

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje diklofenaka u vodi

Vukovinski, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:263701>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Vukovinski

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

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

Kandidatkinja **Petra Vukovinski**

Predala je izrađen završni rad dana: 1. srpnja 2022.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

prof. dr. sc. Sandra Babić, Fakultet kemijskog inženjerstva i
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

prof. dr. sc. Marijana Hranjec, Fakultet kemijskog inženjerstva i
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

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

Završni ispit održat će se dana: 6. srpnja 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Vukovinski

**RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRFSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE DIKLOFENAKA U VODI**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi povjerenstva: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Marijana Hranjec

Zagreb, srpanj 2022.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na stručnoj pomoći, savjetima i pristupačnosti tijekom izrade ovoga rada.

Također, iskreno se zahvaljujem i svojoj asistentici Kristini Tolić, mag. appl. chem. na iznimnom strpljenju i pomoći pri radu u laboratoriju.

Zahvaljujem se i tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić na toplim savjetima pri radu u laboratoriju.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, dečku Josipu i prijateljima koji su mi bili najveća podrška kroz ove tri godine studija.

Ovaj završni rad izrađen je na Zavodu za Analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

SAŽETAK

RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRFSKE METODE ZA ODREĐIVANJE DIKLOFENAKA U VODI

Validacija, tj. vrednovanje svih bitnih postupaka analitičkog sustava, predstavlja prvi korak kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičkog sustava za određenu namjenu. Kako bi validirali analitički sustav potrebno je ispitati izvedbene značajke kao što su: linearnost, točnost, specifičnost/selektivnost, granicu detekcije i granicu kvantifikacije, robusnost, radno područje, preciznost i osjetljivost.

Cilj ovoga rada bio je osmisliti i validirati kromatografsku metodu za određivanje farmaceutika diklofenaka u izvorskoj i MilliQ vodi te se upoznati s izvedbenim značajkama analitičkog sustava. U ovome je radu opisana priprema otopina diklofenaka u izvorskoj i MilliQ vodi te je analiza provedena na tekućinskom kromatografu visoke učinkovitosti uz detektor s nizom dioda (HPLC-DAD). Rezultati analize potvrdili su da je ispitana kromatografska metoda valjana za određivanje diklofenaka u vodi jer su gotovo sve izvedbene značajke zadovoljile kriterij.

Ključne riječi: validacija kromatografske metode, tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, diklofenak, izvedbene značajke

SUMMARY

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF DICLOFENAC IN WATER

Validation, i.e., evaluation of all relevant procedures of the analytical system, represents the first step to determining and documenting the suitability of the analytical system for a specific purpose. Performance parameters such as linearity, accuracy, specificity/selection, limit of detection and limit of quantitation, robustness, work area, precision, and sensitivity need to be examined to validate.

This work aims to develop and validate a chromatographic method for the determination of diclofenac in spring water and MilliQ water and become familiar with the performance parameters of the analytical system. In this work, the preparation of diclofenac solutions in spring water and MilliQ water is described. The analysis was performed on a high-performance liquid chromatograph coupled to a diode array detector (DAD). The research results have confirmed that the tested method is acceptable for the determination of diclofenac in water because almost all parameters met the criterion.

Key words: validation of chromatographic method, high performance liquid chromatography, diclofenac, performance parameters

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	OPĆI DIO	3
2.1	FARMACEUTICI	4
2.1.1	Farmaceutici u okolišu	4
2.1.2	Diklofenak	5
2.2	KROMATOLOGRAFIJA.....	6
2.2.1	Povijest	6
2.2.2	Podjela kromatografije	6
2.2.3	Kalibracija	7
2.2.4	Metoda vanjskog standarda	7
2.2.5	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	8
2.3	VALIDACIJA	9
2.3.1	Definicija	9
2.3.2	Izvedbene značajke [1]	9
2.3.3	Kada je potrebno provoditi validaciju?	11
3	EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1	MATERIJALI.....	13
3.1.1	Kemikalije	13
3.1.2	Diklofenak.....	14
3.1.3	Izvorska voda	14
3.2	INSTRUMENTI.....	15
3.2.1	Analitička vaga.....	15
3.2.2	Uređaj za filtraciju vode	15
3.2.3	Tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti (HPLC)	16
3.2.4	Ultrazvučna kada.....	16
3.3	OPIS RADA	17

3.3.1	Kromatografska analiza.....	17
3.3.2	Priprema standardnih otopina.....	17
3.3.2.1	Priprema standardnih otopina za ispitivanje linearnosti.....	17
3.3.2.2	Priprema standardnih otopina za ispitivanje ponovljivosti.....	18
3.3.2.3	Priprema standardnih otopina za ispitivanje robusnosti.....	18
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1	VALIDACIJA HPLC-DAD KROMATOGRFSKE METODE ZA ODREĐIVANJE DIKLOFENAKA U VODI.....	20
4.2	SELEKTIVNOST/SPECIFIČNOST.....	20
4.3	LINEARNOST.....	22
4.4	OSJETLJIVOST.....	25
4.5	GRANICA KVANTIFIKACIJE (GK) I GRANICA DETEKCIJE (GD).....	26
4.6	PRECIZNOST.....	26
4.7	ISTINITOST.....	30
4.8	RADNO PODRUČJE.....	31
4.9	ROBUSNOST.....	31
4.10	SAŽETAK REZULTATA.....	33
5	ZAKLJUČAK.....	34
6	LITERATURA.....	36
7	ŽIVOTOPIS.....	39

1 UVOD

Razvojem farmaceutske industrije i prekomjernom upotrebom raznih lijekova, njihova prisutnost u okolišu postaje sve veća. Godinama se provode analize zagađivala okoliša, kako bi se utvrdila prisutnost pesticida, zagađivala zraka, ostataka nafte i mnogih drugih tvari, koje svojim prisustvom zagađuju okoliš. Lijekovi pripadaju novoj klasi zagađivala, iako njihova prisutnost u okolišu nije nova. Poradi toga, praćenje farmaceutika u okolišu postaje sve važniji postupak u ispitivanju kakvoće vode, zraka i tla.

Problem nastaje kada se lijekovi transformiraju u jedan ili više metabolita, izlučuju urinom i dospjevaju u okoliš. Također, raspršena upotreba antibiotika stvara antimikrobnu rezistenciju te za posljedicu, bakterije imaju sposobnost modificiranja svog genetskog materijala.

Zabrinutost zbog visoke koncentracije farmaceutika u okolišu, znanstvenike poziva da naglasak stavljaju na nove metode identifikacije i kvantifikacije tih spojeva u različitim uzorcima. Najčešća metoda za određivanje i kvantificiranje farmaceutika je tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti.

Prije provedbe mjerenja potrebno je odraditi validaciju metode i instrumenta, a konačan cilj svake analize je dati pouzdan i točan rezultat.

2 OPĆI DIO

2.1 FARMACEUTICI

Naziv *farmaceutici* obuhvaća sve terapijske lijekove namijenjene ljudima, veterinarske lijekove i dodatke prehrani. U Europskoj se uniji koristi oko 3000 različitih farmaceutski aktivnih spojeva (PhAC). To su uglavnom mali organski spojevi, molekulske mase ispod 500 Da, koji moraju zadovoljiti glavnu karakteristiku; moraju biti umjereno topljivi u vodi i lipofilni, kako bi bili biološki aktivni [1]. Za farmaceutike se oduvijek smatralo da su komplicirane i složene molekule, no oni to ne moraju biti. Farmaceutici mogu biti jednostavne aromatske molekule poput propofola ili alifatske molekule poput nitroglicerina. Bez obzira na strukturne karakteristike, farmaceuticima je zajednička njihova primjena [2].

Farmaceutici pripadaju grupi mikrozagađivala, zbog toga što su u vodenim medijima prisutni u mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama [3]. Farmaceutike, prema terapijskom djelovanju, možemo podijeliti na:

- analgetike,
- diuretike,
- farmaceutike s protubakterijskim djelovanjem,
- antikonvulzive,
- antidijabetike,
- protuupalne farmaceutike,
- anksiolitike.

