spectrometry u J. Beauchamp, C. Davis, J. Pleil (ur.), *Breathborne Biomarkers and the Human Volatilome*, 2. izdanje, Elsevier, Amsterdam, 2020, str. 253 – 270, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819967-1.00016-5>.
28. *M. Manohar, M. A. Marzinke*, Application of Chromatography Combined With Mass Spectrometry in Therapeutic Drug Monitoring u W. Clarke, A. Dasgupta (ur.), *Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring: Special Populations, Physiological Conditions, and Pharmacogenomics*, 1. izdanje, Elsevier Inc., Amsterdam, 2016, str. 45 – 70, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802025-8.00003-9>.
29. URL:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_%28Analytical\\_Chemistry%29/Instrumentation\\_and\\_Analysis/Mass\\_Spe](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_%28Analytical_Chemistry%29/Instrumentation_and_Analysis/Mass_Spe)

ctrometry/Mass\_Spectrometers\_%28Instrumentation%29/Electrospray\_Ionization\_Mass\_Spectrometry (6. 8. 2024.).

30. *A. M. Haag*, Mass Analyzers and Mass Spectrometers, u *H. Mirzaei*, *M. Carrasco*, *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications iz Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 919, Springer International, Cham, 2016, str. 157 – 169, doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7).
31. *A. Saitman*, Overview of Analytical Methods in Drugs of Abuse Analysis: Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Liquid Chromatography Combined With Tandem Mass Spectrometry and Related Methods u *A. Dasgupta* (ur.), *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*, 2. izdanje, Academic Press, London, 2019, str. 157 – 171, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815607-0.00013-7>.
32. *J. B. Crowther*, Validation od Pharmaceutical Test Methods u *S. Ahuja*, *S. Scypinski* (ur.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Vol. 3, Academic Press, San Diego, 2001, str. 415 – 444.
33. *M. Son*, *J. Yang*, *S. Cho*, *J. Lee*, *H. Bin Oh*, GC–MS Method for the Quantitative Analysis of Limonene from Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Bull Korean Chem Soc* **39** (2018) 1368 – 1372, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bkcs.11607>.
34. *R. LoBrutto*, *T. Patel*, Method Validation u *Y. Kazakevich*, *R. LoBrutto* (ur.), *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, Hoboken, 2007, str. 455 – 502, doi: <https://doi.org/10.1002/9780470087954.ch9>.
35. ICH Harmonised guideline, Validation of Analytical Procedures Q2(R2), 2022.
36. *D. R. Joshi*, *N. Adhikari*, An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity, *J Pharm Res Int* **28** (2019) 1 – 18, doi: <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v28i330203>.
37. *M. Gros*, *M. Petrović*, *D. Barceló*, Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in

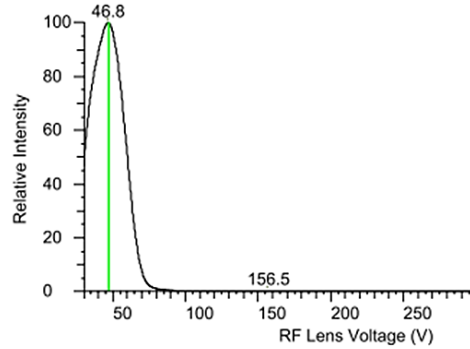
- surface and wastewaters, *Talanta* **70** (2006) 678 – 690,  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>.
38. *P. Paíga, A. Lolić, F. Hellebuyck, L. H. M. L. M. Santos, M. Correia, C. Delerue-Matos*, Development of a SPE-UHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater, *J Pharm Biomed Anal* **106** (2015) 61 – 70,  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.06.017>.
39. *G. Marbán, A. Fernández-Pérez, S. Álvarez-García*, Ultraviolet light spectroscopic characterization of ibuprofen acid aggregation in deionized water, *Heliyon* **9** (2023), doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21260>.
40. *P. Mazellier, É. Leroy, B. Legube*, Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution, *J Photochem Photobiol A Chem* **153** (2002) 221 – 227, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1010-6030\(02\)00296-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1010-6030(02)00296-4).
41. *J. Dolan*, A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection, ACE HPLC Columns, 2006.
42. *P. Liigand, K. Kaupmees, K. Haav, J. Liigand, I. Leito, M. Girod, R. Antoine, A. Kruve*, Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte, *Anal Chem* **89** (2017) 5665 – 5668,  
doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00096>.
43. URL: <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/lib/methanol-acetonitrile.html> (25. 9. 2024.).
44. ICH Harmonised guideline, Bioanalytical Method Validation And Study Sample Analysis M10, 2022.
45. *N. A. Epshtein*, Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice, *Drug development & registration* **8** (2019) 122–130, doi: <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130>.

## 7. PRILOZI

**Prilog 1.** Radiofrekventni napon fokusirajuće leće (ibuprofen – lijevo i karbendazim – desno).

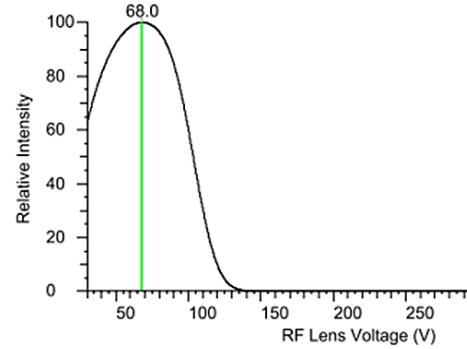
Optimizing RF Lens of Ion 205.000 in Q1MS (-)

Optimal Value: 47 V; Optimal Intensity: 3.02E+006



Optimizing RF Lens of Ion 192.000 in Q1MS (+)

