

## PËRCAKTIMI I VLEFSHMËRISË SË METODËS PËR PËRCAKTIMIN E MBETJEVE TË NIKARBAZINËS NË MËLÇI ME HPLC-DAD

ELMIRA MEHMETI.<sup>1</sup>, KOZETA VASO.<sup>2</sup>, SUZANA KOLA.<sup>1</sup>,  
JULIAN HOXHA.<sup>2</sup>, ENKELA BIBA.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamenti i Toksikologjisë dhe Monitorimit të Mbetjeve, Instituti i Sigurisë  
Ushqimore dhe Veterinarisë, Tiranë

<sup>2</sup>Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Kimisë  
e-mail: elmiramarku@hotmail.com

### Përmbledhje

Ky studim paraqet një metodë analitike shumë efektive për përcaktimin e komponimit dinitrokarbanilid 4, 4 të nikarbazinës të grupit të antikoksidialëve, i cili përdoret në trajtimin e pulave. Duke qenë se nikarbazina përdoret si shtesë në ushqimin e kafshëve vlerësimi i metodës do të kryhet në të gjitha mëlçitë e specieve, (pula, dele, dhi, derr dhe gjedhë) të cilat konsiderohen si ushqim për konsum human. Nikarbazina është një antikoksidial i cili lejohet të përdoret në pulat për rritje por janë vënë re edhe përdorime në specie të tjera. Mostrat e mëlçive janë ekstraktuar me acetonitril dhe ekstraktet e avulluar lahen me hekzan përpara analizimit me kromatografinë e lëngët me performancë të lartë e lidhur me DAD. Mostrat analizohen në kolonën Eclipse Plus C18 (150cm x 4 mm, 5µm) me eluent në kushte izokratike 50:50 acetonitril-bufer acetat në pH 4,5-4,6. Dedektimi UV i dinitrokarbanilidit 4,4 (DNC) së nikarbazinës kryhet në 350 nm. Metoda është vlerësuar sipas kriterëve të Bashkimit Europian për analizimin e mbetjeve të medikamenteve veterinarë në 150, 300 dhe 450 µg/kg për mëlçi të specieve të ndryshme. Për këtë testim mostrat e mëlçive janë marrë në dyqane të ndryshme dhe thertore të Tiranës. Rekuperimi mesatar i DNC-së për mostrat e ndotura është 108.1 % me një shmangie standarde prej 10.4 % dhe linearitet nga 10-500 µg/kg. Metoda e përshkruar përmbush të gjitha kriteret e rregullores 2002/657/EC dhi është e shpejtë dhe e lehtë për t'u aplikuar në analizat rutinë. Rezultatet e vlerësimit të metodës shprehen nga vlerat e vlerat e matura të CCα dhe CCβ, respektivisht 361,0 dhe 422,0 µg/kg. Kjo metodë që bazohet në analizimin me HPLC dhe dedektim UV paraqet një metodë alternative me spektrometrinë e masës duke siguruar kështu rezultate të kënaqshme përsa i takon selektivitet, koston dhe thjeshtësisë në aplikim.

**Fjalëkyçe:** Koksidiostatët, HPLC-DAD, nikarbazinë, mëlçi, vlerësimi i metodës.

### Abstract

In this study we represent a rapid and very effective analytical procedure for determination of one component 4,4-dinitrocarbanilidi of the anticoccidial drug nicarbazin, used to treat poultry. As nicarbazin can be used as additives in feed the test and validation will be performed in all liver species, (chicken, ovine, caprine, swine and bovine) which are consider food. Nicarbazine is an authorized coccidiostat that is used for fattening chickens but there are observed uses in other species. Liver samples were extracted with acetonitrile, and the evaporated extracts were washed with hexane before analysis by high performance liquid performance

