

# Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje sulfametoksazola u vodi

---

**Petko, Ramona**

**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:149:542596>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ramona Petko

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ramona Petko

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

ZAVRŠNI RAD

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

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

prof. dr. sc. Sandra Babić

izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Zagreb, rujan 2022.

*Najljepše se zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na stručnom vođenju rada, prijedlogu teme, korisnim savjetima, podršci te prilici da svoj Završni rad izradim na Zavodu za analitičku kemiju pod njezinim mentorstvom.*

*Zahvalu također dugujem i asistentici, mag. appl. chem. Kristini Tolić Čop kao i tehničarkama u laboratoriju Slavici Kos i Tanji Ivančić zbog pomoći, savjeta, podrške i vrlo ugodnog rada u laboratoriju tijekom izrade ovog Završnog rada.*

*Isto tako se zahvaljujem majci i ostaloj obitelji, kao i prijateljima i kolegama na podršci kroz protekle 3 godine preddiplomskog studija i tijekom pisanja Završnog rada.*

*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 SULFAMETOKSAZOLA U VODI

Cilj ovoga rada jest validacija analitičke kromatografske metode određivanja farmaceutika sulfametoksazola u vodi na HPLC-DAD uređaju. Validacija prethodno razvijene metode važna je iz razloga što će osigurati potvrdu o pouzdanosti i kvaliteti metode koja će se u budućnosti moći sa sigurnošću primjenjivati pri analizi određenog uzorka na određenom uređaju. Analitički sustav u ovome radu validiran je na način da su ispitane izvedbene značajke metode, tj. validacijski parametri poput selektivnosti, linearnosti, osjetljivosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, preciznosti, istinitosti, radnog područja te robusnosti. Na temelju rezultata zaključuje se ispravnost ispitivane analitičke metode.

Prilikom određivanja navedenih kriterija, provedeno je kvantitativno određivanje antibiotika sulfametoksazola otopljenog u deioniziranoj i izvorskoj vodi. Svaki eksperiment proveden je dodatkom standardne otopine sulfametoksazola u obje vrste vode, kako bi se usporedili rezultati dobiveni za eksperimente provedene s deioniziranom vodom koju karakterizira visoka čistoća, s onima u izvorskoj vodi koja sadrži razne interferencije. Na osnovu rezultata istraživanja, dolazi se do zaključka kako je navedena metoda pouzdana i ispravna, ili, drugim riječima, validirana.

Istraživanje u ovom radu poslužit će za daljnja ispitivanja analitičara koji će imati zadatak kvalitativno i kvantitativno odrediti farmaceutik sulfametoksazol u uzorcima vode tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda.

*Ključne riječi:* **validacija analitičke metode, tekućinska kromatografija, farmaceutici, sulfametoksazol**

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF SULFAMETHOXAZOLE IN WATER

The aim of this work is to validate the chromatographic analytical method for the determination of sulfamethoxazole in water on a HPLC-DAD instrument. Validation of a previously developed method is important because it provides confirmation of the reliability and quality of the method, which can be used with confidence in the future when analyzing a particular sample on a particular instrument. The analytical system in this work was validated by examining the method performance characteristics, i.e., validation parameters such as selectivity, linearity, sensitivity, limit of detection, limit of quantification limits, precision, trueness, working range, and robustness. Based on the results, the correctness of the investigated analytical method is concluded.

To determine the above criteria, a quantitative determination of the antibiotic sulfamethoxazole dissolved in deionized and spring water was performed. Each experiment was carried out with samples in both types of water in order to compare the results of experiments with deionized water, which is characterized by high purity, with the results of experiments with spring water, which contains various interferences. Based on the research results, it is concluded that the mentioned method is reliable and correct, or, in other words, it is validated.

The research in this work will serve for further tests of analysts who have the task to qualitatively and quantitatively determine the drug sulfamethoxazole in water samples by high-performance liquid chromatography with a diode array detector.

*Key words:* **validation of analytical method, liquid chromatography, pharmaceuticals, sulfamethoxazole**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Farmaceutici</b> .....	2
2.1.1. <i>Primjena i važnost farmaceutika</i> .....	2
2.1.2. <i>Problematika farmaceutika u okolišu</i> .....	2
2.1.3. <i>Analitičke tehnike detekcije farmaceutika u okolišu</i> .....	3
2.1.4. <i>Primjena i svojstva sulfametoksazola</i> .....	3
<b>2.2. Kromatografija</b> .....	4
2.2.1. <i>Primjena kromatografije</i> .....	4
2.2.2. <i>Podjela kromatografskih tehnika</i> .....	5
2.2.3. <i>Kromatografski sustav i njegovi parametri</i> .....	6
2.2.4. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – detektor s nizom dioda (HPLC-DAD)</i> ....	8
<b>2.3. Validacija</b> .....	8
2.3.1. <i>Primjena i svrha validacije</i> .....	8
2.3.2. <i>Pristup validaciji</i> .....	9
2.3.3. <i>Validacijski parametri</i> .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	13
<b>3.1. Materijali</b> .....	13
3.1.1. <i>Kemikalije</i> .....	13
<b>3.2. Instrumenti</b> .....	13
3.2.1. <i>Analitička vaga</i> .....	13
3.2.2. <i>Ultrazvučna kupelj</i> .....	14
3.2.3. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – detektor s nizom dioda (HPLC-DAD)</i> ..	15
3.2.4. <i>Sustav za filtraciju izvorske vode</i> .....	15
<b>3.3. Opis rada</b> .....	16
3.3.1. <i>Priprema otopina</i> .....	16
3.3.2. <i>Rad na HPLC-DAD uređaju</i> .....	17



<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	18
4.1. <b>Selektivnost</b> .....	18
4.2. <b>Linearnost</b> .....	20
4.3. <b>Osjetljivost</b> .....	22
4.4. <b>Granica detekcije i granica kvantifikacije</b> .....	23
4.5. <b>Preciznost</b> .....	24
4.6. <b>Istinitost</b> .....	29
4.7. <b>Radno područje</b> .....	31
4.8. <b>Robusnost</b> .....	32
4.9. <b>Sažetak rezultata metode</b> .....	34
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	35
<b>6. LITERATURA</b> .....	37
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	38

## **1. UVOD**

## 1. UVOD

Farmaceutici, kao i njihovi metaboliti, vrlo su rašireni u okolišu. Najčešće ih pronalazimo u vodenim ekosustavima. Ovakvo pojavljivanje farmaceutika van njihove primarno zamišljene namjene, može štetiti ljudskom zdravlju i narušiti kvalitetu okoliša. U vodene medije dospjevaju ispuštanjem otpadnih voda iz kućanstava, tvornica, bolnica i proizvodnih djelatnosti. Također se mogu akumulirati u sedimentima te prilikom njihovog ispiranja dospjeti u podzemne vode. Zbog ovakvih emisija u konačnici može doći do onečišćenja vode koja je namijenjena za piće kao i ugroziti život organizama u vodenim staništima.

Sulfametoksazol je antibiotik široke primjene. Prihvatljive je cijene i efektivnog djelovanja te se koristi pri liječenju ljudi oboljelih od infekcija izazvanim prisutnošću raznih bakterija. Kao i svaki farmaceutik, nije poželjan u okolišu. Stoga je u ovom radu validirana metoda njegove detekcije u vodi na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti vezanom na detektor s nizom dioda (HPLC-DAD).

## **2. OPĆI DIO**

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Farmaceutici

#### 2.1.1. *Primjena i važnost farmaceutika [1]*

Farmaceutici su pojam koji općenito predstavlja organske tvari namijenjene upotrebi radi zdravstvenih razloga. Koriste se pri liječenju i prevenciji bolesti kod ljudi i životinja čime poboljšavaju kvalitetu življenja te u tome leži njihova važnost. Otkriće i primjena farmaceutika pridonijeli su daljnjem razvoju medicine, farmacije, kemije i ostalih srodnih znanosti. Njihovo bitno svojstvo jest biorazgradivost u tijelu. Četiri su najvažnije skupine farmaceutika: antibiotici, antineoplastici, kardiovaskularni lijekovi i reproduktivni hormonski lijekovi.

#### 2.1.2. *Problematika farmaceutika u okolišu [2]*

Svaki farmaceutik posjeduje specifična biološka, farmakološka i fizikalno-kemijska svojstva koja variraju ovisno o okolini u kojoj se nalaze te se smatraju novim zagađivalima. To su spojevi za koje se do nedavno nije smatralo da imaju učinak zagađivala, a sve više se ispuštaju u okoliš u većim količinama. Problem predstavlja nepostojanje zakonske regulative o njihovom ispuštanju u okoliš. Kontinuirano unošenje farmaceutika u okoliš, čak i u niskim koncentracijama potencijalno može rezultirati većim koncentracijama pa time i negativnim učincima na ekosustav. U okoliš dospijevaju nepropisnim zbrinjavanjem neupotrijebljenih farmaceutika, putem ljudskih ili životinjskih izlučevina, iz kućanstava, bolnica, groblja, raznih industrija te postrojenja, najčešće onih koja se bave obradom voda putem aktivnog mulja i vodenih tokova. Ponašanje i utjecaj farmaceutika na ekosustav nije dovoljno istražen što predstavlja dodatni problem zbog kojeg su mnogi farmaceutici na „listi promatranja“ Okvirne direktive o vodama pod vodstvom Europske unije.

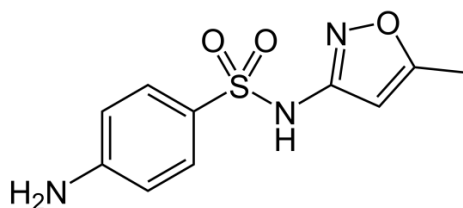
## 2. OPĆI DIO

### 2.1.3. Analitičke tehnike detekcije farmaceutika u okolišu [3]

Za kvalitativno i kvantitativno određivanje farmaceutika prisutnih u uzorcima iz okoliša najčešće se primjenjuju plinska i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC, zajedno sa spektrometrijom masa (HPLC-MS). S obzirom da svojstva farmaceutika poput nehlapljivosti, nestabilnosti pri visokim temperaturama i polarnosti ograničavaju upotrebu plinske kromatografije, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koristi se češće te se pokazala kao zadovoljavajuća metoda detektiranja farmaceutika koji su termički nestabilni i polarni. Metode koje koriste detektor s nizom dioda (DAD) i fluorescentni detektor (FLD) sve se više zamjenjuju uporabom HPLC-MS metode za ovu namjenu. [2] Uz navedene metode, učinkovita se pokazala i primjena nuklearne magnetske rezonancije (NMR) za karakterizaciju detektiranih farmaceutika i njihovih razgradnih produkata.

### 2.1.4. Primjena i svojstva sulfametoksazola

Antibiotik sulfametoksazol,  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ , otkriven je te se primjenjuje od 60.-ih godina prošlog stoljeća. To je sulfoamidni lijek, strukturno analogan para-aminobenzoatnoj kiselini koji kompetitivno inhibira sintezu dihidropteroata sprječavajući stvaranje dihidropteroatne kiseline, prekursora folne kiseline koja omogućava rast i razvoj bakterija. Najčešća primjena ovog lijeka je pri liječenju urinarnih infekcija kao i infekcija respiratornog sustava uzrokovanih prisutnošću bakterija poput *Escherichie coli*, *Klebsielle pneumoniae* i *Proteus mirabilis*. Prakticira se oralno i intravensko unošenje sulfametoksazola, koji često dolazi u kombinaciji s trimetoprimom. Moguće kontraindikacije tijekom liječenja sulfametoksazolom uključuju mučninu, gubitak apetita, povraćanje i kožne osipe. Standardne doze ovog lijeka su 400 mg i 800 mg, ovisno o liječničkoj procjeni. [4] Na Slici 1. prikazana je kemijska strukturna formula sulfametoksazola.



