

# Validacija HPLC-PDA metode za određivanje ciprofloksacina u vodi

---

Vuković, Martina

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:149:717503>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Martina Vuković  
ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

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

Kandidatkinja **Martina Vuković**

Predala je izrađen završni rad dana: 12. srpnja 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

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

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

Dr. sc. Martina Biošić, znanstveni suradnik, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, 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: 15. srpnja 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Martina Vuković

**VALIDACIJA HPLC-PDA METODE ZA ODREĐIVANJE CIPROFLOKSACINA U  
VODI**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Sandra Babić

Prof. dr. sc. Irena Škorić

Dr. sc. Martina Biošić

Zagreb, srpanj 2021.

*Završni rad pod nazivom Validacija HPLC-PDA metode za određivanje ciprofloksacina u vodi izrađen je u prostorijama Zavoda za analitičku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.*

**Zahvala:**

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na ukazanom povjerenju i dodijeljenoj temi, kao i na svoj pruženoj pomoći, strpljenju, prenesenim znanjima i ugodnoj radnoj atmosferi prilikom izrade ovoga rada.*

*Htjela bih se zahvaliti asistentu mag. ing. oecoing. Alanu Badrovu koji je bio uz mene u svakom trenutku prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada, uvijek dostupan za bilo kakva pitanja na koja je veoma vješto i brzo pronalazio adekvatne odgovore.*

*Također zahvale pripisujem i dr. sc. Dariu Dabiću koji me je među prvima uveo u svijet analitičke kemije i prenio znanja koja sam vrlo dobro mogla primijeniti u praksi prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem se i tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju Tanji Ivančić i Slavici Kos na pristupačnosti i susretljivosti prilikom rada u laboratoriju.*

*Posebice se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i ljubavi koju su mi pružili tijekom ovih godina studiranja i bez čije podrške ne bih postigla sve ovo što jesam, hvala vam što ste svakoga dana vjerovali u mene onda kada i ja sama nisam.*

*Za kraj bih se zahvalila svim mojim prijateljima i pojedinim kolegama koji su me poticali i gurali naprijed onda kada je bilo najteže.*

*Svima velika HVALA!*

## SAŽETAK

Nakon razvitka pojedine metode prvi slijedeći korak jest validacija iste. Validacija analitičke metode definira se kao postupak dokazivanja odnosno utvrđivanja je li metoda prikladna za uporabu u željenu svrhu. Procesu validacije metode pristupa se laboratorijskim ispitivanjima pri čemu je nužno ispitivanje izvedbenih karakteristika: selektivnosti/specifičnosti metode, linearnosti, radnoga područja, preciznosti, istinitosti, granica kvantifikacije i detekcije te robusnosti.

Primarni cilj ovoga rada bio je validirati unaprijed poznatu HPLC-PDA analitičku metodu za određivanje fluorokinolonskog antibiotika ciprofloksacina. Istraživanje je provedeno u svrhu upoznavanja cjelokupnog postupka validacije analitičke metode te donošenja adekvatnih zaključaka o prihvatljivosti iste. Određene su izvedbene karakteristike metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti pri čemu su same otopine ciprofloksacina pripravljane u MilliQ i riječnoj vodi.

Na temelju dobivenih rezultata provedenog istraživanja potvrđena je prihvatljivost metode za određivanje ciprofloksacina u vodi, s obzirom da se dobivene vrijednosti izvedbenih karakteristika nalaze unutar definiranih granica prihvatljivosti.

**Ključne riječi:** validacija analitičke metode, tekućinska kromatografija, ciprofloksacin.

## **ABSTRACT**

After the development of a particular method, the first next step is to validate it. Validation of an analytical method is defined as the process of proving or determining whether a method is suitable for use for the desired purpose. The method validation process is approached by laboratory tests, where it is necessary to examine the performance characteristics: selectivity/specificity of the method, linearity, working range, precision, trueness, limits of quantification and detection and also robustness.

The primary goal of this work was to validate an already known HPLC-PDA analytical method for the determination of fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin. The research was conducted to familiarize with the entire process of validation of the analytical method and to make adequate conclusions about its acceptability. Performance characteristics of the high performance liquid chromatography method with a diode array detector are determined using ciprofloxacin solutions prepared in MiliQ and river water.

Based on the obtained results of the conducted research, the applicability of the method for the determination of ciprofloxacin in water was confirmed, since the obtained values of performance characteristics meet all acceptability criteria.

**Key words:** validation of analytical method, liquid chromatography, ciprofloxacin.



## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio .....	2
2.1. Farmaceutici u okolišu .....	2
2.2 Ciprofloksacin .....	6
2.3. Kromatografija .....	10
2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	11
2.3.2. Parametri kromatografske separacije.....	17
2.4. Validacija analitičkih metoda .....	19
2.4.1. Izvedbene karakteristike metode.....	19
3. Eksperimentalni dio .....	25
3.1. Materijali .....	25
3.2. Instrumenti.....	25
3.2.1. Analitička vaga .....	25
3.2.2. Uređaj za filtraciju .....	27
3.2.3. Ultrazvučna kupelj.....	27
3.2.4. Uređaj za proizvodnju Millipore vode.....	28
3.2.5. HPLC uređaj .....	29
3.3. Metode rada .....	30
3.3.1. Opis kromatografskog sustava.....	30
3.3.2. Priprema temeljne standardne otopine ciprofloksacina .....	30
3.3.3. Priprema otopina ciprofloksacina za provjeru linearnosti .....	30
3.3.4. Priprema standardnih otopina ciprofloksacina za procjenu preciznosti.....	31
3.3.4.1. Ponovljivost.....	31
3.3.4.2. Međupreciznost .....	31

3.3.5. Određivanje robusnosti .....	32
4. Rezultati i rasprava .....	33
4.1. Selektivnost metode .....	33
4.2. Linearnost .....	35
4.3. Osjetljivost.....	36
4.4. Istinitost .....	37
4.5. Preciznost .....	37
4.5.1. Ponovljivost .....	37
4.5.2. Međupreciznost.....	40
4.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije .....	43
4.7. Robusnost .....	44
4.8. Radno područje.....	45
4.9. Sažetak rezultata .....	46
5. Zaključak.....	47
6. Literatura.....	48
7. Životopis .....	53
8. Prilog.....	54

## 1. Uvod

Analitička kemija kao teorijska i praktična znanost primjenjuje se u velikom broju laboratorija na mnogo različitih načina. Analitička metodologija obuhvaća poznavanje tehnike, metode, postupka i protokola, a prvenstveno se odnosi na način izvođenja analize. Sama metodologija uključuje potrebne podatke za dani analitički problem, odgovarajuću osjetljivost, potrebnu točnost te raspon koncentracija, a posebice valja istaknuti preciznost rezultata mjerenja. Kako bismo utvrdili valjanost pojedine metode te u konačnici samu njezinu primjenjivost za namjeravanu svrhu ključna je provedba validacije. Postupak validacije predstavlja skup testova kojima se utvrđuje da li dane pretpostavke, na kojima se temelji pojedina analitička metoda, služe točno određenoj namjeni. Kao i svaki drugi proces tako i validacija metode može biti okarakterizirana kako s prednostima tako i s nedostacima, a samo neke od njezinih prednosti bile bi slijedeće: validacija analitičke metode ulijeva visoki stupanj povjerenja za analitičara te rezultira uklanjanjem brojnih frustracija uzrokovanih uzastopnim ponavljanjem čime se bitno štedi na utrošenom vremenu za provedbu iste, također dugoročno gledano je isplativa odnosno jeftina. S obzirom da je uporaba farmaceutika širom svijeta uvelike rasprostranjena te se iz godine u godinu dodatno povećava, glavni nedostatak validacije metode upravo se može povezati s primjerom farmaceutske industrije. Diljem svijeta glavni problem validacije proizlazi iz drugačijih validacijskih uvjeta za regulatorne prijave podnesene u svrhu odobravanja proizvoda, u ovom slučaju farmaceutika, koje se bitno razlikuju ovisno o mjestu na kojem se nalazi regulatorno tijelo. Prijava svakog farmaceutskog proizvoda bilo to u Europi, Americi ili bilo kojem drugom dijelu svijeta zahtjeva primjenu kriterija validacije metode definiranih u vodiču ICH (eng. *International Council for Harmonisation*). Međutim, zbog lokalnih smjernica svake pojedine industrije u svijetu taj postupak izdavanja i prijave farmaceutika postaje znatno duži i skuplji. Iz tog razloga potrebno je harmonizirati različite validacijske smjernice prema ICH smjernicama za provedbu validacije.

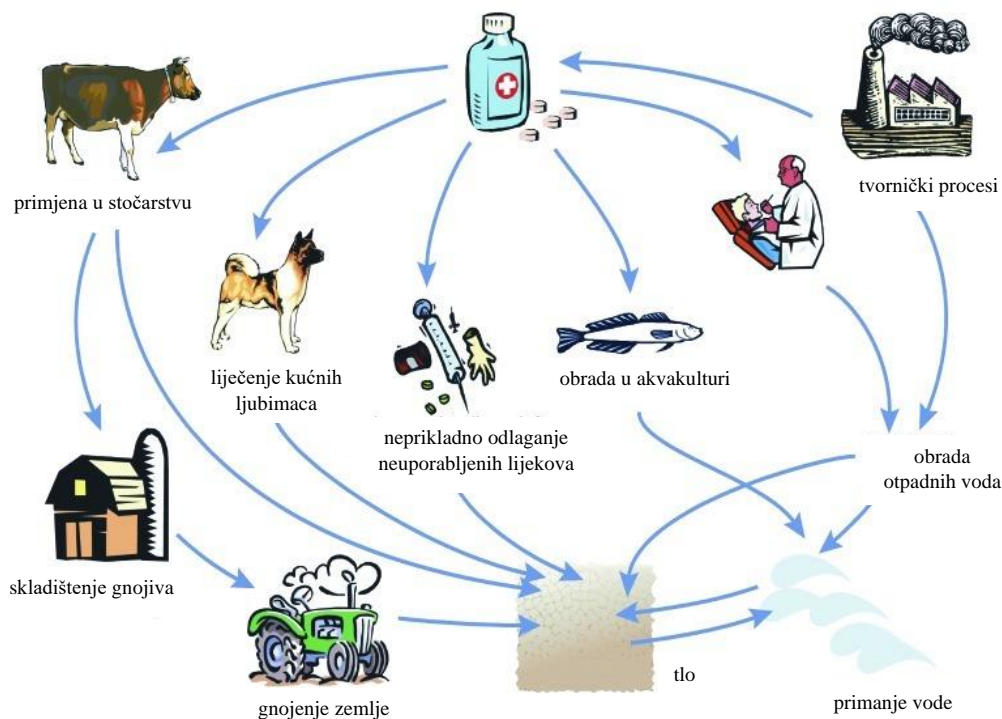
## 2. Teorijski dio

### 2.1. Farmaceutici u okolišu

Farmaceutici, lijekovi ili medikamenti (lat. *medicamentum*) su mnogobrojni anorganski i organski sintetizirani spojevi kao i ljekovite tvari životinjskog ili biljnog podrijetla koji se prvenstveno upotrebljavaju za otkrivanje, ublažavanje, olakšavanje i liječenje simptoma bolesti kako kod ljudi tako i kod životinja. Farmaceutike je moguće razvrstati s obzirom na način proizvodnje, jačinu djelovanja, način primjene i izdavanja, podrijetlo djelatne tvari te sukladno zakonskim odredbama o autorskim pravima i propisima o izdavanju [1]. Danas se u svijetu prema mnogobrojnim istraživanjima procjenjuje da se u humanoj medicini i veterini aktivno koristi više od 4000 aktivnih farmaceutskih supstanci te da njihova proizvodnja na godišnjoj razini premašuje 100 000 tona [2].

Uporaba farmaceutika iz godine u godinu u uzlaznoj je putanji, stoga se njihovo otpuštanje u okoliš uvelike povećava. Istraživanjem samoga okoliša utvrđena je pojava tzv. novih zagađivala uz već otprije poznata konvencionalna prioritetna zagađivala. Nova zagađivala predstavljaju spojeve koji su potencijalna opasnost za ekosustav, a kao primjer za to su na prvome mjestu farmaceutici i farmaceutске aktivne tvari te sredstva za osobnu higijenu [3].

Farmaceutici se na brojne načine mogu unijeti u okoliš. Neki od načina unošenja farmaceutika u okoliš su posredstvom izlučevina, nepropisnim zbrinjavanjem neiskorištenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je protekao rok trajanja, te uporabom u akvakulturi čime se direktno vrši unos farmaceutika u vodu. Premda su farmaceutici u okolišu prisutni u malim koncentracijama, dugotrajnim unosom u okoliš doprinijeti će brojnim negativnim učincima na okoliš [3]. Posljedice za okoliš mogu biti kobne, a samo neke od njih su: pomor riba, algi i vodenih kukaca, uginuća različitih ptica grabljivica te razvoj rezistencije bakterija [4]. Na Slici 1 prikazani su neki od puteva dospijevanja farmaceutika u okoliš.



**Slika 1.** Prikaz puteva kojima farmaceutici završavaju u okolišu [5]

Za procjenu ponašanja farmaceutika u okolišu neophodno je poznavanje njihovih fizikalno – kemijskih svojstava, a neka od njih su karakterizirana koeficijentom raspodjele oktanol/voda ( $K_{ov}$ ), koeficijentom raspodjele ( $K_d$ ), koeficijentom sorpcije na organski ugljik ( $K_{oc}$ ) te konstantom ionizacije ( $K_k$ ). Navedeni parametri definiraju sorpciju farmaceutika na tlo i sediment kao i njihova kiselo-bazna svojstva što utječe na njihovu podložnost procesima razgradnje. Procese razgradnje možemo razdijeliti u dvije glavne skupine: abiotičke i biotičke procese razgradnje. U abiotičke procese razgradnje ubrajamo hidrolizu i fotolizu, dok biotičkim procesima pripada razgradnja farmaceutika gljivicama i bakterijama odnosno mikroorganizmima. Kao posljedice razgradnje, u okolišu se smanjuje koncentracija prvobitne molekule farmaceutika te nastaju transformacijski i razgradni produkti. No, nisu svi farmaceutici podložni razgradnji, određeni farmaceutici pokazuju izraženu sklonost sorpciji na čestice tla, sedimenta ili suspendirane čestice prisutne u vodenoj fazi. Transformacijski produkti podrazumijevaju promjene unutar same strukture farmaceutika u odnosu na prvotnu, a razgradnim produktima smatraju se oni čija se molekula cijepa i dovodi do stvaranja novih spojeva različitih molekulskih masa [3].

Sorpcija farmaceutika je veoma važan proces koji bitno utječe na sudbinu farmaceutika te njihov utjecaj na okoliš, a opisuje raspodjelu farmaceutika između vodene i čvrste faze. Sam proces sorpcije osim o fizikalno – kemijskim svojstvima farmaceutika značajno ovisi i o tipu matice (udio minerala i organskih tvari), ionskom obliku farmaceutika te uvjetima okoliša (temperatura, pH). Sorpcija farmaceutika ima i pozitivnu i negativnu stranu, pozitivno gledano dolazi do opadanja aktivnosti farmaceutika u okolišu čime se uvelike sprječavaju njihovi štetni utjecaji, a negativna strana je ta da farmaceutici vezani na čvrste čestice mogu putovati tokom vode do lokacija koje su znatno udaljene od izvora onečišćenja i tamo, uslijed procesa desorpcije, negativno utjecati na okoliš. Farmaceutici koji nisu podložni sorpciji na tlo i sediment imaju veću mogućnost prodiranja u podzemne i površinske vode [3].

Biotička ili biološka razgradnja farmaceutika odvija se u prisustvu mikroorganizama (bakterija i gljivica). Bakterije su odgovorne za razgradnju u podzemnim i površinskim vodama, a gljivice za razgradnju farmaceutika pretežito u tlu. Biološku razgradnju može se podijeliti na katabolitičku i kometabolitičku, pri čemu se kometabolitička odvija uz prisutnost prikladnog supstrata za rast kao što je acetat, glukoza i metanol. Ukoliko je početna koncentracija farmaceutika velika oni će služiti kao izvori ugljika i energije za mikroorganizme, dok ukoliko je ona niska tada se pretpostavlja slučaj kometabolitičke razgradnje. Biotička razgradnja može biti djelomična kada nastaju produkti s različitim toksičnim svojstvima ili potpuna pri čemu dolazi do nastanka ugljikova dioksida, vode, anorganskih soli kao što su nitrati i sulfati ili do njihove potpune mineralizacije [3].

