

Validacija kromatografske metode za određivanje metoklopramida

Vučemilović Šimunović, Luka

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:149:691856>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Luka Vučemilović Šimunović

VALIDACIJA KROMATOGRFSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE METOKLOPRAMIDA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

dr. sc. Dario Dabić

Zagreb, rujan 2020.

Zahvala:

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na stručnim savjetima i smjernicama, te pristupačnosti i pomoći prilikom izrade ovog završnog rada. Također joj se zahvaljujem na velikom strpljenju u radu sa mnom.

Također, velike zahvale i dr. sc. Dariju Dabiću na ogromnoj pomoći tijekom i nakon izvedbe eksperimentalnog dijela završnog rada te vrlo ugodnoj radnoj atmosferi.

Želim se zahvaliti i tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na susretljivosti u bilo kojoj situaciji, kao i ostatku osoblja na zavodu koji su mi uljepšali svaki radni dan u laboratoriju.

Zahvalu dugujem i svojoj obitelji, prvenstveno roditeljima i bratu, te svim prijateljima i kolegama koji su vjerovali u mene.

I na kraju, posebno se zahvaljujem Karli Kordi koja mi je velika potpora u životu.

SAŽETAK

Validacija analitičke metode je nužan korak u osiguravanju kvalitete u analitičkoj kemiji. To je postupak koji obuhvaća definiranje zahtjeva, eksperimentalno ispitivanje izvedbenih karakteristika metode te davanje izjave o zadovoljavanju postavljenih zahtjeva.

Kako bi se u potpunosti validirao sustav moraju se ispitati sve izvedbene karakteristike metode, a one su: specifičnost/selektivnost, linearnost, točnost, istinitost, preciznost, granica detekcije i kvantifikacije, radno područje i robusnost. Cilj ovog rada bio je validirati metodu za određivanje metoklopramida te ispitati karakteristike i na temelju rezultata zaključiti zadovoljava li analitička metoda kriterije prihvatljivosti. Analiza je provedena HPLC-MS/MS metodom na otopinama metoklopramida u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi, te su ispitane sve izvedbene karakteristike metode.

Rezultati istraživanja su pokazali kako je metoda zadovoljila sve kriterije prihvatljivosti osim kriterija istinitosti za otopinu morske vode najmanje koncentracije. Iz toga možemo zaključiti kako je metoda prihvatljiva za određivanje metoklopramida.

Ključne riječi: validacija analitičke metode, HPLC-MS/MS, metoklopramid

SUMMARY

Validation of the analytical method is a necessary step in ensuring quality in analytical chemistry. It is a procedure that includes defining requirements, experimental testing of method performance characteristics and giving a statement on meeting those requirements.

In order to fully validate the system, all performance characteristics of the method must be examined, and they are: specificity/selectivity, linearity, accuracy, trueness, precision, limit of detection and quantitation, working range and ruggedness. The aim of this study was to validate the method for determination of metoclopramide and to examine the characteristics and, based on the results to conclude whether the analytical method meets the acceptance criteria. The analysis was performed by HPLC-MS/MS method on solutions of metoclopramide in MilliQ, spring and sea water and all performance characteristics of the method were examined.

The result of the study showed that the method met all the acceptance criteria except the trueness criteria for the sea water solution of the lowest concentration. From this we can conclude that the method is acceptable for the determination of metoclopramide.

Key words: validation of analytical method, HPLC-MS/MS, metoclopramide

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Farmaceutici u okolišu.....	2
2.1.1. Metoklopramid.....	2
2.2 Kromatografija	3
2.2.1. Parametri kromatografskog razdvajanja.....	4
2.2.2. Tekućinska kromatografija	7
2.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	8
2.2.4. Detektori.....	9
2.2.5. DAD detektor.....	9
2.3. Spektrometrija masa	10
2.3.1. Ionski izvor	11
2.3.2. Analizatori masa.....	12
2.3.3. Detektori.....	13
2.4. Validacija metode	13
2.4.1. Izvedbene karakteristike metode validacije	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. Materijali	16
3.1.1 Kemikalije.....	16
3.1.2. Metoklopramid.....	16
3.2. Instrumenti.....	17
3.2.1. Analitička vaga	17
3.2.2. Uređaj za dobivanje MilliQ vode.....	18
3.2.3. Uređaj za filtraciju.....	19
3.2.4 Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa	19
3.3 Metode rada	20
3.3.1. Kromatografska analiza	20
3.3.2. Priprema temeljne standardne otopine metoklopramida	20
3.3.3. Priprema standardnih otopina metoklopramida za provjeru linearnosti u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi	20
3.3.4. Priprema standardnih otopina metoklopramida za procjenu preciznosti .	21
3.3.5 Određivanje robusnosti	21
3.3.6 Stabilnost otopine metoklopramida	21

4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
4.1. Validacija HPLC-MS/MS kromatografske metode za određivanje metoklopramida.....	22
4.1.1. Selektivnost.....	22
4.1.2. Linearnost	24
4.1.3. Osjetljivost.....	27
4.1.4. Preciznost	30
4.1.5. Istinitost.....	35
4.1.6. Granica kvantifikacije i granica detekcije.....	36
4.1.7. Radno područje.....	36
4.1.8. Robusnost.....	36
4.1.9. Stabilnost otopine metoklopramida	39
4.1.10. Sažetak rezultata	40
5. ZAKLJUČAK.....	41
6. LITERATURA	42
7. ŽIVOTOPIS	44

1. UVOD

Kemijska analiza u današnje vrijeme je neizostavna disciplina koja zalazi u razne aspekte života. Ima vrlo široku primjenu u medicini, farmaciji, industriji automobila, eksploataciji nafte i plina, agronomiji, arheologiji, itd. Važno je raditi na razvijanju novih ili na poboljšanju već postojećih analitičkih metoda zbog pouzdanosti pri daljnjim istraživanjima i ispitivanjima rezultata. U tome nam može pomoći kromatografija čiji je nagli razvoj u zadnjih 50 godina doveo do najzastupljenije analitičke tehnike, pa je tako znanje o kromatografskim metodama sve više traženo.

Kako se farmaceutici sve više koriste i njihova koncentracija u okolišu je sve veća, potrebno je razvijati pouzdane analitičke metode s kojima možemo kontrolirati razne farmaceutike, koji radi nepravilnog odlaganja i skladištenja mogu utjecati negativno u korist ljudskog zdravlja ali i biljnog i životinjskog.

Ovaj rad može poslužiti kao primjer provođenja validacije analitičke metode, te može koristiti u budućim istraživanjima metoklopramida u svrhu sprječavanja njegovih mogućih posljedica na ljude i okoliš.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Farmaceutici u okolišu

Farmaceutici su spojevi koji se dugo vremena koriste za liječenje ili sprječavanje bolesti ljudi i životinja te u veterinarskoj medicini kao promotori rasta. Posljedica njihove upotrebe je stalna prisutnost u okolišu u kojem se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava mogu vezati na tlo i sediment i biti podložni abiotičkim ili biotičkim procesima razgradnje. Pod abiotičke procese razgradnje spadaju hidroliza i fotoliza, dok pod biotičke procese razgradnje spadaju biološke razgradnje bakterijama i gljivicama.

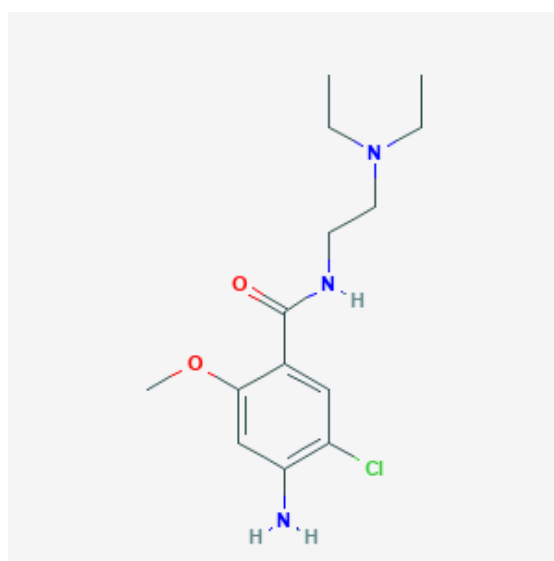
Rezultat takve razgradnje vodi smanjenju koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanku novih, više ili manje stabilnih i toksičnih spojeva u odnosu na početnu molekulu farmaceutika. Tijekom i nakon razgradnje smanjuje se koncentracija početne molekule, te dolazi do nastanka novih spojeva tzv. razgradnih i transformacijskih produkata. Pojam transformacija podrazumijeva promjenu u strukturi početne molekule farmaceutika, pri čemu se molekulska masa ne mijenja, dok razgradnjom dolazi do promjena kao što su cijepanje početne molekule i nastanak novih spojeva s drugačijom molekulskom masom. Novonastali produkti mogu imati različita fizikalno-kemijska svojstva od početne molekule farmaceutika, a postoje i slučajevi kada su produkti razgradnje čak i toksičniji od same početne molekule. Smanjenje koncentracije ne mora nužno biti posljedica razgradnje, jer neki farmaceutici pokazuju izrazitu sklonost sorpciji na čestice tla, sedimenta ili suspendirane čestice prisutne u vodenoj fazi.

Farmaceutici se unose u okoliš putem izlučevina, nepropisnim odlaganjem neupotrijebljenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja, te izravnim unosom u vodu upotrebom u akvakulturi. Najveći izvor farmaceutika u okoliš smatraju se postrojenja za obradu otpadnih voda, pri čemu učinkovitost njihova uklanjanja ovisi o procesu obrade vode i uvjetima tijekom procesa. Iako prisutni u niskim koncentracijama, kontinuirani, svakodnevni unos farmaceutika u okoliš kao vrlo kompleksnih smjesa može rezultirati većim koncentracijama. Posljedica toga su dugoročni i negativni utjecaji na vodene i kopnene organizme [1].

2.1.1. Metoklopramid

Metoklopramid (MCP) je oralni antiemetik i prokinetik koji je korišten u liječenju gastroezofagealne refluksne bolesti, gastropareze, te je korišten u slučajevima ozbiljne i kemoterapijom inducirane mučnine. U rijetkim slučajevima daje se kao lijek za migrenu, iako za taj tretman nije propisan [2]. Metoklopramid dolazi kao tableta ili u obliku tekućine koja se uzima oralnim putem, no u rijetkim slučajevima u bolnici se može davati i intravenozno. Farmaceutik se propisuje na recept, a nuspojave koje se mogu pojaviti su: umor i manjak energije te vrtoglavica uzrokovana padom krvnog tlaka. U rijetkim slučajevima može izazvati alergijsku reakciju u obliku osipa [3].