**Slika 1.** Strukturna formula sulfametoksazola [5]

## 2. OPĆI DIO

Molekulska masa ovog spoja iznosi 253,28 g mol<sup>-1</sup>, a točna masa 253,05211239 g. Temperatura taljenja iznosi 169 °C. IUPAC ime sulfametoksazola je 4-amino-*N*-(5-metil-1,2-oksazol-3-il) benzensulfonamid. Može uzrokovati nadražljivost kože, alergijske reakcije, osjetljivost za oči i respiratorni sustav, te je akutno i kronično opasan za vodeni okoliš. U svojoj strukturi sadrži dvije donorske vodikove veze, šest akceptorskih vodikovih veza te tri rotirajuće veze. [6]

### 2.2. Kromatografija

#### 2.2.1. Primjena kromatografije [7]

Kromatografija je separacijska tehnika temeljena na razlici u veličini čestica i razdiobi između faza. Ime kromatografija dolazi od grčkih riječi *chroma*, što znači boja, i *graphein*, što znači pisati. Danas je ona široko korištena metoda za razdvajanje, identifikaciju i određivanje kemijskih komponenata u složenim smjesama. Ovu metodu razvio je 1906. godine znanstvenik M. S. Tswett primjenjujući kromatografsku tehniku za odjeljivanje biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolazom kroz staklenu kolonu napunjenu CaCO<sub>3</sub> te je na koloni odvojene komponente uočio kao obojene vrpce. Kromatografija se primjenjuje za razdvajanje malih količina uzoraka, kada su komponente vrlo sličnih svojstava te kada su prisutne u vrlo malim koncentracijama. Pouzdana je metoda za identifikaciju supstanci, ispitivanje čistoće tvari, analizu pesticida, ugljikohidrata, vitamina, antiparazitika itd. te za određivanje broja sastojaka u uzorku. Vrlo je brza i učinkovita metoda koja se može primijeniti na različite sustave.

Ova fizikalno-kemijska metoda temelji se na postojanju dvije različite faze koje se međusobno ne miješaju, među kojima se komponente razdjeljuju, a to su nepokretna (stacionarna) faza i pokretna (mobilna) faza koja se kreće u određenom smjeru. Komponente ispitivane smjese prolaze kroz nepokretnu fazu protokom pokretne faze te se, radi različitih svojstava i veličine, razdvajaju na osnovu afiniteta kojeg pokazuju prema pokretnoj i/ili nepokretnoj fazi. Kromatografski sustav čine pokretna, nepokretna faza i ispitivana smjesa. Dvije faze sustava između kojih dolazi do raspodjele mogu biti čvrsto-tekuće, tekuće-plinovito, i tekuće-tekuće. Kod kromatografije normalnih faza, polarna faza bit će nepokretna, a nepolarna pokretna, dok je kod kromatografije obrnutih faza obratno.

## 2. OPĆI DIO

### 2.2.2. Podjela kromatografskih tehnika [8]

Kromatografske tehnike možemo podijeliti na osnovu tri kriterija:

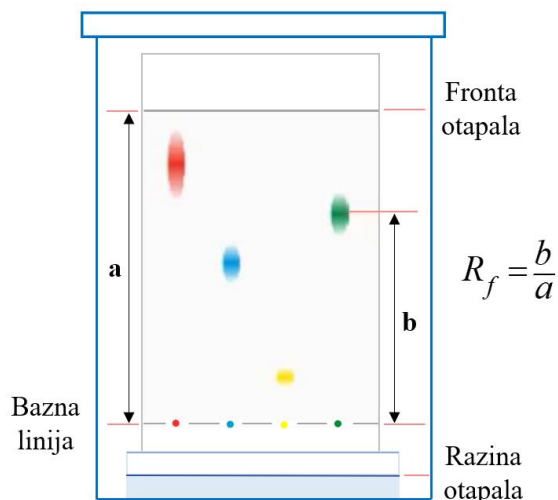
- **Podjela prema mehanizmu separacije**
  - Kromatografija isključenjem – mehanizam isključivanja na osnovu veličine.
  - Ionska kromatografija – razdvajanje različitih iona.
  - Razdjelna kromatografija – temelji se na principu ekstrakcije.
  - Afinitetna kromatografija – primjenjuju se specijalno dizajnirane kolone u kojima se određeni spojevi vežu po točno određenom afinitetu s obzirom na nepokretnu fazu.
  - Adsorpcijska kromatografija – u ovoj metodi dolazi do adsorpcije.
- **Podjela prema obliku kromatografske podloge**
  - Plošna kromatografija
    - *Papirna kromatografija* – kao nepokretna faza koristi se posebno pripremljen kromatografski papir.
    - *Tankoslojna kromatografija* – nepokretna faza je u obliku homogenog, tankog sloja nanosena na inertnu podlogu.
  - Kolonska kromatografija – nepokretna faza je gusto pakirana u stupcu.
- **Podjela prema fizikalnom stanju pokretne faze**
  - Plinska kromatografija
    - jedna od najčešće korištenih metoda za kvantitativnu i kvalitativnu analizu lako hlapljivih komponenata; komponente se razdvajaju između pokretne plinovite faze (He, N<sub>2</sub>, Ar, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) i tekuće ili čvrste nepokretne faze.
  - Tekućinska kromatografija
    - najsvestranija je i najčešće korištena vrsta kromatografije namijenjena za razdvajanje i određivanje komponenata u raznovrsnim biološkim, anorganskim i organskim materijalima koja kao pokretnu fazu koristi kapljevinu male viskoznosti.
  - Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima
    - kromatografija temeljena na separaciji s fluidom koji ima ulogu pokretne faze te se nalazi u uvjetima iznad svoje kritične temperature i kritičnog tlaka.



## 2. OPĆI DIO

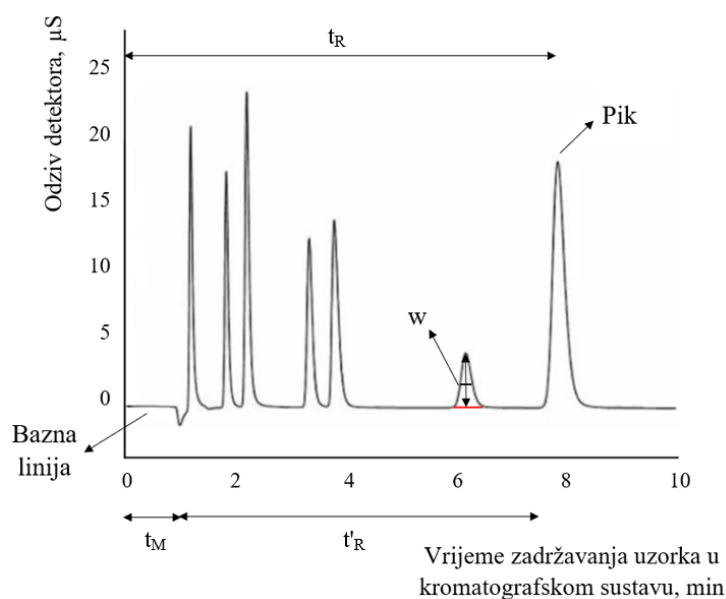
### 2.2.3. Kromatografski sustav i njegovi parametri [9, 10]

Na Slici 2. dan je jednostavan prikaz tankoslojne kromatografije na TLC pločici, gdje je vidljiva bazna linija, fronta ili put otapala, razina otapala i prijeđeni put određenih komponenata uzorka.  $R_f$  vrijednost je faktor zadržavanja, tj. retencijski faktor, a predstavlja omjer puta kojeg je prešao ispitivani sastojak uzorka i fronte otapala. Ova vrijednost karakteristična je za pojedinu tvar u točno određenom kromatografskom sustavu.



**Slika 2.** Prikaz kromatografije na TLC pločici

Kromatogram je zapis masenog ili koncentracijskog profila sastojaka ispitivanog uzorka nakon završene separacije. Prikazuje se grafički kao odnos odziva detektora (koncentracije analita) u eluatu i vremena ili volumena eluata.



**Slika 3.** Kromatogram

## 2. OPĆI DIO

Na Slici 3. prikazan je kromatografski sustav s odgovarajućim parametrima. Vrijeme zadržavanja,  $t_R$ , predstavlja vrijeme koje je uzorak proveo u pokretnoj i nepokretnoj fazi. Zadržano vrijeme,  $t_M$ , je vrijeme potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz kolonu, tj. vrijeme od trenutka injektiranja do trenutka mjerenja. Korigirano vrijeme zadržavanja,  $t'_R$ , računa se iz razlike  $t_R$  i  $t_M$ . Oznaka  $w$  predstavlja širinu kromatografske krivulje.

Faktor kapaciteta,  $k$ , računa se kao omjer korigiranog vremena zadržavanja i vremena zadržavanja. Separacijski faktor,  $\alpha$ , je mjera selektivnosti kromatografskog sustava jer daje informaciju o mogućnosti separacije dvaju spojeva. Računa se kao omjer njihovih retencijskih vremena te se uzima kao pokazatelj koliko je učinkovito razlučivanje dvije komponente na kromatogramu. Ipak,  $\alpha$  nije najpouzdaniji faktor iz razloga što ne uzima u obzir širinu kromatografske krivulje te se iz tog razloga puno više primjenjuje faktor razlučivanja,  $R_S$ .  $R_S$  je jedan od najvažnijih parametara u kromatografskoj analizi jer, zbog širine kromatografske kolone koju uzima u obzir, ukazuje na sposobnost odjeljivanja dva susjedna analita na kromatografskoj koloni. Poželjno je da njegova vrijednost bude veća od 1 kako bi separacija bila moguća.

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{t'_R(A)}{t'_R(B)} \quad (2)$$

$$R_S = \frac{2 \left[ (t_R)_B - (t_R)_A \right]}{w_A + w_B} \quad (3)$$

Prilikom identifikacije komponenata (kvalitativne analize), važan je položaj kromatografske krivulje, dok je visina kromatografske krivulje te njezina površina bitna prilikom kvantitativne analize uzorka jer je površina ispod kromatografske krivulje proporcionalna količini određenog analita u uzorku. Kako je prikazano na Slici 3., širina kromatografske krivulje mjeri se na polovici njegove visine. Prilikom kromatografske analize poželjno je da je vrh kromatografske krivulje oštar, a njegova zona što uža. Trajanje analize ovisi o detektoru koji se koristi te koliko su komponente različite po svojim svojstvima.

## 2. OPĆI DIO

### 2.2.4. *Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – detektor s nizom dioda (HPLC-DAD)*

HPLC je skraćenica za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti. Razdjelna kromatografija najrasprostranjenija je vrsta HPLC-a. UV/Vis kvantitativna analiza također se često koristi u HPLC. Suvremeni HPLC instrument sastoji se od staklenih spremnika koji sadrže pokretne faze, uređaja za uklanjanje prašine i otopljenih plinova iz tekućina kako ne bi došlo do oštećenja i netočnih rezultata, pumpe koja stvara pritisak na otapalo potpomažući time prolazak kroz kolonu, sustava za injektiranje kojim se uzorci uvode u pokretnu fazu, kolone u kojoj se komponente uzorka razdvajaju, načinjene od metalnog kućišta u obliku cijevi koje je ispunjeno nepokretnom fazom, detektora koji otkriva pojedine komponente smjese izlučenih iz kolona te mjeri pojedine komponente kako izlaze iz kolone i pretvara promjene u eluentima u električni signal koji se zabilježi u podatkovnom sustavu na računalu.

