

Validacija spektrofotometrijske metode za određivanje ciprofloksacina

Karlović, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:149:166234>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nina Karlović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nina Karlović

VALIDACIJA SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE CIPROFLOKSACINA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Danijela Ašperger

prof. dr. sc. Irena Škorić

SAŽETAK

Validacija analitičkih metoda prvi je korak ka osiguravanju pouzdanosti i točnosti analitičkih podataka. Validacijom dokazujemo da naša metoda služi svrsi koja joj je namijenjena i njome se pruža mogućnost akreditacije metode. Ona je regulatorni zahtjev kao i profesionalna odgovornost analitičara. Za validaciju analitičke metode potrebno je provesti vrednovanje svih parametara metode: specifičnost/selektivnost, linearnost, preciznost, istinitost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, radno područje i robusnost.

Cilj ovog rada bio je validirati spektrofotometrijsku metodu za određivanje farmaceutika ciprofloksacina, upoznati se s postupkom validacije te na temelju dobivenih rezultata zaključiti zadovoljava li predložena metoda kriterije prihvatljivosti. Pripremljene su otopine ciprofloksacina u Millipore vodi i ispitani su svi parametri validacije. Potvrđena je linearnost metode u radnom području koncentracija od 4,60 mg/L do 30 mg/L, a koeficijent determinacije iznosi $R^2=0,9984$. Granica kvantifikacije nalazi se pri koncentraciji 4,60 mg/L, a granica detekcije pri koncentraciji 1,52 mg/L.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je metoda prihvatljiva za određivanje ciprofloksacina u rasponu koncentracija definiranim radnim područjem metode unutar kojega svi parametri validacije zadovoljavaju postavljene granice prihvatljivosti.

Ključne riječi: validacija analitičke metode, spektrofotometrija, farmaceutici, ciprofloksacin

ABSTRACT

Analytical method validation is the first step towards ensuring the reliability and accuracy of analytical results. Validation verifies that our method is suitable for its intended purpose and also enables method accreditation. It is a regulatory requirement as well as the professional responsibility of an analyst. To validate an analytical method, it is necessary to evaluate all the method parameters: specificity/selectivity, linearity, precision, trueness, accuracy, detection limit, quantification limit, working range and robustness.

The aim of this study was to validate the spectrophotometric method for the determination of the pharmaceutical ciprofloxacin, to get acquainted with the validation procedure and based on the obtained results to conclude whether the suggested method meets the acceptability criteria. Solutions of ciprofloxacin in Millipore water were prepared, and all validation parameters were examined. The linearity of the method was confirmed in the concentration working range from 4,60 mg/L to 30 mg/L with the coefficient of determination $R^2=0,9984$. The quantification limit is at a concentration of 4,60 mg/L, and the detection limit is at a concentration of 1,52 mg/L.

The results of this study showed that the method is acceptable for the determination of ciprofloxacin in the defined working range within which all validation parameters meet predetermined acceptability criteria.

Key words: analytical method validation, spectrophotometry, pharmaceuticals, ciprofloxacin

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Farmaceutici u okolišu.....	2
2.1.1. Ciprofloksacin	3
2.2. UV/VIS spektrometrija [9]	5
2.2.1. Beerov zakon [9]	6
2.3. Validacija.....	7
2.3.1. Specifičnost/selektivnost	8
2.3.2. Linearnost.....	8
2.3.3. Preciznost	9
2.3.4. Istinitost.....	9
2.3.5. Točnost	10
2.3.6. Granice detekcije i kvantifikacije.....	10
2.3.7. Radno područje	11
2.3.8. Robusnost	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Ciprofloksacin	12
3.2. Instrumenti.....	13
3.2.1. Analitička vaga.....	13
3.2.2. UV/VIS spektrofotometar	14
3.3. Metode rada	14
3.3.1. Priprema temeljne standardne otopine ciprofloksacina.....	14
3.3.2. Priprema otopina ciprofloksacina za određivanje linearnosti	15
3.3.3. Priprema otopina ciprofloksacina za određivanje preciznosti.....	15

3.3.4.	Određivanje stabilnosti otopine ciprofloksacina	16
3.3.5.	Određivanje robusnosti	16
4.	REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1.	Specifičnost / selektivnost	17
4.2.	Linearnost	18
4.3.	Osjetljivost.....	22
4.4.	Preciznost.....	23
4.5.	Istinitost	25
4.6.	Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK)	25
4.7.	Radno područje.....	25
4.8.	Stabilnost	25
4.9.	Robusnost	29
5.	ZAKLJUČAK	31
6.	LITERATURA	32
7.	ŽIVOTOPIS	33

1. UVOD

Validacija analitičke metode važan je dio kemijske analize. Analitičke metode se validiraju kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Važnost postizanja kvalitetnog i vjerodostojnog rezultata velika je i stoga je potrebno razvijati nove metode, poboljšavati već postojeće te ispitivati kvalitetu dobivenih rezultata. Rezultati kemijske analize iznimno su važni za proizvodnju, ljudsko zdravlje i okoliš.

Sve veći problem u okolišu predstavljaju tzv. *nova zagađivala* od kojih su bitna skupina farmaceutici. To je široka skupina spojeva proizvedenih u svrhu liječenja, prevencije i ublažavanja simptoma bolesti, kako kod ljudi, tako i kod životinja. U tu skupinu spadaju farmaceutski aktivne tvari koje se upotrebljavaju u medicini, sredstva za osobnu higijenu te sredstva koja se upotrebljavaju u kućanstvu sa svrhom poboljšanja kvalitete svakodnevnog života. Iako su prisutni u niskim koncentracijama, kontinuirano ispuštanje farmaceutika u okoliš može rezultirati većim koncentracijama te dugoročnim i nepoželjnim utjecajima na vodeni i kopneni ekosustav. Uzimajući to u obzir, potrebno je razvijati analitičke metode koje mogu dati brze i kvalitetne rezultate u svrhu kontrole i pravilnog zbrinjavanja farmaceutika u korist zdravlja i okoliša.

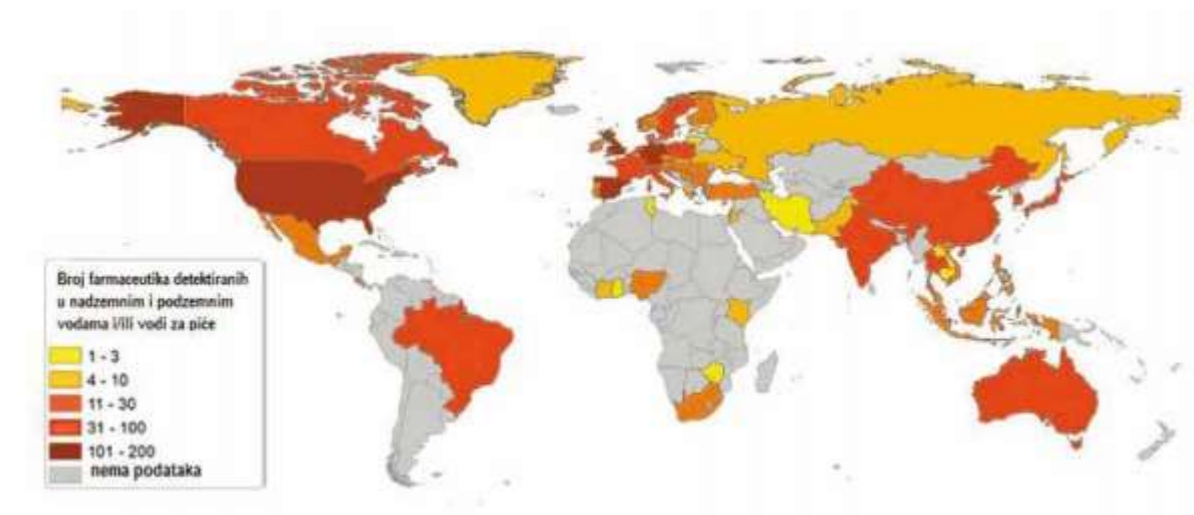
Cilj ovog rada je upoznati se sa spektrofotometrijskom metodom za određivanje ciprofloksacina putem validacije kao neophodnog koraka u razvoju svake analitičke metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Farmaceutici u okolišu

Farmaceutici su u okolišu prisutni već nekoliko desetljeća, no tek se posljednjih godina počela pridavati posebna pozornost njihovom ispitivanju. Iako su koncentracije niske, raste zabrinutost zbog mogućeg lošeg utjecaja na živi svijet uslijed dugoročne izloženosti ovim spojevima. Farmaceutici u okoliš dospijevaju putem izlučevina, ispuštanjem otpadnih voda, nepropisnim odlaganjem neiskorištenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja te upotrebom u akvakulturi, čime izravno odlaze u vodu. Njihova koncentracija u okolišu ovisi o njihovoj potražnji, potrošnji te ponašanju u okolišu [1].

Farmaceutici se koriste u humanoj i veterinarskoj medicini za prevenciju i liječenje raznih mikrobnih infekcija, a primjenu pronalaze i kao promotori rasta u uzgoju životinja. Način uporabe farmaceutika različit je u različitim državama, pa tako uporaba određenog farmaceutika može biti zabranjena u jednoj, a naveliko proširena u drugoj državi. Uporaba (izražena kao DDD (eng. *defined daily dose*) po danu i glavi stanovnika) se kreće od 8,6 do 36 u Europi. Procijenjena [2] godišnja svjetska potrošnja farmaceutika iznosi između 100 000 i 200 000 tona [3]. Koncentracije farmaceutika u podzemnim i površinskim vodama reda su veličine ng L^{-1} , dok otpadne vode i izlazne struje postrojenja za obradu otpadnih voda bilježe koncentracije reda veličine $\mu\text{g L}^{-1}$ [1].



Slika 1. Broj farmaceutika detektiranih u nadzemnim, podzemnim i vodama za piće [4]

Neki od izvora farmaceutika u okolišu su farmaceutska industrija, komunalni sustavi, bolnice, farme, a kao najveći izvor ističu se postrojenja za obradu otpadnih voda, a učinkovitost njihova uklanjanja ovisi o samom procesu obrade. Neučinkovito uklanjanje u postrojenjima rezultira ispuštanjem farmaceutika u okoliš putem vodenih tokova kao i putem aktivnog mulja [1].

Nakon dolaska u okoliš, koncentracija određenog farmaceutika ovisi o njegovoj biogeokemijskoj reaktivnosti te sklonosti biotičkim ili abiotičkim procesima razgradnje [4]. Procesom razgradnje smanjuje se koncentracija početne molekule farmaceutika i nastaju novi spojevi, tzv. razgradni i transformacijski produkti. Razgradni produkti nastaju cijepanjem početne molekule i imaju različitu molekulsku masu, dok transformacijski produkti nastaju promjenom strukture početne molekule, pri čemu se molekulska masa ne mijenja. Novonastali produkti mogu imati različita fizikalno-kemijska svojstva od početne molekule, a postoje i slučajevi kada promjenom strukture nastaju mnogo štetniji oblici za ljude i okoliš [1].