Metoklopramid spada u skupinu supstituiranih benzamida i derivata p-aminobenzojeve kiseline, strukturom sličan prokainamidu, no korišten u različite svrhe. Pokazuje svoja prokinetička svojstva tako da opušta glatke mišiće probavnog trakta blokirajući dopaminske receptore, točnije D2 receptor, i tako sprječava mučninu. To vodi prema pražnjenju želudca u crijeva. Metoklopramid može osnažiti i donji ezofagusni sfinkter i tako zaustaviti refluks kiseline. Metoklopramid se dobiva kondenzacijom 4-amino-5-kloro-2-metoksibenzojeve kiseline i N,N-dietiletilendiamina. Tercijarni amin je; što znači da su na dušikov atom umjesto vodika vezane tri ugljikovodične skupine, te supstituirani anilin. Uz benzamide, svrstava se i u skupinu monoklorbenzena [2].



Slika 1. Struktura metoklopramida [2]

2.2 Kromatografija

Pretpostavlja se da je otac kromatografije ruski botaničar M. S. Cvet (1872. – 1919.), dok su teorijsku podlogu moderne tekućinske kromatografije postavili britanski kemičari A. J. P. Martin (1910. – 2002.) i R. L. M. Synge (1914. – 1994.) ujedno i dobitnici Nobelove nagrade. Prema definiciji po IUPAC-u, u kromatografiju se uvrštavaju i tehnike odvajanja električnom strujom tj. elektroforetske tehnike [4]. Kromatografija je široko rasprostranjena tehnika separacije, identifikacije i određivanja kemijske komponente u složenoj smjesi. Niti jedna druga tehnika separacije nije toliko svestrana. Kromatografija je separacijska tehnika koja svoju izvedbu zasniva na odvajanju komponenti smjese na temelju razdiobe analita između nepokretne faze i pokretne faze koja struji preko nepokretne noseći analit.

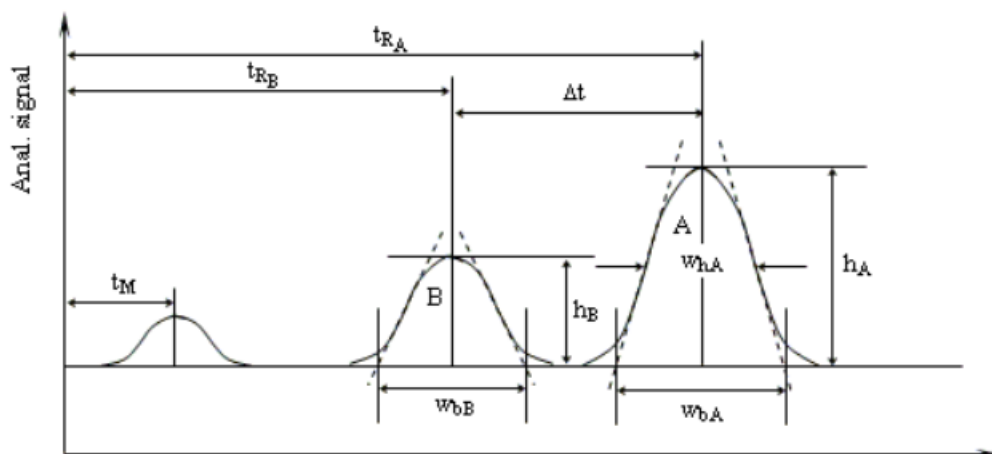
Kromatografiju možemo podijeliti s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze. Tako postoje: adsorpcijska, razdjelna, afinitetna, ionska i kromatografija isključenjem [5,6]. Adsorpcijska kromatografija uspostavlja svoju ravnotežu između pokretne faze koja je kapljevinna ili plin i nepokretne faze koja je krutina, gdje se molekule izravno vežu na adsorbens. Kada se ravnoteža uspostavlja

između dviju kapljevina govorimo o razdjelnoj kromatografiji, gdje je nepokretna faza kapljevina nanosena na inertni materijal. Kod afinitetne kromatografije na površini čvrste faze nalaze se različite funkcionalne skupine sa definiranim prostornim rasporedom te se radi interakcija molekule vežu sa ligandima na površini pokretne faze. Kada je nepokretna faza materijal s porama i slabo izraženih adsorpcijskih svojstava, molekule će se razdvajati zbog razlike u molekularnoj masi i volumenu. Takva kromatografija se naziva kromatografija isključenjem. Ionska kromatografija je zapravo tekućinska kromatografija na stupcu kojoj se separacijski mehanizam temelji na fenomenu ionske izmjene [7].

Prema sastavu nepokretne faze kromatografiju djelimo na plošnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu ili u koloni. Kod kromatografije na stupcu ili u koloni, nepokretna faza se nalazi u uskoj koloni gdje je gusto pakirana, dok pokretna faza struji kroz kolonu pod određenim tlakom ili pod gravitacijskom silom. Kod plošne kromatografije nepokretna faza je tanki sloj materijala nanosen najčešće na staklenoj, plastičnoj ili metalnoj površini, dok se pokretna faza kreće preko nepokretne radi kapilarnih sila, a nekad i radi gravitacijske sile te električnog potencijala (elektrokromatografija). Plošna kromatografija ima svoju podjelu na tankoslojnu te kromatografiju na papiru. Na temelju sastava pokretne faze kromatografiju djelimo na: plinsku (eng. *gas chromatography*, GC), tekućinsku (eng. *liquid chromatography*, LC), te fluidnu pri superkričnim uvjetima (eng. *supercritical fluid chromatography*, SFC). Tekuća pokretna faza može se koristiti u plošnoj kromatografiji te kromatografiji u koloni, dok plinska i fluidna u superkričnim uvjetima zahtjevaju samo kolonu [5]. Kao rezultat kromatografske analize dobivamo kromatogram koji nam govori koliko je naša separacija bila uspješna [7].

2.2.1. Parametri kromatografskog razdvajanja

Rezultat kromatografske analize prikazuje se kromatogramom. Važna tri parametra kromatografskog razdvajanja su zadržavanje, protok kroz porozni medij i širenje kromatografske zone. Na slici 2. prikazani su navedeni karakteristični parametri, t_R je *vrijeme zadržavanja* sastojka od unošenja u kromatografsku kolonu do maksimalnog odziva krivulje, a t_M je *zadržano vrijeme*, tj. zadržano vrijeme pokretne faze. To je vrijeme koje prođe od trenutka unošenja tvari koja se ne veže na nepokretnu fazu do njenog dokazivanja, odnosno vrijeme potrebno da molekule pokretne faze prođu kroz kolonu, dok je w *širina kromatografske zone* [7,8].



Slika 2. Kromatogram smjese sastavnica A i B te njihovi karakteristični parametri [8]

Korištenjem vremena zadržavanja (t_R) može se izračunati prosječna *linearna brzina putovanja analita* (v) :

$$v = \frac{L}{t_R} \quad (1)$$

gdje je L duljina punjenja kolone [8].

Faktor zadržavanja k , definira se kao omjer vremena koje otopljena tvar provede u nepokretnoj fazi i vremena koje provede u pokretnoj fazi [7]:

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (2)$$

Faktor zadržavanja može se odrediti iz kromatograma, te obično iznosi 1-5. Ako je vrijednost $k < 1$, onda se sastojci eluiraju prebrzo jer je t_R približno jednak t_M , tj. odjeljivanje neće biti zadovoljavajuće. Ako je $k > 20$, vremena zadržavanja su preduga. Faktor zadržavanja možemo mijenjati izborom otapala različite jakosti. [7,8].

Faktor odjeljivanja α , također je mjera odjeljivanja dviju komponenti. Definira se kao mjera relativnog zadržavanja dvaju sastojaka koji se kromatografski odjeljuju [8]:

$$\alpha = \frac{k_A}{k_B} \quad (3)$$

Različiti parametri mogu utjecati na α , a to su priroda otapala, pH-vrijednost pokretne faze, te priroda nepokretne faze. U slučaju kada je $\alpha = 1$, nema odjeljivanja, dok za sve ostale vrijednosti dolazi do odjeljivanja sastojaka ispitnog uzorka [7,8].

Što se tiče sigurnosti kvantitativne procjene, potrebno je postići zadovoljavajuće razlučivanje kromatografskih krivulja (pikova). U tome nam koristi R_S -vrijednost, stupanj razlučivanja dviju susjednih kromatografskih vrpca koji je definiran izrazom [7]:

$$R_S = \frac{2 \cdot \Delta t}{(w_1 + w_2)} \quad (4)$$

Bolje razlučivanje vrpce dobivamo većim R_S -faktorom. Na razlučivanje možemo utjecati izmjenom nepokretne faze, promjenom u temperaturi (GC), promjenom sastava pokretne faze (LC), promjenom duljine kolone ili optimizacijom visine tavana. Na samu visinu tavana možemo utjecati tako da reguliramo brzinu protoka pokretne faze, različitom veličinom čestica punila kolone, viskoznošću faza ili debljinom filma na nosaču. Visina ekvivalentna teorijskom tavanu označava se kraticom HEPT (eng. *height equivalent to a theoretical plate*). U svakom tavanu čestice putuju uzduž kolone, te dolazi do postupne ravnoteže između pokretne i nepokretne faze. Broj teorijskih tavana N , dobiva se iz izraza [8]:

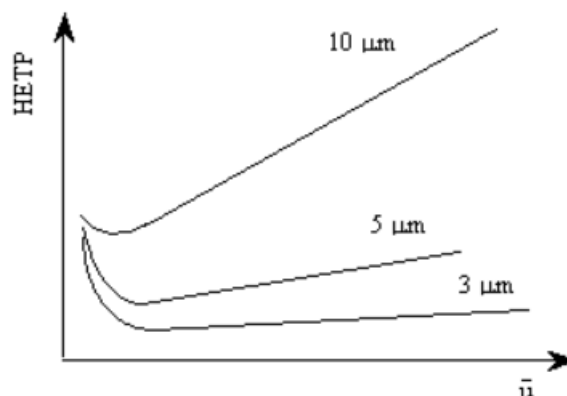
$$N = \frac{L}{HEPT} \quad (5)$$

Efikasnost kolone karakteriziraju HEPT i broj teorijskih tavana, što znači da uz manji HEPT imamo bolju efikasnost kolone. Pošto je broj teorijskih tavana proporcionalan s t_R , porastom broja teorijskih tavana raste i vrijeme zadržavanja. Posljedica kinetičkog efekta koji se odvija između pokretne i nepokretne faze kada se analit prenosi je širenje pikova. Odvija se određenom brzinom i proporcionalno je brzini protoka pokretne faze. Ovisnost širenja kromatografske vrpce o linearnoj brzini protoka dana je Van Deemterovom jednadžbom [8] :

$$HEPT = A + \frac{B}{v} + (C_S + C_M) * v \quad (6)$$

gdje je A koeficijent vrtložne difuzije, B koeficijent uzdužne difuzije a C_S i C_M su koeficijenti prijenosa mase u nepokretnoj i pokretnoj fazi, dok je v linearna brzina protoka pokretne faze [9]. Ako je nepokretna faza čvrsta, koeficijenti C_M i C_S biti će ovisni o procesima adsorpcije i desorpcije. Širina pika ovisit će o relativnoj molekularnoj masi zbog variranja difuzijskih koeficijenata s veličinom čestica.