HPLC se vrlo često koristi u farmaceutskoj industriji pri analizi uzoraka raznih farmaceutika određujući čistoću spojeva i prateći promjene pri sintetskim postupcima. [11]

HPLC-DAD skraćenica je za uređaj na kojem se provodi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana na detektorom s nizom dioda. Ovakav detektor ima mogućnost detekcije u cijelom UV spektru, prolaskom analita kroz detektor uređaj mjeri apsorbanciju po svim valnim duljinama spektra. Ovim načinom rada analit ostaje nepromijenjen. Prednost korištenja HPLC-DAD metode jest mogućnost razlikovanja spektara onih kromatografskih krivulja koji imaju vrlo blisko vrijeme zadržavanja kao i vrlo dobra osjetljivost i selektivnost, reproducibilnost i mogućnost određivanja čistoće kromatografske krivulje. Kvalitativni parametri temelje se na Lambert-Beerovu zakonu u kvantitativnoj primjeni. Rad na ovom uređaju jednostavan je i univerzalan. [12]

## 2.3. Validacija

### 2.3.1. *Primjena i svrha validacije [13, 14]*

Validacija jest potvrda ispitivanjem i prikupljanjem objektivnih dokaza o ispunjenju određenih zahtjeva za predviđenu uporabu. Provodi se radi provjere i potvrde određenih metoda i uređaja za željenu analizu. Nakon razvijene metode od strane analitičara, valja ju

## 2. OPĆI DIO

provjeriti kroz niz koraka koje validacija obuhvaća kako bi se utvrdilo je li metoda primjenjiva, točna i učinkovita.

Pri razvoju metode i validacije, bitno je odabrati reprezentativan uzorak materijala koji će biti podvrgnut analizi. Reprezentativan uzorak jest onakav uzorak koji posjeduje sva bitna obilježja cjeline iz koje je uzet, poput kemijskog sastava i veličine čestica. Uzorak je reprezentativan ukoliko je homogen, stabilan i siguran. Homogenost uzorka podrazumijeva jednoliku raspoređenost svojstva tvari u materijalu te ovisi o vrsti materijala, o njegovom agregatnom stanju i veličini ispitivanog uzorka. Uzorci moraju ostati nepromijenjeni prilikom transporta od mjesta uzorkovanja do mjesta analize. Također je poželjno da uzorak u svojem sastavu ne sadrži opasne tvari koji mogu štetiti ljudskom zdravlju, no ukoliko sadrže iste, osoblje koje njime rukuje treba biti stručno i educirano o pravilnom postupanju s takvim uzorkom.

Laboratorij treba validirati metode koje su nenormirane, razvijene u samom laboratoriju te normirane metode koje se primjenjuju izvan svoje prvobitne namjene. Isto tako, baveći se validiranjem nužno je proučiti ljudske, okolišne i tehničke čimbenike koji potencijalno mogu ometati rad i dati netočne rezultate.

### 2.3.2. *Pristup validaciji [15]*

Postoje dva pristupa validaciji; unutarlaboratorijska i međulaboratorijska validacija.

Unutarlaboratorijska validacija odvija se unutar jednog laboratorija gdje se vrši validacija novorazvijene metode unutar toga laboratorija ili potvrda o uspješnosti analitičke metode razvijene u drugom laboratoriju. Dvije vrste kriterija, tj. validacijskih parametara, važni su pri ovoj vrsti validacije, a to su primarni (točnost, preciznost i granica detekcije) i sekundarni kriteriji (linearnost, selektivnost, osjetljivost, granica kvantifikacije, robusnost i radno područje). Vrste unutarlaboratorijske validacije su prospektivna validacija, retrospektivna validacija, testovi prikladnosti sustava, testovi prikladnosti prijenosa metode te kontrola kvalitete.

Međulaboratorijska validacija potrebna je u slučaju kada je analitička metoda razvijena za široku primjenu. Dva ili više laboratorija ispituju isti uzorak istom, unaprijed definiranom i dogovorenom analitičkom metodom te se dobiveni podaci objavljuju u svrhu skraćivanja

## 2. OPĆI DIO

opsega posla za laboratorije koji će se u budućnosti koristiti tom metodom. Međulaboratorijska validacija prema svrsi može se podijeliti na ispitivanje kvalitete rada određenog laboratorija, ispitivanje karakteristika metode i studije certifikacije materijala.

### 2.3.3. Validacijski parametri [16]

**Selektivnost** je mogućnost točnog, specifičnog i nedvosmislenog određivanja željenog analita u prisutnosti sastojaka koji se mogu očekivati u uzorku. Selektivna metoda je metoda s mogućnošću određivanja više komponenata istovremeno, ukoliko prisutnost neke komponente ne ometa određivanje druge komponente. Selektivnost je kao parametar vrlo važan pri validiranju gotovo svih metoda. Dokazuje se usporedbom odziva metode na analitu i mjerodavnom materijalu.

**Linearnost** je mogućnost metode da unutar danog područja daje rezultate mjerenja direktno proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Netočnost metode očituje se nelinearnošću pri grafičkom prikazu. Rezultate je moguće prikazati matematički jednadžbom pravca ili koeficijentom korelacije te grafičkim prikazom ovisnosti odziva o koncentraciji analita.

**Osjetljivost** je svojstvo uređaja ili metode da razlikuje uzorke različitih koncentracija analita uz definiranu razinu pouzdanosti. U kvantitativnoj kemijskoj analizi osjetljivost predstavlja nagib kalibracijskog pravca, ukoliko je ovisnost između signala i koncentracije analita linearna, dok odsječak pravca može ukazati na sustavnu pogrešku.

**Granica detekcije** jest najmanja količina analita u uzorku koju je moguće detektirati uz određenu preciznost i točnost. Prihvatljiv omjer signala i šuma je 3 : 1. Granicu detekcije statistički je moguće odrediti pomoću jednadžbe (4):

$$GD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad (4)$$

gdje  $\sigma$  predstavlja standardno odstupanje slijepe probe ili analita u području granice detekcije ili y-odsječka kalibracijskog pravca, a  $a$  nagib kalibracijskog pravca.

**Granica kvantifikacije** jest najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz određenu preciznost i točnost. Prihvatljiv omjer signala i šuma je 10 : 1. Statističko određivanje granice kvantifikacije moguće je pomoću jednadžbe (5):

## 2. OPĆI DIO

$$GK = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \quad (5)$$

gdje  $\sigma$  predstavlja standardno odstupanje slijepe probe ili analita u području granice kvantifikacije ili y-odsječka kalibracijskog pravca, a  $a$  nagib kalibracijskog pravca.

Isto tako, granicu detekcije i kvantifikacije moguće je izračunati i na sljedeći način. S obzirom da je pri analizi određenog spoja potrebno provesti više mjerenja iste koncentracije, računa se standardno odstupanje ( $\sigma$ ) dobivenih rezultata, npr. očitanih površina ispod kromatografskih krivulja prema jednadžbi (6):

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

gdje  $N$  predstavlja broj izmjerenih uzoraka,  $x_i$  očitane površine ili drugi određivani parametar, a  $\bar{x}$  izračunatu srednju vrijednost. Prema jednadžbi (7) zatim se računa  $\sigma_0$ .

$$\sigma_0 = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (7)$$

Granica detekcije može se zatim izračunati putem jednadžbe (8):

$$GD = 3,3 \cdot \sigma_0 \quad (8)$$

a granica kvantifikacije putem jednadžbe (9):

$$GK = 10 \cdot \sigma_0 \quad (9)$$

**Preciznost** je parametar koji se ispituje pri ispitivanju karakteristika metode i mjera je ponovljivosti rezultata, odnosno podudaranja numeričkih vrijednosti dvaju ili više mjerenja izvedenih na potpuno isti način. Ista metoda ispituje se u različitim uvjetima; na različitim uzorcima, u različitim laboratorijima ili ispitivanje vrši drugi analitičar. Ovisno o uvjetima u kojima se provodi ispitivanje preciznosti, provode se eksperimenti ponovljivosti i međupreciznosti.

**Istinitost** opisuje bliskost rezultata mjerenja i njegove prihvaćene vrijednosti, a izražava se kao apsolutna ili relativna sustavna pogreška. Eksperiment istinitosti provodi se nakon provedbe linearnosti i preciznosti, najmanje tri puta.

## 2. OPĆI DIO

**Radno područje** je interval između gornje i donje granice analita koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, točnost i linearnost te ovisi o svrsi metode. Zaključak se donosi na osnovu eksperimenta linearnosti te stoga nije potrebno provoditi zasebno ispitivanje u tu svrhu. Maksimalno područje metode potrebno je definirati ukoliko se radi s uzorcima sa širokim rasponom koncentracija, u suprotnom to nije nužno.

**Robusnost** je mjera otpornosti analitičke metode na male i namjerne promjene parametara metode poput vlage, temperature, stabilnosti instrumenta, električnih instalacija i stabilnost otopina. Najčešće se izražava kao relativno standardno odstupanje (RSD). Ukoliko promjena nekog parametra ne utječe bitno na rezultat, metoda se smatra robusnom.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

- Sulfametoksazol,  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ , korišten za analizu proizvođača je Sigma-Aldrich (SAD), p.a. CAS: 723-46-6.
- Metanol,  $CH_3OH$ , korišten za otapanje uzorka farmaceutika uz deioniziranu vodu proizvođača je J. T. Baker (SAD), čistoće  $\geq 99.9\%$ ,
- Acetonitril,  $C_2H_3N$ , korišten kao organska mobilna faza za HPLC-DAD uređaj proizvođača je Fisher Scientific (SAD), čistoće  $\geq 99.9\%$ , CAS: 75-05-8.
- Mravlja kiselina,  $HCOOH$ , korištena u količini  $1\%$  u odnosu sa deioniziranom vodom kao vodena mobilna faza za HPLC-DAD uređaj proizvođača je Lach Ner (Češka), čistoće  $\sim 98\%$ , CAS: 64-18-6.
- Deionizirana voda korištena za pripremu otopina farmaceutika i kao vodena pokretna faza na HPLC-DAD uređaju pročišćena je kroz uređaj Millipore, Simplicity (SAD), iz destilirane vode pripremljene u prostorijama Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.
- Izvorska voda korištena za eksperiment ponovljivosti nakon filtracije na uređaju za filtraciju vode proizvođača Pall (SAD), uzorkovana je 7. prosinca 2021. na području naselja Horvati u Zagrebu.

#### 3.2. Instrumenti

##### 3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga korištena pri vaganju uzoraka sulfametoksazola proizvođača je Mettler Toledo (Švicarska), XA105 DualRange, ID: 1877 te je prikazana na Slici 4.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO



**Slika 4.** Analitička vaga

#### 3.2.2. *Ultrazvučna kupelj*

Ultrazvučna kupelj proizvođača Iskra (Slovenija), (Slika 5), korištena je za degaziranje otopina acetonitrila i deionizirane vode kao pokretnih faza za HPLC-DAD analizu.



**Slika 5.** Ultrazvučna kupelj

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – detektor s nizom dioda (HPLC-DAD)

HPLC-DAD uređaj korišten za analizu uzoraka sulfametoksazola u vodi i provedbu validacije proizvođača je Waters 2795 (SAD), te koristi kolonu C<sub>18</sub> proizvođača Kinetex, promjera zrna čestica 5 μm, duljine 150 mm i promjera 4,6 mm. HPLC-DAD uređaj prikazan je na Slici 6., a korištena kolona je prikazana na Slici 7.



