

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje venlafaksina u vodi

Petrin, Damjan

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:149:464341>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Damjan Petrin
ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2021.

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

Kandidat **Damjan Petrin**

Predao je izrađen završni rad dana: 31. kolovoza 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

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

Prof. dr. sc. Dragana Mutvadžić Pavlović, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, zamjena

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

Završni ispit održat će se dana: 3. rujna 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Damjan Petrin

RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRFSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE VENLAFKSA U VODI

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada:

Prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Sandra Babić

Prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, rujan 2021.

Zahvala

Zahvalnost prije svega upućujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić za svu pomoć, savjete i detaljno objašnjavanje svih nedoumica koje sam imao tijekom pisanja završnog rada.

Zahvaljujem asistentu Alanu Badrovu, mag. ing. oecoing. i kolegici Martini Vuković za pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela, za diskusije oko rezultata mjerenja i bolje shvaćanje važnih pojmova.

Zahvaljujem i tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći, suradnji i na dobroj atmosferi tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela završnog rada.

Veliko hvala mom prijatelju dr. sc. Dariu Dabiću na velikoj podršci, pomoći i savjetima tijekom preddiplomskog studija. Također se zahvaljujem i prijateljici Janini Roknić za veliku podršku i savjete tokom studiranja.

Na kraju bih se zahvalio i svom djedu akademiku Tomislavu Cvitašu što me svojevremeno zainteresirao za kemiju, a kasnije pomagao i davao savjete kada sam ih trebao.

SAŽETAK

Analitička kemija od velikog je značaja za industrijski i znanstveni svijet. Konstantno provođenje analiza važno je za razvoj i kontrolu kvalitete proizvoda, a time i za kvalitetu ljudskog života. Nakon razvijanja neke analitičke metode, prvi nužan korak jest njena validacija. Validacija je postupak kojim se utvrđuje prikladnost metode za neku zamišljenu svrhu, a provodi se ispitivanjem niza karakteristika koje se zatim uspoređuju s propisanim zahtjevima (kriterijima). Karakteristike koje se ispituju pri validaciji su linearnost, osjetljivost, preciznost, selektivnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, radno područje, istinitost i robustnost.

Cilj ovog rada bio je razviti i validirati kromatografsku HPLC-PDA metodu za određivanje venlafaksina u riječnim vodama. Izvedbene karakteristike metode ispitane su u dvije različite matrice, u deioniziranoj i u riječnoj vodi. Sve izvedbene karakteristike zadovoljile su postavljene kriterije pa je ova metoda okarakterizirana kao ispravna za određivanje venlafaksina u riječnoj vodi. Također su opisani i instrumenti koji su korišteni u izvedbi eksperimentalnog dijela te njihov način rada, a detaljnije je opisan proces kromatografije i postupak rada na kromatografskom uređaju.

Ključne riječi: validacija metode, kromatografija, venlafaksin, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ABSTRACT

Analytical chemistry is important both in scientific research and in industrial applications. Regular or continuous analyses are essential for the development and quality control of products and hence for the quality of life. After the development of an analytical method, the first necessary step is its validation. It is the process by which the applicability for a definite purpose is critically and carefully quantitatively examined with respect to a list of required characteristic criteria. The properties examined in the validation are linearity, sensitivity, precision, selectivity, limit of detection, limit of quantification, working range, trueness and robustness.

The aim of the present study is to develop and validate a chromatographic HPLC-PDA method for the quantitative determination of venlafaxine in river waters. The validation criteria have been determined in two matrices: deionized water and river water. All the given criteria have been met so that the present method could be declared as valid for the determination of venlafaxine in river waters. In addition, the instruments used in the experimental procedure and the principles of their operation are described. The process of chromatography and work with chromatographic equipment are given in greater detail.

Key words: method validation, chromatography, venlafaxine, high performance liquid chromatography

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	1
2.1. FARMACEUTICI U OKOLIŠU.....	1
2.2. VENLAFAKSIN.....	2
2.2.1. Djelovanje.....	2
2.2.2. Fizikalno – kemijska svojstva.....	3
2.3. KROMATOGRAFIJA.....	4
2.3.1. Podjela kromatografije.....	5
2.3.2. Stupanj razlučivanja.....	6
2.3.3. Faktor zadržavanja.....	6
2.3.4. Separacijski faktor.....	8
2.3.5. Djelotvornost.....	8
2.3.6. Van Deemterova jednadžba.....	11
2.3.7. Dijelovi kromatografa.....	13
2.4. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA.....	15
2.4.1. Parametri validacije.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1. MATERIJALI.....	19
3.2. INSTRUMENTI.....	20
3.2.1. Analitička vaga.....	20
3.2.2. Sustav za filtraciju.....	22
3.2.3. Kromatograf.....	22
3.2.4. Ultrazvučna kupelj.....	23
3.2.5. Deionizator vode.....	24
3.3. METODE RADA.....	25
3.3.1. Priprema otopina.....	25
3.3.2. Rad na kromatografu.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. SELEKTIVNOST.....	28
4.2. LINEARNOST.....	29
4.3. OSJETLJIVOST.....	33
4.4. GRANICE DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE.....	33

4.5. PRECIZNOST	34
4.6. ISTINITOST	39
4.7. RADNO PODRUČJE.....	40
4.8. ROBUSTNOST.....	40
4.9. STABILNOST	42
4.10. SAŽETAK REZULTATA.....	43
5. ZAKLJUČAK	45
6. LITERATURA.....	46
7. ŽIVOTOPIS.....	47

1. UVOD

Razvojem farmaceutske industrije i medicine sve se više novih lijekova proizvodi i stavlja na tržište. Istodobno u okoliš na razne načine dopijevaju novi farmaceutici (putem izlučevina, otpadnih voda, nepropisnim odlaganjem itd. [1]). Ponašanje i toksičnost pojedinih farmaceutika u okolišu drukčija su za svaki farmaceutik i nisu u potpunosti poznata. Iz tog razloga, važno ih je neprestano pratiti, istraživati i nadzirati njihovu koncentraciju u okolišu. U svrhu unaprjeđenja i održanja kvalitete ljudskog života, u laboratorijima diljem svijeta izvode se različite analize u znanstvene, istraživačke ili industrijske svrhe. Za različite analize koriste se drugačije metode, a istodobno se i razvijaju nove. Koja će metoda biti pogodna za koju analizu, utvrđuje se validacijom. Dakle, validacija je nužan korak prije nego metoda zadobije svoju praktičnu primjenu. Njome potvrđujemo da je neka metoda dobra (prikladna) za korištenje u željenoj analizi. Na taj se način u analitičkom svijetu osigurava točnost i kvaliteta podataka. Nužno je validirati sve novo razvijene metode isto kao i one koje se modificiraju. Također, ako se mijenja ili servisira mjerni instrument ili ako se metoda razvijena u jednom laboratoriju želi primijeniti u drugom, opet je nužno provesti validaciju kako bi bili uvjereni u njenu ispravnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FARMACEUTICI U OKOLIŠU

Farmaceuticima se nazivaju spojevi koji se koriste u medicinske svrhe za liječenje ili sprječavanje bolesti kod ljudi i životinja, a također se mogu koristiti i kao promotori rasta u veterinarskoj medicini [1]. Oni spadaju u grupu tzv. „novih zagađivala“, odnosno spojeva koji se dosad nisu smatrali zagađivalima, ali koji zbog svojeg kontinuiranog unosa u okoliš većom brzinom od njihove razgradnje predstavljaju rastuću opasnost za ekosustav [1]. Mogu se unositi izlučevinama ili nepropisnim odlaganjem farmaceutika. Često su za njihov unos u okoliš odgovorna i postrojenja za obradu otpadnih voda koja svojim neučinkovitim uklanjanjem ispuštaju farmaceutike putem vodenih tokova ili putem aktivnog mulja [1]. U okolišu se

farmaceutici mogu razgrađivati abiotički hidrolizom ili fotolizom, a mogu se razgrađivati i biološki djelovanjem mikroorganizama. Produkti razgradnje razlikuju se od izvorne molekule farmaceutika po molekulskoj masi i strukturi ili samo po strukturi. Takvi novonastali spojevi imaju drugačija fizikalna i kemijska svojstva u odnosu na početni farmaceutik pa tako mogu ponekad biti štetniji za okoliš. Kod biološke razgradnje, farmaceutici se mogu potpuno mineralizirati do ugljikova dioksida i anorganskih soli, dok djelomičnom biološkom razgradnjom obično nastaju spojevi stabilniji od početne molekule i drugačijih karakteristika. Kako se veliki broj farmaceutika u okolišu nalazi u vodama, važan faktor je njihova hidrolitička stabilnost. Dok su neki u vodi stabilni i ne solvatiziraju se, drugi se reakcijom hidrolize razgrađuju. Za one koji pokazuju otpornost i na biološku i na hidrolitičku razgradnju, važnu ulogu ima još i fotolitička razgradnja. Pokazalo se da su kromoforne skupine ili skupine poput nitro, fenolne ili naftoksilne podložne fotolitičkoj razgradnji [1]. Da bi došlo do reakcije fotolize, spojevi bi se trebali nalaziti u čistim površinskim vodama, odnosno na mjestima gdje su izloženi Sunčevom zračenju. Također je nužno da takvi farmaceutici apsorbiraju zračenje u području jakog intenziteta emisijskog zračenja Sunca.

Isto tako od velike nam je važnosti poznavati pK_a vrijednosti farmaceutika jer su zbog disocijacije prisutni u različitim oblicima pri različitim pH-vrijednostima, a time posljedično imaju i drugačija svojstva. Kako su farmaceutici u okolišu često prisutni u smjesama, od većeg nam je interesa istraživati i pratiti njihovo ponašanje u smjesi nego u čistoj vodi. U različitim vodama (rijeke, jezera, otpadne vode) drugačije su matrice pa se isti farmaceutik može drugačije ponašati u svakoj od njih. Zbog svega toga, važno je neprestano pratiti koncentracije i udjele farmaceutika u okolišu kao i istraživati njihova ponašanja s obzirom na uvjete u kojima se nalaze.

2.2. VENLAFAKSIN

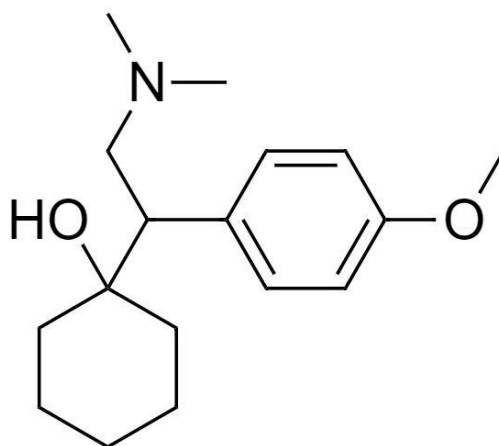
2.2.1. Djelovanje

Venlafaksin je psihijatrijski lijek (antidepresiv) koji je često korišten kod osoba koje pate od depresije, anksioznosti ili napadaja panike [2]. Venlafaksin-hidroklorid prvi je put sintetiziran u američkoj farmaceutskoj tvrtci Wyeth Pharmaceuticals u ranim 1980-im godinama i vrlo brzo se ispostavilo da ima dobar učinak u liječenju depresije. Godine 1994. dobiva odobrenje od

američke agencije FDA (eng. *Food and Drug Administration*) te je po prvi put stavljen na tržište pod imenom „Effexor“ [3]. Smatra se jako učinkovitim antidepresivom, no isto kao i drugi, može uzrokovati dodatne neželjene nuspojave kao što su glavobolja, mučnina, suhoća usta, znojenje ili vrtoglavica. Po svom načinu djelovanja spada u grupu antidepresiva koja se naziva SNRI (eng. *Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors*). Takva vrsta antidepresiva djeluje na neurotransmitere (glasnike koji služe za komunikaciju između moždanih stanica) i blokiraju reapsorpciju serotonina i norepinefrina [4]. Na taj način se povisuje (regulira) njihova razina u mozgu što kod čovjeka uzrokuje bolje raspoloženje.

2.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva

Molekula venlafaksina (*Slika 1*) je aromatska molekula formule $C_{17}H_{27}NO_2$ i molarne mase 277,4 g/mol. Službeni IUPAC-ov naziv je 1-[2-(dimetilamino)-1-(4-metoksifenil)etil]cikloheksan-1-ol. Topljivost venlafaksina u vodi pri 25 °C iznosi 267 mg/mL, dok je njegova topljivost u obliku soli venlafaksin hidroklorid veća i iznosi 572 mg/mL [5]. Osjetljiv je na svjetlo pa se stoga mora držati u zatamnjanim bočicama. Venlafaksin ima pK_a vrijednost 10,09 i u okolišu se uglavnom nalazi u svom kationskom obliku te je kao takav više podložan adsorpciji na organske molekule iz tla. Zbog svog kationskog oblika jako teško isparava iz vlažnih tla, što se očituje njegovim niskim tlakom para od $2,7 \cdot 10^{-7}$ mmHg pri 25 °C [5].



Slika 1. Struktura molekule venlafaksina

Njegov koeficijent raspodjele u smjesi oktanol-voda iznosi $pK_{ow} = 3,20$ što nam govori da je otprilike 1600 puta topljiviji u oktanolu nego u vodi. Iz ovoga se može vidjeti kako venlafaksin više preferira hidrofobnu matricu, odnosno da mu više odgovara nepolarno otapalo te da mu je tendencija vezivanja molekula vode ili hidrofilnost slabije izražena.

Ovaj podatak je također korisno znati prilikom rada na HPLC instrumentu. Kod izbora pokretne (mobilne) faze, analitičar odabire omjer organskog i vodenog otapala u pokretnoj fazi. Voda je hidrofilna tvar, dok organska otapala u pravilu imaju izraženiji hidrofobni karakter. Ukoliko farmaceutik ima jače izražen hidrofobni karakter, povećanjem udjela organskog otapala u pokretnoj fazi farmaceutik će brže eluirati kroz kolonu i prije će doći do njegove detekcije (pojave pika). Kada bi povećali udio vodenog otapala, farmaceutik bi teže eluirao pa bi trebalo dulje da dođe do njegove detekcije.