Hidrolizu ubrajamo u abiotičke procese razgradnje farmaceutika. Ona je bitna za nekolicinu različitih farmaceutika, a ovisi o pH vrijednosti vode, intenzitetu svjetlosti, temperaturi i brzini toka vode [3]. Hidroliza podrazumijeva reakciju neke tvari (analita, supstrata) s vodom koja djeluje kao nukleofil pri čemu može doći do supstitucije, eliminacije ili fragmentacije određenog dijela analita, što dovodi do nastanka razgradnih ili transformirajućih produkata [6].

Fotolitička razgradnja farmaceutika javlja se prvenstveno u čistim površinskim vodama gdje je dovoljan pristup Sunčeve svjetlosti. Da bi neki farmaceutik mogao podleći procesu fotolitičke razgradnje njegov apsorpcijski spektar trebao bi se podudarati sa spektrom Sunčeva zračenja, također sama učinkovitost procesa ovisna je i o kvantnom prinosu, strukturi farmaceutika, dubini vode, geografskom položaju, vremenskim uvjetima (sunčani ili oblačni dani) te godišnjem dobu. Sami produkti fotolitičke razgradnje mogu biti stabilniji ili toksičniji s obzirom na prvobitnu

molekulu farmaceutika. Jednako kao i sorpcija farmaceutika i procesi razgradnje potencijalno mogu imati negativne i pozitivne utjecaje na okoliš. Pozitivni utjecaji na okoliš bili bi smanjenje koncentracije farmaceutika i njegove farmakološke aktivnosti okolišu, a negativni utjecaji su oni kada nastaju produkti razgradnje toksičniji od početne molekule farmaceutika [3].

Kao posljedica svih navedenih procesa dolazi do smanjenja koncentracije prvobitne molekule farmaceutika te stvaranja novih spojeva koji u odnosu na početne molekule mogu biti manje ili više stabilni i toksični. U dosadašnjim istraživanjima prvenstveno je ispitivana koncentracija farmaceutika u okolišu dok se još uvijek vrlo malo zna o njihovu ponašanju i sudbini u istome [3]. Stoga se analitičkim mjerenjima prikuplja niz podataka o promjenama u okolišu čime se bitno može utjecati na poboljšanje uvjeta u okolišu te poduzimanje pravovremenih mjera za njegovu zaštitu [7].

## 2.2 Ciprofloksacin

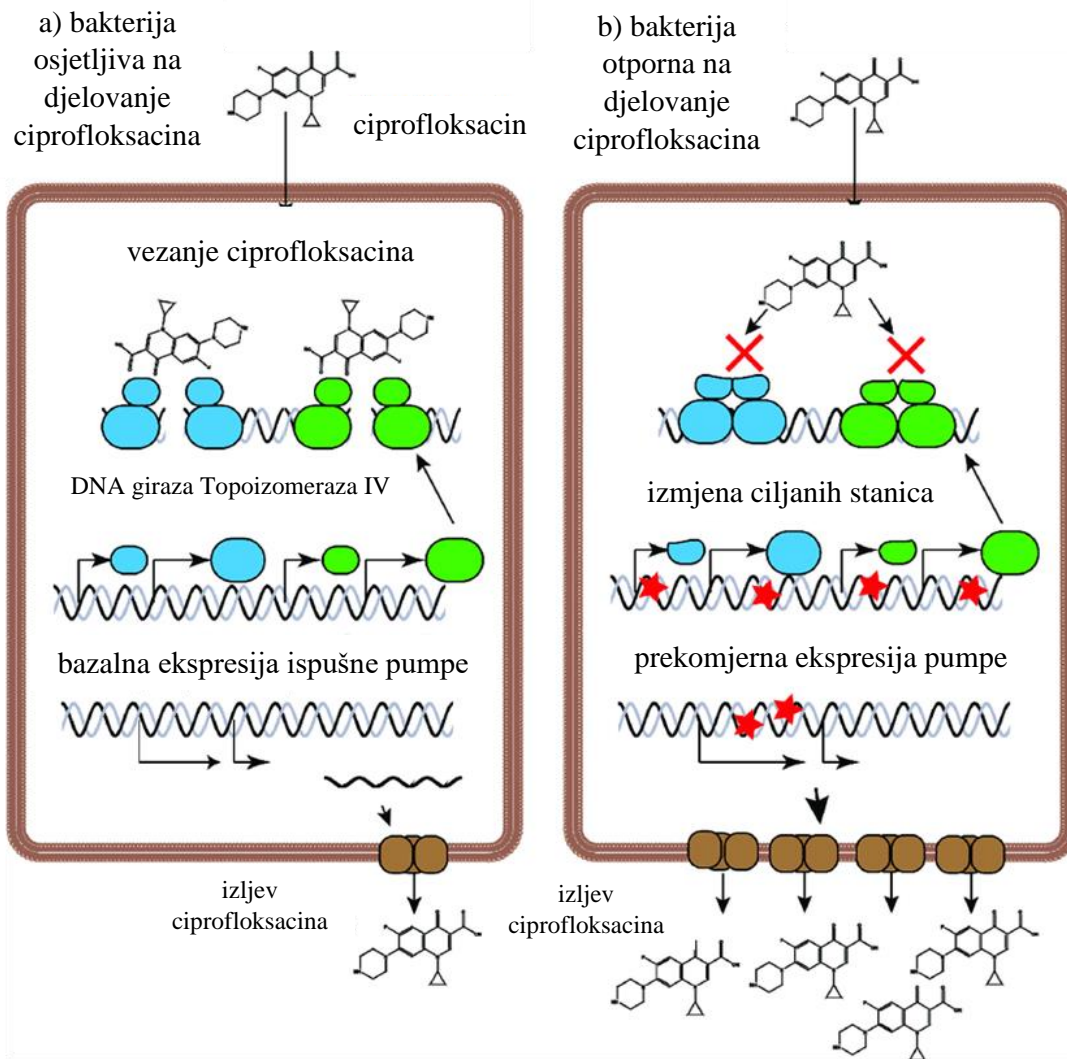
Ciprofloksacin je farmaceutik kojega ubrajamo u skupinu fluorokinolonskih antibiotika, a koristi se za liječenje mnogobrojnih bakterijskih infekcija. Bakterijske infekcije koje liječi najčešće su infekcije zglobova i kostiju, abdominalne infekcije, infekcije dišnih puteva, kožne infekcije te infekcije mokraćnog sustava. Također bitno je napomenuti kako je ovaj farmaceutik našao svoju primjenu i u veterinarskoj medicini za liječenje životinja. Patentiran je 1980. godine, a javnosti je predstavljen 1987. godine kada je stavljen na popis esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (WHO-a). Ciprofloksacin kao takav dostupan je u obliku tableta ili kapsula za oralnu uporabu, u obliku kapi za oči ili uši te kao otopina za intravenoznu primjenu. Prema podacima iz 2010. godine za izdavanje ciprofloksacina napisano je preko 20 milijuna recepata diljem svijeta [8]. Na Slici 2 prikazan je ciprofloksacin u najčešćim oblicima za primjenu.



**Slika 2.** Ciprofloksacin u obliku tableta, kapi i u otopini [9-11]

Mehanizam djelovanja ciprofloksacina je slijedeći: kao farmaceutik aktivan je protiv nekih gram-pozitivnih i mnogih gram-negativnih bakterija. Gram-pozitivne bakterije većinom su uzročnici zlog grča, sušice i difterije, a gram-negativne bakterije uzročnici su kapavca, tifusa, paratifusa i kuge. Ciprofloksacin djeluje inhibirajući topoizomerazu tipa II (DNA girazu) i topizomerazu tipa IV koje su nužne za odvajanje bakterijske DNA, čime se inhibira stanična dioba [8]. Mutacije u genima DNA giraze i genima topoizomeraze tipa IV smanjuju afinitet enzima za ciprofloksacin, a mutacije u genima koje kodiraju regulatorne proteine rezultiraju prekomjernom ekspresijom ispušnih pumpi koje izbacuju ciprofloksacin [12]. Mehanizam djelovanja ciprofloksacina prikazan je na Slici 3.



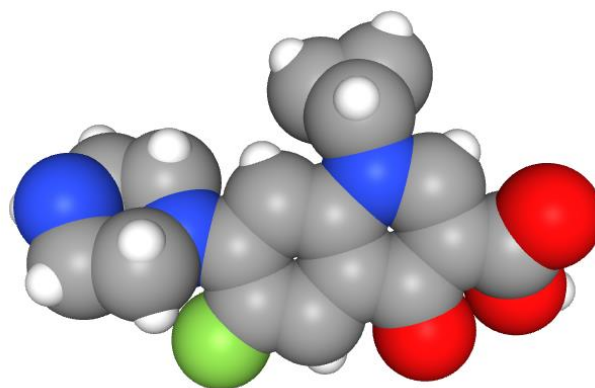
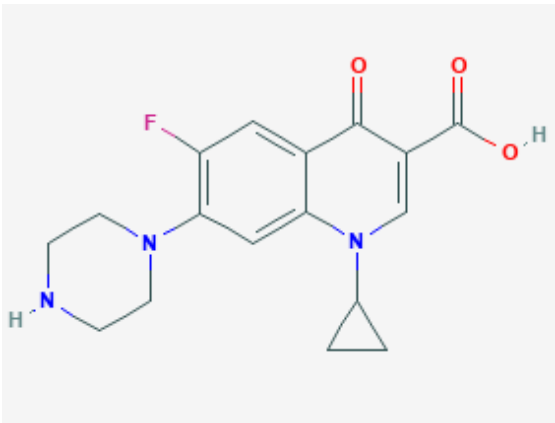


**Slika 3.** Mehanizam djelovanja ciprofloksacina [12]

Ciprofloksacin, molekulske formule  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ , je kristalni prah bijele do svijetložute boje koji se čuva u plastičnoj ambalaži što je prikazano na Slici 4. Osim molekulske formule ciprofloksacin je između ostalog moguće prikazati strukturnom formulom te kalotnim modelom čiji je prikaz dan Slikom 5. Prema IUPAC nomenklaturi deklarira se kao 1-ciklopropil-6-fluoro-4-okso-7-piperazin-1-ilkinolin-3-karboksilna kiselina [13].



**Slika 4.** Kristalni prah ciprofloksacina i primjer njegova pakiranja



**Slika 5.** Strukturna formula i kalotni model ciprofloksacina [13]

Ciprofloksacin je farmaceutik širokog spektra fizikalno-kemijskih svojstava, a neka od njih prikazana su Tablicom 1.

**Tablica 1.** Sumarni prikaz fizikalno-kemijskih svojstava ciprofloksacina [13]

SVOJSTVO	OPIS / BROJČANA VRIJEDNOST
molekulska masa	331,34 g/mol
agregacijsko stanje	čvrsto (s)
boja/forma	svijetložuti kristalni prah
temperatura taljenja (talište)	255 – 257 °C
temperatura razgradnje	225 – 257 °C
topljivost	< 1 mg / ml
topljivost u vodi pri 20 °C	30 mg / l
tlak pare pri 25 °C	$2,85 \times 10^{-13}$ mmHg
pH vodenih koncentrata u bočicama	3,3 – 3,9
pH otopina za infuziju	3,5 – 4,6
pK <sub>a</sub> (skupina karboksilne kiseline)	6,09
pK <sub>a</sub> (dušik na piperazininom prstenu)	8,74

Veoma je važno ispravno rukovanje ciprofloksacinom jer u protivnom može predstavljati opasnost za organizam, primjerice izaziva ozbiljne iritacije i oštećenja očiju, utječe na dišne puteve i reproduktivne organe, a bitno šteti i vodenom svijetu [13]. Stoga se na odgovarajućem pakiranju ciprofloksacina nalaze piktogrami koji na to upozoravaju (Slika 6).



**Slika 6.** Piktogrami opasnosti [14]

### 2.3. Kromatografija

Kromatografija je najučinkovitija fizikalno-kemijska tehnika separacije, što je čini uporabljivom u mnogobrojnim analitičkim ispitivanjima. Pojam kromatografije u svijetu se javlja davne 1906. godine zahvaljujući ruskom botaničaru i biokemičaru M. S. Cvetu, dok je začetak kromatografije u Hrvatskoj povezan s kemičarkom Đ. Deur-Šiftar te kemičarom S. Turinom [15, 16]. Kromatografski sustav čine dvije faze, pokretna i nepokretna te ispitivani spoj koji se nastoji raspodijeliti između njih. Prilikom gibanja faza dolazi do narušavanja dinamičke ravnoteže što omogućuje kretanje skupina molekula u smjeru gibanja pokretne (mobilne) faze. Nepokretna, odnosno stacionarna faza, treba biti odabrana na način da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, tj. da različite molekule imaju različit afinitet prema nepokretnoj fazi što u konačnici rezultira razdvajanjem sastojaka smjese. Analitima koji imaju tendenciju jačih interakcija s nepokretnom fazom biti će potrebno više vremena kako bi prošli kroz sustav negoli oni sa slabijim interakcijama. Same interakcije u pravilu su kemijske prirode, no u iznimnim slučajevima prisutne su i fizikalne interakcije. Kromatografske tehnike moguće je podijeliti na tri načina: s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, s obzirom na sastav pokretne faze te na osnovu izvedbene tehnike [15].

#### **Podjela kromatografskih tehnika s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze:**

- razdjelna kromatografija – kapljevita nepokretna faza vezana na čvrsti inertni nosač (ravnoteža se uspostavlja između dviju kapljevina)
- afinitetna kromatografija – različite funkcionalne skupine smještene na površini čvrste faze (ravnoteža se uspostavlja između nepokretne čvrste faze i funkcionalnih skupina)
- adsorpcijska kromatografija – na površini adsorbensa izravno vezanje ispitivanih molekula (ravnoteža se uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze)
- kromatografija isključenjem – zbog razlike u molekulskoj masi i obujmu dolazi do razdvajanja (ravnoteža se uspostavlja između nepokretne faze u obliku materijala s porama i molekula)
- ionska kromatografija – nepokretna faza je ionski izmjenjivač (ravnoteža se uspostavlja između anionske ili kationske nepokretne faze i molekula ili funkcionalnih skupina)

### Podjela na temelju sastava pokretne faze:

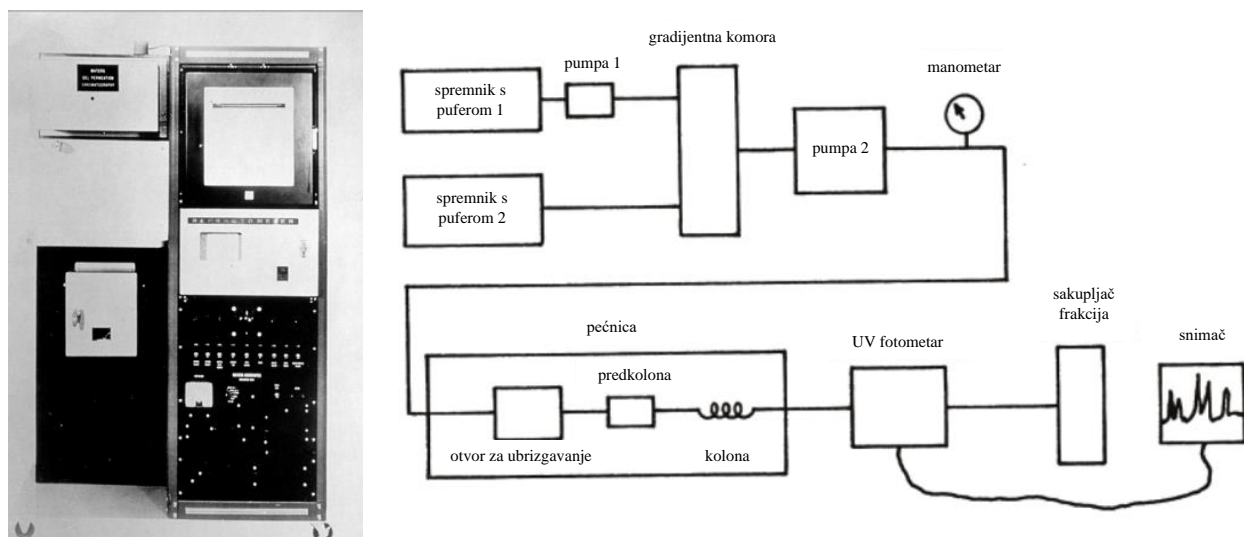
- plinska kromatografija – inertni plin je pokretna faza
- tekućinska kromatografija – pokretna faza je kapljevina
- fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima – pokretna faza je tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka

### Podjela na temelju izvedbene tehnike:

- kromatografija na stupcu ili u koloni
- plošna kromatografija – kromatografija na papiru i tankoslojna kromatografija [15]