**Slika 6.** HPLC-DAD uređaj



**Slika 7.** C<sub>18</sub> kolona

#### 3.2.4. Sustav za filtraciju izvorske vode

Sustav za filtraciju izvorske vode proizvođača je Pall te je prikazan na Slici 8.



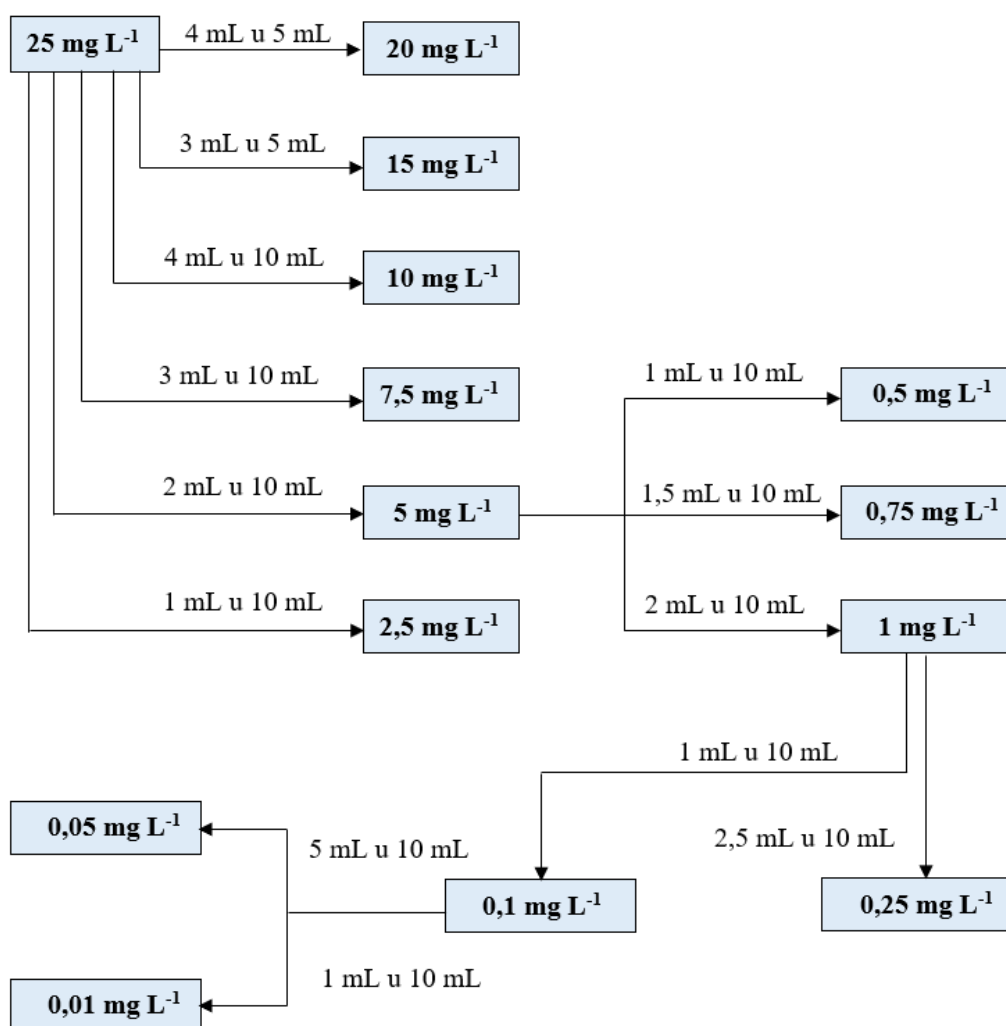
**Slika 8.** Sustav za filtraciju izvorske vode

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.3. Opis rada

##### 3.3.1. Priprema otopina

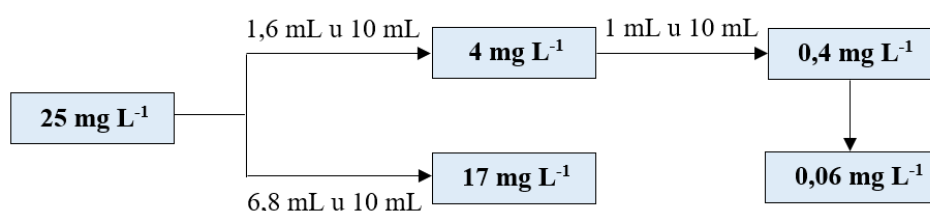
Za eksperiment linearnosti bilo je potrebno pripremiti otopine sulfametoksazola u deioniziranoj vodi raspona koncentracija:  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg L}^{-1}$  i  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . Odvagano je 2 mg farmaceutika u maloj čaši i dodano 200  $\mu\text{L}$  metanola kako bi se farmaceutik lakše otopio. Otopina je prebačena u tikvicu od 20 mL te je do oznake dodana deionizirana/izvorska voda kako bi se dobila otopina koncentracije  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Zatim je iz te otopine uzeto 5 mL i prebačeno u tikvicu od 20 mL te je do oznake dodana deionizirana/izvorska voda čime se dobila otopina koncentracije  $25 \text{ mg L}^{-1}$  iz koje su se pripremale otopine preostalih 13 koncentracija na način prikazan shemom 1.



**Shema 1.** Postupak pripreme standardnih otopina za potrebe određivanja linearnosti

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Za eksperiment preciznosti (ponovljivost i međupreciznost), rađen u razmaku od 6 dana za mjerenja provedena s obje vrste vode, bilo je potrebno pripremiti otopine koncentracija  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg L}^{-1}$  i  $17 \text{ mg L}^{-1}$ . Otopine su prebačene u 40 vijala (10 za svaku koncentraciju). Odvagano je 1 mg farmaceutika u maloj čaši i dodano  $100 \mu\text{L}$  metanola kako bi se farmaceutik lakše otopio. Otopina je prebačena u tikvicu od 10 mL te je do oznake dodana deionizirana/izvorska voda kako bi se dobila otopina koncentracije  $100 \text{ mg L}^{-1}$  iz koje se pripravila otopina koncentracije  $25 \text{ mg L}^{-1}$  te su se potrebne otopine pripravile na način prikazan shemom 2.



**Shema 2.** Postupak pripreme standardnih otopina za potrebe određivanja preciznosti

Za eksperiment robusnosti korištena je radna otopina koncentracije  $4 \text{ mg L}^{-1}$  koja je raspoređena u 50 vijala za analizu. Cilj ovoga eksperimenta bio je ispitati utjecaj promjene sastava i protoka pokretne faze. Granica detekcije i granica kvantifikacije odredile su se iz eksperimentalnih podataka za otopinu farmaceutika koncentracije  $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 3.3.2. Rad na HPLC-DAD uređaju

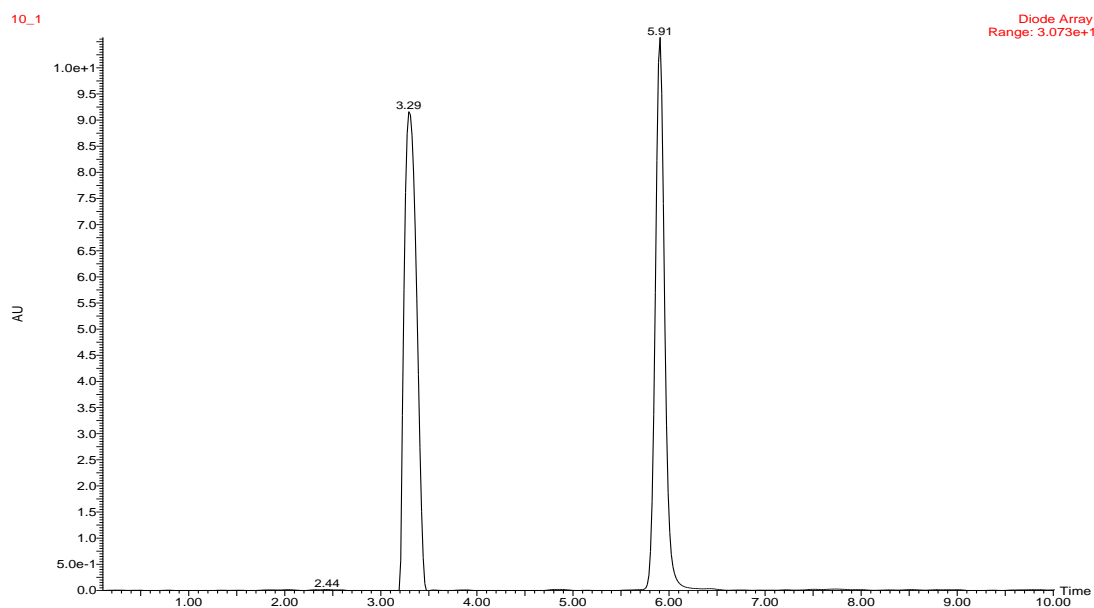
Pokretna faza sastojala se od 1 L vodene otopine mravlje kiseline (0,1 %) kao vodena faza (A) i 1 L otopine mravlje kiseline (0,1 %) u acetonitrilu kao organska faza (B), a kao nepokretna faza koristila se  $\text{C}_{18}$  kolona. Korištena metoda je izokratna, odnosno omjer vodene i organske faze podešen je na 65 : 35 s protokom od  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  i volumenom injektiranja od  $20 \mu\text{L}$  za eksperimente linearnosti i preciznosti. Za eksperiment robusnosti mijenjao se protok pokretne faze ( $0,45 \text{ mL min}^{-1}$  i  $0,55 \text{ mL min}^{-1}$ ) te omjer vodene i organske pokretne faze (63 : 37 i 67 : 33). Sulfametoksazol je identificiran i kvantificiran pri valnoj duljini od 270 nm i vremenu zadržavanja oko 6,17 minuta.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

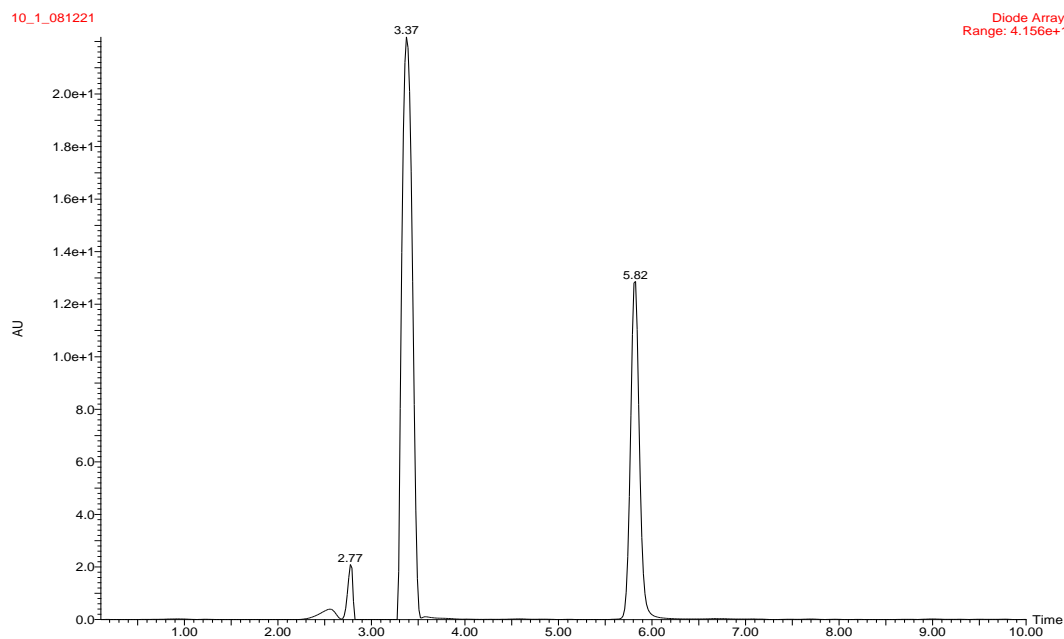
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Selektivnost

Za eksperiment selektivnosti potrebno je usporediti kromatograme dobivene analizom na HPLC-DAD uređaju. Na Slikama 9.-11. prikazani su kromatogrami sulfametoksazola u deioniziranoj i izvorskoj vodi, te usporedba kromatograma uzoraka u obje vrste voda, gdje je vidljiva ovisnost odziva DAD detektora o vremenu zadržavanja uzorka u kromatografskom sustavu.