2.3. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je definirana kao fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna i kreće se određenim smjerom. Ona je najučinkovitija separacijska tehnika i kao takva je široko zastupljena u brojnim analitičkim postupcima, pogotovo u područjima koja se tiču zaštite okoliša i kvalitete ljudskog života.

Osnovni dijelovi kromatografskog sustava su pokretna faza, nepokretna faza te ispitivana tvar, odnosno analit. Tijekom samog procesa sastojci uzorka su u stanju dinamičke ravnoteže između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze. Do razdvajanja tvari dolazi zbog njihovih različitih ravnoteža, odnosno raspodjela između tih dviju faza. Pokretna faza se kreće kroz ili uzduž nepokretne faze. Nepokretna faza može biti čvrsta, kapljevita ili u obliku gela. Ona obično igra glavnu ulogu u kromatografskoj separaciji i odabire se ovisno o prirodi analita, odnosno tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno. Također, mogu postojati još vezana i imobilizirana faza. To su nepokretne faze koje su vezane kovalentnim vezama, odnosno imobilizirane na čestice nosača ili na unutrašnju stijenkku kolone [6].

2.3.1. Podjela kromatografije

Kromatografija se dijeli na više načina. Prema obliku kromatografske podloge kromatografija se dijeli na kolonsku i plošnu kromatografiju. U kolonskoj kromatografiji nepokretna faza nalazi se unutar cijevi (kolone). Može popunjavati cijelu unutrašnjost cijevi (punjene kolone), a može biti koncentrirana na ili uzduž stijenke, ostavljajući otvoreni put za pokretnu fazu kroz sredinu cijevi (kolone otvorenog tipa). U plošnoj kromatografiji nepokretna faza je ploha ili sloj nanesen na plohu. Postoje papirna kromatografija (eng. *paper chromatography*, PC) kod koje je ploha papir i tankoslojna kromatografija (eng. *thin-layer chromatography*, TLC) u kojoj je sloj čvrstih čestica nanesen na nosač. [6]

Obzirom na fizikalno stanje pokretne faze postoje plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*, GC), tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*, LC), i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (eng. *supercritical fluid chromatography*, SFC) [6]. Podjela može biti i detaljnija, uzimajući u obzir i fizikalno stanje nepokretne faze. Tako postoje plinsko-tekućinska (eng. *gas-liquid chromatography*, GLC), plinsko-čvrsta (eng. *gas-solid chromatography*, GSC), tekućinsko-tekućinska (eng. *liquid-liquid chromatography*, LLC), tekućinsko-čvrsta (eng. *liquid-solid chromatography*, LSC) i plinsko-tekućinska razdjelna kromatografija (eng. *gas-liquid partition chromatography*, GLPC). Danas se u tekućinskoj kromatografiji koriste kolone s finim česticama (promjera nekoliko mikrometara) i visoki tlakovi. Takva vrsta kromatografije naziva se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili HPLC (eng. *high performance liquid chromatography*).

Kromatografske tehnike mogu se dijeliti i s obzirom na mehanizam separacije, odnosno na vrstu dinamičke ravnoteže koja se uspostavlja između dviju faza. Tako postoje razdjelna, adsorpcijska, afinitetna, ionsko-izmjenjivačka kromatografija i kromatografija isključenjem. Razdjelna kromatografija temeljena je na različitoj topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi (GC) ili između pokretne i nepokretne faze (LC). U adsorpcijskoj kromatografiji separacija se temelji na razlici u afinitetu sastojaka uzorka prema površini adsorbensa. Afinitetna kromatografija je tip kromatografije u kojoj se koristi jedinstvena biološka interakcija analita i liganda. Kod ionsko-izmjenjivačke kromatografije do separacije dolazi zbog razlike u afinitetu sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni. Kod kromatografije isključenjem, razdvajanje se temelji na razlikama u veličini i/ili obliku molekula i naboju [6]. Kada je nepokretna faza čvrsti materijal s porama određenih dimenzija, do razdvajanja sastojaka uzorka doći će zbog njihovih različitih veličina.

2.3.2. Stupanj razlučivanja

Jedan od glavnih ciljeva u kromatografskoj analizi je postizanje što boljeg razdvajanja sastojaka. Informacija o uspješnosti ili stupnju razdvajanja dana je veličinom koja se naziva stupanj razlučivanja ili R_S -vrijednost. U tekućinskoj kromatografiji, ona ukazuje na uspješnost razlučivanja dviju kromatografskih krivulja (pikova). Može se izraziti pomoću prosjeka širina osnovica pikova (*jednadžba 1*) ili pomoću parametara o kojima ovisi razlučivanje (*jednadžba 2*) [7].

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (1)$$

R_S – stupanj razlučivanja

t_R – vrijeme zadržavanja

w_b – širina osnovice kromatografske krivulje (pika)

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{1 + k} \quad (2)$$

N – broj teorijskih odsječaka (broj kojim se označava djelotvornost kolone)

α – separacijski faktor (faktor odjeljivanja)

k – faktor zadržavanja

2.3.3. Faktor zadržavanja

Faktor zadržavanja (k) je veličina koja ukazuje na to koliko duže sastojak putuje kroz kolonu zbog zadržavanja u nepokretnoj fazi nego što bi putovao brzinom pokretne faze. Definira se kao omjer vremena koje sastojak uzorka provede u nepokretnoj fazi i vremena koje provede u pokretnoj fazi [6].

$$k = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

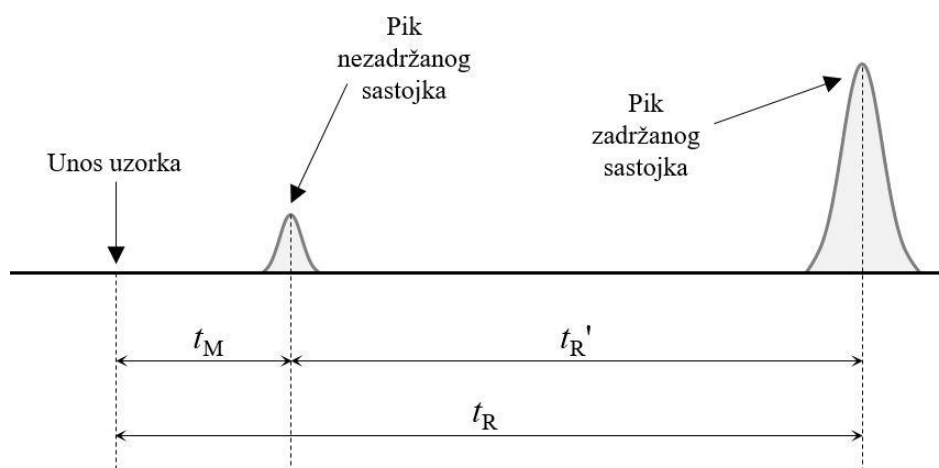
k – faktor zadržavanja

t_R' – prilagođeno vrijeme zadržavanja

t_M – zadržano vrijeme

t_R – vrijeme zadržavanja

Vrijeme zadržavanja je vrijeme koje prođe od trenutka unošenja uzorka do maksimalnog odziva (maksimuma pika) sastojka koji se određuje, čime je uključeno i zadržano vrijeme (Slika 2). Zadržano vrijeme je vrijeme potrebno za ispiranje sastojka koji uopće nije zadržan u nepokretnoj fazi (čija je koncentracija u nepokretnoj fazi zanemariva u odnosu na njenu koncentraciju u pokretnoj fazi). Drugim riječima, to je vrijeme od trenutka unošenja uzorka do detekcije sastojka koji se ne zadržava u nepokretnoj fazi. Prilagođeno vrijeme je razlika vremena zadržavanja i zadržanog vremena. Ako je protok pokretne faze kroz kolonu konstantan, sve navedene vremenske veličine mogu se također iskazivati i volumenima pokretne faze; volumen zadržavanja (V_R), zadržani volumen (V_M) i prilagođeni volumen zadržavanja (V_R') [6].



Slika 2. Tipični kromatogram s ispisom dobivenim diferencijalnim detektorom

Faktor zadržavanja je veličina koja ne ovisi niti o iznosu protoka niti o dimenzijama kolone i stoga je korisna za usporedbu iste analize na različitim HPLC uređajima. Kada je faktor zadržavanja manji od 1, to može značiti da je analit eluirao (eluirati = ispirati = razvijati) s nekim drugim sastojkom uzorka ili zajedno s otapalom. Nakon što je faktor razlučivanja jednak 5, daljnjim povećanjem k neznatno bi utjecali na stupanj razlučivanja (jednadžba 2) a istodobno bi se zahtijevalo mnogo dodatnog vremena. Stoga optimalne vrijednosti faktora razlučivanja iznose između 1 i 5. Kod kompleksnijih višekomponentnih uzoraka, optimalni faktori razlučivanja mogu iznositi između 2 i 10, a ako se ni s faktorom 10 ne dobiva željeni

stupanj razlučivanja, korisnije je utjecati na druge parametre o kojima ovisi razlučivanje (separacijski faktor ili djelotvornost) [7].

2.3.4. Separacijski faktor

Separacijski faktor ili faktor odjeljivanja (također zvan i selektivnost, iako se taj izraz ne preporuča) je vrijednost relativnog zadržavanja izračunatog za dvije susjedne kromatografske krivulje (pika) [6]. On ukazuje na sposobnost kromatografskog sustava da postigne razlikovanje sastojaka iz uzorka. Matematički se definira omjerom faktora zadržavanja dvaju različitih sastojaka uzorka čiji su pikovi susjedni.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (4)$$

α – separacijski faktor

k_2 – faktor zadržavanja duže zadržane komponente

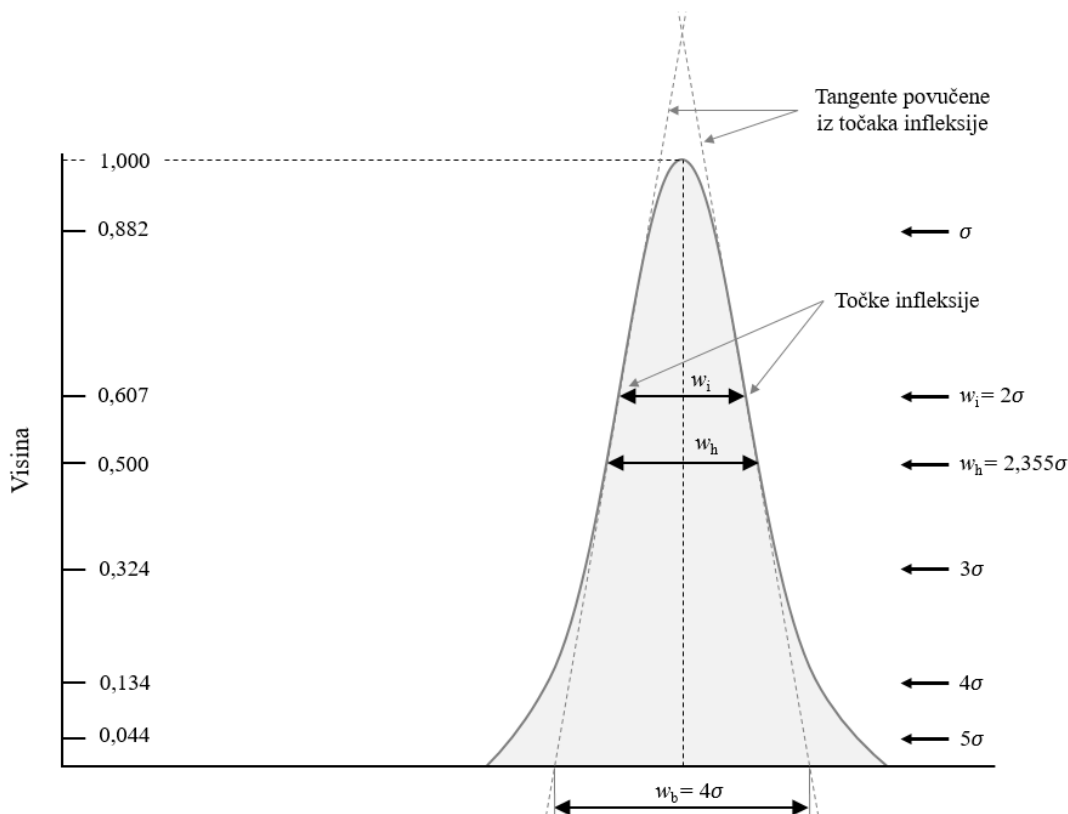
k_1 – faktor zadržavanja kraće zadržane komponente

Po definiciji, separacijski faktor uvijek je veći od 1, osim u slučaju kada bi sastojci istodobno eluirali, odnosno kada bi imali jednak faktor zadržavanja te bi njihov omjer tada bio jednak 1. Najveći utjecaj na separacijski faktor ima odabir nepokretne faze, što je ujedno i ključno za uspješno razlučivanje sastojaka iz uzorka. Također je još moguće utjecati i promjenom organskog otapala, promjenom omjera organskog i vodenog otapala pokretne faze, dodavanjem raznih aditiva u pokretnu fazu te promjenom temperature i pH pokretne faze. Neke kolone izrađene od silike nisu otporne na ekstremne pH-vrijednosti što također treba uzeti u obzir pri optimizaciji metode.

2.3.5. Djelotvornost

Djelotvornost ili učinkovitost definira se kao mjera disperzije pojasa analiziranog sastojka (njegove širine pika). U uvjetima idealne kromatografije, dobivene kromatografske krivulje (pikovi) za određene sastojke bile bi tanke okomite linije. Kako tijekom eluiranja uzorka dolazi

do disperzijskih efekata, kromatografske krivulje se šire i u konačnici poprimaju oblik nalik Gaussovoj krivulji (Slika 3). Na taj način smanjena je djelotvornost, odnosno učinkovitost separacije. Kvantitativno se djelotvornost izražava brojem teorijskih odsječaka (N) koji se za određeni sastojak uzorka izračunava pomoću volumena ili vremena zadržavanja i širine pika, odnosno standardnog odstupanja Gaussove krivulje (jednadžbe 5, 6 i 7).