#### 2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

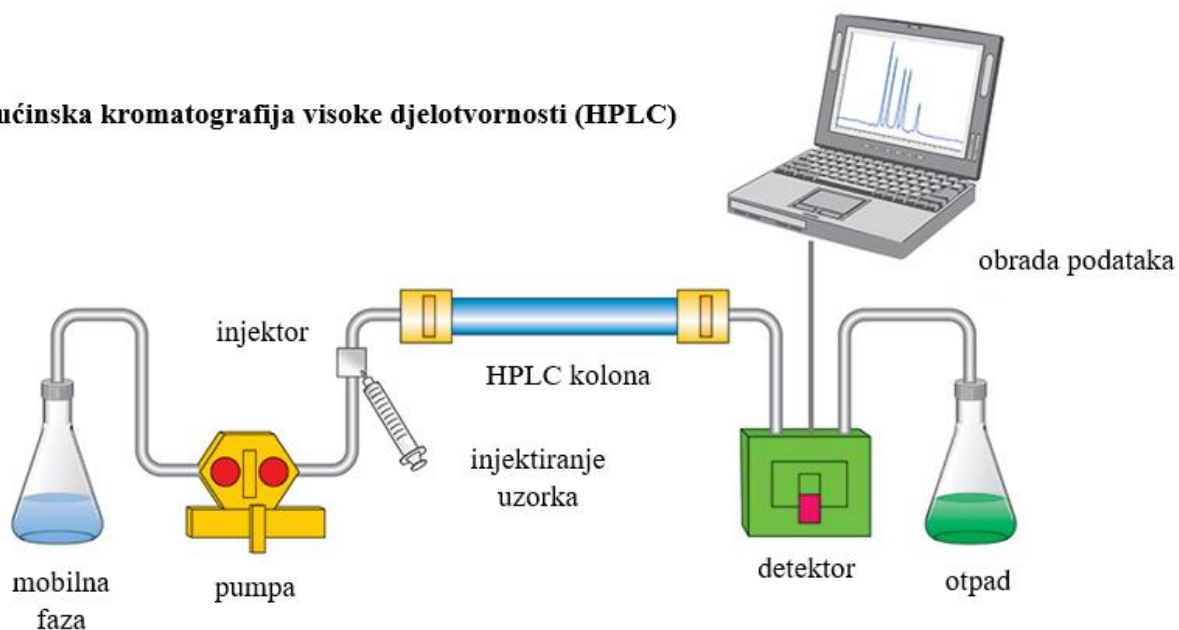
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) je važna metoda odvajanja odnosno separacije koja se koristi u praksi. Koristi se za kvantitativnu analizu ili pročišćavanje komponenata složene smjese, primjerice za razdvajanje proteina ili lijekova te za analizu lijekova i komponenata u biološkim materijalima [17]. Britanski kemičar A. J. P. Martin i biokemičar R. L. M. Synge 1941. godine objavili su istraživanje koje predviđa kako bi visoki tlak i male čestice nepokretne faze mogli doprinijeti djelotvornom razdvajanju. Prvo izvješće o HPLC-u objavljeno je 1966. godine, a svega godinu kasnije tvrtka Picker Nuclear lansirala je prvi HPLC uređaj na tržište [18] koji je prikazan na Slici 7.



Slika 7. Prvi HPLC uređaj iz 1967. godine, model LCS-1000 [18, 19]

Princip rada HPLC uređaja temelji se na forsiranju prolaska analiziranog spoja ili smjese kroz stupac pumpanjem tekućine odnosno pokretne faze pod visokim tlakom. Uobičajene pokretne faze koje se koriste kod ove vrste tekućinske kromatografije uključuju svaku moguću mješljivu kombinaciju vode i organskog otapala od kojih su najčešća acetonitril i metanol, pri čemu vodena komponenta pokretne faze može sadržavati i mali udio kiseline kao što su mravlja, fosforna ili trifluorocetna kiselina. U sustav odnosno tok mobilne faze ubrizgava se mali volumen uzorka koji se na osnovu specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija različito zadržava unutar same kolone. Unutar same kromatografske kolone dolazi do separacije sastojaka ispitivanog uzorka [20]. Kako bi molekula mogla preći iz jedne faze u drugu potrebno je savladati određenu energijsku barijeru između dviju faza, a kako bi se prekinule veze između istih potrebna je određena količina energije koja može nastati zahvaljujući slučajnim sudarima s drugim molekulama. Ukoliko se molekule nalaze u pokretnoj fazi one će lakše prelaziti energijsku barijeru jer su veze između molekule i pokretne faze obično slabije nego što je to slučaj njezine veze s nepokretnom fazom. Poboljšavanje ili narušavanje procesa separacije kontrolira se promjenom protoka ili sastava pokretne faze ili promjenom temperature. Primjerice povišenjem temperature dolazi do poboljšanja kinetičkih parametara pri čemu se poboljšava difuzivnost uzorka i smanjuje viskoznost pokretne faze, a također dolazi i do promjene selektivnosti stupca. Ukoliko postoji mogućnost izbora prihvatljivije je vršiti izmjene protoka čime se poboljšava separacija, a istovremeno smanjuje vrijeme zadržavanja [21]. Kako bi se smanjile ili uklonile promjene u eluiranju, crpka odnosno pumpa mora održavati konstantnu brzinu protoka otapala i uzorka kroz kolonu bez pojave impulsa. Kada ispitivani uzorak dođe do kraja kromatografske kolone potrebno je registrirati prisutnost različitih komponenata uzorka pomoću odgovarajućeg detektora. On omogućuje identificiranje i kvantificiranje čistih komponenti ispitivanog uzorka. HPLC uređaj povezan je s računalom na čijem se ekranu, kao rezultat ispitivanja, prikazuje kromatogram. Kromatogram predstavlja prikaz kromatografskog razdvajanja postignutog u HPLC sustavu, a crta ga računalna podatkovna stanica. Svaki HPLC uređaj sastoji se od slijedećih osnovnih komponenata: spremnika pokretne faze, pumpe, injektora, kromatografske kolone, detektora (za ovaj rad od izrazite važnosti PDA detektor) te računala za prikaz podataka [21, 22]. Slika 8 prikazuje shematski prikaz HPLC uređaja.

## Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)



**Slika 8.** Shematski prikaz HPLC uređaja [23]

*Spremnik* sadrži otapalo koje se naziva pokretnom fazom. U HPLC sustavu obično su prisutna minimalno dva spremnika pokretne faze od kojih svaki u pravilu sadrži do jedne litre otapala, a mogu biti izrađeni od stakla ili nehrđajućeg čelika (Slika 9). Prije početka provedbe same analize iz pokretne faze procesom degaziranja nužno je ukloniti otopljene plinove kako eventualno prisutni mjehurići ne bi naštetili ostalim dijelovima uređaja [24].



**Slika 9.** Spremnici pokretne faze [25]



HPLC *pumpa* jedan je od najvažnijih dijelova kromatografskog uređaja. Standardna HPLC pumpa može dostići tlak od 6000 psi, dok UHPLC pumpa u pravilu može dostići vrijednosti tlaka od čak 20000 psi pa i više. Pumpe su sposobne pumpati različite vrste tekućina, a neke od njih su: vodeni puferi, organska otapala, agresivne i viskozne tekućine, radioaktivne tekućine te otopine slane vode, pri čemu raspon protoka varira od mikrolitra pa sve do litre u minuti. Razlikujemo pumpe s više klipova koji omogućuju kontrolu protoka jednim klipom dok se drugi puni, te pumpe za ubrizgavanje koje posjeduju još veću kontrolu protoka, no zbog štrcaljke koja ne može proizvesti dovoljno velik tlak ne mogu se koristiti u svim HPLC uređajima [22, 26]. Slika 10 prikazuje primjer HPLC pumpe.



**Slika 10.** Waters 515 Isocratic HPLC pumpa - WAT207000 [27]

*Injektor* ili *ubrizgivač* omogućuje unošenje preciznog volumena uzorka na kolonu. Sam volumen injektiranja pretežito se kreće u rasponu od 5 do 500  $\mu\text{l}$ . Ručna mlaznica injektora sastoji se od ventila sa šest otvora te rotora, petlje za uzorke i otvora za iglu. Otopina uzorka uvodi se u petlju pomoću šprice, a uzorak se potom injektira u kromatografsku kolonu prebacivanjem ventila u odgovarajući položaj. Tipična veličina vanjske petlje uzorka kreće se u rasponu od 6  $\mu\text{l}$  do 2 ml. Ventil za ubrizgavanje radi na dva načina: u fiksnom ili u djelomičnom krugu. S obzirom na željenu pouzdanost i produktivnost u analizama se prvenstveno koriste automatski injektori, dok ručni služe isključivo za stanje pripravnosti [28]. Slika 11 prikazuje primjer injektora.





**Slika 11.** Athena HPLC Rheodyne injektor i Swagelok HPLC injektor [29, 30]

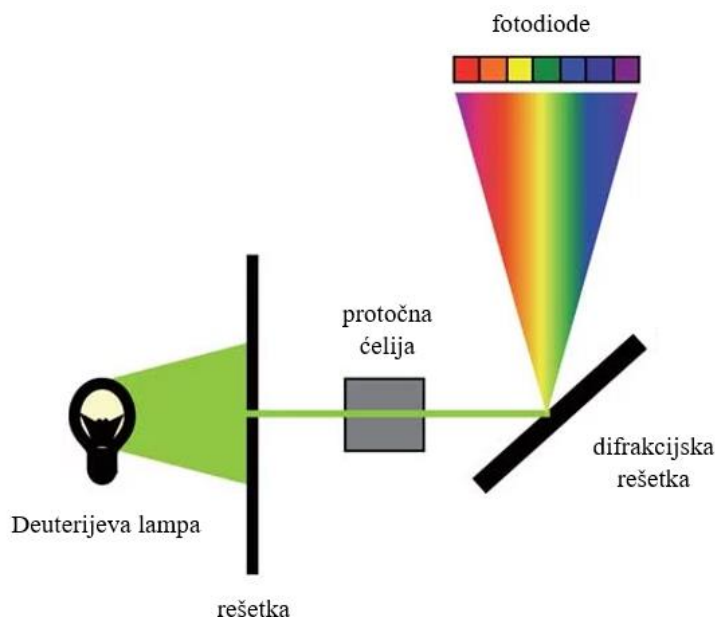
*Kromatografska kolona* (Slika 12) izrađena je od nehrđajućeg čelika i punjena odgovarajućom nepokretnom fazom na kojoj dolazi do razdvajanje komponenti uzorka na temelju njihovih različitih interakcija sa samim sorbansom. Ukoliko uzorak posjeduje izraženije interakcije prema nepokretnoj fazi u koloni, on će provesti više vremena adsorbiran na sorbensu u koloni te će iz tog razloga i vrijeme zadržavanja biti veće. Većina kromatografskih kolona dugačke su 10 – 30 cm, te im je unutrašnji promjer 4 – 10 mm, a veličina čestica punila kreće se u rasponu od 5 do 10  $\mu\text{m}$ , no na današnjem tržištu mogu se pronaći i manje kolone dužine 3 – 7,5 cm, unutarnjeg promjera 1 – 4,6 mm te veličinom čestica punila 3 – 5  $\mu\text{m}$  i one kao takve omogućuju bržu analizu čime se umanjuje potrošnja pokretne faze, a samim time je smanjen i ukupan trošak analize [22, 31].



**Slika 12.** Kromatografska kolona NUCLEODUR® C18 Gravity [32]

HPLC *detektor* koji je smješten na kraju kromatografske kolone služi za registraciju prisutnih različitih komponenti uzorka, pri čemu ne smije detektirati samo otapalo. Izbor samog detektora za provedbu analize ovisan je o prirodi analiziranog uzorka pa shodno tome razlikujemo slijedeće vrste: detektor ultraljubičastog zračenja (UV), detektor vidljivog zračenja (VIS), detektor s nizom dioda (PDA), detektore indeksa loma, spektrometar masa, detektor vodljivosti, detektor fluorescencije i kemiluminiscencije te elektrokemijski detektor [33].

*Detektor s nizom dioda* (eng. *photodiode array detection*, PDA ili *diode array detector*, DAD) je vrsta HPLC detektora koja se sastoji od velikog broja fotodioda i vrši snimanje spektra u određenom rasponu valnih duljina u UV/VIS području, a apsorbancija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja te valnoj duljini [34]. Svjetlo se iz deuterijeve lampe prozirnom lećom usmjerava na način da cijeli snop svjetla može proći kroz detektorsku ćeliju do holografske rešetke. Na taj način uzorak je podvrgnut svjetlu svih valnih duljina koje dolaze iz deuterijeve lampe. Od holografske rešetke svjetlo je raspršeno na niz dioda. Svaka dioda u nizu daje karakterističan odziv koji se bilježi i pohranjuje na računalu. Spektar otopljene tvari moguće je dobiti iz krivulje koja povezuje apsorpciju s valnom duljinom. Nedostatak PDA detektora je taj da je njegova rezolucija ograničena brojem dioda koje se nalaze u nizu [35]. PDA detektor prikazan je Slikom 13.



**Slika 13.** Shematski prikaz detektora s nizom dioda [36]

### 2.3.2. Parametri kromatografske separacije

Prilikom prolaska molekule uzorka kroz kromatografsku kolonu molekula provodi određeni dio vremena u pokretnoj i nepokretnoj fazi. Svaka molekula se jednako dugo zadrži u mobilnoj fazi, a ta pojava se naziva *zadržano vrijeme*,  $t_m$ . Zadržano vrijeme odgovara vremenu proteklom od trenutka injektiranja tvari koja se ne adsorbira na nepokretnu fazu do trenutka njene detekcije. *Vrijeme zadržavanja otopljene komponente*,  $t_R$  predstavlja vrijeme od trenutka unošenja uzorka u stupac pa sve do detekcije svake pojedine komponente na izlasku iz kolone. *Prilagođeno vrijeme zadržavanja*,  $t_R''$  je vrijeme koje otopljena komponenta provede vezana za nepokretnu fazu [15].

$$t_R = t_m + t_R'' \quad (1)$$

*Učinkovitost* ili *djelotvornost separacije* predstavlja stupanj širenja kromatografskih zona proporcionalno vremenu i duljini putovanja uzorka, a označava se kao broj teorijskih odsječaka ( $N$ ) ili kao visina odsječaka ( $H$ ). Mjerilo je disperzije analita dok putuje kroz HPLC sustav i kromatografsku kolonu. U idealnim uvjetima kromatografski vrhovi bili bi tanki poput linije olovke, međutim zbog disperzije vrhovi poprimaju svoj karakteristični oblik, oblik Gaussove krivulje. Učinkovitost je izvedena iz teorije Martina i Syngea koji su učinkovitost usporedili s frakcijskom destilacijom, gdje je kolona podijeljena u teoretske odsječke odnosno tavane [15, 37].

$$N = \frac{L}{H} \quad (2)$$

gdje je  $N$  broj teorijskih odsječaka,  $L$  duljina kromatografske kolone ili stupca te varijabla  $H$  koja predstavlja visinu odsječka.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (3)$$

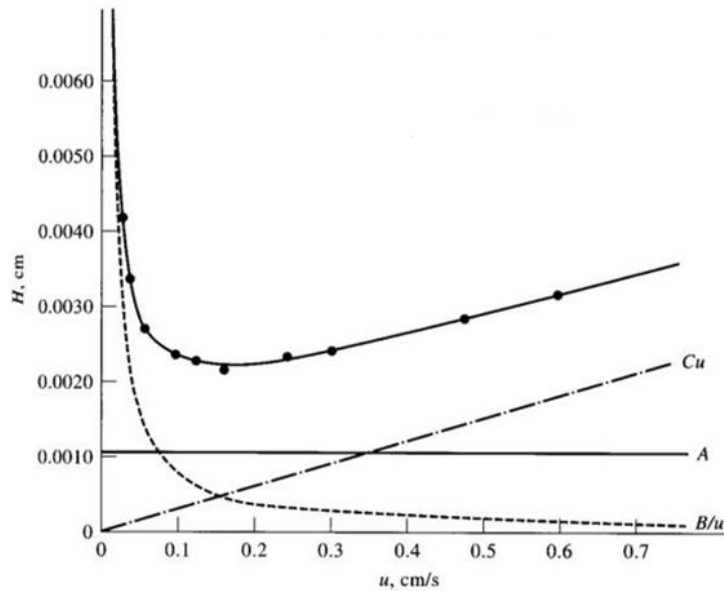
gdje je  $t_R$  vrijeme zadržavanja otopljene komponente, a  $w$  je širina pika na baznoj liniji.

$$H = \frac{Lw^2}{16t_R^2} \quad (4)$$

Pojavu širenja kromatografskih zona odnosno gubitak učinkovitosti kolone donekle nastoji objasniti *van Deemterova jednadžba*:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_s u + C_M u \quad (5)$$

pri čemu su varijable u jednadžbi slijedeće:  $A$  predstavlja doprinos vrtložne, a  $B$  uzdužne difuzije,  $C_s$  i  $C_M$  su doprinosi nastali zbog prijenosa mase u nepokretnoj i pokretnoj fazi, a  $u$  je linearna brzina pokretne faze. Slika 14 prikazuje ovisnost širenja kromatografske zone o brzini pokretne faze gdje je uočljivo kako se kromatografske zone šire najmanje u točki kada su sumarni uzroci širenju zone minimalni [15, 38].