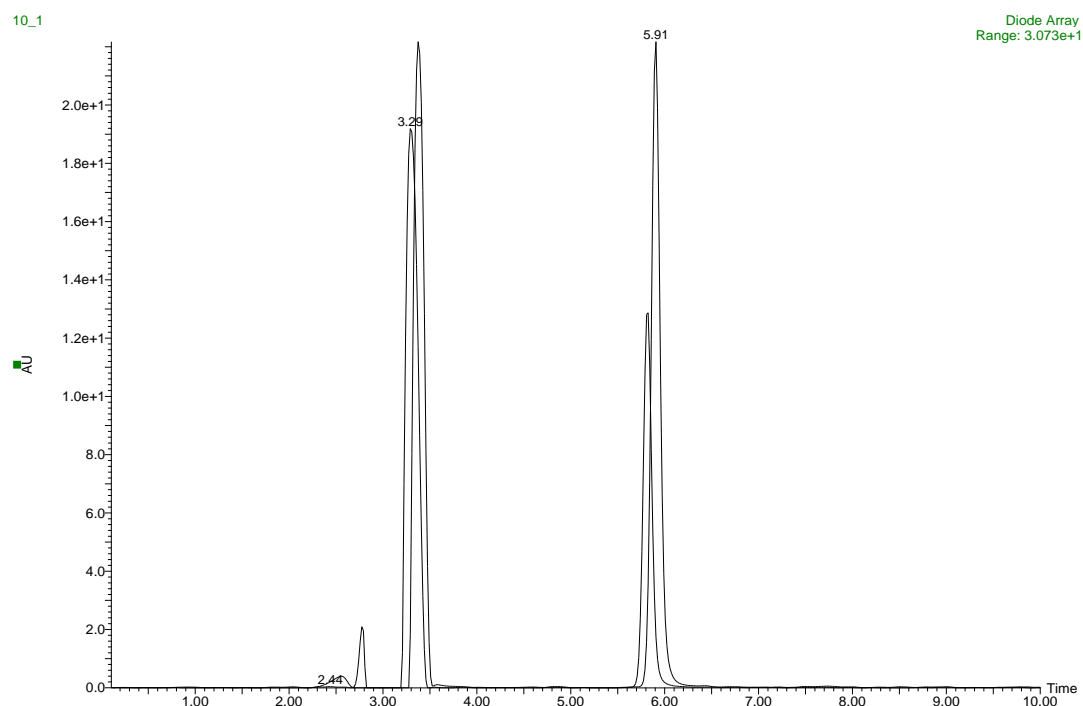


Slika 9. Kromatogram sulfametoksazola u deioniziranoj vodi.



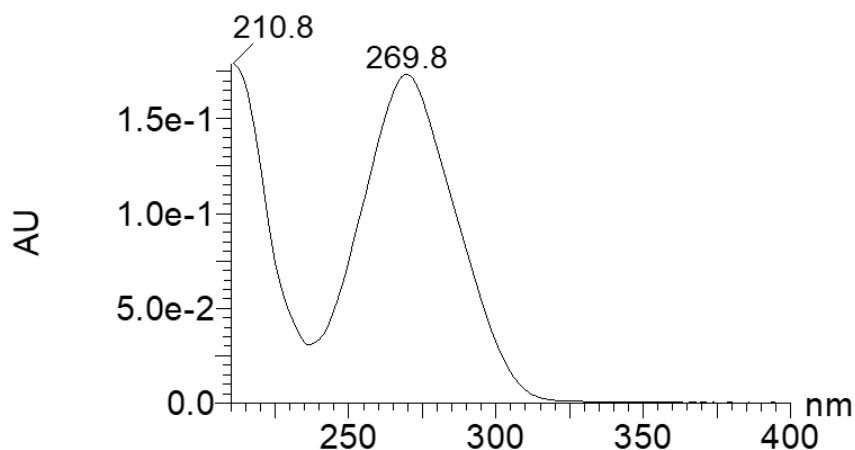
Slika 10. Kromatogram sulfametoksazola u izvorskoj vodi.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA



**Slika 11.** Usporedba kromatograma sulfametoksazola u deioniziranoj i izvorskoj vodi.

Vrijeme zadržavanja sulfametoksazola u deioniziranoj vodi iznosi 5,91 minuta, a u izvorskoj vodi 5,82 minute. Ove vrijednosti su vrlo bliske, no vrijeme zadržavanja farmaceutika u deioniziranoj vodi nešto je veće. U oba slučaja zone su uske i oštre, što ukazuje na dobru separaciju i zadovoljavajuću djelotvornost kolone. Na Slici 12. prikazana je ovisnost odziva detektora o valnoj duljini, iz čega je uočljivo da se uzorak detektira pri valnoj duljini od 270 nm zbog toga što pri toj vrijednosti sulfametoksazol najviše apsorbira. Kriterij selektivnosti je zadovoljen.



**Slika 12.** Ovisnost apsorbancije o valnoj duljini za sulfametoksazol.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

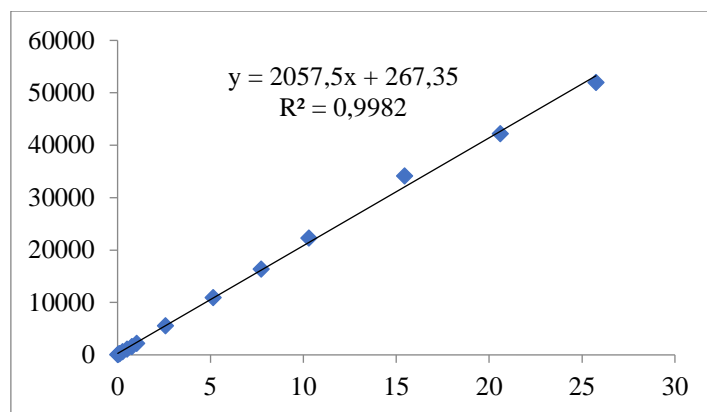
### 4.2. Linearnost

Za eksperiment linearnosti s otopinama sulfametoksazola u deioniziranoj vodi odvagano je 2,06 mg farmaceutika te su se radne otopine pripremile na prethodno opisan način (str. 16). Otopina svake koncentracije analizirana je na uređaju tri puta te su dobivene po tri izmjerene površine ispod pika za svaku koncentraciju. Uz očitane površine, Tablica 1. i Tablica 2. sadrže i izračunatu srednju vrijednost površina za svaku koncentraciju farmaceutika, izračun standardnog odstupanja te relativnog standardnog odstupanja (RSD). Slika 13. i Slika 14. prikazuju grafički prikaz ovisnosti srednje vrijednosti površina ispod kromatografske krivulje o stvarnoj koncentraciji farmaceutika.

**Tablica 1.** Eksperimentalni podaci površina ispod kromatografskih krivulja za eksperiment linearnosti s deioniziranom vodom.

Nazivna koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	Stvarna koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>sr</sub>	Standardno odstupanje	RSD [%]
0,01	0,0103	69,87	68,03	99,04	78,98	17,3968129	22,02685861
0,05	0,0515	177,32	177,79	157,68	170,93	11,4772427	6,71458650
0,1	0,103	243,37	247,35	259,63	250,12	8,4757143	3,38870434
0,25	0,2575	585,71	592,41	584,25	587,46	4,3513829	0,74071556
0,5	0,515	1149,94	1113,85	1099,15	1120,98	26,1349134	2,33143441
0,75	0,7725	1564,17	1651,87	1607,64	1607,89	43,8505488	2,72720509
1	1,03	2172,08	2220,39	2273,51	2221,99	50,7340047	2,28326539
2,5	2,575	5560,06	5597,78	5524,20	5560,68	36,7939180	0,66168019
5	5,15	10795,64	11117,14	10962,21	10958,33	160,7851153	1,46724104
7,5	7,725	16481,49	16525,49	16124,92	16377,30	219,6719106	1,34131945
10	10,30	21434,59	22726,33	22674,54	22278,49	731,2945638	3,28251454
15	15,45	34307,11	34548,70	33505,76	34120,52	545,9321378	1,60001103
20	20,60	42948,04	41604,66	42025,61	42192,77	687,1130222	1,62850892
25	25,75	52528,25	48992,72	54438,29	51986,42	2762,9229030	5,31470123

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA



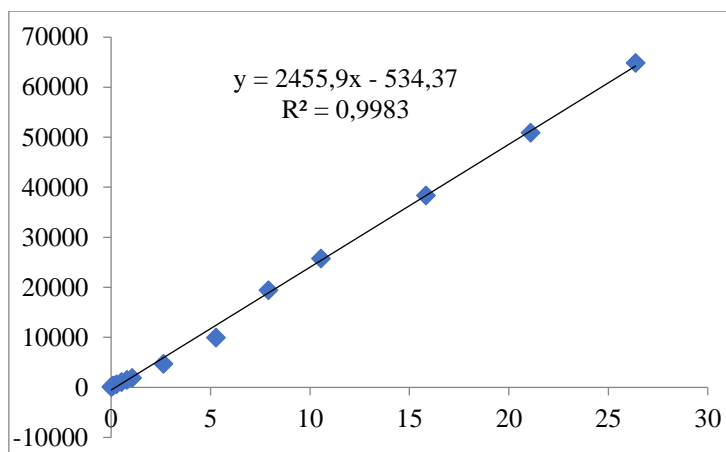
**Slika 13.** Umjerni pravac ovisnosti srednje vrijednosti površine ispod kromatografske krivulje o stvarnoj koncentraciji farmaceutika u deioniziranoj vodi.

Za eksperiment linearnosti s otopinama sulfametoksazola u izvorskoj vodi odvagano je 2,11 mg farmaceutika te su radne otopine pripremljene na prethodno opisan način.