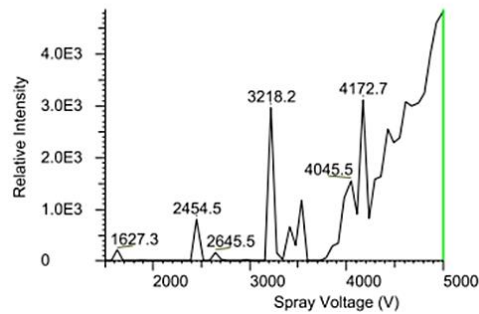
Optimal Value: 68 V; Optimal Intensity: 2.79E+008



**Prilog 2.** Napon na kapilari (ibuprofen – lijevo i karbendazim – desno).

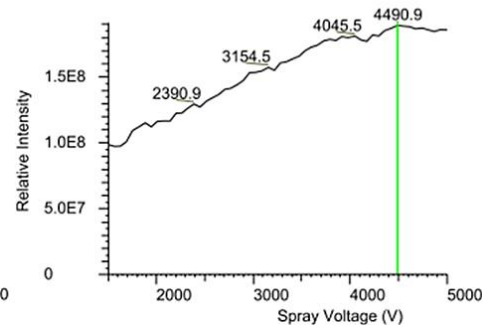
Optimizing Spray Voltage for Ion 205.000 in Q1MS (-)

Optimal Spray Voltage = 5000



Optimizing Spray Voltage for Ion 192.000 in Q1MS (+)

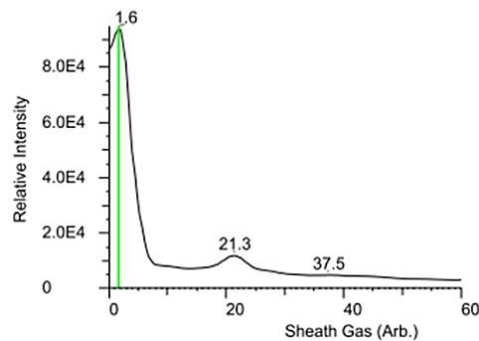
Optimal Spray Voltage = 4490.909



**Prilog 3.** Plin za stvaranje fine maglice (ibuprofen – lijevo i karbendazim – desno).

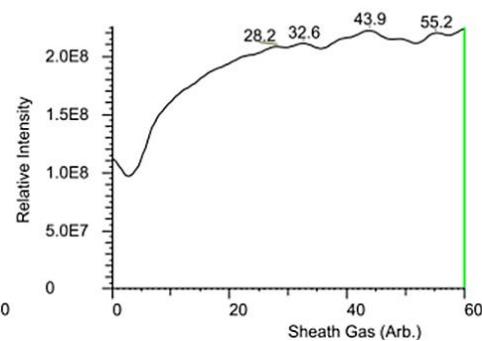
Optimizing Sheath Gas for Ion 205.000 in Q1MS (-)

Optimal Sheath Gas = 1.611



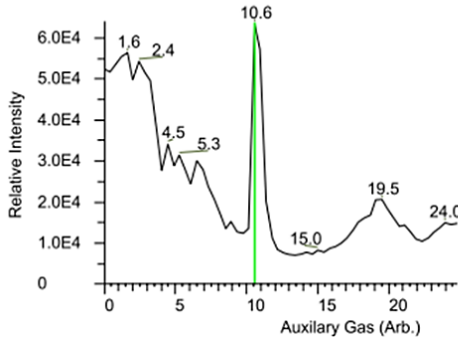
Optimizing Sheath Gas for Ion 192.000 in Q1MS (+)

Optimal Sheath Gas = 60

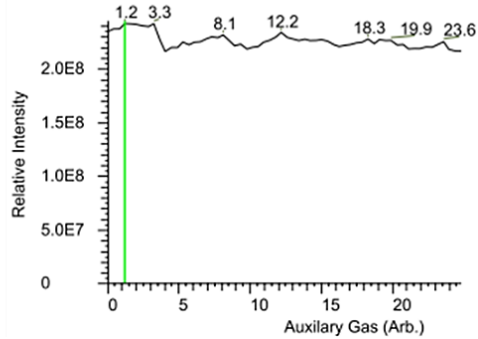


**Prilog 4.** Pomoćni plin za stvaranje fine maglice (ibuprofen – lijevo i karbendazim – desno).

Optimizing Auxiliary Gas for Ion 205.000 in Q1MS (-)  
Optimal Auxiliary Gas = 10.569

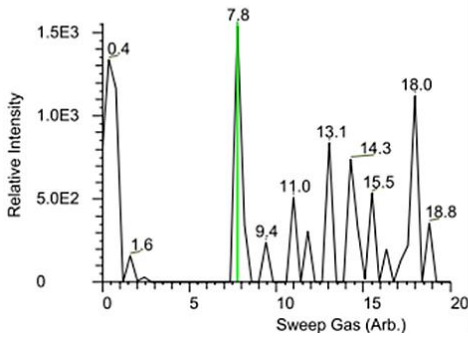


Optimizing Auxiliary Gas for Ion 192.000 in Q1MS (+)  
Optimal Auxiliary Gas = 1.22



**Prilog 5.** Plin za poboljšavanje stvaranja fine maglice (ibuprofen – lijevo i karbendazim – desno).

Optimizing Sweep Gas for Ion 205.000 in Q1MS (-)  
Optimal Sweep Gas = 7.755



Optimizing Sweep Gas for Ion 192.000 in Q1MS (+)  
Optimal Sweep Gas = 3.265

