

Állatorvostudományi Egyetem

Élelmiszer-higiéniai Tanszék



**Bioanalitikai módszer fejlesztése és validálása állatgyógyászati
antibiotikumok méréséhez állati szövetekből**

**Development and validation of a bioanalytical method for measuring
veterinary antibiotics from animal tissues**

Lakatos Zsófi

Témavezető: Dr. Lányi Katalin

Élelmiszer-higiéniai Tanszék (EHT)

2023

Absztrakt

Diplomamunka kutatásom a házityúk (*Gallus gallus domesticus*) izom, vese, zsír és máj szövetéből az amoxicillin, enrofloxacin és ciprofloxacín vegyületek LC-MS/MS műszerrel történő meghatározásához szükséges módszer fejlesztésére, illetve validálására irányult. Kutatásunk során kiskereskedelmi forgalomból, vágóhídról, illetve egyéb úton beszerzett házityúk szöveteket mesterséges elszennyezését követően hajtottunk végre néhány próbakísérletet, módszerfejlesztés céljából. Amikor a módszerünkhöz a mintaelőkészítés megfelelőnek bizonyult, a méréseink eredményeinek kiszámítása, valamint kiértékelése következett, majd a kapott eredményeinket elbíráltuk, a validálási paraméterekre vonatkozó megfelelő tartományok szerint. A vizsgált paraméterek közül a linearitás, valamint a mérési napon belüli és mérési napok közötti precizitás és pontosság paraméterei minden esetben megfelelőnek bizonyultak, amit a módszerfejlesztésünket követően el is vártunk. A stabilitás a mátrixban tanulmányozása azt az eredményt hozta, hogy nem célravezető a mérés előtt több órán át szobahőmérsékleten hagyni a mérésre váró mintát, valamint a már egyszer kiolvaszott mintát sem szabad visszahelyezni a fagyasztóba, hanem annak mérését el kell végezni. Robusztusság tekintetében pedig az áramlási sebesség és az ultrahangos rázatás változására robusztusnak tekinthető a módszer, azonban az eluens additív koncentrációját változtatva ez nem volt megállapítható. Összességében elmondható, hogy egy megfelelő érzékenységgű és költséghatékony módszert sikerült fejlesztenünk, aminek alkalmazásával különböző szövetekben, egymástól különböző vegyületek mérhetőek, megfelelő hatékonysággal.

Abstract

My thesis research was intended to develop and validate a method necessary for determining the compounds of amoxicillin, enrofloxacin and ciprofloxacin by LC-MS/MS from the muscle, kidney, fat and liver tissues of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). During the research, after the artificial contamination of chicken tissues obtained from retail sale, slaughterhouses or by other means, some trial experiments were conducted with the aim of method development. When the sample preparation was found to be appropriate for our method, the results of our measurements were calculated and appraised. Then the obtained results were assessed in accordance with the appropriate ranges for the validation parameters. From among the parameters examined, linearity as well as within-run and between-run precision and accuracy were proved to be adequate in all cases, which we expected after our method development. The investigation of stability in the matrix led to the conclusions that it is not

suitable to leave stay samples to be measured at room temperature for several hours before measuring, and samples must not be put back into the freezer once unfrozen, but they shall be measured as soon as possible. Regarding to robustness, the method can be considered robust for the change of flow rate and ultrasonic shaking; however, the same can not be ascertained by changing the concentrations of the eluent additive. Overall, a method with appropriate sensitivity and cost-effectiveness could be developed, which can be used to measure different compounds in different tissues with appropriate efficiency.

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| 1. Bevezetés | 6 |
| 2. Irodalmi áttekintés | 8 |
| 2.1 Az antibiotikumok története az állatgyógyászatban | 8 |
| 2.2 A rezisztencia helyzet | 9 |
| 2.3 A vizsgált antibiotikumok..... | 12 |
| 2.3.1. Amoxicillin..... | 12 |
| 2.3.2. Fluorokinolonok | 14 |
| 2.4 Korábbi vizsgálatok a témában..... | 17 |
| 2.5 Analitikai módszerek validálása | 18 |
| 2.6 Vizsgálandó szövetek kiválasztása farmakokinetikai vizsgálatokhoz..... | 20 |
| 3. Anyag és módszertan | 22 |
| 3.1 Anyagok..... | 22 |
| 3.2 Módszerfejlesztés | 22 |
| 3.3 Végleges minta előkészítési eljárás | 25 |
| 3.3 Műszeres mérések..... | 25 |
| 3.4 Adatfeldolgozás | 26 |
| 3.5 Validálási paraméterek kiszámítása | 28 |
| 4. Mérési eredmények | 31 |
| 4.1 Amoxicillin..... | 31 |
| 4.1.1. Izomszövet | 31 |
| 4.1.2. Májszövet | 32 |
| 4.1.3. Veseszövet | 34 |
| 4.1.4. Zsírszövet | 36 |
| 4.2 Ciprofloxacin | 38 |
| 4.2.1. Izomszövet | 38 |
| 4.2.2. Májszövet | 40 |
| 4.2.3. Veseszövet | 42 |
| 4.2.4. Zsírszövet | 44 |
| 4.3 Enrofloxacin | 46 |
| 4.3.1. Izomszövet | 46 |
| 4.3.2. Májszövet | 48 |
| 4.3.3. Veseszövet | 50 |
| 4.3.4. Zsírszövet | 52 |
| 5. Következtetések | 55 |

| | |
|------------------------------|----|
| 6. Összefoglalás | 58 |
| 7. Irodalomjegyzék | 59 |
| 8. Köszönetnyilvánítás | 62 |

1. Bevezetés

A világ népessége folyamatosan növekszik és ezzel együtt folyamatosan növekedni kell az állattenyésztésnek is, hogy lépést tudjon tartani a növekvő élelmiszerigényekkel. A baromfihús fogyasztás minden országban és régióban emelkedik. Termelése napjainkra a világ hústermelésének a harmadát teszi ki. [1] Az előrejelzések szerint pedig az elkövetkezendő évtizedben ez a mennyiség a hústermelésnek a felét is elérheti, amely körülbelül 154 millió tonna. A fogyasztókat az alacsony ára, a termék konzisztenciája, illetve a magas fehérje és alacsony zsírtartalma egyaránt a baromfihús vásárlására buzdítja.[2]

Olyan hatalmas igény van a gyorsan nagy tömegűre fejlődő házi tyúk állományra, hogy ezeket a szinteket sajnos egy bizonyos mérték felett lehetetlen már csak a technológia fejlődésével kielégíteni. Az állattartó telepeken jellemző a zsúfoltság, hogy el tudják érni a tőlük elvárt darabszámot. A zsúfoltság pedig igen kedvező állapota a kórokozók terjedésének. Ezért sajnos jelentős mértékben használnak a gazdaságok antibiotikum tartalmú készítményeket, hogy a tőlük elvárt magas termelést teljesíteni tudják. Ezzel azonban az a probléma, hogy ezek a gyógyszerek megoszlanak az állatok különböző szöveteiben és ha az utolsó kezeléstől számítva nem várnak eleget a levágás pillanatáig akkor bizony ezek a maradékanyagok elérhetik a fogyasztót. Ennek pedig igen komoly negatív hatása lehet az emberi egészségre, a környezetre és az antibiotikum rezisztenciára. Egy becslés szerint az antibiotikum túlhasználatból eredő antibiotikum rezisztencia akár évente 10 millió áldozatot is követelhet világszerte, az évszázad közepén. [3]

Ezt elkerülendő a szermaradványok ellenőrzése egy új irányzatot vett az élelmiszerbiztonság szemszögéből, illetve kiemelkedő fejlődésnek indult. Szükség van egy olyan módszerre, ami minél gyorsabban és minél precízebben mutatja ki az állatgyógyászati szermaradékokat. Napjainkban erre a célra az LC-MS/MS módszert találják a legjobbnak, mivel igen sokféle anyag kimutatására alkalmas. Illetve rendkívül érzékeny módszer, a megengedett koncentrációk alatti szintek is biztonságosan mérhetőek a műszerrel.

Szakedolgozatom célja a házityúk (*Gallus gallus domesticus*; 1. ábra) izom, vese, zsír és máj szövetéből az amoxicillin, enrofloxacin és ciprofloxacin vegyületek LC-MS/MS műszerrel történő meghatározásához mérési módszer kidolgozása és validálása. A kutatásom alapját egy már létező módszer képezte, ami több, mint száz állatgyógyászati antibiotikum szűrő (screen) vizsgálatára alakítottak ki állati szövetekből, tojásból, tejből, illetve mézből. Mindenféleképpen muszáj volt ugyanakkor módosítani eljárást, hiszen a mi vizsgálati célunk más volt, mint az eredeti módszeré (reziduum vizsgálat vs. szűrővizsgálat), és a mátrixaink is különböztek:

többféle állati szövet egyszerre történő vizsgálata volt a célunk, más állati eredetű terméket viszont nem vizsgáltunk. Ráadásul a szűrővizsgálatok általános megközelítése – MRL érték fölötti antibiotikum-maradvány kimutatható-e? – a mi esetünkben nem volt követhető, hiszen nekünk meg kellett keresnünk az elérhető legalacsonyabb kimutatási határokat. Mindezek miatt a módszer adaptálását egy komolyabb mértékű módszerfejlesztés és –módosítás előzte meg, és a módosított módszer került validálásra.



1. ábra - Házityúk hím és nőstény egyede [4]

Mint ahogy már korábban említettem, az LC-MS/MS műszerrel történő mérés egy nagyon fontos eleme az élelmiszerláncbiztonságnak, ugyanis ezzel a módszerrel határoztak már meg számos élelmezésegészségügyi várakozási időt (ÉEVI), illetve nagyon pontosan lehet vele maradékanyagszintek alatti koncentrációkat is mérni. A kutatásom már egy meglévő módszer adaptálásával és átdolgozásával indult, azonban a sikerhez szükség volt lényegi módosításokra is. A csirkehúsról hatalmas az igény Magyarországon és az egész világon is. A Központi Statisztikai Hivatal szerint 2022-ben a baromfi vágóállat termelés 856 106 darab állatot jelentett, az egy főre jutó baromfihús fogyasztás pedig 25,2 kg volt hazánkban 2020-ban. Az élelmiszerláncban kimagasló szerepe miatt esett a választás erre az állatfajra. [5] [6]

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az antibiotikumok története az állatgyógyászatban

Az antibiotikum használat állattenyésztésben való elterjedésének elsősorú oka az 50-es években az volt, hogy ki tudja a gazdaság szolgálni a rohamosan növekvő szükségletet a húсарu iránt. A használatuk céljai, a terápiás jellegű betegségek kezelése, metafilaktikus kezelés, illetve profilaktikus kezelés mely a betegségek megelőzésére irányul. Nem gyógyászati céllal pedig alkalmazták hozamfokozás céljából. [7] Utóbbi célra való használata azonban 2006 január 1-je óta tilos az Európai Unióban. Betiltásának elsődleges oka az volt, hogy megjelent az antibiotikum rezisztencia, illetve, hogy fény derült arra a tényre is, hogy a rezisztenciát okozó géneket a mikrobák át tudják adni egymásnak és így olyan patogének is rezisztense válhatnak, amelyek nem találkoztak az antibiotikummal. [8] Az antibiotikumok már nem használhatóak profilaxis, illetve metafilaxis céljából rutinszerűen az Európai Unióban. Ezen célokra, csak kivételes esetekben, egyedi állatokra vagy korlátozott számú állatra a fertőzés következményeinek enyhítése céljából. Olyan esetekben amikor súlyos következményekkel lehet számolni. [9]

Az antimikrobiális szerek, biológiai tulajdonságaikkal megölik, illetve gátolják a mikroorganizmusok szaporodását, mint például a baktériumokat, gombákat, protozoonokat és a parazitákat. Túlzott, helytelen alkalmazásuk vezet a rezisztencia megjelenéséhez. Az állatgyógyászati készítmények maradványai jelen lehetnek az állati eredetű élelmiszerekben még akkor is, ha azok használata teljes mértékben szabályozott. Világszerte tisztában vannak azzal a ténnyel, hogy az állattartók és a tenyésztők nem szentelnek kellő figyelmet az élelmiszer-egészségügyi várakozási időkre. Ezt a kifejezést, annak az időtartamnak a leírására használják, amelynek kötelezően el kell telni, az utolsó gyógyszerbeadást követően, az állat levágásának időpontjáig, hogy az élelmiszer ne tartalmazzon olyan mennyiséget az adott gyógyszerből, amely túllépi a maximális maradékanyag-határértéket (MRL). [10]

A farmakokinetika és farmakodinámia segítségével, meglehetősen egyszerű megjósolni a kezelt állatok ehető termékeiben az antimikrobiális szermaradványok kiürülésének sebességét. Az állatkísérletekből származó toxikológiai dózis-válasz adatokkal együtt, meghatározható az antimikrobiális szermaradványok koncentrációját. Ezek az értékek pedig összeegyeztethetők a veszélynek kitett emberek számára elfogadható szintekkel. Az adatokból meghatározható az élelmiszer-egészségügyi várakozási idő. Az antimikrobiális szermaradványok MRL feletti (azaz nem biztonságos) és potenciálisan toxikus koncentrációinak elkerülését előíró szabályozást sok

évvel ezelőtt széles körben elfogadták, melyet vizsgálati programokkal és szankciókkal hajtanak végre. [11]

Egyre nagyobb a tudatosság a húszennyező anyagok potenciális kockázatával kapcsolatban, amelyek megbetegedéseket okozhatnak. Ilyen megbetegedés lehet például daganatos megbetegedés, illetve a szervezet funkcionális zavara. Funkcionális zavarok lehetnek idegrendszer, immunrendszer, a szaporító rendszer, valamint az endokrin rendszer érintettségével. További veszélyt jelenthet a közvetlen toxicitásként megjelenő gyógyszerallergia, túlérzékenységi reakciók és az antibiotikum-rezisztens baktériumok megjelenése, melyek globális egészségügyi kihívást jelentenek. [10]

2.2 A rezisztencia helyzet

Az antibiotikum rezisztencia ténye és veszélye egyre inkább eléri a fogyasztót is ami miatt elkezdtek érdeklődést mutatni az antibiotikum mentes termelés felé. Mely számos ebből eredő problémát felvetett. Ezen kihívások főleg termelési, menedzsment, egészségügyi, illetve állatjóléti eredetűek. Az egészségügyi problémák leginkább bélrendszeri, illetve szisztémás betegségekben mutatkozik meg. A bél eredetű megbetegedések háttérében főleg a kokcidiózis, illetve a nekrotikus enteritisz áll. A kokcidiózis által előidézett bélhámsérülések, kaput nyitnak a nekrotikus enteritisz kórokozója számára. A szisztémás megbetegedések zömét *E. coli* által előidézett septicémia okozza. A legtöbb esetben, az *E. coli* fertőzés nem az elsődleges kórokozó. Ha madarak stressznek vannak kitéve, vagy valamilyen egyéb okból meggyengült az immunrendszerük, akkor az *E. coli* baktériumok elszaporodhatnak és szisztémás fertőzést vagy akár halált is okozhat. [12]

Baromfiban a colibacillosis kezelésében az enrofloxacinra 84%-ban, míg amoxicillinre csak 50%-ban érzékeny a kórokozó. [13] A nekrotikus enteritisz kezelésében pedig az enrofloxacin 98%-ban bizonyult hatékonynak és amoxicillinnel is kezelhető még a megbetegedés.[14]

Az antibiotikumok elsődleges alkalmazási módja baromfiban az ivóvízhez keverés annak egyszerűsége miatt, valamint azért, mert egyszerre nagy számú állat kezelhető már a betegség kezdetén. [15] Ebben az esetben azonban fontos tisztában lenni azzal a ténnyel, hogy ilyen kezelési mód mellett nem csak a valóban beteg állatokat fogja elérni a gyógyszeres kezelés. Sőt valójában éppen a beteg egyedeket éri így el kevésbé a kezelés, ugyanis a beteg állatok általában éppen kevesebb vizet fogyasztanak. Lényegében az antimikrobiális gyógyszerhasználat a

baromfiágazatban nem feltétlenül kezelés, hanem megelőzés, a még egészséges, tüneteket nem mutató egyedek számára.[16]

A felelőtlen antibiotikum használat által okozott szelektív nyomás, összefüggésbe hozható a rezisztencia kialakulásával. Az elmúlt években az új antibiotikumok fejlesztésére irányuló kísérletek pedig kudarcba fulladtak. A rezisztencia terjedhet vertikális és horizontális géntranszfereken, és mutáción keresztül.[17] A horizontális géntranszfer, idegen, antibiotikum rezisztens gének cseréje, mikroorganizmusok között, melyek főleg intrinsic rezisztens baktériumoktól származnak. [18] A mezőgazdaságban kialakított rezisztencia gének a normál körforgás alapján, az emberhez is eljuthat, ami komoly közegészségügyi problémát jelent. Ugyanis igen széles körben alkalmazzák orvosi, állategészségügyi és mezőgazdasági ágazatban is gyógyításra, profilaktikus és metafilaktikus kezelésekre a béta-laktám antibiotikumokat, mint a penicillineket, cefalosporinokat, és a karbapenemeket. Ezen csoport teszi ki az antibiotikum felhasználás 50-70%-át. A túlhasználat miatt sajnos egyértelmű hatásként jelenik meg a rezisztencia romlása, mivel az adott antibiotikum csoportra kevésbé érzékeny baktériumok, így elszaporodnak, illetve folyamatosan szelektálódnak az egyre ellenállóbb tulajdonságok felé. Valamint további negatív hatásként említhető a nem megfelelő gyógyszer, illetve időtartam választás. Lényegében ez a szelekciós folyamat játszódik le az emberi szervezetben is. Az állatok szöveteiben, ugyanis fennmaradnak bizonyos mennyiségű antibiotikum maradványok melyet mi felvesszünk és rezisztens baktériumok alakulnak ki a szervezetünkben. Habár azt is kimutatták, hogy a rezisztencia kialakulhat az antibiotikummal való érintkezés hiányában is. [17]

A rezisztencia kialakulásának mechanizmusa lényegében végbe mehet genetikai vagy mechanikai úton. Azok a baktériumok, melyek bizonyos antibakteriális szereket termelő organizmusokkal azonos környezetben élnek, ősi mechanizmusokat fejlesztettek ki, hogy ellenálljanak ezeknek a hatásoknak. Vagyis az úgynevezett intrinsic azaz belső rezisztencia teszi lehetővé számukra a túlélést. [18] Ennél a rezisztenciátípusnál a fő ok, a baktérium szerkezeti tulajdonságaiból adódik. Olyan organizmus esetében, mely nem kompatibilis az antibiotikum szerkezetével, vagy olyan antibiotikumból ered a rezisztencia, mely tulajdonságai miatt nem találkozik a célpontjával.

Szerzett rezisztencia, olyan baktérium populációban alakulhat ki, mely eredetileg érzékeny volt az antibiotikummal szemben. Ez a rezisztencia forma, a fő kromoszómákból vagy az extrakromoszómákból származhat. A kromoszóma rezisztencia olyan mutációkból eredhet, melyek véletlen következnek be, valamilyen fizikai vagy kémiai tényező következtében. Az

extrakromoszómális rezisztencia plazmidokon, transzpozonokon és integronokon keresztül továbbíthatók. [19]

A keresztrezisztencia azt jelenti, hogy bizonyos mikroorganizmusok melyek rezisztensek egy adott antibiotikummal szemben azok rezisztensek az azonos vagy rokon mechanizmussal működő más antibiotikumokra is. Ezek lehetnek kromoszómális eredetűek vagy eredhet az antibiotikumok azonos szerkezetéből is. [19]

Mechanikus antibiotikum rezisztencia esetében a baktériumok védekező mechanizmusokat hoztak létre, annak érdekében, hogy ellen tudjanak állni az antibiotikumoknak. Ezen mechanizmusok biokémiai alapon jönnek létre. Egy, vagy akár több módszert is képesek egyszerre alkalmazni a baktériumok. Az első ilyen mechanizmus például az antibiotikum módosítása mely enzim termeléssel jár, ami gátat szab, az antibiotikum hatásának. Az antibiotikum kémiai változtatása során, az enzimek kémiai változtatásokat hoznak létre, melyek kémiai reakciókat katalizálnak, mint például az acetilezés, foszforiláció és adenilezés ezzel csökkentve a gyógyszer affinitását. Az antibiotikum elbontására példa a B-laktamáz enzim, mely megszakítja a béta laktám gyűrű amidkötését, így ezen keresztül vezet rezisztenciához. Csökkent permeabilitás alakulhat ki annak érdekében, hogy az antibiotikum ne legyen képes bejutni a sejtbe a kötőhelyére. Ez a mechanizmus létre jöhet, a porin csatornák kifejeződésének „down” regulációjával, azoknak megváltoztatásával vagy a működésük károsításával. [18]

A multi-drog rezisztens baktériumok több gént szereznek be egyszerre, melyek mindegyike specifikus gyógyszer rezisztenciát kódol. Ez a forma általában az R-plazmidon kódolt. Valamint kialakulhat az efflux pumpákat kódoló, fokozott génexpresszióval, az antibiotikum enzimatis inaktiválásával, a szerkezetben és a célpontban bekövetkező változásokkal, stb. [19] A kötőhely védelme megfigyelhető például a tetraciklinek esetében, mely során a rezisztenciát okozó elemek kölcsönhatásba lépnek a baktérium riboszómájával, és egy GTP-függő folyamaton keresztül eltávolítja a tetraciklint, a kötőhelyről. Ez a folyamat változásokat idézhet elő a riboszóma szerkezetében, mely megakadályozza a későbbi receptorhoz kötődést is. További gyógyszer kötőhely módosító mechanizmus a mutáció, enzimes módosítás, valamint a kötőhely megkerülése vagy cseréje. [18]

Egy elrettentő példaként az amoxicillinnel szembeni *E. coli* rezisztenciája kimagasló. A vizsgálatok szerint az emberi minták esetében, mely a 70,5-95%-ban mutatott rezisztenciát, állatban 95-96%-ban, míg az élelmiszerekben és a környezetben is 58,4-95%-os rezisztenciát állapítottak meg.[20]

2.3 A vizsgált antibiotikumok

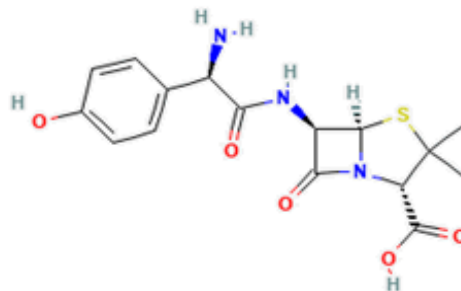
2.3.1. Amoxicillin

Története:

Az első antibiotikum, amely 1946 óta az orvosok rendelkezésére állt, a penicillin volt, mely a *Penicilium* gomba terméke. Sir Alexander Fleming már 1928-ban egy véletlennek köszönhetően felfedezte. Azonban ezt számos kutatás és megfigyelés követte a második világháború során. A felfedezését modern csodának tartották ugyanis minden típusú *Streptococcus* spp. illetve *Staphylococcus* spp. által okozott fertőzést lehetett vele kezelni. [21] Napjainkig már több mint 40 antibiotikumot azonosítottak a penicillin csoporton belül. Vannak közöttük természetesen előfordulók és bioszintetikusak is. [22]

Szerkezete:

Az amoxicillin (lásd 2. ábra) az amino-penicillinek csoportjába tartozó, béta-laktám antibiotikum. Széles spektrumú antibakteriális hatása miatt, gyakran használt gyógyszer az állatgyógyászatban. [23]



2. ábra. Az amoxicillin szerkezete [24]

Hatásmechanizmusa és hatásmódja:

A béta-laktám antibiotikumok a penicillin-kötő fehérjékhez kötődve hatnak, ezáltal gátolják a sejtfal szintézise során a keresztkötési folyamatot, vagyis a transzpeptidációt. Ez a folyamat autolitikus enzimek aktivitásához vezet a bakteriális sejtfalban, mely annak lízise révén végül elpusztítja a baktérium sejtet.