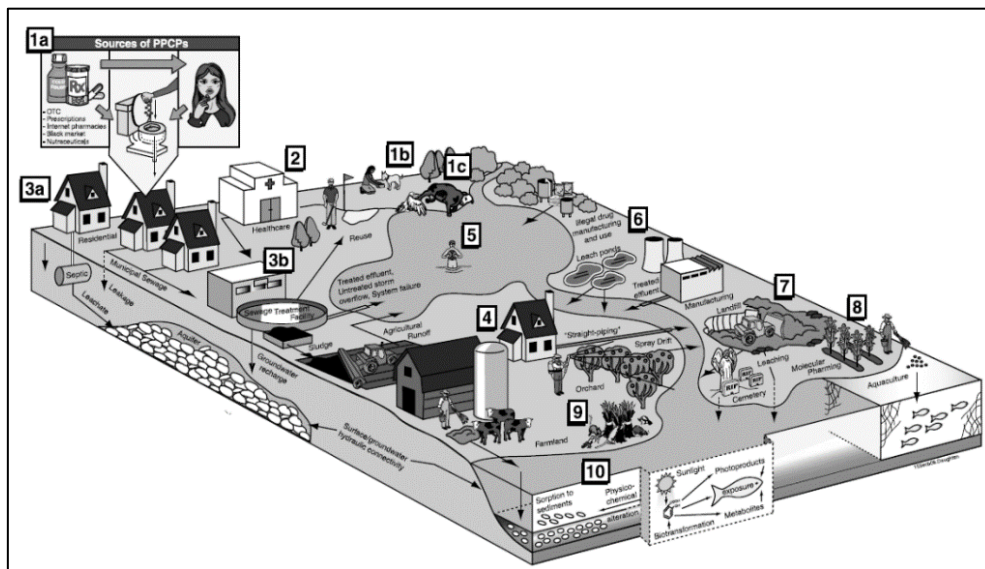
Među najpoznatijim farmaceuticima ističu se paracetamol, azitromicin, kofein, klaritromicin, diklofenak, ibuprofen te penicilin [1].

2.1.1 Farmaceutici u okolišu

Uz brzi razvoj znanosti i tehnologije, stvara se i ispušta sve više zagađivala u okoliš. Znanja i vještine analitičkih kemičara postaju sve važnije, kako bi unijele promjene, tj. modifikacije u instrumentaciju, uzorkovanje i postupke pripreme uzoraka, te time znatno povećale uspješnost praćenja koncentracije zagađivala u okolišu [4]. Farmaceutici su pronađeni u ispuštima nakon obrade otpadnih voda, u tlu i površinskim vodama te u vodovodnim vodama.

Na slici 1. je prikazan put farmaceutika u okolišu. Iz slikovnog se prikaza može vidjeti da se farmaceutici, koji su uneseni u organizam, ispuštaju u otpadne vode. Takve se vode zatim koriste u poljoprivredne svrhe. Također, farmaceuticima se nastoji suzbiti štetnošću u tlu.

Njihova koncentracija nije visoka, no postoji zabrinutost zbog izloženosti živih bića tim spojevima. Antibiotici i estrogeni dvije su, od brojnih drugih vrsta, za koje se vjeruje da opstaju u okolišu, zbog toga što se teško biološki razgrađuju te zbog njihovog konstantnog ispuštanja u okoliš. Posljedica korištenja farmaceutika je njihovo ispuštanje u okoliš te vezanje na tlo i sediment. Također, postoji opasnost zbog mogućnosti nastanka novih spojeva, koji mogu biti više ili manje stabilni i toksični prema početnoj molekuli farmaceutika [5].



Slika 1. Put farmaceutika u okolišu. [6]

2.1.2 Diklofenak

Diklofenak, poznatiji kao Voltaren, nesteroidni je lijek iz klase feniloctene kiseline s protuupalnim, analgetskim i antipiretičkim svojstvima. Koristi se za liječenje blage do umjerene boli te pomaže u ublažavanju simptoma artritisa, kao što su upale, otekline, ukočenost i bol u zglobovima. Povijest diklofenaka seže u 1973. godinu, kada su ga prvi puta sintetizirali Alfred Sallmann i Rudolf Pfister, a prvi ga je uveo Ciba-Geigy (danas Novartis AG, Basel, Švicarska) [7]. Fizikalno-kemijska svojstva ovoga spoja navedena su u eksperimentalnom dijelu na stranici 14.

2.2 KROMATOGRAFIJA

Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) definira kromatografiju kao fizikalnu tehniku odjeljivanja u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna te se kreće u određenom smjeru [1]. Kromatografija se temelji na pojavama adsorpcije, ionske izmjene i razdjeljenja, koje omogućuju odjeljivanje sastojaka smjese. Ravnoteže koje određuju fenomene razdiobe ovise o svojstvima tvari koje se raspodjeljuju između faza [8].

2.2.1 Povijest

Pojam *kromatografija*, u novije vrijeme povezujemo s analitičkom kemijom i metodama separacija, iako ona izvorno nije povezana s kemičarima već biologima, botaničarima i agronomima. Nastojeći izolirati pigmente iz raznih biljaka, pojam *kromatografija* prvi spominje Mihail Semjonovič Cvet početkom 20. stoljeća [9]. Primijenio je kromatografsku tehniku za odjeljivanje otopine biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu sitnozrnastim kalcijevim(II) karbonatom. Tehnika je dobila naziv od grčke riječi *chroma*, što znači boja te od riječi *graphein*, što znači pisati [10]. Daljnje istraživanje kromatografije nastavljaju A. J. P. Martin i R. L. M. Synge, koji su prvi razjasnili razdjelnu kromatografiju na papiru, tumačenjem teorije tavana. Kasnije, šezdesetih godina prošloga stoljeća, instrumentalna tekućinska kromatografija kreće se sve više i više razvijati [1].

2.2.2 Podjela kromatografije

S obzirom na prirodu ravnoteže, kromatografija se može podijeliti na:

- *razdjelnu kromatografiju*, gdje se ravnoteža uspostavlja između pokretne faze (tekućina ili fluid pri superkričnim uvjetima) i tekuće nepokretne faze vezane za inertni čvrsti nosač
- *adsorpcijsku kromatografiju*, gdje se ravnoteža uspostavlja između pokretne faze (tekućina ili inertni plin) i čvrste nepokretne faze, a molekule ispitivane tvari izravno vežu na površinu adsorbensa
- *ionsko-izmjenjivačku kromatografiju*, u kojoj dolazi do izmjene iona ispitivanog uzorka i ionima nepokretne faze
- *afinitetnu kromatografiju*, u kojoj dolazi do vezanja zbog interakcija molekula s kemijskim vezanim ligandom na površini nepokretne faze

- *kromatografiju isključenjem po veličini*, gdje nepokretnu fazu čini materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom te se odjeljivanje zbiva zbog razlike u molekulskoj masi i obujmu.

Kromatografija se može podijeliti i na temelju sastava pokretne faze. S obzirom na pokretnu fazu, možemo koristiti *plinsku kromatografiju*, gdje je pokretna faza inertni plin nosioc, *tekućinsku kromatografiju*, gdje je pokretna faza tekućina male viskoznosti te *fluidnu kromatografiju* gdje je pokretna faza fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka [1].

Također, kromatografiju možemo podijeliti na *kromatografiju u stupcu* i *plošnu kromatografiju* ako je u pitanju nepokretna faza, koja može biti tekuća ili čvrsta. Tekućinska se kromatografija dalje dijeli na tankoslojnu kromatografiju (TLC), tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC), kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UHPLC), ionsku kromatografiju (IC) i kromatografiju isključenjem po veličini (SEC) [1].

2.2.3 Kalibracija

Kalibracija spada u jedan od najvažnijih koraka kemijske analize. Definira se kao postupak u kojemu se mjerni sustav uspoređuje sa standardiziranim sustavom. Kalibracija se provodi kako bi pogreška mjernog sustava bila minimalna, tj. kako bi točnost konačnog rezultata bila maksimalna.

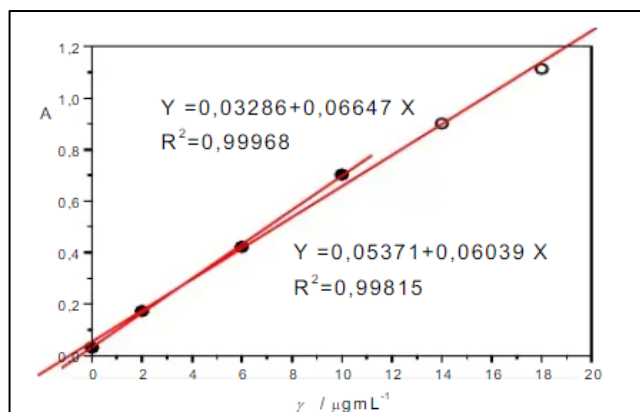
Postoje tri kalibracijske metode [11]:

- metoda vanjskog standarda,
- metoda unutarnjeg standarda,
- metoda standardnog dodatka.

U ovome je radu korištena i opisana metoda vanjskog standarda.

2.2.4 Metoda vanjskog standarda

Kalibracijski, tj. umjerni dijagrami prikazuju ovisnost signala, koji je dobiven mjerenjem signala standarda pri točno definiranim uvjetima rada, prema količini analita, tj. koncentraciji. Često se linearnost, kod niskih ili visokih koncentracija, ne zadovoljava, pa se uzima sredina umjernog pravca, tj. linearan dio koji se može opisati jednadžbom pravca: $y=a+bx$. Tada y predstavlja signal s instrumenta, a signal slijepe probe a b je nagib pravca za ispitivani sustav. Na slici 2. prikazan je umjerni dijagram [12].