**Slika 14.** Ovisnost širenja kromatografske zone o brzini pokretne faze [15]

*Parametar razlučivanja*,  $R_S$ , mjera je odjeljivanja dva maksimuma različitih vremena zadržavanja, u kromatogramu:

$$R_S = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{w_A + w_B} \quad (6)$$

gdje je  $t_R$  vrijeme zadržavanja komponente A i B, a  $w$  širina pikova A i B na baznoj liniji [38].

*Koeficijent selektivnosti*,  $\alpha$  prikazuje omjer dvaju koeficijenata raspodjele za dvije komponente odnosno to je sposobnost odjeljivanja komponenata na koloni ( $\alpha > 1$ ) [38].

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_m}{(t_R)_A - t_m} = \frac{k_B}{k_A} \quad (7)$$

pri čemu je  $k$  faktor zadržavanja komponenti A i B.

## 2.4. Validacija analitičkih metoda

Validacija analitičke metode omogućava nam postizanje pouzdanih i točnih rezultata te pokazuje ispravnost mjerenja ili karakterizacije ispitivanog uzorka [39]. Omogućuje analitičaru da razumije ponašanje metode i utvrdi ograničenje iste. Validacijom se provjerava mjeri li određena metoda parametar kako je predviđeno i zadovoljava li postavljene kriterije izvedbe metode [40].

Validacija se definira kao postupak dokazivanja da naša metoda služi svrsi što je od regulatornog i analitičkog značaja. Obzirom da se razlikuju kvalitativne i kvantitativne metode, sam postupak i pristup validaciji biti će različit. Postupak validacije ovisi o tome određuje li se analit prisutan u uzorku na makrorazini ili je analit prisutan u tragovima u kompleksnoj matrici. Svako metodi osigurava se individualan pristup te se procjenjuje što je sve potrebno napraviti za dokaz svrhovitosti [39]. Da bi se provela validacija metode, laboratorij bi trebao slijediti pisani standardni operativni postupak koji uključuje između ostalog i korištenje umjerenih instrumenata [40]. Struka, regulativa i zakonodavstvo prihvatili su osam osnovnih parametara, takozvanih izvedbenih karakteristika metode:

- *selektivnost / specifičnost*
- *linearnost*
- *točnost*
- *istinitost*
- *preciznost (ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost)*
- *granica detekcije*
- *granica kvantifikacije*
- *robusnost (postojanost)*
- *radno područje*

Plan validacije za svaku metodu određuje se kombinacijom navedenih karakteristika [39].

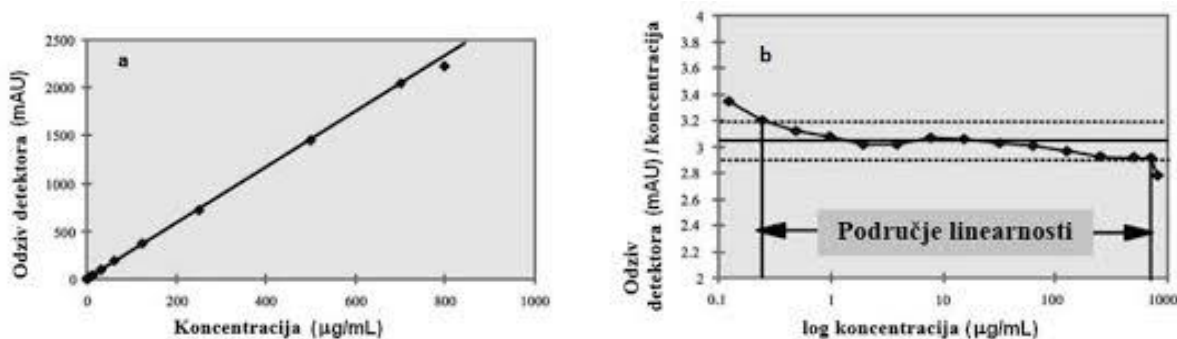
### 2.4.1. Izvedbene karakteristike metode

Svojstvo analitičke metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisustvu ostalih komponenata u matrici uzorka uz određene uvjete analiziranja naziva se specifičnost/selektivnost. Specifičnost i selektivnost dva su zasebna svojstva analitičke metode. **Specifičnost** podrazumijeva određivanje isključivo jednog analita, dok nasuprot tome zahvaljujući **selektivnosti** istodobno je

moгуće određivanje više komponenata uz uvjet da one međusobno jedna drugoj ne predstavljaju smetnju. Ova karakteristika jedna je od primarnih i samim time nezaobilaznih u procesu provedbe validacije. Dokazivanje u praksi vrši se usporedbom odziva metode na referencijski materijal s odzivom realnog uzorka pri čemu je potrebno dokumentirati parametre koji uvjetuju razdvojenost i simetriju pikova, a kod nekih metoda nužno je i prikupljanje informacija o njihovoj čistoći [39].

**Linearnost** se deklarira kao sposobnost metode da unutar definiranog područja daje ispitne rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određivanje u praksi vrši se mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog materijala, pri čemu je preporuka analizirati minimalno pet koncentracija uz tri ponavljanja uzastopce. Procjena parametra linearnosti provodi se grafički i matematički. Matematički, uporabom linearne regresije se ovisnost koncentracije o odzivu instrumenta izražava jednadžbom pravca ( $y = ax+b$ ) i izračuna se koeficijent korelacije ( $R$ ) ili koeficijent determinacije ( $R^2$ ). Parametar koji ukazuje na osjetljivost same metode odgovara nagibu pravca ( $a$ ), dok na sustavnu pogrešku ukazuje odsječak pravca na  $y$ -osi ( $b$ ). Grafički prikazi ovisnosti signala odnosno odziva detektora o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualne potvrde linearnosti. U uporabi najčešće susrećemo dva načina grafičkog prikaza linearnosti:

- grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji standardnih otopina – jednolika raspodjela pozitivnih i negativnih vrijednosti odstupanja od pravca (Slika 15a)
- grafički prikaz relativnih signala (omjer odziva detektora o odgovarajućoj koncentraciji) na  $y$ -osi i odgovarajućih koncentracija na  $x$ -osi prikazanih logaritamskom skalom (Slika 15b)



Slika 15. Prikaz linearnosti na dva načina [39]

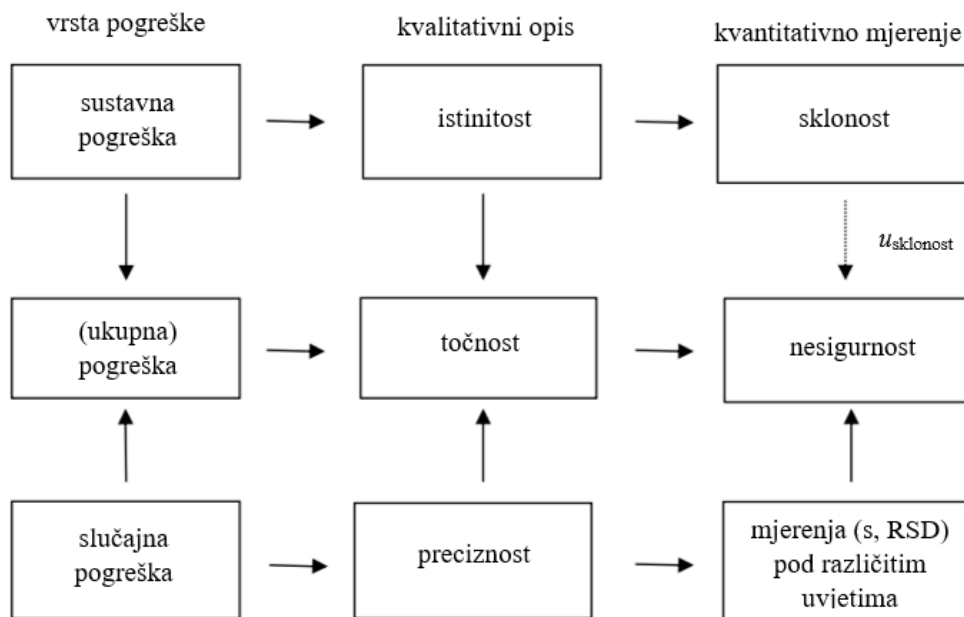
**Točnost** mjerenja izražava se kao podudaranje vrijednosti koja je prihvaćena kao referentna vrijednost s jednom eksperimentalno dobivenom vrijednošću. Validacijom se želi istražiti utjecaj sustavnih i slučajnih pogrešaka na pojedinačne rezultate te se stoga točnost obično proučava kao dvije zasebne komponente: komponenta istinitosti i preciznosti [41].

**Istinitost** se izražava kao slaganje beskonačnog broja ponovljenih mjerenja i referentne vrijednosti [39]. Kako nije moguće provesti beskonačan broj mjerenja, istinitost se procjenjuje kao odmak od prave vrijednosti (eng. *bias*). U praktičnom radu, odmak se procjenjuje kao odstupanje srednje vrijednosti niza mjerenje od prave, odnosno referentne vrijednosti. Procjena odmaka može se provesti na nekoliko načina: usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim referentnom metodom, obogaćivanjem uzorka poznatom koncentracijom analita te analizom uzorka poznate koncentracije (referentnog materijala) [39].

**Preciznost** se definira kao izraz podudaranja između niza mjerenja dobivenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima određivanja razlikujemo:

- *preciznost pod uvjetima ponovljivosti* ili *ponovljivost* – potreban rad jednog analitičara u jednom laboratoriju, uporaba iste aparature te rad u kratkom vremenskom periodu
- *međupreciznost* – uključuje rad unutar istog laboratorija u duljem vremenskom periodu uz očekivane promjene uvjeta (nekoliko analitičara, različita instrumentacija, reagensi iz različitih boca i od različitih proizvođača)
- *preciznost pod uvjetima obnovljivosti* ili *obnovljivost* – promjenjivi uvjeti podrazumijevaju različite laboratorije, određuje se u svrhu normiranja metode. Kada je sastavni dio validacije koju provodi sam laboratorij uobičajeno se procjenjuje kroz međulaboratorijska ispitivanja [39]

Slika 16 ilustrira detaljne veze između navedenih komponenti.



**Slika 16.** Prikaz veza između točnosti, istinitosti i preciznosti [41]

Eksperimente preciznosti nužno je provoditi na homogenom autentičnom uzorku. Radi se najčešće po pet ponavljanja uzastopce pri koncentracijama koje su unutar raspona područja linearnosti. Kriterij prihvatljivosti ovisi o vrsti analize, matici uzorka i koncentraciji analita koji se određuje. Razlika između preciznosti i istinitosti može se prikazati Slikom 17.

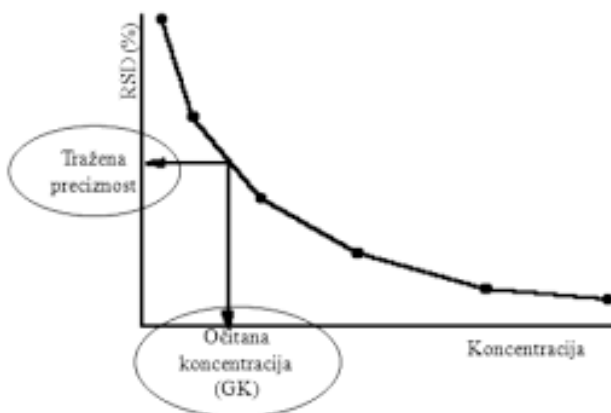


**Slika 17.** Prikaz razlike između preciznosti i istinitosti [39]

**Granica kvantifikacije** (eng. *limit of quantification, LOQ*) i **granica detekcije** (eng. *limit of detection, LOD*) predstavljaju minimalnu količinu analita koju je moguće kvantificirati odnosno detektirati u uzorku uz odgovarajuću razinu točnosti, a sam eksperiment određivanja parametara

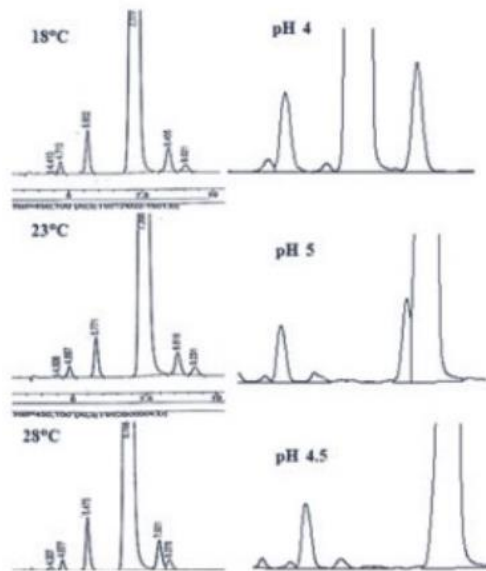


temelji se na razrjeđenju osnovne otopine. Moguća je vizualna procjena parametra granice detekcije pomoću nedvojbenog prepoznavanja minimalnog omjera signal/šum ili pak statistička procjena na bazi standardnog odstupanja signala i nagiba. Za granicu kvantifikacije prihvatljivim omjerom signal/šum smatra se 10:1, a za granicu detekcije 3:1. Ukoliko metoda zahtijeva zadanu preciznost na granici kvantifikacije, potrebno je pripremiti nekoliko uzoraka poznatih koncentracija u području oko moguće granice kvantifikacije te svaki izmjeriti pet do šest puta, nakon čega se računa relativno standardno odstupanje svake koncentracije. Odnos relativnog standardnog odstupanja prema koncentraciji prikazuje se grafički i iz njega odredi koncentracija na granici kvantifikacije s točno definiranom preciznošću (prikazano Slikom 18). U praksi je običaj preciznost potvrditi višekratnim mjerenjem.



**Slika 18.** Određivanje granice kvantifikacije uz zadanu preciznost [39]

**Robusnost** se definira kao mjera otpora analitičkog postupka na male, nenamjerno prouzročene promjene radnih uvjeta metode. Ispitivanje robusnosti provodi se u svrhu određivanja kako male namjerno izazvane promjene utječu i doprinose konačnim rezultatima analize. Primjerice kod tekućinske kromatografije moguće je vršiti promjenu sastava i pH-vrijednosti pokretne faze, temperature kolone, protoka i različite šarže ili dobavljača kolone. Ukoliko neki od navedenih čimbenika ne narušava krajnje rezultate tada se smatra da su oni u području robusnosti metode. Nasuprot tome ukoliko pak neki čimbenik uzrokuje bitne promjene tada ga je ključno držati pod nadzorom. Jedan od primjera utjecaja promjene radnih uvjeta na izgled kromatograma prikazan je na Slici 19.



**Slika 19.** Primjer utjecaja temperature kolone i pH vrijednosti pokretne faze na kromatografsko razdvajanje [39]

**Radno područje** je interval između gornje i donje koncentracijske granice analita pri čemu su granice uključene, u uzorku koje je moguće kvantificirati uz pripadajuće parametre preciznosti, istinitosti i linearnosti. Zaključke za ovaj parametar izvodimo na osnovu linearnosti i granice kvantifikacije pri čemu nije potrebno provesti zasebne eksperimente.

Prilikom provođenja validacije nije nužno za sve metode odrediti sve karakteristike. Ovisno o namjeni metode vrši se njihov odabir i stoga razlikujemo djelomičnu i potpunu validaciju. Neizostavan dio validacije je postavljanje kriterija prihvatljivosti za svaki parametar koji se potom uspoređuju s eksperimentalno dobivenim rezultatima. Posljednji korak validacije je pisanje izvještaja s jasno konstatiranim zaključkom o tome odgovara li metoda namijenjenoj svrsi [39].

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja korištene su kemikalije različitih proizvođača te odgovarajuće čistoće što je prikazano Tablicom 2.