Iz slike 3. vidljivo je da pri manjim veličinama čestica nepokretne faze dolazi do smanjenja HEPT, te se povećava efikasnost odjeljivanja kolone [8].



Slika 3. Utjecaj veličine čestica na HEPT [8]

Protok kroz porozni medij definira pokretna faza koja prolazi kroz sloj međuprostora nepokretne faze u stupcu. Kod kromatografskih uvjeta strujanje je uglavnom laminarno, pa je brzina definirana Darcyjevim zakonom [7]:

$$v(x) = \left(\frac{-K}{\eta}\right) * \frac{dP}{dx} \quad (7)$$

gdje je $v(x)$ brzina pokretne faze u nekoj točki x , K propusnost stupca, a η viskoznost pokretne faze [7].

2.2.2. Tekućinska kromatografija

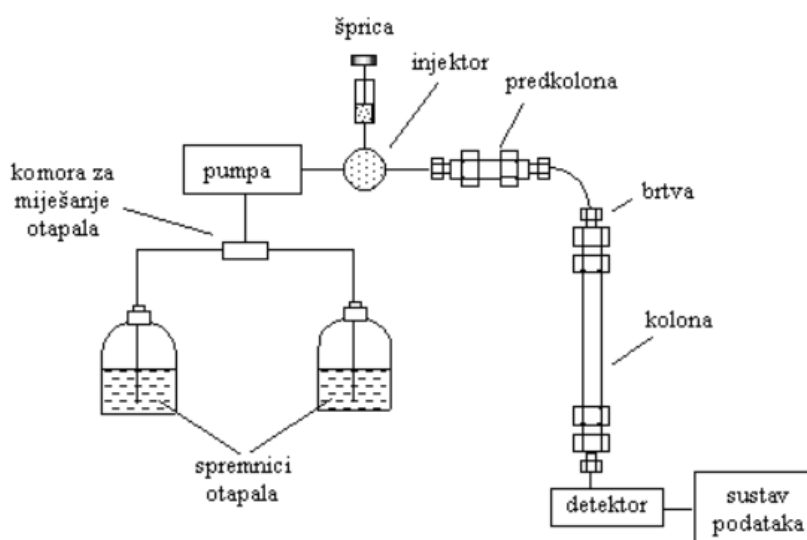
Kod tekućinske kromatografije pokretna faza je kapljevina, dok nepokretnu fazu čine razni sorbensi. Dijeli se na dvije različite vrste, adsorpcijsku kromatografiju kod koje je nepokretna faza sorbens, i na razdjelnu kromatografiju kod koje je kapljevinska nepokretna faza nanosena na čvrsti inertni nosač. Kod tekućinske kromatografije moguća je uporaba različitih faza. Tako postoje kromatografija normalnih faza i kromatografija obratnih faza [7]. U kromatografiji normalnih faza nepokretna faza je polarna a pokretna faza je nepolarna. Kod ove tehnike nepolarna komponenta putuje brže i brže će doći do eluiranja. To se događa zbog manjeg afiniteta između nepolarne komponente i nepokretne faze. Polarne komponente su zadržane duže vremena radi većeg afiniteta prema nepokretnoj fazi, te tako treba više vremena za eluiranje. U farmaceutskoj industriji lijekovi su najčešće polarne molekule, pa tako kromatografija normalnih faza nije često uporabljiva zbog dužeg vremena eluiranja. Kromatografija obratnih faza je najpopularnija tehnika analitičke separacije. Široko je korištena u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te analizi bioloških uzoraka i uzoraka iz okoliša. U ovoj tehnici nepokretna faza je nepolarna, najčešće su to hidrofobne oktadecilne skupine na površini silikagela, dok je pokretna faza polarna. Polarne komponente se eluiraju brže, a nepolarne ostaju zadržane duže vremena. Pokretna faza najčešće je smjesa vode i polarnog organskog otapala radi kontrole selektivnosti i zadržavanja [10]. Na učinkovitost odjeljivanja u tekućinskoj kromatografiji mogu utjecati razni čimbenici pri konstantnom sastavu i brzini pokretne faze. Duljina stupca, promjer čestica punjenja i radni tlak samo su neki od faktora, dok temperatura može utjecati na odjeljivanje [7]. Na koji način izbor radne temperature utječe na odjeljivanje u tekućinskoj kromatografiji, van't Hoff je opisao termodinamičkim odnosom između faktora zadržavanja k i termodinamičke temperature [8]:

$$\ln k = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \left(\ln \frac{1}{\beta}\right) \quad (8)$$

gdje su ΔH i ΔS entalpija i entropija prijenosa otopljene tvari iz pokretne na nepokretnu fazu, R je univerzalna plinska konstanta, a β je omjer volumena pokretne i nepokretne faze. Entalpiju prijenosa možemo dobiti iz nagiba pravca ovisnosti $\ln k$ o $1/T$, a entropiju iz odsjeka na y -osi. Taj linearni prikaz van't Hoffove jednadžbe pokazuje da se ΔH prijenosa ne mijenja s promjenom temperature dok nelinearna funkcija ukazuje da postoji promjena u interakcijama između otopljene tvari i jednom od faza, ili između otopljene tvari i obje faze. Povišenjem temperature postiže se brže eluiranje s kolone ali i manja efikasnost separacije. Važno je pronaći optimalnu radnu temperaturu, za koju je nužno da bude stalna i strogo kontrolirana [8].

2.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) glavni je predstavnik tekućinske kromatografije, te se u 75% slučajeva primjene koristi kao tehnika obrnutih faza. Ono što HPLC dijeli od tekućinske kromatografije je tlak koji uzrokuje prolaz pokretne faze kroz nepokretnu. Upravo radi tog većeg tlaka i aparatura koja se primjenjuje kod HPLC analiza je složenija što se vidi na slici 4 [8,9].



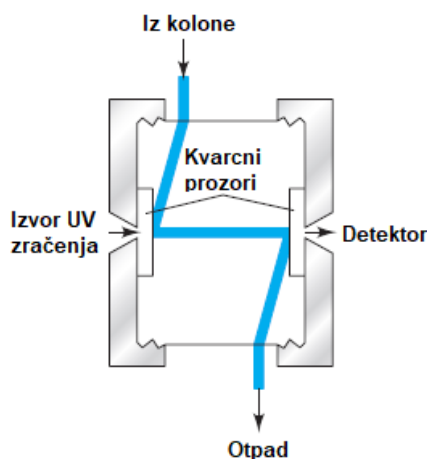
Slika 4. Shematski prikaz HPLC kromatografa [8]

Otapalo tj. pokretna faza koja se koristi mora biti izrazito visoke čistoće, i potrebno je osloboditi ju od otopljenih plinova ili suspendiranih čestica. Koriste se voda, metanol, acetonitril te tetrahidrofurano izbor ovisi o samoj topljivosti analita. Tetrahidrofurano najmanje polaran od navedenih otapala i nekompatibilan za detekciju niskih valnih duljina koje su potrebne za analize farmaceutskih proizvoda. Pokretna faza sastoji se od vodene i organske faze. Sam omjer u kojem su pomiješane faze može utjecati na analizu. Kada se uzorak eluira sa 100 % organske faze, neće doći do razdvajanja jer uzorak nije zadržan. Za ubacivanje pokretne faze u kolonu pod visokim tlakom i stalnom brzinom zaslužna je pumpa. Pokretna faza je najčešće pod tlakovima do 15 MPa, te brzina njenog protoka varira u rasponu od $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ do 10 mL min^{-1} . Mikrolitarska šprica služi za unošenje uzorka u sustav za injektiranje volumena koji može biti od $5 \mu\text{L}$ do $500 \mu\text{L}$, u kojem se održava tlak. Otapalo prolazom kroz injektor nosi uzorak na kolonu, koja je najčešće izrađena od nehrđajućeg čelika. Postoje razne dimenzije kolona no najčešće su duljina 250 mm, unutarnjeg promjera 4,6 mm te punjene česticama veličine 5 ili $10 \mu\text{m}$. Kolona je najbitniji dio HPLC sustava te mijenjanjem kolone dobivamo najveći utjecaj na razvijanje metode zbog svojstava eluiranja i selektivnosti. Modificirani silikagel je najzastupljenija nepokretna faza u HPLC sustavima zbog svoje robusnosti, izdržljivosti pod visokim tlakovima i niskim pH-vrijednostima, no iznad pH 7 postoji mogućnost otapanja. Temperatura kolone nije toliko bitna, ali može utjecati na selektivnost tako da pri različitim temperaturama analiti

moгу davati drugačije odzive, pa se analize izvode pri konstantnoj temperaturi. Temperatura raspona 30 - 40 °C dovoljna je za uspješno izvođenje. Temperature različite od navedenog raspona mogu utjecati na viskoznost pokretne faze. Detektori služe za praćenje značajki pokretne faze ili otopljene tvari mjerenjem indeksa loma ili struja na elektrodi. Primjenjuju se razne vrste detektora no najzastupljeniji su detektori s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD ili *photo diode array detector*, PDA) [8,10].

2.2.4. Detektori

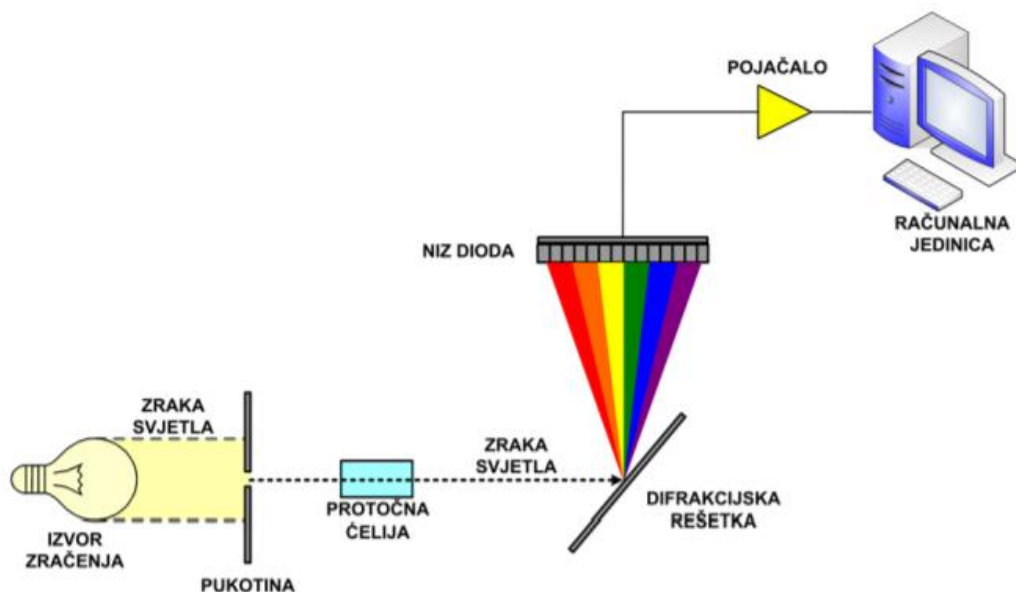
Kako bi detektor bio idealan mora posjedovati neke od karakteristika: adekvatna osjetljivost, dobra stabilnost i obnovljivost, dovoljno velik raspon temperature (bilo bi poželjno od sobne temperature do 400 °C), kratko vrijeme reakcije neovisno o volumnom toku, velika pouzdanost, jednakost u odzivu prema svim vrstama otopljenih tvari te nedestruktivnost. Trenutno ne postoji niti jedan detektor koji obuhvaća sve te karakteristike pa se koriste različiti detektori za različite izvedbe. Detektori koji se najčešće koriste u tekućinskoj kromatografiji bazirani su na apsorpciji UV ili vidljivog zračenja [5].