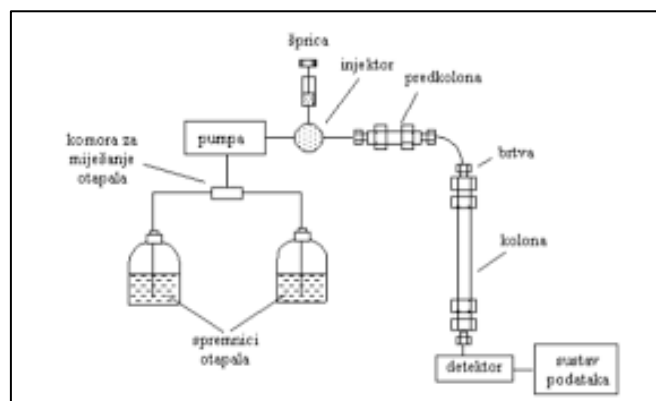
Slika 2. Umjerni dijagram. [12]

Ova se metoda kalibracije koristi kada je utjecaj matice zanemariv i kada ne ovisi o analitu. Nužnost ove metode je stabilnost mjernog instrumenta [12].

2.2.5 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

U ovome je radu korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

Općenito, tekućinska se kromatografija može provoditi u otvorenim ili zatvorenim sustavima, tj. na kromatografskoj pločici ili u stupcu. Svaki se instrument za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti sastoji od spremnika za otapala pokretne faze, pumpe, injektora, pretkolone (nije nužno), kolone i detektora (slika 3.) [1].



Slika 3. Shematski prikaz HPLC kromatografa .[1]

Najbitniji dio samog instrumenta je pumpa, koja crpi pokretnu fazu u stupac pod visokim tlakom stalnom brzinom (0,1-10 ml/min), a uzorak se automatskim dodavanjem unosi u sustav u tzv. petlju (obujma 5-500 μL), gdje se održava stalni tlak. Otapalo zatim prolazi kroz injektor te unosi uzorak u kolonu. Kako bi kolona dulje trajala poželjno je koristiti pretkolone. Kao detektori mogu se koristiti spektrometri masa, spektrofotometrijski detektori u UV-VID području elektromagnetskoga zračenja, detektori na osnovi molekulske fluorescencije, indeksa

loma, oni koji se osnivaju na raspršenju elektromagnetskoga zračenja na isparenom uzorku te elektrokemijski detektori (konduktometrijski i amperometrijski) [1].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti upotrebljava se pri odjeljivanju i određivanju polarnih i nepolarnih nehlapljivih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, kliničkoj i forenzičkoj industriji. Osobito je važna njena primjena u određivanju štetnih tvari u tlu, hrani, vodi, zraku i industrijskim procesima [1].

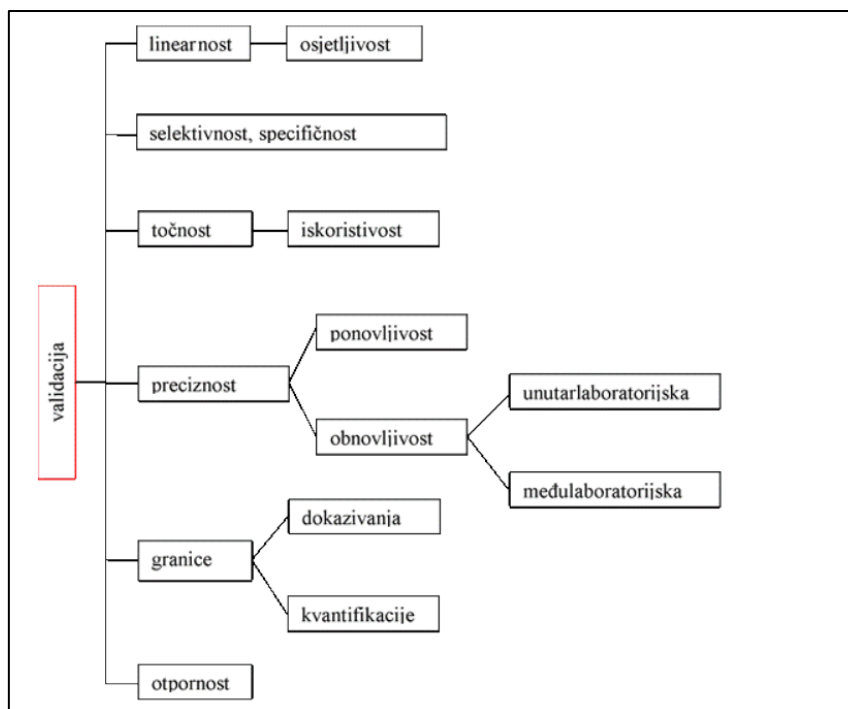
2.3 VALIDACIJA

2.3.1 Definicija

U novije vrijeme, u analitičkoj se kemiji, naglasak stavlja na razvoj novih analitičkih metoda i tehnika pomoću kojih se mogu pouzdano identificirati i kvantificirati komponente u uzorcima [13]. Prije same provedbe eksperimenta, potrebno je provesti validaciju metode. Validacija je skup postupaka kojima potvrđujemo da naša metoda služi svrsi te da ju možemo primijeniti pri provedbi eksperimenta [14]. Nakon postupka validacije, sve radnje i postupci moraju biti jasno i uredno dokumentirani [13].

2.3.2 Izvedbene značajke [1]

Da bi validirali metodu potrebno je procijeniti izvedbene značajke mjernog sustava. Neke od glavnih izvedbenih značajki su: točnost, preciznost, selektivnost i specifičnost, osjetljivost metode, granice dokazivanja i granice kvantifikacije, linearnost, iskoristivost te otpornost metode. Nakon provedenog postupka validacije, dobiva se rezultat, koji može dati binarne rezultate poput DA/NE, POZITIVNO/NEGATIVNO ili IZNAD/ISPOD određene granice prihvatljivosti [15]. Na slici 4. prikazane su izvedbene značajke koje se procjenjuju postupkom validacije.



Slika 4. Izvedbene značajke metode koja se procjenjuje postupkom validacije. [1]

Preciznost je parametar koji govori o ponovljivosti rezultata koji su dobiveni pomoću iste metode, istog uzorka u istim uvjetima provedbe mjerenja.

Točnost definiramo kao razliku prosječne vrijednosti niza mjerenja i referentne vrijednosti. Možemo ju procijeniti iz referentnih materijala, no ako oni nisu prisutni, možemo se poslužiti dodatkom poznate količine analita matici uzorka. Točnost se može dokumentirati na kontrolnim dijagramima, a iskazuje se razlikom izmjerene i prave vrijednosti analiziranog certificiranog referentnog materijala.

Specifičnost tj. **selektivnost** svojstva su metode da egzaktno i specifično odredi analit u prisutnosti ostalih komponenti u matici uzorka. Važno je naglasiti da specifičnost i selektivnost nisu ekvivalentni parametri. Pomoću specifičnosti moguće je odrediti samo jedan specifični analit, dok se pomoću selektivnosti može odrediti više komponenti istodobno, no tako da jedna komponenta ne utječe na drugu [14].

Granica kvantifikacije je najmanja koncentracija koja se može odrediti, dok se **granica dokazivanja** definira kao najmanja koncentracija koja se može dokazati, ali se ne može kvantitativno odrediti.

Linearnost se definira kao mogućnost da se metodom unutar radnog područja dobije izravno proporcionalna ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita, te se određuje postupkom umjeravanja uz primjenu regresijske analize.

Iz umjernog se pravca, očitavanjem nagiba, može odrediti **osjetljivost**. Osjetljivost je svojstvo instrumenta ili metode da razlikuje različite koncentracije analita uz definiranu razinu pouzdanosti.

Robusnost je svojstvo analitičke metode u kojoj se dobiveni rezultati smatraju pouzdanima, čak i kada se izvode u neznatno promijenjenim uvjetima. Može se još definirati i kao sposobnost metode da ostane nepromijenjena kada se primjenjuju male varijacije [16].

2.3.3 Kada je potrebno provoditi validaciju?

Potrebno je naglasiti da validacija može biti potpuna, ako se određuju sve izvedbene značajke, ili djelomična.

Validacija se treba provoditi:

- uvodimo li novu metodu,
- nakon svake promjene ili većeg servisa instrumenta,
- prilikom prenamjene i modifikacije postojeće metode,
- u određenim vremenskim intervalima,
- kada se metoda razvija u vlastitom laboratoriju,
- kada se normirana metoda želi primijeniti izvan normiranog područja,
- kada se normirana metoda upotrebljava u različitim laboratorijima ili je u istom laboratoriju izvode različiti analitičari različitim instrumentima.