with DAD. The column used is Eclipse Plus C18 (150cm x 4 mm, 5 $\mu$ m) with acetonitrile-acetate buffer (pH 4,5-4,6) as eluent in isocratic conditions. UV detection of the 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC) of nicarbazin was carried out at 350 nm. The method has been validated according to the EU criteria for the analysis of veterinary drug residues at 150, 300 and 450  $\mu$ g/kg in different liver species. For this test the liver samples were collected in stores in Tirana and in slaughterhouse. The mean recovery from DNC spiked samples was 108.1 % with a RSD of 10.4 % in a concentration range of linearity 10-500  $\mu$ g/kg. The method described meets all the criteria of Decision 2002/657/EC and is easy and fast to use in routine analysis. Validation results are presented with the measured CC $\alpha$  and CC $\beta$  values, 361.0 and 422.0 respectively. This method based on HPLC and UV detection represents a valid alternative to the mass-spectrometric determination ensuring good results in terms of selectivity, costs and simplicity.

**Key words:** Coccidiostats, HPLC-DAD, nicarbazin, liver, validation.

## Hyrje

Përdorimi i aditivëve në ushqimin për kafshë luan një rol të rëndësishëm në prodhimin shtazor në të gjithë botën. Aktualisht në BE janë të autorizuar për përdorim 11 substanca koksidiiale që lejohet të përdoren për parandalimin e koksidiozave në një apo më shumë specie kafshësh. Autorizimi jepet për një minimum dhe maksimum nivel përdorimi si aditiv në ushqimin për kafshë gjatë dietës ditore të tyre dhe mund të jepet për një specie apo kategori speciesh (një shembull tipik janë pulat për mish dhe pulat për mbarështim) dhe në disa raste jepet dhe periudha e degradimit si dhe përdorimit të tyre. Disa aditivë siç është nikarbazina (NIC) mund të përdoret për qëllime profilaktike apo terapeutike në parandalimin dhe trajtimin e koksidiozave. Legjislacioni shqiptar e lejon përdorimin e NIC vetëm për pulat për mish dhe jo për pulat për prodhim vezësh me qëllim që të ndalohet formimi i mbetjeve të tyre në vezë.

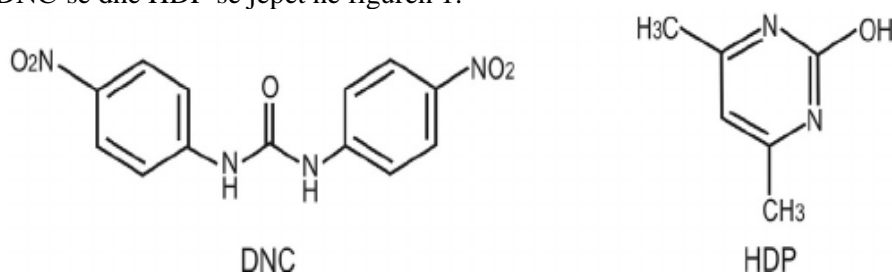
Nikarbazina përdoret në pula për të ndaluar koksidiozat, sëmundje infektive të shkaktuara nga parazitët e brendshëm të protozoarëve. Nikarbazina është jashtëzakonisht elektrostatische dhe ky është një faktor shumë i rëndësishëm në ndotjen edhe të ushqimeve (McEvoy *et al.*, 2003).

Për speciet e përmendura më sipër ligji parashikon një kohë degradimi të kësaj shtese ushqimore prej 5 ditësh para se të theret. Përdorimi nga njerëzit i sasive të vogla të lëndëve farmakologjike veterinare të pranishme në ushqimet me origjinë shtazore në formën e mbetjeve mund të shkaktojë probleme nga më të ndryshmet. Kjo është arsyeja pse është e nevojshme të kontrollohet përdorimi i saktë apo abuzimi me produkte të tilla siç është NIC pasi ka shumë mundësi të zhvillojë rezistencën ndaj koksidiialeve. Ndaj është e nevojshme që të përdoret në mënyrë korrekte dhe është më se e qartë rëndësia e kontroleve të vazhdueshme të produkteve me origjinë shtazore si vezët apo mëlçitë e pulave. Por një rëndësi të veçantë duhet t'i kushtohet dhe

produkteve të tjera të destinuara për ushqim human me qëllim që të monitorohen për përdorime të palejuara.