**Tablica 2.** Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač	Čistoća
ciprofloksacin	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD	p.a.
ultračista voda	$H_2O$	Millipore Corporation, Billerica, MA, SAD	p.a.
acetonitril	$CH_3CN$	Fisher Scientific, Bishop Meadow Road, UK	p.a.
mravlja kiselina	$HCOOH$	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska	p.a.

Također, kako bi se procijenio utjecaj matice uzorka, za pripravu otopina ciprofloksacina korištena je riječna voda uzorkovana iz rijeke Save.

Riječna voda uzorkovana je u plastični spremnik u količini od sedam litara dana 31. listopada 2020. godine na prilazu iz Petrovaradinske ulice u Zagrebu. Nakon uzorkovanja profiltrirana riječna voda pohranjuje se u staklenim bocama i čuva u hladnjaku na +4 °C.

#### 3.2. Instrumenti

Prilikom rada u laboratoriju korišten je niz instrumenata, a neki od njih su: analitička vaga, uređaj za filtraciju, ultrazvučna kupelj, uređaj za proizvodnju Millipore vode i HPLC uređaj.

##### 3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga je veoma osjetljiv laboratorijski instrument dizajniran za precizno mjerenje mase. Niti jedna kvantitativna kemijska analiza ne može biti provedena bez uporabe vage, jer neovisno o korištenoj metodi, gotovo uvijek je potrebno odvagati uzorak za analizu ili potrebnu količinu

reagensa za pripravu otopina. Raspon njihovih očitavanja kreće se u pravilu od 0,1 mg pa sve do 0,01 mg. S obzirom da su ove vrste vaga osjetljive na najmanje vibracije ili zračne struje koje bitno mogu utjecati na rezultate, smještaju se u staklena kućišta s pomičnim vratima kako bi se spriječile moguće smetnje. Analitičke vage potrebno je pomno nadgledati i često provjeravati te redovito umjeravati. Današnje moderne analitičke vage imaju niz prednosti i mogućnosti u odnosu na prijašnje. Imaju LCD zaslon koji osim jasno prikazanih rezultata daje i niz drugih informacija kao što su: tara vrijednosti, raspon nekolicine mjernih jedinica koje uvelike olakšavaju mjerenje mase potrebnog uzorka, internetsku vezu koja omogućava slanje izmjerenih podataka na računalo te višejezične softvere koji omogućuju primjenu vage u raznim zemljama [42, 43]. Tijekom izvođenja eksperimenta korištena je analitička vaga XA105 DualRange proizvođača Mettler Toledo (Slika 20).



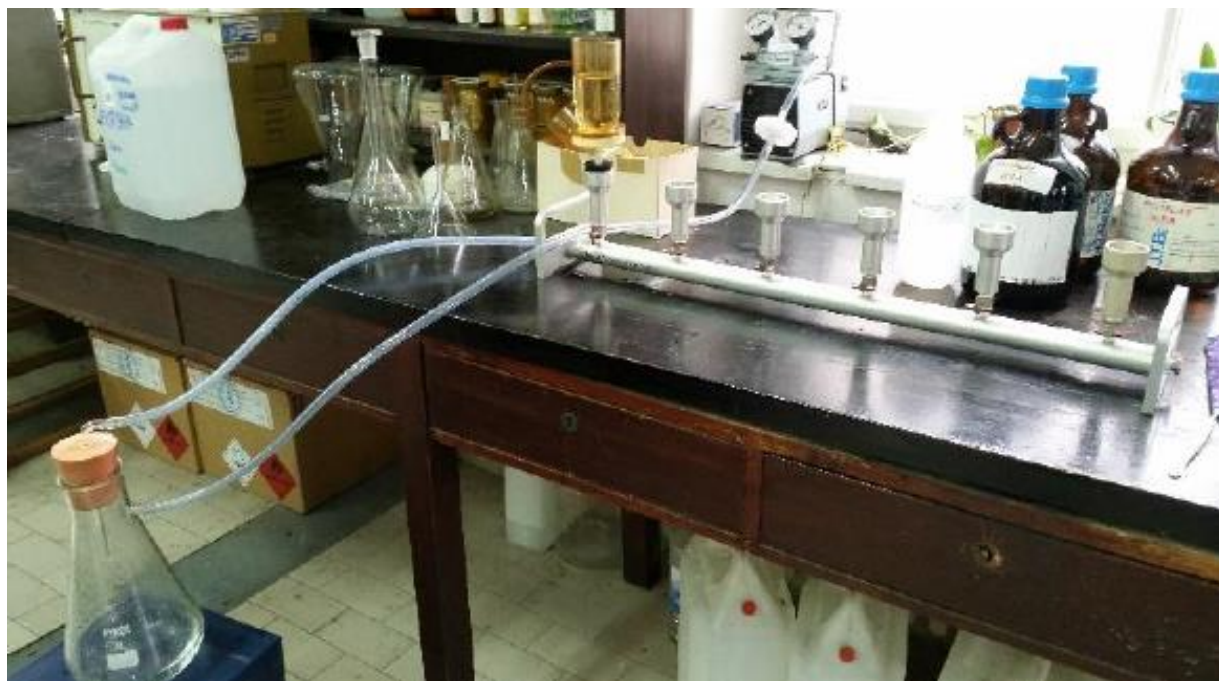
**Slika 20.** Analitička vaga XA105 DualRange, Mettler Toledo

Specifikacije korištene analitičke vage:

- maksimalan kapacitet: 220 g
- područje tare: 0 – 220 g
- očitavanje: 0,1 mg
- linearnost:  $\pm 0,2$  mg
- ponovljivost: 0,07 mg
- ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu: 0,1 mg

### 3.2.2. Uređaj za filtraciju

Prije pripreme otopina ciprofloksacina koje su korištene u istraživanju, uzorak riječne vode je profiltriran kako bi se uklonile prisutne suspendirane čestice. U laboratorijskom radu korišten je uređaj za filtraciju PALL Life Sciences (Washington, SAD) uz korištenje polipropilenskog membranskog filtra (GH Polypro, 47 mm, 0,45  $\mu$ m) pri tlaku od 600 mmHg (Slika 21).



**Slika 21.** Uređaj za filtraciju PALL Life Sciences

### 3.2.3. Ultrazvučna kupelj

U analitičkom laboratoriju ultrazvučna kupelj se koristi za uklanjanje plinova iz otopina (npr. pokretna faza), pospješivanje otapanja tvari u svrhu pripreme otopina te čišćenje laboratorijskog

posuđa. Ultrazvučna kupelj koristi kavitacijske mjehuriće inducirane zvučnim valovima za miješanje tekućine prilikom čišćenja te se može termostatirati ugrađenim grijačem do 80 °C [44, 45]. Kupelj se puni vodom, a ispod same posude smještene su ultrazvučne sonde koje djeluju na uzorke u kupelji. Tijekom eksperimenta korišten je uređaj Sonorex Digital 10P, Bandelin prikazan na Slici 22.



**Slika 22.** Ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10P, Bandelin

#### **3.2.4. Uređaj za proizvodnju Millipore vode**

Sustav za proizvodnju MilliQ vode djeluje kao pouzdan izvor dobivanja čiste ili ultra čiste vode koja je potrebna za postizanje točnih rezultata u provedbi eksperimenta. Ukoliko bi korištena voda bila kontaminirana ona može imati negativan utjecaj na provedbu istraživanja. Millipore ili MilliQ odnosi se na vodu koja je pročišćena smolastim filtrima, a sam Millipore sustav prati koncentraciju iona mjerenjem električnog otpora vode. Što je otpor veći to postoji manje iona koji su nosioci naboja. Uređaj ispušta vodu kroz membranski filter veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  sa specifičnim otporom od 18,2  $\mu\Omega$  [46]. U laboratoriju je korišten model Millipore Simplicity UV prikazan na Slici 23.





**Slika 23.** Uređaj za proizvodnju MilliQ vode, Millipore Simplicity UV

### 3.2.5. HPLC uređaj

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u svrhu određivanja ciprofloksacina u vodi provedena je na uređaju Waters 2795 Alliance HPLC systems s 2996 PDA detektorom (Slika 24).



**Slika 24.** Uređaj Waters 2795 Alliance HPLC systems s 2996 PDA detektorom

Kromatografska separacija provedena je na kromatografskoj koloni Kinetex C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličine zrna punjenja 5 µm i veličine pora 100 Å.

### **3.3. Metode rada**

#### **3.3.1. Opis kromatografskog sustava**

Kromatografski sustav korišten za određivanje ciprofloksacina u vodi metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti primarno se sastoji od pokretne faze koja je sačinjena od 0,1% mravlje kiseline u MilliQ vodi koja protječe kanalom A i 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu koja protječe kanalom B uz održavanje protoka pokretne faze na 1 ml/min. Temperatura kromatografske kolone prilikom ispitivanja održavana je na 20 °C uz trajanje analize od 10 minuta. Volumen injektiranja iznosio je 20 µl. Sastav pokretne faze bio je namješten na A:B=85:15 (V/V), a ciprofloksacin je praćen pri valnoj duljini od 278,8 nm. Dobiveni kromatogrami i njihova obrada provedena je u programskom paketu MassLynx V41 SCN 714 Waters na računalu uz instrument.

#### **3.3.2. Priprema temeljne standardne otopine ciprofloksacina**

Temeljna standardna otopina (TSO) ciprofloksacina masene koncentracije 10 mg/l odnosno 10 ppm pripravljena je vaganjem 1,0 mg standarda ciprofloksacina na analitičkoj vagi. Odvaga standarda kvantitativno je prenesena u odmjernu tikvicu od 100 ml koja je potom nadopunjena MilliQ vodom ili profiltriranom riječnom vodom do oznake.

#### **3.3.3. Priprema otopina ciprofloksacina za provjeru linearnosti**

Iz prethodno pripremljenih temeljnih standardnih otopina ciprofloksacina masenih koncentracija 10 mg/l postupkom razrjeđenja pripravljeno je deset standardnih otopina masenih koncentracija u rasponu od 0,05 mg/l do 10 mg/l s MilliQ i riječnom vodom. Ovisno o željenoj koncentraciji pojedine standardne otopine u odmjernu tikvicu od 10 ml dodan je određeni volumen temeljne standardne otopine ciprofloksacina te je tikvica nadopunjena MilliQ ili riječnom vodom do oznake. Detaljan prikaz pripreme razrijeđenih otopina dan je Tablicom 3. Za provedbu eksperimenta određivanja izvedbene karakteristike linearnosti pripravljeno je po tri uzorka (3 vijale) od svake navedene standardne otopine (za MilliQ i za riječnu vodu) ciprofloksacina, što znači da je ukupno pripravljeno 60 otopina za ispitivanje u 60 vijala.



**Tablica 3.** Priprema umjernih standarda ciprofloksacina

Oznaka	Faktor razrjeđenja	Koncentracija (mg/l)	Volumen TSO (ml)	Ukupni volumen (ml)
TSO	1	10,00	/	/
C – 1	200	0,05	0,05	10
C – 2	100	0,10	0,10	10
C – 3	40	0,25	0,25	10
C – 4	20	0,50	0,50	10
C – 5	13,33	0,75	0,75	10
C – 6	10	1,00	1,00	10
C – 7	4	2,50	2,50	10
C – 8	2	5,00	5,00	10
C – 9	1,33	7,50	7,50	10

### 3.3.4. Priprema standardnih otopina ciprofloksacina za procjenu preciznosti

Za procjenu parametra preciznosti (ponovljivosti i međupreciznosti) pripremljene su tri standardne otopine ciprofloksacina čije su koncentracije smještene unutar linearnog područja (1, 5 i 7,5 mg/l), pri tome potrebno je napomenuti da nisu korištene otopine pripravljene za izradu umjernog pravca. Otopine navedenih koncentracija pripremljene su postupkom razrjeđenja TSO ciprofloksacina u MilliQ i riječnoj vodi. U odmjerne tikvice od 20 ml otpipetiran je odgovarajući volumen TSO te je odmjerna tikvica nadopunjena do oznake vodom.

#### 3.3.4.1. Ponovljivost

Za provjeru parametra ponovljivosti pripremljeno je po 10 otopina za svaku od tri navedene koncentracije u MilliQ i riječnoj vodi. Za svaku vodu po 30 uzoraka odnosno 60 vijala ukupno.

#### 3.3.4.2. Međupreciznost

Provjera međupreciznosti izvršena je na jednaki način kao i provjera ponovljivosti, ali u odmaku od sedam dana. Na taj način je dobiven novi set mjernih podataka za ponovljivost pri tri

koncentracije (1, 5 i 7,5 mg/l). Usporedivši ta dva seta podataka dobivenih u razmaku od sedam dana određena je značajka međupreciznosti.

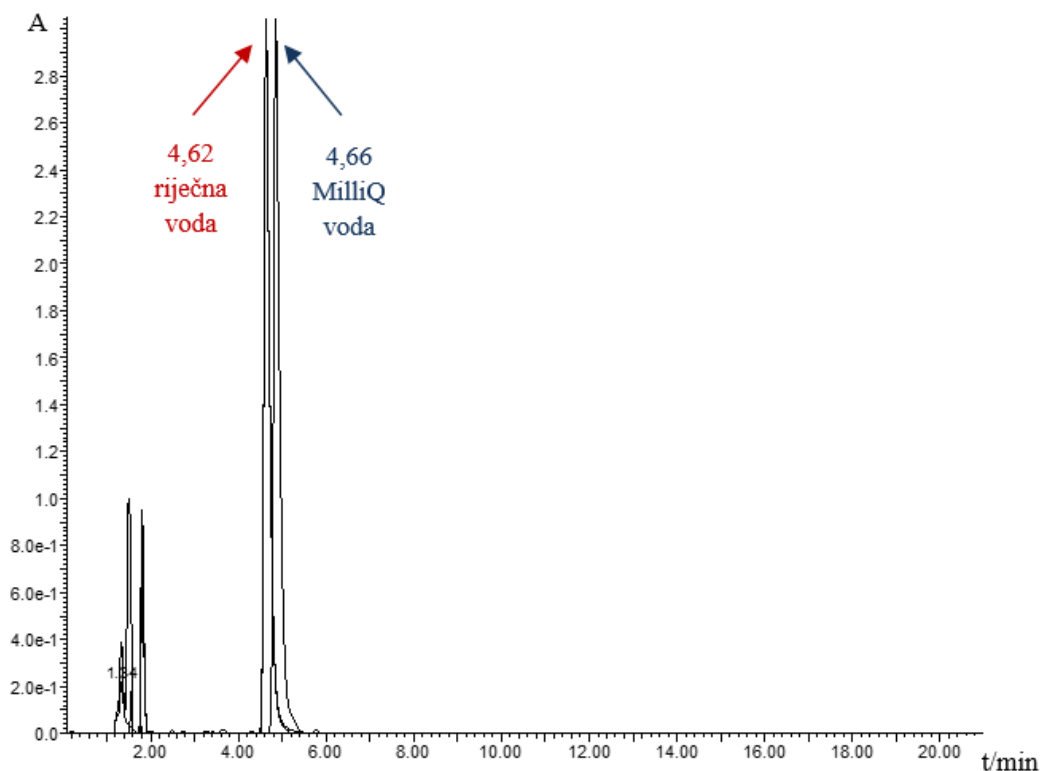
### **3.3.5. Određivanje robusnosti**

Robusnost se definira kao mjera otpora analitičkog postupka na male, ali nenamjerno prouzročene promjene radnih uvjeta metode. Određena je praćenjem promjene površine ispod pika na kromatogramu te vremena zadržavanja nakon namjerno uvedenih promjena u sastavu pokretne faze i temperature kolone. Sastav pokretne faze smanjen je na 83% u odnosu na početnih 85%, a temperatura kolone je povećana s 20 °C na 25 °C uz skraćeno vrijeme provedbe analize s početnih 10 na 7 minuta. Svaka promjena pojedinog parametra praćena je analizom standardne otopine koncentracije 5 mg/l u MilliQ i riječnoj vodi analizirajući po deset uzoraka iste koncentracije uzastopce, ukupno je analizirano 40 otopina.