Slika 3. Širina Gaussove krivulje pri različitim visinama, kao funkcija standardnog odstupanja krivulje

$$N = \left(\frac{V_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad (5)$$

$$N = 16 \left(\frac{V_R}{w_b}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (6)$$

$$N = 5,545 \left(\frac{V_R}{w_h}\right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \quad (7)$$

N – broj teorijskih odsječaka

V_R – volumen zadržavanja

t_R – vrijeme zadržavanja

σ – standardno odstupanje

w_b – širina kromatografske krivulje (pika) pri osnovici

w_h – širina kromatografske krivulje (pika) pri polovici visine

Broj teorijskih odsječaka predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža između nepokretne i pokretne faze, o čemu ovisi koliko je separacija učinkovita. Što je veći broj uspostavljenih ravnoteža (veći N), sastojak manje dispergira tijekom eluiranja kroz kolonu i djelotvornost je bolja, odnosno kao rezultat se dobivaju uže kromatografske krivulje (pikovi).

Ovaj način izražavanja djelotvornosti analogan je izrazu za djelotvornost kod frakcijske destilacije. Većim brojem frakcija raste i udio sastojka kojeg izdvajamo u destilatu, odnosno veća je djelotvornost separacije. Ona se još izražava i visinom jednog stupnja destilacije na način da se duljina cijele destilacijske kolone dijeli s brojem stupnjeva. Na isti način se i u kromatografiji koristi visina teorijskog odsječaka (H) da se izrazi djelotvornost (*jednadžba 8*).

$$H = \frac{L}{N} \quad (8)$$

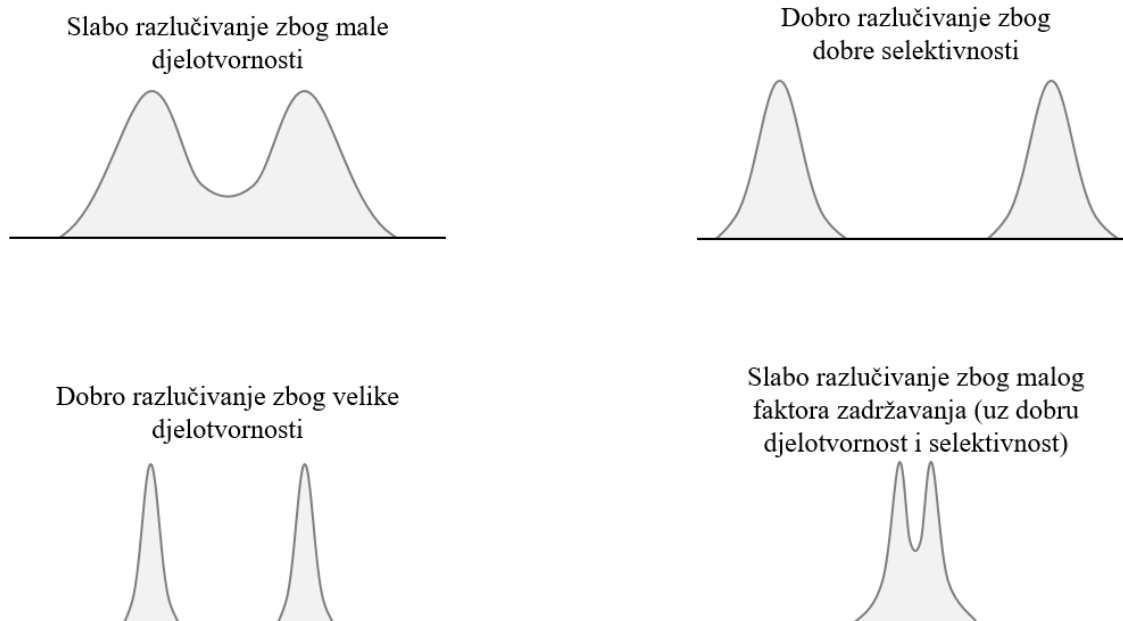
H – visina teorijskog odsječaka

L – duljina kolone

N – broj teorijskih odsječaka

Djelotvornost kolone može se još izraziti i efektivnim brojem teorijskih odsječaka (N_{eff}) ili efektivnom visinom teorijskog odsječaka (H_{eff}) koji se računaju pomoću prilagođenog volumena (V_R') ili vremena zadržavanja (t_R') umjesto ukupnog volumena ili vremena zadržavanja.

Zaključno su prikazani utjecaji djelotvornosti, selektivnosti i faktora zadržavanja na ukupni stupanj razlučivanja dvaju sastojka (*Slika 4*).



Slika 4. Utjecaji djelotvornosti, selektivnosti i faktora zadržavanja na razlučivanje sastojaka

2.3.6. Van Deemter-ova jednadžba

U nastojanju da se što kvalitetnije interpretira širenje kromatografske krivulje uzeti su u obzir kinetički parametri i efekti prijenosa mase do kojih dolazi tijekom kretanja analita kroz kolonu. Kinetički utjecaji na širenje pika ovise o trajanju prijelaza između pokretne i nepokretne faze.

Parametri koji utječu na djelotvornost kromatografske kolone:

Linearna brzina pokretne faze	u (cm s ⁻¹)
Koeficijent difuzije u pokretnoj fazi	D_M (cm ² s ⁻¹)
Koeficijent difuzije u nepokretnoj fazi	D_S (cm ² s ⁻¹)
Promjer čestice punila	d_p (cm)
Debljina filma nepokretne faze	d_f (cm)
Vrijeme odnosno brzina desorpcije analita	t_d (s)
Promjer kolone	d_c (cm)

Nizozemski fizičar Jan van Deemter obuhvatio je navedene efekte te je postavio jednadžbu za djelotvornost izrazivši ovisnost visine teorijskog odsječka o linearnoj brzini pokretne faze (jednadžbe 9 i 10) [8].

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (9)$$

$$H = A + \frac{B}{u} + C_S u + C_M u \quad (10)$$

H – visina teorijskog odsječka

u – linearna brzina pokretne faze

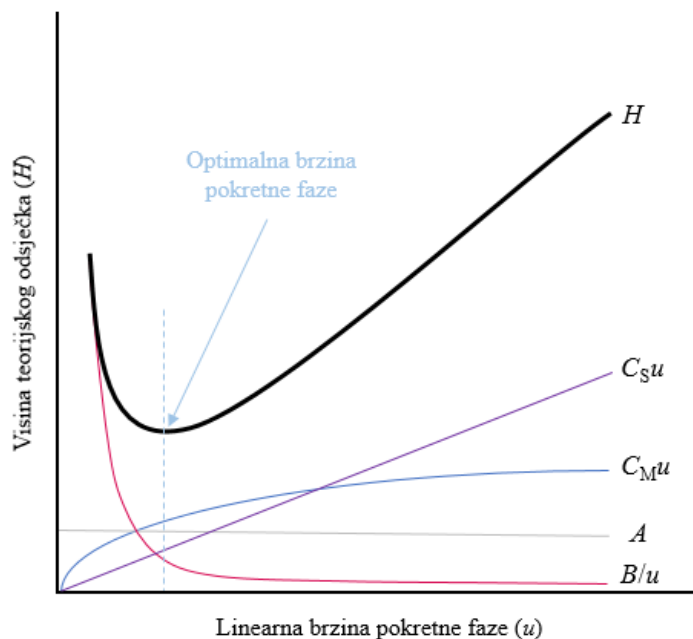
A – koeficijent turbulentne (vrtložne) difuzije

B – koeficijent longitudinalne (linearne) difuzije

C_S – otpor prijenosu mase u i iz nepokretne faze

C_M – otpor prijenosu mase u pokretnoj fazi

Koeficijentom turbulentne difuzije opisuje se utjecaj difuzije molekula analita unutar punila na širenje kromatografske krivulje. Do odvajanja molekula tijekom eluiranja dolazi zato što putuju različitim putevima kroz kolonu pa se stoga i različito dugo zadržavaju. Osim toga, kako sve čestice punila nisu jednakih veličina, protok između čestica može biti drugačiji na različitim mjestima. Koeficijent longitudinalne difuzije uzima u obzir da se molekule analita, osim turbulentnom difuzijom, kreću u određenim smjerovima i zbog vlastite difuzije. Ovaj doprinos jače se osjeti pri niskim protocima (brzinama) pokretne faze. Otpor prijenosu mase u i iz nepokretne faze ima značajan utjecaj na širenje kromatografske krivulje. On ukazuje na vrijeme potrebno da molekule analita dospiju do površine aktivne tvari nepokretne faze, uđu u nju na određeno vrijeme, a zatim izađu i vrate se u pokretnu fazu. Molekule koje se za to vrijeme ne vežu na taj način, one dalje eluiraju zajedno s pokretnom fazom i nalazit će se ispred zaostalih molekula, što za posljedicu ima širenje kromatografske krivulje. Ovi doprinosi prikazani su grafički na *Slici 5*.



Slika 5. Doprinosi pojedinih efekata visini teorijskog odsječka temeljeni na van Deemter-ovoj jednadžbi

2.3.7. Dijelovi kromatografa

Najvažniji dijelovi kromatografskih uređaja su pumpa (još se naziva crpka ili sisaljka), kolona, injektor i detektor. Pumpa je naprava koja služi za protiskivanje pokretne faze u kolonu kontroliranim iznosom protoka. Nužno je da bude inertna na otapala, otopine soli i pufere te da je otporna na koroziju. Iz tog su razloga pumpe najčešće izrađene od nehrđajućeg čelika, titanija ili otpornih mineralnih tvari [9]. Prema svom načinu rada dijele se na ubrizgavajuće, naizmjenične i pneumatske pumpe. Ubrizgavajuće pumpe koriste klip i kod kontrolirane brzine unutar glatkog cilindra protiskuju pokretnu fazu. Naizmjenične pumpe imaju jedan ili više prostora iz kojih protiskuju pokretnu fazu pomoću naizmjeničnih klipova ili dijafragmi. Pneumatske pumpe koriste plin kojim se potiskuje pokretna faza izravno, ili neizravno putem klipa [6].

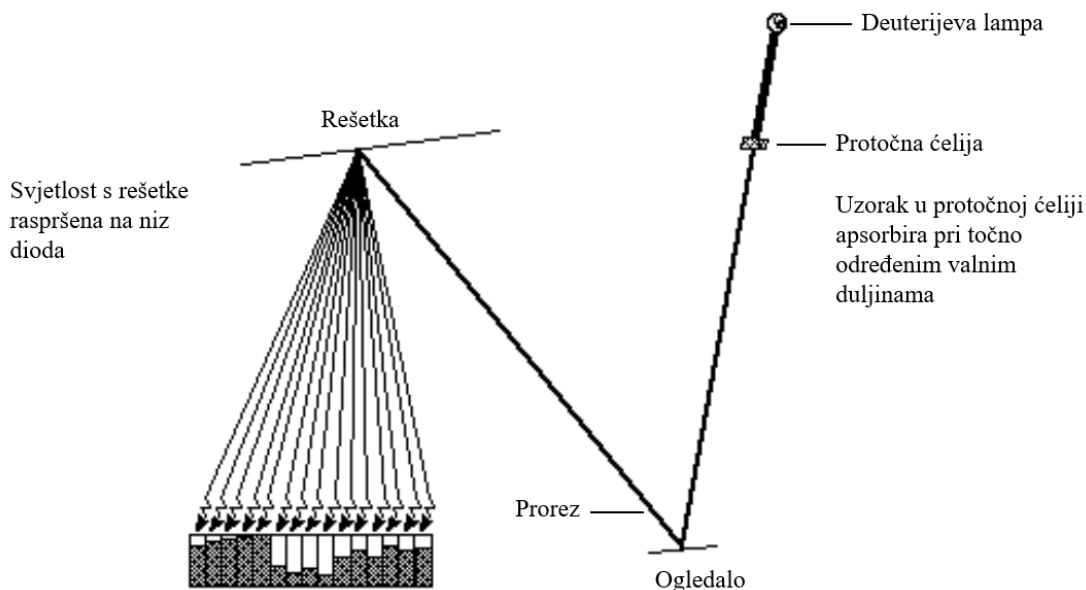
Kolona je cijev u kojoj se nalazi čvrsta nepokretna faza ili nepokretna faza smještena na čvrstom nosaču. Danas se u analizama uglavnom koriste kolone koje u sebi već sadrže na

poroznim česticama kemijski vezanu fazu s kojom sastoji uzorka tvore interakcije i na njoj se zadržavaju. Prema dimenzijama unutarnjeg promjera, kolone se dijele na preparativne ($d_c > 4,6$ mm), analitičke kolone visoke djelotvornosti ($1,0 \text{ mm} < d_c < 4,6 \text{ mm}$), kapilarne kolone ($0,1 \text{ mm} < d_c < 1,0 \text{ mm}$) te nano kolone ($d_c < 0,1 \text{ mm}$). Izbor kolone ključan je za uspjeh separacije jer nepokretna faza ugrađena u koloni ima najvažniju ulogu u odvajanju sastojaka na temelju određenih fizikalnih i kemijskih svojstava. Kako se tijekom analize koriste visoki tlakovi, kolone se obično izrađuju od nehrđajućeg čelika. U manjoj mjeri koriste se staklene ili polimerne (PEEK) kolone [9].

Injektor je uređaj pomoću kojeg se uzima određeni volumen uzorka i unosi (injektira) u struju pokretne faze. Volumeni injektiranja uobičajeno iznose između 5 i 20 μL .