Nikarbazina reagon fillimisht duke penguar zhvillimin e nivelit të dytë të zigotës, dhe në një masë të vogël, nivelin e parë të ndarjes së zigotës të parazitit *Eimeria spp.* (McEvoy *et al.*, 2003). Efekti antikoksidial i nikarbazinës ndërmjetësohet në një masë të madhe nga absorbimi sistematik. DNC, por jo HDP, ka aktivitet antikoksidial kur përdoret vetëm kundrejt *Eimeria spp.* Potenciali veprues i DNC-së raportohet që rritet 10 herë kur është e kompleksuar me HDP-në në formën e nikarbazinës. Megjithatë nuk vihet re një rritje e aktivitetit antikoksidial me një përzierje të thjeshtë të dy komponimeve. Kompleksi formohet nga lidhjet hidrogjenore mes karbonil amidit dhe hidrogjeneve të aminës (Rogers *et al.*, 1983). Nikarbazina shkatërrohet pjesërisht në zorrë në DNC dhe HDP të cilat mund të absorbohen në mënyrë të pavarur. DNC përdoret si mbetje target për vlerësimin e sigurisë ushqimore sepse gjendet në nivele shumë më të larta se HDP-ja. DNC-ja përqendrohet kryesisht në mëlçi dhe veshkë që sekretohet fillimisht në feçe, ndërkohë që HDP-ja sekretohet në urinë (EFSA Journal. 2010). Koha e degradimit përpara therjes është 5 ditë (Council Directive 70/524/EEC).

Nikarbazina është një kompleks sintetik i përbërë në raportin molar 1:1 të DNC-së (4, 4' dinitrokarbanilidit me masë molekulare 300) me HDP-së (2-hidroksi 4, 6 dimetilpirimidinë me masë molekulare 112). Struktura kimike e DNC-së dhe HDP-së jepet në figurën 1.



**Figura 1** Struktura kimike e dinitrokarbanilid-4,4 (DNC) dhe hidroksi-2-dimetil-4,6-pirimidine HDP

Ky produkt është i autorizuar si koksidual në aditivët ushqimor për përdorim tek pulat për mish në një përqendrim maksimal 50 mg/kg në ushqimin total në qoftë se është në kombinim me narasinën (lista e plotë e aditivëve në ushqimin e kafshëve jepet e plotë të rregullorja 2004/EC 50/01. Përveç kërkesave të vëna në rregulloren e Bashkimit Europian Nr. 183/2005 pranohet se në praktikë gjatë përgatitjes së ushqimeve të përziera me këtë shtesë ushqimore, një përqindje e caktuar e ushqimit të përgatitur ngelet në zinxhirin e prodhimit, i cili mund të ndosë lote prodhimi të ushqimit të kafshëve të tjera që nuk kanë aplikimin e këtij medikamenti e për pasojë depozitimin e mbetjeve në këto specie.

## Materiali dhe metodat

Gjatë viteve janë aplikuar një sërë metodash analitike për përcaktimin sasior të mbetjeve të saj në indet e pulave. Që në fillim të viteve 1960 janë publikuar disa metoda analitike për përcaktimin e NIC. Metodot e para analitike (Skelly *et al.*, 1983) janë procedura spektrofotometrike me selektivitet dhe sensitivitet shumë të ulët krahasuar me metodat analitike të publikuara më vonë (Harbut *et al.*, 1985; Lewis *et al.*, 1989; Dusi *et al.*, 2000) që përdornin kromatografinë e lëngët me presion të lartë me dedektim ultraviolet. Sot edhe pse në shumë laboratorë aplikohen metodat shumëmbetjeve me një ndjeshmëri të lartë, përsëri aplikimi i metodave të thjeshta, mbetet efikas dhe me një performancë shumë të mirë. Të gjitha studimet janë kryer në mëlçi pule speciet e tjera të mëlçive nuk janë studiuar. Kjo e bën dhe unike e të veçantë këtë publikim, pasi kjo metodë përmbush të gjitha kërkesat e BE në rregullore CE 2002/657.