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Selektivnost metode

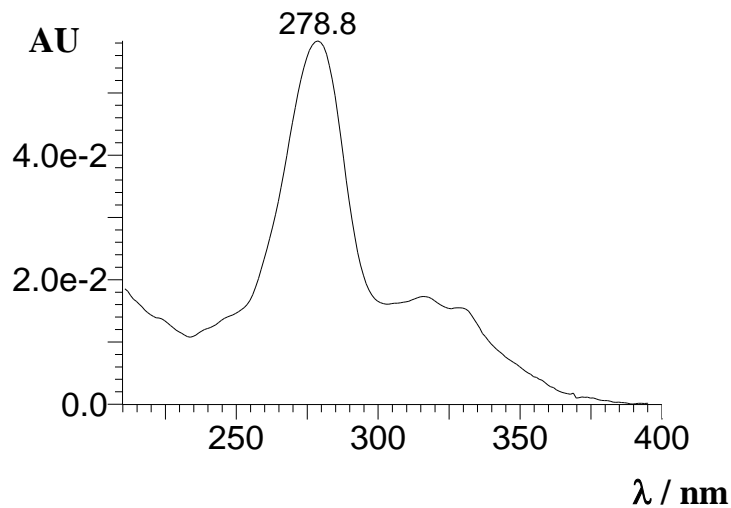
Selektivne analitičke metode omogućavaju određivanje željenog analita uz istodobnu prisutnost drugih komponenata. Selektivnost metode potvrđena je usporedbom kromatograma standarda s kromatogramom ciprofloksacina u riječnoj vodi. Usporedba kromatograma prikazana je Slikom 25.



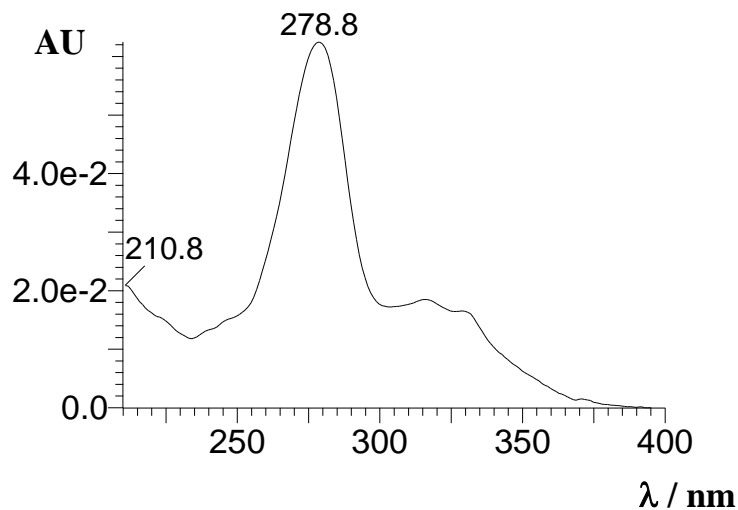
**Slika 25.** Preklapljeni kromatogrami ciprofloksacina u MilliQ i riječnoj vodi (5 mg/l)

Vrijeme zadržavanja,  $t_R$  ciprofloksacina (5 mg/l) u MilliQ vodi iznosi 4,66 min, a u riječnoj vodi 4,62 min. Pikovi na početku kromatograma mogu pripadati pokretnoj fazi ili prisutnim nečistoćama u vodi. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da matica uzorka, riječna voda, ne utječe bitno na vrijeme zadržavanja i oblik kromatografske krivulje ciprofloksacina. Također u riječnoj vodi ne nalaze se prisutne druge komponente koje ometaju određivanje ciprofloksacina čime se potvrđuje selektivnost ove metode.

Svi daljnji rezultati ispitivanih karakteristika metode očitavani su pri valnoj duljini u iznosu od 278,8 nm (maksimum krivulje) što je jasno vidljivo iz apsorpcijskih spektara ciprofloksacina u MilliQ i riječnoj vodi (Slika 26 i 27). Također promatrajući spektre farmaceutika u MilliQ i riječnoj vodi ne uočava se značajna razlika između istih.



**Slika 26.** Apсорpcijski spektar ciprofloksacina u MilliQ vodi

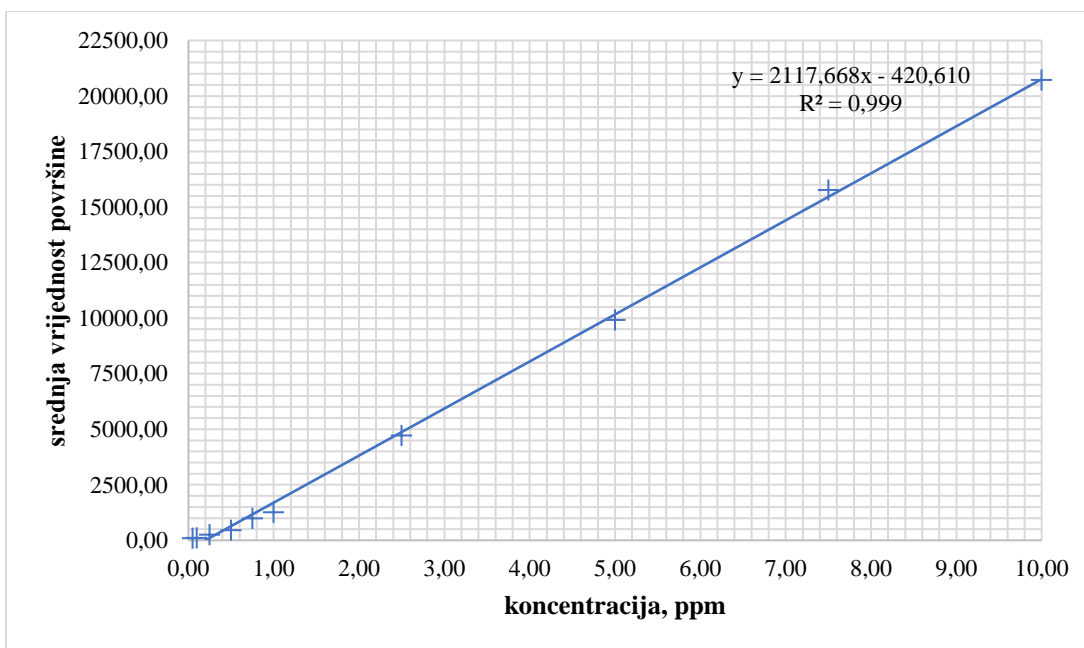


**Slika 27.** Apсорpcijski spektar ciprofloksacina u riječnoj vodi

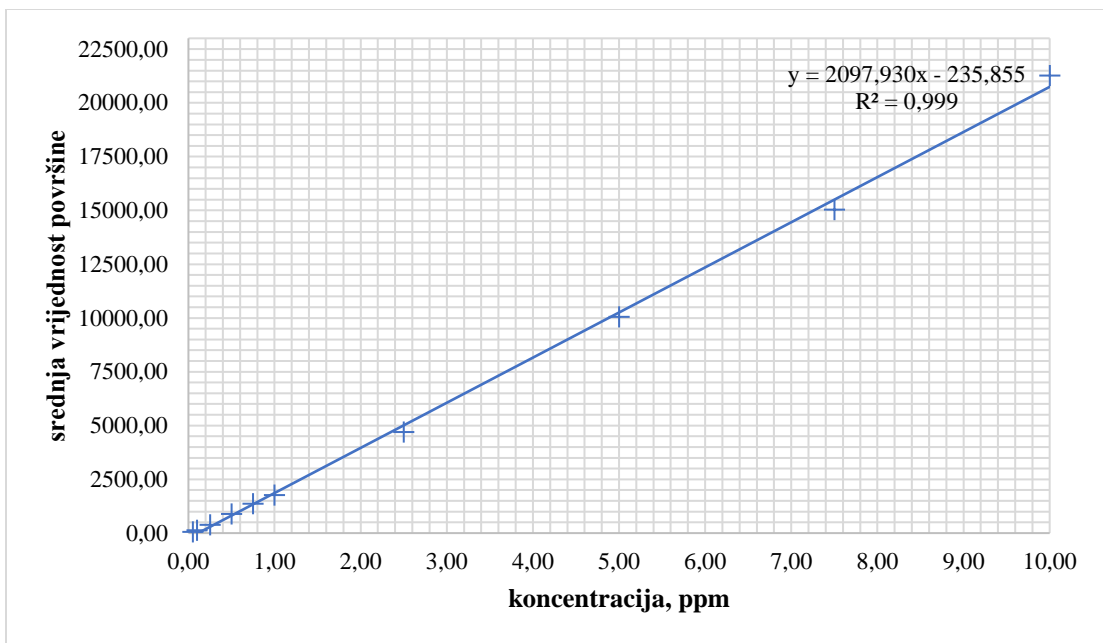
## 4.2. Linearnost

Linearnost se definira kao sposobnost metode da u određenom području daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Linearnost je utvrđena izradom kalibracijskog pravca koji je sačinjen od deset standardnih otopina različitih koncentracija ciprofloksacina u rasponu od 0,05 mg/l do 10,0 mg/L, sa po tri uzastopna mjerenja svake koncentracije. Uporabom linearne regresijske analize, ovisnost koncentracije o odzivu instrumenta izražena je jednadžbom pravca ( $y=ax+b$ ) te popratnim koeficijentom determinacije ( $R^2$ ).

Dobiveni koeficijenti determinacije za MilliQ i riječnu vodu zadovoljavaju definirani kriterij prihvatljivosti ( $R^2 \geq 0,995$ ). Ispitivanje u MilliQ i riječnoj vodi pri valnoj duljini od 278,8 nm dalo je koeficijente determinacije u iznosu od 0,999 (Slika 28 i 29). S obzirom da su u oba slučaja koeficijenti zadovoljavajući, potvrđena je linearnost ispitivane metode.



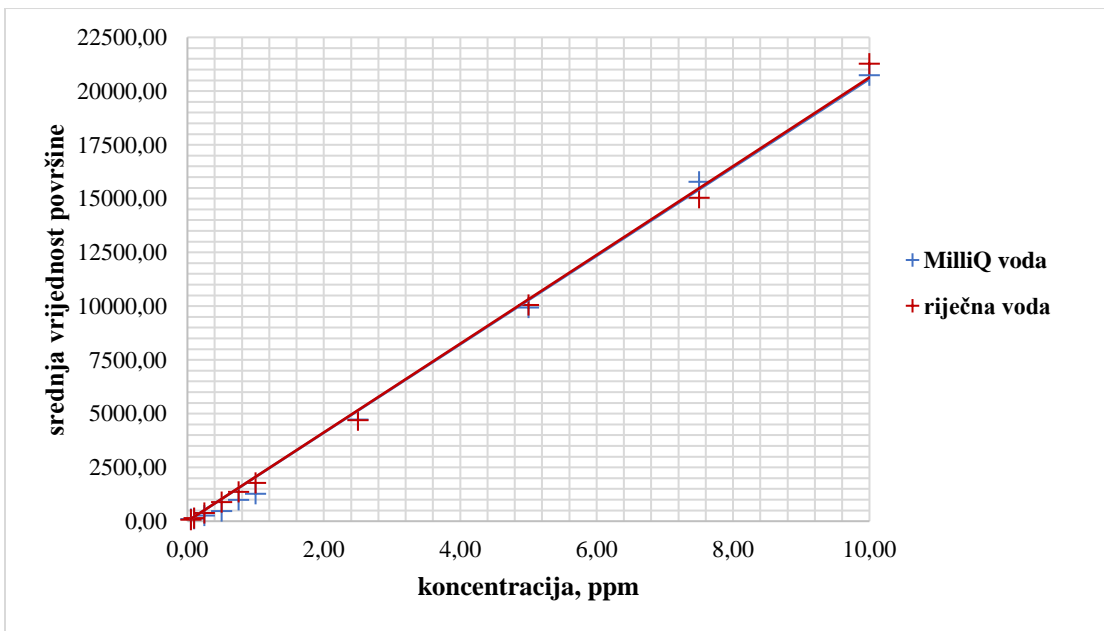
**Slika 28.** Kalibracijski pravac ciprofloksacina u MilliQ vodi pri 278,8 nm



Slika 29. Kalibracijski pravac ciprofloksacina u riječnoj vodi pri 278,8 nm

### 4.3. Osjetljivost

Osjetljivost metode određuje se iz jednadžbe kalibracijskog pravca i jednaka je njegovom nagibu. Usporedba kalibracijskih pravaca ciprofloksacina u MilliQ i riječnoj vodi prikazana je na Slici 30.



Slika 30. Usporedba kalibracijskih pravaca ciprofloksacina u MilliQ i riječnoj vodi pri 278,8 nm

Promatrajući Sliku 30 možemo zaključiti da između nagiba kalibracijskih pravaca određenih s uzorcima MilliQ i riječne vode ne postoji značajna razlika, čime se potvrđuje da matica uzorka (riječna voda) ne utječe na određivanje ciprofloksacina.

#### **4.4. Istinitost**

Istinitost rezultata određuje se kao odstupanje srednje izmjerene koncentracije od njezine prave vrijednosti ili kao iskorištenje. Prilikom ispitivanja ove izvedbene karakteristike potrebno je obuhvatiti tri koncentracije smještene unutar definiranog linearnog područja.

Ispitivanje izvedbene karakteristike istinitosti u ovome radu uključilo je mjerenje deset uzastopnih uzoraka standardnih otopina ciprofloksacina koncentracije 1, 5 i 7,5 mg/l. Na osnovu dobivenih podataka izračunata su slijedeća iskorištenja određivanja ciprofloksacina u vodi: za koncentraciju 1 mg/l iskorištenje iznosi 93,43%, za koncentraciju 5 mg/l iznosi 97,42%, a za koncentraciju od 7,5 mg/l iznosi 93,99%. S obzirom na definirani kriterij prihvatljivosti za istinitost rezultata ispitivanja ( $\pm 10\%$ ), može se zaključiti da ispitivana metoda zadovoljava postavljeni kriterij za sve tri ispitane koncentracije.

#### **4.5. Preciznost**

Preciznost jest izraz slaganja između niza mjerenja dobivenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima određivanja u ovome radu preciznost je iskazana kao ponovljivost i međupreciznost.

##### **4.5.1. Ponovljivost**

Ponovljivost mjerenja površine ispod pika ispitana je u MilliQ i riječnoj vodi pri tri koncentracije unutar linearnog područja. Dobiveni rezultati mjerenja prikazani su Tablicama 4 i 5.

**Tablica 4.** Rezultati za procjenu ponovljivosti u MilliQ vodi

<b>Koncentracija, mg/l</b>	1,00	5,00	7,50
<b>Uzorak 1, A</b>	2253,99	9435,92	14273,62
<b>Uzorak 2, A</b>	2244,33	9169,46	15921,18
<b>Uzorak 3, A</b>	1887,24	9566,69	16352,72
<b>Uzorak 4, A</b>	2121,98	9647,80	16465,12
<b>Uzorak 5, A</b>	2025,03	9549,97	16478,49
<b>Uzorak 6, A</b>	2087,37	9826,66	16276,16
<b>Uzorak 7, A</b>	2136,64	9685,62	16530,62
<b>Uzorak 8, A</b>	2223,40	10019,93	17205,74
<b>Uzorak 9, A</b>	1978,23	9732,03	16547,91
<b>Uzorak 10, A</b>	2177,19	9612,07	16641,13
<b>Srednja vrijednost površine, <math>\bar{A}</math></b>	2113,54	9624,62	16269,27
<b>Relativno standardno odstupanje, %</b>	5,72	2,36	4,74
<b>Standardno odstupanje</b>	120,92	227,24	771,30

Ponovljivost mjerenja površine ispod pika za određivanje ciprofloksacina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz PDA detektor u MilliQ vodi, iskazano kao relativno standardno odstupanje, iznosi 5,72%, za koncentraciju 1 mg/l, za koncentraciju 5 mg/l iznosi 2,36% te za koncentraciju od 7,5 mg/l iznosi 4,74%. S obzirom da se sve dobivene vrijednosti nalaze unutar definiranog kriterija prihvatljivosti ( $RSD \leq 10\%$ ) izvedbena karakteristika ponovljivosti smatra se zadovoljavajućom.



**Tablica 5.** Rezultati za procjenu ponovljivosti u riječnoj vodi

Koncentracija, mg/l	1,00	5,00	7,50
Uzorak 1, A	1926,63	9576,72	14093,17
Uzorak 2, A	2076,92	9608,35	15072,89
Uzorak 3, A	1980,32	9634,29	15229,03
Uzorak 4, A	1956,21	9604,94	14557,59
Uzorak 5, A	2044,21	9693,79	15518,47
Uzorak 6, A	1924,86	8746,43	1562,39
Uzorak 7, A	2010,45	9811,83	15744,40
Uzorak 8, A	1970,23	9321,53	16044,13
Uzorak 9, A	1922,96	8910,66	15421,81
Uzorak 10, A	1934,67	8857,84	15963,81
Srednja vrijednost površine, $\bar{A}$	1974,75	9376,64	15290,77
Relativno standardno odstupanje, %	2,72	4,19	3,97
Standardno odstupanje	53,77	392,81	607,29

Ponovljivost mjerenja površine ispod pika za određivanje ciprofloksacina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz PDA detektor u riječnoj vodi, iskazano kao relativno standardno odstupanje, iznosi 2,72% za koncentraciju 1 mg/l, za koncentraciju 5 mg/l iznosi 4,19% te za koncentraciju od 7,5 mg/l iznosi 3,97%. S obzirom da se sve dobivene vrijednosti nalaze unutar definiranog kriterija prihvatljivosti ( $RSD \leq 10\%$ ) izvedbena karakteristika ponovljivosti smatra se zadovoljavajućom.