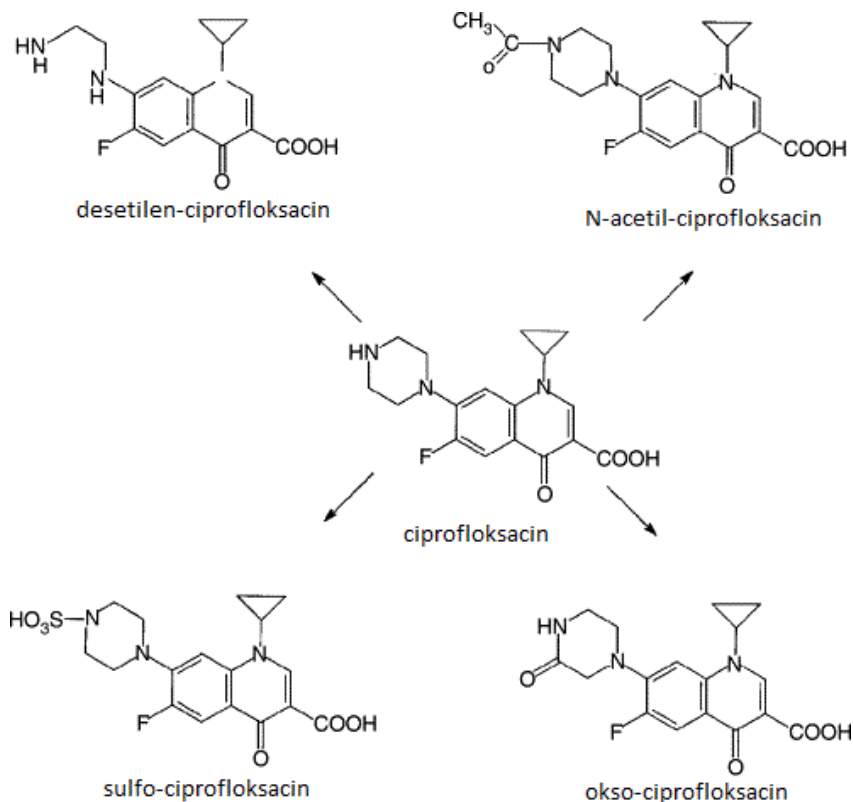
Veliki problem prilikom identifikacije i kvantifikacije farmaceutika u uzorcima iz okoliša predstavljaju njihove vrlo niske koncentracije. Za određivanje farmaceutika u okolišu primjenjuju se uglavnom plinska i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography* HPLC) vezane sa spektrometrijom masa (eng. *mass spectrometry*, MS). Primjena plinske kromatografije ograničena je zbog fizikalno-kemijskih svojstava farmaceutika kao što su polarnost, nehlapljivost i nestabilnost pri visokim temperaturama. Naprotiv, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti pokazala se kao dobra tehnika za određivanje polarnih i termički nestabilnih farmaceutika. Posljednjih godina HPLC-MS metode postupno zamjenjuju analitičke metode koje koriste detektor s nizom dioda i fluorescentni detektor. Zbog ograničene primjene navedenih detektora, spektrometar masa sve se više upotrebljava za identifikaciju i kvantifikaciju farmaceutika u uzorcima iz okoliša. HPLC-MS metode omogućavaju određivanje analita uz niže granice detekcije i kvantifikacije te omogućuju određivanje molekulske mase farmaceutika i strukture nepoznatih spojeva [1].

2.1.1. Ciprofloksacin

Ciprofloksacin je antibiotik koji spada u skupinu fluorokinolona. Patentiran je 1983. godine u Bayerovom laboratoriju, a njegova je uporaba odobrena 1987. godine od strane USFDA (eng. *United States Food and Drug Administration*). Koristi se za liječenje

brojnih bakterijskih infekcija poput infekcija mokraćnih puteva, infekcija zglobova, kostiju i kože, spolno prenosivih bolesti, infekcija donjih dišnih puteva i dr. Ciprofloksacin je prikladan u liječenju pacijenata s predisponirajućim čimbenicima za Gram-negativne infekcije [5].

Ciprofloksacin metabolizira u jetri modifikacijom piperazinske skupine pri čemu mogu nastati četiri aktivna metabolita – desetilen-ciprofloksacin, sulfo-ciprofloksacin, okso-ciprofloksacin te N-acetilciprofloksacin (slika 2.). Okso-ciprofloksacin glavni je urinarni, a sulfo-ciprofloksacin primarni fekalni metabolit [6]. Ciprofloksacin relativno lako prodire u središnji živčani sustav, a njegov poluživot traje 4-6 sati. 50-70% administrirane doze izlučuje se u urinu kao nemetabolizirani lijek. Dodatnih 10% izlučuje se u urinu u obliku metabolita, a otprilike 25% izlučuje se u fecesu. Izlučivanje mokraćom gotovo je 24 sata nakon primjene lijeka [7].



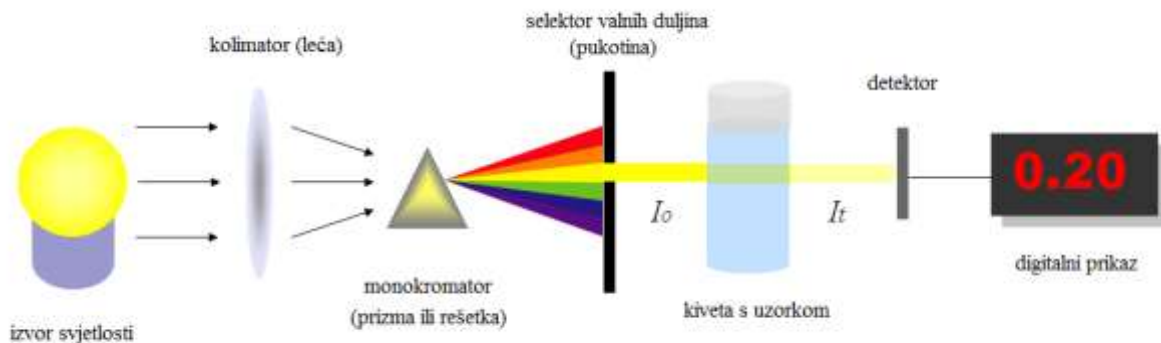
Slika 2. Metabolizam ciprofloksacina [6]

Ciprofloksacin je 1-ciklopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-okso-7-(1-piperazini)-3-kinolonkarboksilna kiselina. Pospješuje replikaciju DNA inhibirajući DNA topozomerazu i DNA girazu te potiče razdiobu stanica. Inhibira aktivne i rastuće mikroorganizme i stoga predstavlja veliki rizik u okolišu [5]. U okoliš uglavnom

dospijeva kao sastavni dio urina, izmeta ili gnoja. Veže se za gornji sloj tla, čime je smanjena opasnost od onečišćenja površinskih i podzemnih voda. Međutim, snažna sorpcija ciprofloksacina na tlo i sediment odgađa njegovu biorazgradnju i prolongira biološku aktivnost [8].

2.2. UV/VIS spektrometrija [9]

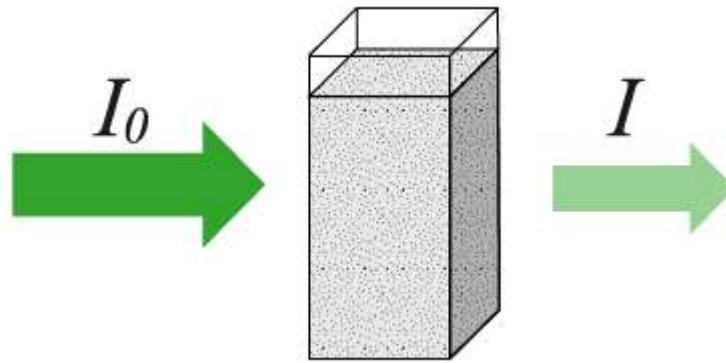
UV/VIS spektrofotometrija je analitička metoda koja se temelji na interakciji tvari i svjetlosti u ultraljubičastom i vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Tehnika mjerenja zasniva se na količini svjetlosti koju nepoznati uzorak apsorbira. Ovisno o uzorku, dio se svjetlosti apsorbira, a dio reflektira. UV/VIS spektrofotometrija uglavnom se koristi za ispitivanje organskih molekula, anorganskih iona ili otopina kompleksa. Dobiveni UV/VIS spektri vrlo su korisni pri kvantitativnim ispitivanjima određenih uzoraka, a mjerenjem apsorbancije pri određenoj valnoj duljini može se dobiti podatak o koncentraciji analita u otopini. Mjerenja u UV/VIS spektrofotometriji provode se pomoću uređaja spektrofotometra koji mjeri intenzitet svjetlosti koja prođe kroz uzorak u kiveti i uspoređuje ga s intenzitetom svjetla prije prolaska kroz uzorak. Glavne dijelove UV/VIS spektrofotometra čine izvor svjetlosti, monokromator (uređaj koji propušta samo određenu valnu duljinu) i detektor (slika 3.).



Slika 3. Osnovni dijelovi spektrofotometra [10]

Izvor svjetlosti šalje zraku svjetlosti do kivete s uzorkom, pri čemu monokromator propušta zračenje određene valne duljine. Dio svjetlosti se apsorbira u uzorku, a dio propušta (slika 4.) do detektora koji se sastoji od fotootpornika koji služi kao senzor i šalje električni signal proporcionalan intenzitetu svjetlosti. Signal se pojačava pojačalom i preračunava u apsorbanciju. Dio svjetlosti kojeg detektira detektor zove se

intenzitet transmitirane svjetlosti, I . Vrijednost intenziteta transmitirane svjetlosti manja je od intenziteta upadnog zračenja, I_0 , jer se dio svjetlosti apsorbira u uzorku.



Slika 4. Smanjenje intenziteta svjetlosti zbog apsorpcije

Omjer dviju vrijednosti intenziteta I/I_0 definira se kao transmitancija T , a mjerna jedinica je %.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Bitan podatak predstavlja i apsorbancija A , koja je definirana kao negativan logaritam transmitancije i izravno je proporcionalna koncentraciji analita u otopini

$$A = -\log(T) \quad (2)$$

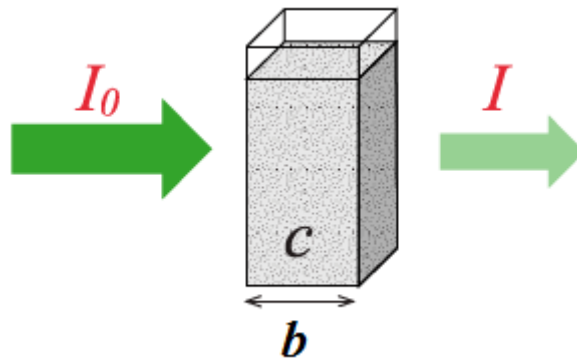
2.2.1. Beerov zakon [9]

Prilikom prolaska kroz kivetu s uzorkom, intenzitet svjetlosti se smanjuje proporcionalno s koncentracijom analita u uzorku i duljinom puta svjetlosti (kivete). Funkcijska ovisnost eksperimentalno određene fizikalne veličine, apsorbancije A i fizikalne veličine koja se određuje računski, koncentracije c opisana je Beerovim zakonom koji glasi:

$$A = -\log(I_0/I) = abc = \epsilon bc \quad (3)$$

gdje je A apsorbancija pri danoj valnoj duljini, a je konstanta proporcionalnosti koju nazivamo apsorpcijski koeficijent, b je duljina puta svjetlosti kroz uzorak, a c koncentracija analita u uzorku (slika 5.). Apсорbancija je bezdimenzijska veličina dok

apsorpcijski koeficijent poprima mjernu jedinicu ovisno o jedinicama u kojima su izraženi koncentracija i duljina puta. Ako duljinu puta izrazimo u cm, a koncentraciju analita u otopini u mol L⁻¹, apsorpcijski koeficijent nazivamo molarni apsorpcijski koeficijent s oznakom ϵ i mjernim jedinicama L mol⁻¹ cm⁻¹. Uz pomoć Beerovog zakona može se analitički odrediti nepoznata koncentracija ispitivanog uzorka mjerenjem njegove apsorbancije.