Az amoxicillin időfüggő, baktericid antibiotikum. Az „időfüggő” időintervallum azt az időt jelenti amíg a szérumkoncentráció meghaladja a mikroorganizmus minimális

gátlókoncentrációját (MIC). Így ezen típusú antibiotikumok esetében az a cél, hogy ezt a szintet minél tovább fenntartsuk, vagyis naponta többször kell őket adagolni. [25]

Antibakteriális spektruma és felhasználása:

Széles spektrumába beletartoznak a gram-negatív (mint a *Bordetella Bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pasteurella* spp. *Salmonella* spp., és *Haemophilus* spp.) illetve a gram-pozitív baktériumok (mint *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. és a *Corynebacterium* spp.) is. A baromfi esetében az amoxicillint az emésztőrendszeri, urogenitális és légúti fertőzések kezelésére használják. [26]

Rezisztencia:

A Gram-pozitív baktériumok rezisztencia-mechanizmusa két fő stratégián keresztül valósulhat meg. Az antibiotikumok enzimatis lebontása β -laktamázok termelése révén, vagy a célhelyük, a penicillin-kötő fehérje (PBP) affinitásának és érzékenységének csökkentésével. [27] Illetve lehet még csökkentett penetráció a célhelyre mely a *Pseudomonas aeruginosa* rezisztenciájára jellemző, valamint egy specifikus efflux pumpa mechanizmus révén történő kiáramlás a periplazmatikus térből. [28]

Számos olyan béta-laktamáz enzim létezik, mely képes hidrolizálni a béta-laktám szerkezetet és inaktiválni a gyógyszert. A Gram-negatív baktériumok olyan módosított külső membránnal rendelkező sejtfalat hozhatnak létre, amely nem permeábilis a béta-laktám antibiotikumokkal szemben, így jobban ki is vannak téve a béta-laktamáz enzimeknek. [22]

Az amoxicillint gyakran alkalmazzák klavulánsavval kombinációban, mely öngyilkos szubsztrát hatását úgy éri el, hogy kovalensen kötődik a β -laktamáz aktív helyén található szerin-maradékhoz, ami saját szerkezetátalakítást eredményez. [29]

Farmakokinetika:

Adható intramusculárisan (IM) vagy intravénásan (IV) nátriumsóként. Vizes oldatban trihidrát formában adható subcután (SC) vagy IM is így elnyújtottabb hatást lehet vele elérni. Orális felhasználás esetében pedig az került megállapításra, hogy ha üres gyomorra adjuk, akkor jobban felszívódik, de átlagosan 60-68%-os még így is a felszívódása. Az eliminációs felezési ideje elég rövid, így gyakran alkalmaznak lassú felszívódású készítményeket, melyek így nyújtják a felezési időt. Minden penicillin származék a vesén keresztül ürül, és igen nagy koncentrációt ér el a vizeletben. Keletkező metabolitjai is aktívak. [22] Körülbelül 10-14%-a metabolizálódik és ürül ki a májon keresztül. [30] A megoszlás tekintetében megfelelő koncentrációt érnek el az érzékeny baktériumokkal szemben a vesében, az ízületi folyadékokban, májban, a tüdőben, a bőrben és a légyszövetekben. A vér-agy gáton alapvetően nem jut át, de azért emelt dózisban alkalmazzák CNS fertőzések kezelésére is. [22]

Élelmiszerhigiéniai vonatkozások:

Az amoxicillin kezelési idejét 3-5 nap között határozták meg, majd ezt az időszakot követően az élelmiszer-egészségügyi várakozási időt pedig 1-3 napban. A készítményt nem lehet alkalmazni árutojás termelő állomány esetében. [31] [32] Amoxicillinre az MRL értéke 50 µg/kg az ehető szövetekre. [33]

Egyéb:

Egy német felmérés szerint a broiler csirke ágazat a legnagyobb antibiotikum felhasználó ágazat az állattenyésztésben. A penicillinek pedig az összes antibiotikum eladásnak a 37%-át teszi ki. A broiler ágazatban a csoportos kezelés terjedt el, és a gyógyszerek nagy része szájon át történő alkalmazásban engedélyezett. Így a valóban beteg és nem beteg állatok is részesülnek a kezelésben, mivel az ivóvízbe keverten adják. Broiler csirkéken végzett tanulmány 2020-ban bebizonyította, hogy az amoxicillin kezelés limitált ideig több antibiotikummal szembeni rezisztencia hatást növel. Valamint nem találtak ennek kiváltásában eltérést aszerint, hogy csoportos kezelést alkalmaztak vagy ha megoldották az egyéni kezelést. [34]

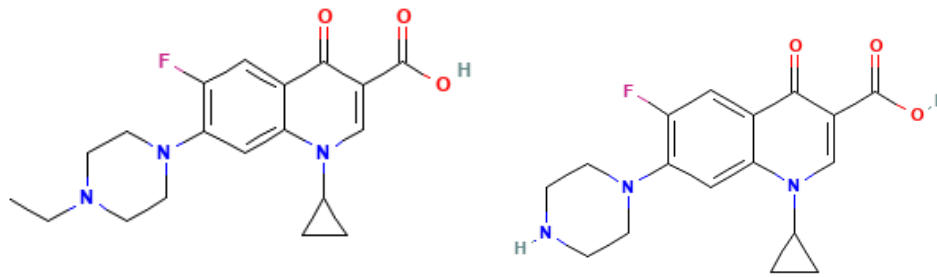
2.3.2. Fluorokinolonok

Történetük:

A fluorokinolonok az állatgyógyászatban használt legfontosabb antibakteriális szerek közé tartoznak. Gyakorlatilag minden fajban használatos és igen széles spektruma által lefedi, a legtöbb bakteriális eredetű fertőzés kezelését. Az 1980-as évek végén történő bevezetése óta, jelentős mértékben bővült az alkalmazása. A fluorokinolonok szintetikus antibakteriális szerek, melyet először enrofloxacinaként vezettek be az állatgyógyászatba. A ciprofloxacin a humángyógyászatba is engedélyezett szer és szintén kiemelkedő jelentőséggel bír az állatgyógyászatban is. [22]

Szerkezetük:

A fluorokinolon antibiotikumok a kinolonyűrű módosításával állítható elő. Melyben a 4. szénatom helyén található egy keto-csoport, a 3. szénatomon pedig egy karboxil csoport. Valamint a 6. szénatomhoz fluor atom kapcsolódik, ez különbözteti meg a kinolonoktól és szélesíti mind a gram-negatív és a gram-pozitív spektrumát. Az enrofloxacin és a ciprofloxacin (lásd 3. ábra) esetében pedig az 1. pozícióban izopropil csoport is található. [22]



3. ábra. Az enrofloxacin és ciprofloxacin szerkezete [35] [36]

Hatásmechanizmusuk és hatásmódjuk:

A kinolonok bactericid hatással rendelkeznek azért, hogy gátolják a bakteriális DNS replikációját és transzkripcióját. A kétszálú DNS szorosan felcsavarodik a sejtben, és az osztódáskor ennek el kell különülnie egymástól. Ezt a folyamatot a DNS-giráz enzim biztosítja, a szálak elvágásával és újbóli összekapcsolásával. Ez az enzim egy topoizomeráz mely A és B alegységekből áll. A kinolonok leggyakoribb célpontja a gyrA gén által kódolt DNS-giráz A alegysége. Az emlős sejtek rezisztensek a kinolon hatásával szemben, mivel ezen sejtekben a topoizomeráz II nem gátolt addig, amíg a már baktériumokra ható koncentráció százszorosát nem alkalmazzuk. Egy másik célpont a topoizomeráz IV enzim ParC és ParE alegységei. Ez a hatás helye a gram-pozitív baktériumok szempontjából jelentős.[22]

Spektrumuk és rezisztencia helyzetük:

A fluorokinolonok jó aktivitást mutatnak a gram negatív baktériumok ellen főleg az *enterobacteriaceae* baktériumaival szemben. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. és *Enterobacter* spp. általában érzékeny. A *Pseudomonas aeruginosa* ellen, ha érzékenyek is, akkor nagyobb MIC értéket kell alkalmazni, hogy hatékonyak legyenek. A ciprofloxacin tartják a leghatékonyabbnak ellene. A fluorokinolonokra érzékeny egyéb baktériumok köze tartoznak az intracelluláris baktériumok, mint a *Rickettsia* spp., *Chlamydia* spp. *Mycobacterium* spp. és a *Mycoplasma* spp. A gram pozitív baktériumok változatos érzékenységet mutatnak. A *Staphylococcus* fajok általában érzékenyek, de itt is jelentősen emelni kell a dózist a hatékonyság reményében. Rezisztencia leggyakrabban gyr A mutáció

révén alakul ki, ami a DNS giráz A alegységét kódolja. A mutáció a topoizomeráz IV enzim parC részét kódoló génben szintén fontos, főleg a gram pozitív baktériumok esetében. [22]

Az enrofloxacin rezisztenciája fakadhat a rezisztencia gének jelenlétéből a plazmidban, illetve az efflux pumpák túlzott kifejeződéséből. Az előbbi megvédi a topoizomeráz enzimet az antibiotikumtól, melyeket *E. coli* törzsekből már mutattak ki. Míg a fokozott efflux pumpa kifejeződése pedig, az antibiotikum intracelluláris szintjét csökkenti. Ezen rezisztencia meglétét igazolták *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *E. coli*, és *Enterococcus* törzsekben. Az efflux pumpák fontos szerepet játszhatnak a *P. aeruginosa* fluorokinolonok rezisztenciájában. [37]

A rezisztencia megjelenése közegészségügyi jelentőséggel is bír. Ugyanis bebizonyosodott, hogy az emberre átvihető a rezisztencia *Campylobacter jejuni*-val illetve *Salmonella typhimurium* fajokkal. Az emberek csirkehús által kapták meg a rezisztens *Campylobacter* fajokat, aminek megnövekedett incidenciája onnantól jellemző, hogy engedélyezték a fluorokinolon antibiotikumok ivóvízben történő alkalmazását a baromfi fajok számára.[22]

Humán vonatkozás:

A ciprofloxacin kiterjedt használata, baromfiban a legvalószínűbb, hogy kialakít humán rezisztens patogén törzseket. Átlagos ételmezeiségészségügyi várakozási ideje 12-15 nap ezeknek a szereknek. Ezt azonban jelentősen befolyásolhatja, ha az állat komoly vese vagy májelégtelenségben szenved. Így a tényleges ürülés, akár elérheti a 23 napot is. Ami broiler csirke esetében azt jelentené, hogy 19 napos korban abba kellene hagyni a kezelést, hogy a vágási időre kiürüljön a szer. A légúti megbetegedések azonban éppen ez után jelentkeznek, így ennek a szernek az alkalmazását mellőzni kellene. Ennek figyelmen kívül hagyása okozhatja a szer bekerülését az emberek szervezetébe is a táplálkozás során. Megfigyelték, hogy a ciprofloxacin gátolja a CYP 450 enzim általi metabolizmust Így abban az esetben ha úgy kerül be az emberi szervezetbe, hogy más olyan gyógyszert is szándékosan szed egy ember amit szintén ez az enzim metabolizál, akkor igen komoly mellékhatásra is lehet számítani.[38]

Farmakokinetikájuk:

A fluorokinolonok orális felszívódása a legtöbb vizsgált fajban magas, függetlenül attól, hogy táplálékkal vagy anélkül alkalmazzák. Az enrofloxacin szájon át történő felszívódása megfelelő, és eléri a kívánt hatást csirkékben, ha az ivóvízbe keverik nekik. Parenterális alkalmazásuk pedig gyakorlatilag teljes, a vizsgált fajokban. [22]

Az enrofloxacin metabolizmusa során képes ciprofloxacinná alakulni deetilézés révén. A ciprofloxacin bomlás termékei nem rendelkeznek számottevő antibakteriális hatással. Azonban baromfiban ennek az enrofloxacinból ciprofloxacinná történő metabolizmusból igen csekély eredmény mutatható ki. A fluorokinolonok nagy része a vesén keresztül ürül a szervezetből. A legtöbb esetben a kiindulási gyógyszer, vagy annak metabolitja visszanyerhető a vizeletből, vagy minimális mennyisége a bélsárból. Szöveti megoszlására jellemző, hogy bizonyos szövetekben, mint például a vese és a májszövetben a plazmakoncentráció többszöröse is megjelenhet. Különösen magas koncentrációt képesek elérni a macrophagokban és a neutrophil granulocitákban. Itt ugyanis a plazmakoncentráció akár 4-10szeresét is elérhetik. Ez a magas intracelluláris koncentráció azért alakulhat ki, mert a fluorokinolonok kellően lipídoldékony molekulák ahhoz, hogy átjussanak a membránon. Ezen antibiotikumok magas koncentrációt érhetnek el a vizeletben is, illetve azon kevés gyógyszerek közé tartozik, ami képes a prosztata szöveteibe is behatolni és ott hatékony koncentrációt elérni. [22]

Élelmiszerhigiéniai vonatkozások:

A szakirodalmi adatok sem teljesen egyértelműek e téren, de az 5 napos kezelési időt követően az ÉEVI-re való javaslat 4-8 nap között található az enrofloxacin esetében.[39] Míg a ciprofloxacinra a „Humán vonatkozások” című bekezdésben már említést tettem, az enrofloxacinra az MRL értékek szövetenként változnak úgy, mint az izom-, zsírszövet és bőr esetében 100 µg/kg, veseszövetre 200 µg/kg végül a májszövetre pedig 300 µg/kg. Az enrofloxacin nem használható olyan állományok esetében melyeknek tojását, humán fogyasztásra szánják. [40]

2.4 Korábbi vizsgálatok a témában

Számos kutatás irányult már az élelmezésegészségügyi várakozási idők megerősítésére vagy megcáfolására. Az amoxicillin maradványokat vizsgálták például brojler állomány egyedek májában, veséjében lépében, zsírjában, mell és combizomzatában vékonyréteg kromatográfiás teszttel és ezzel az élelmezésegészségügyi várakozási időket is ellenőrizték. Melyben 18 db 16 napos random kiválasztott csirkét 3 csoportra osztottak. Az A csoport gyógyszermentes vizet kapott, a B csoport a terápiás gyógyszer mennyiséget kapta amoxicillinből 7 napig, míg a C csoport pedig szintén a terápiás mennyiséget kapta, viszont 14 napig. Az eredmények pedig azt mutatták, hogy a kontroll csoport minden tagja, minden szövet tekintetében, negatív lett. A B csoportban a májszövetek esetében 100 %, veseszövetek 66,67%, zsír és lépszövetek esetében pedig 33,34% lett pozitív a mintáknak. Ebben a csoportban az izomszöveteket negatívak lettek.

A C csoportban a máj és veseszövetek 100%-ban, az izomszövetek 16,67%-ban és a lép és zsírszövetek pedig 50%-ban lettek pozitívak a vizsgálat során. A vizsgálatok alapján kimondható, hogy a kezelés után kisebb nagyobb koncentrációban jelen lesznek maradékanyagok az állati szövetekben, azonban az, hogy az izomszövetben jelen lesz-e az a kezelés hosszától függ. [26]

Szintén amoxicillin gyógyszer maradványok vizsgálatára indult a következő kísérlet is melyben összesen 10 db broiler csirkét vizsgáltak melyeket 4 csoportba osztottak. Az első A csoportban 2 csirke semmilyen kezelésben nem részesült. A B csoportban 3 csirkét 48 órás gyógyszeres kezelés után vágta le. A C csoportban 3 csirkét 96 órás kezelés után, míg a D csoportban pedig 96 óra kezelést követő 96 óra pihentetés után vágta le. Vizsgálat során megállapították, hogy az amoxicillin felszívódása gyorsabb a májban, mint a vesében. Az MRL szintekkel összehasonlítva az általuk mért szintek meghaladják a megengedett maradékanyag mennyiséget. Azonban a D csoport esetében LC-MS-sel nem mutattak ki hatóanyag és fő metabolit maradványt. Ebben az esetben az alkalmazott várakozási időszak elegendőnek tűnt, a gyógyszer húgyutakon történő kiválasztásához. [41]

Egy enrofloxacinra irányuló tanulmányban random választottak ki broiler csirkéket egy baromfi piacról és szintén maradékanyag szinteket vizsgálták. 75 hús és 75 máj mintát készítettek és vizsgáltak meg HPLC/MS-sel. A húsminták 52%-a volt pozitív enrofloxacin szermaradványokra és ebből 58,3%-a a mintáknak volt az MRL értéke felett. A májminták 78,7%-a volt pozitív melynek 71,2%-a az MRL értéke felett volt. A magasabb májbéli koncentrációnak az az oka, hogy az enrofloxacin főként a májban metabolizálódik. [42] Egy másik tanulmányban pedig az LC/MS módszert hasonlították össze az ELISA módszerrel. Melyből az derült ki, hogy az ELISA a minták 72,2%-át találta pozitívnak enrofloxacin maradványra nézve, míg az LC/MS csak 22,2%-ban találta pozitívnak ugyan azt a mintát. Az eltérő eredményeknek többek között az is az oka, hogy az ELISA teszt az enrofloxacin mellett detektálja a metabolitjait mint a ciprofloxacint, illetve egyéb kinolonokat is. [43]

2.5 Analitikai módszerek validálása

A validálás egy bizonyos rendszer vagy folyamat ellenőrzése abból a szempontból, hogy egy rögzített minőségi paraméter-rendszer feltételeinek eleget tesz-e. Valamennyi rendszer, illetve folyamat esetében, a validálást egyedileg szükséges elvégezni. Fontos ellenőrizni és megerősíteni azt a tényt, hogy a vizsgálati terv szerint egyes paraméterek és tulajdonságok, melyek kritikusak a kísérletben, megismételhetőek és változatlanok maradjanak. Ezen

tulajdonságok és a hozzá tartozó paraméterek kockázatbecslés alapján kerülnek kiválasztásra, melyeket szintén rögzíteni szükséges. Az eljárás során használt műszereknek kalibrált, a létesítménynek, illetve a berendezéseknek pedig kvalifikált státuszban szükséges lenniük. A személyzettel szemben pedig az az elvárás, hogy a megfelelő oktatással rendelkező emberek, akik majd a valós kísérletben részt vesznek, ők vegyenek részt a validálási eljárásban is.[44]

A VICH GL 49 dokumentum [45] – ami az általam alkalmazott validálási eljárás alapját is képezi – célja, hogy általános leírást adjon azon folyamatról mely a szövetminták vizsgálatára kifejlesztett, analitikai módszerek validálási eljárását tartalmazza, amit maradékanyag kiürülésére végzett vizsgálatokban lehet alkalmazni. Ennek a vizsgálatnak alapvetően az a célja, hogy megfelelő adatokat szolgáltatson a hatóságok számára, az élelmezésegészségügyi várakozási idők meghatározására.

Vannak általánosan elfogadott validálási paraméterek (lásd 4. ábra) amiket minden validálási eljárásban elvárnak. Ezek a jellemzők a linearitás, pontosság, precizitás, kimutatási határ, mennyiségi határ, szelektivitás, stabilitás a mátrixban, a feldolgozott minta stabilitása és a robusztusság.

Linearitás

- azt mutatja meg hogy, mekkora az a koncentráció tartomány ahol a kapott analitikai jel egyenesen arányos a merendő anyag koncentrációjával.

Pontosság

- az analit valós értéke és az alkalmazott eljárás során mért eredmény közelségét fejezi ki.

Precizitás

- kifejezi a kapott mérési eredmények közelségét ugyanazon méréssel végzett sorozatok között.

Kimutatási határ

- a mintában található legkisebb mennyiségű anyag ami már biztosan kijelenthető, hogy a merendő anyag azonban pontos számszerű értéke még nincsen.

Mennyiségi határ

- az a legkisebb mennyiségű anyag a mintában amely megfelelő pontossággal és precizitással számszerűen meghatározható.

Szelektivitás

- az a tulajdonság, hogy a merendő anyag detektálható legyen az egyéb anyagok között.

Stabilitás

- a mátrixban azt jelenti, hogy a vizsgálandó anyag mennyi ideig tárolható bizonyos körülmények között nagyarányú elbomlás nélkül a szövetben. Meghatározza a maximális tárolási időt a vizsgálat előtt.

A feldolgozott minta stabilitása

- akkor elfogadható ha a mérést megismételjük a feldolgozást követően és ugyan azt az eredményt kapom.

Robusztusság

- azt jelenti ha egy paramétert egy picit megváltoztatok az nem szabad, hogy jelentősen befolyásolja az eredményt.

4. ábra Validálási paraméterek [45] alapján saját szerkesztés

2.6 Vizsgálendő szövetek kiválasztása farmakokinetikai vizsgálatokhoz

Az élelmiszertermelő állatok körében a farmakokinetika meghatározó az élelmezésegészségügyi várakozási idő meghatározása szempontjából, hogy elkerüljük a káros gyógyszermaradványok előírás feletti jelenlétét az ehető szövetekben. Alapvetően 4 folyamattal tudjuk ezt a sort jellemezni, hogy mi is történik a gyógyszerrel a szervezeten belül. Ezen folyamatok pedig sorrendben a felszívódás, eloszlás, metabolizáció és a kiürülés. A felszívódás a gyógyszernek a beadási helyéről, a véráramba vezető útját jellemzi. Számos gyógyszerbeadási módszer lehet, azonban a három leggyakoribb az orális, az intramuszkuláris, illetve az intravénás gyógyszerbeadás. A megoszlás során számos szövet létezik melyekbe eljuthatnak a gyógyszerek. Ennek a folyamatnak részeként, ezek a gyógyszerek bizonyos esetekben tárolódhatnak is, és innen csak lassan kerülnek vissza a szisztémás keringésbe, hogy véglegesen kiürüljenek a szervezetből. Ha az állat élelmiszertermelő faj, az ilyen elnyújtott elimináció gyógyszermaradványok jelenlétét okozhatják az ehető szövetekben. Ezeknek a megengedett szintjeit jogilag határozzák meg bizonyos ehető szövetekre vagy fajokra vonatkozóan. Ha a gyógyszer affinitása magas a szövetek irányába, akkor az alacsonyabban perfundált szövetekben is jól megoszlík, mint például a zsírszövet. Ezen szöveteknek pedig mind a gyógyszerrel történő feltöltése és a kiürülése is jóval hosszabb folyamat. [22]

A first pass hatás az orális gyógyszerbeadás egyedi velejárója. A bekerült gyógyszer a nyálkahártyán át kerül a kapillárisokba. Ezen gyógyszerek a portális keringésbe kerülnek majd pedig közvetlenül a májba, ahol biotranszformáció zajlik le. A máj, a first pass hatás révén jelentős mértékben csökkenti az aktív hatóanyagok mennyiségének felszívódását. A máj a biotranszformáció mellett felelős az epével történő kiválasztásért is. [22]

A gyógyszerek szervezetből kiürülésének egy gyakori formája a vesén keresztül történik. Ennek mértékét a lipidoldékonyság és az ionizáció mértéke nagyban befolyásolja. Azon gyógyszerek melyeket először a máj biotranszformál, nagyobb vizoldékonyságra tesznek szert így a vizelettel ürülnek a vesén keresztül. [22]

Az élelmiszerekben fellelhető gyógyszer maradékanyagok lehetnek az eredeti vegyületek, illetve annak metabolitjai is. A maradék anyagok származhatnak gyógyszerek vagy adalékanyagok nem szándékos beadásából is. Azonban ezen nem szándékosan felvett anyagok is okozhatnak maradékanyag jelenlétet az ehető szövetekben. [22] Ezzel kapcsolatban bizonyos tolerancia szinteket állapítanak meg a gyógyszerekkel szemben az élelmiszertermelő állatok bizonyos szöveteiben. Ez a tolerancia szint, az a célszöveti koncentráció, mely szint alá kell

kerülnie a gyógyszer markervegyületének ahhoz, hogy azok a szövetek emberi fogyasztásra kerülhessenek. A célszövet egy olyan ehető szövet (mely általában a vese vagy a máj) amelyben, ha a markervegyület a tolerancia szint alá csökken, akkor biztosítja, hogy minden ehető szövet emberi fogyasztásra alkalmas. A tolerancia szintek meghatározására állatokon végeznek vizsgálatokat, amiből meghatározható, hogy mennyi a felvehető mennyiség mely még nem okoz egészségkárosodást. [22]

Az élelmezésegészségügyi várokozási időket kísérletekkel határozzák meg. Ami lényegében abból áll, hogy egészséges állat csoportokat kezelnek az adott gyógyszerrel majd csoportokra osztva őket bizonyos időközönként levágják az állatokat és azoknak a szöveteit vizsgálják a gyógyszerkoncentrációkra.[22]

Az ÉEVI meghatározására először kísérleti állatokon határozzák meg a vegyületek toxikusságát. Erre a No Observed Effect Level (NOEL)-t határozták meg, mely révén egy átlagos emberrel és biztonsági tényezőkkel is számolva meghatározzák az elfogadható napi bevitelt (ADI) egy teljes életidőre számolva. Ehhez a számításhoz, először megbecsülik az ehető szövetek átlagos fogyasztását, mint a hús, zsír, vese és máj szövet. Majd ez alapján határozzák meg, hogy a szövetekben a biztonság érdekében mennyi gyógyszermaradékanyag lehet jelen. Az élelmiszertermelő állatokban használható gyógyszerek élelmezésegészségügyi várokozási ideje csak bizonyos fajokra, dózisa, beadási módra és gyakoriságra érvényes. [22]

A gyógyszerek farmakokinetikája nem csak a terápia révén fontos, hogy hogyan viselkedik a szervezetben, hanem azért is kiemelten fontos, hogy a terápia lezajlása után a gyógyszermaradványanyagok jelenléte elkerülhető legyen, és az állatok levágásra kerülhessenek.[22]

3. Anyag és módszertan

3.1 Anyagok

A kísérlethez a házityúk szöveteket normál kiskereskedelmi fogalomból szereztük be. Az első kísérletekhez pedig a Nagymamámhoz fordultam segítségért, ugyanis vidéken nevelget néhány tyúkot saját fogyasztásra, így megsürgettem néhány egyed levágását. Elsősorban a veseszövetet szerettem volna tőle mindenképpen beszerezni, mivel az nem kapható önmagában a kereskedelemben. Azonban a módszerfejlesztés elég sok mintát követelt, így ezt a mennyiséget, amit innen szereztem, elég gyorsan a sokszorosára kellett növelni. Ebben a részben pedig egy Pest megyei vágóhíd volt segítségünkre, ahonnan kaptunk 20 darabos csomagolásban farhátat, és azokból vettük ki a veséket (lásd 5. ábra).



5. ábra. Vesék kivétele a farhátakból

A szükséges amoxicillin, enrofloxacin és ciprofloxacin sztenderdeket, illetve a belső sztenderd (ISTD) penicillin-V-t a Sigma-Aldrich márkától álltak rendelkezésünkre. Az extraháló szerként használatos acetonitril, triklórecetsav és az oxálsav pedig a VWR International márkától származott.

3.2 Módszerfejlesztés

A mintákhoz minden szövet és vizsgálat tekintetében 2 grammra volt szükség. Az előkészítés során igyekeztem a mintákat vágódeszkán a lehető legkisebb méretűre összevágni (lásd. 6. ábra), így a kimérést elősegítve. A 2 grammos mennyiséget analitikai mérlegen mértük ki majd helyeztük centrifugacsövekbe. Ezen a ponton következett a mintáinknak a mesterséges elszennyezése antibiotikummal. Ehhez a mintákhoz pipettáztunk 10 µl ún. “spikeoló” oldatot,

ami a 3 mérendő antibiotikumnak a meghatározott koncentrációjú elegye volt. Az elszennyezésnél fontos lépés volt, hogy amikor az antibiotikumot tartalmazó elegyet pipettáztuk akkor az valóban a szövetekre kerüljön, és ne csak végig csorogjon a centrifugacső falán. Kivéve a vak mintát, amibe nem tettünk ebből az elegyből, illetve a belső sztenderd helyett is csak acetonitril oldatott mértünk hozzá. A spikeoló oldat hozzáadását követően 10 µl penicillin-V-t adtunk hozzá majd 10 ml extrahálószer, ami az első kísérletben acetonitril 1:9 arányú vizes oldatának és 0,01 M oxálsav 25:75 arányú elegye volt. Majd az elkészült mintákat behelyeztük 40 percre a rázógépre (IKA KS 501 rázógép), melynek a sebessége 200 rázás/perc volt. Miután ez lejárt, áthelyeztük 10 percre 10 fokon a centrifugába (VWR MicroStar 17R mikrocentrifuga). A centrifuga sebességét 8500 rpm-re állítottuk. Ezt a lépést követően a felülúszót 0,22 µm-es fecskendőszűrővel HPLC vialba szűrtük majd elindítottuk a LC-MS/MS mérést.



6. ábra Szövetek aprítása

A második próbakísérlet során a sztenderd oldat mennyiségét módosítottuk 10 µl-ről 20 µl-re vagyis a duplájára. Az extrahálószernek a mennyiségét nem változtattuk meg, viszont az arányát módosítottuk 1:1-re.

Harmadik kísérlet során több változtatásra is sor került. A minta tömege és a spikeoló oldat mennyiségében nem történt változás. Azonban a penicillin-V mennyiségét megemeltük 32 µl-re az extraháló oldatot pedig lecsökkentettük 4 ml-re. Az extraháló oldat ebben az esetben 0,1 M triklórecetsav és acetonitril 1:1 arányú elegye volt. A rázógépet is lecseréltük ettől a kísérlettől kezdve ultrahangos rázógépet (Realsonic ultrahang-kád) használtunk erre a célra.



7. ábra. Kalibráló oldatok készítése

A mennyiségi mérés első lépéseként szükség volt a kalibrálás elvégzésére. A kalibráció során nem a szöveti kalibrációt választottuk, mert nem volt teljes mértékben lehetőségünk ismert kezeletlen mintákat beszerezni. Amennyiben bizonyíthatóan kezeletlen szövetek hiányában így jártunk volna el, akkor nem lett volna megfelelő a kalibráció, ha van a háttérben egyéb nem ismert koncentrációjú anyag is. Így ennek helyettesítésére készült egy oldatsorozat (lásd 7. ábra) melynek koncentrációi lényegében úgy lettek kiszámítva, hogy az extrakció utáni minta koncentrációkat modellezzék.

A validálási szövet koncentrációk értékei a VICH GL 49 dokumentum [45] szerint lettek megtervezve (lásd 1. táblázat). A nulladik minta a vak minta, tehát abban csak oldószer kerül a szövetre. Az első számú mintának a koncentrációja a várható alsó kimutatási határ (LOD) értékét a második oldat pedig a mérési határt vagyis LOQ értékére lett meghatározva, melynek értéke megegyezik a LOD háromszorosával. A további három koncentrációt úgy kellett meghatározni, hogy azok a validálási tartomány alján, közepén és a tetején helyezkedjenek el.