Validacija se još može provoditi nakon zamjene proizvodne pošiljke, ako promijenimo reagens, ako analitičar metodu koristi prvi put i pri promjeni sastava gotovog proizvoda [11].

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

Kemikalije i podaci o kemikalijama, koje su korištene za izradu ovoga završnoga rada prikazane su u tablici 1.

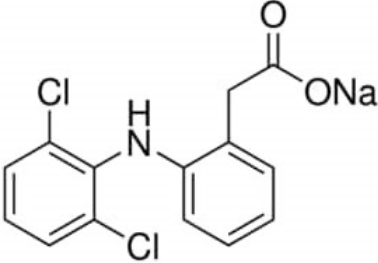
Tablica 1. Kemikalije korištene za izradu ovoga rada:

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Diklofenak (natrijeva sol)	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$	<i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich
Acetonitril	CH_3CN	HPLC	Fischer Scientific
Mravlja kiselina	CH_2OH	<i>p.a.</i>	Lach-Ner
Ultračista voda (MilliQ)	H_2O		Millipore Corporation
Izvorska voda	H_2O	profiltrirana	Izvor Horvati

3.1.2 Diklofenak

U tablici 2. prikazana su fizikalno-kemijska svojstva ispitivanog farmaceutika diklofenaka (natrijeve soli).

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika diklofenaka:

Generičko ime	Diklofenak (natrijeva sol)
Terapijsko djelovanje	Protuupalni farmaceutik
Strukturna formula [16]	
Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂
Molarna masa	318,13 g/mol
CAS broj [17]	15307-79-6
Naziv po IUPAC-u	2-[(2,6-diklorfenil)amino] benzenoctena kiselina
Topljivost u vodi, S [17]	50 mg/mL
Svojstva	Bijeli kruti prah bez mirisa
pK _a [18]	4,15
Područje taljenja [19]	283-285 °C
Izvor (dobivanje)	Sigma-Aldrich

3.1.3 Izvorska voda

Radi provedbe eksperimenta, koristila se izvorska voda uzorkovana na izvoru Horvati. Uzorkovanje je provedeno 7. prosinca 2021. godine, a izvorska je voda profiltrirana 8. prosinca 2021. godine.

3.2 INSTRUMENTI

3.2.1 Analitička vaga

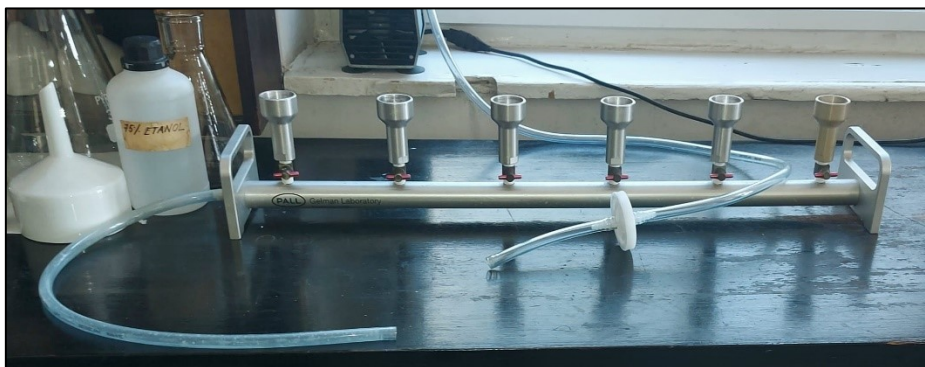
Analitička se vaga koristi za egzaktno mjerenje mase ispitivane tvari. U ovome se radu koristila vaga proizvođača Mettler Toledo XA105 DualRange prikazana na slici 5. Maksimalni kapacitet vage iznosi 120 g te ima sposobnost očitavanja 0,1 mg.



Slika 5. Analitička vaga proizvođača Mettler Toledo XA105 DualRange.

3.2.2 Uređaj za filtraciju vode

Prije provedbe eksperimenta, izvorska se voda morala profiltrirati kako bi se uklonile nepoželjne čestice. U radu je korišten uređaj za filtraciju PALL Life Sciences, prikazan na slici 6.



Slika 6. Uređaj za filtraciju PALL Life Sciences.

3.2.3 Tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti (HPLC)

Za razvoj i validaciju diklofenaka korišten je tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti Waters 2795 Alliance HPLC System s DAD detektorom prikazan na slici 7. Kolona korištena u ovome radu je KINETEX C18, dimenzija 150 mm x 4,6 mm te 5 μm promjera čestice unutar kolone.



Slika 7. Tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti Waters 2795 Alliance.

3.2.4 Ultrazvučna kada

Ultrazvučna kada korištena u ovom radu, proizvođača Iskra, namijenjena je za brzo degaziranje otapala za HPLC analizu te je prikazana na slici 8.



Slika 8. Ultrazvučna kada proizvođača Iskra.

3.3 OPIS RADA

3.3.1 Kromatografska analiza

Za određivanje diklofenaka u vodi koristila se kromatografija obrnutih faza, što znači da je pokretna faza u usporedbi s nepokretnom bila polarnija. Kao pokretne faze korištene su 0,1% mravlja kiselina u MilliQ vodi, koja predstavlja fazu (A) te 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (ACN), koja predstavlja fazu (B). U ovome je radu korištena izokratna metoda, tj. metoda stalnog sastava otapala, takva da je omjer A prema B bio jednak 35:65. Protok pokretne faze iznosi 0,5 mL/min. Rezultati mjerenja uočavaju se pri valnoj duljini od 276 nm. Volumen injektiranja iznosio je 20 µL.

3.3.2 Priprema standardnih otopina

Temeljna standardna otopina (TSO) diklofenaka, masene koncentracije 25 mg/L, priređena je vaganjem 1,34 mg (stvarno izvagano 1,38 mg) diklofenak-natrijeve soli na analitičkoj vagi. Odvaga je prenesena u tikvicu od 50 mL koja je nadopunjena MilliQ vodom, odnosno izvorskom vodom.

3.3.2.1 Priprema standardnih otopina za ispitivanje linearnosti

Za provjeru linearnosti priređene su otopine farmaceutika masenih koncentracija 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L, 1 mg/L, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L te 25 mg/L. Otopine masenih koncentracija 2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L te 20 mg/L priređene su u odmjernim tikvicama od 10 mL, u koje je redom dodano 1, 2, 3, 4, 6 te 8 mL temeljne standardne otopine diklofenaka, masene koncentracije 25 mg/L. Tikvice su zatim nadopunjene vodom do oznake. Otopine masenih koncentracija 0,5 mg/L, 0,75 mg/L te 1 mg/L pripremljene su u tikvicama od 10 mL te je redom dodano 1, 1,5, 2 mL otopine masene koncentracije 5 mg/L te je svaka tikvica nadopunjena vodom do oznake. Otopine masenih koncentracija 0,1 mg/L te 0,25 mg/L pripremljene su u tikvicama od 10 mL dodatkom 1 mL te 2,5 mL otopine masene koncentracije 1 mg/L te su tikvice nadopunjene vodom do oznake. Otopine masenih koncentracija 0,01 te 0,05 mg/L priređene su u odmjernim tikvicama volumena 10 mL i 5 mL te im je dodano 1 mL i 2,5 mL otopine masene koncentracije 0,1 mg/L te su tikvice nadopunjene vodom do oznake.

3.3.2.2 Priprema standardnih otopina za ispitivanje ponovljivosti

Za provjeru ponovljivosti pripravljena je otopina masene koncentracije 25 mg/L u odmjernoj tikvici od 10 mL, vaganjem 0,27 mg diklofenak-natrijeve soli. Za ispitivanje ponovljivosti bilo je potrebno prirediti otopine masenih koncentracija 17 mg/L, 4 mg/L, 0,4 mg/L te 0,06 mg/L. Otopina masene koncentracije 17 mg/L pripravljena je u odmjernoj tikvici od 10 mL u koju je dodano 6,8 mL otopine masene koncentracije 25 mg/L te je tikvica nadopunjena vodom do oznake. Otopina masene koncentracije 4 mg/L pripravljena je u odmjernoj tikvici od 10 mL dodatkom 1,6 mL prethodno pripravljene otopine masene koncentracije 17 mg/L. Otopina masene koncentracije 0,4 mg/L priređena je u odmjernoj tikvici od 10 mL dodatkom 1 mL otopine masene koncentracije 4 mg/L. Otopina masene koncentracije 0,06 mg/L pripravljena je u odmjernoj tikvici od 10 mL dodatkom 1,5 mL otopine masene koncentracije 0,4 mg/L.