Slika 5. Beerov zakon

Beerov zakon vrijedi samo za otopine s niskim koncentracijama i za monokromatska svjetla jer promjenom koncentracije dolazi do promjene molekulskog stanja otopljene tvari što uzrokuje odstupanja jer se mijenja vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta.

2.3. Validacija

Validacija je postupak kojim je moguće potvrditi je li neka analitička metoda u određenim uvjetima primjenjiva ili ne. Ukoliko se želi postići relevantnost podataka, metoda se mora prethodno validirati. Validirane metode će osigurati pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Validacija mora obuhvatiti sve bitne podatke o analitičkom procesu određivanja, tako da se metoda kao takva može primjenjivati na svim mjestima gdje za to postoji razlog. Različito se pristupa validaciji kvalitativnih i kvantitativnih metoda – pristup ovisi o tome je li analit u uzorku prisutan kao makrokomponenta ili je prisutan u tragovima u kompleksnoj matrici. Svakoј metodi pristupa se individualno i procjenjuje se što treba napraviti za dokaz njezine svrhovitosti. I struka i regulativa i zakonodavstvo prihvatili su devet ključnih parametara, tj. izvedbenih značajki validacije:

- specifičnost/selektivnost
- linearnost

- preciznost
- istinitost
- točnost
- granice detekcije i kvantifikacije
- radno područje
- robusnost

Za oblikovanje plana validacije metode potrebno je navedene parametre kombinirati. Ovisno o zahtjevima metode, odabiru se različiti parametri te nije nužno uzimati u obzir sve parametre validacije tijekom provedbe validacije [11], [12].

2.3.1. Specifičnost/selektivnost

Specifičnost/selektivnost metode definira se kao sposobnost metode da točno i specifično odredi ispitivani analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod određenim uvjetima ispitivanja [13]. Potrebno je dokazati da na analitičku metodu ne utječe prisutnost nečistoća, produkata razgradnje te komponenata u matrici uzorka. Iako se često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost su dva različita svojstva – specifična metoda je ona kojom se određuje samo jedan specifični analit, a selektivnom metodom moguće je određivati više komponenata istodobno, pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj. U praksi se selektivnost dokazuje usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku [11]. Nije uvijek moguće dokazati da je analitička metoda specifična za određeni analit i stoga je potrebno kombinirati dva ili više analitičkih postupaka da bi se postigla tražena razina diskriminacije [14].

2.3.2. Linearnost

Linearnost metode predstavlja mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita. U praksi se određuje mjerenjem odziva metode na poznate koncentracije referentnog materijala, a procjenjuje se i matematički i grafički. Matematički se procjenjuje preko linearne regresije izražavanjem jednadžbe pravca ($y = ax + b$) i izračunavanjem koeficijenta korelacije (R) ili, češće, koeficijenta determinacije (R^2). Za koeficijent determinacije uobičajeno se postavlja kriterij $R^2 \geq 0,99$. Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora [11]. Ukoliko postoji linearna ovisnost između signala i koncentracije analita, potrebno je rezultate ispitati

prikladnim statističkim metodama, npr. računanje regresijske linije metodom najmanjih kvadrata. Računanje standardnog odstupanja rezultata od regresijske linije također pomaže pri određivanju linearnosti [14].

2.3.3. Preciznost

Preciznost rezultata mjerenja označava bliskost slaganja između niza mjerenja dobivenih analizom više homogenih uzoraka pri danim uvjetima. Izražava se statističkim parametrima kojima se opisuje raspršenost podataka, a to su standardno odstupanje i relativno standardno odstupanje te koeficijent varijacije ili varijanica. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje, razlikujemo:

- preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost pri čemu uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu i kratko razdoblje
- međupreciznost definiranu kao preciznost ostvarenu unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, različita aparatura)
- preciznost pod uvjetima obnovljivosti ili obnovljivost pri čemu uvjeti uključuju različite laboratorije, a određuje se sa svrhom normiranja metode

Ispitivanjem preciznosti kvantificiraju se slučajne pogreške metode. Preciznost ovisi o koncentraciji analita u uzorku i stoga se mora ispitivati pri određenom broju različitih koncentracija unutar radnog područja. Broj ponavljanja treba zadovoljiti zahtjeve statistike. Najčešće se rade tri ponavljanja pri nekoliko koncentracija. U slučaju da rezultati ne zadovoljavaju postavljene kriterije potrebno je otkriti najvažniji izvor pogreške i nastojati ga ukloniti. Kriteriji prihvatljivosti ovise o vrsti analize, koncentraciji analita i matrici uzorka [11].

2.3.4. Istinitost

Istinitost rezultata mjerenja definirana je kao stupanj podudaranja izmjerene vrijednosti od srednje vrijednosti dobivene ponovljenim mjerenjima.

Numerički pokazatelj istinitosti je eksperimentalno određeno sustavno odstupanje metode koje se dobiva kao razlika ili odnos aritmetičke sredina rezultata i referentne vrijednosti. Istinitost metode moguće je procijeniti na sljedeće načine:

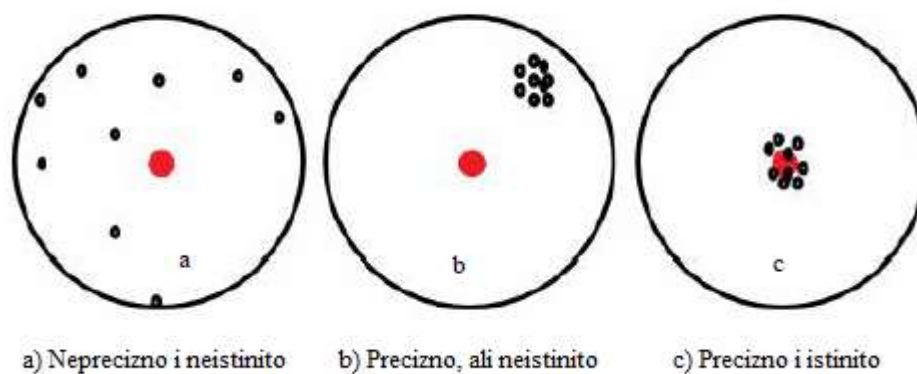
- usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim referentnom metodom

- analizom uzorka poznate koncentracije i usporedbom izmjerenih rezultata s certificiranom vrijednosti
- cijepljenjem matrice ili uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala [11]

2.3.5. Točnost

Točnost rezultata mjerenja definirana je kao bliskost slaganja rezultata dobivenih ispitivanjem uzorka s pravom vrijednošću. Validacijom se nastoji istražiti točnost rezultata ispitivanjem utjecaja sustavnih i slučajnih učinaka na pojedinačne rezultate. Točnost se, stoga, proučava kroz dvije komponente: istinitost i preciznost [12].

Na slici 6. prikazan je međusobni odnos preciznosti i istinitosti.



Slika 6. Prikaz preciznosti i istinitosti [11]

2.3.6. Granice detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije/kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati/kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuje se razrjeđivanjem početne otopine, a rezultati se mogu procijeniti vizualno, pomoću omjera signal/šum te statistički. Vizualnom procjenom se procjenjuje najmanji signal koji se nedvojbeno može prepoznati. Prihvatljivi omjeri signal/šum su 1:3 za granicu detekcije i 1:10 za granicu kvantifikacije. Statističko određivanje uključuje računanje standardnog odstupanja signala i nagiba. Granica detekcije i granica kvantifikacije određuju se prema sljedećim jednadžbama:

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

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

gdje je s procjena standardnog odstupanja, a a nagib očitao iz jednadžbe pravca.

Procjena standardnog odstupanja računa se pomoću jednadžbe:

$$s = \frac{s'}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

gdje je s' standardno odstupanje n ponovljenih mjerenja.

Parametar granice kvantifikacije važan je kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima koji i u vrlo niskim koncentracijama pokazuju štetno djelovanje na zdravlje ljudi i okoliš [11].

2.3.7. Radno područje

Radno područje metode je raspon između donje i gornje koncentracijske granice analita u uzorku unutar kojeg metoda daje rezultate s odgovarajućom preciznosti, istinitosti i linearnosti [11]. Donja koncentracijska granica predstavlja granicu kvantifikacije. Gornja koncentracijska granica definirana je koncentracijama pri kojima nisu prisutna značajna odstupanja od željenih vrijednosti [12]. Sužavanjem radnog područja na koncentracijski raspon uzoraka postiže se bolja točnost metode [11].

2.3.8. Robusnost

Robusnost metode definirana je kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, nenamjerne promjene radnih uvjeta. Pruža informaciju o pouzdanosti metode tijekom njezine uporabe [12]. Ispitivanjem robusnosti otkrivaju se optimalni uvjeti rada metode i parametri koje je potrebno nadzirati. Tijekom eksperimenta mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati se kvantitativna promjena rezultata. Ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode. Ukoliko promjena radnog uvjeta znatno utječe na rezultat, potrebno je kontrolirati ga kroz cijeli eksperiment. Prema dobivenim podacima potrebno je postaviti parametre za ispitivanje prikladnosti sustava. Tipičan parametar ispitivanja robusnosti metode je stabilnost [11].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije i proizvođači kemikalija korišteni tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela navedeni su u Tablici 1.

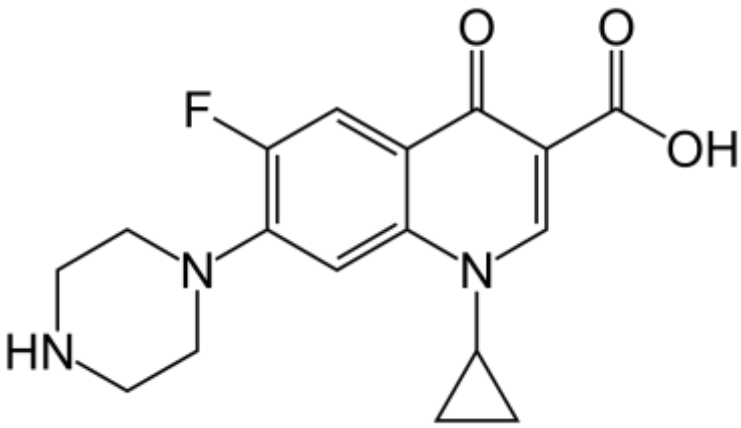
Tablica 1. Popis kemikalija i njihove karakteristike

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	C ₂ H ₃ N	HPLC	Fisher Chemical, SAD
Millipore voda	H ₂ O	p.a.	Merck Millipore S.A.S., Francuska

3.1.2. Ciprofloksacin

Fizikalno-kemijska svojstva ispitivanog farmaceutika ciprofloksacina (Fluka Analytical, Švicarska) navedena su u Tablici 2.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva ciprofloksacina

Generičko ime	Ciprofloksacin
Ime po IUPAC-u	1-ciklopropil-6-fluoro-4-okso-7-piperazin-1-kinolinil-3-karboksilna kiselina
Grupa farmaceutika	Antibiotici
Klasa antibiotika	Fluorokinoloni
Molekulska formula	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃
Strukturna formula	
Molarna masa	331,34 g/mol
CAS broj	85721-33-1
Čistoća	HPLC

Temperatura vrelišta	255-257°C
Topljivost u vodi	1,35 mg/mL (DrugBank);1,61mg/mL (Chemicalize)
pK_a (bazični)	5,56
pK_a (kisel)	8,77

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga osjetljiv je i skup instrument za precizno određivanje mase tvari. O ispravnosti i preciznosti analitičke vage ovisi točnost rezultata provedene analize. Zbog svoje osjetljivosti, analitička vaga mora biti zaštićena staklenim pokrovom ili kućištem kako bi se spriječio utjecaj prašine i zračnih strujanja.