Duke qenë se në vlerësimin e metodës duhet të merren në konsideratë sa më shumë parametra dhe matrica për analizim studimi ynë nuk u kufizua vetëm në analizimin e mostrave të mëlçive të pulave, por morëm dhe të gjitha llojet e mëlçive të kafshëve që janë të destinuara për konsum human.

Mbledhja e mostrave u krye në disa nga dyqanet e mishit në qytetin e Tiranës, që furnizohen me mish nga e gjithë Shqipëria. Gjithsej u morën 10 mostra mëlçie në 10 dyqane mishi të ndryshme në mënyrë që mostrat të ishin sa më gjithëpërfshirëse.

## Materialë dhe reagentë

Reagentët acetonitril, metanol, acid acetik dhe acetat amoni ishin të firmave Prolabo, Ndërsa dimetiksulfoksidi nga Himedea. Standardi analitik i nikarbazinës është marrë nga Sigma. Tretësira mëmë e DNC përgatitet në dimetilsulfoksid në një përqendrim  $0.2 \text{ mg ml}^{-1}$ , ndërsa tretësirat standarde me përqendrim 1 dhe 10 ng/ml përgatiten në metanol dhe ruhen në  $-20^\circ\text{C}$ .

## Kushtet e LC-së

Instrumenti i përdorur për këtë qëllim është HPLC Agilent Technologies seria 1200 që përbëhet nga një pompë model 1200, autosampler dhe detektori DAD që operon në gjatësinë e valës 350 nm. Për matje aplikohet eluimi izokratik ku si fazë lëvizëse aplikohet acetonitrili me tretësirën buferike të acetatit të amonit me pH 4.4-4.5. Prurja është 1 ml/min me qëllim që të ndahen analiti në kolonën analitike Eclipse Plus C18 (150cm x 4 mm,  $5\mu\text{m}$ ). Temperatura e kolonës mbahet në  $25^\circ\text{C}$ . Të dhënat përpunohen dhe integrohen duke përdorur programin Chemstation software (Agilent Technologies).

## Ekstraktimi

Mostrat e mëlçive të pulës merren në mënyrë të rastësishme në supermarkete të Tiranës si dhe mëlçitë e specieve të tjera merren në thertore në Tiranë pa patur ndonjë kriter të veçantë përzgjedhjeje. Mostrave ju largohet dhjami me

kujdes, copëtohen dhe përzihen në  $\pm 0.1$  g dhe kalohet në një tub plastik 50 ml. Shtohet 12 ml acetonitril, dhe me shpejtësi homogjenizohet në vorteks për 1 minutë dhe sonifikohet për 15 minuta. Centrifugohet për 10 min me 3000 rpm dhe 1 ml nga faza organike avullohet nën një rrymë të lehtë azoti në 65°C. Shtohet 0.5 ml heksan dhe përzihet lehtë në vorteks për 10 sekonda me qëllim që të largohet yndyra që është ekstraktuar.

DNC tretet në 1 ml tretësirë metanoli 75%. Para analizimit në HPLC mostra centrifugohet për 10 min me 3000 rpm në 4°C. 20 $\mu$ l e fazës organike injektohet në HPLC-DAD.

Për të studiuar vlefshmërinë e metodës së përcaktimit të DNC-së në mëlçi 3 g mostër ndotet me DNC në tre nivele që i korrespondojnë 0.5\*MRL, 1\*MRL dhe 1.5\*MRL duke shtuar sasi të ekuivalente të nikarbazinës. Mostrat lihen në qetësi për rreth 30 minuta dhe i nënshtrohen më tej procedurave të ekstraktimit.

#### **Efekti matricë dhe lineariteti**

Për të verifikuar mungesën e efektit matricë 5 mostra të bardha spikohen në fillim të analizës në nivelet 100, 200, 300, 400 dhe 500 në dy seri paralele. Po ashtu përgatiten seria e standardeve ekuivalente në metanol në seri prej dy paralelesh. Secili nga këto standarde injektohet dy herë, në mënyrë të alternuar respektivisht.