Slika 5. UV detektor za HPLC [5]

2.2.5. DAD detektor

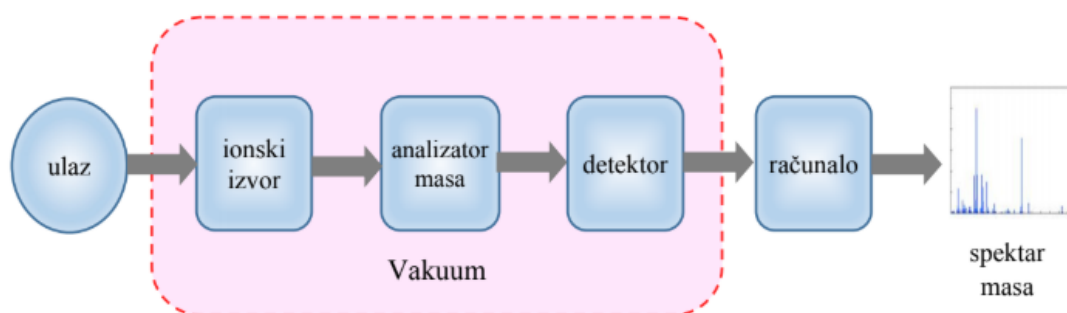
Detektor s nizom dioda radi na principu da se za svako vrijeme zadržavanja dobiva cjelokupni snimljeni UV/VIS spektar. Polikromatsko zračenje prolazi kroz uzorak te se interakcije odvijaju pri svim valnim duljinama, i simultano se mjeri apsorbancija preko niza dioda. Svaka pojedinačna dioda, od njih 1000 najčešće, mjeri apsorbanciju pri određenoj valnoj duljini za razliku od UV/VIS detektora koji sadrži po jednu diodu koja je mjerna i jednu koja je referentna [11].



Slika 6. Shematski prikaz UV/VIS detekcije s nizom dioda [11]

2.3. Spektrometrija masa

Spektrometar masa je uređaj koji razdvajanjem i identifikacijom na temelju omjera mase i naboja ionizira molekulu. Sastoji se od 3 glavna dijela: ionskog izvora, analizatora masa te detektora. U ionskom izvoru dolazi do početne ionizacije, a razdvajanje se događa u analizatoru masa. Nakon detekcije na detektoru dobije se ispis u obliku spektra masa [12].



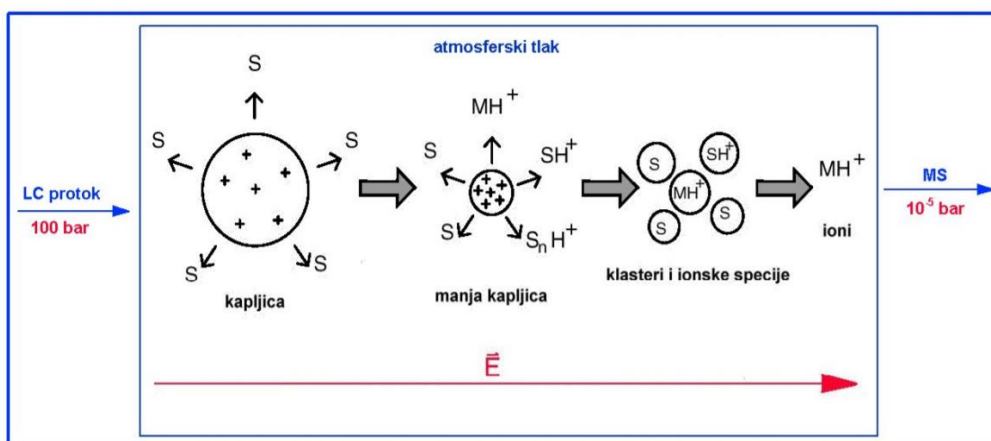
Slika 7. Shematski prikaz spektrometra masa [12]

U praksi, velika većina u spektrometriji masa definira razlučivost kao omjer $m/\Delta m$, gdje je m masa iona, a Δm širina pika koja se najčešće mjeri kao širina polovice maksimuma pika (eng. *full-width half-maximum*, FWHM) ili razmakom između dva pika krivulja jednakih intenziteta. Kod instrumenata koji mjere rezoluciju jedinica mase kao što su kvadripoli, računanje razlučivosti preko FWHM je korisno zbog cijelog spektra masa u kojem se može koristiti. U spektrometriji masa, masa molekule, tj. m/z iona je izražena kao molekularna masa (monoizotopna masa) koja se odnosi na najobilnije prirodne izotope elemenata prisutnih u ionu ili molekuli. Postoje dvije vrste masa, teorijska i

eksperimentalno dobivena. Teorijska masa je izračunata masa, gdje je stanje naboja relevantno zbog neznačajne vrijednosti mase elektrona. Eksperimentalno dobivena masa mjerena je sa odgovarajućim stupnjem točnosti i preciznosti. Dostižna vrijednost točnosti određivanja mase u praksi ovisi o samoj razlučivosti masenog analizatora i njegovoj kvaliteti. Postoje različiti načini izračuna točnosti određivanja masa, no kod spektrometrije masa visoke razlučivosti (eng. *high resolution mass spectrometry*, HRMS), izražava se kao apsolutna pogreška u mili daltonu, ili kao relativna pogreška u ppm. Spektar masa predstavlja samo djelić niza podataka zbroja iona funkcije omjera m/z u određenoj vremenskoj točki. Spektar masa koristi se za pomoć pri identifikaciji komponenti [13]

2.3.1. Ionski izvor

Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojem koji otparava tekućinu, ionizira neutralne molekule te uvodi analit u analizator. Na površini međuspoja događaju se procesi otparavanja i desorpcije. Jedan od najučestalijih načina ionizacije koji je kompatibilan sa svim analizatorima je ionizacija elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionization*, ESI). Ionizacija može biti pozitivna i negativna te se događa pri atmosferskom tlaku. Najpovoljnija radna temperatura za ionizaciju je iznad 100 °C, te se događa u struji dušika. ESI radi na principu da pokretna faza i analit ulaze u ionizator kroz iglu koja je ujedno i elektroda pod visokim naponom, te se formira maglica sastavljena od kapljica otapala i nešto uparenog otapala na vrhu igle. Na drugoj strani kolektorska elektroda privlači novonastale nabijene kapljice i dodatno ih ubrzava. Pošto se ionizacija izvodi u struji dušika, te zbog temperature i električnog potencijala, otapalo polako otparava pri čemu ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu. Posljedica toga je smanjenje kapljica. Nakon određenog vremena kapljice su dovoljno male pa sile kulonskog odbijanja prevladaju nad silama površinske napetosti i kapljice se počnu otparavati ili lomiti na još manje kapljice, a analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu. Kada ioni analita krenu napuštati površinu, oko njih se počinje stvarati sfera uparenog otapala koje analizator privlači [14]. Proces ionizacije prikazan je na slici 8.

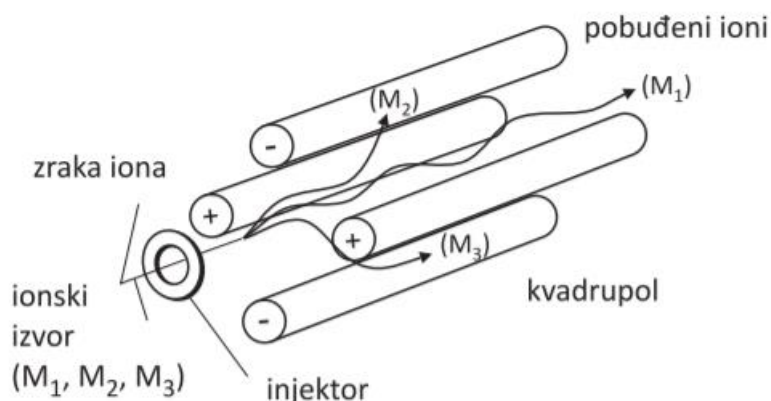


Slika 8. Shematski prikaz ESI [15]

Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (eng. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) je također često zastupljena tehnika ionizacije. Ima sposobnost da ionizira i polarne i nepolarne molekule, a kako i sam naziv kaže događa se pri atmosferskom tlaku te može biti pozitivna i negativna. Radni protok je malo veći nego kod ESI, a radna temperatura optimalna za ionizaciju iznosi oko 400 °C. Isto kao i ESI, ionizacija se odvija u struji dušika, ali za razliku od prethodne tehnike odvija se u plinskoj fazi. Do ionizacije dolazi radi prijenosa naboja među ionima. Izbijajuća igla koja započinje ionizaciju narinutog potencijala 2-5 kV je smještena na samom ulazu pokretne faze i analita u ionizator. Prijenos protona i naboja na analit vrši jako reaktivni ion $H_3O^+(H_2O)_n$ koji je nastao kaskadnim prijenosom naboja od N^{2+} , O^{2+} i NO^+ iona. Što se tiče negativne ionizacije, kada se sudare elektroni emitirani iglom s neutralnim česticama, formiraju ione O^- ili O^{2-} ione koji su najveći izvor negativnih iona u APCI. [14]. Neke od ostalih tehnika ionizacije su: kemijska ionizacija (eng. *chemical ionization*, CI), ionizacija brzim atomima (eng. *fast atom bombardment*, FAB), matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI), termoraspršenje (eng. *thermospray*, TS) i ionizacija poljem i desorpcija poljem (eng. *field ionization*, FI i *field desorption*, FD) [15].

2.3.2. Analizatori masa

Analizator masa je sastavni dio spektrometra masa koji razdvaja ione na temelju različitog omjera mase i naboja. Jedan od najzastupljenijih analizatora masa je kvadripol. Čine ga četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane, gdje svaki par ima različite polaritete, pozitivne i negativne. Parovi su spojeni radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje. Radi na principu da u analizator ulaze ioni koji imaju različit omjer mase i naboja (m/z) i u ovisnosti o primijenjenoj struji ili polju prolaze analizator sa zadržanom putanjom ili postaju neutralne molekule dodirujući elektrode [14].