Kako bi smo utvrdili postoji li značajna razlika u ponovljivosti u MilliQ i riječnoj vodi potrebno je provesti F-test. Rezultati provedenog F-testa dani su Tablicom 6.

**Tablica 6.** Rezultati provedenog F-testa

	1,00 mg/l		5,00 mg/l		7,50 mg/l	
	MilliQ voda	riječna voda	MilliQ voda	riječna voda	MilliQ voda	riječna voda
<b>srednja vrijednost</b>	2113,54	1974,75	9624,62	9376,64	16269,27	15290,77
<b>varijanca, <math>s^2</math></b>	14621,89	2891,804	51638,86	154299,22	594903,02	368802,30
<b>broj uzoraka, <math>n</math></b>	10	10	10	10	10	10
<b>stupnjevi slobode, (<math>n-1</math>)</b>	9	9	9	9	9	9
<b>F</b>	5,06		2,99		1,61	
<b>F<sub>kritični</sub></b>	3,18		3,18		3,18	

Ukoliko kao rezultat dobivamo da je  $F_{\text{kritični}} > F$  tada hipotezu o jednakosti varijanci prihvaćamo, dok ukoliko je suprotno tada nultu hipotezu odbacujemo, tj. smatramo da je razlika među njima bitna. S obzirom na dobivene rezultate F-testa zaključujemo da postoji bitna razlika u varijancama za koncentraciju od 1 mg/l, dok za preostle dvije koncentracije potvrđujemo kako ne postoji značajna razlika u ponovljivosti u MilliQ i riječnoj vodi te se hipoteza smatra prihvaćenom.

#### 4.5.2. Međupreciznost

Međupreciznost mjerenja površine ispod pika ispitana je na jednak način kao i ponovljivost, ali u vremenskom odmaku od sedam dana. Dobiveni rezultati mjerenja dani su Tablicama 7 i 9.

**Tablica 7.** Rezultati za procjenu ponovljivosti u MilliQ vodi, drugi dan

Koncentracija, mg/l	1,00	5,00	7,50
Uzorak 1, A	2091,74	10819,57	16533,24
Uzorak 2, A	1949,87	10848,11	16692,16
Uzorak 3, A	2070,47	9692,62	16864,14
Uzorak 4, A	2159,03	10927,08	16666,8
Uzorak 5, A	2127,55	10386,53	16881,44
Uzorak 6, A	2092,05	10832,94	17148,78
Uzorak 7, A	2119,48	10903,30	17231,62
Uzorak 8, A	2091,63	11133,32	16782,28
Uzorak 9, A	2051,36	10997,96	16885,37
Uzorak 10, A	2070,45	11199,65	15491,67
Srednja vrijednost površine, $\bar{A}$	2082,36	10774,11	16717,75

Vrijednosti relativnog standardnog odstupanja izraženog u postotcima te vrijednosti standardnog odstupanja, izračunate su na način da su se obuhvatili mjerni podaci za ponovljivost prvoga i drugoga dana zajedno (Tablica 8 i 10).

**Tablica 8.** Izračunate vrijednosti RSD i SD za ponovljivost u MilliQ vodi, oba dana

koncentracija, mg/l	1,00	5,00	7,50
RSD, %	4,44	6,67	4,04
SD	93,14	680,66	666,12

Međupreciznost mjerenja površine ispod pika za određivanje ciprofloksacina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz PDA detektor u MilliQ vodi za koncentraciju 1 mg/l iznosi 4,44%, za koncentraciju 5 mg/l iznosi 6,67% te za koncentraciju od 7,5 mg/l iznosi 4,04%. S obzirom da se sve dobivene vrijednosti nalaze unutar definiranog kriterija prihvatljivosti ( $RSD \leq 10\%$ ) izvedbena značajka međupreciznosti smatra se zadovoljavajućom.

**Tablica 9.** Rezultati za procjenu ponovljivosti u riječnoj vodi, drugi dan

Koncentracija, mg/l	1,00	5,00	7,50
Uzorak 1, A	2184,39	11528,84	17146,43
Uzorak 2, A	2201,05	11334,54	17689,30
Uzorak 3, A	2257,08	11583,32	17743,60
Uzorak 4, A	2234,76	11560,62	17344,96
Uzorak 5, A	2257,27	11013,47	17560,13
Uzorak 6, A	2187,33	11140,48	16733,26
Uzorak 7, A	2339,40	11321,85	17150,32
Uzorak 8, A	2241,92	11396,82	16997,68
Uzorak 9, A	2595,43	11544,56	17370,10
Uzorak 10, A	2194,70	11295,38	17321,93
Srednja vrijednost površine, $\bar{A}$	2269,33	11363,09	17305,77

**Tablica 10.** Izračunate vrijednosti RSD i SD za ponovljivost u riječnoj vodi, oba dana

koncentracija, mg/l	1,00	5,00	7,50
RSD, %	8,36	9,24	6,97
SD	177,35	1061,83	1135,60

Međupreciznost mjerenja površine ispod pika za određivanje ciprofloksacina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz PDA detektor, u riječnoj vodi iskazana kao relativno standardno odstupanje, iznosi 8,36% za koncentraciju 1 mg/l, za koncentraciju 5 mg/l iznosi 9,24% te za koncentraciju od 7,5 mg/l iznosi 6,97%. S obzirom da se sve dobivene vrijednosti nalaze unutar definiranog kriterija prihvatljivosti ( $RSD \leq 10\%$ ) izvedbena značajka međupreciznosti smatra se zadovoljavajućom.

Kako bi smo utvrdili postoji li značajna razlika u ponovljivosti u MilliQ i riječnoj vodi, drugi dan, potrebno je provesti F-test. Rezultati provedenog F-testa dani su Tablicom 11.

**Tablica 11.** Rezultati provedenog F-testa

	1,00 mg/l		5,00 mg/l		7,50 mg/l	
	MilliQ voda	riječna voda	MilliQ voda	riječna voda	MilliQ voda	riječna voda
<b>srednja vrijednost</b>	2097,95	2122,04	10199,36	10369,86	16493,51	16298,27
<b>varijanca, <math>s^2</math></b>	8675,06	31453,02	463298,04	1127483,00	443715,85	1289587,36
<b>broj uzoraka, <math>n</math></b>	10	10	10	10	10	10
<b>stupnjevi slobode, (<math>n-1</math>)</b>	9	9	9	9	9	9
<b>F</b>	3,63		2,43		2,91	
<b>F<sub>kritični</sub></b>	3,18		3,18		3,18	

S obzirom na dobivene rezultate F-testa zaključujemo da postoji bitna razlika u varijancama za koncentraciju od 1 mg/l, dok za preostle dvije koncentracije potvrđujemo kako ne postoji značajna razlika te se hipoteza smatra prihvaćenom.

#### 4.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije, LOD, dobivena je primjenom slijedeće jednadžbe:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{a} \quad (8)$$

pri čemu je  $a$  nagib kalibracijskog pravca,  $S_{y/x}$  rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca izračunata prema jednadžbi (9) u kojoj  $n$  odgovara broju mjerenja s kalibracijskim otopinama.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (9)$$

Granica kvantifikacije, LOQ, dobivena je primjenom slijedeće jednadžbe:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{a} \quad (10)$$

pri čemu je  $a$  nagib kalibracijskog pravca, a  $S_{y/x}$  rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca izračunata prema jednadžbi (9).

Pomoću podataka prikazanih u Tablicama P1 i P2 (u Prilogu) te korištenjem jednadžbi (8), (9), (10) izračunate su granice detekcije i granice kvantifikacije za određivanje ciprofloksacina u vodi. Vrijednosti granica detekcije i kvantifikacije uz broj mjerenja  $n = 30$  te rezidualna standardna odstupanja  $S_{y/x}$  (MilliQ voda) = 160,48 i  $S_{y/x}$  (riječna voda) = 160,12 iznose:

$$\text{LOD (MilliQ voda)} = 0,25 \text{ mg/l}$$

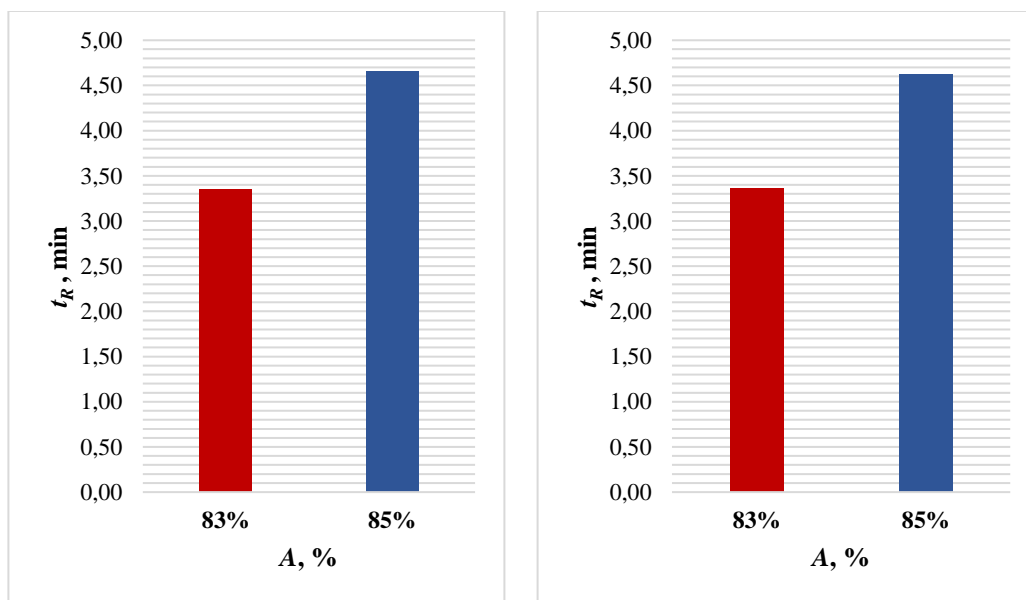
$$\text{LOQ (MilliQ voda)} = 0,76 \text{ mg/l}$$

$$\text{LOD (riječna voda)} = 0,25 \text{ mg/l}$$

$$\text{LOQ (riječna voda)} = 0,76 \text{ mg/l}$$

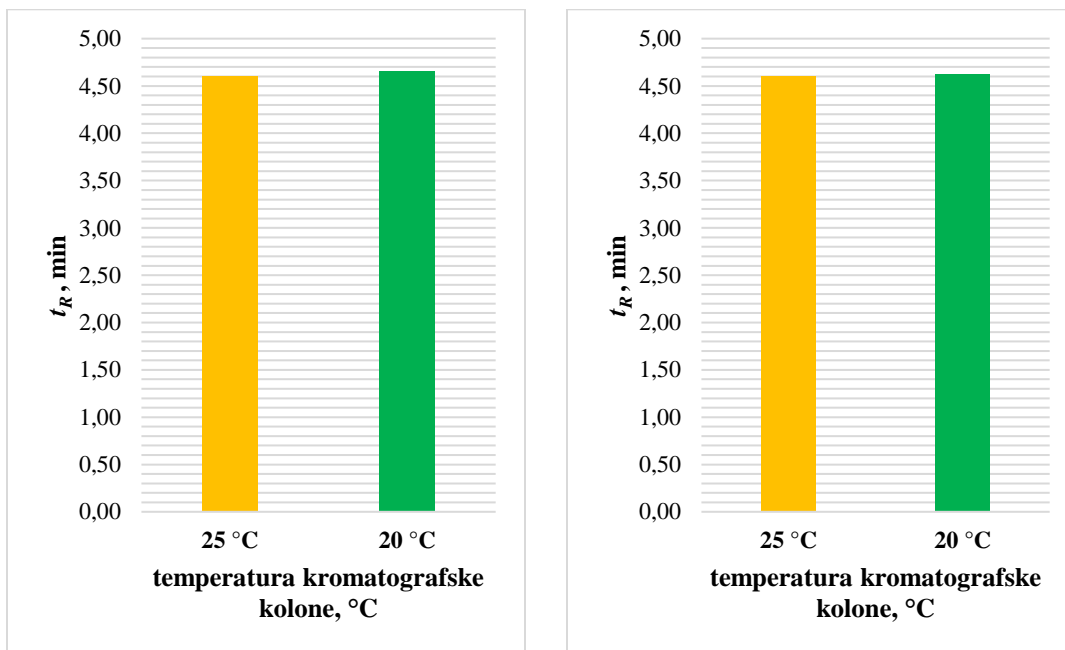
#### 4.7. Robusnost

Robusnost metode predstavlja mjeru otpora analitičkog postupka na male promjene radnih, eksperimentalnih uvjeta metode. Određuje se namjernom promjenom eksperimentalnih parametara rada koji utječu na određivanje analita. Dobiveni rezultati nastali uslijed promjene udjela vodene faze (A) u pokretnoj fazi te temperature kolone prikazani su Tablicama P3 do P6 kao i slikama 31 i 32.



**Slika 31.** Grafički prikaz utjecaja promjene sastava pokretne faze na određivanje ciprofloksacina u MilliQ i riječnoj vodi za otopinu koncentracije 5 mg/l

Na osnovu dobivenih rezultata vidljivo je da promjena sastava pokretne faze bitno utječe na vrijeme zadržavanja ciprofloksacina u kromatografskoj koloni. Smanjenjem udjela vodene faze s početnih 85% na 83% dolazi do smanjenja vremena zadržavanja,  $t_R$ . Uspoređujući pri tome površine ispod kromatografskih krivulja na kromatogramima ne uočavaju se bitne razlike između njih, što nam govori da sastav pokretne faze ne utječe na kvantitativno određivanje ciprofloksacin.



**Slika 32.** Grafički prikaz utjecaja promjene temperature kolone na određivanje ciprofloksacina u MilliQ i riječnoj vodi za otopinu koncentracije 5 mg/l

Temeljem dobivenih rezultata vidljivo je da promjenom, odnosno povećanjem temperature kromatografske kolone s optimalnih 20 °C na 25 °C ne dolazi do značajne promjene vremena zadržavanja,  $t_R$ . Uspoređujući pri tome površine ispod kromatografskih krivulja na kromatogramima ne uočavaju se bitne razlike između njih.

#### 4.8. Radno područje

Radno područje metode definirano je kao interval između donje i gornje koncentracijske granice analita u uzorku unutar kojega se analit može kvantificirati uz pripadajuće parametre preciznosti, linearnosti i istinitosti. Raspon radnog područja odnosno područja primjene za ciprofloksacin u MilliQ vodi nalazi se između 0,76 mg/l i 10 mg/l, pri čemu donja granica ovog raspona odgovara granici kvantifikacije, a gornja granica jest najviša točka kalibracijskog pravca. Za uzorke

ciprofloksacina u riječnoj vodi raspon radnog područja kreće se između donje granice koja iznosi 0,76 mg/l i gornje granice od 10 mg/l.

#### 4.9. Sažetak rezultata

**Tablica 12.** Sažeti prikaz rezultata validacije HPLC-PDA metode za određivanje ciprofloksacina

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati u MilliQ vodi	Rezultati u riječnoj vodi	Zadovoljava kriterij u MilliQ vodi	Zadovoljava kriterij u riječnoj vodi
<b>Selektivnost</b>	Informacija	Slika 25		DA	
<b>Linearnost</b>	Koeficijent determinacije, <b>R<sup>2</sup> ≥ 0,995</b>	0,999	0,999	DA	DA
<b>Radno područje</b>	Informacija	0,76 mg/l do 10 mg/l	0,76 mg/l do 10 mg/l	/	/
<b>Preciznost</b>	<b>RSD ≤ 10%</b>				
Ponovljivost, mjerjenje površine ispod pika	γ = 1 mg/l	5,72%	2,72%	DA	DA
	γ = 5 mg/l	2,36%	4,19%	DA	DA
	γ = 7,5 mg/l	4,74%	3,97%	DA	DA
Međupreciznost, mjerjenje površine ispod pika	γ = 1 mg/l	4,44%	8,36%	DA	DA
	γ = 5 mg/l	6,67%	9,24%	DA	DA
	γ = 7,5 mg/l	4,04%	6,97%	DA	DA
<b>Istinitost</b>	<b>90 – 110%</b>				
Iskorištenje	γ = 1 mg/l	93,43%		DA	
	γ = 5 mg/l	97,42%		DA	
	γ = 7,5 mg/l	93,99%		DA	
<b>LOD / mg/l</b>	Informacija	0,25	0,25	/	/
<b>LOQ / mg/l</b>	Informacija	0,76	0,76	/	/



Na temelju dobivenih rezultata mjerenja i njihove obrade možemo zaključiti da je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda (HPLC-PDA metoda) prihvatljiva za određivanje ciprofloksacina u vodi zato što su sve izvedbene karakteristike metode unutar definiranih kriterija prihvatljivosti.