**Tablica 2.** Eksperimentalni podaci površina ispod pikova za eksperiment linearnosti s izvorskom vodom.

Nazivna koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	Stvarna koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>sr</sub>	Standardno odstupanje	RSD [%]
0,01	0,01055	88,24	96,66	119,57	101,49	16,2139	15,97581
0,05	0,05275	195,32	194,08	205,43	198,28	6,2259	3,14002
0,1	0,1055	337,90	333,69	346,12	339,24	6,3219	1,86356
0,25	0,26375	691,28	559,53	550,05	600,29	78,9450	13,15121
0,5	0,5275	1111,62	1076,59	1062,16	1083,46	25,4349	2,34757
0,75	0,79125	1528,32	1545,65	1471,92	1515,30	38,5517	2,54417
1	1,055	1949,45	1889,55	1808,70	1882,57	70,6344	3,75203
2,5	2,6375	4605,20	4711,99	4834,53	4717,24	114,7551	2,43268
5	5,275	9766,24	10136,13	9910,66	9937,68	186,4191	1,87588
7,5	7,9125	19403,76	19587,37	19318,37	19436,50	137,4561	0,70721
10	10,55	25736,23	25799,41	25727,67	25754,44	39,1825	0,15214
15	15,825	38066,43	38459,09	38531,14	38352,22	250,1095	0,65214
20	21,1	50943,16	50738,02	50970,75	50883,98	127,1527	0,24989
25	26,375	65082,30	64665,30	64786,27	64844,62	214,5369	0,33085

## 4. REZULTATI I RASPRAVA



**Slika 14.** Umjerni pravac ovisnosti srednje vrijednosti površine ispod kromatografske krivulje o stvarnoj koncentraciji farmaceutika u izvorskoj vodi.

Kriterij linearnosti zadovoljen je u oba provedena eksperimenta. Kao indikator točnosti metode, uz grafički prikaz ovisnosti srednje vrijednosti površine ispod kromatografske krivulje o stvarnoj koncentraciji farmaceutika u deioniziranoj/izvorskoj vodi, vrijednost relativnog standardnog odstupanja također ukazuje na ispravnost metode. Pri koncentracijama od 0,05 – 25 mg L<sup>-1</sup> sulfametoksazola vrijednost RSD u postotku iznosi manje od 10 % što je poželjno, dok pri koncentraciji 0,01 mg L<sup>-1</sup> RSD iznosi nešto više od 10 %, ali s obzirom da se radi o vrlo maloj koncentraciji farmaceutika u otopini ovakvo odstupanje smatra se prihvatljivim. Vrijednosti koeficijenta korelacije ( $R^2$ ) prikazane uz grafički prikaz na Slici 13. i Slici 14. za oba eksperimenta iznose vrlo blizu 1; 0,9982 za eksperiment s deioniziranom vodom te 0,9983 za eksperiment s izvorskom vodom čime je potvrđena linearnost.

### 4.3. Osjetljivost

Osjetljivost predstavlja nagib umjernog pravca. U provedenim analizama osjetljivost je velika za oba uzorka; za otopinu deionizirane vode iznosi 2057,5 L mg<sup>-1</sup>, a za otopinu izvorske vode iznosi 2455,9 L mg<sup>-1</sup>. Ove vrijednosti razlikuju se za manje od 3 % što ukazuje na prihvatljivo odstupanje. Veći nagib predstavlja veću osjetljivost, koju u ovom slučaju imaju otopine izvorske vode.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

U Tablici 3. prikazane su očitane površine ispod kromatografskih krivulja kao i koncentracije sulfametoksazola izračunate dijeljenjem površine s nagibom umjernog pravca, naznačenog na Slici 12. Pri mjerenju koristile su se radne otopine nazivne koncentracije 0,06 mg L<sup>-1</sup> sulfametoksazola načinom prikazanim na str. 17, otopljenog u deioniziranoj, odnosno Oizvorskoj vodi. Mjerenja su provedena 10 puta.

**Tablica 3.** Očitane površine i koncentracije sulfametoksazola u otopinama koncentracije 0,06 mg L<sup>-1</sup>.

Broj uzorka, n	Deionizirana voda		Izvorska voda	
	Stvarna koncentracija sulfametoksazola [mg L <sup>-1</sup> ]			
	0,0618		0,0594	
	A	Koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	A	Koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]
1	217,98	0,105132	253,96	0,104721
2	184,67	0,089066	231,34	0,095394004
3	197,94	0,095466	236,87	0,097674
4	187,70	0,090528	254,77	0,105055462
5	210,08	0,101322	243,08	0,100235
6	182,06	0,087807	258,52	0,106602
7	187,11	0,090243	248,32	0,102396
8	194,52	0,093817	247,94	0,102239
9	171,06	0,082502	256,11	0,105608
10	174,23	0,084031	268,04	0,110527
<b>Srednja vrijednost</b>	190,735	0,091991	249,895	0,102214
$\sigma$	14,82	0,01	10,79729	0,004452307
$\sigma_0$	4,69	0,00	3,414403	0,001408
<b>RSD</b>	7,77	7,77	4,32	4,355873

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Na osnovu podataka prikazanih u Tablici 3. izračunate su vrijednosti granice detekcije i granice kvantifikacije pomoću jednadžbi (6) – (9). Granica detekcije za radne otopine sulfametoksazola u deioniziranoj vodi iznosi  $0,0075 \text{ mg L}^{-1}$ , a u izvorskoj vodi  $0,00465 \text{ mg L}^{-1}$ . Granica kvantifikacije za otopine sulfametoksazola u deioniziranoj vodi iznosi  $0,0226 \text{ mg L}^{-1}$ , a u izvorskoj vodi  $0,01406 \text{ mg L}^{-1}$ . Granica kvantifikacije za obje vrste otopine veća je od granice detekcije te obje vrijednosti iznose nešto više za deioniziranu vodu.

### 4.5. Preciznost

Za eksperiment preciznosti; ponovljivosti i međupreciznosti, odabrane su i pripremljene koncentracije sulfametoksazola u iznosima,  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg L}^{-1}$  i  $17 \text{ mg L}^{-1}$  na opisan način (str. 17). Svaka otopina prebačena je u 10 vijala. Za analizu obje vrste vode mjerenje se vršilo dva puta, dva različita dana na način da su se temeljna i radne standardne otopine svaki put ponovno pripremale.

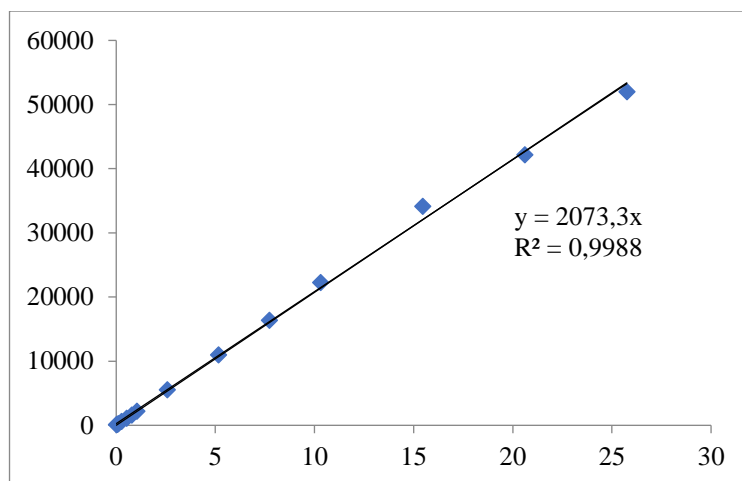
Prvo mjerenje za otopinu sulfametoksazola u deioniziranoj vodi provedeno je 4. studenog 2021. kada je početna otopina sadržavala  $1,03 \text{ mg}$  farmaceutika otopljenog u  $10 \text{ mL}$  deionizirane vode. Rezultati ovoga mjerenja prikazani su u Tablici 4.

Drugo mjerenje za otopinu sulfametoksazola u deioniziranoj vodi vršilo se 10. studenog 2021. kada je početna otopina sadržavala  $1,00 \text{ mg}$  farmaceutika otopljenog u  $10 \text{ mL}$  deionizirane vode, što daje jednake vrijednosti nazivne i stvarne koncentracije. Rezultati ovog mjerenja prikazani su u Tablici 5.

Prvo mjerenje za otopinu sulfametoksazola u izvorskoj vodi vršilo se 9. prosinca 2021. kada je početna otopina sadržavala  $0,99 \text{ mg}$  farmaceutika otopljenog u  $10 \text{ mL}$  izvorske vode. Rezultati ovog mjerenja prikazani su u Tablici 6.

Drugo mjerenje za otopinu sulfametoksazola u izvorskoj vodi vršilo se 15. prosinca 2021. kada je početna otopina sadržavala  $1,11 \text{ mg}$  farmaceutika otopljenog u  $10 \text{ mL}$  izvorske vode. Rezultati ovog mjerenja prikazani su u Tablici 7.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA



**Slika 15.** Umjerni pravac ovisnosti srednje vrijednosti površine ispod kromatografske krivulje o stvarnoj koncentraciji farmaceutika u deioniziranoj vodi rađen s podacima za koncentracije neuključujući one krajnje.

**Tablica 4.** Eksperimentalni podaci očitanih površina ispod kromatografskih krivulja za eksperiment preciznosti s deioniziranom vodom prvog mjerenja.

<b>Nazivna koncentracija [mg L<sup>-1</sup>]</b>	0,4	4	17
<b>Stvarna koncentracija [mg L<sup>-1</sup>]</b>	0,412	4,12	17,51
<b>Broj uzorka, n</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
1	1151,99	10256,84	43775,04
2	1195,81	10221,93	43522,56
3	1166,26	10072,74	43401,22
4	1116,31	10066,64	42540,35
5	1126,75	10218,37	42713,02
6	1169,40	10112,23	43694,01
7	1168,92	10301,97	43168,01
8	1162,08	9899,05	43481,84
9	1166,10	10123,13	43697,55
10	1193,20	9994,66	43842,52
<b>Srednja vrijednost</b>	1161,68	10126,76	43383,61
<b><math>\sigma</math></b>	25,13	125,22	446,62
<b><math>\sigma_0</math></b>	7,95	39,60	141,23
<b>RSD [%]</b>	2,16	1,24	1,03

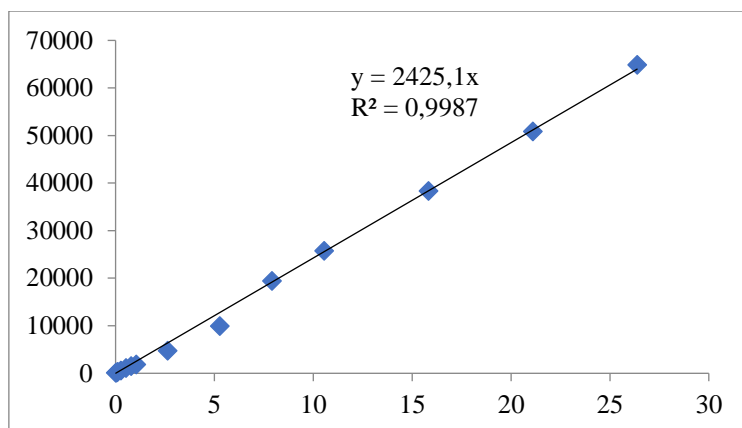
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

**Tablica 5.** Eksperimentalni podaci očitanih površina ispod kromatografskih krivulja za eksperiment preciznosti s deioniziranom vodom drugog mjerenja.

Nazivna koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	0,4	4	17
Broj uzorka, n	A	A	A
1	1363,53	12160,27	51481,28
2	1354,50	12248,98	50298,51
3	1346,90	12182,79	50549,58
4	1349,69	12315,58	50065,59
5	1350,35	12157,00	50644,03
6	1343,91	12235,31	50083,15
7	1366,90	12307,60	50475,10
8	1366,73	12162,13	50489,00
9	1356,73	12044,42	51375,93
10	1385,53	12347,09	50274,87
<b>A<sub>sr</sub></b>	1358,48	12216,12	50573,70
<b><math>\sigma</math></b>	12,49	92,49	489,17
<b>RSD [%]</b>	0,92	0,76	0,97

Sve vrijednosti relativnih standardnih odstupanja oba eksperimenta iznose manje od 10 % te se izračunata srednje vrijednosti površina za pojedinu koncentraciju ne razlikuju značajno. Rezultati provedena dva mjerenja za otopine farmaceutika u deioniziranoj vodi zadovoljavaju kriterij preciznosti.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA



**Slika 16.** Umjerni pravac ovisnosti srednje vrijednosti površine ispod kromatografske krivulje o stvarnoj koncentraciji farmaceutika u izvorskoj vodi rađen s podacima za koncentracije neuključujući one krajnje.