Slika 9. Prikaz kvadripola [14]

Kvadripol može djelovati na 4 načina. Može se primijeniti u načinu rada praćenja cijelog spektra skeniranjem fiksnog omjera istosmjerne i izmjenične struje pružajući razlučivost jedinice mase i separaciju mase izotopa sa velikom lakoćom, prilagodbom,

te ograničenim troškovima. Može se i primjenjivati u ion selektivnom načinu, gdje je ograničen broj m/z prenesen. U takvom načinu moguće je brzo mijenjanje između različitih vrijednosti m/z što ga čini najčešće korištenim načinom rada pri ciljanim kvantitativnim analizama. U radiofrekventnom načinu rada, kvadripol se koristi kao prenosilac iona, te se kao takav koristi u APCI tehnikama. Kvadripol može biti izveden i kao ionska zamka. Ioni ulaze u zamku na koju je doveden istosmjerni i izmjenični napon, te kontrolirano izlaze iz zamke prema detektoru. Zbog prevelikog broja iona u zamci, ovakav način rada može utjecati na manju razlučivost [13].

Mehanizam rada se dijeli na principu lakših i težih iona. Kada kod XZ-filtra lakših iona nemamo istosmjerni potencijal ioni će težiti k sredini procjepa za vrijeme pozitivne polovice izmjeničnog ciklusa, a za vrijeme negativnog k elektrodama. Ako ion udari u elektrodu prilikom negativnog ciklusa, biti će neutraliziran. Ako je ion dovoljno težak a izmjenični potencijal velik, on neće značajno osjetiti izmjenični potencijal, te će biti pod utjecajem istosmjernog potencijala. Kod manjih izmjeničnih potencijala i lakšeg iona, ion se sudara s elektrodom za vrijeme negativnog izmjeničnog ciklusa. Kada na elektrodama nema izmjeničnog potencijala, negativni par privlači sve pozitivne ione i neutralizira ih. Kod YZ-filtra težih iona pod stalnim naponom negativnog istosmjernog potencijala nalazi se negativni par elektroda koji će privlačiti pozitivne ione kada nema izmjeničnog potencijala. Ako je ion dovoljno lagan, može se djelovati na njegovu putanju izmjeničnim potencijalom i držati ga dalje od elektrode. Postoje još različite izvedbe analizatora masa kao analizator koji mjeri vrijeme leta (eng. *time of flight*, TOF), magnetni (sektorski), ionsko ciklotronski rezonantni kod kojeg se mjere ciklotronske frekvencije zarobljenih iona i Fourierovim transformacijama preračunavaju u m/z vrijednosti (eng. *Fourier-transform ion cyclotron resonance*. FT-ICR) [14].

2.3.3. Detektori

Nakon prolaska iona kroz analizator masa, ioni dolaze do detektora. Detektori rade na principu da spektar masa daju ovisno o naboju, masi ili brzini iona. Pošto ima vrlo malo tih iona koji dopiru do detektora, potrebno je znatno povećanje da bi dobili kvalitetan signal tj. spektar. Neki od najpoznatijih detektora su: fotografska ploča, Faradayev cilindar, multiplikatori elektrona i elektro-optički ionski detektori [12].

2.4. Validacija metode

Validacija analitičke metode je postupak koji obuhvaća definiranje analitičkih zahtjeva, eksperimentalno ispitivanje izvedbenih karakteristika metode te, na temelju dobivenih rezultata, davanje izjave o zadovoljavanju postavljenih zahtjeva [16]. Najjednostavnija definicija kaže da je to postupak kojim dokazujemo da naša metoda služi svrsi koju smo joj namijenili. Puno prije pojave regulativa i zahtjeva, analitičari su primjenjivali temeljna načela validacije metoda. U svijetu je validacija rutina u nekim laboratorijima, dok u nekim još nije ili se tek počela primjenjivati [17]. Ako se rezultatima analize ne može vjerovati, onda ona ima malu vrijednost. Korisnik očekuje da može vjerovati rezultatima, jer postupak provode laboratoriji i analitičari koji imaju stupanj obrazovanja adekvatan za to, tako da laboratorij i njegovi zaposlenici imaju odgovornost da

opravdaju povjerenje korisnika. Prethodno samoj validaciji dolazi razvijanje metode. U jednu ruku može se koristiti već postojeća metoda, ili adaptirana postojeća metoda koja je izmijenjena radi nove svrhe. U drugu ruku, analitičar može sam razviti novu metodu no to zahtjeva više posla i više znanja. Bez obzira na to koliko se truda uložilo u razvijanje metode, nema nikakve garancije da će metoda biti provedena uspješno i adekvatno [16]. Ne postoji opći propis, ili opće upute kako validirati metodu no postoje postupci provođenja validacije analitičkih metoda propisane od ICH (eng. *International Council for Harmonisation*) koji su uglavnom namijenjeni farmaceutskoj industriji. Također korisne informacije vezano uz provođenje validacije metoda mogu se pronaći u priručnicima koje izdaje Eurachem, mreža europskih organizacija koja promiče dobru praksu u analitičkim mjerenjima [18].

2.4.1. Izvedbene karakteristike metode validacije

Svakoj se metodi pristupa individualno, a struka i regulativa i zakonodavstvo prihvatili su osam osnovnih parametara validacije. Plan validacije za svaku metodu osmišljava se kombinacijom tih parametara. Parametri ili izvedbene značajke su:

1. Specifičnost / Selektivnost

Specifičnost i selektivnost su svojstvo metode da uz visoku točnost specifično odredi željenu komponentu u prisutnosti ostalih komponenti. Iako često poistovječena, ova dva svojstva metode su različita. Specifična metoda je metoda koja određuje samo jedan specifičan analit, dok selektivna metoda može odrediti više komponentni istodobno koje međusobno ne utječu jedna na drugu. U validaciji selektivnost je jedan od ključnih i nezaobilaznih parametara.

2. Linearnost

Linearnost je sposobnost metode da unutar određenog područja, daje ispitne rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određuje se pripremom najmanje pet koncentracijskih razina sa tri ponavljanja te mjerenjem odziva metode na poznate koncentracije [17].

3. Točnost

Točnost je slaganje tj. podudaranje jedne eksperimentalne vrijednosti sa referentnom vrijednosti. Točnost se utvrđuje procjenom sustavne i slučajne pogreške na jednu vrijednost rezultata, te zato točnost dijelimo na istinitost i preciznost.

4. Istinitost

Istinitost nam govori koliko se slažu referentna vrijednost i srednja vrijednost beskonačnog broja ponovljenih mjerenja. Pošto je nemoguće provesti beskonačan broj mjerenja, istinitost ne može biti mjerena ali se može procijeniti. Procijeniti se može na razne načine kao npr. usporedbom rezultata metode koju smo ispitivali sa referentnom metodom, analizom uzorka poznate koncentracije (referentni uzorak) ili analizom obogaćenog uzorka [16,17].

5. Preciznost

Preciznost je parametar validacije koji definira izraz slaganja između niza mjerenja provedenih iz istog homogenog uzorka. Dijeli se na preciznost pod uvjetima ponovljivosti (ponovljivost) i međupreciznost. Ponovljivost uključuje kratko razdoblje, i uvjete kao što su: jedan analitičar, jedan laboratorij i ista aparatura. Međupreciznost se ostvaruje u duljem vremenskom periodu unutar istog laboratorija ali uz promjenu prethodno navedenih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, dobavljači, itd.) [17].

6. Granice kvantifikacije i detekcije

Ova dva parametra svrstavamo skupa zbog svoje sličnosti. Granica detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati ali ne i kvantitativno odrediti dok granica kvantifikacije može kvantitativno odrediti najmanju količinu analita u uzorku uz dozu potrebne točnosti i preciznosti [18]. Određuju se tako da se osnovna otopina razrijedi. Procjena se može napraviti vizualno pomoću omjera signala i šuma ili statistička.

Granica kvantifikacije (GK) i granica detekcije (GD) određuju se prema slijedećim jednadžbama:

$$GK = k_Q \cdot s'_0 \quad (9)$$

gdje faktor k_Q prema IUPAC-u iznosi 10, a s'_0 označava standardno odstupanje.

$$GD = 3,3 \cdot s'_0 \quad (10)$$

Standardno odstupanje se računa prema izrazu:

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad (11)$$

gdje je s_0 procjena standardnog odstupanja za n broj mjerenja pri niskim koncentracijama u blizini nule.

7. Radno područje

Radno područje je skup vrijednosti koje se nalaze u intervalu gornje i donje granice analita u uzorku koje se mogu kvantitativno odrediti uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost. Granice su isto uračunate u područje.

8. Robusnost

Robusnost je mjera koja pokazuje kako će male promjene radnih uvjeta koje smo unaprijed definirali utjecati na rezultat analize [17].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1 Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Popis kemikalija i njihove specifikacije

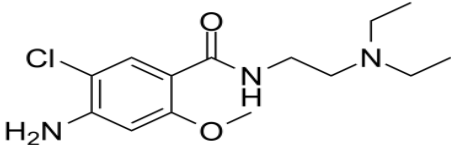
Naziv	Kemijska formula	Čistoća	Proizvođač
Acetonitril	CH ₃ CN	HPLC	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
Mravlja kiselina	HCOOH	HPLC	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
MilliQ voda	H ₂ O	p.a	Millipore Corporation, Billerica, USA
Metoklopramid hidroklorid	C ₁₄ H ₂₃ Cl ₂ N ₃ O ₂	p.a	Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA

Također korištene su u eksperimentalnom dijelu izvorska i morska voda. Izvorska voda je uzorkovana na izvoru Vrelo u Fužinama (listopad 2016.), a morska voda na Brijunima (srpanj 2018.).

3.1.2. Metoklopramid

Osnovne karakteristike i fizikalno-kemijska svojstva ispitivanog farmaceutika prikazana su u tablici 2.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva metoklopramida

Generički naziv	Metoklopramid
IUPAC naziv	4-amino-5-kloro- <i>N</i> -[2-(dietilamino)etil]-2-metoksibenzamid
CAS broj	364-62-5
Strukturna formula	
Molekularna masa	299,79 g/mol
Topljivost u vodi pri 25°C	0,02 g/100 mL
pK_a	9,27

[2]

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Za sva vaganja tijekom provođenja ispitivanja korištena je analitička vaga prikazana na slici 10.