Detektori su uređaji koji mjere promjene u sastavu eluata mjerenjem fizikalnih ili kemijskih svojstava [6]. Njihova zadaća je pretvorba fizikalnih ili kemijskih podražaja u mjerni signal koji je u izravnoj vezi s identifikacijom ili kvantifikacijom sastojaka uzorka. Prema obliku odziva dijele se na diferencijalne i integralne detektore. Diferencijalni detektori bilježe trenutačne razlike u sastavu eluata, dok integralni detektori bilježe ukupnu količinu sastojka koji dolazi u detektor. Prema temelju odziva, postoje detektori osjetljivi na koncentraciju i detektori osjetljivi na prijenos mase. Detektorima koji su osjetljivi na koncentraciju dobivaju se odzivi proporcionalni koncentraciji sastojka u eluatu, a kod detektora osjetljivih na prijenos mase odzivi su proporcionalni količini sastojka koja dolazi u detektor u jedinici vremena [6].

Danas se na HPLC instrumentima koriste razne vrste detektora koji se dijele obzirom na način rada. Tako postoje UV/VIS, fluorescentni, elektrokemijski, radioaktivni, konduktometrijski, kemiluminescentni detektori s dušikom, kiralni, detektori s indeksom loma, detektori s raspršenjem svjetlosti i aerosolni detektori [10]. Najčešće su od njih korišteni UV/VIS detektori obzirom da većina analiziranih sastojaka apsorbira zračenje u tom području. Jedan od tipova UV/VIS detektora je i PDA detektor (eng. *photo diode array*) (Slika 6) koji je korišten u ovom radu.



Slika 6. Shematski prikaz mehanizma rada PDA detektora [11]

Kod PDA detektora, kao izvor zračenja koriste se deuterijeve ili volframove lampe. Zrake zatim prolaze kroz protočnu ćeliju (kroz koju protječe pokretna faza), izlaze iz ćelije, reflektiraju se i kroz prorez dolaze na rešetku. S rešetke se zrake dalje raspršuju s obzirom na valnu duljinu i padaju na niz fotodioda (Slika 6). Svaka od dioda apsorbira zrake točno određene valne duljine. Detektor mjeri struju potrebnu za punjenje svake od dioda pri čemu je struja izravno proporcionalna količini svjetlosti određene valne duljine koja je propuštena kroz protočnu ćeliju u nekom vremenskom intervalu. Dakle, kako uzorak u ćeliji apsorbira točno određene valne duljine, neke od dioda puniti će se slabije (manjom strujom) iz čega dobivamo informaciju o apsorbiranim valnim duljinama [11].

2.4. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Osim što je svakome u interesu koristiti pouzdane metode, nekada se, od strane nekih firmi ili tvrtki, zahtijevaju točno određeni kriteriji prihvatljivosti izvedbenih karakteristika kojima se potvrđuje ispravnost određene metode. Ti kriteriji ili zahtjevi obično su propisani zakonskim regulativama, pa u tom smislu validacija osim što je sastavni dio struke, postaje i obveza koju analitičar izvršava prije nego metoda počne imati praktičnu primjenu. Na taj način osigurava se pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Općenita definicija validacije bila bi da je to postupak kojim se dokazuje da određena metoda služi namjeni. U samom postupku obuhvaća

se ispitivanje niza izvedbenih karakteristika koje se uspoređuju sa zadanim zahtjevima korisnika te se u konačnici izdaje izjava o udovoljavanju zahtjevima. Ako se validacijom određuju sve izvedbene karakteristike, govori se o potpunoj validaciji, a nekada se ispituje samo dio karakteristika pa je u tom slučaju riječ o djelomičnoj validaciji. Različite metode će zahtijevati drugačije pristupe, pa se tako validacije kod kvalitativnih metoda razlikuju od onih za kvantitativne metode. Iako bi svaka metoda zahtijevala individualni pristup, postoje osnovne izvedbene karakteristike koje su općenito prihvaćene kod svih metoda:

- ✓ Selektivnost / Specifičnost
- ✓ Linearnost
- ✓ Osjetljivost
- ✓ Granica kvantifikacije
- ✓ Granica detekcije
- ✓ Radno područje
- ✓ Preciznost (ponovljivost, međupreciznost, obnovljivost)
- ✓ Istinitost
- ✓ Robustnost

2.4.1. Parametri validacije

Pojmovi selektivnosti i specifičnosti često se poistovjećuju, no ipak postoji razlika među njima. Specifičnost neke metode definira se kao svojstvo metode da se njome određuje točno željena komponenta (može biti sama ili u smjesi s drugim komponentama), dok je selektivnost svojstvo metode da se željena komponenta uspješno određuje u prisutnosti drugih komponentata. Selektivnost se inače može dokazati usporedbom odziva standarda i slijepe probe, dok se u kromatografskim metodama selektivnost očituje razmakom među pikovima (separacijskim faktorom) [12].

Linearnost je svojstvo metode da se njome u određenom mjernom području dobivaju rezultati koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Može se utvrditi grafički (vizualno) izradom umjernog pravca ili pomoću grafa konstantnog odziva (odziv/koncentracija vs. koncentracija). Može se još odrediti i matematički na način da se izradi umjerni pravac, provede linearna regresija te odredi koeficijent determinacije (R^2) [12].

Osjetljivost metode je opisana nagibom umjernog pravca. Što je veći nagib to je veća i osjetljivost.

Preciznost je svojstvo metode da se rezultati mjerenja poklapaju kada se provodi niz mjerenja istog homogenog uzorka u točno određenim uvjetima. Može se određivati svojstvima ponovljivosti, međupreciznosti ili obnovljivosti. Ponovljivost metode odnosi se na rezultate mjerenja kada se mjerenje sprovede u kratkom vremenskom razdoblju. Svojstvo međupreciznosti se određuje provođenjem mjerenja u dužem vremenskom intervalu (u različitim danima) ili provođenjem nizova mjerenja u drugačijim uvjetima (različiti analitičari i instrumenti). Obnovljivost metode je svojstvo kod kojeg se uspoređuju rezultati mjerenja provedenih u različitim uvjetima (u dva različita laboratorija) i obično se određuje prilikom standardizacije (normizacije) metoda. Pri određivanju preciznosti uobičajeno se provode po 5-10 mjerenja na 3 ili više različitih koncentracija iz područja linearnosti [12].

Istinitost je mjera podudaranja između stvarne referentne vrijednosti i srednje vrijednosti rezultata beskonačnog broja mjerenja dobivenih određenom metodom. Istinitost se očituje sustavnim odstupanjem, odnosno konstantnom razlikom između stvarne vrijednosti i aritmetičke sredine rezultata mjerenja.

Točnost metode je funkcija preciznosti i istinitosti. Porastom preciznosti i istinitosti raste i točnost.

Radno područje definira se kao raspon između donje i gornje koncentracije analita koja se može odrediti uz odgovarajuću linearnost, preciznost i istinitost [12]. Taj se raspon obično određuje iz grafa linearnosti, a donja granica se također može potvrditi i računanjem granice kvantifikacije. Sužavanjem radnog područja postiže se veća točnost metode.

Granica detekcije predstavlja najnižu koncentraciju analita za koju se određenom metodom dobiva signal odziva, odnosno koja se može detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti. Može se uvidjeti iz samih rezultata mjerenja, a može se i računati formulom:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_y}{b} \quad (11)$$

LOD – granica detekcije (eng. *limit of detection*)

S_y – rezidualno standardno odstupanje

b – nagib umjerne krivulje

Granica kvantifikacije predstavlja najnižu koncentraciju analita koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom točnošću. Računa se formulom:

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_y}{b} \quad (12)$$

LOQ – granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*)

S_y – rezidualno standardno odstupanje

b – nagib umjerne krivulje

Rezidualno standardno odstupanje je veličina kojom se opisuje usklađenost niza podataka (točaka) sa stvarnom vrijednošću, odnosno predstavlja mjeru odstupanja točaka od umjernog pravca.

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}} \quad (13)$$

S_y – rezidualno standardno odstupanje

y_i – izmjerena površina (očitanje iz kromatograma)

\hat{y} – stvarna površina (iz jednadžbe umjernog pravca)

n – broj mjerenja odnosno vijala

Robustnost je svojstvo metode da pruži otpornost na promjenu nekih od radnih uvjeta kao što su temperatura, pH, protok pokretne faze ili omjer otapala u pokretnoj fazi kod HPLC-a itd. Za uvjete koji nemaju velikog utjecaja na rezultate mjerenja kaže se da su u području robusnosti. Kada neki od uvjeta imaju utjecaj na rezultate, nužno ih je držati pod kontrolom pri mjerenju [12].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kemikalije korištene u ovom radu prikazane su u *Tablici 1*.

Tablica 1. Kemikalije koje su korištene tijekom izvođenja eksperimenta:

Kemikalija	Formula	Proizvođač i zemlja	Čistoća
Venlafaksin hidroklorid	$C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$	TCI Co. Ltd., Shanghai, Kina	> 98,0 %
Mravlja kiselina	HCOOH	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska	p.a. (98 – 100 %)
Acetonitril	CH_3CN	Fischer Chemical, Pittsburgh, PA, SAD	$\geq 99,9$ % (HPLC Gradient grade)

Kao matice u kojima je venlafaksin određivan korištene su deionizirana i riječna voda. Deionizirana voda dobivana je pomoću instrumenta za deionizaciju koji je detaljnije opisan u poglavlju o instrumentima. Riječna voda uzorkovana je iz Save 23. studenoga 2020. kod Podsusedskog mosta u Zagrebu. U laboratoriju je profiltrirana sustavom za filtraciju s polipropilenskim membranskim filterom GH Polypro i držana svo vrijeme u hladnjaku (4 °C) u boci obloženoj aluminijskom folijom.

Od laboratorijskog posuđa korišteno je:

- laboratorijske čaše (5, 100, 250 i 1000 mL)
- odmjerne tikvice (5, 10, 20 i 100 mL)
- staklena boca s čepom (za čuvanje riječne vode)
- kapalice
- vijale (volumena 1,5 mL)
- žličica
- spatula
- automatske pipete (50-200 μ L, 100-1000 μ L i 1-20 mL)

3.2. INSTRUMENTI

Instrumenti korišteni u izvođenju eksperimenta:

- ✓ Analitička vaga
- ✓ Sustav za filtraciju riječne vode
- ✓ HPLC kromatograf
- ✓ Ultrazvučna kupelj
- ✓ Deionizator vode

3.2.1. Analitička vaga

Općenito postoje vage koje se temelje na mjerenju mase i one koje se temelje na mjerenju težine. Dakle, vagom koja se temelji na mjerenju težine ne bi dobili isti rezultat kada bi vagali na Mjesecu i kada bi vagali na Zemlji obzirom da rezultat ovisi o gravitacijskoj sili. Takve vage funkcioniraju sukladno Hooke-ovom zakonu, odnosno izmjerena masa direktno je proporcionalna otklonu opruge do kojeg dolazi zbog težine tijela [13].

Vage kojima se mjeri masa obično rade na principu usporedbe mase vaganog tijela s nekom poznatom referentnom masom. Danas se najčešće upotrebljavaju vage koje koriste elektromagnetsku silu kao signal odziva. Postoje takvih vaga pozicionirano je nad elektromagnetskom zavojnicom kroz koju teče električna struja i koja se deformira kada se optereti masom nekog tijela. Kao odgovor na deformaciju, pojačalom se povećava iznos električne struje potreban da bi se zavojnica po principu poluge vratila u početni položaj [13]. Potrebna elektomagnetska sila za uravnotežavanje direktno je proporcionalna masi vaganog tijela.

Vaganje venlafaksin-hidroklorida za pripreme standardnih otopina provedeno je na analitičkoj vagi XA105 DualRange, tvrtke Mettler Toledo (*Slika 7*). Karakteristike ove vage dane su *Tablicom 2*.



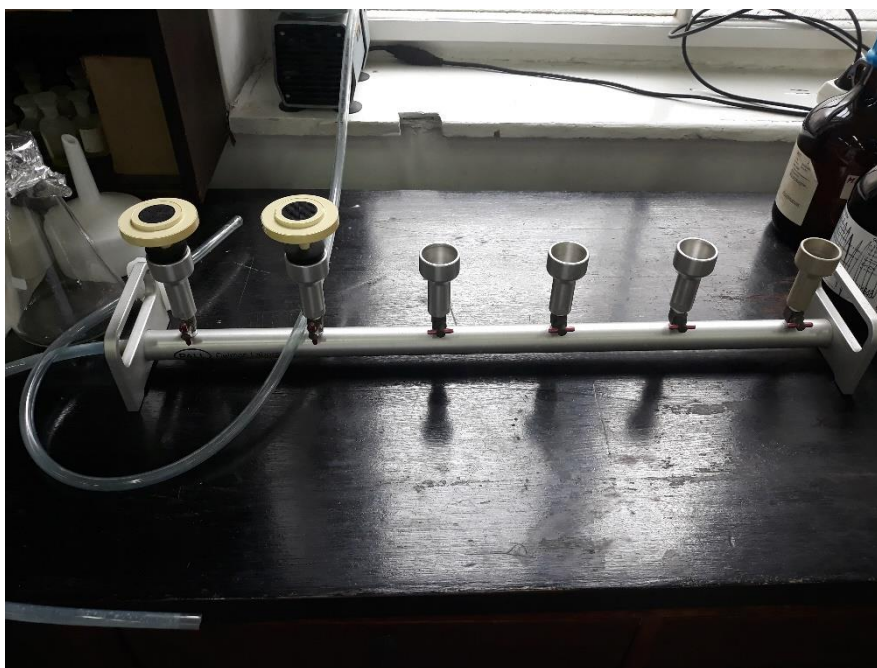
Slika 7. Analitička vaga Mettler Toledo XA105 DualRange

Tablica 2. Specifikacije analitičke vage XA105 DualRange

Maksimalni kapacitet	120 g
Maksimalni optimalni kapacitet	41 g
Očitavanje	0,1 mg
Očitavanje pri optimalnim kapacitetima	0,01 mg
Ponovljivost pri maksimalnim kapacitetima (100 g)	0,1 mg
Ponovljivost pri manjim kapacitetima (10 g)	0,05 mg
Ponovljivost pri optimalnim kapacitetima (10 g)	0,02 mg
Odstupanje od linearnosti	$\pm 0,2$ mg
Osjetljivost	0,8 mg

3.2.2. Sustav za filtraciju

Riječnu vodu bilo je nužno filtrirati radi uklanjanja mogućih čvrstih suspendiranih čestica. Za to je korišten sustav za filtraciju dan *Slikom 8*. Korišteni su polipropilenski membranski filtri GH Polypro (47 mm, 0,45 μm), na tlaku 600 mmHg.