1. táblázat. Validálási szövet koncentrációk

| Validálási SZÖVET elméleti koncentrációk (ng/g; µg/kg) | |
|---|-----------------|
| | célvegy. |
| VAL00 | +0,0 |
| VAL01 | +2,0 |
| VAL02 | +6,0 |
| VAL03 | +18,0 |
| VAL04 | +100,0 |
| VAL05 | +800,0 |

3.3 Végleges minta előkészítési eljárás

A mintáim előkészítése váratlanul egyszerűnek bizonyult, viszont ez nem volt elmondható a minták számáról és azoknak kódolásáról. Az első próbakísérlettől kezdve minden kísérlethez előkészítettük az összes mintát mind a négy szövetből. Ez szövetenként 3 párhuzamos kísérletet jelentett 6 különböző koncentráció szinttel. Valamint 3 egymást követő napon mértük le, így valójában a mintáink száma $3 \times 3 \times 6$ vagyis 54 darabot jelentett szövetenként. Továbbá kellett még minták a robusztusság vizsgálatához, melyhez 4 darab kellett szövetenként és a rövidtávú (short-term) stabilitás, illetve a fagyasztás-kiolvasztási (freeze-thaw) stabilitás vizsgálatához 6-6 darabot használtunk fel. A mintáinkat eredetileg, úgy kellett volna beszereznünk, hogy azok 6 különböző állatból származzanak. Bár erre nekünk nem volt lehetőségünk a beszerzéskor, azonban igyekeztünk mégis helyesen eljárni. A zsírszövet mintákat például 6 különböző farháttról gyűjtöttük be.

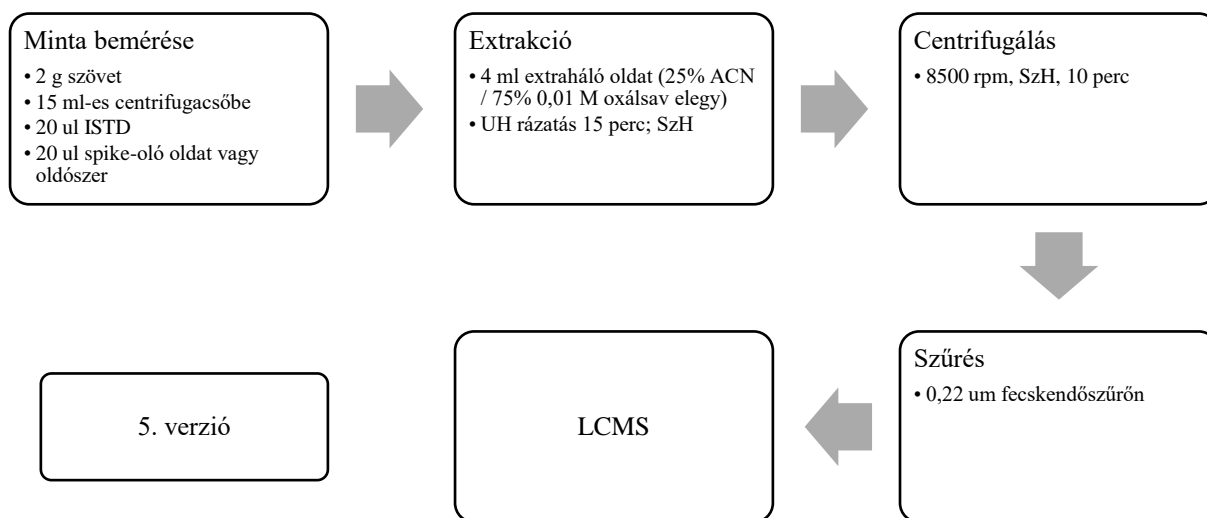
Negyedik nekifutásra jutottunk el a véglegesen elfogadott, validálhatónak tekinthető módszerig (lásd 8. ábra). A minták tömege itt is 2 g volt. Melyhez hozzámértünk 20 μ l spikeoló oldatot mely a vak minta esetében szintén a 3.1 bekezdésben említett oldatot jelentette. Majd 20 μ l sztenderd oldatot, a vak minta esetében pedig 25% acetonitril és 75% 0,01 M oxálsav elegyét. Az acetonitril és oxálsav elegyéből 4 ml-t mértünk még minden mintához extrahálószerként. Majd 15 percig tartó ultrahangos rázatás volt a következő lépés. Ezt követte a 10 percig tartó centrifugálás mely ebben az esetben már szobahőmérsékleten zajlott. Utolsó lépésként pedig itt is a szűrés majd az LC-MS/MS mérés következett.

Az egyes mintaelőkészítési módszerek összehasonlítását úgy végeztük el, hogy lemértük a műszerrel a kapott mintákat és összehasonlítottuk a csúcsterületeket. Azt néztük, hogy az azonos mértékű szennyezésre, hol kaptuk a legnagyobb csúcsterületet.

3.3 Műszeres mérések

A 3.2 alfejezetben vázolt módon előkészített mintákat a következő műszeres analitikai mérésnek vetettük alá. A feldolgozott minták antibiotikum-tartalmát egy Shimadzu LC-MS/MS 8030 Plus rendszerrel mértük. A kromatográfiás oszlop egy Phenomenex Kinetex C18 EVO, 50 x 4,6 mm ID (2,6 μ m részecskeméret) kolonna volt; 4 x 2 mm C18 EVO védőkolonnával. Gradiens elúciót alkalmaztunk, melyben az 'A' eluens: 0,1% HFBA (heptafluoro-vaajsav) vízben, a 'B' eluens: 0,1 % (v/v%) hangyasav acetonitrilben. Az áramlási sebesség: 0,5 ml/min; egy kromatográfiás mérés ideje: 9 perc volt. A kolonnatér hőmérséklete: 30 °C, a mintaadagoló

hőmérséklete: 10 °C. Injektált térfogat: 10 µl. Mind a kalibrációs, a QC és az éles mintákat háromszor injektáltuk.



8. ábra. Minta előkészítés

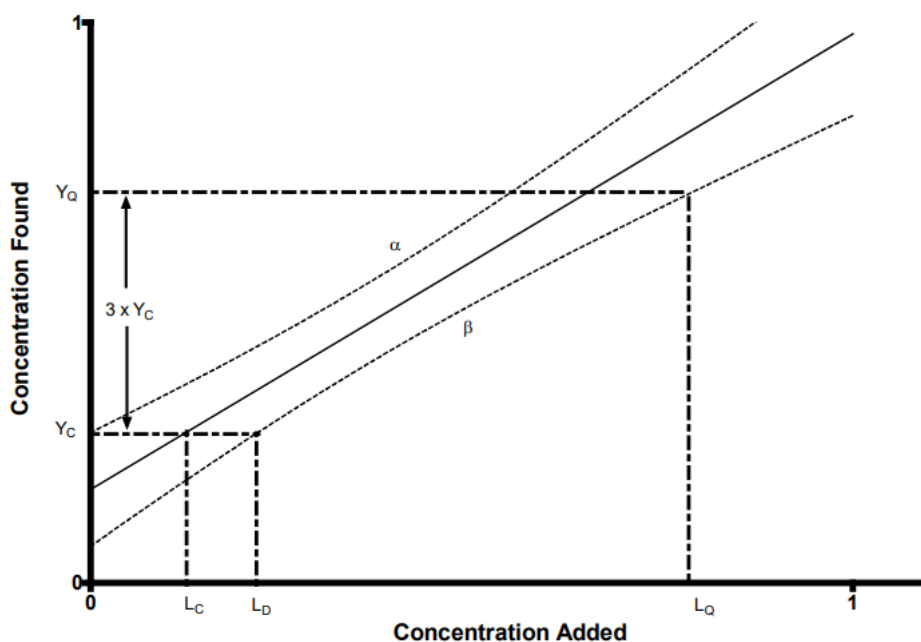
Electrospray (ESI) ionforrást használtunk pozitív ionizációs polaritással, multiple reaction monitoring (MRM) módban. Interface: 4,5 kV, interface hőmérséklet 350 °C, desolvation line: 300 °C, heat block: 450 °C, detektor feszültség: 1,78 kV, porlasztó gáz (N₂): 3 l/perc, szárító gáz (N₂): 15 l/perc. Ütközési gáz (Ar): 230 kPa.

A kalibrációs egyenes pontjait akkor tekintettük elfogadhatónak, ha a 11 pontjából legalább 7 esetében a csúcsterület értékét az egyenes egyenletébe helyettesítve $\pm 15\%$ -os pontossággal visszakaptuk az adott kalibrációs ponthoz tartozó névleges koncentrációt. Mindezeket túl a kalibrációs egyenes korrelációs koefficiensének (R^2 érték) legalább 0,99-nek kellett lennie.

3.4 Adatfeldolgozás

Az LC-MS/MS mérések nyers eredményeit a műszert vezérlő SHIMADZU LabSolutions® programból nyertük ki, majd MS Excel segítségével statisztikai számításokat végeztünk. Az Excel program segítségével három függvényt (lásd. 9. ábra) ábrázoltunk minden egyes hatóanyag-szövet kombináció esetében. Az egyik függvényhez az elméleti koncentrációk függvényében ábrázoltuk a mért koncentrációkat, valamennyi koncentráció-szinten valamennyi

párhuzamost, és ezekre egyenest illesztettünk. Ez lett a „mért” grafikon, és ezen egyenes R^2 értéke adja az adott hatóanyag-szövet páros esetében a módszer linearitását. Utána minden egyes elméleti koncentráció-szintnél kiválasztottuk az adott szinten mért legkisebb és a legnagyobb értéket és ezeket is ábrázoltuk az elméleti koncentráció függvényében. A legkisebb határértékekre illesztett egyenes lett az alsó konfidencia-határ (β függvény), a legnagyobb határértékekre illesztett egyenes pedig a felső konfidencia-határ (α függvény). Alsó döntési szintnek (decision limit; Y_c) nevezzük azt a pontot, ahol a felső konfidencia-határ egyenese metszi a mért koncentrációk tengelyét (azaz, az α függvény tengelymetszete). Majd a kapott decision limit értékét behelyettesítettük az alsó konfidencia-határ (β) egyenesének egyenletébe, és az így kapott eredmény adta az alsó kimutatási határt (LOD). Következő paraméter a mérési határ (LOQ), melynek kiszámításához az Y_c értékét meg kell szorozni hárommal (a műszeres analitikai szakterületen általánosságban elfogadott szabály, hogy a számértéket eredményező mérés alsó határa az alsó döntési szint háromszorosa). Ennek eredménye adta meg az alsó meghatározási határt (determination limit), mely értéket szintén az alsó konfidencia-határ (β) egyenesének egyenletébe beillesztve megkapjuk a LOQ-t.



9. ábra α és β egyenes ábrázolása [45]

3.5 Validálási paraméterek kiszámítása

Linearitás

A linearitás paramétere akkor tekinthető elfogadhatónak, ha a 11 kalibrációs pontból legalább 7 megfelelő, vagyis értéke a $\pm 15\%$ -os tartományba esett ($\pm 20\%$ LOQ), valamint a korrelációs koefficiens (R^2) nagyobb mint 0,99.

Mérési napon belüli (within-run) precízió és pontosság

A pontosság az elméleti koncentráció és az eljárás alkalmazásával mért átlagos eredmény közötti eltérés, százalékban kifejezett értékével egyenlő. A módszer pontossága pedig, a homogén vizsgálati anyagból meghatározott felhasználási feltételek mellett kapott, független vizsgálati eredmények közötti relatív szórás százalékban kifejezett értékével egyenlő.

A within-run precizitás és pontosságának vizsgálatához öt különböző koncentráció szintű és egy kontroll mintát használtunk (lásd 3.2 alfejezet) Az egy napon végzett mérések során kilencszer három mintát mértünk a különböző koncentrációjú mintákból (+0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, +2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, +6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, +18 $\mu\text{g}/\text{kg}$, +100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ és +800 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A pontosság és a precizitás értéke a különböző töménységű mintákra külön lett meghatározva. A paraméter elfogadhatóságát az alábbi 2. táblázat szemlélteti a megfelelő koncentráció tartományban.

2. táblázat *Within-run* pontosság és precizitás meghatározása

| Analit koncentráció | Elfogadható within-run precizitás % CV | Elfogadható within-run pontosság tartománya |
|---|--|---|
| < 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 30 % | -50 % és +20 % között |
| $\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg} < 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ - | 25% | -40 % és +20 % között |
| $\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg} < 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ | 15% | -30 % és +10 % között |
| $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ | 10% | -20 % és +10 % között |

Mérési napok közötti (between-run) precízió és pontosság

A beetwen-run precizió és pontosság meghatározására is ugyanazt a hat különböző koncentrációjú mintát mértük, mint amit a within-run esetében. Mindegyikből kilencszer három mintát mérünk, és itt a három napra együttesen vizsgáltuk ennek értékét. A paraméterek elfogadhatóságához a százalékokat az alábbi 3. táblázat tartalmazza

3. táblázat *Between-run* pontosság és precizitás

| Analit koncentráció | Elfogadható <i>between-run</i> precizitás % CV | Elfogadható <i>between-run</i> pontosság tartománya |
|------------------------|--|---|
| < 1 µg/kg | 45 % | -50 % és +20 % között |
| ≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg - | 32% | -40 % és +20 % között |
| ≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg | 23% | -30 % és +10 % között |
| ≥ 100 µg/kg | 16% | -20 % és +10 % között |

Kimutatási határ (LOD)

A kimutatási határ az analit azon legkisebb mért koncentrációja, amelyből elfogadható biztonsággal következtetni lehet annak jelenlétére a vizsgálati mintában. A paraméter kiszámítását lásd a 3.4-es bekezdésben.

Mérési határ (LOQ)

Az LOQ az analit azon legkisebb mért tartalma, amely felett a meghatározás a megadott pontossággal és precizitással elvégezhető. A paraméter meghatározásának kiszámítását lásd a 3.4-es bekezdésben.

Stabilitás

Rövidtávú (short-term) stabilitás

Short-term stabilitás esetében az elkészített három legmagasabb koncentrációjú (+18 µg/kg, +100 µg/kg és +800 µg/kg) minták mindegyikéből három mintát készítettünk, és a mérés előtt 4 órán át szobahőn tárolva, hasonlítottuk össze a kontroll, vagyis az elkészítés pillanatában mért mintákkal. Annak érdekében, hogy a mintákat szobahőmérsékleten stabilnak lehessen elfogadni, a vizsgált minták legfeljebb ±15%-ban térhetnek el a friss minták esetében mért értékektől.

Fagyasztás-kiolvasztási (freeze-thaw) stabilitás

A freeze-thaw stabilitás mérése során az elkészített mintákat a mérés előtt háromszor lefagyasztottuk majd kiengedtük anélkül, hogy melegítettük volna. A három legmagasabb koncentrációjú minták (+18 µg/kg, +100 µg/kg és +800 µg/kg) mindegyikéből hármat hasonlítottuk össze a kontroll mintákkal. Annak érdekében, hogy a mintákat a

fagyasztás/kiengedés vizsgálatban stabilnak lehessen nevezni, a vizsgált minták legfeljebb $\pm 15\%$ -kal térhetnek el a kontroll mintáktól.

Robusztusság

A módszerek robusztusságának értékelése kiemelten fontos. Az módszer fejlesztése, validálása vagy használata során nyilvánvalóvá válhat a módszer érzékenysége, ezért értékelni kell a módszer teljesítményét leginkább befolyásoló eltéréseket. Itt három kisebb módosítást vizsgáltunk a kísérleten, azonban minden mintánk $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ koncentrációjú volt. Az első módosítás során az eluens áramlási sebességet $0,50$ -ról $0,40$ -re csökkentettük, a változás a második módosításként az eluens additív (HFBA) koncentrációját növeltük $0,10\%$ -ról $0,15\%$ -ra a vízben. Az utolsó módosítás pedig a minta extrakció során az ultrahangos rázatás idejének 15 percről 8 percre történő módosítását jelentette. A robusztusság paramétere akkor elfogadható, ha a változtatott minta az eredeti kontroll mintától, mindössze $\pm 15\%$ -kal tér el.

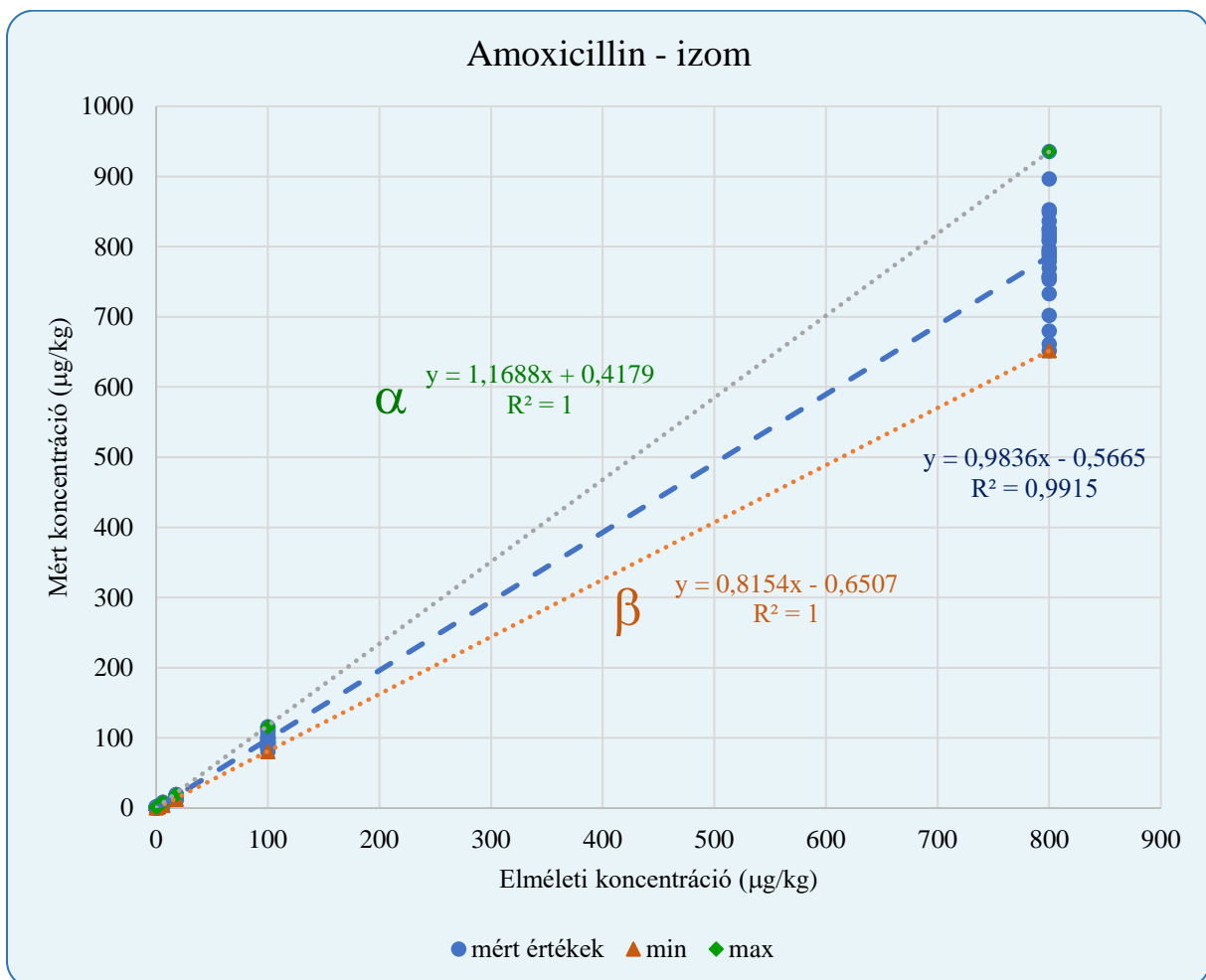
4. Mérési eredmények

4.1 Amoxicillin

4.1.1. Izomszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. Az amoxicillin esetében izomszövetben a LOD értéke 1,31 $\mu\text{g}/\text{kg}$, az LOQ pedig 2,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lett (lásd 10. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9915, azaz, a validálási kritériumnak ($<0,99$) eleget tesz.



10. ábra - Az amoxicillin izomszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy

napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 4. és az 5. táblázatok (I. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az amoxicillinre az izomminták esetében.

Stabilitás a mátrixban

A short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 6. táblázatban (I. Függelék) szereplő eredmények azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott izomszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát szintén a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 7. táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott, mint ami még tolerálható lenne.

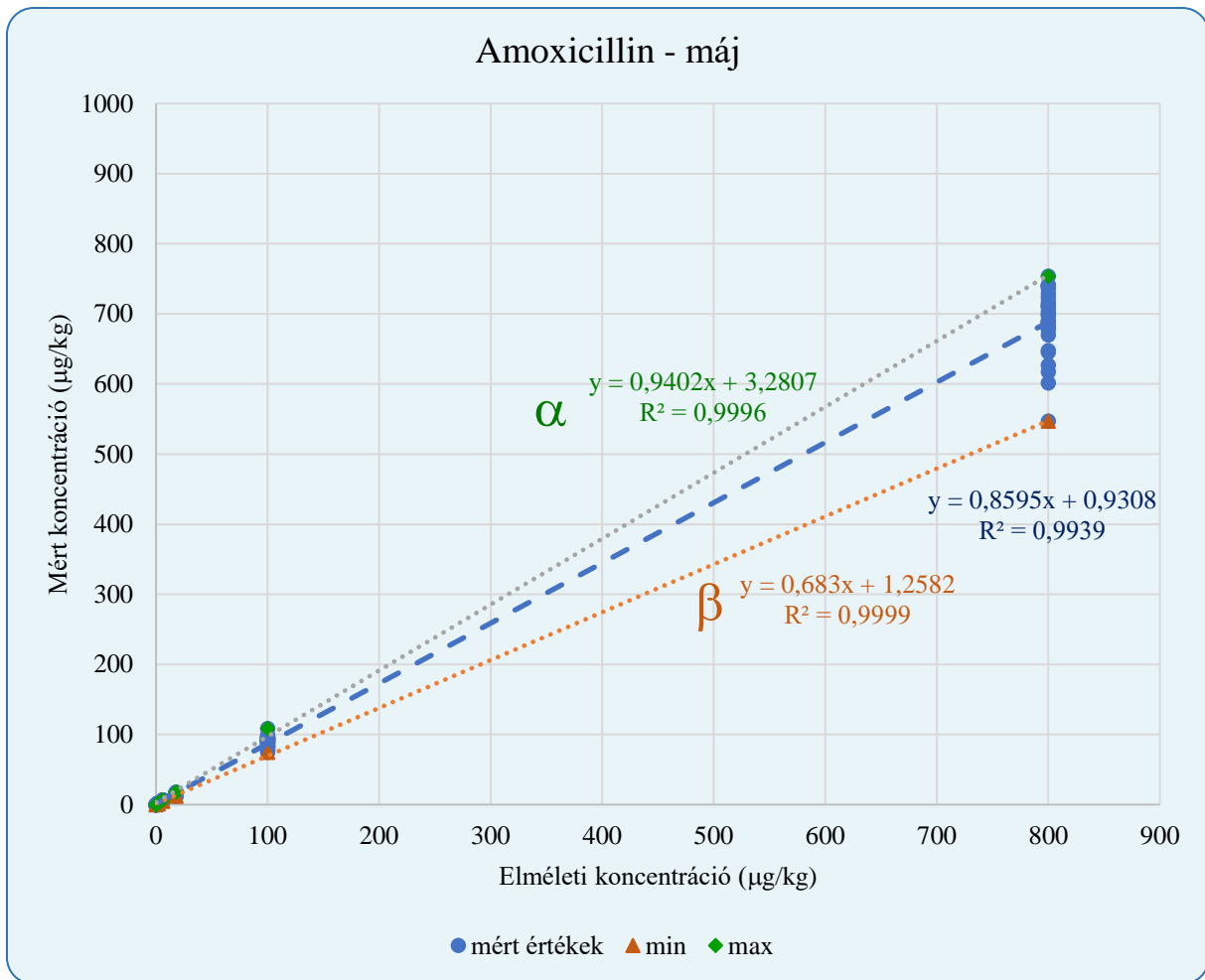
Robusztusság

A 8. táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.1.2. Májszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. Az amoxicillin esetében májszövetben a LOD értéke 2,96 µg/kg, az LOQ pedig 12,57 µg/kg lett (lásd 11. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9939, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



11. ábra Az amoxicillin májszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékek számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 10. és a 11. táblázatok (I. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az amoxicillinre a májminták esetében.

Stabilitás a mátrixban

A short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 12. Táblázatban (I. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták

szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott májszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 13. Táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

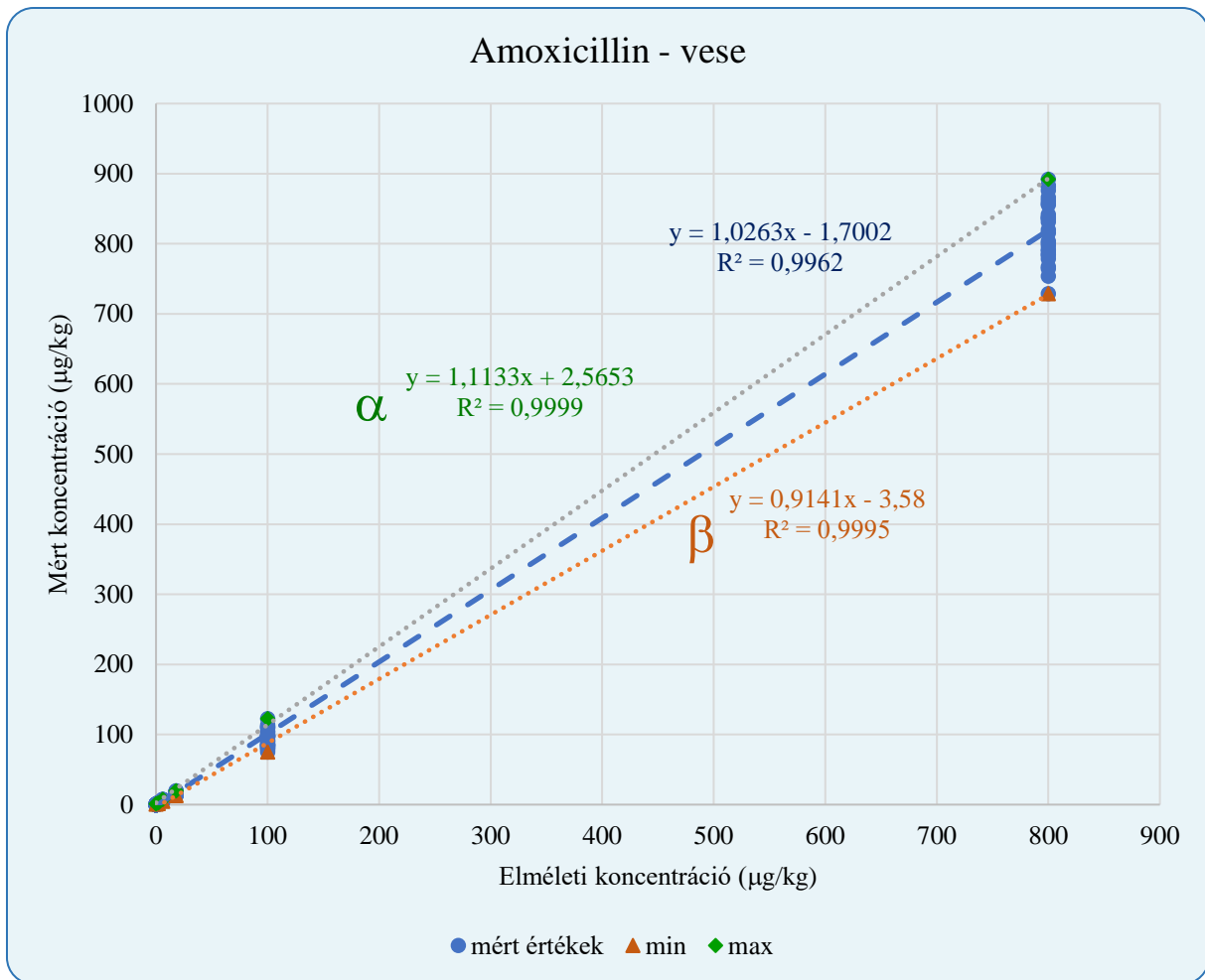
Robusztusság

A 14. táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben májszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.1.3. Vesezsövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. Az amoxicillin esetében vesezsövetben a LOD értéke 6,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$, az LOQ pedig 12,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lett (lásd 12. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9962, azaz, a validálási kritériumnak ($<0,99$) eleget tesz.