3.3.2.3 Priprema standardnih otopina za ispitivanje robusnosti

Za provjeru robusnosti pripravljena je otopina masene koncentracije 25 mg/L u odmjernoj tikvici od 10 mL, vaganjem 0,27 mg diklofenak-natrijeve soli. 8 mL tako priređene otopine preneseno je u odmjernu tikvicu od 50 mL te je nadopunjeno vodom do oznake. Dobivena je potrebna otopina, masene koncentracije 4 mg/L, za ispitivanje parametra robusnosti.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 VALIDACIJA HPLC-DAD KROMATOGRFSKE METODE ZA ODREĐIVANJE DIKLOFENAKA U VODI

Cilj provedbe validacije je dati pouzdanu i točnu informaciju o prirodi i sastavu ispitivane tvari. Provedba validacije sastoji se od tri povezana koraka:

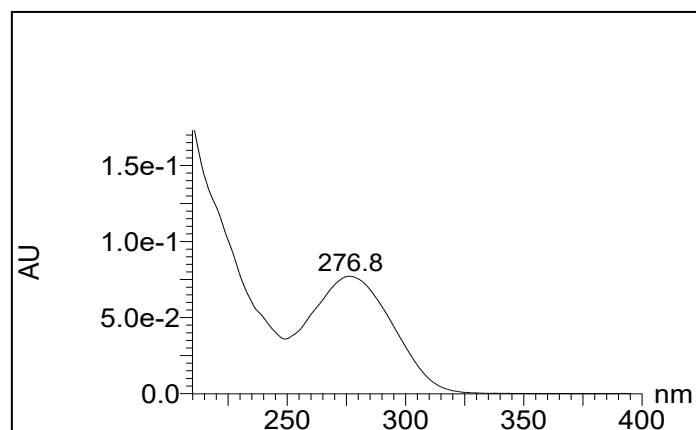
- karakterizacije ispitnog postupka,
- usporedbe sa zahtjevima korisnika,
- izjave o udovoljavanju zahtjeva.

U ovome je radu validacija ispitana pomoću sljedećih parametara: selektivnosti/specifičnosti, linearnosti, osjetljivosti, granice kvantifikacije i granice detekcije, preciznosti, istinitosti, radnog područja i robusnosti.

4.2 SELEKTIVNOST/SPECIFIČNOST

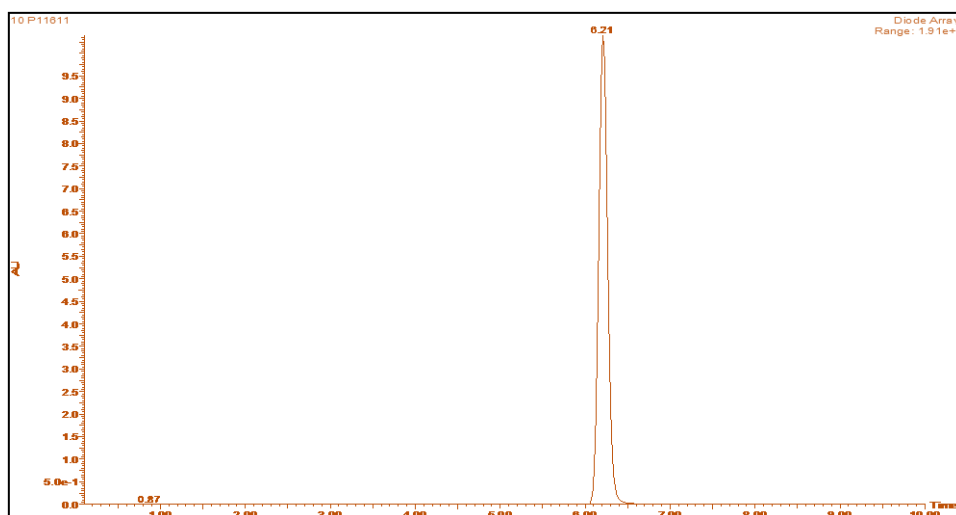
Određivanje diklofenaka provodilo se na tekućinskom kromatografu visoke učinkovitosti s nizom dioda (HPLC-DAD) te su signali uočeni pri valnoj duljini od 276 nm. Apsorpcijski spektar diklofenaka prikazan je na slici 9.

Ako je metoda specifična, njome možemo odrediti jedan analit u prisutnosti drugih sastojaka uzorka, dok se kod selektivnih metoda identificira i kvantificira točno željeni analit, samo pod uvjetom da jedna komponenta ne smeta drugoj.

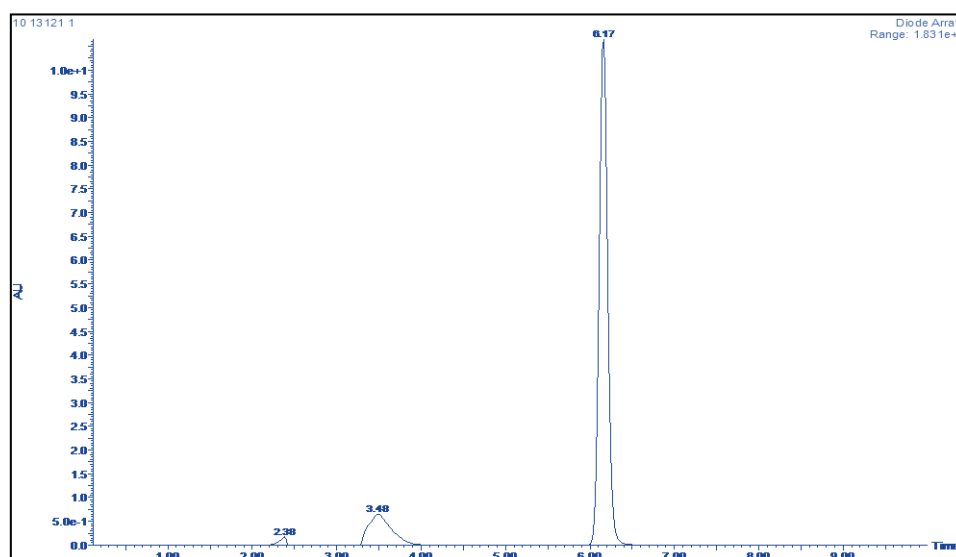


Slika 9. Apsorpcijski spektar diklofenaka.

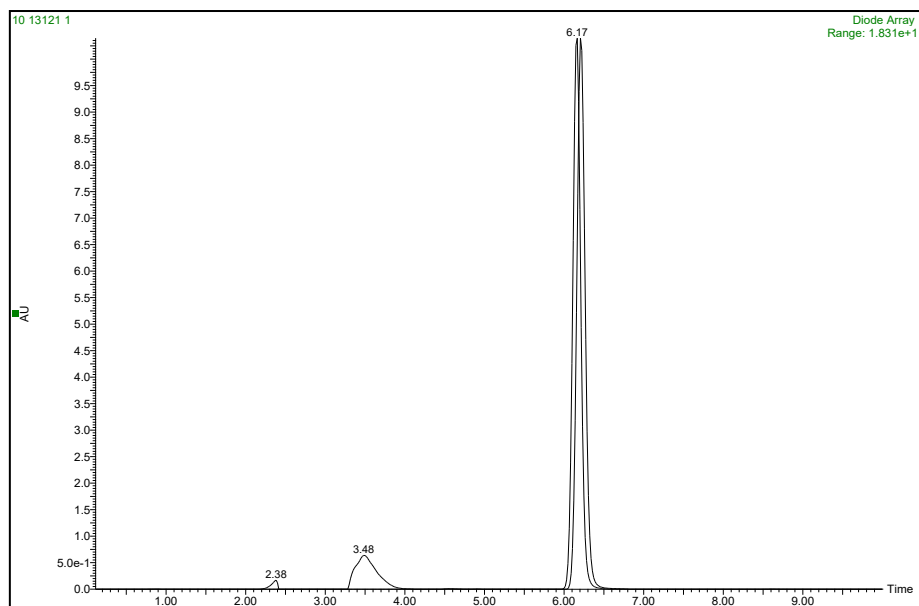
Na slici 10. je prikazan kromatogram diklofenaka u MilliQ vodi, pri čemu vrijeme zadržavanja iznosi 6,21 minutu. Na slici 11. prikazan je kromatogram diklofenaka u izvorskoj vodi te vrijeme zadržavanja iznosi 6,17 minuta. Na kromatogramu, gdje je korištena izvorska voda, javljaju se signali na 2,38 min i 3,48 min, zbog toga što je riječ o izvorskoj vodi koja ima sitne nečistoće u usporedbi s MilliQ vodom, koja je ultra čista voda. Međusobnim preklapanjem grafova (slika 12.) da se uočiti da je površina ispod obiju krivulja približno istih vrijednosti te možemo reći da je metoda selektivna prema analitu.



Slika 10. Kromatogram diklofenaka u MilliQ vodi.



Slika 11. Kromatogram diklofenaka u izvorskoj vodi.