Slika 8. Sustav za filtraciju tvrtke Pall

3.2.3. Kromatograf

Mjerenja uzoraka venlafaksina provedena su na kromatografu Alliance 2795, američke tvrtke Waters (*Slika 9*). Watersovi softverski paketi na HPLC instrumentima dosta su jednostavniji za korištenje (više „user-friendly“) u odnosu na konkurentne proizvođače na tržištu, pa je njihova primjena u novije doba sve veća. Pripremanje kromatografa za analizu provođeno je propisanim protokolom. Model kolone je Kinetex C18, tvrtke Phenomenex. Duljina kolone iznosila je 150 mm, širina 4,6 mm, veličina čestica 5 μm te veličina pora 100 Å (150 x 4,6 mm, 5 μm). Kao detektor korišten je PDA detektor tvrtke Waters. Ova vrsta detektora pogodan je odabir za određivanje venlafaksina, obzirom da molekula venlafaksina sadrži kromofornu skupinu (nezasićene ugljikove veze na benzenskom prstenu) te ima sposobnost apsorpiranja UV zračenja.



Slika 9. HPLC-PDA kromatograf Alliance 2795, Waters 2996

3.2.4. Ultrazvučna kupelj

Ultrazvučna kupelj (Slika 10) korištena je za postizanje potpunog otapanja farmaceutika i dodatnog miješanja u pripremljenim temeljnim standardnim otopinama. Samim puštanjem ultrazvučnih valova kroz otopinu dolazi do povećanja kinetičke energije molekula (što se očituje blagim porastom temperature otopine) i do stvaranja kavitacija, odnosno prostornih šupljina uzrokovanih smanjenjem tlaka otopine.



Slika 10. Ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P, njemačke tvrtke Bandelin electronic

3.2.5. Deionizator vode

Deionizacija vode provodi se propuštanjem kroz membranski filter debljine $0,22 \mu\text{m}$ i specifičnog otpora $18,2 \mu\Omega$. Kada se voda propusti, otpor se trenutno smanjuje zbog prisutstva iona u vodi. Postupnom deionizacijom broj iona se smanjuje i električni otpor raste sve dok ne dosegne maksimalnu vrijednost od $18,2 \mu\Omega$ čime je deionizacija završena. Samim instrumentom mjeri se električni otpor vode i na taj se način nadzire koncentracija iona u vodi [14]. Kao konačni produkt, dobiva se deionizirana voda koja se još naziva i Milli-Q, što označava vodu dobivenu korištenjem membranskog filtera i sustavom za pročišćavanje tvrtke Millipore Corporation (*Slika 11*) [14].



Slika 11. Deionizator vode Millipore, američke tvrtke Millipore Corporation, Billerica, MA, SAD

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprema otopina

Temeljne standardne otopine (TSO) nazivnih koncentracija 10 mg/L pripremane su vaganjem otprilike 1 mg čvrstog venlafaksin-hidroklorida na analitičkoj vagi te otapanjem u deioniziranoj i riječnoj vodi u tikvicama od 100 mL. Nakon dodavanja čvrstog standarda i nadopunjavanja vodom, tikvice su stavljane u ultrazvučnu kupelj kroz približno 30 minuta radi postizanja potpunog otapanja farmaceutika u otopini.

Dalje su pripremane radne standardne otopine nazivnih koncentracija 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10,0 mg/L razrjeđivanjem temeljnih standardnih otopina u tikvicama od 10 i 20 mL. Iz tako pripremljenih standardnih otopina kapaljkom se uzimalo otprilike po 1 mL i stavljalo u vijale.

Kod mjerenja linearnosti, za svaku od 10 navedenih koncentracija pripremljeno je po 3 uzorka (vijala) za snimanje. S dobivenim podacima određene su linearnost, osjetljivost, granica detekcije, granica kvantifikacije i radno područje.

Nakon toga su odabrane 3 koncentracije unutar radnog područja pomoću kojih su provedena daljnja mjerenja (0,5, 2,5 i 7,5 mg/L). Za svaku od 3 koncentracija pripremljeno je po 10 vijala za snimanje. Podaci dobiveni provedenim mjerenjima korišteni su za određivanje preciznosti i istinitosti.

U sklopu preciznosti ispitane su karakteristike ponovljivosti i međupreciznosti. Vremenski razmak između mjerenja ponovljivosti i međupreciznosti kod deionizirane vode iznosio je 7 dana (3.12.2020. – 10.12.2020.), a kod riječne vode 5 dana (10.12.2020. – 15.12.2020.). Kod mjerenja međupreciznosti u deioniziranoj vodi (10.12.2020.), za najnižu koncentraciju (0,5 mg/L) dobiveni su rezultati s velikim odstupanjima i očitim pogreškama, pa je mjerenje za tu koncentraciju ponovljeno 15.12.2020., odnosno 12 dana nakon ispitivanja ponovljivosti za istu koncentraciju i matricu.

Istinitost je iskazana kao iskorištenje i računata je pomoću podataka dobivenih mjerenjem ponovljivosti. Kao referentne, tj. stvarne vrijednosti uzete su teorijske površine pikova dobivene pomoću jednadžbi umjernih krivulja za svaku od voda. Dakle, iskorištenja su računata kao omjer površine očitane iz kromatograma i površine računate odgovarajućom jednadžbom pravca za danu koncentraciju.

U određivanju robustnosti ispitan je utjecaj promjene protoka pokretne faze. Korištena je radna standardna otopina koncentracije 7,5 mg/L te je pripremljeno po 10 vijala za deioniziranu i 10 za riječnu vodu.

Također je određena i stabilnost otopine venlafaksina tako što su mjerenja provedena jednom sa svježe pripremljenom otopinom i drugi put nakon što je otopina odstajala duže vrijeme u određenim uvjetima. Oba puta izmjereno je po 10 uzoraka (vijala) za deioniziranu i 10 za riječnu vodu. Za mjerenja je korištena radna standardna otopina koncentracije 7,5 mg/L.

3.3.2. Rad na kromatografu

Priprema uređaja za kromatografsku analizu provedena je propisanim protokolom koji obuhvaća ispiranje kolone, ispiranje šprice, ispiranje igle i prilagođavanje kolone protoku koji je zadan u metodi. Te su sve funkcije već automatizirane i postavljene u softverskom programu, a analitičar odabire broj ciklusa i volumene ispiranja šprice i igle te vrijeme ispiranja kolone pokretnom fazom. Prilagođavanje kolone zadanom protoku („*Accommodation*“) provodi se postepenim povećavanjem protoka (za 0,1 mL/min) do zadanog te namještanjem omjera otapala u pokretnoj fazi. Time se uređaj pripremi za rad i spreman je za injektiranje uzoraka.

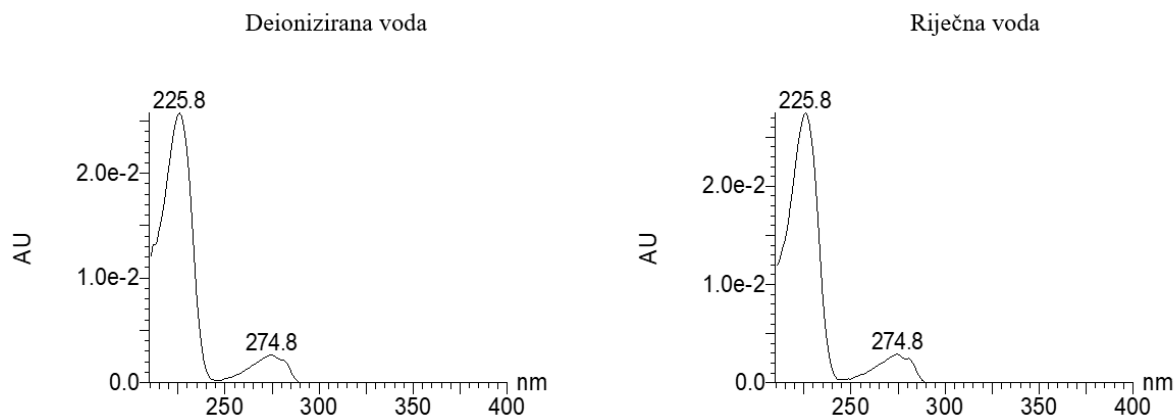
U sučelju softverskog programa zadaju se injektiranja odabirom pozicije uzorka (vijale) na plateu i namještanjem volumena injektiranja. Volumen injektiranja u ovoj metodi iznosio je cijelo vrijeme 20 μ L.

U početku je postavljena metoda s protokom od 1,0 mL/min i omjerom otapala vodena/orgnaska faza = 85:15. Na tako dobivenim kromatogramima nije uočen pik, odnosno u zadanom vremenu venlafaksin nije detektiran. Uzevši u obzir hidrofobnost venlafaksina i činjenicu da je otprilike 1600 puta topljiviji u nepolarnom otapalu, povećan je udio manje polarnog otapala acetonitrila. Tako je novi omjer otapala iznosio vodena/organska faza = 80:20 i na taj način molekule venlafaksina nisu više tolike dugo bile vezane na nepokretnoj fazi. S tim sastavom pokretne faze, venlafaksin je detektiran s vremenom zaržavanja od 6,61 minuta u deioniziranoj i 6,56 minuta u riječnoj vodi.

Kao vodena faza pokretne faze, korištena je 0,1%-tna mravlja kiselina (1 mL HCOOH razrijeđena deioniziranom vodom na 1000 mL), a kao organska faza 0,1%-tna mravlja kiselina u acetonitrilu (1 mL HCOOH razrijeđena acetonitrirom na 1000 mL). U bocama s otapalima nalaze se sisaljke kojima instrument uzima otapala u zadanom omjeru. Bilo je važno kontinuirano pratiti razine pojedinih otapala u bocama i po potrebi nadopunjavati novopripremljenim otapalima kako ne bi došlo do usisavanja zraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Na početku mjerenja, bilo je nužno snimiti apsorpcijski spektar venlafaksina (*Slika 12*) te ustanoviti valnu duljinu pri kojoj je apsorpcija EMZ zračenja maksimalna.

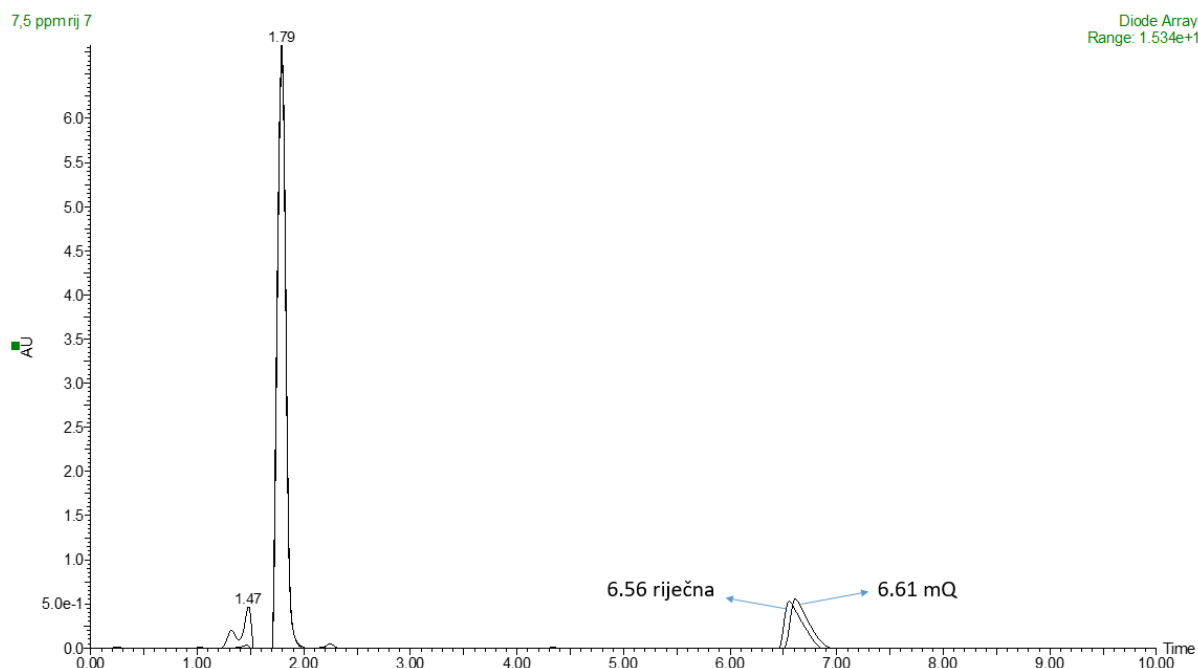


Slika 12. Apсорpcijski spektri venlafaksina u deioniziranoj i riječnoj vodi

Maksimumi dobivenih spektara venlafaksina nalaze se na valnim duljinama od 273,8 i 274,8 nm, većinom na 274,8 nm. Određivanja venlafaksina dalje su provođena pri valnoj duljini od 274,8 nm i na taj način je postignuta najveća moguća osjetljivost u metodi.

4.1. SELEKTIVNOST

Jedan od načina utvrđivanja selektivnosti metode, a koji je korišten u ovom radu, jest usporedba kromatograma u deioniziranoj i realnoj vodi, u ovom radu u riječnoj vodi (*Slika 13*). Kada je vrijeme zadržavanja (t_R) analita u riječnoj matrici isto ili približno jednako onome u deioniziranoj, može se reći da je korištena metoda selektivna za određivanje u riječnoj matrici.