12. ábra Az amoxicillin veseszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 15. és a 16. táblázatok (I. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az amoxicillinre a veseminták esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 17. táblázatban (I. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át

szobahőmérsékleten hagyott veseszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 18. táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett veseszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

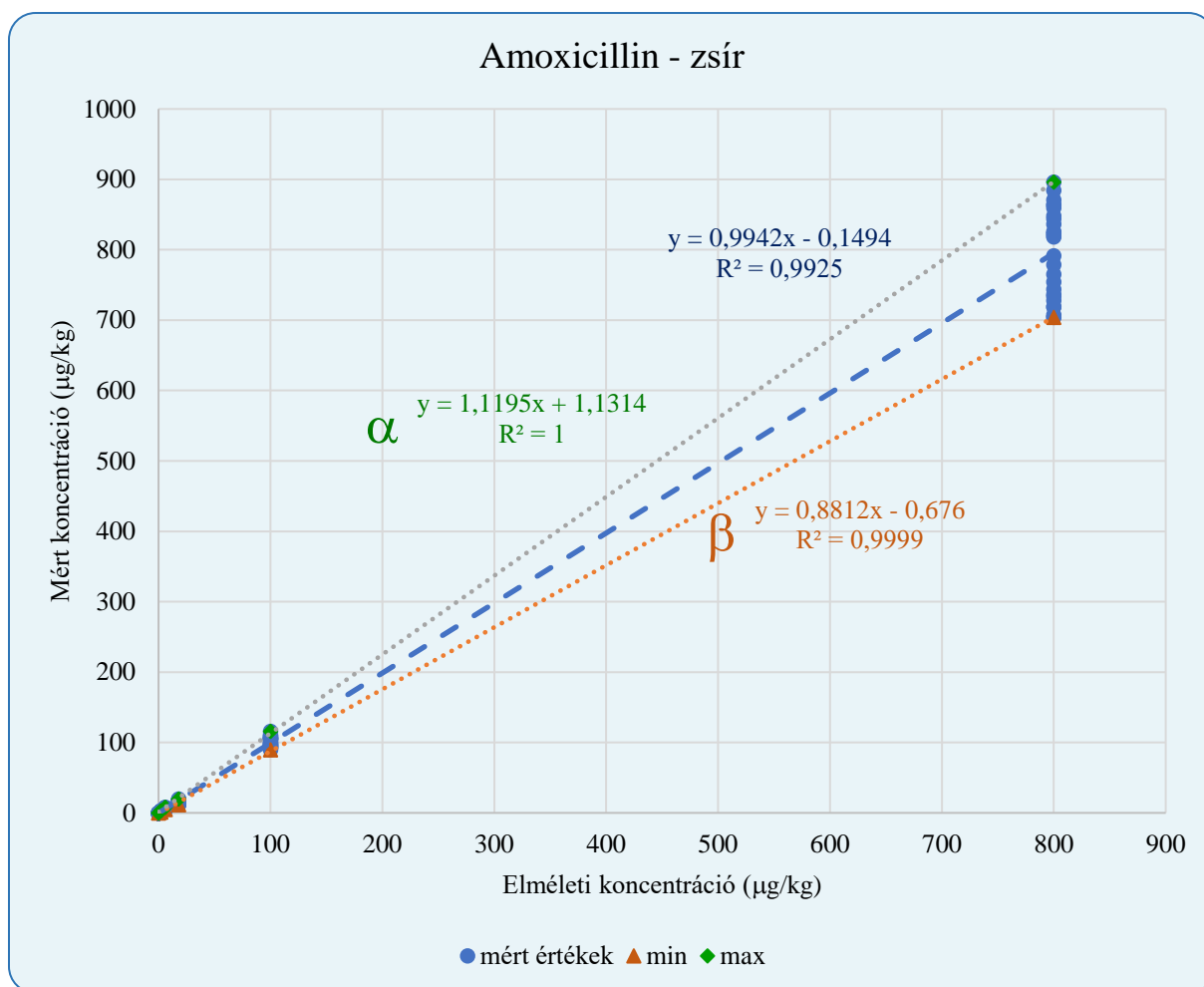
Robusztusság

A 19. táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben veseszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.1.4. Zsírszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. Az amoxicillin esetében zsír szövetben a LOD értéke 2,05 µg/kg, az LOQ pedig 4,62 µg/kg lett (lásd 13. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9999, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



13. ábra Az amoxicillin zsírszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 20. és a 21. táblázatok (I. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az amoxicillinre a zsírminták esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 22. táblázatban (I. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át

szobahőmérsékleten hagyott zsírszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 23. táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett zsírszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

Robusztusság

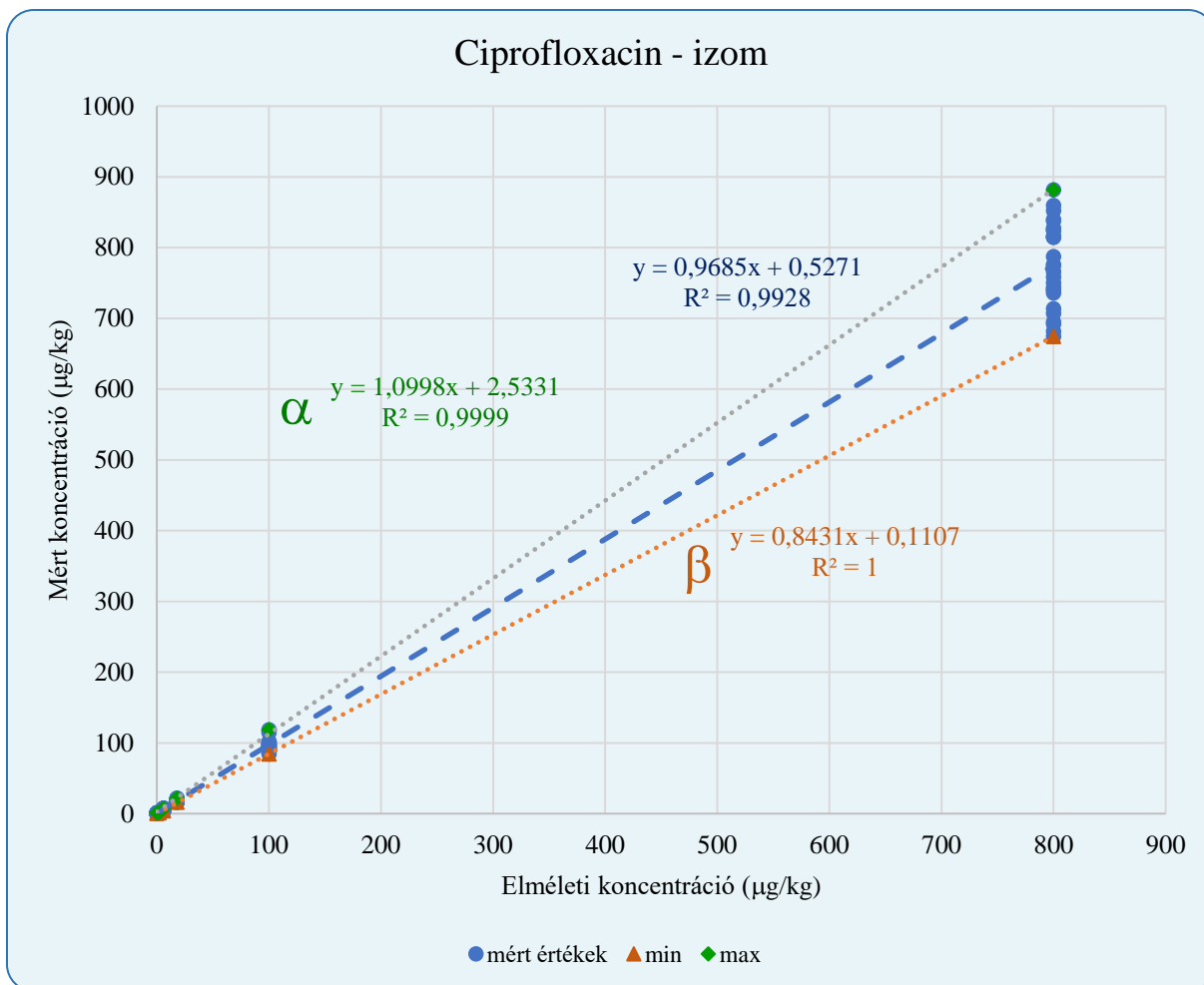
A 24. táblázat (I. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben zsírszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.2 Ciprofloxacin

4.2.1. Izomszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacin esetében izomszövetben a LOD értéke 2,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$, az LOQ pedig 8,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lett (lásd 14. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9928, azaz, a validálási kritériumnak ($<0,99$) eleget tesz.



14. ábra A ciprofloxacin izomszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékek számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 25. és a 26. táblázatok (II. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek a ciprofloxacinra az izomminták esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 27. táblázatban (II. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták

szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott izomszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 28. táblázat (II. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy a 18 µg/kg-os minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, azonban a másik két nagyobb koncentrációt tartalmazó minta, nem mondható stabilnak ebben a kísérletben, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

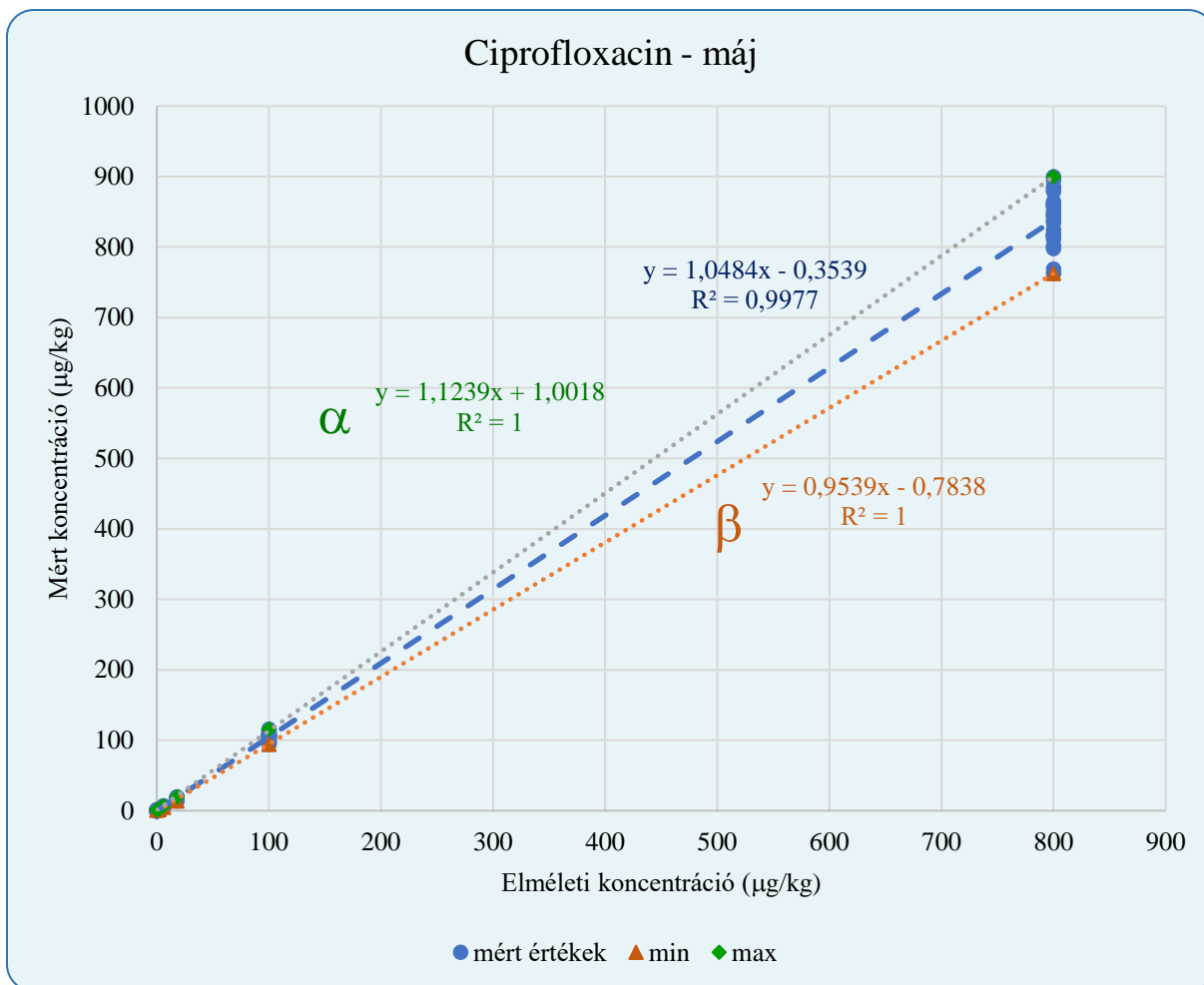
Robusztusság

A 29. táblázat (II. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét, különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.2.2. Májuszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacin esetében májuszövetben a LOD értéke 1,87 µg/kg, az LOQ pedig 3,97 µg/kg lett (lásd 15. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9977, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



15. ábra A ciprofloxacin májszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 30. és a 31. táblázatok (II. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek a ciprofloxacinra a májszövet esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 32. táblázatban (II. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták közül a +18 µg/kg és a +100 µg/kg koncentrációjú májszövet minták szobahőmérsékleten stabilnak bizonyultak. A 800 µg/kg-os minta mely 4 órán át szobahőmérsékleten volt hagyva, illetve a kontroll minták

koncentrációja közötti különbség viszont jelentősen nagyobbnak bizonyult mint 15%. Tehát ez utóbbi esetében nem megállapítható a stabilitás.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 33. táblázat (II. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy a 100 µg/kg-os és a 800 µg/kg-os minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében. Viszont a 18 µg/kg-os minta a kontroll mintához hasonlítva, több mint 15%-os eltérést mutat, így ezt nem lehet stabilnak nevezni.

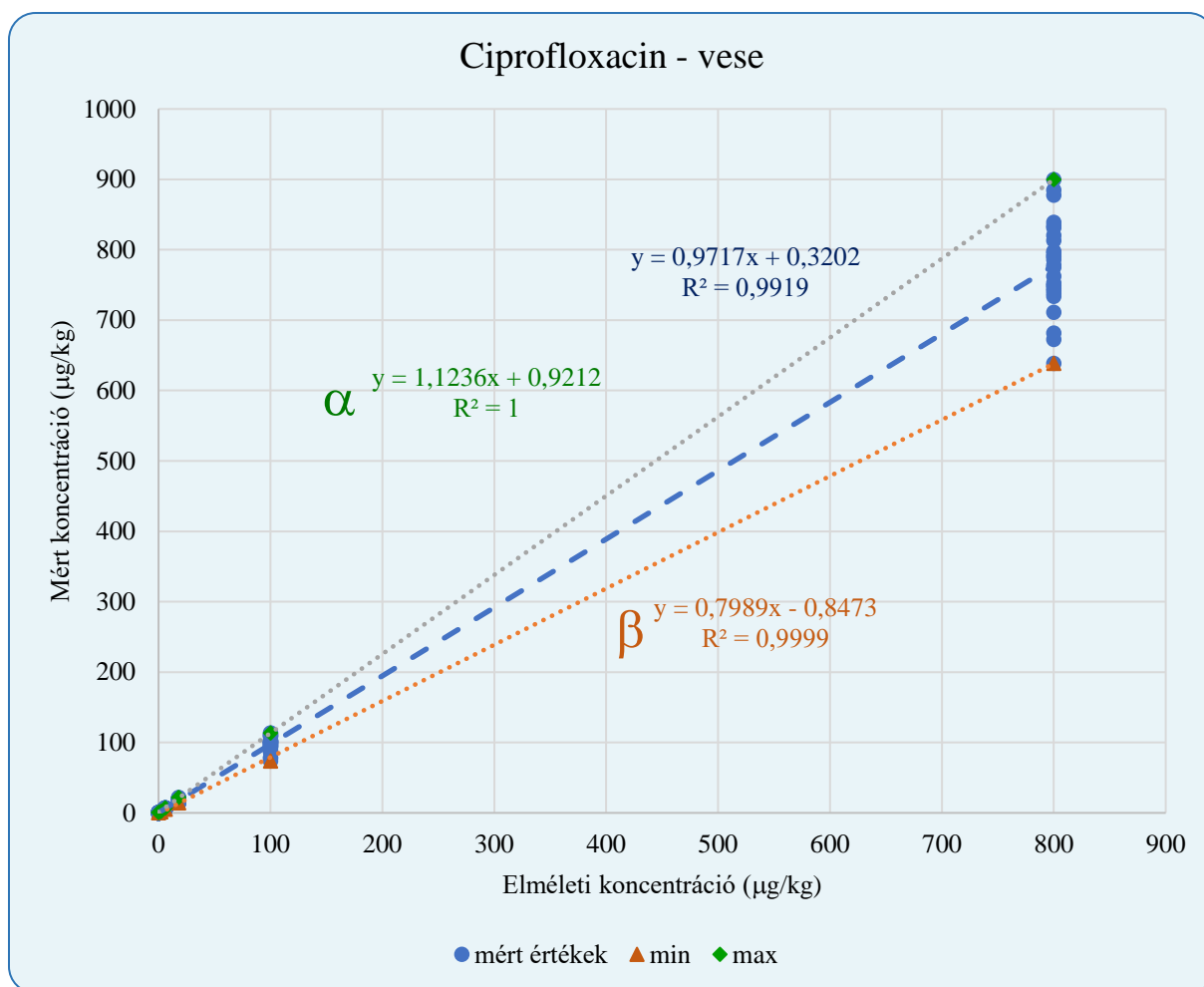
Robusztusság

A 34. táblázat (II.Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét, különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.2.3. Veseszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacín esetében veseszövetben a LOD értéke 2,21 µg/kg, az LOQ pedig 4,52 µg/kg lett (lásd 16. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9919, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



16. ábra A ciprofloxacin veseszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 35. és a 36. táblázatok (II. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek a ciprofloxacinra a veseszövet esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 37. táblázatban (II. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a 18 µg/kg-os minta szobahőmérsékleten stabilnak bizonyult. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott 100 µg/kg-os és 800 µg/kg-os veseszövet minták koncentrációja

közötti különbség viszont jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%, így ezeket nem lehetett stabilnak megállapítani.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk A 38. táblázat (II. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy minden minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében.

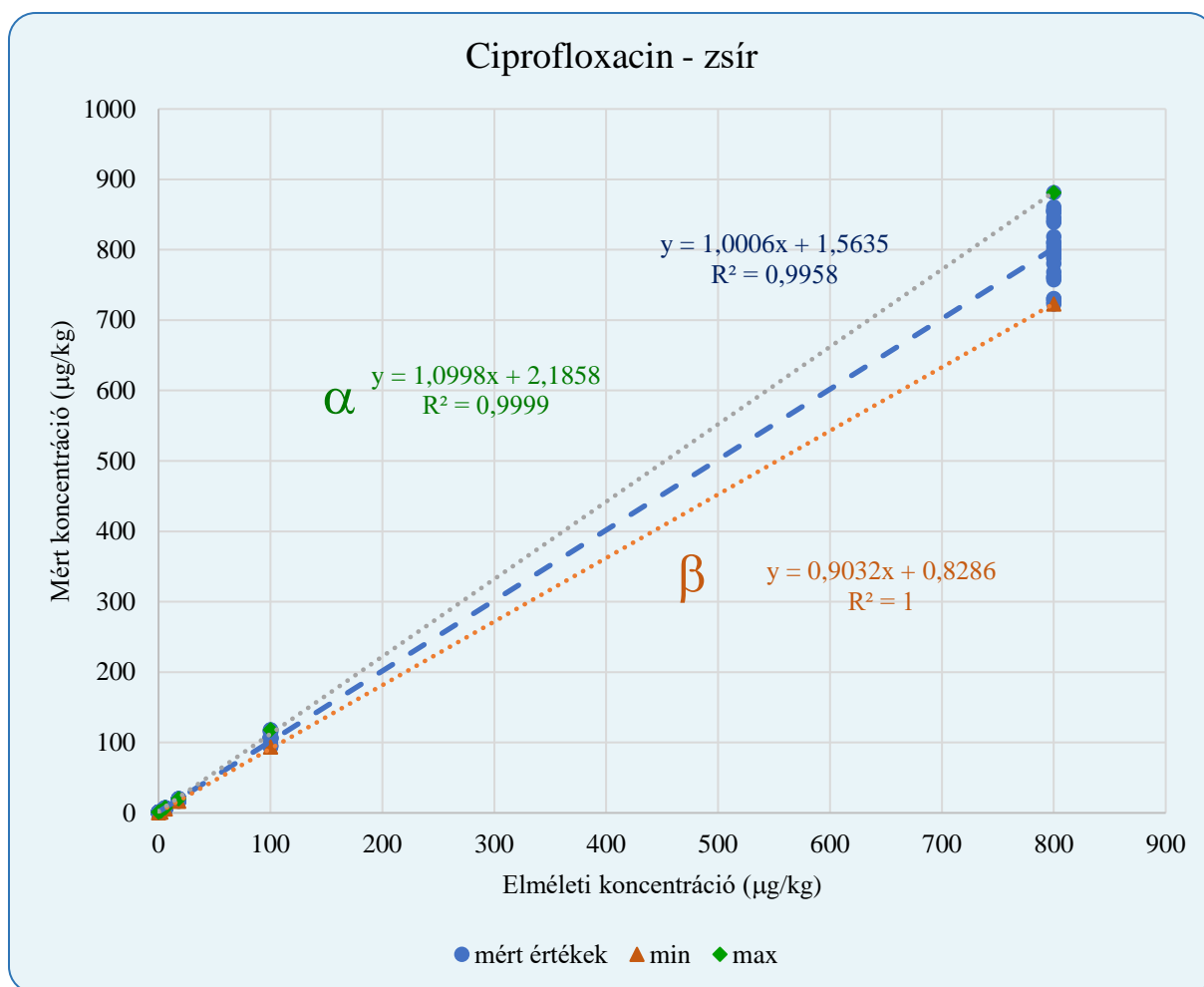
Robusztusság

A 39. táblázat (II. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét, különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.2.4. Zsírszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacin esetében zsír szövetben a LOD értéke 1,50 µg/kg, az LOQ pedig 6,34 µg/kg lett (lásd 17. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9958, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



17. ábra A ciprofloxacin zsírszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 40. és a 41. táblázatok (II. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek a ciprofloxacinra a zsírszövet esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 42. táblázatban (II. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták közül szobahőmérsékleten csak a 18 µg/kg-os minták bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott 2 nagyobb koncentrációjú zsírszövet

minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%, így ezeket nem lehetett stabilnak nevezni.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk A 43. táblázat (II. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy a 800 µg/kg-os minta bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, a másik két alacsonyabb koncentrációt tartalmazó minta esetében nem tapasztaltunk megfelelő stabilitást, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

Robusztusság

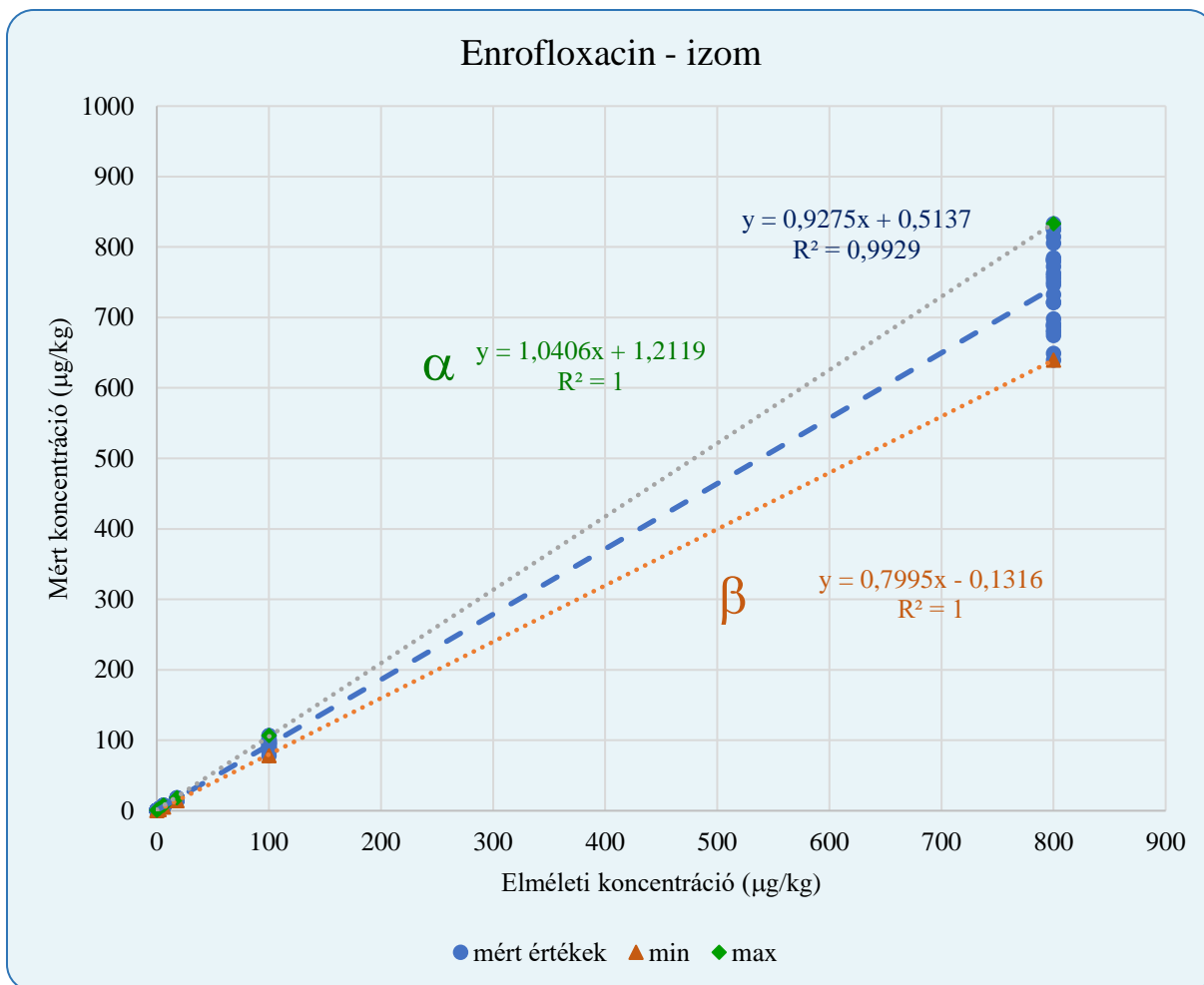
A 44. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét, különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.3 Enrofloxacin