Za vaganje ciprofloksacina korištena je analitička vaga XS204 Delta Range proizvođača Mettler Toledo (Švicarska) (slika 7.).



Slika 7. Analitička vaga XS204 Delta Range, Mettler Toledo

3.2.2. UV/VIS spektrofotometar

UV/VIS spektrofotometar je uređaj kojim se mjeri spektar i količina svjetlosti koju određeni uzorak može apsorbirati u vidljivom ili UV dijelu spektra. Zraka svjetlosti propušta se kroz uzorak u kiveti te se mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz ispitivani uzorak i uspoređuje se s intenzitetom ulazne zrake svjetlosti. Intenzitet apsorbiranog zračenja u uzorku direktno je proporcionalan koncentraciji tvari koja se određuje.

Uzorak treba biti pripremljen u obliku otopine i prije mjerenja potrebno je umjeriti instrument pomoću slijepe probe. Slijepa proba sadrži sve sastojke ispitivanog uzorka osim analita.

Za mjerenje apsorbancije ciprofloksacina i snimanje spektra korišten je spektrofotometar Lambda 35 proizvođača PerkinElmer (SAD) (slika 8.).



Slika 8. Spektrofotometar PerkinElmer Lambda 35

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema temeljne standardne otopine ciprofloksacina

Temeljna standardna otopina ciprofloksacina masene koncentracije $\gamma=50$ mg/L pripremljena je vaganjem 5 mg standarda ciprofloksacina na analitičkoj vagi. Odvaga standarda premještena je u odmjernu tikvicu od 250 mL u koju je dodan 1 mL

acetonitrila i Millipore voda do oznake. Pripremljena otopina stavljena je u ultrazvučnu kupelj 120 min da bi se osiguralo potpuno otapanje ciprofloksacina.

3.3.2. Priprema otopina ciprofloksacina za određivanje linearnosti

Za određivanje linearnosti pripremljeno je 14 otopina iz prethodno pripravljene temeljne standardne otopine u rasponu koncentracija 0,05-50 mg/L (0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L, 1 mg/L, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L i 50 mg/L). Ovisno o željenoj koncentraciji pojedine otopine, u odmjernu tikvicu dodan je određeni volumen temeljne standardne otopine i Millipore voda do oznake (Tablica 3.). Za provjeru linearnosti, za svaku pripremljenu otopinu 3 puta je ponovljeno mjerenje apsorbancije (ukupno 42 mjerenja) pri valnoj duljini od 270 nm.

Tablica 3. Priprema otopina za određivanje linearnosti

Koncentracija TSO (mg/L)	Faktor razrjeđenja	Koncentracija otopine (mg/L)	Volumen TSO (mL)	Volumen tikvice (mL)
50	1000	0,05	0,1	100
	500	0,1	0,2	100
	200	0,25	0,5	100
	25	0,5	1	100
	66,67	0,75	1,5	100
	50	1	2	100
	20	2,5	5	100
	10	5	10	100
	6,67	7,5	15	100
	5	10	20	100
	2,5	20	4	10
	1,67	30	6	10
	1,25	40	8	10
	1	50	250	250

3.3.3. Priprema otopina ciprofloksacina za određivanje preciznosti

Za određivanje preciznosti pripremljene su otopine četiriju koncentracija unutar radnog područja (0,2 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L i 30 mg/L).

a) Ponovljivost

Za određivanje ponovljivosti pripremljeno je 9 otopina svake koncentracije (ukupno 36 otopina). Za svaku je otopinu izmjerena apsorbancija (36 mjerenja).

b) Međupreciznost

Za određivanje međupreciznosti korišten je isti postupak kao i za određivanje ponovljivosti pri čemu je postupak ponovljen i za naredna dva dana. Time su dobivena tri seta rezultata. Za svaku pojedinu koncentraciju uzete su izmjerene vrijednosti apsorbancije i uspoređene za svaki pojedini dan.

3.3.4. Određivanje stabilnosti otopine ciprofloksacina

Za određivanje stabilnosti otopine ciprofloksacina pripremljene su 4 otopine masenih koncentracija 0,2 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L i 30 mg/L dodavanjem određenog volumena temeljne standardne otopine (0,2 mL, 1 mL, 10 mL i 30 mL) u odmjerne tikvice od 50 mL. Stabilnost je praćena u periodu od 15 dana, pri čemu je napravljeno 8 mjerenja (0., 1., 2., 4., 6., 8., 12. i 15. dan). Mjerenja su provedena koristeći dvije odmjerne tikvice zbog nedostatka količine uzorka (druga se odnosi na 6., 8., 12. i 15. dan). Zabilježene su vrijednosti apsorbancija pojedinih otopina. Uzorci su čuvani u hladnjaku pri 4 °C tijekom vremenskog perioda praćenja stabilnosti.

3.3.5. Određivanje robusnosti

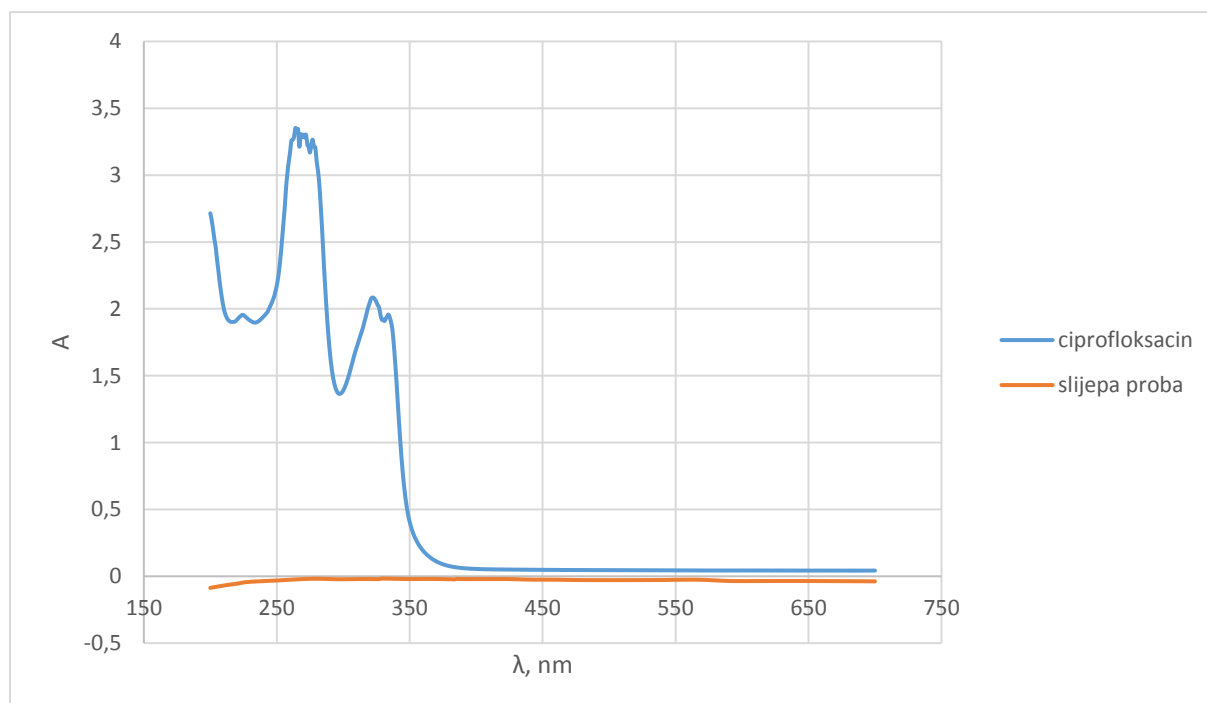
Za određivanje robusnosti pripremljena je temeljna standardna otopina ciprofloksacina otapanjem odvage standarda od 12,5 mg u tikvici od 250 mL da bi se dobila otopina masene koncentracije 50 mg/L. U tikvicu je dodana odvaga, 1 mL acetonitrila i Millipore voda do oznake. Određena je linearnost otopine pri valnoj duljini od 264 nm pripremom 14 otopina istim postupkom kao i pri valnoj duljini od 270 nm. Određena je i ponovljivost praćenjem otopina masenih koncentracija 0,2 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L i 30 mg/L istim postupkom kao i pri valnoj duljini od 270 nm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovim istraživanjem ispitani su svi parametri validacije metode za određivanje ciprofloksacina: specifičnost/selektivnost, linearnost, radno područje, osjetljivost, preciznost (ponovljivost i međupreciznost), stabilnost, istinitost (točnost), granica kvantifikacije i granica detekcije te robusnost. U skladu sa dobrom laboratorijskom praksom, navedeni parametri trebaju zadovoljavati postavljene kriterije prihvatljivosti.