## 5. Zaključak

Ovim istraživanjem potvrđeno je kako se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-PDA) može koristiti u svrhu određivanja ciprofloksacina u riječnoj vodi. Eksperimentalni rad proveden je sa standardnim otopinama farmaceutika u MilliQ i riječnoj vodi, a ispitane su izvedbene karakteristike metode pri čemu su definirani kriteriji prihvatljivosti. Iz navedenoga se izvode slijedeći zaključci:

- Metoda je selektivna za određivanje ciprofloksacina u vodi.
- Potvrđena je linearnost metode s obzirom da je u oba slučaja zadovoljen postavljeni kriterij  $R^2 \geq 0,995$ , pri čemu su rezultati ispitivanja direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku.
- Usporedbom kalibracijskih pravaca u MilliQ i riječnoj vodi ne uviđaju se bitne razlike u nagibu pravca.
- Parametri ponovljivosti i međupreciznosti za sve tri koncentracije zadovoljavaju postavljeni kriterij  $RSD \leq 10\%$ .
- Potvrđena je istinitost metode s obzirom da iskorištenje zadovoljava definirani kriterij za sve ispitane koncentracije.
- Određene su vrijednosti granice detekcije i kvantifikacije:  $LOD = 0,25 \text{ mg/l}$  te  $LOQ = 0,76 \text{ mg/l}$ , koje su jednake za MilliQ i riječnu vodu.
- Radno područje primjene u MilliQ i riječnoj vodi je u rasponu od  $0,76 \text{ mg/l}$  do  $10 \text{ mg/l}$ .
- Robusnost metode ispitana je promjenom sastava pokretne faze te promjenom temperature kromatografske kolone, pri čemu je najznačajniji utjecaj zabilježen na vremenu zadržavanja.

## 6. Literatura

[1] Faramaceutici, URL:

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=36490> (pristup 01.02.2021.)

[2] S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode, 24 (2016), 119 – 121.

[3] M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kemija u industriji, 65 (2016) 471 – 475.

[4] V. Žerjav, Utjecaj lijekova na okoliš i postupci zbrinjavanja, 12. Hrvatska konferencija o kvaliteti i 3. Znanstveni skup hrvatskog društva za kvalitetu, Brijuni (2012), 396 – 398.

[5] A. Boxall, R. Murray, B. Bryan, D. J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J. P. Staveley, T. Verslycke, G. T. Ankley, K. F. Beazley, S. E. Belanger, J. P. Berninger, P. Carriquiriborde, A. Coors, P. C. Deleo, S. D. Dyer, J. F. Ericson, F. Gagné, J. P. Giesy, T. Gouin, L. Hallstrom, M. V. Karlsson, D. G. J. Larsson, J. M. Lazorchak, F. Mastrocco, A. McLaughlin, M. E. McMaster, R. D. Meyerhoff, R. Moore, J. L. Parrott, J. R. Snape, R. Murray-Smith, M. R. Servos, P. K. Sibley, J. O. Straub, N. D. Szabo, E. Topp, G. R. Tetreault, V. L. Trudeau, G. Van Der Kraak, Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions?, Environmental Health Perspectives, 12 (2012) 1221 – 1229.

[6] D. Dabić, Utjecaj abiotičkih procesa na farmaceutike u vodenom okolišu, doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2020)

[7] K. Margeta, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, Š. Ukić, Zaštita okoliša i regionalni razvoj – iskustva i perspektive, Zagreb (2009), 243 – 265.

[8] Ciprofloxacín, URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ciprofloxacín> (pristup 02.02.2021.)

[9] Ciprofloksacin tablete (Slika 2), URL:

<https://www.youtube.com/watch?v=0lbpBUfqKdk> (pristup 02.02.2021.)

[10] Ciprofloksacin kapi za oči (Slika 2), URL:

<https://www.indiamart.com/proddetail/ciprofloxacín-eye-drops-14716511897.html>  
(pristup 02.02.2021.)

- [11] Ciprofloksacin otopina (Slika 2), URL:  
<https://allmedtech.com/cila200mgini.html> (pristup 02.02.2021.)
- [12] A. Rehman, W. M. Patrick, I. L. Lamont<sup>1</sup>, Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem, *Journal of Medical Microbiology*, 68 (2019) 1–10. DOI 10.1099/jmm.0.000873
- [13] Ciprofloxacin, URL:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin#section=Solubility> (pristup 02.02.2021.)
- [14] Piktogrami (Slika 6), URL:  
<http://www.zirs.hr/znakovi-sigurnosti.aspx?category=71> (pristup 03.02.2021.)
- [15] M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Zagreb (2003), 217 – 279.
- [16] Kromatografija, URL:  
<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34154> (pristup 04.02.2021.)
- [17] T. Fornstedt, P. Forssén, D. Westerlund, Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution, in: V. Pino, J. L. Anderson, A. Berthod, A. M. Stalcup (Eds.), *Anal. Sep. Sci.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015, str. 1 – 24.
- [18] P. D. McDonald, *James Waters and His Liquid Chromatography People: A Personal Perspective*, Waters Whitepaper, WA62008, 2006.
- [19] Prvi HPLC uređaj, URL:  
<https://theanalyticalscientist.com/techniques-tools/the-top-10-game-changers-in-hplc-history> (pristup 04.02.2021)
- [20] Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, URL:  
[https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska\\_kromatografija\\_visoke\\_djelotvornosti](https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska_kromatografija_visoke_djelotvornosti) (pristup 04.02.2020.)

[21] Princip rada HPLC-a, URL:

[https://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US) (pristup 04.02.2021.)

[22] High Performance Liquid Chromatography, LibreTexts™, URL:

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/High\\_Performance\\_Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography) (pristup 04.02.2021.)

[23] High Performance Liquid Chromatography, URL:

<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (pristup 04.02.2021.)

[24] High Performance Liquid Chromatography, URL:

[http://hiq.lindegas.com/en/analytical\\_methods/liquid\\_chromatography/high\\_performance\\_liquid\\_chromatography.html](http://hiq.lindegas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html) (pristup 05.02.2021.)

[25] Fabulous at 50: A Brief History of HPLC (Slika 9), URL:

<https://www.polymersolutions.com/blog/a-brief-history-of-hplc/> (pristup 05.02.2021.)

[26] Everything You Need to Know About HPLC Pumps, URL:

<https://www.iconsci.com/everything-you-need-to-know-about-hplc-pumps/#:~:text=An%20HPLC%20pump%20is%20also,resistance%20of%20the%20HPLC%20column.&text=Most%20HPLC%20pumps%20have%20a%20reciprocating%20dual%20piston%20design.> (pristup 05.02.2021.)

[27] Waters 515 Isocratic HPLC pump - WAT207000 (Slika 10), URL:

<https://uvison.com/chromatography-systems/waters-chromatography-systems/waters-hplc-systems/waters-hplc-solvent-management/waters-515-isocratic-hplc-pump-wat207000> (pristup 05.02.2021.)

[28] HPLC injektor, HPLC Instrumentation in Pharmaceutical Analysis: Status, Advances, and Trends, URL:

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/injectors> (pristup 05.02.2021.)

- [29] Athena HPLC Rheodyne Injector For Laboratory Use (Slika 11),  
URL: <https://www.indiamart.com/proddetail/hplc-rheodyne-injector-21213771448.html> (pristup 05.02.2021.)
- [30] Slika 11, URL:  
<https://www.linkedin.com/pulse/sampler-injector-hplc-dominique-richon> (pristup 05.02.2021.)
- [31] B. Štraus, A. Stavljenić-Rukavina, F. Plavšić, Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Zagreb, Medicinska naklada, 1997, 246 – 252.
- [32] HPLC column NUCLEODUR® C18 Gravity (Slika 12), URL:  
<https://www.carlroth.com/com/en/separation-columns-nucleodur-for-hplc/hplc-column-nucleodur-c18-gravity-5-%C2%B5m/p/kk91.1> (pristup 05.02.2021.)
- [33] Detectors for HPLC, URL: <https://www.shodex.com/en/kouza/f.html#!> (pristup 05.02.2021.)
- [34] S. Lutteroti, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), URL: [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (pristup 05.02.2021.)
- [35] R. P. W. Scott, Tandem Techniques, UV and Visible Spectroscopy, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester (1997), 53-54.
- [36] Photodiode Array Detector Hplc (Slika 13), URL: <https://phototo-ok.blogspot.com/2011/05/photodiode-array-detector-hplc.html> (pristup 05.02.2021.)
- [37] Theory of HPLC chromatographic parameters, Chrom academy – e-learning for the analytical chemistry community
- [38] D. Mandić, Uvod u kromatografske separacije, prezentacija, URL:  
[https://www.hkmb.hr/clanovi/tecajevi/2018/Analiticke%20tehnike/prezentacije/05\\_Dario%20Mandic%20-%20Uvod%20u%20kromatografske%20separacije.pdf](https://www.hkmb.hr/clanovi/tecajevi/2018/Analiticke%20tehnike/prezentacije/05_Dario%20Mandic%20-%20Uvod%20u%20kromatografske%20separacije.pdf) (pristup 06.02.2021.)
- [39] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, 61-65
- [40] Analytical Method Development and Validation, URL:  
<https://lubrizolcdmo.com/technical-briefs/analytical-method-development-and-validation/#:~:text=Analytical%20method%20development%20and%20validation%20are%20co>

ntinuous%20and%20interconnected%20activities,performance%20limits%20of%20the%20meas  
urement. (pristup 06.02.2021.)

[41] The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation  
and Related Topics, Eurachem, 2014, URL:

[https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf) (pristup  
06.02.2021.)

[42] Analitička vaga, Kemijski riječnik, URL:

<https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=analiti%C4%8Dka+vaga> (pristup 23.02.2021.)

[43] What are Analytical Balances?, URL:

<https://www.adamequipment.co.uk/aeblog/what-are-analytical-balances> (pristup 23.02.2021.)

[44] Ultrazvučna kupelj, URL:

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:xIth9D3bmYkJ:www.pbf.unizg.hr/content/download/31491/126097/version/1/file/Elmasonic%2BP%2Bultrazvu%25C4%258Dna%2Bkupelj.pdf+%&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=hr> (pristup 23.02.2021.)

[45] Ultrasonic cleaning, URL:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasonic\\_cleaning](https://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasonic_cleaning) (pristup 23.02.2021.)

[46] Milli Q Water System, URL:

<https://www.che.iitb.ac.in/online/labfacility/milli-q-water-system> (pristup 23.02.2021.)



## 8. Prilog

**Tablica P1.** Pomoćna tablica za procjenu značajki granice kvantifikacije i granice detekcije u MilliQ vodi

	Koncentracija, $x_i$	Površina (stvarna), $y_i$	Površina (procjena), $\hat{y}_i$	Pogreška, $y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
1	0,05	98,4933	-314,7266	413,2199	170750,6858
2	0,10	113,8800	-208,8432	322,7232	104150,2638
3	0,25	254,8767	108,8070	146,0697	21336,3573
4	0,50	458,4600	638,2240	-179,7640	32315,0957
5	0,75	991,1033	1167,6410	-176,5377	31165,5595
6	1,00	1270,6900	1697,0580	-426,3680	181789,6714
7	2,50	4721,1367	4873,5600	-152,4233	23232,8624
8	5,00	9928,7367	10167,7300	-238,9933	57117,7974
9	7,50	15776,1100	15461,9000	314,2100	98727,9241
10	10,00	20733,9333	20756,0700	-22,1367	490,0335
$\bar{x}$	27,65	5434,7420		<b>SUM</b>	721076,2509
				<b>AVERAGE</b>	72107,6251



**Tablica P2.** Pomoćna tablica za procjenu značajki granice kvantifikacije i granice detekcije u riječnoj vodi

	Koncentracija, $x_i$	Površina (stvarna), $y_i$	Površina (procjena), $\hat{y}_i$	Pogreška, $y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
<b>1</b>	0,05	62,8767	-130,9590	193,8357	37572,2786
<b>2</b>	0,10	136,6200	-26,0620	162,6820	26465,4331
<b>3</b>	0,25	380,2000	288,6275	91,5725	8385,5228
<b>4</b>	0,50	886,0200	813,1100	72,9100	5315,8681
<b>5</b>	0,75	1359,5170	1337,5930	21,9240	480,6618
<b>6</b>	1,00	1772,6000	1862,0750	-89,4750	8005,7756
<b>7</b>	2,50	4697,9430	5008,9700	-311,0270	96737,7947
<b>8</b>	5,00	10047,5000	10253,8000	-206,3000	42559,6900
<b>9</b>	7,50	15035,4100	15498,6200	-463,2100	214563,5041
<b>10</b>	10,00	21270,5300	20743,4500	527,0800	277813,3264
$\bar{x}$	27,65	5564,9217		<b>SUM</b>	717899,8552
				<b>AVERAGE</b>	71789,9855

**Tablica P3.** Rezultati dobiveni uzrokovanom promjenom sastava pokretne faze za određivanje ciprofloksacina u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 5 mg/l

Koncentracija, 5 mg/l	Izmjerena vrijednost površine, A	Vrijeme zadržavanja, $t_R$
Uzorak 1	10978,90	3,35 min
Uzorak 2	10035,42	3,34 min
Uzorak 3	10712,87	3,34 min
Uzorak 4	9260,58	3,34 min
Uzorak 5	8523,46	3,36 min
Uzorak 6	9142,55	3,36 min
Uzorak 7	9784,99	3,34 min
Uzorak 8	9291,64	3,36 min
Uzorak 9	8605,31	3,36 min
Uzorak 10	10438,14	3,34 min
<b>Srednja vrijednost</b>	9677,39	3,35 min

**Tablica P4.** Rezultati dobiveni uzrokovanom promjenom sastava pokretne faze za određivanje ciprofloksacina u riječnoj vodi za otopinu koncentracije 5 mg/l

Koncentracija, 5 mg/l	Izmjerena vrijednost površine, A	Vrijeme zadržavanja, $t_R$
Uzorak 1	10263,73	3,34 min
Uzorak 2	10907,42	3,34 min
Uzorak 3	10226,40	3,36 min
Uzorak 4	10347,63	3,36 min
Uzorak 5	10399,11	3,36 min
Uzorak 6	10393,24	3,36 min
Uzorak 7	10406,88	3,36 min
Uzorak 8	10783,69	3,36 min
Uzorak 9	10557,90	3,36 min
Uzorak 10	10153,24	3,36 min
<b>Srednja vrijednost</b>	10443,92	3,36 min

**Tablica P5.** Rezultati dobiveni uzrokovanom promjenom temperature kolone za određivanje ciprofloksacina u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 5mg/l

Koncentracija, 5 mg/l	Izmjerena vrijednost površine, A	Vrijeme zadržavanja, $t_R$
Uzorak 1	8821,90	4,59 min
Uzorak 2	8901,44	4,59 min
Uzorak 3	10200,70	4,59 min
Uzorak 4	9949,82	4,61 min
Uzorak 5	9579,80	4,61 min
Uzorak 6	10215,03	4,61 min
Uzorak 7	8968,12	4,59 min
Uzorak 8	10162,16	4,57 min
Uzorak 9	10036,93	4,57 min
Uzorak 10	8897,92	4,59 min
<b>Srednja vrijednost</b>	9573,38	4,60 min

**Tablica P6.** Rezultati dobiveni uzrokovanom promjenom temperature kolone za određivanje ciprofloksacina u riječnoj vodi za otopinu koncentracije 5 mg/l

Koncentracija, 5 mg/l	Izmjerena vrijednost površine, A	Vrijeme zadržavanja, $t_R$
Uzorak 1	10329,12	4,59 min
Uzorak 2	10425,41	4,59 min
Uzorak 3	10057,31	4,59 min
Uzorak 4	10178,47	4,59 min
Uzorak 5	10851,32	4,59 min
Uzorak 6	10421,69	4,61 min
Uzorak 7	10663,86	4,61 min
Uzorak 8	10597,8	4,61 min
Uzorak 9	10777,41	4,61 min
Uzorak 10	10581,63	4,61 min
<b>Srednja vrijednost</b>	10488,41	4,60 min