4.3.1. Izomszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacin esetében izomszövetben a LOD értéke 1,68 µg/kg, az LOQ pedig 4,71 µg/kg lett (lásd 18. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9929, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



18. ábra Az enrofloxacin izomszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 45. és a 46. táblázatok (III. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az enrofloxacinra a izomszövet esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 47. táblázatban (III. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át

szobahőmérsékleten hagyott izomszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 48. táblázat (III. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy a 18 µg/kg-os minta bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett izomszövet minták esetében. míg a másik két nagyobb koncentrációjú minta esetében nem tapasztaltunk stabilitást, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

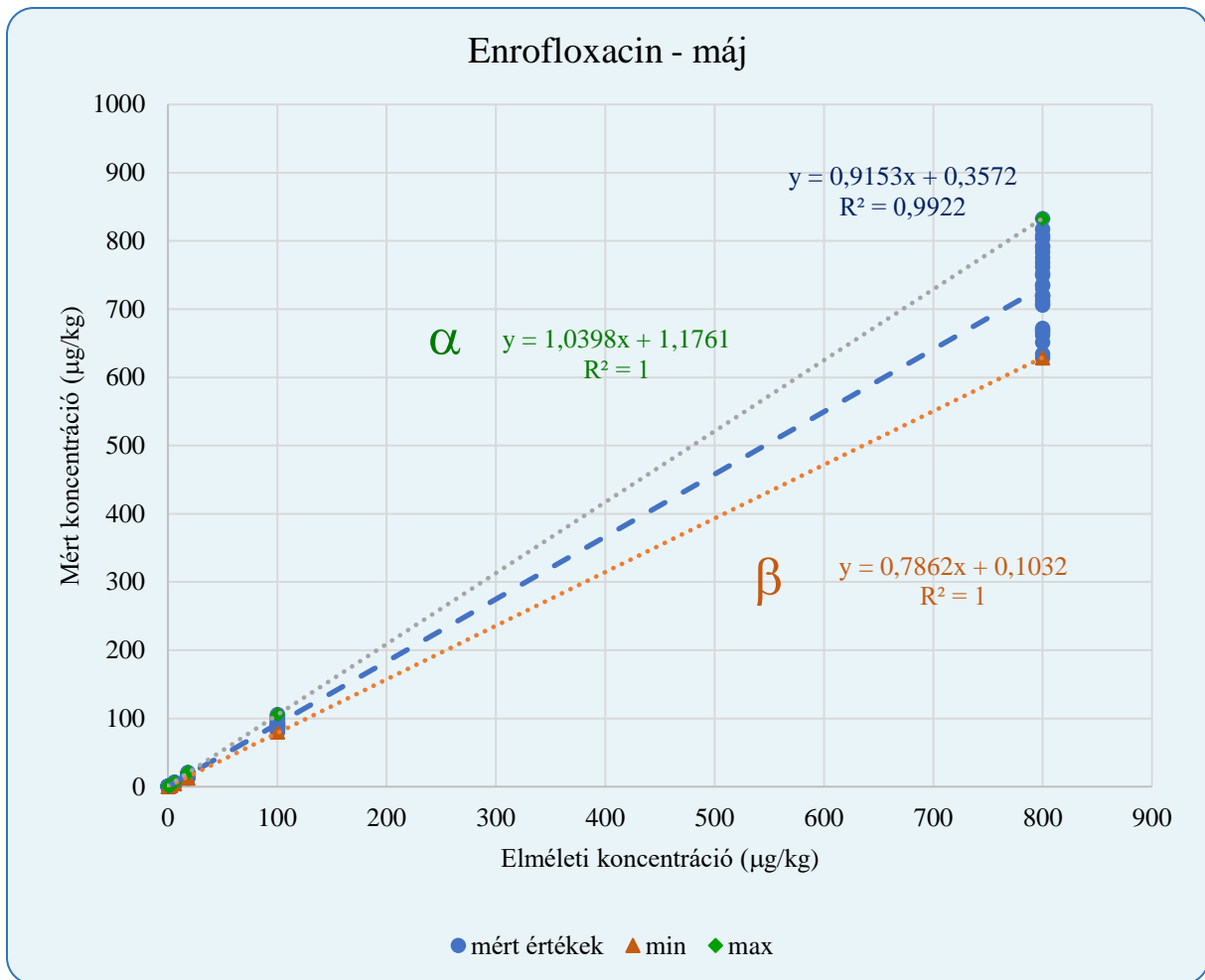
Robusztusság

A 49. táblázat (III. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben izomszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.3.2. Májzsövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacin esetében májzsövetben a LOD értéke 1.36 µg/kg, az LOQ pedig 4,36 µg/kg lett (lásd 19. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9922, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



19. ábra Az enrofloxacin májszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 50. és a 51. táblázatok (III. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az enrofloxacinra a májszövet esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 52. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a 18 µg/kg-os minták szobahőmérsékleten stabilnak bizonyultak. A két másik nagyobb koncentrációjú mintákat a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott kontroll májszövet minták koncentrációjával összehasonlítva a

különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%, vagyis azok a minták nem nevezhetőek stabilnak.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 53. táblázat eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak, a háromszor lefagyasztott és kiengedett májszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

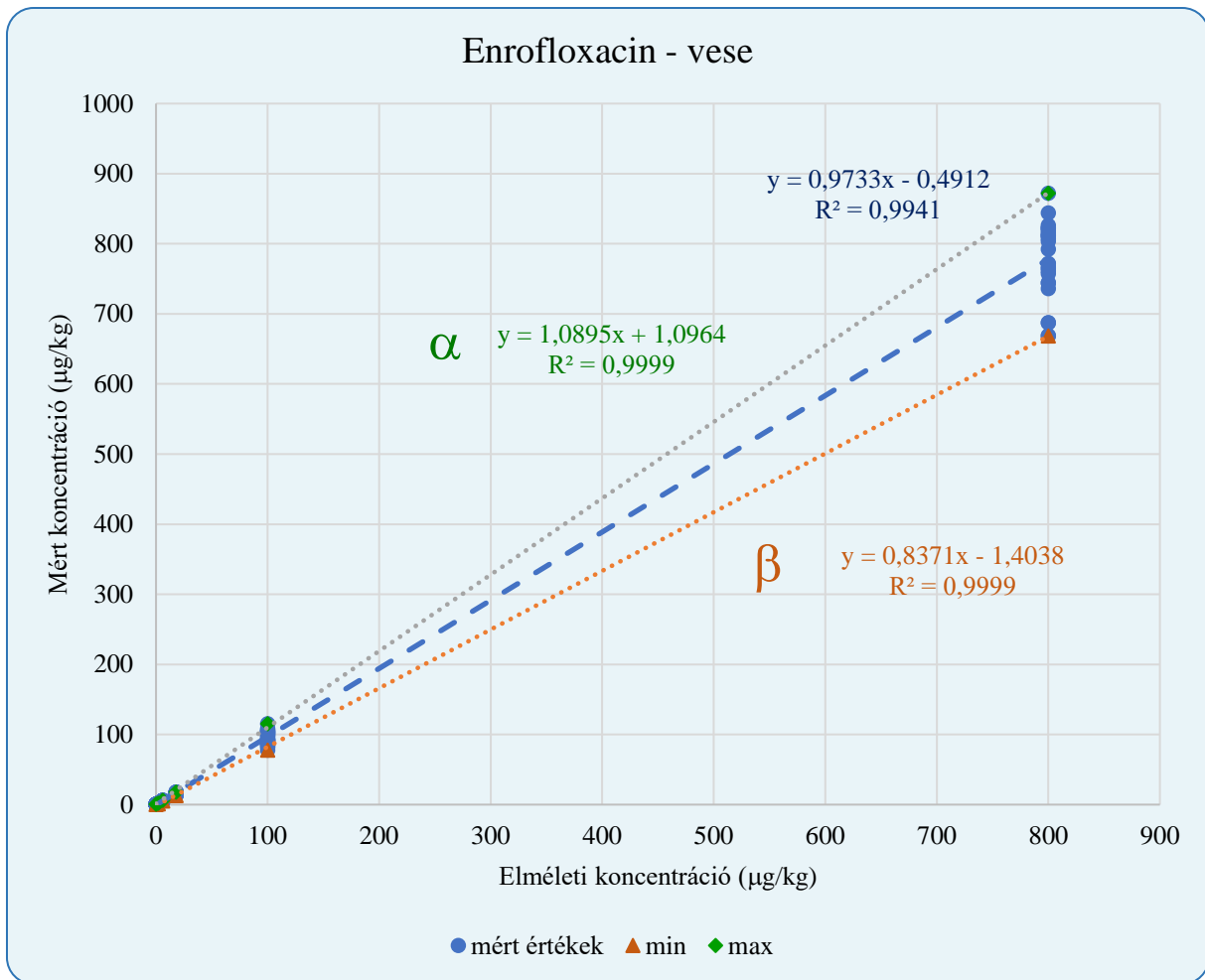
Robusztusság

A 54. táblázat (III. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben májszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.3.3. Veseszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacin esetében veseszövetben a LOD értéke 2,99 µg/kg, az LOQ pedig 5,61 µg/kg lett (lásd 20. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9941, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



20. ábra Az enrofloxacin veseşövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 55. és a 56. táblázatok (III. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az enrofloxacinra a veseşövet esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 57. táblázatban (III. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át

szobahőmérsékleten hagyott veseszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 58. táblázat (III. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy a 100 µg/kg-os minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett veseszövet minták esetében. Azonban a 18 µg/kg-os és a 800 µg/kg-os minta nem nevezhető stabilnak, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

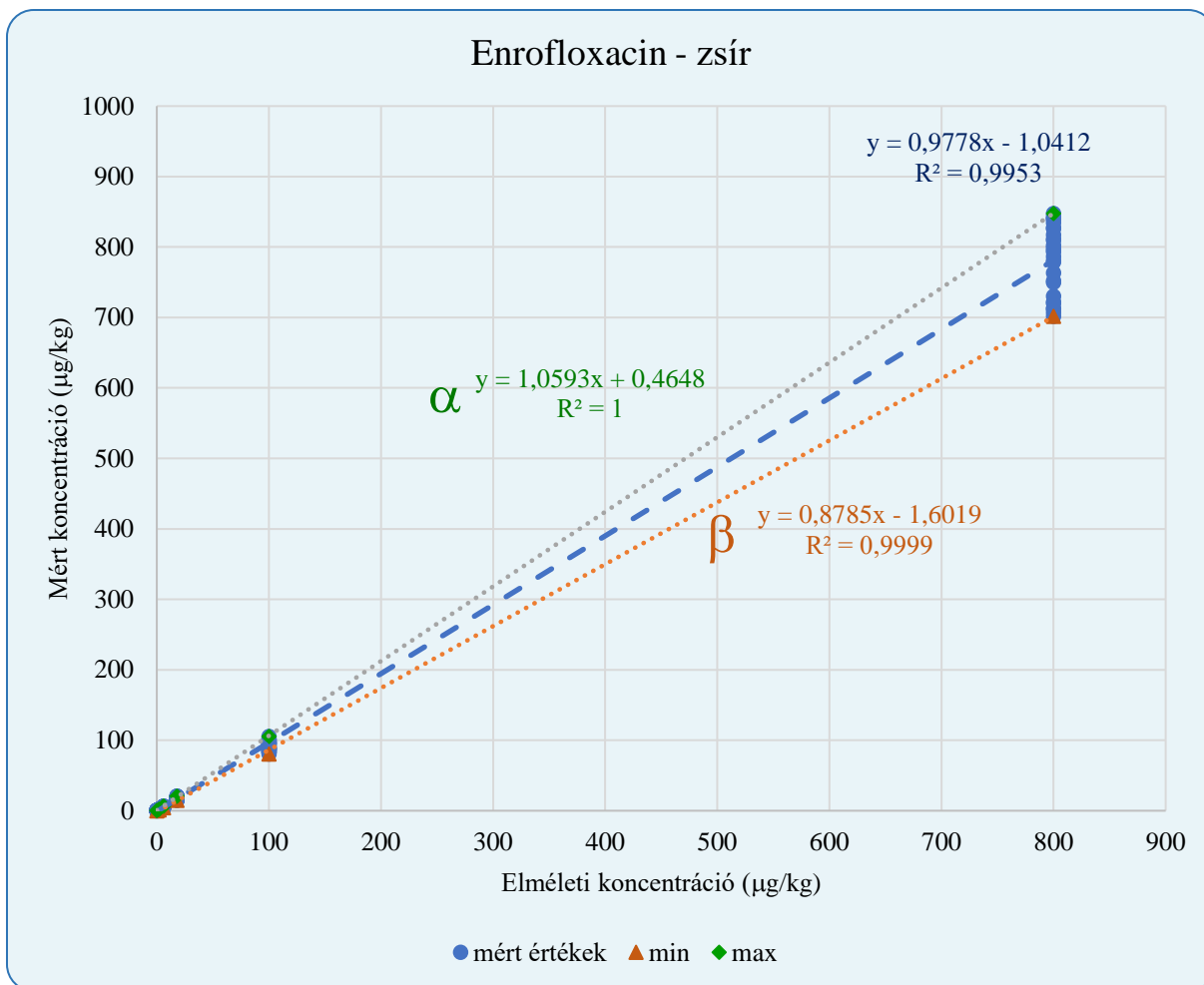
Robusztusság

Az 59. táblázat (III. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy az eluens tartalmát változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben veseszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

4.3.4. Zsírszövet

Linearitás, LOD és LOQ

A mérési módszer linearitásának, alsó kimutatási (LOD) és mérési határának (LOQ) számítását a 3.4 bekezdés szerint végeztük el. A ciprofloxacin esetében zsír szövetben a LOD értéke 2,35 µg/kg, az LOQ pedig 3,41 µg/kg lett (lásd 21. ábra). Az összes mért koncentráció értékre illesztett egyenes R^2 értéke 0,9953, azaz, a validálási kritériumnak (<0,99) eleget tesz.



21. ábra Az enrofloxacin zsírszövetben mérhető linearitásának, LOD és LOQ értékének számítása

Precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, egy napon belül (within-run), illetve a három napi méréseket együtt is (between-run). A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A kapott koncentráció értékeket, ezek szórását, illetve a vizsgált paraméterek értékeit a 60. és a 61. táblázatok (III. Függelék) tartalmazzák. A validálási kritériumok mind a within run, mind a between run precizitás és pontosság esetében teljesültek az enrofloxacinra a zsírszövet esetében.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 62. táblázatban (III. Függelék) szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át

szobahőmérsékleten hagyott zsírszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 63. táblázat (III. Függelék) eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett zsírszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

Robusztusság

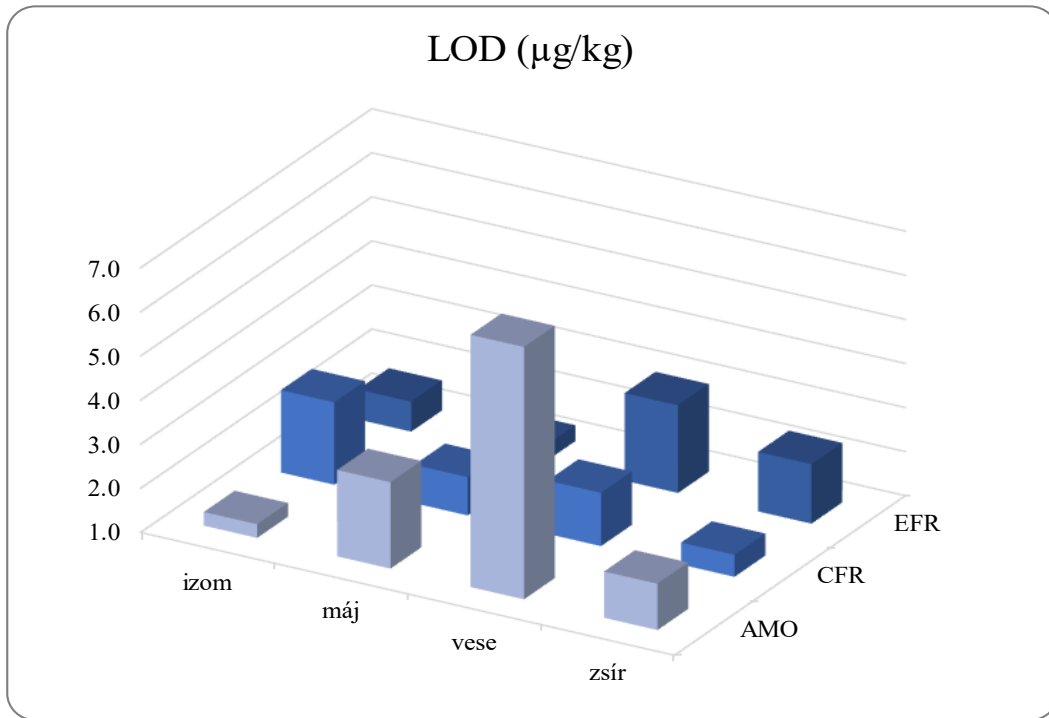
A 64. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét, különösen a terület esetében. Azonban a másik két változtatás esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben zsírszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

5. Következtetések

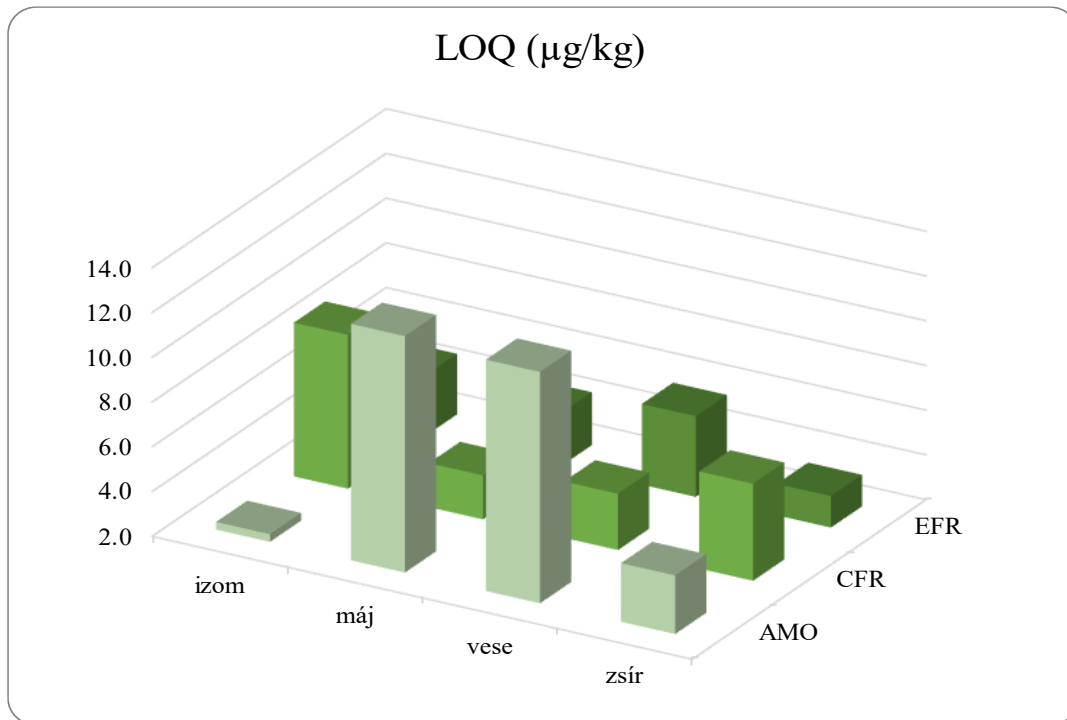
A linearitás, a within-run és a between-run precizitás és pontosság paraméterei minden esetben az elfogadható tartományba estek a mért eredményeink esetében. Ez a megállapítás azonban nem is meglepő, mert a kísérletünket a módszerfejlesztéssel kezdtük, ahol az volt a célkitűzés, hogy optimalizáljuk a mintaelőkészítési eljárásunkat.

A stabilitás a mátrixban paramétert vizsgálva általánosságban megállapítható, hogy sem a short-term, sem pedig a freeze-thaw stabilitás nem teljesült a méréseink során. Így megállapítható, hogy a mintáinkat, ha mérni szeretnénk nem szabad 4 órán át szobahőmérsékleten hagyni, tehát ha nem is mérjük meg egyből, mindenképpen legalább a hűtőbe vissza kell tenni. Illetve azokat a mintákat, amiket kivettünk a fagyasztóból már nem tanácsos újból visszatenni oda. Ha egyszer kivettük akkor azt már le kell mérni. Az amoxicillin vegyület esetében egyszer sem kerültek az elfogadható tartományba az eredmények. Az enrofloxacin esetében már előfordult, hogy az elfogadható tartományban tapasztaltunk eredményeket. A ciprofloxacin és a vegyületen belül a veseszövet pedig a freeze-thaw stabilitás szempontjából megbízhatóan stabilnak bizonyult. Így ezzel kapcsolatban azt a megállapítást tettük, hogy abban az esetben, ha csak ebben az egy szövetben végeznénk reziduum vizsgálatot akkor elfogadható ez a módszer. Azonban, ha az összes szövetre, vagy a másik két vegyületet is szeretnénk vizsgálni akkor a legrosszabb eredményt kell figyelembe venni, ami egy jelentős bomlást mutat, tehát nem javasolt az alkalmazása.

A LOD (lásd 22. ábra) és a LOQ (lásd 23. ábra) esetében is a legalacsonyabb, illetve a legmagasabb értéket is az amoxicillin vegyület esetében mértük. Ebből a megállapításból az is következik, hogy az amoxicillin vegyület adta a mérések során a legnagyobb szórást. Széles körben elfogadott szakmai várakozás szerint jó, ha az LOQ legalább az MRL tizede. Az eredményeink jóval az MRL érték alatt voltak, azonban reziduum vizsgálatához a LOQ-nak 5 körül lehetne maximum lennie, ami a mi esetünkben nem minden esetben teljesült. Ez valószínűleg izotóp jelzett belső sztenderd használatával kiküszöbölhető lett volna, azonban jelen kutatásunk esetében ennek beszerzésére nem volt lehetőségünk.



22. ábra LOD értékeinek grafikonos ábrázolása

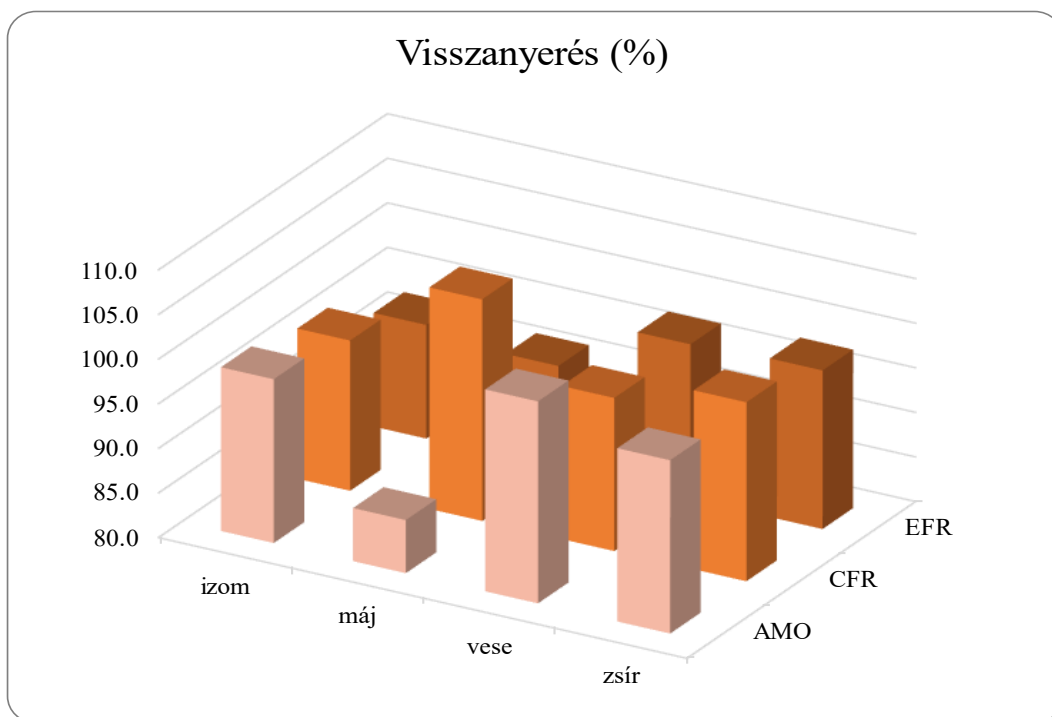


23. ábra LOQ értékeinek grafikonos ábrázolása

A robusztusság paraméterének vizsgálata során az eluens additív koncentrációjának változtatása jelentős befolyással volt a mérésünkre. Ezt a beállítást éppen humán erőforrás készíti össze, tehát van benne hibalehetőség és éppen erre a változtatásra nem volt robusztus a

módszer. Az ultrahangos rázatógép működésének idején történő változtatás, nem okozott jelentős változást a módszeren, illetve az áramlási sebesség változtatása sem, tehát utóbbi két változtatásra robusztus a módszer. Megjegyzendő, hogy az áramlási sebesség egyébként szoftveresen vezérelt, tehát ebben az esetben a hibalehetőség alacsony.

A visszanyerési százalékot tekintve (lásd 24. ábra) mely az elméleti, illetve a mért koncentrációk arányát mutatja meg, az tapasztalható, hogy az amoxicillin viselkedése volt a legkevésbé következetes, míg az enrofloxacin bizonyult a leginkább következetesnek. Alapvetően megállapítható, hogy az általunk összeállított mérési rendszer egy kicsit aláméri a vegyületek koncentrációját, de még a hibahatáron belül. Ennek jelentősége azonban a belső sztenderd alkalmazása miatt elhanyagolható.



24. ábra Visszanyerési százalék grafikonos ábrázolása

Össességében elmondható, hogy egy elfogadható érzékenységű, egyszerűen és költség hatékonyan kivitelezhető, megbízható módszert sikerült fejleszteni, mely egymástól egészen eltérő mátrixokban és egymástól egészen eltérő vegyületeket is képes megbízhatóan mérni.

6. Összefoglalás

Szaktervezés célja az volt, hogy a házityúk (*Gallus gallus domesticus*) izom, vese, zsír és máj szöveteiből az amoxicillin, enrofloxacin és ciprofloxacín vegyületek LC-MS/MS módszerrel történő meghatározásához mérési módszert dolgozzunk ki, valamint validáljuk is azt. A kutatásom alapját egy már létező módszer képezte, ami több, mint száz állatgyógyászati antibiotikum szűrő (screen) vizsgálatára alakították ki. Nem állt azonban módunkban módosítások nélkül adaptálni az eljárást, hiszen a mi vizsgálati célunk más volt, mint az eredeti módszerré (reziduum vizsgálat vs. szűrővizsgálat). Néhány lényegi módszerfejlesztési lépés után viszont megfelelő mérési módszert sikerült kialakítanunk. A csirkehúsról nagyon magas a kereslet világszerte, ebből a tényből kifolyólag éreztem fontosnak ezt a fajt, és húsának biztonságossági vizsgálatait választani.

A validálás elvégzése során a vonatkozó szakmai irányelvekben megfogalmazott alapvető fontosságú validálási paraméterek mellett néhány általunk még fontosnak tartottat választottuk ki és vizsgáltunk. Ezek a paraméterek pedig a linearitás, a napon belüli (within-run) és a mérési napok közötti (between-run) precizitás és pontosság, az alsó kimutatási (LOD) és mérési határ (LOQ), a stabilitás a mátrixban részeként a rövidtávú (short-term) illetve a fagyasztás-kiolvasztás (freeze-thaw) stabilitás, végül pedig a robusztusság három paraméter kisebb változtatással.