4.1. Specifičnost / selektivnost

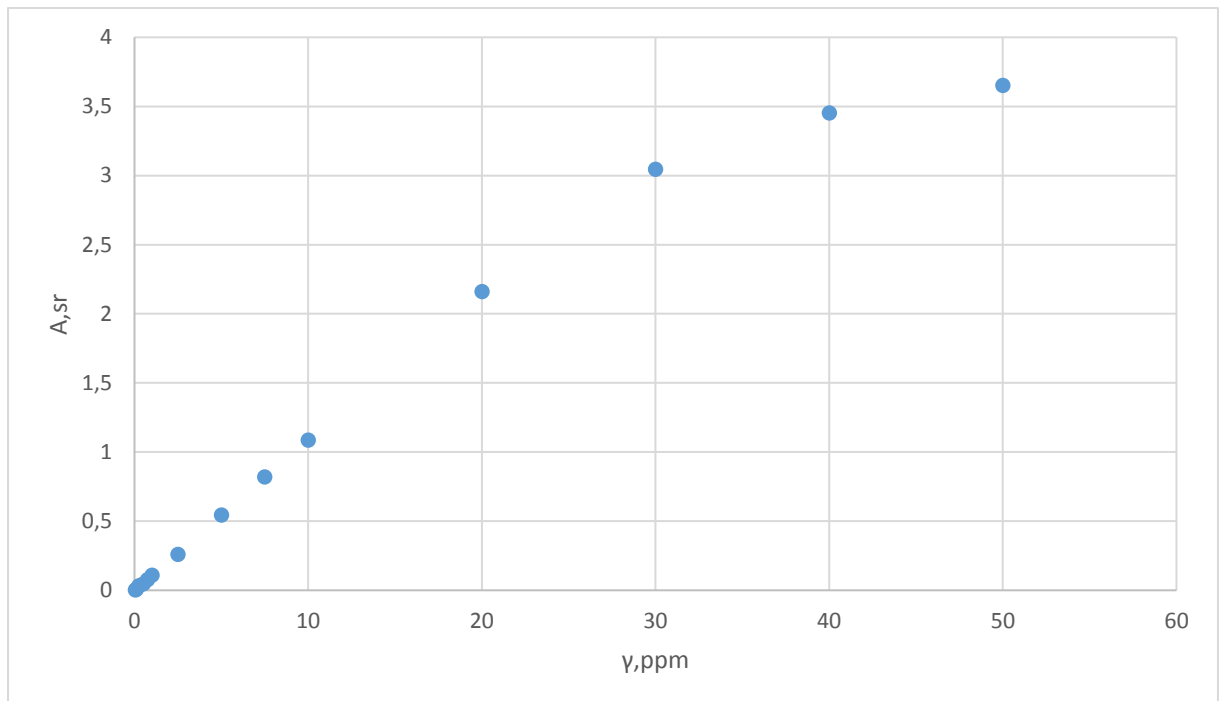
Specifičnost se definira kao sposobnost metode da razlikuje jedan analit od ostalih komponenata prisutnih u uzorku, dok se selektivnost definira kao mogućnost metode da može točno odrediti željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata. Dokazana je usporedbom UV/VIS spektra slijepe probe i standardne otopine ciprofloksacina koncentracije 50 mg/L. Spektar je snimljen u rasponu valnih duljina od 200 do 700 nm. Apsorpcijski maksimum ciprofloksacina nalazi se pri $\lambda_{\max}=264,11$ nm. Daljnja su mjerenja provedena pri valnoj duljini $\lambda=270$ nm. Budući da ne dolazi do preklapanja dvaju spektara blizu apsorpcijskog maksimuma (slika 9.), zaključuje se da Millipore voda ne sadrži tvari koje ometaju određivanje ciprofloksacina.



Slika 9. Usporedba UV/VIS spektara standarda ciprofloksacina i slijepe probe

4.2. Linearnost

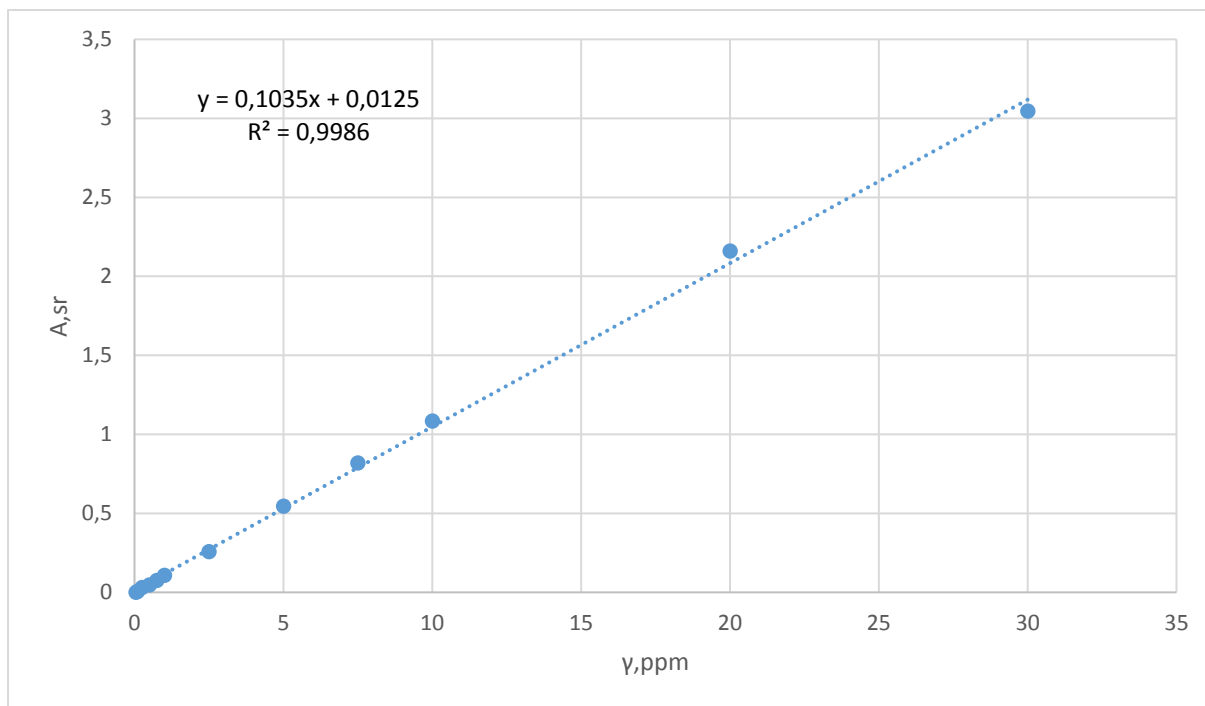
Linearnost se definira kao mogućnost metode da unutar određenog koncentracijskog područja daje odzive proporcionalne koncentraciji analita prisutnog u uzorku. Određuje se izradom umjernog pravca. Pripremom i analizom 14 standardnih otopina ciprofloksacina dobiveno je 14 umjernih točaka pomoću kojih je izrađen umjerni pravac koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji analita. Linearnost je ispitana u rasponu koncentracija od 0,05 mg/L do 50 mg/L, izmjerena je apsorbancija za svaku koncentraciju i dobiveni rezultati prikazani su grafički (slika 10.).



Slika 10. Grafički prikaz dobivenih rezultata

Iz dobivenog grafa vidljivo je da ovisnost koncentracije o apsorbanciji nije linearna u području viših koncentracija, što je u skladu s odstupanjima od Beerovog zakona. Visoke koncentracije uzrokuju promjenu molarnog apsorpcijskog koeficijenta. Odstupanja zbog visoke koncentracije posljedica su interakcije između vrsta koje apsorbiraju u smjesi i promjene indeksa loma, a uzrok odstupanja može biti i prisutstvo drugih nepoželjnih zračenja.

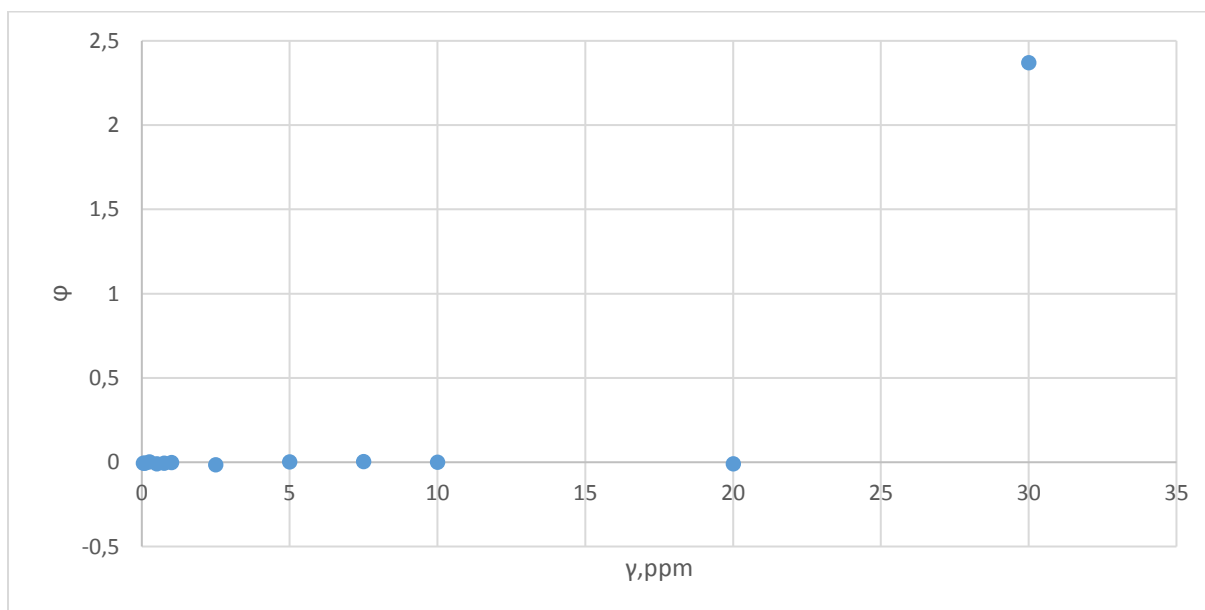
Stoga je pripremljen novi graf u kojem su odbačene točke koje odstupaju od linearnosti (slika 11.).



Slika 11. Umjerni pravac za raspon koncentracija 0,05 – 30 mg/L

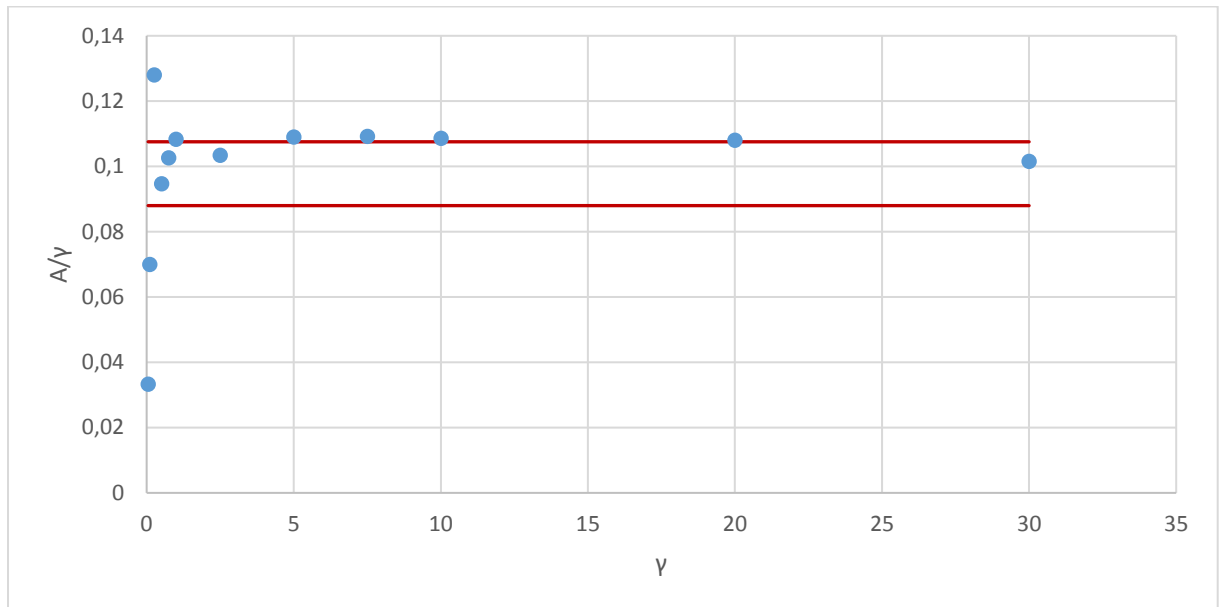
Određena je jednačba pravca i izračunat koeficijent determinacije koji iznosi $R^2=0,9986$ čija vrijednost zadovoljava kriterij $R^2 \geq 0,995$. Koeficijent determinacije govori o reprezentativnosti regresije i što je njegova vrijednost bliža 1, model je reprezentativniji.