**Tablica 6.** Eksperimentalni podaci očitanih površina ispod kromatografskih krivulja za eksperiment preciznosti s izvorskom vodom prvog mjerenja.

<b>Nazivna koncentracija [mg L<sup>-1</sup>]</b>	0,4	4	17
<b>Stvarna koncentracija [mg L<sup>-1</sup>]</b>	0,396	3,96	16,83
<b>Broj uzorka, n</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
1	1016,33	6793,66	28708,38
2	1065,00	6897,03	28919,72
3	929,60	6798,34	28363,35
4	1030,03	6906,35	28804,22
5	999,99	6857,53	28837,87
6	1039,89	6903,69	28452,35
7	1024,69	6811,58	28538,48
8	985,50	6833,98	28647,22
9	980,01	6801,45	28714,85
10	995,61	6828,46	28359,01
<b>Srednja vrijednost</b>	1006,67	6843,207	28634,55
<b><math>\sigma</math></b>	37,61698501	45,04537713	198,71989340
<b><math>\sigma_0</math></b>	11,89554	14,2446	62,84075
<b>RSD [%]</b>	3,74	0,66	0,69



#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

**Tablica 7.** Eksperimentalni podaci očitanih površina ispod kromatografskih krivulja za eksperiment preciznosti s izvorskom vodom drugog mjerenja.

Nazivna koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	0,4	4	17
Stvarna koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	0,444	4,44	18,87
Broj uzorka, n	A	A	A
1	1094,10	10330,27	41963,15
2	1083,90	10206,52	42552,90
3	1058,96	10203,14	41736,77
4	1103,88	10218,17	42480,73
5	1080,77	10144,22	42888,77
6	1067,50	10359,01	42379,65
7	1081,09	10392,09	41843,17
8	1077,27	10189,25	41663,64
9	1070,83	10302,28	42349,40
10	1067,12	10377,96	42421,36
<b>A<sub>sr</sub></b>	1078,54	10272,29	42227,95
<b>σ</b>	13,42123	89,83540	402,66090
<b>σ<sub>0</sub></b>	4,24417	28,40845	127,33250
<b>RSD [%]</b>	1,24	0,87	0,95

Sve vrijednosti relativnih standardnih odstupanja oba eksperimenta iznose manje od 10 % te se izračunata srednje vrijednosti površina za pojedinu koncentraciju ne razlikuju značajno. Rezultati provedena dva mjerenja za otopine farmaceutika u izvorskoj vodi zadovoljavaju kriterij preciznosti.

Pomoću rezultata koji su dobiveni za preostale tri koncentracije (0,4 mg L<sup>-1</sup>, 4 mg L<sup>-1</sup> i 17 mg L<sup>-1</sup>) proveden je *F*-test. Svrha *F*-testa jest usporedba standardnih odstupanja dvaju nizova, odnosno varijanci ( $s^2$ ), u ovom slučaju uspoređivani su uzorci u istoj vodi uzorkovani i analizirani u određenom vremenskom razmaku radi provjere međupreciznosti. U Tablici 8. i Tablici 9. naznačene su vrijednosti standardnih odstupanja uzoraka u deioniziranoj i izvorskoj vodi te odgovarajuća teorijska i računski *F*-vrijednost dobivena izrazom (10):

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (10)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

gdje je  $s_1 > s_2$ .

**Tablica 8.** Prikaz odgovarajućih  $F$ -vrijednosti za eksperiment s deioniziranom vodom.

Koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	$s_1$	$s_2$	$F_{\text{računski}}$	$F_{\text{teorijski}}$
0,4	25,13	12,49	4,05	3,18
4	125,22	92,49	1,83	3,18
17	446,62	489,17	0,83	3,18

**Tablica 9.** Prikaz odgovarajućih  $F$ -vrijednosti za eksperiment s izvorskom vodom.

Koncentracija [mg L <sup>-1</sup> ]	$s_1$	$s_2$	$F_{\text{računski}}$	$F_{\text{teorijski}}$
0,4	37,62	13,4212	7,86	3,18
4	45,05	89,8354	0,25	3,18
17	198,72	402,6609	0,24	3,18

U slučaju kada je izračunata  $F$ -vrijednost veća od teorijske  $F$ -vrijednosti, nulta hipoteza se odbacuje te se varijance dvaju mjerenja definiraju kao nejednake što je slučaj pri koncentraciji farmaceutika u vrijednosti od 0,4 mg L<sup>-1</sup> zbog male vrijednosti koncentracije. Odnosno, pokazana je signifikantna razlika u preciznosti dvaju provedenih mjerenja pri navedenoj koncentraciji. Odstupanje ove vrijednosti u eksperimentu s deioniziranom vodom vrlo je malo, dok je u eksperimentu s izvorskom vodom ono nešto veće, radi interferencija prisutnih u izvorskoj vodi.

### 4.6. Istinitost

Provjera kriterija istinitosti vrši se s podacima za otopine istih koncentracija kao u eksperimentu ponovljivosti. U Tablici 10. i Tablici 11. prikazane su vrijednosti pravih pripremljenih koncentracija, koncentracija izmjerenih instrumentom i iskorištenje za uzorke provedenih mjerenja s otopinama farmaceutika u deioniziranoj i izvorskoj vodi. Koncentracije izmjerene instrumentom izračunate su dijeljenjem očitane površine ispod kromatografske krivulje s vrijednošću nagiba odgovarajućeg umjernog pravca naznačenih na Slici 13. i Slici 14.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

**Tablica 10.** Prikaz vrijednosti pravih pripremljenih koncentracija, koncentracija izmjerenih na HPLC-DAD uređaju i iskoristivosti za prvo mjerenja s deioniziranom vodom.

<b>Stvarna konc. [mg L<sup>-1</sup>]</b>	0,412		4,12		17,51	
<b>Broj uzorka, n</b>	<b>Izmjerena konc. [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Iskoristivost [%]</b>	<b>Izmjerena konc. [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Iskoristivost [%]</b>	<b>Izmjerena konc. [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Iskoristivost [%]</b>
1	0,428871	104,0950	4,854287	117,8225	21,145820	120,7642
2	0,450170	109,2646	4,837319	117,4107	21,023102	120,0634
3	0,435807	105,7785	4,764805	115,6506	20,964125	119,7266
4	0,411529	99,8857	4,761840	115,5786	20,545699	117,3369
5	0,416603	101,1174	4,835589	117,3687	20,629625	117,8162
6	0,437334	106,1489	4,783999	116,1165	21,106435	120,5393
7	0,437100	106,0923	4,876222	118,3549	20,850773	119,0792
8	0,433776	105,2854	4,680383	113,6015	21,003310	119,9504
9	0,435730	105,7596	4,789297	116,2451	21,108156	120,5491
10	0,448902	108,9567	4,726854	114,7295	21,178619	120,9516
<b>Srednja vrijednost</b>	0,433582	105,2384	4,791060	116,2879	20,955570	119,6777

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

**Tablica 11.** Prikaz vrijednosti pravih pripremljenih koncentracija, koncentracija izmjerenih na HPLC-DAD uređaju i iskoristivosti za prvo mjerenja s izvorskom vodom.

Stvarna konc. [mg L <sup>-1</sup> ]	0,444		4,44		18,87	
Broj uzorka, n	Izmjerena konc. [mg L <sup>-1</sup> ]	Iskoristivost [%]	Izmjerena konc. [mg L <sup>-1</sup> ]	Iskoristivost [%]	Izmjerena konc. [mg L <sup>-1</sup> ]	Iskoristivost [%]
1	0,451157	101,6119	4,259729	95,9399	17,303678	91,699408
2	0,446951	100,6646	4,208701	94,7906	17,546864	92,988151
3	0,436667	98,3483	4,207307	94,7592	17,210329	91,204714
4	0,455189	102,5202	4,213505	94,8988	17,517104	92,830442
5	0,445660	100,3739	4,183011	94,2120	17,685361	93,722106
6	0,440188	99,1415	4,271581	96,2068	17,475424	92,609559
7	0,445792	100,4036	4,285221	96,5140	17,254204	91,437223
8	0,444217	100,0488	4,201579	94,6302	17,180174	91,044907
9	0,441561	99,4507	4,248188	95,6799	17,462950	92,543455
10	0,440031	99,1062	4,279395	96,3828	17,492623	92,700705
Srednja vrijednost	0,444741	100,1669	4,235822	95,4014	17,412871	92,2781

Da bi kriterij istinitosti bio zadovoljen, poželjno je da su odstupanja izmjerenih od stvarnih pripremljenih koncentracija uzoraka u rasponu od 90 % - 110 %. U eksperimentu provedenom s otopinama u deioniziranoj vodi, pri koncentracijama farmaceutika od 4,12 mg L<sup>-1</sup>, odnosno 17,51 mg L<sup>-1</sup> postoji odstupanje od navedenih vrijednosti, dok rezultati eksperimenta provedenog u izvorskoj vodi u potpunosti zadovoljavaju kriterij.

### 4.7. Radno područje

Radno područje metode može se definirati na osnovu ispitivanja kriterija linearnosti. Kriterij linearnosti je zadovoljen s obzirom da je iznos korelacijskog faktora  $R^2$  vrlo blizak 1 te je RSD za sve koncentracije manji od 10 %, osim pri koncentraciji sulfametoksazola u iznosu

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

od  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ . Stoga, radnim područjem se može smatrati raspon koncentracija od granice kvantifikacije ( $0,0226 \text{ mg L}^{-1}$  za deioniziranu vodu,  $0,01406 \text{ mg L}^{-1}$  za izvorsku vodu) koje su u oba slučaja nešto veće od navedenih  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ , pa sve do  $25 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 4.8. Robusnost

Provjera kriterija robusnosti izvela se na način da se provelo 5 mjerenja iste koncentracije sulfametoksazola koja je iznosila  $4 \text{ mg L}^{-1}$  nazivno, odnosno stvarne  $4,2 \text{ mg L}^{-1}$  u deioniziranoj vodi i  $3,88 \text{ mg L}^{-1}$  u izvorskoj vodi. Prvi eksperiment proveo se pri unaprijed definiranom omjeru vodene i organske faze ( $65 : 35$ ) i protoku od  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Drugi i treći eksperiment provedeni su pri istom protoku od  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  promijenivši omjere vodene i organske pokretne faze na omjer  $63 : 37$  za drugi eksperiment, odnosno  $67 : 33$  za treći eksperiment. Četvrti i peti eksperiment provedeni su pri istom omjeru vodene i organske pokretne faze ( $65 : 35$ ) promijenivši protok pokretne faze na  $0,45 \text{ mL min}^{-1}$  za četvrti eksperiment, odnosno  $0,55 \text{ mL min}^{-1}$  za peti eksperiment.

U Tablici 12. i Tablici 13. prikazane su očitane površine ispod kromatografskih krivulja, srednja vrijednost površina za pojedini eksperiment, standardno odstupanje te relativno standardno odstupanje.