A validálási paramétereink vizsgálatát megelőzte a módszerfejlesztés folyamata, mely nagyon jól sikerült, ugyanis a linearitás, a within-run valamint a between run precizitás és pontosság paraméterei is, minden esetben az elfogadható tartományba kerültek. Az alsó mérési határok (LOQ) szövetenként és vegyületenként komoly mértékű eltéréseket mutattak ugyan, de egyik esetben sem haladták meg a három vegyület közül a legszigorúbb MRL érték (50 µg/kg) 25%-át, így elfogadhatónak nyilvánítottuk ezeket is. A stabilitás paraméteréről ez a széles körű elfogadhatóság már nem mondható el, mivel általánosságban azt állapítottuk meg, hogy sem a short-term, sem pedig a freeze-thaw stabilitás nem lett megfelelő. Tehát a vizsgálni kívánt mintáinkat nem javasolt több órán át kint hagyni a labor asztalon a mérés előtt, illetve, ha már egyszer egy mintát kivettünk a fagyasztóból akkor azt nem tanácsolt újra a fagyasztóba helyezni, ha már egyszer kivettük, végezzük is el annak mérését. A robusztusság tekintetében pedig azt állapítottuk meg, hogy a három apróbb változtatásunk közül, az eluens additív koncentrációjának a változtatására nem robusztus a módszer, míg az áramlási sebesség, valamint az ultrahangos rázatás idejének módosítására igenis az.

7. Irodalomjegyzék

- [1] M. de Mesquita Souza Saraiva és mtsai., „Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry”, *Braz. J. Microbiol.*, köt. 53, sz. 1, o. 465–486, márc. 2022, doi: 10.1007/s42770-021-00635-8.
- [2] 5 Editor, „FAO-OECD release meat outlook”. 2022. [Online]. Elérhető: <https://www.thepoultrysite.com/news/2022/07/fao-oecd-release-meat-outlook-for-2022-2031>
- [3] M. Tian és mtsai., „Pollution by Antibiotics and Antimicrobial Resistance in LiveStock and Poultry Manure in China, and Countermeasures”, *Antibiotics*, köt. 10, sz. 5, Art. sz. 5, máj. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10050539.
- [4] Andrei Niemimäki, „Házityúk kép”. Wikipédia, 2007. [Online]. Elérhető: https://hu.wikipedia.org/wiki/H%C3%A1zi_ty%C3%BAk#/media/F%C3%A1jl:Male_and_female_chicken_sitting_together.jpg
- [5] Központi Statisztikai Hivatal, „Az egy főre jutó éves élelmiszer fogyasztás”. 2020. [Online]. Elérhető: https://www.ksh.hu/stadat_files/jov/hu/jov0031.html
- [6] Központi Statisztikai Hivatal, „Vágóállat-termelés”. 2022. [Online]. Elérhető: https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0032.html
- [7] S. K. Mahlake, C. M. Mnisi, C. Kumanda, D. M. N. Mthiyane, és P. K. Montso, „Green Tea (*Camellia sinensis*) Products as Alternatives to Antibiotics in Poultry Nutrition: A Review”, *Antibiotics*, köt. 11, sz. 5, Art. sz. 5, máj. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11050565.
- [8] J. I. R. Castanon, „History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds”, *Poult. Sci.*, köt. 86, sz. 11, o. 2466–2471, nov. 2007, doi: 10.3382/ps.2007-00249.
- [9] I. Schmerold, I. van Geijlswijk, és R. Gehring, „European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, köt. 189, o. 106473, okt. 2023, doi: 10.1016/j.ejps.2023.106473.
- [10] Almashhadany, Mohammed, Muslat, Rashid, Hassan, Hassan, „Antimicrobial Residues in Meat and Meat Products”, in *Health Risks of Food Additives - Recent Developments and Trends in Food Sector [Working Title]*, IntechOpen, 2022. [Online]. Elérhető: <https://www.intechopen.com/online-first/82512>
- [11] S. A. McEwen és P. J. Collignon, „Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective”, *Microbiol. Spectr.*, köt. 6, sz. 2, o. 10.1128/microbiolspec.arba-0009–2017, márc. 2018, doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017.
- [12] H. M. Cervantes, „Antibiotic-free poultry production: Is it sustainable?”, *J. Appl. Poult. Res.*, köt. 24, sz. 1, o. 91–97, márc. 2015, doi: 10.3382/japr/pfv006.
- [13] Y. Panth, „Colibacillosis in poultry: A review”, *J. Agric. Nat. Resour.*, köt. 2, sz. 1, Art. sz. 1, okt. 2019, doi: 10.3126/janr.v2i1.26094.
- [14] M. E. Abd El-Hack és mtsai., „Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives - a comprehensive review”, *Poult. Sci.*, köt. 101, sz. 2, o. 101590, febr. 2022, doi: 10.1016/j.psj.2021.101590.
- [15] M. Gbylik-Sikorska és mtsai., „Influence of enrofloxacin traces in drinking water to doxycycline tissue pharmacokinetics in healthy and infected by *Mycoplasma gallisepticum* broiler chickens”, *Food Chem. Toxicol.*, köt. 90, o. 123–129, ápr. 2016, doi: 10.1016/j.fct.2016.02.006.
- [16] P. Gray, R. Jenner, J. Norris, S. Page, G. Browning, és Australian Veterinary Association Ltd and Animal Medicines Australia, „Antimicrobial prescribing guidelines for poultry”, *Aust. Vet. J.*, köt. 99, sz. 6, o. 181–235, jún. 2021, doi: 10.1111/avj.13034.

- [17] C. D. Iwu, L. Korsten, és A. I. Okoh, „The incidence of antibiotic resistance within and beyond the agricultural ecosystem: A concern for public health”, *MicrobiologyOpen*, köt. 9, sz. 9, o. e1035, szept. 2020, doi: 10.1002/mbo3.1035.
- [18] J. M. Munita és C. A. Arias, „Mechanisms of Antibiotic Resistance”, *Microbiol. Spectr.*, köt. 4, sz. 2, ápr. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- [19] T. Hasan és R. AL-Harmoosh, „Mechanisms of Antibiotics Resistance in Bacteria”, *Syst. Rev. Pharm.*, köt. 11, o. 817–823, jún. 2020, doi: 10.31838/srp.2020.6.118.
- [20] A. Pormohammad, M. J. Nasiri, és T. Azimi, „Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis”, *Infect. Drug Resist.*, köt. 12, o. 1181–1197, máj. 2019, doi: 10.2147/IDR.S201324.
- [21] Kourkouta, Tsaloglidou, Koukourikos, Iliadis, Plati, Dimitriadou, „History of Antibiotics”, *Sumerianz J. Med. Healthc.*, köt. Vol. 1, sz. No. 2, o. 51–54, 2018.
- [22] Jim E. Riviere, Mark G. Papich, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10. John Wiley & Sons, Inc., 2018.
- [23] M. Khan és T. K. Mandal, „Pharmacokinetics of Amoxicillin in Broiler Chicken Following a Single Oral Administration”, *Indian Journal of Animal Health*, 2017, Elérés: 2023. október 22. [Online]. Elérhető: <https://vbudspace.lsdiscovetry.in/xmlui/handle/123456789/5415>
- [24] National Center for Biotechnology Information, „Az amoxicillin szerkezete”. 2023. [Online]. Elérhető: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33613>
- [25] Akhavan BJ, Khanna NR, Vijhani P., „Amoxicillin”. StatPearls Publishing, 2022. [Online]. Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482250/>
- [26] M. Khatun és mtsai., „Residual effect of amoxicillin in broiler”, köt. 7, o. 51–58, szept. 2020, doi: 10.5281/zenodo.4063937.
- [27] B. Jubeh, Z. Breijyeh, és R. Karaman, „Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches”, *Molecules*, köt. 25, sz. 12, o. 2888, jún. 2020, doi: 10.3390/molecules25122888.
- [28] Pandey N, Cascella M., „Beta-Lactam Antibiotics”. StatPearls Publishing, 2023. [Online]. Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
- [29] A. Huttner és mtsai., „Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage”, *Clin. Microbiol. Infect.*, köt. 26, sz. 7, o. 871–879, júl. 2020, doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.028.
- [30] D. G. S. Burch és D. Sperling, „Amoxicillin—current use in swine medicine”, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, köt. 41, sz. 3, o. 356–368, 2018, doi: 10.1111/jvp.12482.
- [31] Tolnagro, „Amoxicillin készítmény”. 2019. [Online]. Elérhető: <http://mail.tolnagro.hu:7771/wbs2/data/cikk/leiras/900059.pdf>
- [32] Lavet Gyógyszeripari Kft., „Amoxyn készítmény”. 2019. [Online]. Elérhető: <https://vitamed.hu/wp-content/uploads/2020/02/Amoxyn.pdf>
- [33] EMEA, „Penicillin MRL”. 2008. [Online]. Elérhető: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/penicillins-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf?fbclid=IwAR1w-KznE005s8vcmJhHlXo_rifXOqTDr4kldXxRFyd9Qq0hfJmsKMldLPQ
- [34] E. Burow és mtsai., „Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Broiler Chickens After Amoxicillin Treatment in an Experimental Environment”, *Microb. Drug Resist.*, köt. 26, sz. 9, o. 1098–1107, szept. 2020, doi: 10.1089/mdr.2019.0442.
- [35] National Center for Biotechnology Information, „Az enrofloxacin szerkezete”. 2023. [Online]. Elérhető: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71188>
- [36] National Center for Biotechnology Information, „A ciprofloxacin szerkezete”. 2023. [Online]. Elérhető: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764>

- [37] Ł. Grabowski és mtsai., „Enrofloxacin—The Ruthless Killer of Eukaryotic Cells or the Last Hope in the Fight against Bacterial Infections?”, *Int. J. Mol. Sci.*, köt. 23, sz. 7, o. 3648, márc. 2022, doi: 10.3390/ijms23073648.
- [38] G. J. Khan, R. Khan, I. Majeed, F. Siddiqui, és S. Khan, „Ciprofloxacin; the Frequent Use in Poultry and Its Consequences on Human Health”, *Prof. Med. J.*, köt. 22, o. 1–5, jan. 2015, doi: 10.29309/TPMJ/2015.22.01.1403.
- [39] European Commission, „Enrofloxacin Annexes”. 2014. [Online]. Elérhető: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140228127398/anx_127398_hu.pdf
- [40] EMA, „Enrofloxacin MRL”. 2002. [Online]. Elérhető: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-extension-all-food-producing-species-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal_en.pdf
- [41] M. P. Hermo, J. Saurina, J. Barbosa, és D. Barrón, „High-resolution mass spectrometry applied to the study of metabolome modifications in various chicken tissues after amoxicillin administration”, *Food Chem.*, köt. 153, o. 405–413, jún. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.080.
- [42] B. Aslam és mtsai., „Determination of Enrofloxacin Residues in Commercial Broilers Using High Performance Liquid Chromatography”, *Int. J. Food Prop.*, köt. 19, sz. 11, o. 2463–2470, nov. 2016, doi: 10.1080/10942912.2015.1027922.
- [43] P. H. N. Panzenhagen és mtsai., „Investigation of enrofloxacin residues in broiler tissues using ELISA and LC-MS/MS”, *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, köt. 33, sz. 4, o. 639–643, 2016, doi: 10.1080/19440049.2016.1143566.
- [44] Z. Dr. Szaller, „Kalibrálás, kvalifikálás, validálás”, előadás TOX2018 Tudományos Konferencia, 2018. [Online]. Elérhető: https://www.hungariantoxicologists.hu/wp-content/uploads/2018/10/P1-3_Szaller_Z_Kalibralas_kvalifikalas_validalas_2018_GLP.pdf?fbclid=IwAR0FHrb7kCHDgiMcldCmbNng9BjfyBi-2W2-moXI6CZRBP-9XtmUvQt8VQk
- [45] EMA, „VICH GL49 Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation analytical methods used depletion studies - Scientific guideline”. 2018. szeptember 17. Elérés: 2023. október 25. [Online]. Elérhető: <https://www.ema.europa.eu/en/vich-gl49-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals>

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a témavezetőmnek Dr. Lányi Katalinnak, illetve Dr. Süth Miklós Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tették a kutatásom létrejöttét, valamint a diplomamunkám elkészítését. Köszönöm az Élelmiszer-higiéniai laboratórium munkatársának, Lucsányi Georgina és Szita Mónika labortechnikusoknak, valamint Dr. Buzás Annának a rengeteg munkájukat és segítőkészségüket a kísérletünk során. Továbbá köszönöm Dr. László Noéminek, hogy támogatta a munkánkat több csomagnyi csirke farhát formájában, mely egy általa felügyelt Pest megyei baromfi vágóhídról származott. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Nagymamámnak, a házilag levágott egész házityúk mintát és a további vágásokból származó veséket.

I. Függelék – Részletes validálási paraméterek

Amoxicillin

Izomszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes izomszövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. Within run precizitás és pontosság izomszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 2,26 | 13,28 | 21,76 |
| | +2,0 | 2,32 | | |
| | +2,0 | 2,22 | | |
| | +6,0 | 7,31 | 9,41 | 12,64 |
| | +6,0 | 5,66 | | |
| | +6,0 | 6,73 | | |
| | +18,0 | 15,87 | -9,09 | 10,91 |
| | +18,0 | 14,75 | | |
| | +18,0 | 18,47 | | |
| | +100,0 | 96,24 | -5,78 | 7,97 |
| | +100,0 | 85,29 | | |
| | +100,0 | 101,13 | | |
| +800,0 | 731,23 | -3,17 | 5,23 | |
| +800,0 | 802,38 | | | |
| +800,0 | 790,21 | | | |
| 2 | +2,0 | 2,10 | 12,00 | 12,62 |
| | +2,0 | 2,14 | | |
| | +2,0 | 2,48 | | |
| | +6,0 | 6,09 | -14,19 | 16,87 |
| | +6,0 | 4,45 | | |
| | +6,0 | 4,90 | | |
| | +18,0 | 13,16 | -15,08 | 14,70 |
| | +18,0 | 17,59 | | |
| | +18,0 | 15,11 | | |
| | +100,0 | 88,84 | -10,12 | 5,38 |
| | +100,0 | 95,11 | | |
| | +100,0 | 85,70 | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | +800,0 | 832,48 | 2,74 | 9,22 |
| | +800,0 | 790,96 | | |
| | +800,0 | 842,26 | | |
| 3 | +2,0 | 1,87 | -2,58 | 11,81 |
| | +2,0 | 2,03 | | |
| | +2,0 | 1,95 | | |
| | +6,0 | 5,57 | 8,41 | 15,05 |
| | +6,0 | 7,33 | | |
| | +6,0 | 6,62 | | |
| | +18,0 | 15,05 | -15,09 | 9,27 |
| | +18,0 | 14,15 | | |
| | +18,0 | 16,66 | | |
| | +100,0 | 113,44 | 6,13 | 8,77 |
| | +100,0 | 94,51 | | |
| | +100,0 | 110,43 | | |
| | +800,0 | 820,12 | -4,65 | 8,52 |
| | +800,0 | 689,89 | | |
| | +800,0 | 778,42 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes izomszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

5. táblázat. *Between run precizitás és pontosság izomszövet esetében, amoxicillin vegyülettel*

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | 7,59 | 17,20 |
| +6 | 1,21 | 17,91 |
| +18 | -13,09 | 11,82 |
| +100 | -3,26 | 10,35 |
| +800 | -1,70 | 8,29 |

Stabilitás a mátrixban

A short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 6. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten

hagyott izomszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

6. táblázat Short-term stabilitás izomszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ% |
|------------------------|--|---|------------|
| +18,0 | 15,82 | 11,45 | -91,94 |
| | 19,06 | 7,41 | |
| | 20,59 | 13,13 | |
| Átlag | 18,49 | 10,66 | |
| Szórás | 2,44 | 2,94 | |
| RSD (%) | 13,17 | 27,57 | |
| +100 | 113,09 | 8,50 | -42,41 |
| | 109,20 | 10,30 | |
| | 118,09 | 8,65 | |
| Átlag | 113,46 | 9,15 | |
| Szórás | 4,46 | 1,00 | |
| RSD (%) | 3,93 | 10,92 | |
| +800 | 756,43 | 436,65 | -77,99 |
| | 788,21 | 462,72 | |
| | 788,48 | 444,21 | |
| Átlag | 777,71 | 447,86 | |
| Szórás | 18,42 | 13,41 | |
| RSD (%) | 2,37 | 2,99 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 7. táblázat eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

7. táblázat Freeze-thaw stabilitás izomszövet esetében amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ% |
|------------------------|--|--|------------|
| +18,0 | 15,36 | 2,94 | -77,99 |
| | 16,52 | 3,51 | |
| | 15,09 | 3,89 | |
| Átlag | 15,66 | 3,45 | |
| Szórás | 0,76 | 0,48 | |
| RSD (%) | 4,85 | 13,87 | |

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ% |
|------------------------|--|--|------------|
| +100 | 89,65 | 33,05 | -66,73 |
| | 91,25 | 30,76 | |
| | 96,52 | 28,48 | |
| Átlag | 92,47 | 30,76 | |
| Szórás | 3,59 | 2,29 | |
| RSD (%) | 3,89 | 7,43 | |
| +800 | 701,74 | 73,27 | -89,59 |
| | 695,36 | 69,83 | |
| | 682,15 | 73,37 | |
| Átlag | 693,08 | 72,16 | |
| Szórás | 9,99 | 2,02 | |
| RSD (%) | 1,44 | 2,79 | |

Robusztusság

A 8. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

8. táblázat Robusztusság izomszövet esetében amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 75.867 | 81.928 | 48.971 | 70.328 |
| | 79.376 | 86.920 | 53.819 | 70.616 |
| | 74.715 | 91.137 | 49.475 | 73.077 |
| Átlag terület | 76.653 | 86.662 | 50.755 | 71.340 |
| Szórás | 2.428 | 4.610 | 2.665 | 1.511 |
| RSD% | 3,17 | 5,32 | 5,25 | 2,12 |
| Δ% | | 13,06 | -33,79 | -6,93 |

Májszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes májzsövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

9. táblázat Within-run pontosság és precizitás májzsövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 2,13 | 2,44 | 4,83 |
| | +2,0 | 2,05 | | |
| | +2,0 | 1,97 | | |
| | +6,0 | 6,11 | -0,46 | 9,88 |
| | +6,0 | 6,07 | | |
| | +6,0 | 5,74 | | |
| | +18,0 | 14,11 | -17,27 | 11,68 |
| | +18,0 | 13,61 | | |
| | +18,0 | 16,95 | | |
| | +100,0 | 81,83 | -12,75 | 8,29 |
| | +100,0 | 85,64 | | |
| | +100,0 | 94,29 | | |
| | +800,0 | 676,67 | -12,55 | 3,37 |
| | +800,0 | 695,33 | | |
| +800,0 | 726,79 | | | |
| 2 | +2,0 | 2,14 | 6,50 | 8,32 |
| | +2,0 | 2,10 | | |
| | +2,0 | 2,15 | | |
| | +6,0 | 5,97 | -2,69 | 10,03 |
| | +6,0 | 5,91 | | |
| | +6,0 | 5,63 | | |
| | +18,0 | 17,20 | -13,94 | 9,82 |
| | +18,0 | 14,32 | | |
| | +18,0 | 14,95 | | |
| | +100,0 | 98,97 | -7,22 | 8,74 |
| | +100,0 | 95,16 | | |
| | +100,0 | 84,21 | | |
| | +800,0 | 682,39 | -18,43 | 9,32 |
| | +800,0 | 668,05 | | |
| +800,0 | 607,32 | | | |
| 3 | +2,0 | 2,09 | -3,11 | 10,96 |
| | +2,0 | 1,78 | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | +2,0 | 1,95 | | |
| | +6,0 | 5,70 | -3,50 | 6,67 |
| | +6,0 | 5,76 | | |
| | +6,0 | 5,91 | | |
| | +18,0 | 16,71 | -13,90 | 10,11 |
| | +18,0 | 16,05 | | |
| | +18,0 | 13,74 | | |
| | +100,0 | 90,85 | -9,64 | 6,17 |
| | +100,0 | 85,00 | | |
| | +100,0 | 95,22 | | |
| | +800,0 | 718,80 | -10,96 | 4,70 |
| | +800,0 | 714,82 | | |
| | +800,0 | 703,25 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes májszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

10. táblázat. Between run precizitás és pontosság májszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | 1,94 | 8,91 |
| +6 | -2,22 | 8,77 |
| +18 | -15,04 | 10,30 |
| +100 | -9,87 | 7,94 |
| +800 | -13,98 | 7,03 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a májszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az amoxicillin esetében májszövetben a LOD értéke 2,96 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét amoxicillin esetében májszövetben mely 12,57 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

A short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 12. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott májszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

11. táblázat Short-term stabilitás májszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|-------------------------------|---|--|--------------------|
| +18,0 | 16,84 | 3,69 | -85,07 |
| | 19,65 | 1,75 | |
| | 17,55 | 2,63 | |
| Átlag | 18,01 | 2,69 | |
| Szórás | 1,46 | 0,97 | |
| RSD (%) | 8,11 | 36,11 | |
| +100 | 109,51 | 19,25 | -85,47 |
| | 99,54 | 12,27 | |
| | 108,38 | 14,59 | |
| Átlag | 105,81 | 15,37 | |
| Szórás | 5,46 | 3,55 | |
| RSD (%) | 5,16 | 23,13 | |
| +800 | 812,27 | 51,56 | -93,77 |
| | 807,07 | 48,99 | |
| | 764,01 | 47,97 | |
| Átlag | 794,45 | 49,51 | |
| Szórás | 26,49 | 1,85 | |
| RSD (%) | 3,33 | 3,74 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 13. táblázat eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

12. táblázat Freeze-thaw stabilitás májszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 16,26 | 1,40 | -84,82 |
| | 16,06 | 4,08 | |
| | 15,90 | 1,84 | |
| Átlag | 16,07 | 2,44 | |
| Szórás | 0,18 | 1,44 | |
| RSD (%) | 1,12 | 58,90 | |
| +100 | 108,52 | 9,49 | -91,84 |
| | 107,77 | 7,77 | |
| | 106,81 | 9,11 | |
| Átlag | 107,70 | 8,79 | |
| Szórás | 0,86 | 0,90 | |
| RSD (%) | 0,80 | 10,28 | |
| +800 | 744,76 | 31,09 | -96,15 |
| | 755,13 | 27,73 | |
| | 777,43 | 28,93 | |
| Átlag | 759,11 | 29,25 | |
| Szórás | 16,69 | 1,70 | |
| RSD (%) | 2,20 | 5,82 | |

Robusztusság

A 14. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben májszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

13. táblázat Robusztusság májszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 81.698 | 92.834 | 199.984 | 83.016 |
| | 76.206 | 79.236 | 220.336 | 81.184 |
| | 79.518 | 90.894 | 243.496 | 99.984 |
| Átlag terület | 79.141 | 87.655 | 221.272 | 88.061 |
| Szórás | 2.765 | 7.355 | 21.771 | 10.366 |
| RSD% | 3,49 | 8,39 | 9,84 | 11,77 |
| Δ% | | 10,76 | 179,59 | 11,27 |

Veseszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes veseszövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

15. táblázat Within-run pontosság és precizitás veseszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 2,44 | 14,83 | 7,48 |
| | +2,0 | 2,25 | | |
| | +2,0 | 2,20 | | |
| | +6,0 | 5,38 | 8,48 | 14,55 |
| | +6,0 | 7,01 | | |
| | +6,0 | 7,14 | | |
| | +18,0 | 15,55 | -10,80 | 9,40 |
| | +18,0 | 17,16 | | |
| | +18,0 | 15,46 | | |
| | +100,0 | 84,83 | -11,42 | 8,68 |
| | +100,0 | 98,52 | | |
| | +100,0 | 82,39 | | |
| +800,0 | 788,78 | -2,29 | 2,05 | |
| +800,0 | 762,09 | | | |
| +800,0 | 794,13 | | | |
| 2 | +2,0 | 2,19 | 5,50 | 10,59 |
| | +2,0 | 2,21 | | |
| | +2,0 | 1,93 | | |
| | +6,0 | 6,23 | -1,87 | 8,13 |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | +6,0 | 5,78 | -3,00 | 6,48 |
| | +6,0 | 5,66 | | |
| | +18,0 | 17,52 | | |
| | +18,0 | 18,04 | | |
| | +18,0 | 16,82 | -11,82 | 9,15 |
| | +100,0 | 82,78 | | |
| | +100,0 | 85,79 | | |
| | +100,0 | 95,97 | 3,61 | 6,18 |
| | +800,0 | 790,46 | | |
| | +800,0 | 870,62 | | |
| +800,0 | 825,58 | | | |
| 3 | +2,0 | 2,21 | 12,78 | 10,56 |
| | +2,0 | 2,13 | | |
| | +2,0 | 2,43 | | |
| | +6,0 | 6,62 | 5,28 | 9,48 |
| | +6,0 | 6,70 | | |
| | +6,0 | 5,63 | | |
| | +18,0 | 15,15 | -9,55 | 13,47 |
| | +18,0 | 18,64 | | |
| | +18,0 | 15,06 | | |
| | +100,0 | 104,00 | 7,85 | 7,57 |
| | +100,0 | 110,39 | | |
| | +100,0 | 109,17 | | |
| | +800,0 | 822,46 | 6,22 | 2,89 |
| | +800,0 | 873,65 | | |
| +800,0 | 853,07 | | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes veseszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

16. táblázat. Between run precizitás és pontosság veseszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | 11,04 | 9,92 |
| +6 | 3,96 | 11,64 |
| +18 | -7,78 | 10,38 |
| +100 | -5,13 | 12,75 |
| +800 | 2,51 | 5,34 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a veseszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az amoxicillin esetében veseszövetben a LOD értéke 6,72 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét amoxicillin esetében veseszövetben mely 12,34 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 17. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott veseszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

17. táblázat Short-term stabilitás veseszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +18,0 | 16,59 | 16,22 | -15,71 |
| | 21,17 | 17,03 | |
| | 19,59 | 15,09 | |
| Átlag | 19,12 | 16,11 | |
| Szórás | 2,33 | 0,97 | |
| RSD (%) | 12,17 | 6,05 | |
| +100 | 103,82 | 29,50 | -73,41 |
| | 110,36 | 28,92 | |
| | 114,00 | 28,85 | |
| Átlag | 109,39 | 29,09 | |
| Szórás | 5,16 | 0,36 | |
| RSD (%) | 4,72 | 1,23 | |
| +800 | 738,27 | 33,43 | -95,62 |
| | 785,41 | 31,83 | |
| | 763,16 | 34,82 | |
| Átlag | 762,28 | 33,36 | |
| Szórás | 23,58 | 1,50 | |
| RSD (%) | 3,09 | 4,49 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 18. táblázat eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett veseszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