Kako bi se dodatno potvrdila linearnost pripremljeni su graf apsolutnih odstupanja (slika 12.) i graf konstantnog odziva (slika 13.).



Slika 12. Graf apsolutne pogreške za raspon koncentracija 0,05 – 30 mg/L

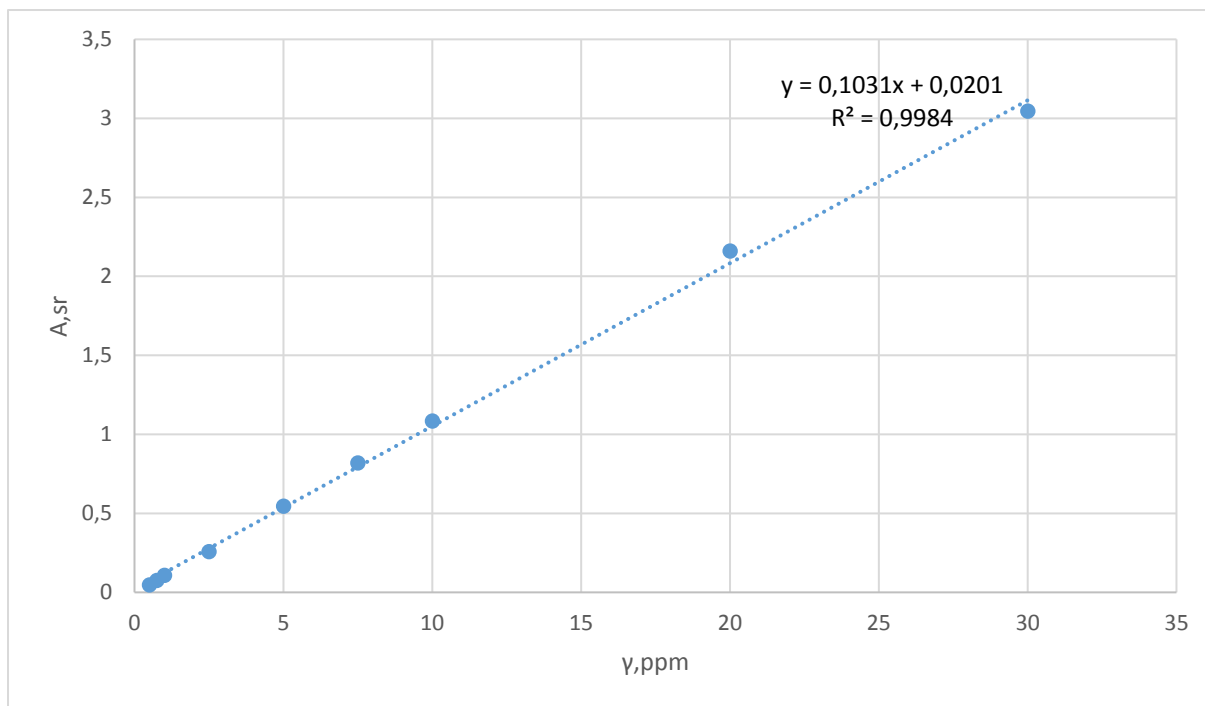
Iz grafa na slici 12. vidi se da su odstupanja slučajno raspoređena oko nule čime je potvrđena linearnost u rasponu koncentracija 0,05 – 30 mg/L.



Slika 13. Graf konstantnog odziva za raspon koncentracija 0,05 – 30 mg/L

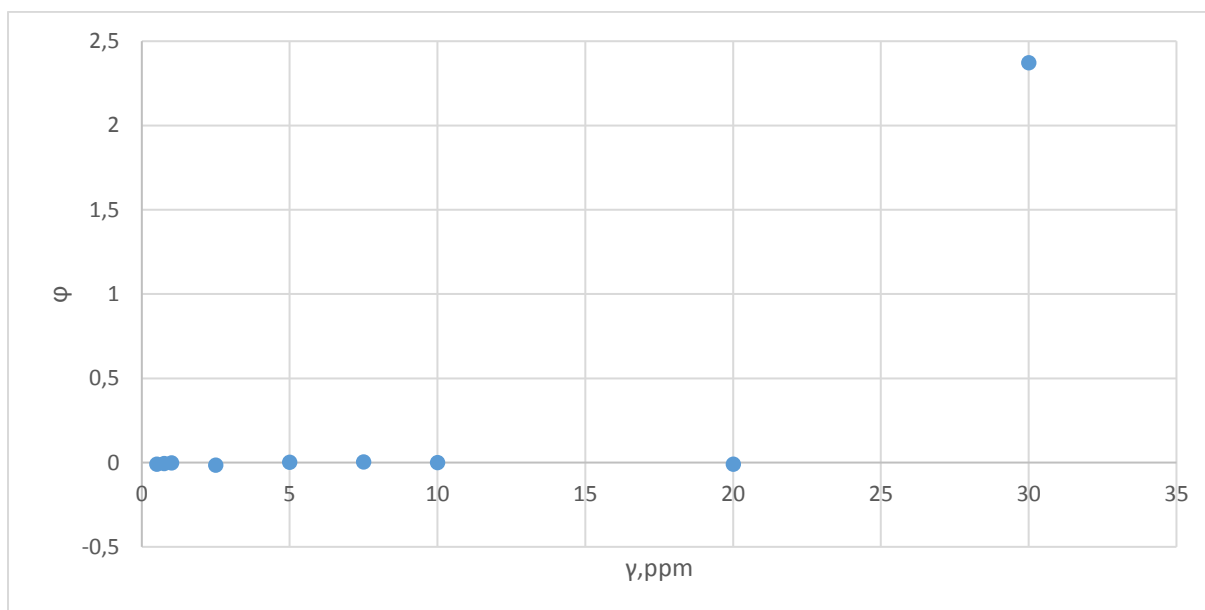
Graf na slici 13. prikazuje ovisnost omjera apsorbancije i koncentracije (A/γ) o koncentraciji analita s naznačenim granicama $\pm 10\%$ srednje vrijednosti A/γ . Vidljivo je da niske koncentracije nisu unutar zadanih granica i može se zaključiti da odstupaju od linearnosti.

Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da se linearno područje metode nalazi u rasponu koncentracija od 0,5 mg/L do 30 mg/L te je pripremljen graf za to područje koncentracija (slika 14.).

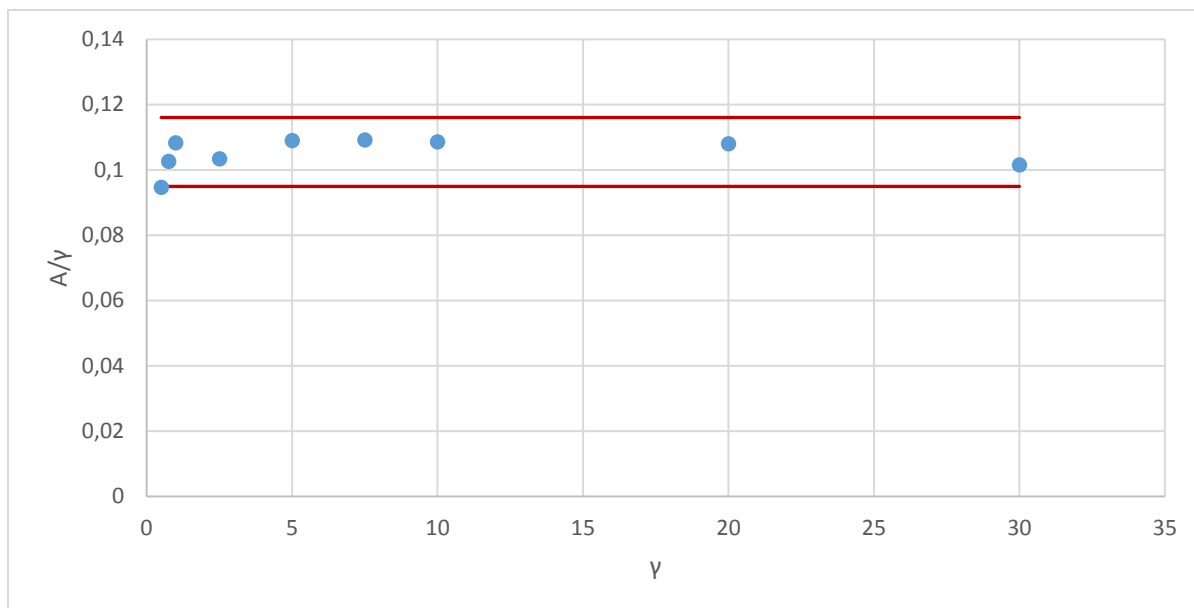


Slika 14. Umjerni pravac za područje koncentracija 0,5 – 30 mg/L

Dobivena jednadžba pravca glasi $y=0,1031x+0,0201$, a koeficijent determinacije iznosi $R^2=0,9984$.



Slika 15. Graf apsolutnog odstupanja za raspon koncentracija 0,5 – 30 mg/L



Slika 16. Graf konstantnog odziva za raspon koncentracija 0,5 – 30 mg/L

Iako je najniža koncentracija utvrđenog linearnog područja 0,5 mg/L, u radu su provjerene ostale izvedbene karakteristike metode i pri niskoj koncentraciji ciprofloksacina (0,2 mg/L) s obzirom da se zadovoljavajuća linearna ovisnost ostvaruje i za nisko koncentracijsko područje (0,05 – 5 mg/L, $R^2=0,9991$).