Bazuar në pikën 3.1.1.5 të rregullores 657/2002 EC për llogaritjen e linearitetit përgatiten tre lakore kalibrimi në 3 lloje të ndryshme pule në mënyrë të pavarur nga njëra tjetra në nivelet 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000  $\mu$ g/kg në të njëjtën ditë. Verifikohen kriteret e pranueshmërisë dhe të  $r^2 > 0.99$ .

#### **Përsëritshmëria, riprodhueshmëria dhe përpikmëria**

Sipas pikës 3.1.2.2 ripërsëritshmëria dhe 3.1.2.3 riprodhueshmëria llogaritet si më poshtë:

- Përgatitet seria e mostrave identike me matricën e spikuar në përqendrime ekuivalente në 0.5, 1 dhe 1.5MRL.
- Për secilin nivel analizohen 7 replikate.
- Gjendet përqendrimi për secilën mostër.
- Llogaritet përqendrimi mesatar, shmangia standarde dhe koeficienti i variancës (%) për mostrat e spikuara.
- Përsëritet ky hap dhe dy herë të tjera dhe llogaritet përqendrimi mesatar i përgjithshëm dhe CV e mostrave të spikuara.

Vlefshmëria e metodës u realizua në tre seri të pavarura. Për realizimin e vlefshmërisë dhe përcaktimit të parametrave të tij u morën në konsideratë të gjitha matricat e përmendura më sipër si dhe dy prej tyre ishin pulë. Për secilin nivel vlefshmërie u analizuan nga 7 replikata.

## Rezultatet

Lakore e kalibrimit për DNC është marrë duke ndërtuar grafikun ku në boshtin e X jepet përqendrimin dhe në boshtin e Y sipërfaqja e pikut të DNC në intervalin prej 0.1-0.5 ppm dhe është gjetur të jetë lineare me  $R^2 = 0.99845$ . Nga analizimi i lakoreve të kalibrimit si në tretës dhe në matricë u vu re që nuk ka ndryshime sinjifikative mes tyre që tregon mungesën e efektit matricë. Metoda detekton sasi të DNC-së të përfshira midis limitit të kuantifikimit dhe përqendrimin të nivelit të sipërm të kurbës kalibruese 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  deri në 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .  $R^2$  është gjithmonë më e madhe se 0.99. Në këtë zonë vlera e ndjeshmërisë është konstante, matjet analitike mund kryhen me saktësi dhe përpikëri të pranueshme.

Limiti i vendimit  $CC\alpha$  dhe limiti i dedektimit  $CC\beta$ . Për substancat e lejuara (me MRL)  $CC\alpha$  është vlera mbi të cilin raportohet se mostra është jokonform (pozitive) me një probabilitet gabimesh prej  $\alpha = 5\%$ . Sipas pikës 3.1.2.5 për substancat të cilat kanë MRL përcaktimi i  $CC\alpha$  mund të bëhet duke përdorur lakoren e kalibrimit sipas ISO 11843. Përqendrimi që i korrespondon limitit të lejuar plus 1.64 shumëzuar me shmangien standarde të riprodhueshmërisë brenda laboratorit është e barabartë me limitin e vendimit ( $\alpha = 5\%$ ).

$$CC\alpha = \text{MRL}_{\text{mesatare}} + 1.64 * S_r$$

Ku  $S_r$  është shmangia standarde e riprodhueshmërisë ndërlaboratorike e marrë në përqendrimin e MRL-së.  $CC\beta$  i takon përqendrimin ku mund të thuhet që kampioni është vërtet jokonform (pozitiv) me një siguri statistikore  $1-\beta$ . Për substancat që kanë MRL, pika 3.1.2.6 e 2002/657/EC, është 95%. Aftësia dedektuese merret pas përllogaritjes  $CC\alpha$  së përshkruar më sipër duke përdorur ekuacionin e mëposhtëm:

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64 * S_r$$

Në nivelin e  $CC\beta$  kriteret e identifikimit (koha e mbajtjes, kromatografia e UV) duhen respektuar në të paktën 50% të rasteve.