Slika 13. Kromatogrami venlafaksina u deioniziranoj i riječnoj vodi

Vrijeme zadržavanja venlafaksina u riječnoj vodi iznosilo je 6,56 min, a u deioniziranoj vodi 6,61 min. Iz male razlike u vremenu zadržavanja (0,76 %) može se zaključiti kako je ova metoda selektivna za određivanje venlafaksina u riječnoj vodi.

4.2. LINEARNOST

Kao signali odziva dobivani su pikovi različitih veličina, ovisno o kojoj koncentraciji venlafaksina se radilo. Funkcijom integriranja u sklopu programa na računalu, izračunate su površine ispod dobivenih pikova. Jednadžbom umjernog (kalibracijskog) pravca funkcionalno se povezala ovisnost tih površina sa stvarnom koncentracijom venlafaksina u otopini.

Mjerenja površina (A) i obrađeni podatci dani su u *Tablicama 3 i 4* te na *Slikama 14 i 15*. Za koncentracije niže od 0,5 mg/L nisu dobiveni pouzdani odzivni signali na kromatogramu.

Deionizirana voda

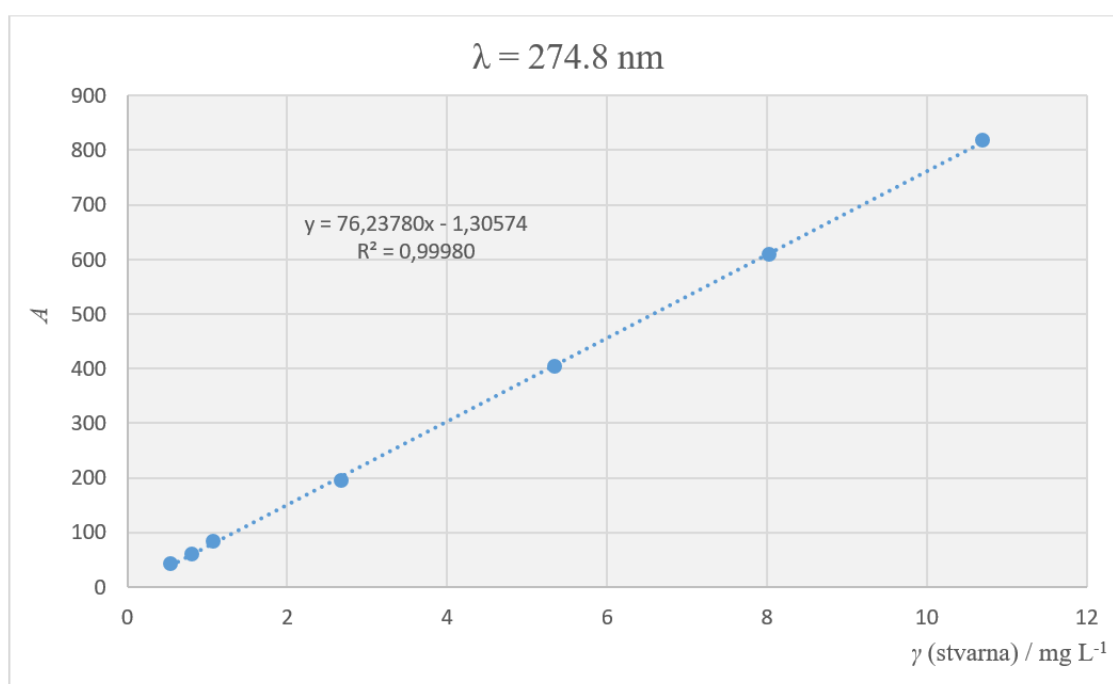
Odvaga venlafaksin-hidroklorida za određivanje linearnosti u deioniziranoj vodi je iznosila:

$$m (\text{VEN}) = 1,07 \text{ mg}$$

$$\gamma (\text{VEN, TSO}) = 10,7 \text{ mg/L}$$

Tablica 3. Obrada podataka za određivanje linearnosti u deioniziranoj vodi

γ (nazivna) / mg L^{-1}	γ (stvarna) / mg L^{-1}	A_1	A_2	A_3	Srednja vrijednost	RSD%
0,5	0,535	40,54	41,23	44,92	42,23	5,58
0,75	0,8025	55,92	65,26	61,48	60,89	7,72
1	1,07	83,82	81,21	88,57	84,53	4,41
2,5	2,675	195,51	194,01	194,11	194,54	0,43
5	5,35	409,20	408,19	396,38	404,59	1,76
7,5	8,025	612,76	597,31	617,46	609,18	1,73
10	10,7	832,13	806,34	814,94	817,80	1,61



Slika 14. Graf linearnosti u deioniziranoj vodi te jednačba umjernog pravca

Riječna voda

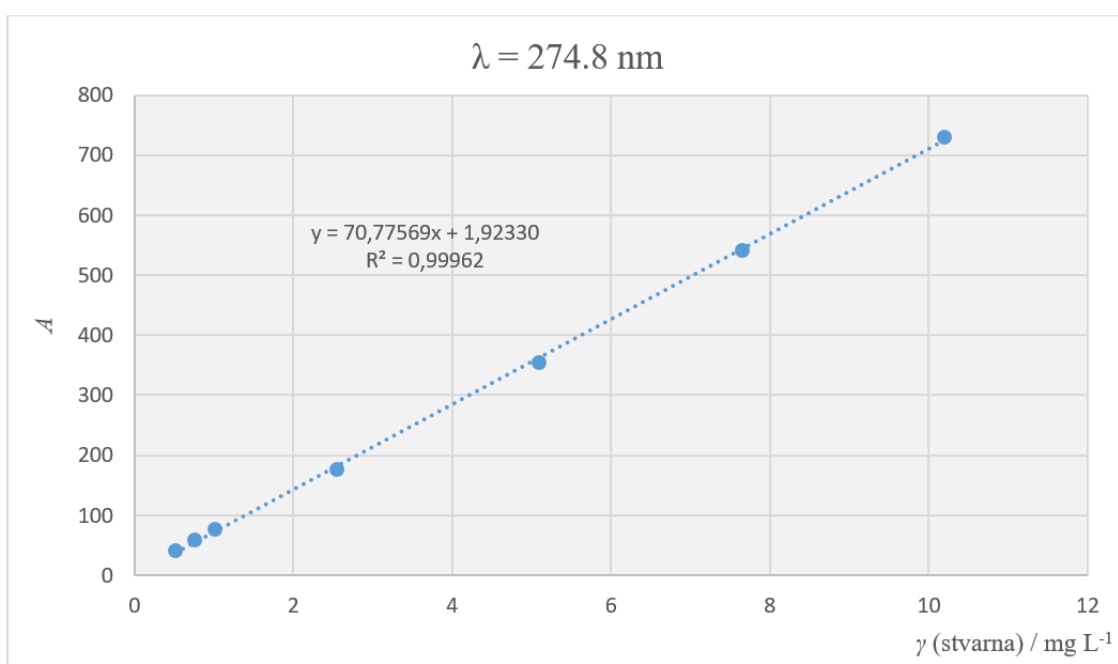
Odvaga venlafaksin-hidroklorida iznosila je:

$$m(\text{VEN}) = 1,02 \text{ mg}$$

$$\gamma(\text{VEN, TSO}) = 10,2 \text{ mg/L}$$

Tablica 4. Obrada podataka za određivanje linearnosti u riječnoj vodi

γ (nazivna) / mg L^{-1}	γ (stvarna) / mg L^{-1}	A_1	A_2	A_3	Srednja vrijednost	RSD%
0,5	0,51	43,83	40,00	41,33	41,72	4,66
0,75	0,765	54,36	64,70	57,64	58,90	8,97
1	1,02	81,86	79,47	69,46	76,93	8,55
2,5	2,55	170,93	174,42	185,02	176,79	4,15
5	5,1	340,83	366,13	357,57	354,84	3,63
7,5	7,65	537,61	552,28	534,85	541,58	1,73
10	10,2	725,40	728,20	736,13	729,91	0,76

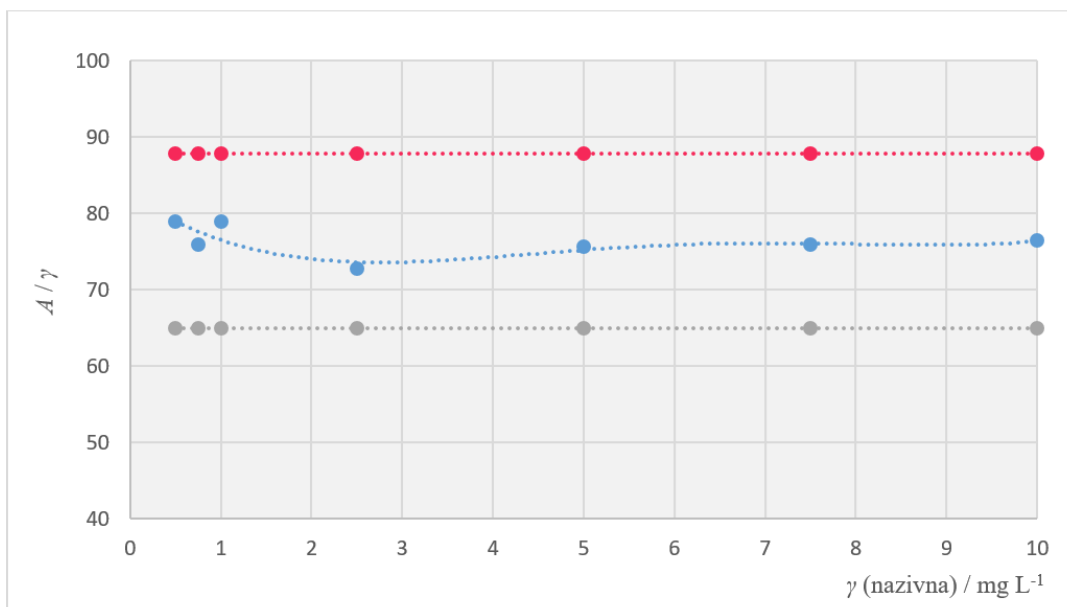


Slika 15. Graf linearnosti venlafaksina u riječnoj vodi i jednadžba umjernog pravca

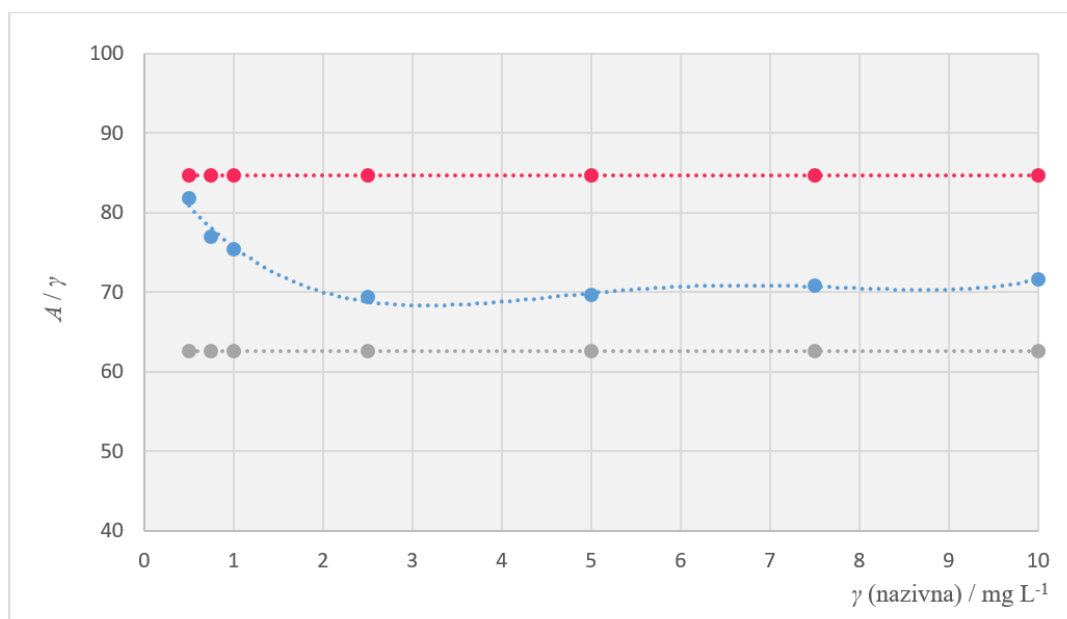
Relativna standardna odstupanja (RSD) su niža od 10 % kod svih koncentracija i u deioniziranoj i u riječnoj vodi i kao takva su zadovoljavajuća.

Koeficijenti determinacije (R^2) veći su od 0,995 i u deioniziranoj i riječnoj vodi čime je zadovoljen uvjet linearnosti.

Linearnost je dodatno potvrđena i grafovima konstantnog odziva (Slike 16 i 17). Na takvim grafovima vizualno su predočena odstupanja od srednje vrijednosti A/γ za pojedine koncentracije. Dozvoljene granice su iznosile $\pm 15\%$ od srednje vrijednosti.