4.3. Osjetljivost

Osjetljivost metode jednaka je nagibu umjernog pravca i iznosi 0,10743 koji je prema Beerovom zakonu jednak umnošku apsorpcijskog koeficijenta i debljine kivete. Mjerenja su provedena u kiveti debljine 1 cm iz čega slijedi da je apsorpcijski koeficijent jednak nagibu umjernog pravca, izražen u jedinicama $L \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Molarni apsorpcijski koeficijent je specifičan oblik apsorpcijskog koeficijenta kada je koncentracija izražena u mol/L i koji govori o vjerojatnosti elektronskog prijelaza. Dobiva se množenjem apsorpcijskog koeficijenta s molarnom masom analita izraženom u g/mol:

$$\varepsilon = a \cdot M \cdot 1000 \quad (7)$$

te iznosi $35595,86 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.4. Preciznost

Preciznost metode se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pri definiranim uvjetima. Provjerena je preko ponovljivosti i međupreciznosti. Ispitane su četiri koncentracije analita: 0,2 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L i 30 mg/L. Numerički pokazatelji preciznosti su standardno odstupanje i relativno standardno odstupanje.

a) Ponovljivost

Svaka pripremljena otopina mjerena je 9 puta kroz 3 dana (36 mjerenja svaki dan) te su izračunata odstupanja. Srednja vrijednost rezultata ponovljenih mjerenja, standardna odstupanja (SD) i relativna standardna odstupanja (RSD) prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Rezultati procjene ponovljivosti (1. dan)

γ , mg/L	\bar{A}	SD	RSD (%)
0,2	0,0097	0,0059	61,2
1	0,0854	0,0031	3,6
10	0,9849	0,0298	3,0
30	2,7546	0,0342	1,2

Podaci mjerenja za koncentraciju 0,2 mg/L (1. dan) nisu konzistentni i proveden je Q-test da bi se utvrdilo je li prisutna gruba pogreška, no rezultati su pokazali da sve izmjerene vrijednosti treba uzeti u obzir. Rezultati Q-testa nalaze se u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati Q-testa

A	Q_{min}/Q_{max}	$Q(n=9, \alpha=0,01)$
0,004	0,105	0,598
0,023	0,421	

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 0,2 mg/L iznosi 61,2% te ne zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 1 mg/L iznosi 3,6% te zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 10 mg/L iznosi 3,0% te zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 30 mg/L iznosi 1,2% te zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Rezultati ispitivanja ponovljivosti za koncentracije 1 mg/L, 10 mg/L i 30 mg/L zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti čime je potvrđena ponovljivost rezultata ispitivanja.

b) Međupreciznost

Međupreciznost je određena iz rezultata ponovljenih mjerenja provedenih u tri različita dana. Svaka pripremljena otopina analizirana je 9 puta u svakom danu. Rezultati 1. dana mjerenja prikazani su u Tablici . dok su rezultati ostala dva dana prikazani u Tablicama 6. i 7.

Tablica 6. Rezultati procjene ponovljivosti (2. dan)

γ , mg/L	\bar{A}	SD	RSD (%)
0,2	0,0191	0,0013	6,6
1	0,1006	0,0029	2,9
10	1,0260	0,0126	1,2
30	2,7692	0,0293	2,5

Tablica 7. Rezultati procjene ponovljivosti (3. dan)

γ , mg/L	\bar{A}	SD	RSD (%)
0,2	0,0183	0,0025	13,9
1	0,1024	0,0026	2,5
10	1,0716	0,0293	2,7
30	2,9844	0,0194	0,7

Objedinjeni prikaz rezultata provjere međupreciznosti prikazan je u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati procjene međupreciznosti

γ , mg/L	\bar{A}	SD	RSD (%)
0,2	0,0157	0,0057	36,2
1	0,0961	0,0082	8,6
10	1,0275	0,0435	4,2
30	2,8361	0,1159	4,1

Međupreciznost za koncentraciju 0,2 mg/L iznosi 36,2%, za koncentraciju 1 mg/L 8,6%, za koncentraciju 10 mg/L 4,2% i za koncentraciju 30 mg/L 4,1%. Sve koncentracije osim 0,2 mg/L zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 15\%$.

4.5. Istinitost

Istinitost rezultata ispitivanja ispitana je pri četiri koncentracije (0,2 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L i 30 mg/L) korištenjem podataka dobivenih za mjerenje ponovljivosti. Izražava se kao iskorištenje, odnosno omjer aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti:

$$I = \frac{\gamma_{sr}}{\gamma_{ref}} \cdot 100 \quad (8)$$

Izračunata iskorištenja za svaku pojedinu koncentraciju prikazana su u Tablici 9.

Tablica 9. Istinitost izražena kao iskorištenja

γ_{ref} , mg/L	γ_{sr} , mg/L	I , %
0,2	0,1009	50,45
1	0,6334	63,34
10	9,3579	93,58
30	26,5228	88,41

4.6. Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK)

Granice detekcije i kvantifikacije određene su jednadžbama (4) i (5) i iznose:

$$GD = 1,52 \text{ mg/L}$$

$$GK = 4,60 \text{ mg/L}$$

4.7. Radno područje

Radno područje određeno je iz umjernog pravca, rezultata ispitivanja preciznosti i na temelju prethodno određene granice kvantifikacije i nalazi se u rasponu od 4,60 mg/L do 30 mg/L.

4.8. Stabilnost

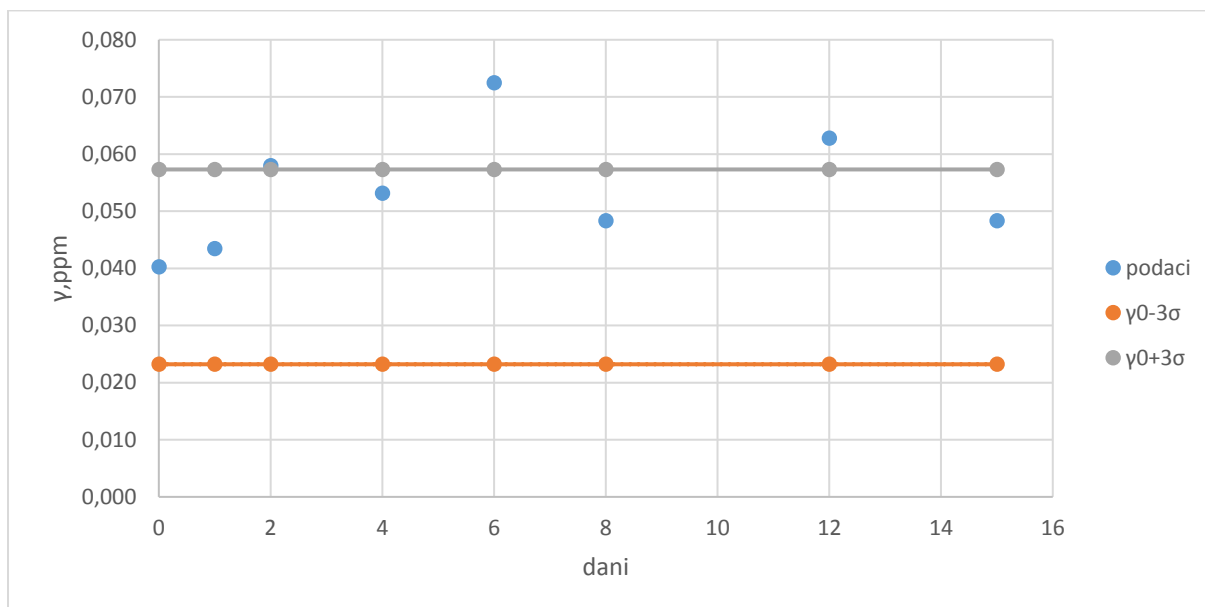
Stabilnost otopine ciprofloksacina ispitana je u periodu od 15 dana za koncentracije 0,2 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L i 30 mg/L.

Rezultati za koncentraciju 0,2 mg/L prikazani su u Tablici 10. i na slici 17.

Tablica 10. Podaci za stabilnost otopine koncentracije 0,2 mg/L

dan	\bar{A}	γ , mg/L
0.	0,017	0,040
1.	0,017	0,043

2.	0,019	0,058
4.	0,018	0,053
6.	0,020	0,072
8.	0,018	0,048
12.	0,019	0,063
15.	0,018	0,048

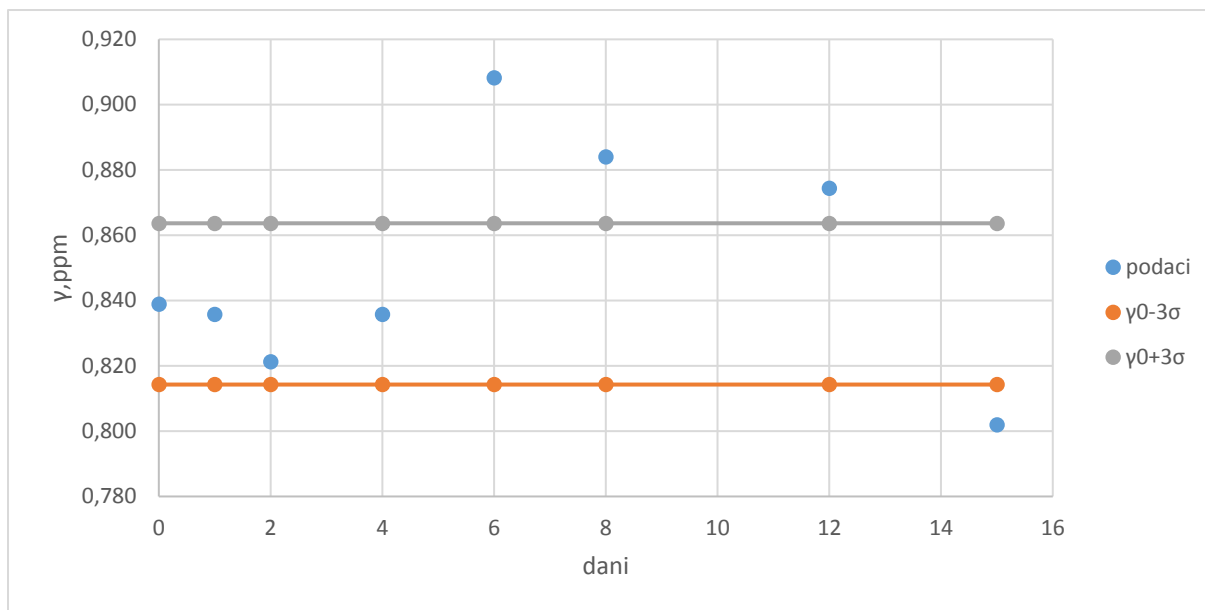


Slika 17. Stabilnost otopine koncentracije 0,2 mg/L

Rezultati za koncentraciju 1 mg/L prikazani su u Tablici 11 i na slici 18.

Tablica 11. Podaci za stabilnost otopine koncentracije 1 mg/L

dan	\bar{A}	γ , mg/L
0.	0,099	0,839
1.	0,099	0,836
2.	0,098	0,821
4.	0,099	0,836
6.	0,107	0,908
8.	0,104	0,884
12.	0,103	0,874
15.	0,096	0,802

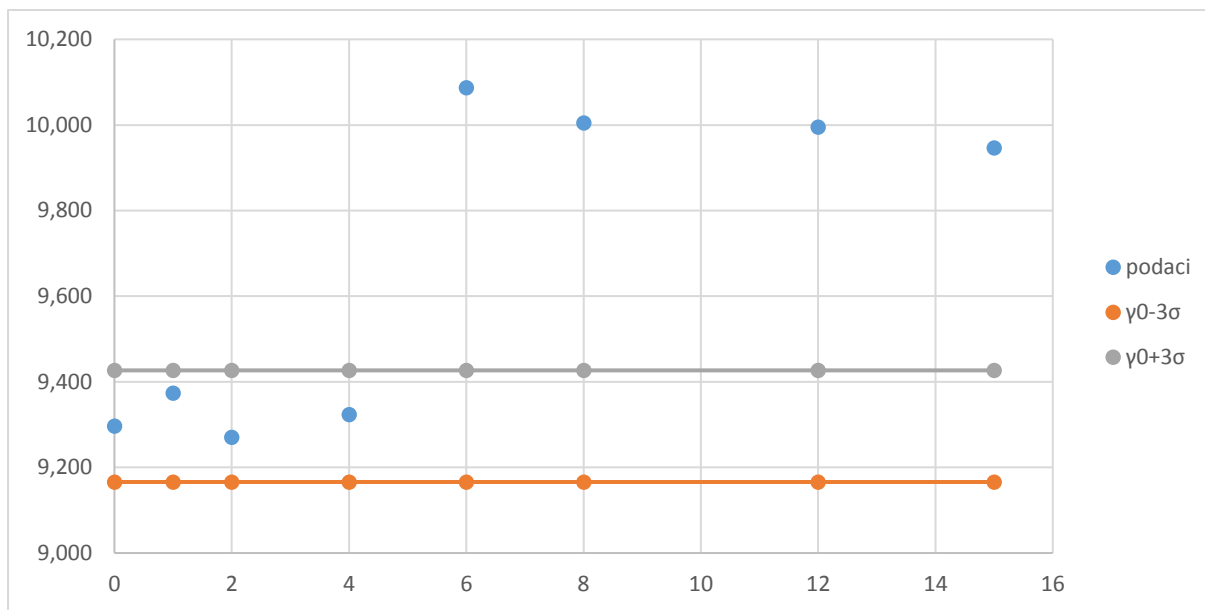


Slika 18. Stabilnost otopine koncentracije 1 mg/L

Rezultati za koncentraciju 10 mg/L prikazani su u Tablici 12. i na slici 19.