18. táblázat Freeze-thaw stabilitás veseszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 19,74 | 5,40 | -72,14 |
| | 18,65 | 5,28 | |
| | 17,56 | 4,91 | |
| Átlag | 18,65 | 5,20 | |
| Szórás | 1,09 | 0,26 | |
| RSD (%) | 5,84 | 4,91 | |
| +100 | 97,02 | 29,11 | -67,79 |
| | 90,99 | 29,90 | |
| | 88,84 | 30,17 | |
| Átlag | 92,28 | 29,73 | |
| Szórás | 4,24 | 0,55 | |
| RSD (%) | 4,60 | 1,85 | |
| +800 | 823,02 | 180,42 | -76,35 |
| | 766,37 | 184,27 | |
| | 728,35 | 183,46 | |
| Átlag | 772,58 | 182,72 | |
| Szórás | 47,64 | 2,03 | |
| RSD (%) | 6,17 | 1,11 | |

Robusztusság

A 19. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben veseszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

19. táblázat Robusztusság veseszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 93.087 | 104.896 | 39.697 | 93.455 |
| | 89.953 | 111.361 | 41.382 | 105.609 |
| | 88.497 | 94.466 | 40.790 | 97.536 |
| Átlag terület | 90.512 | 103.574 | 40.623 | 98.867 |
| Szórás | 2.346 | 8.525 | 855 | 6.185 |
| RSD% | 2,59 | 8,23 | 2,10 | 6,26 |
| Δ% | | 14,43 | -55,12 | -9,23 |

Zsírszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes zsírszövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

20. táblázat Within-run pontosság és precizitás zsírszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 2,13 | 17,83 | 11,62 |
| | +2,0 | 2,35 | | |
| | +2,0 | 2,59 | | |
| | +6,0 | 6,30 | 9,54 | 8,83 |
| | +6,0 | 6,91 | | |
| | +6,0 | 6,51 | | |
| | +18,0 | 19,02 | -5,94 | 11,72 |
| | +18,0 | 16,95 | | |
| | +18,0 | 14,83 | | |
| | +100,0 | 110,90 | 8,11 | 3,35 |
| | +100,0 | 108,06 | | |
| | +100,0 | 105,37 | | |
| +800,0 | 861,31 | 4,81 | 3,86 | |
| +800,0 | 821,35 | | | |
| +800,0 | 832,29 | | | |
| 2 | +2,0 | 2,27 | 8,94 | 11,58 |
| | +2,0 | 2,04 | | |
| | +2,0 | 2,22 | | |
| | +6,0 | 5,93 | 3,22 | 8,79 |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | +6,0 | 6,25 | | |
| | +6,0 | 6,40 | | |
| | +18,0 | 15,69 | | |
| | +18,0 | 14,06 | -18,01 | 7,87 |
| | +18,0 | 14,53 | | |
| | +100,0 | 94,47 | | |
| | +100,0 | 99,29 | -4,77 | 4,20 |
| | +100,0 | 91,93 | | |
| | +800,0 | 754,62 | | |
| | +800,0 | 719,05 | -9,00 | 3,11 |
| +800,0 | 710,41 | | | |
| 3 | +2,0 | 2,11 | 1,83 | 17,94 |
| | +2,0 | 2,29 | | |
| | +2,0 | 1,72 | | |
| | +6,0 | 5,53 | 5,81 | 14,51 |
| | +6,0 | 7,20 | | |
| | +6,0 | 6,31 | | |
| | +18,0 | 13,82 | -23,30 | 11,98 |
| | +18,0 | 15,26 | | |
| | +18,0 | 12,34 | | |
| | +100,0 | 105,90 | -0,50 | 5,24 |
| | +100,0 | 95,03 | | |
| | +100,0 | 97,56 | | |
| | +800,0 | 823,12 | 2,31 | 6,98 |
| | +800,0 | 827,54 | | |
| +800,0 | 804,88 | | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes zsírszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

21. táblázat. Between run precizitás és pontosság zsírszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | 9,54 | 14,55 |
| +6 | 6,19 | 10,89 |
| +18 | -15,75 | 13,58 |
| +100 | 0,95 | 6,80 |
| +800 | -0,62 | 7,84 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a zsírszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az amoxicillin esetében zsírszövetben a LOD értéke 2,05 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét amoxicillin esetében zsírszövetben mely 4,62 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 22. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott zsírszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

22. táblázat Short-term stabilitás zsírszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +18,0 | 17,41 | 8,43 | -48,90 |
| | 17,29 | 8,56 | |
| | 16,59 | 9,22 | |
| Átlag | 17,10 | 8,74 | |
| Szórás | 0,44 | 0,42 | |
| RSD (%) | 2,59 | 4,85 | |
| +100 | 115,11 | 10,36 | -90,99 |
| | 111,45 | 9,30 | |
| | 110,92 | 10,76 | |
| Átlag | 112,49 | 10,14 | |
| Szórás | 2,28 | 0,75 | |
| RSD (%) | 2,03 | 7,44 | |
| +800 | 823,58 | 453,25 | -44,91 |
| | 845,60 | 454,46 | |
| | 819,76 | 463,36 | |
| Átlag | 829,65 | 457,02 | |
| Szórás | 13,95 | 5,52 | |
| RSD (%) | 1,68 | 1,21 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 23. táblázat eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett zsírszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

23. táblázat Freeze-thaw stabilitás zsírszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 18,97 | 13,10 | -23,05 |
| | 19,24 | 14,94 | |
| | 15,88 | 13,58 | |
| Átlag | 18,03 | 13,87 | |
| Szórás | 1,87 | 0,95 | |
| RSD (%) | 10,35 | 6,88 | |
| +100 | 103,52 | 22,74 | -78,56 |
| | 105,02 | 22,99 | |
| | 105,41 | 21,58 | |
| Átlag | 104,65 | 22,44 | |
| Szórás | 1,00 | 0,75 | |
| RSD (%) | 0,95 | 3,35 | |
| +800 | 767,26 | 466,61 | -39,52 |
| | 764,04 | 453,16 | |
| | 767,29 | 470,44 | |
| Átlag | 766,20 | 463,40 | |
| Szórás | 1,87 | 9,08 | |
| RSD (%) | 0,24 | 1,96 | |

Robusztusság

A 24. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben zsírszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

24. táblázat Robusztusság zsírszövet esetében, amoxicillin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 91.152 | 78.929 | 62.040 | 89.940 |
| | 98.323 | 83.601 | 59.863 | 88.722 |
| | 94.438 | 79.481 | 61.811 | 90.335 |
| Átlag terület | 94.638 | 80.670 | 61.238 | 89.666 |
| Szórás | 3.590 | 2.553 | 1.196 | 841 |
| RSD% | 3,79 | 3,16 | 1,95 | 0,94 |
| Δ% | | -14,76 | -35,29 | -5,25 |

II. Függelék – Részletes validálási paraméterek

Ciprofloxacín

Izomszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes izomszövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

25. táblázat. Within run precizitás és pontosság izomszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 1,66 | -14,06 | 5,55 |
| | +2,0 | 1,76 | | |
| | +2,0 | 1,73 | | |
| | +6,0 | 5,63 | 12,98 | 13,35 |
| | +6,0 | 7,42 | | |
| | +6,0 | 7,29 | | |
| | +18,0 | 18,83 | 9,16 | 7,38 |
| | +18,0 | 18,78 | | |
| | +18,0 | 21,34 | | |
| | +100,0 | 96,79 | 4,61 | 9,08 |
| | +100,0 | 100,15 | | |
| | +100,0 | 116,90 | | |
| | +800,0 | 852,81 | 5,05 | 2,49 |
| | +800,0 | 845,87 | | |
| | +800,0 | 822,61 | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 2 | +2,0 | 1,89 | -6,94 | 2,91 |
| | +2,0 | 1,81 | | |
| | +2,0 | 1,88 | | |
| | +6,0 | 6,06 | -3,93 | 22,77 |
| | +6,0 | 7,10 | | |
| | +6,0 | 4,13 | | |
| | +18,0 | 16,65 | -4,77 | 3,87 |
| | +18,0 | 17,84 | | |
| | +18,0 | 16,93 | | |
| | +100,0 | 86,60 | -7,35 | 5,58 |
| | +100,0 | 94,15 | | |
| | +100,0 | 97,18 | | |
| | +800,0 | 742,22 | -5,53 | 6,89 |
| | +800,0 | 745,62 | | |
| | +800,0 | 779,45 | | |
| 3 | +2,0 | 1,92 | -13,22 | 10,50 |
| | +2,0 | 1,62 | | |
| | +2,0 | 1,67 | | |
| | +6,0 | 5,97 | 10,26 | 9,65 |
| | +6,0 | 7,38 | | |
| | +6,0 | 6,50 | | |
| | +18,0 | 18,74 | 5,77 | 4,78 |
| | +18,0 | 19,97 | | |
| | +18,0 | 18,40 | | |
| | +100,0 | 98,88 | -6,26 | 4,50 |
| | +100,0 | 91,87 | | |
| | +100,0 | 90,47 | | |
| | +800,0 | 739,13 | -8,77 | 3,86 |
| | +800,0 | 700,28 | | |
| | +800,0 | 750,17 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes izomszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

26. táblázat. *Between run* precizitás és pontosság izomszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|--|------------------------------|-------------------------------|
| +2 | -11,41 | 7,59 |
| +6 | 6,44 | 16,52 |
| +18 | 3,39 | 8,00 |
| +100 | -3,00 | 8,73 |
| +800 | -3,08 | 7,66 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek az izomszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely a ciprofloxacín esetében izomszövetben a LOD értéke $2,87 \mu\text{g}/\text{kg}$.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét ciprofloxacín esetében izomszövetben mely $8,88 \mu\text{g}/\text{kg}$ lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 27. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott izomszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

27. táblázat *Short-term* stabilitás izomszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Friss minták mért koncentrációja ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Eltérés $\Delta\%$: |
|---|---|--|-------------------------|
| +18,0 | 13,30 | 2,54 | -86,63 |
| | 18,38 | 1,99 | |
| | 19,57 | 2,32 | |
| Átlag | 17,08 | 2,28 | |
| Szórás | 3,33 | 0,28 | |
| RSD (%) | 19,49 | 12,12 | |

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahón töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +100 | 100,10 | 18,18 | -82,35 |
| | 99,69 | 17,92 | |
| | 98,12 | 16,49 | |
| Átlag | 99,30 | 17,53 | |
| Szórás | 1,05 | 0,91 | |
| RSD (%) | 1,05 | 5,19 | |
| +800 | 765,34 | 318,84 | -59,93 |
| | 769,89 | 302,96 | |
| | 780,32 | 305,96 | |
| Átlag | 771,85 | 309,25 | |
| Szórás | 7,68 | 8,44 | |
| RSD (%) | 1,00 | 2,73 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 28. táblázat eredményei azt mutatják, hogy a 18 µg/kg-os minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, azonban a másik két nagyobb koncentrációt tartalmazó minta, nem mondható stabilnak ebben a kísérletben, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

28. táblázat Freeze-thaw stabilitás izomszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 16,76 | 15,11 | -12,06 |
| | 17,45 | 15,00 | |
| | 18,02 | 15,82 | |
| Átlag | 17,41 | 15,31 | |
| Szórás | 0,63 | 0,45 | |
| RSD (%) | 3,62 | 2,91 | |
| +100 | 109,90 | 42,12 | -61,07 |
| | 107,08 | 42,48 | |
| | 110,75 | 42,98 | |
| Átlag | 109,24 | 42,53 | |
| Szórás | 1,92 | 0,43 | |
| RSD (%) | 1,76 | 1,02 | |

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +800 | 798,44 | 257,76 | -68,54 |
| | 841,09 | 249,26 | |
| | 805,77 | 262,31 | |
| Átlag | 815,10 | 256,44 | |
| Szórás | 22,80 | 6,62 | |
| RSD (%) | 2,80 | 2,58 | |

Robusztusság

A 29. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások eseténként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

29. táblázat Robusztusság izomszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 1.281.784 | 1.312.896 | 892.427 | 1.327.171 |
| | 1.281.049 | 1.446.414 | 979.147 | 1.353.824 |
| | 1.284.871 | 1.465.439 | 987.494 | 1.331.484 |
| Átlag terület | 1.282.568 | 1.408.250 | 953.023 | 1.337.493 |
| Szórás | 2.028 | 83.125 | 52.643 | 14.307 |
| RSD% | 0,16 | 5,90 | 5,25 | 1,07 |
| Δ% | | 9,80 | -25,69 | 4,28 |

Májszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta.

Az összes májszövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

30. táblázat. *Within run* precizitás és pontosság májszövet esetében, ciprofloxacin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1. | +2,0 | 1,96 | -1,06 | 4,94 |
| | +2,0 | 1,92 | | |
| | +2,0 | 2,05 | | |
| | +6,0 | 5,70 | -0,13 | 5,26 |
| | +6,0 | 6,32 | | |
| | +6,0 | 5,96 | | |
| | +18,0 | 17,27 | -2,78 | 4,89 |
| | +18,0 | 18,52 | | |
| | +18,0 | 16,71 | | |
| | +100,0 | 96,46 | 2,38 | 4,64 |
| | +100,0 | 105,79 | | |
| | +100,0 | 104,90 | | |
| +800,0 | 824,31 | 5,86 | 3,16 | |
| +800,0 | 872,72 | | | |
| +800,0 | 843,71 | | | |
| 2 | +2,0 | 2,17 | 11,22 | 7,14 |
| | +2,0 | 2,10 | | |
| | +2,0 | 2,40 | | |
| | +6,0 | 5,60 | -1,20 | 10,15 |
| | +6,0 | 6,14 | | |
| | +6,0 | 6,05 | | |
| | +18,0 | 19,42 | -9,79 | 1,88 |
| | +18,0 | 16,18 | | |
| | +18,0 | 17,35 | | |
| | +100,0 | 109,21 | 2,91 | 5,56 |
| | +100,0 | 96,64 | | |
| | +100,0 | 102,89 | | |
| +800,0 | 809,56 | 4,22 | 4,35 | |
| +800,0 | 812,61 | | | |
| +800,0 | 879,21 | | | |
| 3 | +2,0 | 2,13 | 10,17 | 12,98 |
| | +2,0 | 2,55 | | |
| | +2,0 | 1,93 | | |
| | +6,0 | 5,97 | -4,59 | 6,06 |
| | +6,0 | 5,88 | | |
| | +6,0 | 5,32 | | |
| | +18,0 | 16,15 | -9,79 | 1,88 |
| | +18,0 | 16,15 | | |
| +18,0 | 16,42 | | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | +100,0 | 107,34 | 9,13 | 3,51 |
| | +100,0 | 106,31 | | |
| | +100,0 | 113,73 | | |
| | +800,0 | 844,94 | 4,30 | 5,35 |
| | +800,0 | 783,11 | | |
| | +800,0 | 875,09 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes májszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

31. táblázat. Between run precizitás és pontosság májszövet esetében, ciprofloxacin vegyülettel

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | 6,78 | 10,33 |
| +6 | -1,98 | 7,46 |
| +18 | -4,84 | 7,71 |
| +100 | 4,81 | 5,34 |
| +800 | 4,80 | 4,26 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek az májszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely a ciprofloxacin esetében májszövetben a LOD értéke 1,87 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét ciprofloxacin esetében májszövetben mely 3,97 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 32. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták közül a +18 µg/kg és a +100 µg/kg koncentrációjú májszövet minták szobahőmérsékleten stabilnak bizonyultak. A 800 µg/kg-os minta mely 4 órán át szobahőmérsékleten volt hagyva, illetve a kontroll minták koncentrációja közötti különbség viszont jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%. Tehát ez utóbbi esetében nem megállapítható a stabilitás.

32. táblázat Short-term stabilitás májszövet minták esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +18,0 | 19,77 | 17,59 | -9,56 |
| | 18,65 | 17,40 | |
| | 18,99 | 16,93 | |
| Átlag | 19,14 | 17,31 | |
| Szórás | 0,57 | 0,34 | |
| RSD (%) | 3,00 | 1,96 | |
| +100 | 110,66 | 93,12 | -13,29 |
| | 106,53 | 94,12 | |
| | 109,64 | 96,14 | |
| Átlag | 108,94 | 94,46 | |
| Szórás | 2,15 | 1,54 | |
| RSD (%) | 1,97 | 1,63 | |
| +800 | 812,92 | 429,81 | -45,99 |
| | 824,71 | 439,33 | |
| | 783,16 | 438,24 | |
| Átlag | 806,93 | 435,79 | |
| Szórás | 21,41 | 5,21 | |
| RSD (%) | 2,65 | 1,20 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 33. táblázat eredményei azt mutatják, hogy a 100 µg/kg-os és a 800 µg/kg-os minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében. Viszont a 18 µg/kg-os minta a kontroll mintához hasonlóan, több mint 15%-os eltérést mutat, így ezt nem lehet stabilnak nevezni.

33. táblázat Freeze-thaw stabilitás májszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 19,48 | 15,72 | -19,40 |
| | 20,77 | 15,77 | |
| | 17,54 | 15,09 | |
| Átlag | 19,26 | 15,53 | |
| Szórás | 1,63 | 0,38 | |
| RSD (%) | 8,44 | 2,44 | |
| +100 | 105,87 | 102,72 | -1,58 |
| | 104,54 | 101,30 | |
| | 105,62 | 107,03 | |
| Átlag | 105,34 | 103,68 | |
| Szórás | 0,71 | 2,98 | |
| RSD (%) | 0,67 | 2,88 | |
| +800 | 789,60 | 921,59 | 2,14 |
| | 908,62 | 899,51 | |
| | 1000,73 | 935,60 | |
| Átlag | 899,65 | 918,90 | |
| Szórás | 105,85 | 18,19 | |
| RSD (%) | 11,77 | 1,98 | |

Robusztusság

A 34. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

34. táblázat Robusztusság májszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 1.368.769 | 1.135.735 | 1.049.862 | 1.390.831 |
| | 1.331.765 | 1.121.157 | 1.049.270 | 1.264.038 |
| | 1.283.185 | 1.149.268 | 1.037.635 | 1.290.101 |
| Átlag terület | 1.327.906 | 1.135.387 | 1.045.589 | 1.314.990 |
| Szórás | 42.922 | 14.059 | 6.895 | 66.961 |
| RSD% | 3,23 | 1,24 | 0,66 | 5,09 |
| Δ% | | -14,50 | -21,26 | -0,97 |

Veseszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes veseszövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

35. táblázat. Within run precizitás és pontosság veseszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 1,95 | -7,61 | 8,00 |
| | +2,0 | 1,67 | | |
| | +2,0 | 1,93 | | |
| | +6,0 | 7,06 | 13,43 | 3,39 |
| | +6,0 | 6,66 | | |
| | +6,0 | 6,70 | | |
| | +18,0 | 17,69 | -11,54 | 8,88 |
| | +18,0 | 15,11 | | |
| | +18,0 | 14,96 | | |
| | +100,0 | 100,05 | -0,48 | 2,31 |
| | +100,0 | 97,37 | | |
| | +100,0 | 101,14 | | |
| +800,0 | 789,53 | -8,39 | 7,70 | |
| +800,0 | 664,56 | | | |
| +800,0 | 744,50 | | | |
| 2 | +2,0 | 1,94 | -0,94 | 5,97 |
| | +2,0 | 1,97 | | |
| | +2,0 | 2,03 | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run | |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|-------|
| | +6,0 | 6,05 | 4,78 | 11,69 | |
| | +6,0 | 5,65 | | | |
| | +6,0 | 7,16 | | | |
| | | +18,0 | 15,54 | -8,74 | 6,88 |
| | | +18,0 | 15,90 | | |
| | | +18,0 | 17,85 | | |
| | | +100,0 | 91,95 | -12,81 | 9,79 |
| | | +100,0 | 76,78 | | |
| | | +100,0 | 92,85 | | |
| | | +800,0 | 741,12 | -0,98 | 9,32 |
| | | +800,0 | 747,93 | | |
| +800,0 | | 887,54 | | | |
| 3 | +2,0 | 1,92 | -12,72 | 9,71 | |
| | +2,0 | 1,62 | | | |
| | +2,0 | 1,70 | | | |
| | | +6,0 | 6,23 | 5,46 | 8,88 |
| | | +6,0 | 6,99 | | |
| | | +6,0 | 5,77 | | |
| | | +18,0 | 19,62 | 6,20 | 12,36 |
| | | +18,0 | 16,22 | | |
| | | +18,0 | 21,50 | | |
| | | +100,0 | 104,77 | 8,11 | 4,17 |
| | | +100,0 | 107,12 | | |
| | | +100,0 | 112,43 | | |
| | | +800,0 | 819,80 | 0,95 | 3,25 |
| | | +800,0 | 798,74 | | |
| +800,0 | | 804,39 | | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes veseszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

36. táblázat. Between run precizitás és pontosság veseszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | 7,09 | 9,25 |
| +6 | 7,89 | 8,97 |
| +18 | -4,69 | 12,72 |
| +100 | -1,73 | 10,52 |
| +800 | -2,80 | 8,08 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a veseszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása, mely a ciprofloxacín esetében, veseszövetben a LOD értéke 2,21 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét ciprofloxacín esetében veseszövetben mely 4,52 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 37. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a 18 µg/kg-os minta szobahőmérsékleten stabilnak bizonyult. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott 100 µg/kg-os és 800 µg/kg-os veseszövet minták koncentrációja közötti különbség viszont jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%, így ezeket nem lehetett stabilnak megállapítani.

37. táblázat Short-term stabilitás veseszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +18,0 | 17,09 | 19,37 | -1,59 |
| | 21,90 | 19,81 | |
| | 20,86 | 19,72 | |
| Átlag | 19,95 | 19,63 | |
| Szórás | 2,53 | 0,23 | |
| RSD (%) | 12,69 | 1,18 | |
| +100 | 94,72 | 61,68 | -36,92 |
| | 100,67 | 61,79 | |
| | 98,20 | 61,73 | |
| Átlag | 97,86 | 61,73 | |
| Szórás | 2,99 | 0,06 | |
| RSD (%) | 3,05 | 0,09 | |
| +800 | 829,52 | 177,95 | -78,38 |
| | 803,49 | 172,88 | |
| | 830,41 | 181,82 | |
| Átlag | 821,14 | 177,55 | |
| Szórás | 15,29 | 4,48 | |
| RSD (%) | 1,86 | 2,53 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk A 38. táblázat eredményei azt mutatják, hogy minden minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében.

38. táblázat Freeze-thaw stabilitás veseszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 17,61 | 15,06 | -12,30 |
| | 16,67 | 15,05 | |
| | 16,94 | 14,81 | |
| Átlag | 17,07 | 14,97 | |
| Szórás | 0,48 | 0,14 | |
| RSD (%) | 2,83 | 0,95 | |
| +100 | 97,65 | 77,95 | -13,59 |
| | 104,44 | 85,67 | |
| | 95,72 | 93,71 | |
| Átlag | 99,27 | 85,78 | |
| Szórás | 4,58 | 7,88 | |
| RSD (%) | 4,61 | 9,19 | |
| +800 | 805,68 | 701,13 | -10,23 |
| | 775,96 | 727,72 | |
| | 802,60 | 711,60 | |
| Átlag | 794,75 | 713,48 | |
| Szórás | 16,34 | 13,39 | |
| RSD (%) | 2,06 | 1,88 | |

Robusztusság

A 39. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

39. táblázat Robusztusság veseszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 1.162.423 | 1.110.432 | 466.185 | 1.184.341 |
| | 1.165.862 | 1.111.848 | 456.328 | 1.283.531 |
| | 1.216.606 | 1.058.088 | 457.078 | 1.248.283 |
| Átlag terület | 1.181.630 | 1.093.456 | 459.864 | 1.238.718 |
| Szórás | 30.339 | 30.638 | 5.487 | 50.282 |
| RSD% | 2,57 | 2,80 | 1,19 | 4,06 |
| Δ% | | -7,46 | -61,08 | 4,83 |

Zsírshószövet

A within-run és a between run precízitás és pontosság

A within-run precízitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes zsírshószövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precízitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

40. táblázat. Within run precízitás és pontosság zsírshószövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precízitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 2,16 | 13,28 | 5,61 |
| | +2,0 | 2,30 | | |
| | +2,0 | 2,34 | | |
| | +6,0 | 7,24 | 7,83 | 9,49 |
| | +6,0 | 5,92 | | |
| | +6,0 | 6,25 | | |
| | +18,0 | 17,91 | 4,29 | 4,61 |
| | +18,0 | 19,78 | | |
| | +18,0 | 18,62 | | |
| | +100,0 | 95,43 | 2,70 | 5,40 |
| | +100,0 | 106,98 | | |
| | +100,0 | 105,67 | | |
| +800,0 | 795,01 | 2,29 | 3,27 | |
| +800,0 | 850,51 | | | |
| +800,0 | 809,51 | | | |
| 2 | +2,0 | 2,07 | 1,94 | 3,44 |
| | +2,0 | 2,00 | | |
| | +2,0 | 2,05 | | |
| | +6,0 | 6,32 | 10,59 | 5,08 |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | +6,0 | 6,99 | | |
| | +6,0 | 6,60 | | |
| | +18,0 | 20,00 | | |
| | +18,0 | 19,24 | 5,50 | 5,68 |
| | +18,0 | 17,72 | | |
| | +100,0 | 115,47 | | |
| | +100,0 | 107,20 | 5,81 | 8,56 |
| | +100,0 | 94,75 | | |
| | +800,0 | 865,63 | | |
| | +800,0 | 846,77 | 4,58 | 3,79 |
| +800,0 | 797,50 | | | |
| 3 | +2,0 | 1,73 | -6,11 | 8,54 |
| | +2,0 | 1,99 | | |
| | +2,0 | 1,91 | | |
| | +6,0 | 5,83 | 4,29 | 4,61 |
| | +6,0 | 7,24 | | |
| | +6,0 | 6,43 | | |
| | +18,0 | 18,50 | 3,35 | 6,34 |
| | +18,0 | 17,34 | | |
| | +18,0 | 19,97 | | |
| | +100,0 | 106,53 | 9,99 | 5,38 |
| | +100,0 | 105,83 | | |
| | +100,0 | 117,60 | | |
| | +800,0 | 738,53 | -6,30 | 3,03 |
| | +800,0 | 768,65 | | |
| | +800,0 | 741,68 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes zsírszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

41. táblázat. Between run precizitás és pontosság zsírszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | 3,04 | 9,79 |
| +6 | 8,91 | 8,04 |
| +18 | 4,38 | 5,43 |
| +100 | 6,16 | 6,97 |
| +800 | 0,19 | 5,78 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a zsírszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az amoxicillin esetében zsírszövetben a LOD értéke 1,50 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét ciprofloxacin esetében zsírszövetben mely 6,34 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 42. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták közül szobahőmérsékleten csak a 18 µg/kg-os minták bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott 2 nagyobb koncentrációjú zsírszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%, így ezeket nem lehetett stabilnak nevezni.