Slika 16. Graf konstantnog odziva u deioniziranoj vodi



Slika 17. Graf konstantnog odziva u riječnoj vodi

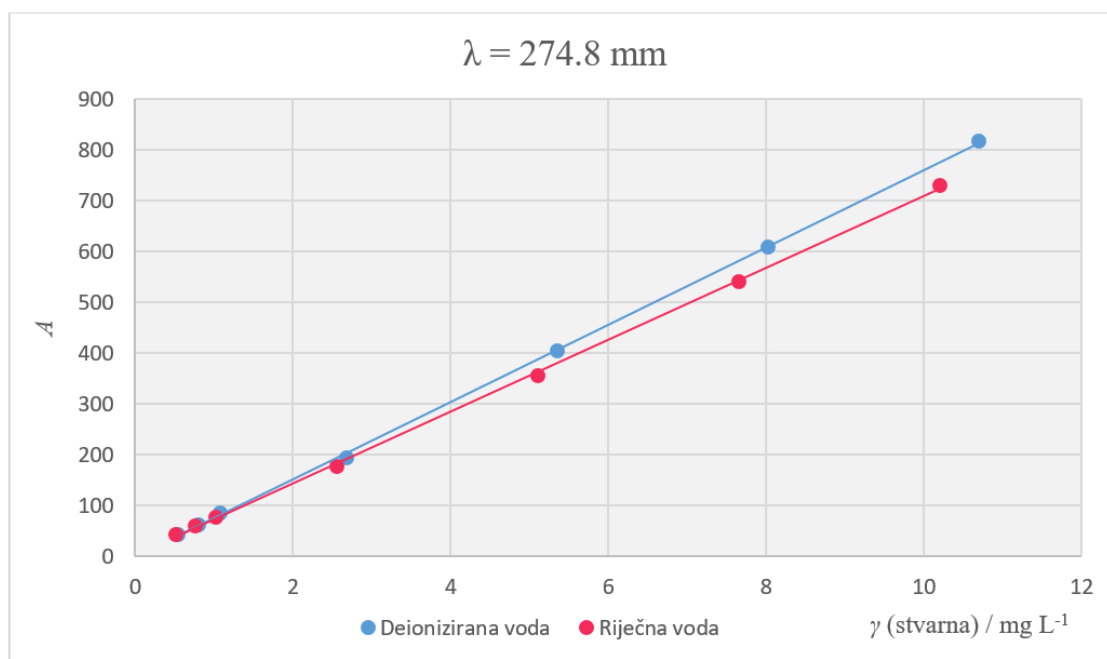
4.3. OSJETLJIVOST

Osjetljivost metoda određena je nagibima umjernih pravaca ovisnosti površine ispod pika o stvarnoj koncentraciji analita.

$$S (\text{deionizirana voda}) = 76,23780 \text{ L mg}^{-1}$$

$$S (\text{riječna voda}) = 70,77569 \text{ L mg}^{-1}$$

Iz podataka se da uočiti da je veći nagib tj. veća osjetljivost u mjerenjima provedenim u deioniziranoj vodi kao što je i grafički prikazano *Slikom 18*.



Slika 18. Usporedba osjetljivosti metode u deioniziranoj i riječnoj vodi

4.4. GRANICE DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE

Granice detekcije i kvantifikacije izračunate su prema jednadžbama (11) i (12) te one iznose:

Deionizirana voda

$$\text{LOD} = 0,1037 \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 0,3144 \text{ mg/L}$$

Riječna voda

LOD = 0,1377 mg/L

LOQ = 0,4174 mg/L

Vrijednosti granica detekcije i kvantifikacije su očekivano nešto veće u riječnoj vodi jer je matrica riječne vode bogatija interferencijama. Kako se i pokazalo u podacima za linearnost, ispod koncentracije 0,5 mg/L nije bilo moguće pouzdano mjeriti koncentraciju analita. Na nekim kromatogramima nije došlo do pojave pika, dok su na nekima dobivani pikovi čija je površina nepouzdanost varirala. Ovo je potvrđeno izračunatim granicama kvantifikacije u deioniziranoj i u riječnoj vodi.

4.5. PRECIZNOST

U sklopu preciznosti ispitivane su karakteristike ponovljivosti i međupreciznosti za koncentracije 0,5, 2,5 i 7,5 mg/L. Za svaku koncentraciju pripremljeno je po 10 uzoraka (vijala) za snimanje.

Maksimalne dozvoljene vrijednosti relativnih standardnih odstupanja za ponovljivost iznose $RSD < 10\%$ u deioniziranoj vodi te $RSD < 15\%$ u riječnoj vodi.

Kako bi se odredila međupreciznost, mjerenja provedena za procjenu preciznosti ponovljena su nakon 7 dana u deioniziranoj, odnosno nakon 5 dana u riječnoj vodi. Obzirom da su ova dva niza mjerenja provedena s temeljnim standardnim otopinama različitih koncentracija, međupreciznost je određena usporedbom standardnih odstupanja (*F*-testom) za ta dva niza mjerenja. Uvjet je da računski dobivena *F*-vrijednost bude niža od kritične *F*-vrijednosti.

Deionizirana voda

Odvaga venlafaksin-hidroklorida za procjenu ponovljivosti u deioniziranoj vodi iznosila je:

$m(\text{VEN}) = 1,12 \text{ mg}$

$\gamma(\text{VEN, TSO}) = 11,2 \text{ mg/L}$

Odvaga za procjenu međupreciznosti u deioniziranoj vodi iznosila je:

$$m (\text{VEN}) = 1,00 \text{ mg}$$

$$\gamma (\text{VEN, TSO}) = 10,0 \text{ mg/L}$$

Mjerenje za procjenu ponovljivosti za deioniziranu vodu provedeno je 3.12.2020., a ponovljeno mjerenje za određivanje međupreciznosti provedeno je 10.12.2020. Za koncentraciju 0,5 mg/L pri ponovljenom mjerenju došlo je do velikih odstupanja pa je to mjerenje još jednom provedeno 15.12.2020. s novom temeljnom standardnom otopinom ($\gamma = 11,2 \text{ mg/L}$) (Tablica 5).

Tablica 5. Rezultati ponovljenih mjerenja površine ispod pika venlafaksina u deioniziranoj vodi

PRECIZNOST (1. DAN)				PRECIZNOST (2. DAN)			
γ (nazivna) / mg L^{-1}	0,5	2,5	7,5	γ (nazivna) / mg L^{-1}	0,5	2,5	7,5
γ (stvarna) / mg L^{-1}	0,56	2,8	8,4	γ (stvarna) / mg L^{-1}	0,56	2,5	7,5
A ₁	41,86	220,46	680,41	A ₁	47,18	178,27	500,35
A ₂	47,24	221,10	662,38	A ₂	43,33	171,98	503,74
A ₃	45,38	227,51	652,30	A ₃	47,62	163,48	493,21
A ₄	39,81	219,10	666,88	A ₄	48,50	156,67	493,85
A ₅	48,45	230,68	657,72	A ₅	54,50	171,55	477,96
A ₆	47,65	243,61	666,06	A ₆	44,87	154,20	494,21
A ₇	41,11	212,14	663,10	A ₇	38,17	172,40	493,72
A ₈	48,38	212,12	660,56	A ₈	40,83	168,66	494,13
A ₉	49,99	220,84	654,94	A ₉	43,25	164,60	510,13
A ₁₀	41,46	221,65	654,28	A ₁₀	48,95	154,70	507,38
AVG	45,13	222,92	661,86	AVG	45,72	165,65	496,87
RSD%	8,25	4,15	1,24	RSD%	10,17	5,04	1,84
s	3,7222	9,2623	8,1943	s	4,6481	8,3415	9,1300

Međupreciznost u deioniziranoj vodi – F -test

Kako bi usporedili standardna odstupanja ponovljenih mjerenja provedenih u različitim danima i tako dobili uvid u međupreciznost, proveden je statistički F -test prema jednadžbi (14):

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (14)$$

F – vrijednost pomoću koje određujemo postoji li karakteristična razlika u nizovima mjerenja s_1 i s_2 – standardna odstupanja dvaju nizova mjerenja

Uvjet je da je $s_1 > s_2$

Kod F -testa postoje dva niza mjerenja čija se standardna odstupanja uspoređuju. Svaki od nizova mjerenja ima svoj stupanj slobode, jedan se odnosi na brojnik ($n_1 - 1$) i drugi na nazivnik ($n_2 - 1$). Kako je u ovom radu provedeno po 10 mjerenja u oba niza ispitivanja preciznosti, stupanj slobode jednak je za brojnik kao i za nazivnik te iznosi $(n - 1) = 9$.

Kritične F -vrijednosti ovise o broju stupnjeva slobode za oba niza mjerenja i tabelirane su obzirom na vjerojatnost uz koju se provodi F -test. Za nizove mjerenja s brojem stupnjeva slobode $(n_1 - 1) = 9$ i $(n_2 - 1) = 9$ te uz vjerojatnost od 95 %, kritična F -vrijednost iznosi 3,18.

Tablica 6. Rezultati procjene međupreciznosti (F -test) u deioniziranoj vodi

	s_1	s_2	$F_{\text{rač.}}$	$F_{\text{rač.}} < F_{\text{krit.}}$
$\gamma = 0,5 \text{ mg/L}$	3,7222	4,6481	1,56	DA
$\gamma = 2,5 \text{ mg/L}$	9,2623	8,3415	1,23	DA
$\gamma = 7,5 \text{ mg/L}$	8,1943	9,1300	1,24	DA

RSD vrijednosti kod mjerenja ponovljivosti niže su od 10 % i F -testom je pokazano da ne postoje signifikantne razlike u preciznosti mjerenja provedena u dva različita dana. Ovime su značajke ponovljivosti i međupreciznosti u deioniziranoj vodi zadovoljene.

Riječna voda

Odvaga venlafaksin-hidroklorida za mjerenje ponovljivosti u riječnoj vodi iznosila je:

$$m(\text{VEN}) = 1,01 \text{ mg}$$

$$\gamma(\text{VEN, TSO}) = 10,1 \text{ mg/L}$$

Odvaga za mjerenje međupreciznosti u riječnoj vodi iznosila je:

$$m(\text{VEN}) = 1,18 \text{ mg}$$

$$\gamma(\text{VEN, TSO}) = 11,8 \text{ mg/L}$$

Mjerenje ponovljivosti u riječnoj vodi provedeno je 10.12.2020., a mjerenje međupreciznosti 15.12.2020. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Rezultati ponovljenih mjerenja površine ispod pika venlafaksina u riječnoj vodi

PRECIZNOST (1. DAN)				PRECIZNOST (2. DAN)			
γ (nazivna) / mg L ⁻¹	0,5	2,5	7,5	γ (nazivna) / mg L ⁻¹	0,5	2,5	7,5
γ (stvarna) / mg L ⁻¹	0,505	2,525	7,575	γ (stvarna) / mg L ⁻¹	0,59	2,95	8,85
A ₁	41,14	197,30	582,87	A ₁	51,63	225,70	690,73
A ₂	44,56	197,21	589,76	A ₂	39,78	242,11	696,98
A ₃	36,68	192,06	594,22	A ₃	52,84	229,50	699,60
A ₄	53,51	205,49	603,83	A ₄	51,42	235,92	713,88
A ₅	46,07	198,33	581,58	A ₅	47,51	234,59	697,94
A ₆	42,77	190,53	595,95	A ₆	43,52	227,34	693,84
A ₇	46,63	194,07	583,01	A ₇	51,55	240,35	707,78
A ₈	47,39	195,64	588,29	A ₈	50,69	221,13	711,42
A ₉	49,79	199,80	611,12	A ₉	40,81	243,22	701,13
A ₁₀	36,50	209,49	591,60	A ₁₀	50,63	223,53	717,47
AVG	44,50	197,99	592,22	AVG	48,04	232,34	703,08
RSD%	12,17	2,94	1,61	RSD%	10,17	3,44	1,28
s	5,4156	5,8184	9,5292	s	4,8832	8,0021	9,0234

Međupreciznost u riječnoj vodi – F -test

Rezultati usporedbe preciznosti određivanja venlafaksina u riječnoj vodi u različitim danima prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati određivanja međupreciznosti (F -test) u riječnoj vodi

	s_1	s_2	$F_{\text{rač.}}$	$F_{\text{rač.}} < F_{\text{krit.}}$
$\gamma = 0,5 \text{ mg/L}$	5,4156	4,8832	1,23	DA
$\gamma = 2,5 \text{ mg/L}$	5,8184	8,0021	1,89	DA
$\gamma = 7,5 \text{ mg/L}$	9,5292	9,0234	1,12	DA

RSD vrijednosti su kod ponovljivosti niže od 15 % te nema signifikantnih razlika u nizovima mjerenja čime su značajke ponovljivosti i međupreciznosti u riječnoj vodi zadovoljavajuće.

F-Test

U ovom dijelu rada proveden je F -test kako bi se usporedila preciznost mjerenja venlafaksina u deioniziranoj i u riječnoj vodi za nazivnu koncentraciju γ (VEN) = 7,5 mg/L.

$$s \text{ (deionizirana)} = 8,1943$$

$$s \text{ (riječna)} = 9,5292$$

$$F_{\text{krit.}} = 3,18$$

$$F_{\text{rač.}} = 1,35$$

Usporedbom izračunate i kritične F -vrijednosti ($1,35 < 3,18$) vidi se da nema statistički signifikantne razlike u preciznosti mjerenja venlafaksina provedenih u deioniziranoj i riječnoj vodi.

Također, ovdje valja uzeti u obzir i činjenicu da stvarne koncentracije venlafaksina u deioniziranoj i riječnoj vodi nisu jednake jer su pripremane iz različitih temeljnih standardnih otopina (11,2 mg/L za deioniziranu i 10,1 mg/L za riječnu vodu). U tom smislu bi u riječnoj

matrici standardno odstupanje automatski trebalo biti manje obzirom da je venlafaksin prisutan u nižoj koncentraciji i da se dobivaju manje površine ispod pikova.

Uzevši i to u obzir, izračunata F -vrijednost mogla bi biti malo veća, no i dalje nedovoljno da bi se moglo reći da postoji signifikantna razlika u preciznosti mjerenja.

4.6. ISTINITOST

Iskorištenja su računata kao površine očitane iz kromatograma dijeljene s teoretskom površinom koju bi dobili jednadžbom umjernog pravca za odgovarajuću koncentraciju. Podatci (površine ispod pikova) korišteni u računanju iskorištenja su oni dobiveni mjerenjem ponovljivosti za deioniziranu i riječnu vodu.

Granice prihvatljivosti iskorištenja su 90 – 100 % za deioniziranu, odnosno 80 – 120 % za riječnu vodu.