Slika 12. Preklopljeni kromatogrami diklofenaka u MilliQ i izvorskoj vodi.

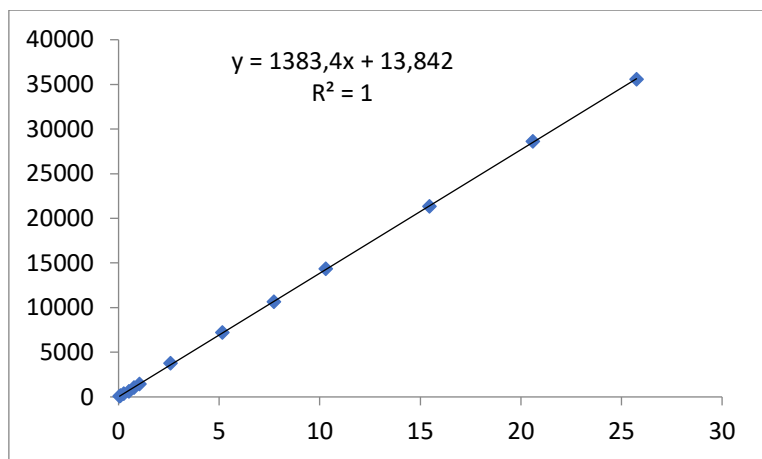
4.3 LINEARNOST

Ispitivanje linearnosti od velike je važnosti jer ona daje proporcionalnu ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita. Linearnost je ispitivana postupkom umjeravanja uz primjenu regresijske analize.

Za ispitivanje linearnosti, korištenjem MilliQ vode, izvagano je 1,38 mg diklofenak-natrijeve soli, dok je kod izvorske vode izvagano 1,34 mg te je pripremljeno četrnaest standardnih otopina različitih koncentracija. Od svake je otopine uzeto po tri uzorka za analizu. Grafičkom ovisnošću površine ispod signala i stvarne koncentracije, prikazanoj na slikama 13. i 14., dobiva se jednadžba pravca, iz koje je pomoću koeficijenta determinacije, koji u oba slučaja iznosi 1, vidljivo da je kriterij linearnosti zadovoljen, tj. da je koeficijent u oba slučaja veći od 0,995.

Tablica 3. Podaci dobiveni nakon analize u MilliQ vodi, potrebni za crtanje umjernog pravca.

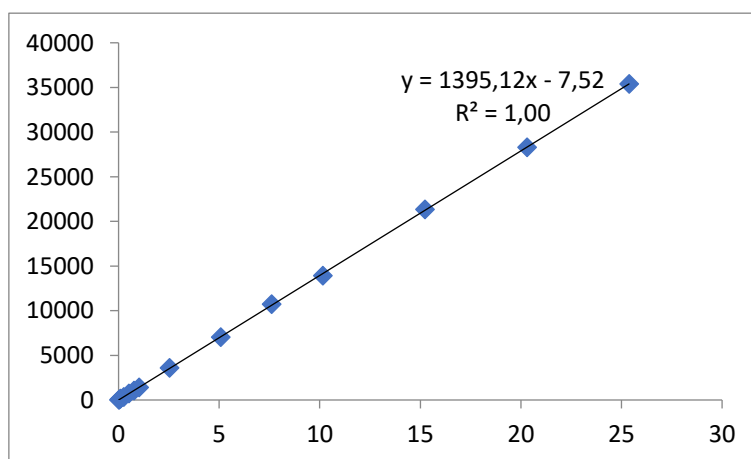
Nazivna koncentracija, mg/L	Stvarna koncentracija, mg/L	\bar{A}	RSD, %
0,05	0,05149	75,51	6,68
0,1	0,1029	147,93	9,89
0,25	0,2575	341,87	8,48
0,5	0,5149	595,27	2,86
0,75	0,7724	1028,78	3,51
1	1,0299	1439,69	0,95
2,5	2,5746	3761,51	3,22
5	5,1493	7204,67	0,58
7,5	7,7239	10644,61	0,91
10	10,2985	14339,52	0,32
15	15,4478	21331,34	1,49
20	20,5970	28585,2	1,10
25	25,7463	35557,8	1,10



Slika 13. Ovisnost površine ispod signala i stvarne koncentracije diklofenaka u MilliQ vodi.

Tablica 4. Podaci dobiveni nakon analize u izvorskoj vodi, potrebi za crtanje umjernog pravca.

Nazivna koncentracija, mg/L	Stvarna koncentracija, mg/L	\bar{A}	RSD, %
0,01	0,01015	15,38	29,21
0,05	0,05074	71,78	4,41
0,1	0,1015	143,93	4,49
0,25	0,2537	339,35	2,77
0,5	0,5075	722,62	0,85
0,75	0,7612	1030,62	0,30
1	1,0149	1401,64	1,79
2,5	2,5373	3571,54	0,80
5	5,0746	7042,28	1,05
7,5	7,6119	10722,54	1,89
10	10,1493	13911,76	0,92
15	15,2239	21342,52	0,41
20	20,2985	28305,61	1,14
25	25,3731	35394,50	0,24

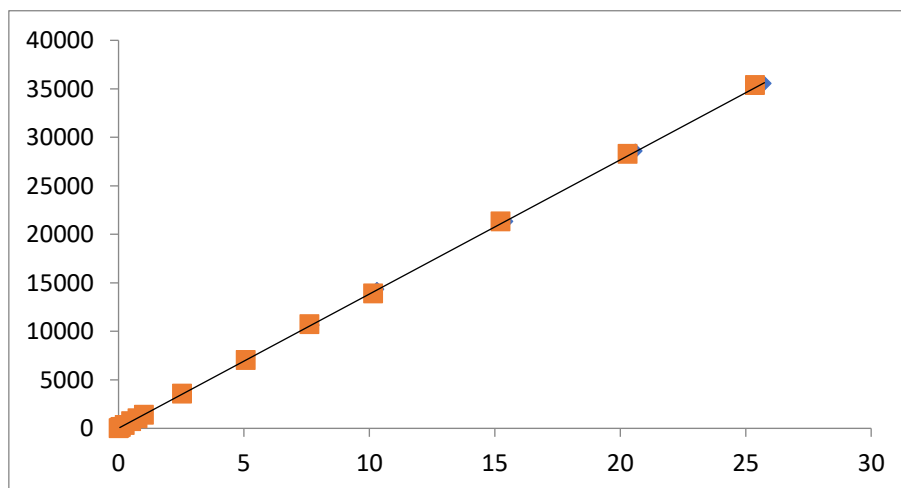


Slika 14. Ovisnost površine ispod signala i stvarne koncentracije diklofenaka u izvorskoj vodi

Nakon provedene analize, može se zaključiti da su veće RSD vrijednosti postignute u uzorcima MilliQ vode. Takvi rezultati nisu bili očekivani, obzirom da je MilliQ voda veće čistoće od izvorske vode. Veća odstupanja bila su očekivana kod izvorske vode. Mogući razlog tako dobivenih rezultata je manja izvagana masa diklofenaka u slučaju MilliQ vode, a samim time i niža koncentracija.

4.4 OSJETLJIVOST

Osjetljivost metode moguće je odrediti iz jednadžbe pravca, točnije osjetljivost je jednaka nagibu umjerne krivulje, $y=f(x)$. Na slici 15. prikazana je ovisnost površine o koncentraciji, tj. umjerni dijagram za MilliQ vodu i izvorsku vodu. Osjetljivost za izvorsku vodu iznosi 1395,1 L/mg, dok za MilliQ vodu iznosi 1383,4 L/mg (očitano sa slika 13. i 14.). Iz dobivenih vrijednosti da se zaključiti da su vrijednosti bliske. Iz bliskih vrijednosti osjetljivosti, vidljivo je da izvorska voda i MilliQ voda razlikuju uzorke, različitih koncentracija analita, uz sličnu razinu pouzdanosti.



Slika 15. Preklopljeni dijagrami ovisnosti površine ispod signala i stvarne koncentracije diklofenaka u MilliQ i izvorskoj vodi.

4.5 GRANICA KVANTIFIKACIJE (GK) I GRANICA DETEKCIJE (GD)

Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK) računaju se prema izrazima (1) i (2):

$$GD = 3,3 \cdot s'_0 \quad (1)$$

$$GK = 10 \cdot s'_0 \quad (2)$$

Gdje s'_0 računamo prema jednadžbi (3):

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

s_0 predstavlja procjenu standardnog odstupanja n mjerenja pri koncentraciji blizu nule. Broj ponovljenih mjerenja je 10 te su rezultati prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Granica kvantifikacije i granica detekcije za MilliQ i izvorsku vodu

	Granica kvantifikacije (GK)	Granica detekcije (GD)
MilliQ voda	0,009241 mg/L	0,003049 mg/L
Izvorska voda	0,020826 mg/L	0,006873 mg/L

Iz dobivenih vrijednosti granica detekcije i granica kvantifikacije da se zaključiti da je kod MilliQ vode, pri puno nižim vrijednostima masene koncentracije, moguće detektirati i kvantitativno odrediti diklofenak u vodi. Razlog tomu je upravo veća čistoća MilliQ vode.