Slika 10. Analitička vaga XA105 DualRange, Mettler Toledo

Analitičke vage okružene su staklenim ormarićem koji prije vaganja mora biti zatvoren. Služi kao zaštita od prašine i zračnih struja koje mogu utjecati na mjerenje. Ležajevi vage su najbitniji i najosjetljiviji kod mjerenja pa ih tako treba čuvati od oštećenja i pažljivo rukovoditi sa uzorkom prilikom stavljanja na ležaj. Specifikacije korištene vage su:

- a) maksimalni kapacitet: 220 g
- b) očitavanje: 0,1 mg
- c) minimalna odvaga: 8 mg
- d) područje tare: 0 – 220 mg
- e) linearnost: 0,2 mg
- f) ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu: 0,1 mg

3.2.2. Uređaj za dobivanje MilliQ vode

MilliQ voda dobivena je iz uređaja prikazanog na slici 11.



Slika 11. Uređaj za dobivanje MilliQ vode Millipore Simplicity UV sustav

Procesu dobivanja MilliQ vode prethode procesi filtracije i deionizacije koji se odvijaju preko 0,22 μm membranskog filtra, a koncentracija iona se određuje mjerenjem električnog otpora vode pri 25 °C. Ovim procesom dobiva se MilliQ voda „tipa 1“ određenih karakteristika.

3.2.3. Uređaj za filtraciju

Prije same pripreme uzoraka i izvedbe eksperimenta uzorci izvorske i morske vode moraju se filtrirati preko membranskog filtera kako bi se otklonile suspendirane čestice i čestice nečistoća. Uređaj za filtraciju prikazan je na slici 12.



Slika 12. Pall Life Science uređaj za filtraciju

3.2.4 Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa korišten je u svrhu kvantitativne i kvalitativne analize metoklopramida, te prikaza njegovog spektra masa. Analiza je provedena na uređaju Agilent serije 1200 s Agilentovim 6410 trostrukim kvadripolnim analizatorom masa, Foster City Kalifornija, SAD (slika 13.). Ovakav sustav ionizaciju može provoditi tehnikama elektroraspršenja i kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku a obrada podataka i dobivenih rezultata analize provodi se pomoću računalnog programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data acquisition Triple Quad B.01.04.



Slika 13. Agilent 1200 s Agilent 6410 trostrukim kvadripolnim analizatorom masa

3.3 Metode rada

3.3.1. Kromatografska analiza

Kromatografijom obratnih faza provedena je analiza metoklopramida u uzorcima MilliQ, izvorske i morske vode. Kao nepolarna nepokretna faza korištena je C18 Kinetex kolona dimenzija 100 mm x 2,1 mm sa veličinom čestica punjenja 5 μm i veličinom pora od 100 \AA . Kao polarna pokretna faza korištena je 0,1 % mravlja kiselina u MilliQ vodi (eluens A) te 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (eluens B). Brzina protoka iznosila je 0,2 mL min^{-1} , dok je volumen injektirana iznosio 5 μL . Vrijeme trajanja analize iznosilo je 6 minuta uz izokratno eluiranje i sastav pokretne faze 85 % A i 15 % B. Spektar je snimljen u području od 30 do 1000 m/z u struji dušika. Analiza se izvodila pri naponu kapilare od 4000 V i naponu kolizijske ćelije od 135 V. Temperatura desolvacijskog plina iznosila je 350 $^{\circ}\text{C}$. Energije sruza bile su reda veličine 5 - 30 eV.

3.3.2. Priprema temeljne standardne otopine metoklopramida

Temeljna standardna otopina (TSO) metoklopramida pripravljena je otapanjem 28,12 mg metoklopramida hidroklorida (ekvivalent 25,00 mg metoklopramida) u odmjerne tikvici od 25 mL MilliQ vodom. Masena koncentracija TSO iznosila je 1000 mg L^{-1} te su iz te otopine nadalje pripravljene radne standardne otopine metoklopramida.

3.3.3. Priprema standardnih otopina metoklopramida za provjeru linearnosti u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi

Priprema standardnih otopina (SO) za provjeru linearnosti potekla je iz prethodno pripravljene temeljne standardne otopine. Pripravljeno je 10 standardnih otopina različitih koncentracija (0,05 mg L^{-1} , 0,1 mg L^{-1} , 0,25 mg L^{-1} , 0,5 mg L^{-1} , 0,75 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} , 2,5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , 7,5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1}). Za pripremu standardnih otopina korištene su tikvice od 10, 25 i 50 mL. Za MilliQ, izvorsku i morsku vodu priprema standardnih otopina bila je ista. U tikvicama od 10 mL pripravljene su SO masenih koncentracija 0,75 mg L^{-1} i 1 mg L^{-1} tako da su alikvoti uzeti iz TSO iznosili 7,5 μL i 10 μL . U tikvici od 25 mL pripravljena je SO masene koncentracije 0,5 mg L^{-1} tako da je

aliquot uzet iz TSO iznosio 12,5 μL . U tikvicama od 50 mL pripremljene su SO masenih koncentracija 0,05 mg L^{-1} , 0,1 mg L^{-1} , 0,25 mg L^{-1} , 2,5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , 7,5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} tako da su alikvoti uzeti iz TSO iznosili 2,5 μL , 5 μL , 12,5 μL , 125 μL , 250 μL , 375 μL , 500 μL . U sva tri tipa tikvica od 10, 25 i 50 mL, nakon dodatka TSO tikvice su napunjene do oznake odgovarajućom vodom: MilliQ, morskom i izvorskom.

Za samo mjerenje linearnosti pripremljene su po 3 otopine od svake navedene standardne otopine. Tako je pripremljeno po 33 otopina u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi, što čini sveukupno 99 standardnih uzoraka za analizu.

3.3.4. Priprema standardnih otopina metoklopramida za procjenu preciznosti

Za procjenu preciznosti (ponovljivost i međupreciznost) pripremili smo tri standardne otopine masenih koncentracija 0,09 mg L^{-1} , 2,25 mg L^{-1} i 5,5 mg L^{-1} . Koncentracije se nalaze unutar radnog područja, ali nisu korištene za izradu umjernog pravca kod provjere linearnosti. Sve tri otopine pripremane su u tikvicama od 50 mL izravno iz TSO uzimanjem alikvota od 4,5 μL za najnižu, 112,5 μL za srednju i 275 μL za najveću koncentraciju. Tikvice su nadopunjene do oznake MilliQ, morskom i izvorskom vodom.

a) Ponovljivost

Kod provjere ponovljivosti pripremljeno je 10 otopina za svaku prethodno pripremljenu koncentraciju u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi. Ukupno je pripremljeno 90 otopina.

b) Međupreciznost

Kod provjere međupreciznosti cijeli postupak pripreme otopina i analize rezultata ponovljen je kao i kod ponovljivosti dva dana poslije za sve tri koncentracije u sva tri uzorka vode.

3.3.5 Određivanje robusnosti

Kod određivanja robusnosti praćen je utjecaj promjene radnih uvjeta na površinu ispod pika, tj. na određivanu koncentraciju. Uvjeti koji su bili mijenjani su sastav pokretne faze, protok pokretne faze te napon kapilare. Početni sastav pokretne faze sadržavao je 85 % eluensa A te je njegov udio smanjen na 83,3 % i povećan na 86,7 %. Protok pokretne faze smanjen je na 0,19 mL min^{-1} i povećan na 0,21 mL min^{-1} sa početne vrijednosti od 0,20 mL min^{-1} . Što se tiče napona kapilare on je mijenjan za 50 V pa je tako sa početnog iznosa od 4000 V spušten na 3950 V i podignut na 4050 V. Sve promjene radnih uvjeta praćene su s otopinom masene koncentracije 5 mg L^{-1} u MilliQ vodi. Ispitivane su po tri otopine za svaku promjenu što znači ukupno 27 analiza.

3.3.6 Stabilnost otopine metoklopramida

Stabilnost otopine metoklopramida ispitivana je u vremenskom periodu od četiri tjedna, svaki tjedan jedno mjerenje. Ispitivanje je provedeno na otopinama masenih koncentracija 0,09 mg L^{-1} i 5,5 mg L^{-1} u MilliQ vodi. Sva ispitivanja provedena su iz istih otopina.

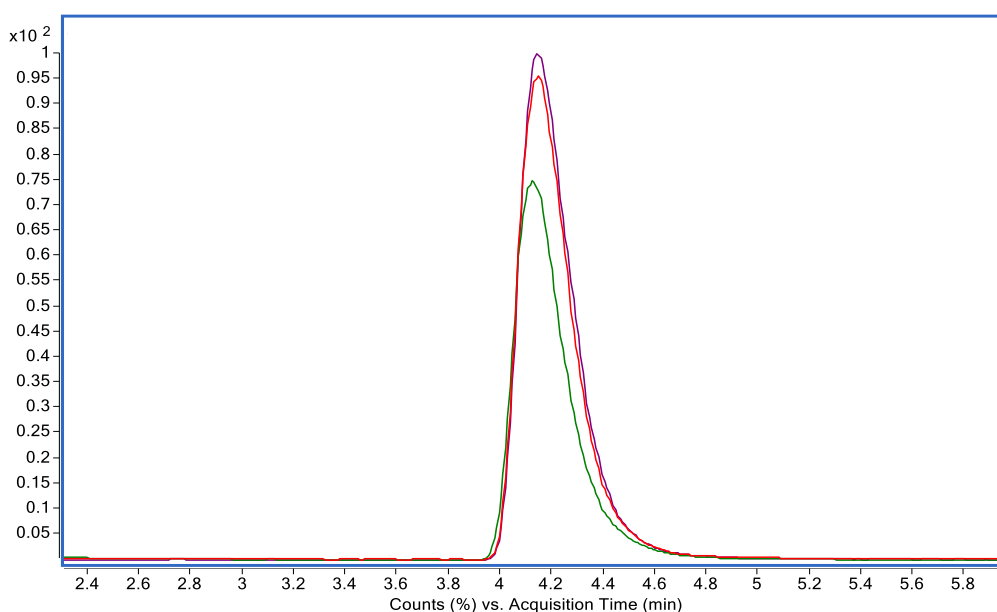
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija HPLC-MS/MS kromatografske metode za određivanje metoklopramida

Validacija metode nalaže postavljanje kriterija prihvatljivosti za izvedbene karakteristike. Kriteriji prihvatljivosti HPLC-MS/MS metode za određivanje metoklopramida prikazane su u tablici 25.