Vrijednost RSD za svaki provedeni eksperiment iznosi manje od 3 % što ukazuje kako je metoda robusna i kriterij je zadovoljen.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

**Tablica 12.** Prikaz rezultata eksperimenta provjere kriterija robusnosti u deioniziranoj vodi.

<b>Eksperiment</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>A<sub>1</sub></b>	7936,78	7460,48	7901,90	8695,59	7172,75
<b>A<sub>2</sub></b>	7753,56	7818,13	7665,14	8781,49	7211,59
<b>A<sub>3</sub></b>	7647,05	7793,00	7804,99	8536,90	7128,55
<b>A<sub>4</sub></b>	7681,01	7762,71	7754,93	8643,60	7189,09
<b>A<sub>5</sub></b>	7895,44	7792,38	7847,35	8804,09	7052,14
<b>A<sub>6</sub></b>	7611,30	7878,06	7772,19	8577,45	7232,55
<b>A<sub>7</sub></b>	7719,28	7948,45	7847,35	8813,03	7206,89
<b>A<sub>8</sub></b>	7762,47	7979,33	7707,24	8649,21	7233,25
<b>A<sub>9</sub></b>	7926,43	7934,23	7772,05	8809,82	7172,15
<b>A<sub>10</sub></b>	7915,20	7895,23	7957,45	8410,04	7016,04
<b>A<sub>sr</sub></b>	7784,85	7826,20	7803,06	8672,12	7161,50
<b><math>\sigma</math></b>	123,8366	148,1786	88,1709	135,8171	74,5136
<b>RSD [%]</b>	1,590737	1,893366	1,129953	1,566135	1,040475

**Tablica 13.** Prikaz rezultata eksperimenta provjere kriterija robusnosti u izvorskoj vodi.

<b>Eksperiment</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>A<sub>1</sub></b>	9278,12	9294,76	9419,75	10285,95	8484,45
<b>A<sub>2</sub></b>	9202,99	9362,91	9386,78	10432,26	8551,74
<b>A<sub>3</sub></b>	9454,63	9425,26	9254,74	10297,53	8586,28
<b>A<sub>4</sub></b>	9366,62	9452,15	9394,39	10319,30	8568,28
<b>A<sub>5</sub></b>	9449,93	9517,52	9369,63	10459,30	8474,94
<b>A<sub>6</sub></b>	9239,70	9416,03	9336,81	10297,66	8462,03
<b>A<sub>7</sub></b>	9383,15	9319,75	9319,52	10279,01	8492,61
<b>A<sub>8</sub></b>	9416,13	9453,71	9259,21	10438,18	8460,27
<b>A<sub>9</sub></b>	9465,29	9467,23	9350,91	10425,36	8363,95
<b>A<sub>10</sub></b>	9273,13	9281,35	9393,65	10226,62	8441,96
<b>A<sub>sr</sub></b>	9361,84	9412,15	9343,53	10359,39	8493,84
<b><math>\sigma</math></b>	97,0333	80,1322	56,6458	83,5444	66,0961
<b>RSD [%]</b>	1,036477	0,851370	0,606257	0,806460	0,778166

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.9. Sažetak rezultata metode

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat MiliQ/izvorska	Zadovoljavanje kriterija MiliQ/izvorska
Selektivnost	informacija	5,91 min / 5,82 min	DA / DA
Linearnost	$R^2 \geq 0,995$	0,9982 / 0,9983	DA / DA
Koeficijent korelacije			
Osjetljivost	informacija	2057,5 L mg <sup>-1</sup> / 2455,9 L mg <sup>-1</sup>	
Granica detekcije	informacija	0,0075 mg L <sup>-1</sup> / 0,00465 mg L <sup>-1</sup>	
Granica kvantifikacije	informacija	0,0226 mg L <sup>-1</sup> / 0,01406 mg L <sup>-1</sup>	
Preciznost	<b>RSD ≤ 10 %</b>		
Ponovljivost			
Međupreciznost	$\gamma = 0,4 \text{ mg L}^{-1}$	2,16 % / 3,74 %	DA/DA
	$\gamma = 4 \text{ mg L}^{-1}$	1,24 % / 0,66 %	DA/DA
	$\gamma = 17 \text{ mg L}^{-1}$	1,03 % / 0,69 %	DA/DA
	<b>RSD ≤ 10 %</b>		
	$\gamma = 0,4 \text{ mg L}^{-1}$	0,92 % / 1,24 %	DA/DA
	$\gamma = 4 \text{ mg L}^{-1}$	0,76 % / 0,87 %	DA/DA
$\gamma = 17 \text{ mg L}^{-1}$	0,97 % / 0,95 % /	DA/DA	
<i>F</i> -test: $F_{\text{računski}} < F_{\text{teorijski}}$ $F_{\text{teorijski}} = 3,18$			
$\gamma = 0,4 \text{ mg L}^{-1}$	4,05 / 7,86	NE/NE	
$\gamma = 4 \text{ mg L}^{-1}$	1,83 / 0,25	DA/DA	
$\gamma = 17 \text{ mg L}^{-1}$	0,83 / 0,24	DA/DA	
Istinitost			
Iskoristivost	<b>90 – 110 %</b>		
	$\gamma = 0,4 \text{ mg L}^{-1}$	105,2384 % / 100,1669 %	DA/DA
	$\gamma = 4 \text{ mg L}^{-1}$	116,2879 % / 95,4014 %	NE/DA
$\gamma = 17 \text{ mg L}^{-1}$	119,6777 % / 92,2781 %	NE/DA	
Radno područje	informacija	0,0226 – 25 mg L <sup>-1</sup> / 0,01406 – 25 mg L <sup>-1</sup>	

## **5. ZAKLJUČAK**



## 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu provedeno je ispitivanje valjanosti metode za određivanje uzoraka farmaceutika sulfametoksazola u deioniziranoj i izvorskoj vodi. Zaključci donešeni na osnovu provedenih eksperimenata su sljedeći:

- Metoda je selektivna za određivanje sulfametoksazola u obje vrste vode radi vrlo male razlike u vremenu zadržavanja.
- Kriterij linearnosti zadovoljen je za otopine sulfametoksazola u obje vrste vode radi vrijednosti korelacijskog faktora za otopine svih koncentracija, koji je iznosio  $\geq 0,995$ .
- Metoda je osjetljivija za određivanje sulfametoksazola u izvorskoj vodi, nego u deioniziranoj vodi.
- Granica detekcije za otopinu farmaceutika u deioniziranoj vodi iznosi  $0,0075 \text{ mg L}^{-1}$ , a za otopinu u izvorskoj vodi  $0,00465 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Granica kvantifikacije za otopinu farmaceutika u deioniziranoj vodi iznosi  $0,0226 \text{ mg L}^{-1}$ , a za otopinu u izvorskoj vodi  $0,01406 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Kriterij preciznosti zadovoljen je za otopine sulfametoksazola u obje vrste radi vrijednosti korelacijskog faktora za otopine svih koncentracija koji je iznosio  $\geq 0,995$ . Provedbom *F*-testa za otopinu koncentracije  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  u obje vrste vode vidljivo je kako su izračunate *F*-vrijednosti veće od teorijske *F*-vrijednosti, što se može smatrati prihvatljivim radi vrlo male koncentracije uzorka, ili pogreške analitičara pri pripravi otopina.
- Kriterij istinitosti zadovoljen je za otopine svih koncentracija u izvorskoj vodi, dok su blaža odstupanja od kriterija prisutna pri koncentracijama otopina deionizirane vode od  $4 \text{ mg L}^{-1}$  i  $17 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Metoda je robustna na male promjene protoka i omjera vodene i organske pokretne faze samog uređaja. RSD vrijednosti svih za otopine svih radnih koncentracija za obje vrste vode iznose manje od 3 %.
- Radno područje otopina farmaceutika u deioniziranoj vodi je od  $0,0226 \text{ mg L}^{-1}$  do  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , a u izvorskoj vodi od  $0,01406 \text{ mg L}^{-1}$  do  $25 \text{ mg L}^{-1}$ .

## 5. ZAKLJUČAK

Primijenjena analitička metoda validirana je po većini validacijskih kriterija te je ovime potvrđena njezina ispravnost i stoga se može primjenjivati u kromatografskoj analizi farmaceutika sulfametoksazola u uzorcima vode na HPLC-DAD uređaju, što predstavlja važnost za istraživanja koja se bave tematikom kakvoće i sastava voda. Detekcija farmaceutika u uzorcima vode važna je radi analize učinaka na okoliš i ljudsko zdravlje koje prisustvo farmaceutika može uzrokovati, što do danas nije istraženo u dovoljnoj mjeri da bi se mogli donijeti konkretni zaključci o njihovom potencijalnom štetnom djelovanju.

## **6. LITERATURA**

## 6. LITERATURA

- [1] H. Sanderson; A. R. Brain; D. J. Johnson; C. J. Wilson; K. R. Solomon: Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones, *Toxicology* **203** (2004) 27-40.
- [2] M. Periša; S. Babić: Farmaceutici u okolišu, *Kemija u industriji* **65** (2016) 471-482.
- [3] M. Li; X. Lu; W. Xu; G. M. Troup; M. J. McNevin; H. Nie; Y. Su: Quantifying Pharmaceutical Formulations from Proton Detected Solid-State NMR under Ultrafast Magic Angle Spinning, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **109** (2020) 3045-3053.
- [4] P. A. Masters; T. A. O'Bryan; J. Zurlo; D. Q. Miller; N. Joshi: Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited, *Arch Intern Med.* **163** (2003) 402-410.
- [5] <https://eu.wikipedia.org/wiki/Sulfametoxazol> [pristup 27. veljače 2022.]
- [6] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (2004) PubChem Compound Summary for CID 5329, Sulfamethoxazole; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole> [pristup 27. veljače 2022.]
- [7] C. F. Poole: The Essence of Chromatography, *Elsevier* (2003)
- [8] Š. Cerjan-Stefanović; V. Drevenkar; B. Jurišić; M. Medić-Šarić; M. Petrović; N. Šegudović; V. Švob; S. Turina: Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zageb, 1999.
- [9] D. A. Skoog; D. M. West; F. J. Holler: Osnove analitičke kemije (1999) 645-698.
- [10] M. Kaštelan-Macan: Kemijska analiza u sustavu kvalitete (2003) 217-235.
- [11] S. Ahuja; M. Dong, ed. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC, *Elsevier* (2005)
- [12] D. G. Watson: Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, *Elsevier* **70** (1999) 249-250.
- [13] P. Araujo: Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *Journal of Chromatography B* **877** (2009) 2224-2234.
- [14] AOAC International, How to meet ISO 17025, Requirements for method Verification, (2007)
- [15] The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation on Related Topics 2<sup>nd</sup> Edition, *Eurachem* (2014)
- [16] K. Lazarić: Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Laboratoriji* **62** (2012) 61-64.

## **7. ŽIVOTOPIS**

## 7. ŽIVOTOPIS

Ramona Petko [REDACTED] 2007. godine upisuje Osnovnu školu Malešnica koju završava 2015. godine. Osnovnu glazbenu školu „Rudolf Matz“ upisuje 2011. godine te ju završava 2015. godine, kao i osnovnu školu. Iste godine upisuje opći dvojezični smjer u X. gimnaziji „Ivan Supek“ koju završava 2019. godine. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Ekoinženjerstvo upisuje 2019. godine. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, pod mentorstvom dr. sc. Lea Frkanca u sklopu projekta „Sinteza supramolekulskih samo-udruženih nanostrukture za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala (SUPeRNANO)“.