Tablica 12. Podaci za stabilnost otopine koncentracije 10 mg/L

dan	\bar{A}	γ , mg/L
0.	0,975	9,296
1.	0,983	9,374
2.	0,972	9,271
4.	0,978	9,324
6.	1,057	10,087
8.	1,048	10,005
12.	1,047	9,995
15.	1,042	9,947

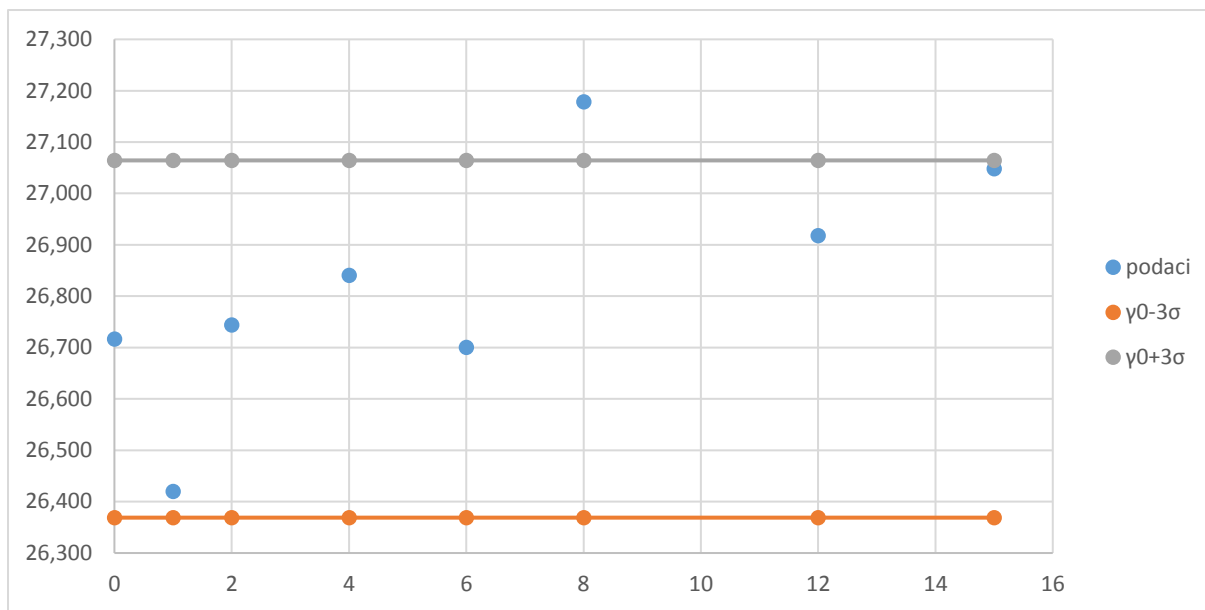


Slika 19. Stabilnost otopine koncentracije 10 mg/L

Rezultati za koncentraciju 30 mg/L prikazani su u Tablici 13. i na slici 20.

Tablica 13. Podaci za stabilnost otopine koncentracije 30 mg/L

dan	\bar{A}	γ , mg/L
0.	2,778	26,717
1.	2,747	26,420
2.	2,781	26,744
4.	2,791	26,841
6.	2,776	26,700
8.	2,826	27,179
12.	2,799	26,918
15.	2,812	27,048

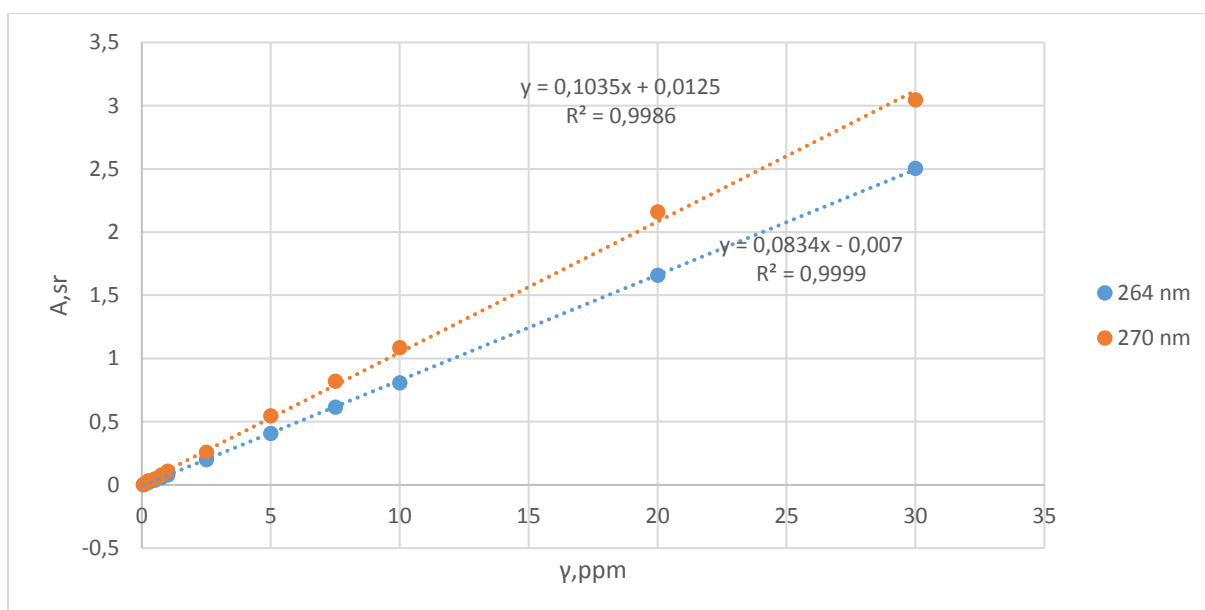


Slika 20. Stabilnost otopine koncentracije 30 mg/L

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je stabilnost otopine ciprofloksacina za sve ispitane koncentracije zadovoljavajuća prvih 5 dana, nakon čega vrijednosti variraju. Mogući razlog odstupanja je razgradnja ciprofloksacina u otopini.

4.9. Robusnost

Za određivanje robusnosti promijenjena je vrijednost valne duljine na $\lambda=264$ nm pri kojoj su određene linearnost i ponovljivost. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 21. i u Tablici 14.



Slika 21. Usporedba umjernih pravaca za različite vrijednosti valne duljine

Tablica 14. Podaci za ponovljivost pri valnoj duljini 264 nm

γ , mg/L	\bar{A}	SD	RSD
0,2	0,0148	0,0008	5,6
1	0,0759	0,0023	3,1
10	0,8241	0,0071	0,9
30	2,4873	0,0585	2,4

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 0,2 mg/L iznosi 5,6% i zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 1 mg/L iznosi 3,1% i zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 10 mg/L iznosi 0,9% i zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Ponovljivost mjerenja za koncentraciju 30 mg/L iznosi 2,4% i zadovoljava kriterij prihvatljivosti $RSD \leq 10\%$.

Na temelju dobivenih podataka vidljivo je da promjena parametra valne duljine ne utječe znatno na rezultate te se može zaključiti da je taj radni uvjet u području robusnosti metode. Nagib, koji odgovara osjetljivost metode, veći je pri valnoj duljini $\lambda=270$ nm (0,1035) nego pri valnoj duljini $\lambda=264$ nm (0,0834). Metoda daje bolje rezultate pri valnoj duljini $\lambda=264$ nm koja se nalazi bliže određenom maksimumu valne duljine ($\lambda_{\max}=264,11$ nm).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je validacija spektrofotometrijske metode za određivanje ciprofloksacina. Istraživanje je provedeno s otopinama ciprofloksacina u Millipore vodi i ispitani su svi parametri validacije. Na temelju dobivenih rezultata, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- ❖ Metoda je selektivna za određivanje ciprofloksacina.
- ❖ Metoda je linearna što potvrđuje činjenica da koeficijent determinacije iznosi $R^2=0,9984$ i zadovoljava postavljeni kriterij $R^2 \geq 0,995$. Iz ovoga proizlazi zaključak da su rezultati mjerenja izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku.
- ❖ Rezultati ispitivanja ponovljivosti i međupreciznosti izraženi pomoću relativnog standardnog odstupanja zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti (osim za najnižu ispitivanu koncentraciju), što potvrđuje preciznost metode.
- ❖ Radno područje metode nalazi se u rasponu koncentracija od 4,60 mg/L (ujedno i granica kvantifikacije) do 30 mg/L.

Na temelju svih dobivenih rezultata možemo zaključiti da razvijena metoda omogućava pouzdano određivanje ciprofloksacina.

6. LITERATURA

- [1] M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. 65 (9-10) (2016) 471-482.
- [2] R. Wise, Antimicrobial resistance: priorities for action. J. Antimicrob. Chemoth. 49 (2002) 585-586.
- [3] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, Chemosphere 75 (2009) 417-434.
- [4] S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode 24 (2016) 119-136.
- [5] T. Thai, B. H. Salisbury, P. M. Zito, Ciprofloxacin, StatPearls Publishing (2020)
- [6] M. A. Al-Omar, Ciprofloxacin: Drug Metabolism and Pharmacokinetic Profile, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology 31 (2005) 209-214.
- [7] URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ciprofloxacin#Pharmacokinetics> (pristup 28.7.2020.)
- [8] P. Sukul, M. Spittler, Fluoroquinolone Antibiotics in the Environment, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 191 (2007) 131-162.
- [9] C. A. De Caro, C. Haller, UV/VIS Spectrophotometry – Fundamentals and Application, Mettler-Toledo Publication No. ME-30256131, 2015.
- [10] URL:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry) (pristup 8.9.2020.)
- [11] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, Svijet po mjeri, 1 (2012) 61-64.
- [12] Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide for Method Validation and Related Topics, Second edition, 2014., 7-38.
- [13] T. Nageswara Rao, Validation of Analytical Methods – A Sampling of Current Approaches, u Mark Stauffer (ur), Calibration and Validation of Analytical Methods, IntechOpen, London, 2018., 131-142.
- [14] ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (1995)