4.6 PRECIZNOST

Preciznost je definirana stupnjem podudaranja rezultata, koji su dobiveni nezavisnim ispitivanjem istoga homogenog uzorka u propisanim uvjetima. U ovome je radu preciznost ispitana preko ponovljivosti i međupreciznosti.

Ispitana je ponovljivost mjerenja površina izvorske i MilliQ vode, za koncentracije unutar radnog područja. Rezultati analize prikazani su u tablicama 6-9.

Tablica 6. Ispitivanje ponovljivosti 1. dan za otopine diklofenaka različitih koncentracija u MilliQ vodi.

MilliQ voda- PONOVLJIVOST 1. DAN				
Nazivna koncentracija / mg/L	Stvarna koncentracija / mg/L	\bar{A}	s	RSD, %
0,4	0,3873	643,214	6,45	1,00
4	3,8729	6549,786	38,29	0,58
17	16,4600	27131,894	178,43	0,66

Tablica 7. Ispitivanje ponovljivosti 1. dan za otopine diklofenaka različitih koncentracija u izvorskoj vodi.

Izvorska voda- PONOVLJIVOST 1. DAN				
Nazivna koncentracija / mg/L	Stvarna koncentracija / mg/L	\bar{A}	s	RSD, %
0,4	0,4	593,022	17,19	2,90
4	4	5881,641	55,94	0,95
17	17	26046,118	276,95	1,06

Tablica 8. Ispitivanje ponovljivosti 2. dan za otopine diklofenaka različitih koncentracija u MilliQ vodi.

MilliQ voda- PONOVLJIVOST 2. DAN				
Nazivna koncentracija / mg/L	Stvarna koncentracija / mg/L	\bar{A}	s	RSD, %
0,4	0,4	542,883	7,56	1,39
4	4	5423,098	42,94	0,79
17	17	22781,801	283,68	1,25

Tablica 9. Ispitivanje ponovljivosti 2. dan za otopine diklofenaka različitih koncentracija u izvorskoj vodi.

Izvorska voda- PONOVLJIVOST 2. DAN				
Nazivna koncentracija / mg/L	Stvarna koncentracija / mg/L	\bar{A}	s	RSD, %
0,4	0,4	527,545	8,37	1,59
4	4	5359,872	21,53	0,40
17	17	23390,166	271,70	1,16

Ponovljivost mjerenja površine ispod kromatografske krivulje za određivanje diklofenaka u MilliQ vodi za koncentraciju od 0,3873 mg/L iznosi 1,00 %, za 3,8729 mg/L iznosi 0,58 % te za koncentraciju 16,460 mg/L iznosi 0,66 %. Ponovljivost mjerenja površine ispod kromatografske krivulje, provedena 2. dan, za koncentraciju 0,4 mg/L iznosi 1,39 %, za koncentraciju 4 mg/L iznosi 0,79 % te za koncentraciju 17 mg/L iznosi 1,25 %. Iz dobivenih RSD vrijednosti, koje su manje od 10 %, zaključuje se da je kriterij zadovoljen.

Ponovljivost mjerenja površine ispod kromatografske krivulje za određivanje diklofenaka u izvorskoj vodi za koncentraciju 0,4 mg/L iznosi 2,90 %, za koncentraciju 4 mg/L iznosi 0,95 % te za koncentraciju 17 mg/L iznosi 1,06 %. Ponovljivost mjerenja površine ispod kromatografske krivulje, provedena 2. dan, za koncentraciju 0,4 mg/L iznosi 1,59 %, za koncentraciju 4 mg/L iznosi 0,40 % te za koncentraciju 17 mg/L iznosi 1,16 % Kriterij prihvatljivosti (RSD<10) zadovoljen je kod koncentracija od 0,4 mg/L, 4 mg/L te kod koncentracije 17 mg/L.

Niže RSD vrijednosti, tj. bolji rezultati ponovljivosti postignuti su kod MilliQ vode.

Međupreciznost je određivana iz dvaju ponovljenih mjerenja, odnosno mjerenja provedena u dva dana. Pomoću *F*-testa određene su *F*-vrijednosti, dok su tablične vrijednosti očitane s 95%-tnom pouzdanosti za 10 ponovljenih mjerenja. Rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati *F* testa.

MilliQ voda			
Masena koncentracija, mg/L	$F_{rač}$	$F_{tabl} = F_{krit}$	$F_{rač} < F_{krit}$
0,4	1,38	3,18	DA
4	1,26	3,18	DA
17	2,53	3,18	DA
Izvorska voda			
0,4	4,22	3,18	NE
4	6,75	3,18	NE
17	1,04	3,18	DA

Iz tablice 10. može se vidjeti da, u MilliQ vodi, sve koncentracije zadovoljavaju kriterij jer je $F_{rač}$ manji od tablične vrijednosti. Mjerenja u izvorskoj vodi, pri koncentraciji 0,4 mg/L i 4 mg/L ne zadovoljavaju kriterij jer je izračunata vrijednost veća od tablične, tj. može se zaključiti da postoje signifikantne razlike u preciznosti mjerenja provedena u dva različita dana. Kod koncentracije 17 mg/L zadovoljen je kriterij.

4.7 ISTINITOST

Istinitost metode definirana je stupnjem podudaranja stvarne, odnosno prihvaćene vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta. Podatci za izvorsku i MilliQ vodu prikazani su u tablicama 11. i 12. Za računanje istinitosti, korišteni su podaci dobiveni eksperimentom ponovljivosti.

Tablica 11. Vrijednosti iskoristivosti za otopine diklofenaka u izvorskoj vodi.

Izvorska voda		
Stvarna koncentracija, mg/L	Srednja koncentracija, mg/L	Iskoristivost, %
0,4	0,431	92,89
4	3,752	106,60
17	18,811	91,10

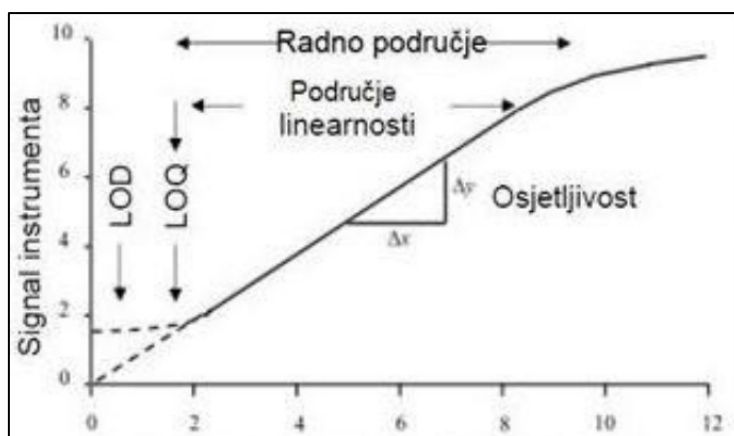
Tablica 12. Vrijednosti iskoristivosti za otopine diklofenaka u MilliQ vodi.

MilliQ voda		
Stvarna koncentracija, mg/L	Srednja koncentracija, mg/L	Iskoristivost, %
0,3873	0,4550	81,97
3,8729	4,7255	83,97
16,46	19,6025	96,32

Provedenom analizom vidljivo je da se bolje iskoristivosti postižu kod izvorske vode, što nije bilo za očekivati jer je MilliQ voda veće čistoće od profiltrirane izvorske vode. Parametar istinitosti prihvaća se ako su iskoristivosti u intervalu od 90 do 110 %. Kod MilliQ vode, samo koncentracija 16,46 mg/L zadovoljava kriterij. Za očekivati je bilo da će izvorska voda, voda manje čistoće, dati manje vrijednosti iskoristivosti. Nakon provedene analize, rezultati pokazuju obrnuti slučaj. Niže vrijednosti postižu se kod MilliQ vode. Mogući razlog takvog odstupanja je veća razlika stvarne i srednje koncentracije.

4.8 RADNO PODRUČJE

Radno se područje definira kao interval u kojemu odabrana metoda ima željene vrijednosti preciznosti, istinitosti i linearnosti. Radno područje može se predočiti i kao niz vrijednosti analita, gdje se unutar određenih granica nalazi pogreška mjernog instrumenta. Radno područje za određivanje diklofenaka u izvorskoj vodi nalazi se u granicama od 0,020826 mg/L do 25,3731 mg/L, dok se radno područje kod MilliQ vode nalazi od 0,009241 do 25,7463 mg/L. Na slici 16. prikazan je način očitavanja radnog područja.