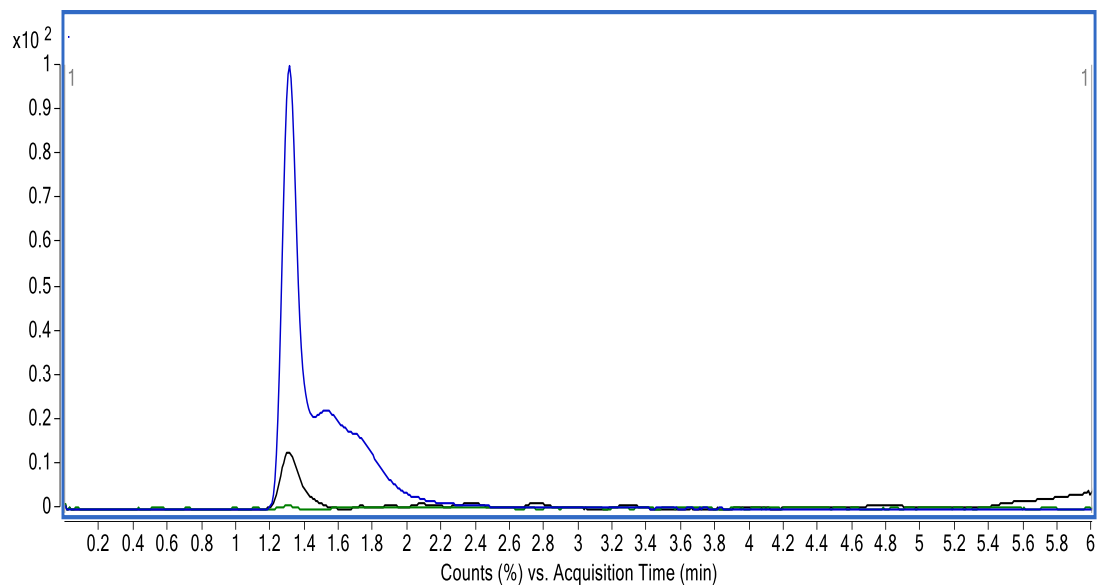
4.1.1 Selektivnost

Selektivnost metode određujemo usporedbom kromatograma standardnih i realnih uzoraka. Usporedbu kromatograma metoklopramida u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi vidimo na slici 14.



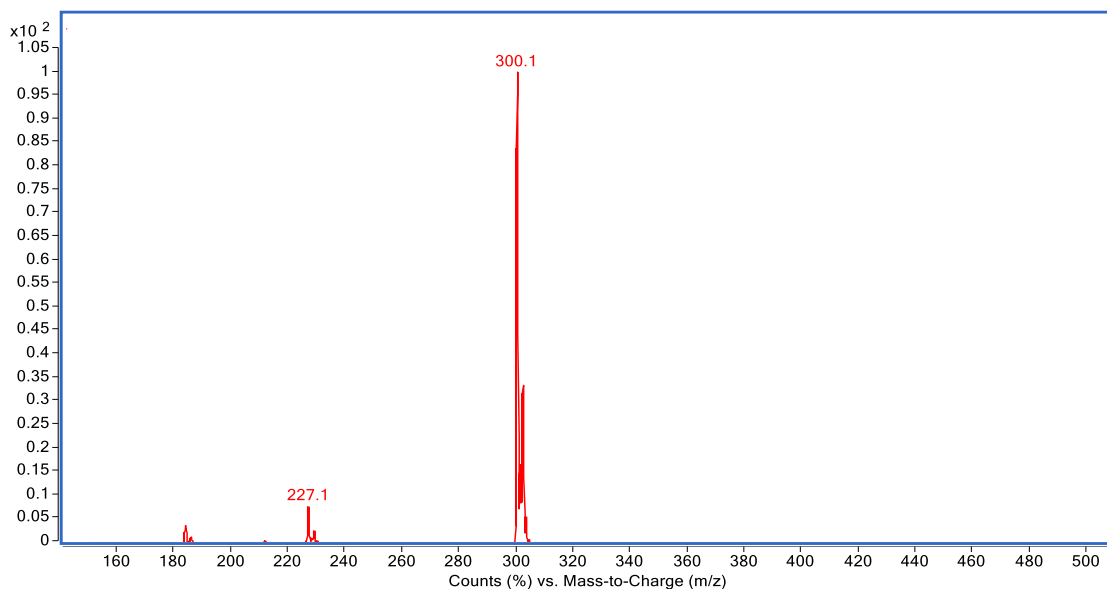
Slika 14. Preklopljeni kromatogrami MCP koncentracije 10 mg L^{-1} u sva tri uzorka realnih voda (crvena - MilliQ voda, plava - izvorska voda, zelena - morska voda)

Iz kromatograma vidimo kako se vrijeme zadržavanja ne razlikuje puno između uzoraka, te matica ne utječe na njegov pomak. Preklopljene kromatograme slijepih uzoraka vidimo na slici 15.

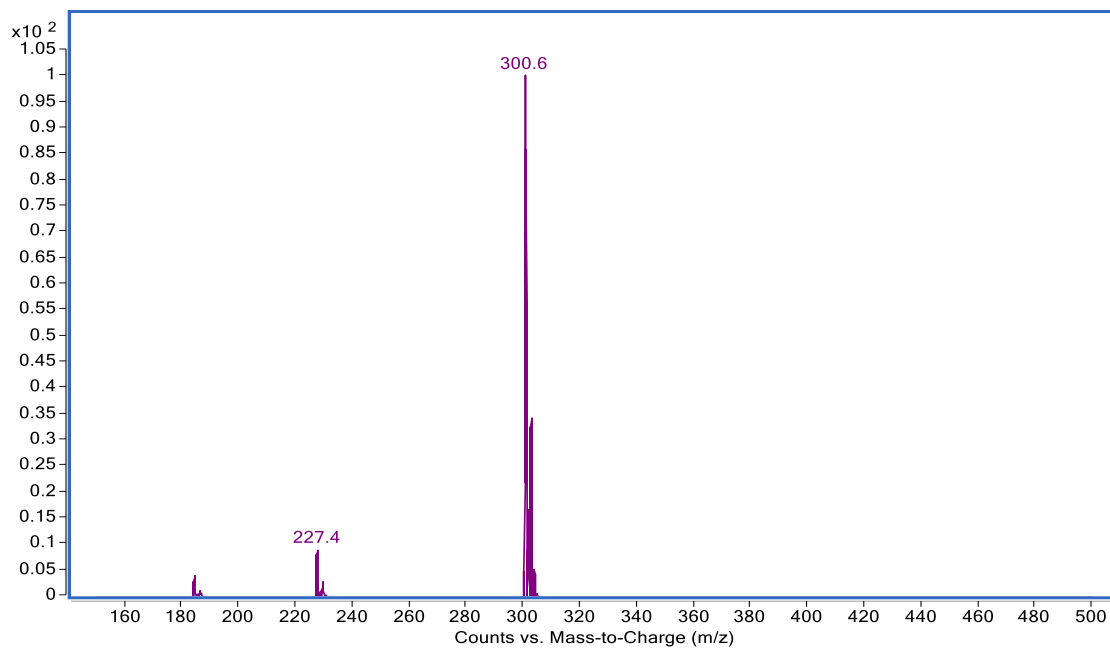


Slika 15. Kromatogrami slijepih uzoraka (plava - morska voda, crna - izvorska voda, zelena - MilliQ voda)

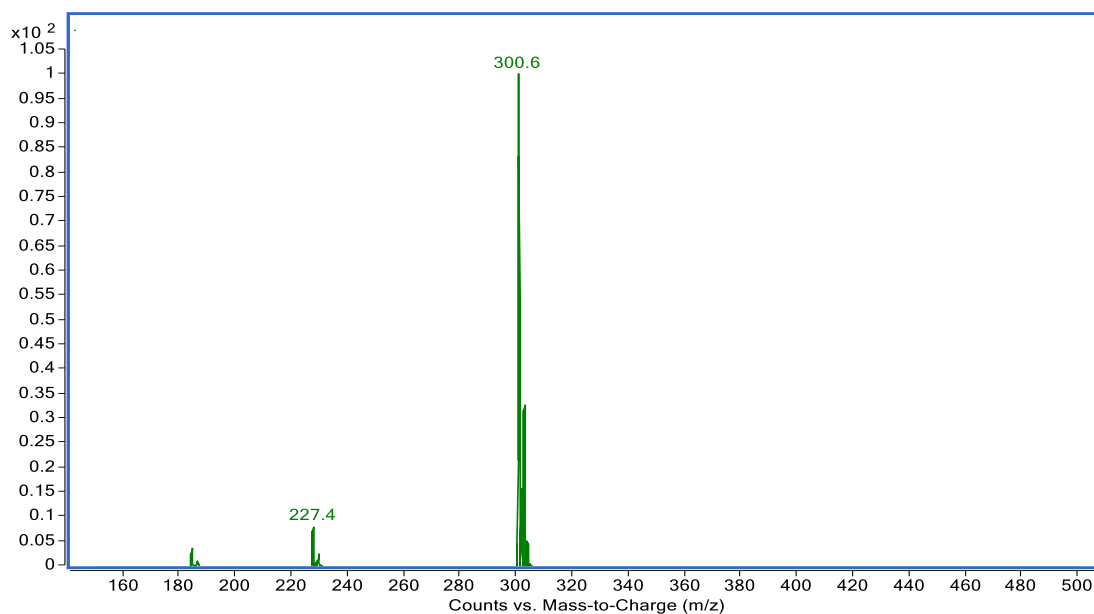
Iz kromatograma slijepih uzoraka možemo zaključiti kako matica ne sadrži interferencije koje eluiraju na istom vremenu zadržavanja kao i ispitivani analit, te potvrđuje da pikovi na slici 14. zaista jesu pikovi ispitivanog analita. Pikovi koji su prikazani na slici 15. potječu od pokretne faze i od matica. Kako bi potvrdili selektivnost metode potrebno je usporediti spektre masa u sve tri vode (slike 16 – 18).



Slika 16. Spektar masa u MilliQ vodi



Slika 17. Spektar masa u izvorskoj vodi



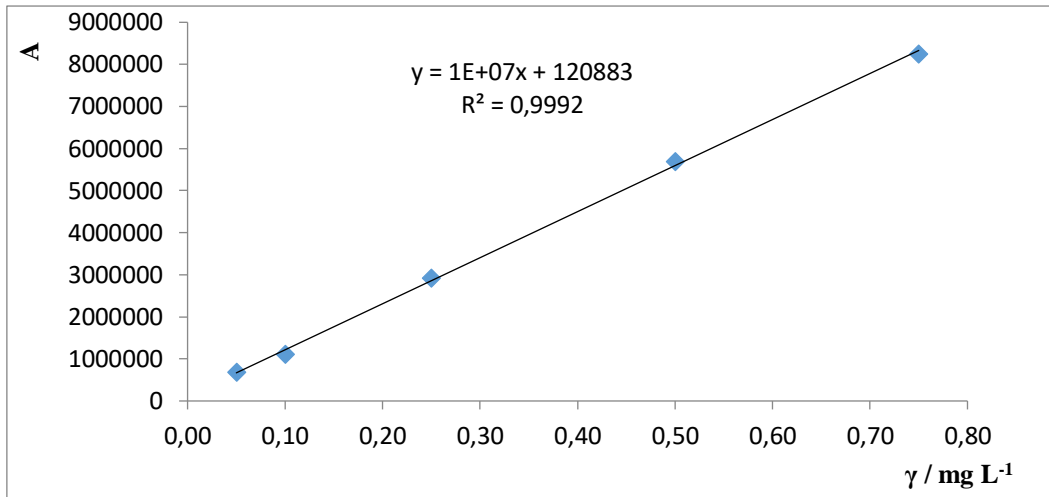
Slika 18. Spektar masa u morskoj vodi

Uz priložene kromatograme i spektre masa zaključuje se da je metoda selektivna.