Tablica 9. Izračunata iskorištenja (%) u deioniziranoj i u riječnoj vodi

DEIONIZIRANA VODA				RIJEČNA VODA			
γ (nazivna) / mg L ⁻¹	0,5	2,5	7,5	γ (nazivna) / mg L ⁻¹	0,5	2,5	7,5
γ (stvarna) / mg L ⁻¹	0,56	2,8	8,4	γ (stvarna) / mg L ⁻¹	0,505	2,525	7,575
1.	101,14	103,91	106,47	1.	109,23	109,23	108,33
2.	114,14	104,21	103,64	2.	118,31	109,18	109,61
3.	109,65	107,24	102,07	3.	97,38	106,33	110,44
4.	96,19	103,27	104,35	4.	142,07	113,76	112,23
5.	117,06	108,73	102,91	5.	122,32	109,80	108,09
6.	115,13	114,82	104,22	6.	113,55	105,48	110,76
7.	99,33	99,99	103,76	7.	123,80	107,44	108,36
8.	116,90	99,98	103,36	8.	125,82	108,31	109,34
9.	120,79	104,09	102,48	9.	132,19	110,61	113,58
10.	100,18	104,47	102,38	10.	96,91	115,98	109,95
AVG%	109,05	105,07	103,56	AVG%	118,16	109,61	110,07

Iskorištenja očekivano najviše odstupaju pri najmanjim koncentracijama u obje matrice, no i dalje se sva iskorištenja nalaze unutar granica prihvatljivosti i time su zadovoljavajuća.

4.7. RADNO PODRUČJE

Najniža granica radnog područja određena je granicom kvantifikacije.

LOQ (deionizirana) = 0,3144 mg/L

LOQ (riječna) = 0,4174 mg/L

Kao gornja granica radnog područja, uzeta je najveća ispitivana koncentracija venlafaksina (10,0000 mg/L). Iako ispitivanje preciznosti i istinitosti za ovu koncentraciju nije prikazano u radu, za nju su također zadovoljene sve tri nužne karakteristike: linearnost, preciznost i istinitost.

Radno područje

Deionizirana voda: 0,3144 mg/L – 10,0000 mg/L

Riječna voda: 0,4174 mg/L – 10,0000 mg/L

4.8. ROBUSTNOST

Mjerenja su provođena za koncentraciju 7,5 mg/L jer su za nju dobivana najmanja relativna standardna odstupanja. U okviru ispitivanja robusnosti ispitan je utjecaj promjene protoka pokretne faze na odziv venlafaksina. Standardni protok u metodi iznosio je 1,0 mL/min, a promijenjeni 0,7 mL/min.

Odvaga venlafaksin-hidroklorida za mjerenje robusnosti u deioniziranoj vodi iznosila je:

m (VEN) = 1,12 mg

γ (VEN, TSO) = 11,2 mg/L

Odvaga za mjerenje robusnosti u riječnoj vodi iznosila je:

$$m (\text{VEN}) = 1,18 \text{ mg}$$

$$\gamma (\text{VEN, TSO}) = 11,8 \text{ mg/L}$$

Tablica 10. Rezultati ponovljenih mjerenja površine ispod pika venlafaksina za različite protoke pokretne faze

Protok 0,7 mL/min			Protok 1,0 mL/min		
	Deionizirana	Riječna		Deionizirana	Riječna
γ (nazivna) / mg L ⁻¹	7,5	7,5	γ (nazivna) / mg L ⁻¹	7,5	7,5
γ (stvarna) / mg L ⁻¹	8,4	8,85	γ (stvarna) / mg L ⁻¹	8,4	8,85
A ₁	924,45	1034,63	A ₁	614,75	690,35
A ₂	888,98	1010,56	A ₂	614,27	686,83
A ₃	903,18	999,12	A ₃	631,85	685,23
A ₄	882,51	956,35	A ₄	602,33	697,47
A ₅	878,13	1028,84	A ₅	635,32	701,95
A ₆	897,77	1031,17	A ₆	616,13	668,43
A ₇	869,18	988,55	A ₇	627,97	696,77
A ₈	896,87	989,57	A ₈	622,46	695,71
A ₉	860,99	989,41	A ₉	619,06	710,34
A ₁₀	901,36	1004,40	A ₁₀	624,22	689,56
AVG	890,34	1003,26	AVG	620,84	692,26
RSD%	2,07	2,42	RSD%	1,56	1,62
s	18,4664	24,2333	s	9,6839	11,2442

Kod protoka 1,0 mL/min prisutna su manja relativna standardna odstupanja u odnosu na ona kod protoka 0,7 mL/min. Kod oba protoka manji RSD je u deioniziranoj vodi.

Iz rezultata se vidi da su pri manjim protocima dobivane veće površine ispod pikova (za otprilike 50 %). Razlog tome je taj što PDA detektor spada u skupinu detektora koji su osjetljivi na koncentraciju analita. Kod takve vrste detektora, dobivene površine ispod pikova obrnuto su proporcionalne protoku [15]. Pri manjem protoku analit dulji vremenski period prolazi kroz protočnu ćeliju i u svakom trenutku apsorbira zračenje koje je direktno proporcionalno

koncentraciji analita u tom trenutku. Kada bi se hipotetski koristio tip detektora osjetljivih na prijenos mase, ne bi bilo razlike u površinama ispod pikova pri drugačijim protocima jer ista masa eluira u oba slučaja, samo drugačijim brzinama [15].

Dakle, ako bi tijekom analize dolazilo do promjena u protoku, to bi imalo značajan utjecaj na rezultate mjerenja, odnosno na dobivene površine ispod pikova. Iz tog razloga, u ovoj metodi nužno je definirati protok i držati ga konstantnim kako bi izbjegli sustavna odstupanja u rezultatima mjerenja.

4.9. STABILNOST

Stabilnost otopine venlafaksina ispitana je mjerenjima provedenim u različitim danima, s većim vremenskim razmakom. Temeljne standardne otopine (γ (deionizirana) = 11,2 mg/L i γ (riječna) = 11,8 mg/L) pripravljene su 15.12.2020. Prvo mjerenje provedeno je 17.12.2020. nakon čega su otopine ostavljene u laboratoriju u odmjernim tikvicama i na sobnoj temperaturi te ponovno upotrijebljene za analizu 2.2.2021.

Tablica 11. Rezultati ponovljenih mjerenja površine ispod pika venlafaksina određene u različitim danima

Mjerenje 17.12.2020.			Mjerenje 2.2.2021.		
	Deionizirana	Riječna		Deionizirana	Riječna
γ (nazivna) / mg L ⁻¹	7,5	7,5	γ (nazivna) / mg L ⁻¹	7,5	7,5
γ (stvarna) / mg L ⁻¹	8,4	8,85	γ (stvarna) / mg L ⁻¹	8,4	8,85
A ₁	614,75	690,35	A ₁	636,18	671,65
A ₂	614,27	686,83	A ₂	631,35	697,04
A ₃	631,85	685,23	A ₃	631,39	687,94
A ₄	602,33	697,47	A ₄	617,57	692,57
A ₅	635,32	701,95	A ₅	631,2	675,31
A ₆	616,13	668,43	A ₆	619,07	692,13
A ₇	627,97	696,77	A ₇	611,14	684,5
A ₈	622,46	695,71	A ₈	646,39	678,71
A ₉	619,06	710,34	A ₉	605,41	676,09
A ₁₀	624,22	689,56	A ₁₀	634,19	671,26
AVG	620,84	692,26	AVG	626,39	682,72
RSD%	1,56	1,62	RSD%	2,01	1,37
s	9,6839	11,2442	s	12,6206	9,3682

U rezultatima je vidljivo da je RSD za deioniziranu vodu malo niži u prvom mjerenju, a za riječnu u drugom. Sve RSD vrijednosti su ispod 10% i time zadovoljavajuće. Prosječne površine ispod pikova mjerene u razmaku 17.12.2020. – 2.2.2021. razlikuju se za 0,89% u deioniziranoj, odnosno 1,38% u riječnoj vodi.

4.10. SAŽETAK REZULTATA

U Tablici 12. sažeto su prikazani rezultati validacije HPLC-PDA metode za određivanje venlafaksina u riječnoj vodi.

Tablica 12. Sažetak rezultata ispitivanja izvedbenih karakteristika metode

Izvedbena Značajka	Uvjet	Deionizirana voda	Riječna voda	Zadovoljava kriterij u deioniziranoj vodi	Zadovoljava kriterij u riječnoj vodi
Selektivnost	Približno vrijeme zadržavanja	6,61 min	6,56 min	/	DA
Linearnost	$R^2 > 0,995$	1,000	1,000	DA	DA
Osjetljivost (L/mg)	/	76,23780	70,77569	/	/
GD (mg/L)	/	0,1037	0,1377	/	/
GK (mg/L)	/	0,3144	0,4174	/	/
Radno područje (mg/L)	/	0,3144 – 10,0000	0,4174 – 10,0000	/	/
Ponovljivost	UVJETI: Deionizirana voda → RSD < 10%, Riječna voda → RSD < 15 %				
Ponovljivost (RSD – %)	$\gamma = 0,5$ mg/L	8,25	12,17	DA	DA
	$\gamma = 2,5$ mg/L	4,15	2,94	DA	DA
	$\gamma = 7,5$ mg/L	1,24	1,61	DA	DA
Međupreciznost	UVJET: $F < 3,18$				
Međupreciznost (F -vrijednosti)	$\gamma = 0,5$ mg/L	1,56	1,23	DA	DA
	$\gamma = 2,5$ mg/L	1,23	1,89	DA	DA
	$\gamma = 7,5$ mg/L	1,24	1,12	DA	DA
Istinitost	UVJETI: Deionizirana voda → 90 – 110 %, Riječna voda → 80 – 120 %				
Iskorištenja – %	$\gamma = 0,5$ mg/L	109,05	118,16	DA	DA
	$\gamma = 2,5$ mg/L	105,07	109,61	DA	DA
	$\gamma = 7,5$ mg/L	103,56	110,07	DA	DA
Robustnost	UVJET: Beznačajne promjene u rezultatima analize ($\Delta A < 5$ %)				
Promjena protoka – (A)	0,7 mL/min	890,34	1003,26	NE	NE
	1,0 mL/min	620,84	692,26		
Stabilnost	UVJET: Beznačajne promjene u rezultatima analize ($\Delta A < 5$ %)				
Stabilnost – (A)	17.12.2020.	620,84	692,26	DA	DA
	2.2.2021.	626,39	682,72		

5. ZAKLJUČAK

Rezultati validacije:

Umjerne krivulje davale su izvrstan koeficijent determinacije čime se zadovoljava linearnost. Osjetljivost je očekivano nešto manja u riječnoj vodi zbog prisutstva interferencija. Granice detekcije i kvantifikacije su također očekivano nešto veće u riječnoj vodi, no još uvijek dovoljno male da u radno područje pripadnu sve koncentracije koje su uspješno detektirane. Za karakteristike ponovljivosti sva relativna standardna odstupanja su zadovoljavajuća, isto kao i *F*-testovi kod određivanja međupreciznosti. Pri ispitivanju istinitosti sva su iskorištenja unutar granica prihvatljivosti i time zadovoljavajuća. Razlike u rezultatima mjerenja pri mijenjanju protoka pokretne faze su značajne ($\Delta A \approx 50\%$) i kao takve neprihvatljive. Ponovno provedeno mjerenje s istom otopinom nakon dužeg vremenskog razmaka nema značajan utjecaj na rezultate mjerenja ($\Delta A < 1,5\%$) čime je zadovoljena stabilnost otopine venlafaksina.

Kao što se može vidjeti po rezultatima validacije, za dane kriterije prihvatljivosti zadovoljavaju sve ispitane izvedbene karakteristike, osim utjecaja promjene protoka pokretne faze. Iz toga zaključujem kako je kromatografska HPLC–PDA metoda odgovarajuća metoda za određivanje venlafaksina u riječnoj vodi u opisanom radnom području (0,4174 – 10,0000 mg/L) te da pritom treba voditi računa o protoku pokretne faze i držati ga konstantnim u metodi.

6. LITERATURA

- [1] M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. **65** (2016) 471-482
- [2] <https://www.nhs.uk/medicines/venlafaxine/> (4.3.2021.)
- [3] <https://www.druglawcenter.org/effexor/> (21.5.2021.)
- [4] <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/in-depth/antidepressants/art-20044970> (4.3.2021.)
- [5] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5656> (4.3.2021.)
- [6] Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrovič, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, Kromatografsko Nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS; Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Sekcija za kromatografiju; Hrvatsko kemijsko društvo, Zagreb, 1999
- [7] https://www.inacom.nl/wp-content/uploads/2020/04/theory_of_hplc_chromatographic_parameters_1.pdf (8.5.2021.)
- [8] F. Gritti, G. Guiochon, The van Deemter Equation Assumptions, limits, and adjustment to modern HPLC, J. Chromatogr. A (2013), DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.032>
- [9] <http://chem-net.blogspot.com/2013/10/pump-column-detector-injector-hplc.html> (8.3.2021.)
- [10] M. Swartz, HPLC Detectors: A Brief Review, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., **33:9-12** (2010) 1130-1150, DOI: doi:10.1080/10826076.2010.484356
- [11] <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500108703ra.pdf> (8.3.2021.)
- [12] K. Lazarić, Validacija Analitičkih Metoda – Osnovna Načela, Svijet po mjeri **1** (2012) 61-64
- [13] <https://www.adamequipment.com/aeblog/how-do-balances-and-scales-work> (25.3.2021.)
- [14] <https://www.che.iitb.ac.in/laboratory-facility/milli-q-water-system> (24.4.2021.)
- [15] I. Halasz, Concentration and Mass Flow Rate Sensitive Detectors in Gas Chromatography, Anal. Chem. **36(8)** (1964) 1428 – 1430. DOI: doi:10.1021/ac60214a009