## Diskutime dhe përfundime

Të gjitha të dhënat eksperimentale përmbledhen në tabelën e mëposhtme:

Tabela 1. Përmbledhja e parametrave vlefshmërisë.

Nr.	Komponimi	DNC (nicarbazinë)
1	Statusi ligjor	I lejuar
2	P ( $\alpha$ )	0.05
3	MRL ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	300
4	Nivelet e vlefshmërisë*	300

5	Rekuperimi mesatar	108.3
6	CC $\alpha$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	360.6
7	CC $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	421.3
8	Riprodhueshmëria brenda grupit	10.2
9	Riprodhueshmëria ndërmjet grupit	8
10	Ripërsëritshmëria/përpikmëria	12.3
11	Lineariteti	10-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Vlera e lejuar nga Bashkimi Europian për nikarbazinën është 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ndaj dhe vlefshmëria është kryer në gjysmën e MRL, në vlerën e MRL si dhe 1.5 herë mbi vlerën e MRL-së. Koeficientet e variancës në % janë konform asaj që parashikohet në pikën 2.3.2.2 të 2002/657/CE dhe janë më të ulëta se 23 që është vlera maksimale e lejuar. Vërtetuar mungesën e efektit matricë në përcaktimin e NIC në mëlçi. Lineariteti i analizimit me këtë metodë shkon nga 10-500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Limiti i vendimit dhe aftësia e zbulimit janë përkatësisht: CC $\alpha$ =360.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , CC $\beta$ =421.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Metoda rezultoi e thjeshtë, e ndjeshme, e qëndrueshme, e saktë dhe e përpiktë. Metoda e propozuar mund të përdoret për analiza rutinore të vlerësimit të DNC (Nikarbazinë) në mëlçi të ndryshme të kafshëve dhe shpendëve që është dhe risia e këtij studimi.

### Rekomandime

Ky studim i mirëfilltë jep mundësinë dhe hap dritaren për të studiuar më tej matrica të tjera që mund të jenë target i abuzimeve me nikarbazinë siç është ushqimi i kafshëve. Mbetjet e nikarbazinës krijohen për shkak të problemeve të menaxhimit të ushqimit – qoftë në kazanë ose në pijet ushqyese, duke rezultuar toksike në kafshë apo shpendë që ushqehen me këto ushqime shumë përpara kohës se ato të përdoren për therje, ndaj duhen të kontrollohen mirë ushqimi i bagëtive.

### Literatura

McEvoy J. D., Smyth W. G. and Kennedy D. G. 2003. Contamination of animal feedingstuff with nicarbazin: investigations in a feed mill. Food Addit. Contam. 20: 136-40

Rogers E. F., Brown R. D., Brown J. E., Kazazis D. M., Leanza W. J., Nichols J. R., Ostlind D. A., and Rodino T. M.. 1983. Nicarbazin complex yields dinitrocarbanilide as ultrafine crystals with improved anticoccidial activity. Science 222(4624):630–632

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on the safety and efficacy of Koffogran (nicarbazin) as a feed additive for chickens for fattening. EFSA Journal. 2010; 8: 1–40

List of the authorised additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. OJ C 50, 25.02.2004, 1-144

Skelly N. E., Cornier R. F.. Semia-utomated liquid chromatographic determination of clopidol in poultry feed. J Assoc Off Anal Chem. 1971 May;54(3):551-4

Hurlbut J. A., Nightengale C. T., Burkepile R. G.. Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feed. J Assoc Off Anal Chem. 1985 May-June; 68(3):596-8

Lewis J. L., Macy T. D., Garteiz D. A.. Determination of nicarbazin in chicken tissues by liquid chromatography and confirmation of identity by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. J Assoc Off Anal Chem. 1989 Jul

Dusi G., Faggionato E., Gamba V., Baiguera A.. Determination of nicarbazin and clopidol in poultry feeds by liquid chromatography”, Journal of Chromatography A, 882 (2000) 79–84

Vendim i Komisionit të Bashkimit European (2002/657/EC)” për implementimin e Direktivës 96/23/EC në lidhje me performancën analitike të metodave dhe interpretimin e rezultateve