42. táblázat Short-term stabilitás zsírszövet esetében, ciprofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +18,0 | 17,23 | 16,63 | -4,80 |
| | 17,86 | 16,97 | |
| | 18,01 | 16,95 | |
| Átlag | 17,70 | 16,85 | |
| Szórás | 0,41 | 0,19 | |
| RSD (%) | 2,34 | 1,13 | |
| +100 | 108,94 | 22,64 | -79,87 |
| | 110,03 | 21,96 | |
| | 109,87 | 21,58 | |
| Átlag | 109,61 | 22,06 | |
| Szórás | 0,59 | 0,54 | |
| RSD (%) | 0,54 | 2,43 | |
| +800 | 796,54 | 312,14 | -60,25 |
| | 775,94 | 312,37 | |
| | 781,57 | 311,30 | |
| Átlag | 784,68 | 311,94 | |
| Szórás | 10,65 | 0,56 | |
| RSD (%) | 1,36 | 0,18 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 43. táblázat eredményei azt mutatják, hogy a 800 µg/kg-os minta bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett minták esetében, a másik két alacsonyabb koncentrációt tartalmazó minta esetében nem tapasztaltunk megfelelő stabilitást, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

43. táblázat Freeze-thaw stabilitás zsírszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 17,86 | 12,77 | -27,95 |
| | 17,29 | 12,62 | |
| | 17,70 | 12,69 | |
| Átlag | 17,62 | 12,69 | |
| Szórás | 0,29 | 0,08 | |
| RSD (%) | 1,67 | 0,59 | |
| +100 | 103,35 | 71,93 | -28,21 |
| | 104,16 | 73,74 | |
| | 98,08 | 73,71 | |
| Átlag | 101,86 | 73,13 | |
| Szórás | 3,30 | 1,04 | |
| RSD (%) | 3,24 | 1,42 | |
| +800 | 796,74 | 757,97 | 1,06 |
| | 755,25 | 797,96 | |
| | 761,61 | 782,12 | |
| Átlag | 771,20 | 779,35 | |
| Szórás | 22,35 | 20,14 | |
| RSD (%) | 2,90 | 2,58 | |

Robusztusság

A 44. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

44. táblázat Robusztusság zsírszövet esetében, ciprofloxacín vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 1.241.830 | 1.119.600 | 651.005 | 1.070.045 |
| | 1.247.225 | 1.084.601 | 628.869 | 1.113.496 |
| | 1.247.230 | 1.096.886 | 621.736 | 1.058.828 |
| Átlag terület | 1.245.428 | 1.100.362 | 633.870 | 1.080.790 |
| Szórás | 3.116 | 17.757 | 15.262 | 28.874 |
| RSD% | 0,25 | 1,61 | 2,41 | 2,67 |
| Δ% | | -11,65 | -49,10 | -13,22 |

III. Függelék – Részletes validálási paraméterek

Enrofloxacin

Izomszövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes izomszövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

45. táblázat Within-run pontosság és precizitás izomszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 1,81 | 2,78 | 17,07 |
| | +2,0 | 1,90 | | |
| | +2,0 | 2,45 | | |
| | +6,0 | 6,21 | 12,61 | 7,60 |
| | +6,0 | 7,07 | | |
| | +6,0 | 6,99 | | |
| | +18,0 | 17,70 | -4,73 | 6,42 |
| | +18,0 | 15,85 | | |
| | +18,0 | 17,89 | | |
| | +100,0 | 102,10 | -2,62 | 5,85 |
| | +100,0 | 98,30 | | |
| | +100,0 | 91,75 | | |
| | +800,0 | 691,84 | -4,39 | 8,08 |
| | +800,0 | 821,56 | | |
| | +800,0 | 781,16 | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 2 | +2,0 | 2,06 | 18,00 | 14,98 |
| | +2,0 | 2,61 | | |
| | +2,0 | 2,41 | | |
| | +6,0 | 7,16 | 18,69 | 10,38 |
| | +6,0 | 6,27 | | |
| | +6,0 | 7,93 | | |
| | +18,0 | 17,05 | -6,86 | 4,71 |
| | +18,0 | 16,59 | | |
| | +18,0 | 16,66 | | |
| | +100,0 | 100,64 | -3,36 | 4,94 |
| | +100,0 | 93,13 | | |
| | +100,0 | 96,14 | | |
| | +800,0 | 728,17 | -8,17 | 5,12 |
| | +800,0 | 754,90 | | |
| | +800,0 | 720,97 | | |
| 3 | +2,0 | 2,39 | 19,17 | 16,79 |
| | +2,0 | 2,58 | | |
| | +2,0 | 2,19 | | |
| | +6,0 | 6,42 | -1,93 | 9,27 |
| | +6,0 | 5,54 | | |
| | +6,0 | 5,69 | | |
| | +18,0 | 17,70 | -8,85 | 9,13 |
| | +18,0 | 16,44 | | |
| | +18,0 | 15,09 | | |
| | +100,0 | 85,30 | -13,84 | 4,58 |
| | +100,0 | 85,10 | | |
| | +100,0 | 88,09 | | |
| | +800,0 | 787,03 | -9,00 | 8,91 |
| | +800,0 | 740,06 | | |
| | +800,0 | 656,97 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes izomszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

46. táblázat. *Between run* precizitás és pontosság izomszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|--|------------------------------|-------------------------------|
| +2 | 13,31 | 17,02 |
| +6 | 9,79 | 11,96 |
| +18 | -6,81 | 6,93 |
| +100 | -6,60 | 7,50 |
| +800 | -7,19 | 7,58 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek az izomszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az enrofloxacin esetében izomszövetben a LOD értéke $1,68 \mu\text{g}/\text{kg}$.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét az enrofloxacin esetében izomszövetben mely $4,71 \mu\text{g}/\text{kg}$ lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 48. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott izomszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

47. táblázat Short-term stabilitás izomszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Friss minták mért koncentrációja ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Eltérés $\Delta\%$: |
|---|---|--|-------------------------|
| +18,0 | 18,11 | 7,19 | -65,69 |
| | 19,33 | 4,54 | |
| | 16,22 | 6,68 | |
| Átlag | 17,89 | 6,14 | |
| Szórás | 1,57 | 1,41 | |
| RSD (%) | 8,76 | 22,91 | |

| Elméleti konc. ($\mu\text{g/kg}$) | Friss minták mért koncentrációja ($\mu\text{g/kg}$) | 4 órát szobahón töltött minták koncentrációja ($\mu\text{g/kg}$) | Eltérés $\Delta\%$: |
|-------------------------------------|---|--|----------------------|
| +100 | 109,28 | 8,01 | -91,94 |
| | 106,64 | 8,69 | |
| | 108,07 | 9,40 | |
| Átlag | 108,00 | 8,70 | |
| Szórás | 1,32 | 0,70 | |
| RSD (%) | 1,22 | 7,99 | |
| +800 | 793,74 | 352,63 | -55,78 |
| | 822,27 | 360,43 | |
| | 805,02 | 357,64 | |
| Átlag | 807,01 | 356,90 | |
| Szórás | 14,37 | 3,95 | |
| RSD (%) | 1,78 | 1,11 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 48. táblázat eredményei azt mutatják, hogy a 18 $\mu\text{g/kg}$ -os minta bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett izomszövet minták esetében. míg a másik két nagyobb koncentrációjú minta esetében nem tapasztaltunk stabilitást, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

48. táblázat Freeze-thaw stabilitás izomszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. ($\mu\text{g/kg}$) | Friss minták mért koncentrációja ($\mu\text{g/kg}$) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja ($\mu\text{g/kg}$) | Eltérés $\Delta\%$: |
|-------------------------------------|---|---|----------------------|
| +18,0 | 18,81 | 18,27 | -2,90 |
| | 17,78 | 18,50 | |
| | 19,26 | 17,46 | |
| Átlag | 18,62 | 18,08 | |
| Szórás | 0,76 | 0,55 | |
| RSD (%) | 4,08 | 3,02 | |
| +100 | 102,31 | 25,74 | -75,54 |
| | 102,67 | 24,87 | |
| | 111,65 | 26,83 | |
| Átlag | 105,54 | 25,81 | |
| Szórás | 5,29 | 0,98 | |
| RSD (%) | 5,01 | 3,80 | |

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +800 | 802,90 | 221,42 | -70,47 |
| | 811,92 | 226,49 | |
| | 782,32 | 260,04 | |
| Átlag | 799,05 | 235,98 | |
| Szórás | 15,17 | 20,99 | |
| RSD (%) | 1,90 | 8,89 | |

Robusztusság

A 49. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben izomszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

49. táblázat Robusztusság izomszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 792.454 | 721.744 | 566.471 | 737.446 |
| | 815.256 | 833.460 | 592.227 | 730.266 |
| | 852.774 | 800.991 | 637.811 | 733.379 |
| Átlag terület | 820.161 | 785.398 | 598.836 | 733.697 |
| Szórás | 30.458 | 57.467 | 36.126 | 3.601 |
| RSD% | 3,71 | 7,32 | 6,03 | 0,49 |
| Δ% | | -4,24 | -26,99 | -10,54 |

Májzsövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes májzsövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

50. táblázat Within-run pontosság és precizitás májzsövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 1,74 | -10,39 | 6,86 |
| | +2,0 | 1,79 | | |
| | +2,0 | 1,85 | | |
| | +6,0 | 5,16 | -13,17 | 13,64 |
| | +6,0 | 5,94 | | |
| | +6,0 | 4,54 | | |
| | +18,0 | 16,70 | -6,13 | 8,27 |
| | +18,0 | 17,91 | | |
| | +18,0 | 16,08 | | |
| | +100,0 | 89,41 | -9,11 | 6,70 |
| | +100,0 | 87,92 | | |
| | +100,0 | 95,34 | | |
| | +800,0 | 708,33 | -11,94 | 7,14 |
| | +800,0 | 713,10 | | |
| +800,0 | 692,09 | | | |
| 2 | +2,0 | 1,91 | -3,56 | 8,27 |
| | +2,0 | 1,95 | | |
| | +2,0 | 1,92 | | |
| | +6,0 | 5,67 | -9,07 | 12,11 |
| | +6,0 | 5,58 | | |
| | +6,0 | 5,12 | | |
| | +18,0 | 18,18 | 2,67 | 7,30 |
| | +18,0 | 18,49 | | |
| | +18,0 | 18,77 | | |
| | +100,0 | 98,12 | -4,05 | 7,91 |
| | +100,0 | 94,07 | | |
| | +100,0 | 95,66 | | |
| | +800,0 | 781,46 | -5,99 | 7,03 |
| | +800,0 | 766,65 | | |
| +800,0 | 708,22 | | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 3 | +2,0 | 1,77 | -10,61 | 5,19 |
| | +2,0 | 1,80 | | |
| | +2,0 | 1,79 | | |
| | +6,0 | 5,23 | -12,67 | 8,28 |
| | +6,0 | 5,11 | | |
| | +6,0 | 5,39 | | |
| | +18,0 | 14,29 | -12,80 | 13,41 |
| | +18,0 | 15,35 | | |
| | +18,0 | 17,45 | | |
| | +100,0 | 95,28 | -9,69 | 7,66 |
| | +100,0 | 85,70 | | |
| | +100,0 | 89,94 | | |
| | +800,0 | 779,48 | -7,37 | 8,88 |
| | +800,0 | 664,58 | | |
| | +800,0 | 779,09 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes májszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

51. táblázat. *Between run precizitás és pontosság májszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel*

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | -8,19 | 7,62 |
| +6 | -11,64 | 11,31 |
| +18 | -5,42 | 11,56 |
| +100 | -7,62 | 7,69 |
| +800 | -8,43 | 7,96 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a májszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az enrofloxacin esetében májszövetben a LOD értéke 1,36 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét az enrofloxacin esetében májszövetben mely 4,36 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 52. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a 18 µg/kg-os minták szobahőmérsékleten stabilnak bizonyultak. A két másik nagyobb koncentrációjú mintákat a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott kontroll májszövet minták koncentrációjával összehasonlítva a különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%, vagyis azok a minták nem nevezhetők stabilnak.

52. táblázat Short-term stabilitás májszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +18,0 | 18,69 | 16,39 | -13,84 |
| | 17,93 | 15,97 | |
| | 19,07 | 15,62 | |
| Átlag | 18,56 | 15,99 | |
| Szórás | 0,58 | 0,39 | |
| RSD (%) | 3,13 | 2,41 | |
| +100 | 99,87 | 84,44 | -17,12 |
| | 100,72 | 81,64 | |
| | 99,98 | 83,04 | |
| Átlag | 100,19 | 83,04 | |
| Szórás | 0,46 | 1,40 | |
| RSD (%) | 0,46 | 1,69 | |
| +800 | 772,81 | 337,12 | -52,71 |
| | 740,93 | 375,27 | |
| | 766,74 | 366,00 | |
| Átlag | 760,16 | 359,46 | |
| Szórás | 16,93 | 19,90 | |
| RSD (%) | 2,23 | 5,54 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 53. táblázat eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak, a háromszor lefagyasztott és kiengedett májszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

53. táblázat Freeze-thaw stabilitás májszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 17,24 | 11,73 | -38,98 |
| | 19,19 | 11,54 | |
| | 20,01 | 11,17 | |
| Átlag | 18,81 | 11,48 | |
| Szórás | 1,42 | 0,28 | |
| RSD (%) | 7,56 | 2,48 | |
| +100 | 107,43 | 86,89 | -18,04 |
| | 107,61 | 88,17 | |
| | 105,03 | 87,26 | |
| Átlag | 106,69 | 87,44 | |
| Szórás | 1,44 | 0,66 | |
| RSD (%) | 1,35 | 0,75 | |
| +800 | 798,46 | 558,60 | -36,50 |
| | 814,56 | 491,78 | |
| | 829,91 | 500,97 | |
| Átlag | 814,30 | 517,12 | |
| Szórás | 15,74 | 36,22 | |
| RSD (%) | 1,93 | 7,00 | |

Robusztusság

A 54. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben májszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

54. táblázat Robusztusság májszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 820.865 | 687.346 | 1.043.897 | 692.321 |
| | 800.671 | 684.563 | 1.093.616 | 700.471 |
| | 751.596 | 708.406 | 1.131.651 | 708.149 |
| Átlag terület | 791.044 | 693.438 | 1.089.721 | 700.314 |
| Szórás | 35.624 | 13.037 | 44.006 | 7.915 |
| RSD% | 4,50 | 1,88 | 4,04 | 1,13 |
| Δ% | | -12,34 | 37,76 | -11,47 |

Vesezövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes vesezövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

55. táblázat Within-run pontosság és precizitás vesezövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 1,88 | -9,39 | 12,94 |
| | +2,0 | 1,68 | | |
| | +2,0 | 1,88 | | |
| | +6,0 | 5,92 | -4,28 | 5,41 |
| | +6,0 | 5,71 | | |
| | +6,0 | 5,60 | | |
| | +18,0 | 16,84 | -7,67 | 5,01 |
| | +18,0 | 17,04 | | |
| | +18,0 | 15,98 | | |
| | +100,0 | 98,71 | 2,28 | 6,81 |
| | +100,0 | 98,98 | | |
| | +100,0 | 109,15 | | |
| | +800,0 | 816,37 | -0,17 | 3,46 |
| | +800,0 | 763,06 | | |
| | +800,0 | 816,48 | | |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 2 | +2,0 | 1,86 | -3,39 | 8,55 |
| | +2,0 | 1,82 | | |
| | +2,0 | 2,12 | | |
| | +6,0 | 5,59 | -5,46 | 3,88 |
| | +6,0 | 5,76 | | |
| | +6,0 | 5,66 | | |
| | +18,0 | 14,05 | -13,73 | 8,59 |
| | +18,0 | 16,77 | | |
| | +18,0 | 15,77 | | |
| | +100,0 | 92,16 | -8,26 | 9,89 |
| | +100,0 | 88,45 | | |
| | +100,0 | 94,61 | | |
| | +800,0 | 681,43 | -6,31 | 7,76 |
| | +800,0 | 753,71 | | |
| | +800,0 | 813,53 | | |
| 3 | +2,0 | 1,87 | -6,17 | 9,45 |
| | +2,0 | 1,72 | | |
| | +2,0 | 2,04 | | |
| | +6,0 | 5,82 | -4,67 | 6,18 |
| | +6,0 | 5,59 | | |
| | +6,0 | 5,75 | | |
| | +18,0 | 17,54 | -7,38 | 7,01 |
| | +18,0 | 15,54 | | |
| | +18,0 | 16,94 | | |
| | +100,0 | 86,91 | -7,20 | 9,07 |
| | +100,0 | 93,12 | | |
| | +100,0 | 98,36 | | |
| | +800,0 | 829,28 | -1,64 | 7,77 |
| | +800,0 | 761,27 | | |
| | +800,0 | 770,00 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes veseszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

56. táblázat. *Between run* precizitás és pontosság veseszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|--|------------------------------|-------------------------------|
| +2 | -6,31 | 10,34 |
| +6 | -4,80 | 5,07 |
| +18 | -9,59 | 7,45 |
| +100 | -4,39 | 9,66 |
| +800 | -2,71 | 6,89 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a veseszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az enrofloxacin esetében veseszövetben a LOD értéke $2,99 \mu\text{g}/\text{kg}$.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét az enrofloxacin esetében veseszövetben mely $5,61 \mu\text{g}/\text{kg}$ lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 57. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott veseszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

57. táblázat *Short-term* stabilitás veseszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Friss minták mért koncentrációja ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Eltérés $\Delta\%$: |
|---|---|--|-------------------------|
| +18,0 | 18,36 | 6,45 | -59,47 |
| | 18,80 | 8,46 | |
| | 18,97 | 7,95 | |
| | Átlag | 18,80 | |
| Szórás | 0,17 | 1,04 | |
| RSD (%) | 0,90 | 13,71 | |

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +100 | 96,55 | 60,97 | -37,04 |
| | 98,51 | 60,74 | |
| | 96,49 | 61,85 | |
| Átlag | 97,18 | 61,19 | |
| Szórás | 1,15 | 0,59 | |
| RSD (%) | 1,18 | 0,96 | |
| +800 | 813,66 | 233,86 | -71,49 |
| | 803,20 | 232,78 | |
| | 803,63 | 223,48 | |
| Átlag | 806,83 | 230,04 | |
| Szórás | 5,92 | 5,71 | |
| RSD (%) | 0,73 | 2,48 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. Az 58. táblázat eredményei azt mutatják, hogy a 100 µg/kg-os minta stabilnak bizonyult a háromszor lefagyasztott és kiengedett veseszövet minták esetében. Azonban a 18 µg/kg-os és a 800 µg/kg-os minta nem nevezhető stabilnak, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

58. táblázat Freeze-thaw stabilitás veseszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 17,41 | 14,93 | -22,27 |
| | 18,24 | 14,02 | |
| | 19,13 | 13,63 | |
| Átlag | 18,26 | 14,19 | |
| Szórás | 0,86 | 0,67 | |
| RSD (%) | 4,71 | 4,70 | |
| +100 | 103,67 | 106,40 | 0,60 |
| | 106,75 | 104,77 | |
| | 103,05 | 104,18 | |
| Átlag | 104,49 | 105,12 | |
| Szórás | 1,98 | 1,15 | |
| RSD (%) | 1,90 | 1,09 | |

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +800 | 798,25 | 693,47 | -19,28 |
| | 840,51 | 704,00 | |
| | 915,59 | 664,43 | |
| Átlag | 851,45 | 687,30 | |
| Szórás | 59,43 | 20,49 | |
| RSD (%) | 6,98 | 2,98 | |

Robusztusság

A 59. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben veseszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

59. táblázat Robusztusság veseszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 736.524 | 714.198 | 226.989 | 641.959 |
| | 798.381 | 697.863 | 217.306 | 699.715 |
| | 859.780 | 694.460 | 216.924 | 731.467 |
| Átlag terület | 798.228 | 702.174 | 220.406 | 691.047 |
| Szórás | 61.628 | 10.551 | 5.704 | 45.379 |
| RSD% | 7,72 | 1,50 | 2,59 | 6,57 |
| Δ% | | -12,03 | -72,39 | -13,43 |

Zsírsvövet

A within-run és a between run precizitás és pontosság

A within-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes zsírsvövet minta elemzését azonos napon végeztük. A precizitás és pontosság

értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait a 2. táblázat tartalmazza.

60. táblázat Within-run pontosság és precizitás zsírszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. | +2,0 | 2,03 | -1,44 | 12,31 |
| | +2,0 | 1,76 | | |
| | +2,0 | 2,12 | | |
| | +6,0 | 5,74 | -4,69 | 7,06 |
| | +6,0 | 5,46 | | |
| | +6,0 | 5,96 | | |
| | +18,0 | 18,32 | 2,77 | 8,85 |
| | +18,0 | 19,39 | | |
| | +18,0 | 17,79 | | |
| | +100,0 | 86,44 | -10,95 | 6,19 |
| | +100,0 | 94,78 | | |
| | +100,0 | 85,93 | | |
| | +800,0 | 766,16 | -4,34 | 5,45 |
| | +800,0 | 797,98 | | |
| +800,0 | 731,74 | | | |
| 2. | +2,0 | 1,97 | -12,11 | 13,00 |
| | +2,0 | 1,80 | | |
| | +2,0 | 1,51 | | |
| | +6,0 | 5,82 | -6,63 | 8,38 |
| | +6,0 | 5,62 | | |
| | +6,0 | 5,37 | | |
| | +18,0 | 17,48 | -1,97 | 10,90 |
| | +18,0 | 17,20 | | |
| | +18,0 | 18,25 | | |
| | +100,0 | 95,35 | -8,20 | 6,97 |
| | +100,0 | 94,58 | | |
| | +100,0 | 85,48 | | |
| | +800,0 | 810,91 | 2,14 | 2,78 |
| | +800,0 | 809,65 | | |
| +800,0 | 830,78 | | | |
| 3. | +2,0 | 2,22 | -2,11 | 12,86 |
| | +2,0 | 1,99 | | |
| | +2,0 | 1,66 | | |
| | +6,0 | 5,21 | -8,35 | 10,99 |
| | +6,0 | 6,14 | | |
| | +6,0 | 5,15 | | |
| | +18,0 | 17,76 | -4,35 | 6,40 |
| | +18,0 | 17,58 | | |
| | +18,0 | 16,31 | | |
| | +100,0 | 97,12 | -5,35 | 7,08 |

| Nap | Elméleti Koncentráció (µg/kg) | Átlag Koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Within run | Precizitás (%) Within run |
|-----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | +100,0 | 93,73 | | |
| | +100,0 | 93,11 | | |
| | +800,0 | 737,99 | | |
| | +800,0 | 752,86 | -4,64 | 7,27 |
| | +800,0 | 797,69 | | |

A between-run precizitás és pontosság vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. 9 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik koncentráció szintű mintából, naponta. Az összes zsírszövet minta elemzését 3 különböző napon végeztük. A precizitás és pontosság értékét minden koncentráció szinten meghatároztuk. A megfelelő tartomány kritériumait az 3. táblázat tartalmazza.

61. táblázat. Between run precizitás és pontosság zsírszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti koncentráció (µg/kg) | Pontosság (%) Between run | Precizitás (%) Between run |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| +2 | -5,22 | 13,30 |
| +6 | -6,56 | 8,71 |
| +18 | -1,18 | 9,12 |
| +100 | -8,17 | 6,99 |
| +800 | -2,28 | 6,12 |

A kritériumok mind a within run és a between run esetében is teljesültek a zsírszövet minták esetében.

A kimutatási határ (LOD)

A 3.4 bekezdés szerint történik a kiszámítása mely az enrofloxacin esetében zsírszövetben a LOD értéke 2,35 µg/kg.

A mérési határ (LOQ)

A 3.4 bekezdésben ismertetett módon számítottuk ki az értékét az enrofloxacin esetében zsírszövetben mely 3,41 µg/kg lett.

Stabilitás a mátrixban

Short-term stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 62. táblázatban szereplő eredmények, azt mutatják, hogy a minták szobahőmérsékleten nem

bizonyultak stabilnak. A kontroll minták koncentrációja és a 4 órán át szobahőmérsékleten hagyott zsírszövet minták koncentrációja közötti különbség jelentősen nagyobbak bizonyult mint 15%.

62. táblázat Short-term stabilitás zsírszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 4 órát szobahőn töltött minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|---|-------------|
| +18,0 | 17,80 | 9,82 | -41,41 |
| | 17,45 | 10,15 | |
| | 17,23 | 10,78 | |
| Átlag | 17,49 | 10,25 | |
| Szórás | 0,29 | 0,49 | |
| RSD (%) | 1,64 | 4,76 | |
| +100 | 96,17 | 56,01 | -43,42 |
| | 97,31 | 53,58 | |
| | 96,44 | 54,46 | |
| Átlag | 96,64 | 54,68 | |
| Szórás | 0,60 | 1,23 | |
| RSD (%) | 0,62 | 2,25 | |
| +800 | 808,73 | 200,28 | -75,32 |
| | 796,50 | 198,09 | |
| | 817,67 | 199,63 | |
| Átlag | 807,63 | 199,33 | |
| Szórás | 10,63 | 1,12 | |
| RSD (%) | 1,32 | 0,56 | |

A freeze-thaw stabilitás vizsgálatát a 3.5 alfejezetben részletezett megközelítéssel vizsgáltuk. A 63. táblázat eredményei azt mutatják, hogy egyik minta sem bizonyult stabilnak a háromszor lefagyasztott és kiengedett zsírszövet minták esetében, mert jelentősen nagyobb mennyiség elbomlott mint ami még tolerálható lenne.

63. táblázat Freeze-thaw stabilitás zsírszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +18,0 | 17,72 | 6,65 | -66,44 |
| | 18,66 | 5,89 | |
| | 18,03 | 5,72 | |
| Átlag | 18,14 | 6,09 | |
| Szórás | 0,48 | 0,50 | |
| RSD (%) | 2,64 | 8,14 | |

| Elméleti konc. (µg/kg) | Friss minták mért koncentrációja (µg/kg) | 3X lefagyasztott majd kiengedett minták koncentrációja (µg/kg) | Eltérés Δ%: |
|------------------------|--|--|-------------|
| +100 | 103,10 | 34,84 | -65,33 |
| | 98,19 | 35,54 | |
| | 104,39 | 35,59 | |
| Átlag | 101,89 | 35,23 | |
| Szórás | 3,27 | 0,42 | |
| RSD (%) | 3,21 | 1,19 | |
| +800 | 802,19 | 700,39 | -12,07 |
| | 824,23 | 697,70 | |
| | 771,05 | 709,39 | |
| Átlag | 799,16 | 702,69 | |
| Szórás | 26,72 | 6,46 | |
| RSD (%) | 3,34 | 0,92 | |

Robusztusság

A 64. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az eluens additív koncentrációját (2. változtatás) változtatva jelentősen megváltoztathatjuk a mérés eredményét. Azonban a másik két változtatás (1. áramlási sebesség változtatása, 3. ultrahangos rázatás idejének változtatása) esetében 15%-on belül maradt az eltérés, így ezen paramétereket változtatva nem kell számítanunk jelentős eltérésre az eredményekben zsírszövet esetében. A robusztusság tesztelése során végrehajtott változtatások esetenként módosították a vegyület retenciós idejét is, emiatt az eredeti körülmények között felvett kalibrációs egyenes nem lett volna használható. A helyzet megoldása érdekében a csúcsterületek közötti eltéréseket elemeztük, és ez alapján állapítottuk meg, hogy elfogadható-e az eredmény, vagy sem.

64. táblázat Robusztusság zsírszövet esetében, enrofloxacin vegyülettel

| Elméleti konc. (µg/kg) | Kontroll | 1. változtatás | 2. változtatás | 3. változtatás |
|------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg | 100 µg/kg |
| Terület | 776.686 | 644.154 | 232.794 | 684.425 |
| | 752.484 | 624.389 | 223.027 | 687.700 |
| | 708.794 | 668.414 | 211.670 | 697.782 |
| Átlag terület | 745.988 | 645.652 | 222.497 | 689.969 |
| Szórás | 34.409 | 22.051 | 10.572 | 6.962 |
| RSD% | 4,61 | 3,42 | 4,75 | 1,01 |
| Δ% | | -13,45 | -70,17 | -7,51 |