Slika 16. Određivanje radnog područja.

4.9 ROBUSNOST

Robusnost metode može se ispitati mijenjanjem uvjeta rada. U ovome radu, za ispitivanje robusnosti, mijenjane su brzine protoka i udjeli pokretnih faza (A i B). Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 13. za izvorsku vodu te u tablici 14. za MilliQ vodu. Nakon provedenog eksperimenta i dobivenih rezultata zaključuje se da promjena sastava faze nije utjecala previše na promjenu površine signala. Veći se utjecaj vidi s promjenom protoka pokretne faze (kod MilliQ vode), a razlog tomu je što ispitivani analit provede manje, odnosno više vremena u koloni, tj. apsorbira različitu količinu zračenja. Iz dobivenih RSD vrijednosti (koje su manje od 5 %), može zaključiti da je metoda robusna na male promjene u radu

Tablica 13. Ispitivanje robusnosti za određivanje diklofenaka u izvorskoj vodi.

Izvorska voda					
Masena koncentracija, mg/L	Protok pokretne faze, mL/min	Metoda (A:B)	\bar{A}	s	RSD, %
4	0,5	35:65	7131,05	79,24	1,11
4	0,45	35:65	7911,19	49,46	0,63
4	0,55	35:65	6481,09	30,89	0,48
4	0,5	37:63	7094,94	47,63	0,67
4	0,5	33:67	7123,35	57,30	0,80

Tablica 14. Ispitivanje robusnosti za određivanje diklofenaka u MilliQ vodi.

MilliQ voda					
Masena koncentracija, mg/L	Protok pokretne faze, mL/min	Metoda (A:B)	\bar{A}	s	RSD, %
4	0,5	35:65	5511,73	39,54	0,72
4	0,45	35:65	6106,94	75,91	1,24
4	0,55	35:65	5001,62	52,71	1,05
4	0,5	37:63	5491,71	55,34	1,01
4	0,5	33:67	5555,46	35,96	0,65

4.10 SAŽETAK REZULTATA

Tablica 15. Sažetak rezultata.

Parametar validacije	Kriterij	Rezultat MilliQ / Izvorska	Zadovoljava kriterij MiliQ / Izvorska
Selektivnosti/specifičnost	Informacija	Slika 12.	DA
Linearnost Koeficijent determinacije	RSD\geq0,995	1 / 1	DA / DA
Osjetljivost	Informacija	1383,4 / 1395,1	
Granica kvantifikacije (mg/L)	Informacija	0,009241 / 0,020826	
Granica detekcije (mg/L)	Informacija	0,003049 / 0,006873	
Preciznost Ponovljivost	RSD \leq 10 %		
Ponovljivost 1. dan	$\gamma=0,4$ mg/L	1,00 % / 2,90 %	DA / DA
	$\gamma=4$ mg/L	0,58 % / 0,95 %	DA / DA
	$\gamma=17$ mg/L	0,66 % / 1,06 %	DA / DA
Ponovljivost 2. dan	$\gamma=0,4$ mg/L	1,39 % / 1,59 %	DA / DA
	$\gamma=4$ mg/L	0,79 % / 0,40 %	DA / DA
	$\gamma=17$ mg/L	1,25 % / 1,16 %	DA / DA
Medupreciznost	$F_{rac} < F_{tabl} (F < 3,18)$		
	$\gamma = 0,4$ mg/L	$F_{rac}=1,38 / F_{rac}=4,22$	DA / NE
	$\gamma=4$ mg/L	$F_{rac}=1,26 / F_{rac}=6,75$	DA / NE
Istinitost Iskoristivost	90-110 %		
	$\gamma=0,4$ mg/L	81,97 % / 92,89 %	NE / DA
	$\gamma=4$ mg/L	83,97 % / 106,60 %	NE / DA
Radno područje	Informacija	0,009241 mg/L-25,7463 mg/L	
		0,020826 mg/L-25,3731 mg/L	
Robusnost	RSD$<$5%		
	$\gamma=0,4$ mg/L		
	Protok pokretne faze / metoda (mL/min) A:B		
	0,5 / 35:65	0,72 % / 1,11 %	DA / DA
	0,45 / 35:65	1,24 % / 0,63 %	DA / DA
	0,55 / 37:63	1,05 % / 0,48 %	DA / DA
0,5 / 37:63	1,01 % / 0,67 %	DA / DA	
0,5 / 33:67	0,65 % / 0,80 %	DA / DA	

5 ZAKLJUČAK

U ovome je radu provedena validacija kromatografske metode za određivanje diklofenaka u vodi tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz detektor s nizom dioda (HPLC-DAD). Postupkom validacije ispitivali smo izvedbene značajke analitičkog sustava te smo pomoću dobivenih podataka donijeli sljedeće zaključke:

- metoda je, za određivanje diklofenaka u izvorskoj i MilliQ vodi, selektivna,
- za MilliQ vodu i izvorsku vodu, koeficijent determinacije (R^2) iznosi 1, što znači da su izlazni signali instrumenta proporcionalni koncentraciji analita,
- iz dobivenih vrijednosti osjetljivosti MilliQ vode i izvorske vode ne postoji značajna razlika, tj. matica uzorka ne utječe na osjetljivost metode,
- metoda je ponovljiva u vremenu za određivanje diklofenaka u MilliQ i izvorskoj vodi,
- iz vrijednosti iskoristivosti vidljivo je da metoda nije primjenjiva za niske koncentracije, tj. parametar istinitosti nije zadovoljen pri niskim koncentracijama,
- metoda je otporna (robustna) na male promjene uvjeta rada.

Nakon provedene validacije, može se tvrditi da je kromatografska metoda primjenjiva za određivanje diklofenaka u vodi.

6 LITERATURA

- [1] grupa autora, Analitika okoliša, ur. M. Kaštelan-Macan i M. Petrović, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str. 75-81, 206-21.
- [2] R. E. Hester, R. M. Harrison, Issues in Environmental Science and Technology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016, str. 4-6.
- [3] S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, pregledni članak, Hrvatske vode, 24 (96) (2016) 119-136.
- [4] P. Patnaik, Analytical Techniques, u Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Solid Wastes, 2nd ed, CRC Press, Boca RAton, 2010., str. 3.
- [5] M. Periša i S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. 65 [9-10] [2016] 471-482.
- [6] M. Petović, D. Barcelo, Analisis fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle, Comprehensive analytical chemistry, Amsterdam, 2007.
- [7] Nation Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4445819/> , pristup (20.3.2022.).
- [8] S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, 4. izdanje, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2011., IX. 1.
- [9] L. S. Ettre, Chapters in the Evolution of Chromatography-edited by John V. Hinshaw, Singapore, 2008, str. 15-16.
- [10] D. A. Skoog, D. M. West i F. J. Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th ed, USA, 2014, str. 912-932.
- [11] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 241.-262.
- [12] Lukić, Academia, https://www.academia.edu/7017481/SVEU%C4%8CILI%C5%A0TE_U_ZAGREBU_FAKULTET_KEMIJSKOG_IN%C5%BDENJERSTVA_I_TEHNOLOGIJE_ZAVOD_ZA_ANALITIKU_KEMIJU (pristup 26.3.2022.).
- [13] F. Xavier Ruis, I. Ruisanchez Capelastegui, Validation of Qualitative Analytical Methods, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2006., str. 45.
- [14] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda-osnovna načela, Laboratoriji, 2012., str. 61.

- [15] J. O. Westgard, S. A. Westgard, <https://www.westgard.com/performance-validation-qualitative-methods.htm> , (pristup 28.3.2022.)
- [16] Ghosh Roy, Losungsfabrik, <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/method-validation/what-is-robustness> (pristup 10.3.2022.).
- [17] Merck, Sigma- Aldrich, https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/d6899?gclid=Cj0KCQjwvLOTBhCJARIsACVldV1gefJIDdhhe6xQHJzRuiC4laStCd4v76aVYoljcZ2VD3Te10zEbnoaAtIQEALw_wcB, pristup (23.4.2022).
- [18] Datta, ResearchData https://www.researchgate.net/figure/Physicochemical-Properties-of-Diclofenac-Sodium_tbl1_274533859 (pristup 28.3.2022.).
- [19] ThermoFischer Scientific, <https://www.thermofisher.in/chemicals/shop/products/diclofenac-sodium-salt-thermo-scientific/ALF-J62609-22> , (pristup 12.4.2022.).

7 ŽIVOTOPIS

Petra Vukovinski [REDACTED] Osnovnu školu Milana Langa u Bregani završava 2015. godine i upisuje opću gimnaziju Antuna Gustava Matoša u Samoboru. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Primijenjene kemije upisuje 2019. godine. Od 2020. godine aktivna je članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera. Stručnu praksu, Petra je odradila 2021. godine u Dechri (Generi), sektor Kontrola kvalitete.