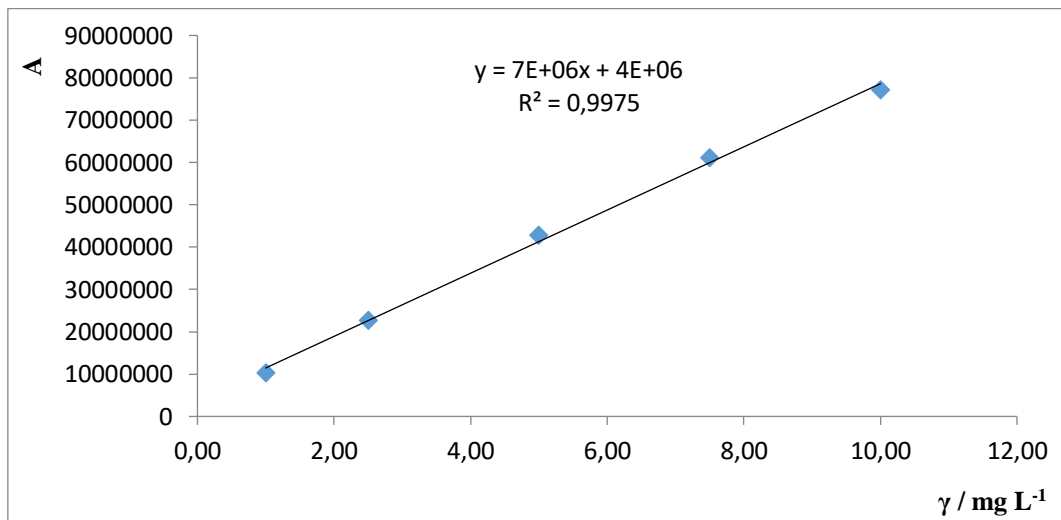
4.1.2 Linearnost

Linearnost je sposobnost metode da daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Utvrđena je određivanjem umjernog pravca. Za izradu umjernog pravca pripremljeno je i analizirano deset standardnih otopina poznatih koncentracija

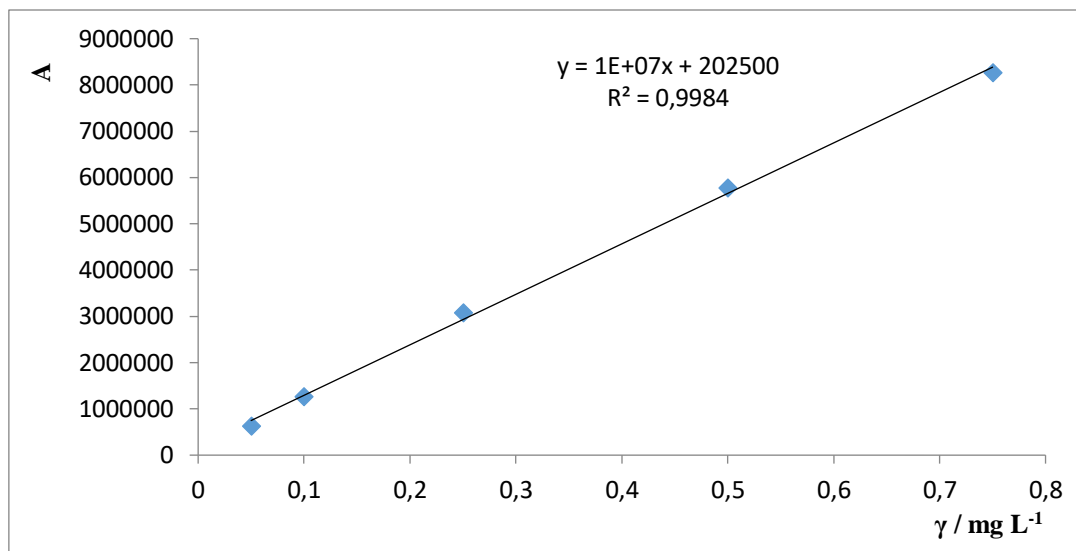
te su provedena tri mjerenja za svaku koncentraciju. Pošto se linearnost ne postiže u širokom rasponu koncentracija, svako područje za MilliQ, izvorsku i morsku vodu podijeljeno je u dva područja nižih ($0,05 \text{ mg L}^{-1} - 0,75 \text{ mg L}^{-1}$) i viših koncentracija ($1 \text{ mg L}^{-1} - 10 \text{ mg L}^{-1}$) u kojima je potvrđena linearna ovisnost. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 19. - 24. te u tablicama u prilogu (P1 - P3).



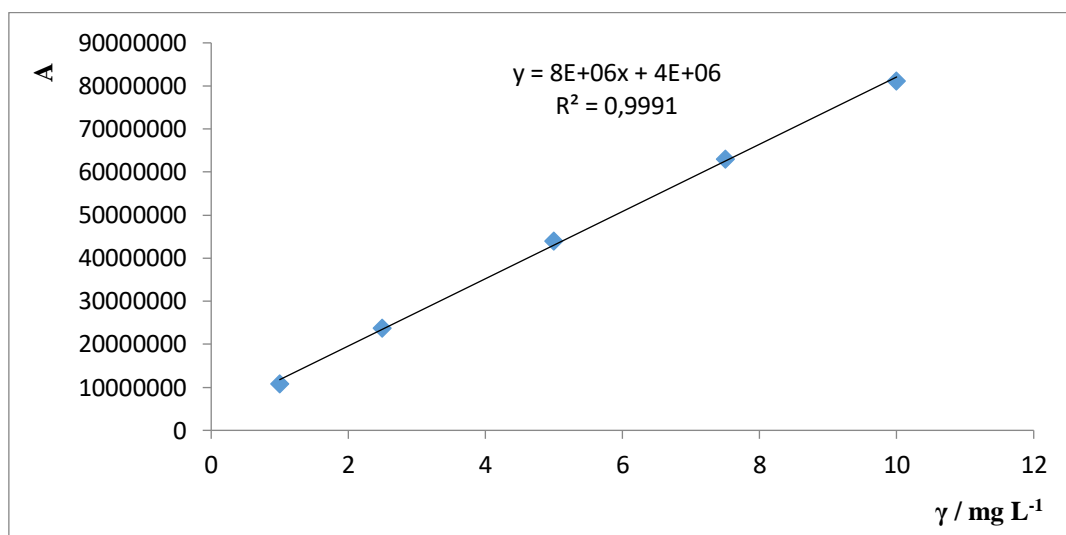
Slika 19. Umjerni pravac MCP u MilliQ vodi za niže koncentracijsko područje



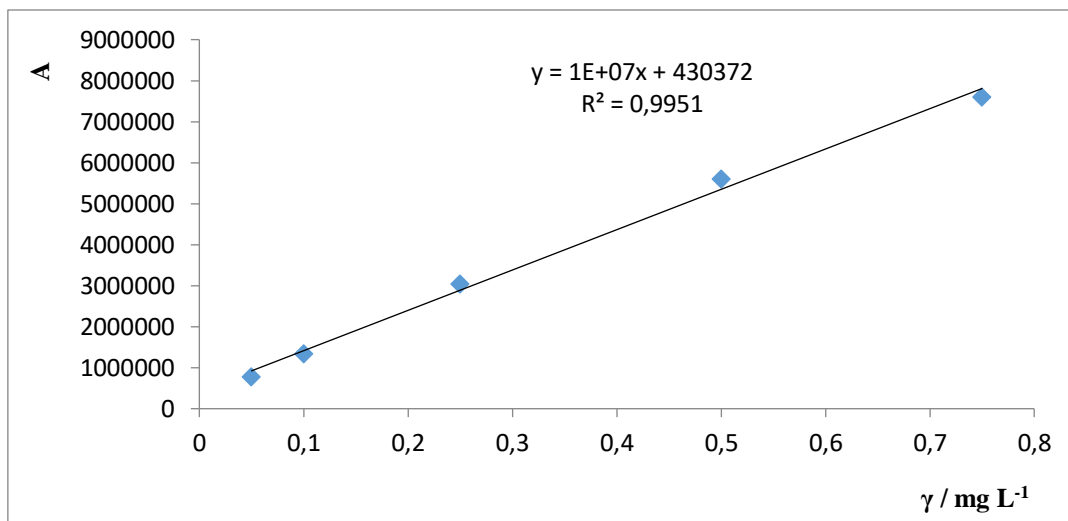
Slika 20. Umjerni pravac MCP u MilliQ vodi za više koncentracijsko područje



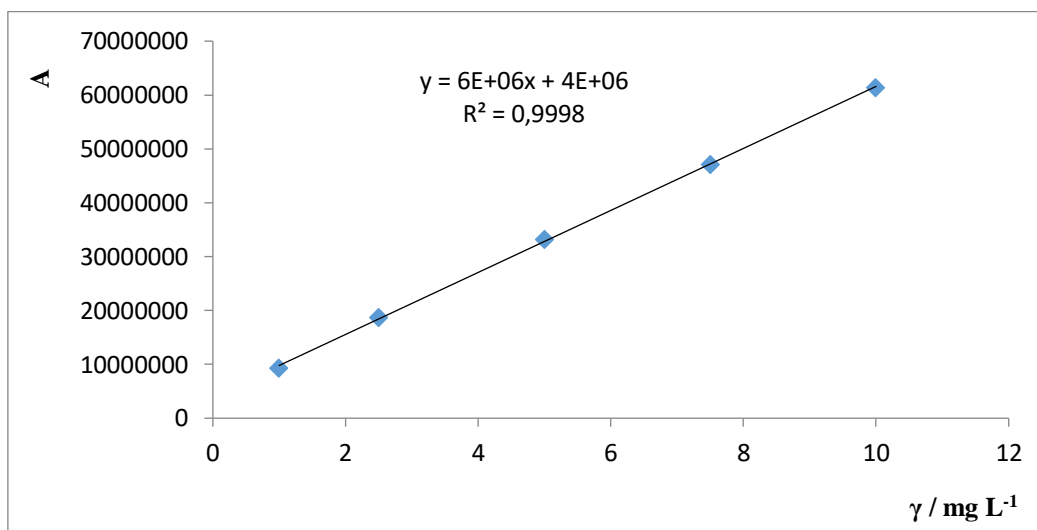
Slika 21. Umjerni pravac MCP u izvorskoj vodi za niže koncentracijsko područje



Slika 22. Umjerni pravac MCP u izvorskoj vodi za više koncentracijsko područje



Slika 23. Umjerni pravac MCP u morskoj vodi za niže koncentracijsko područje



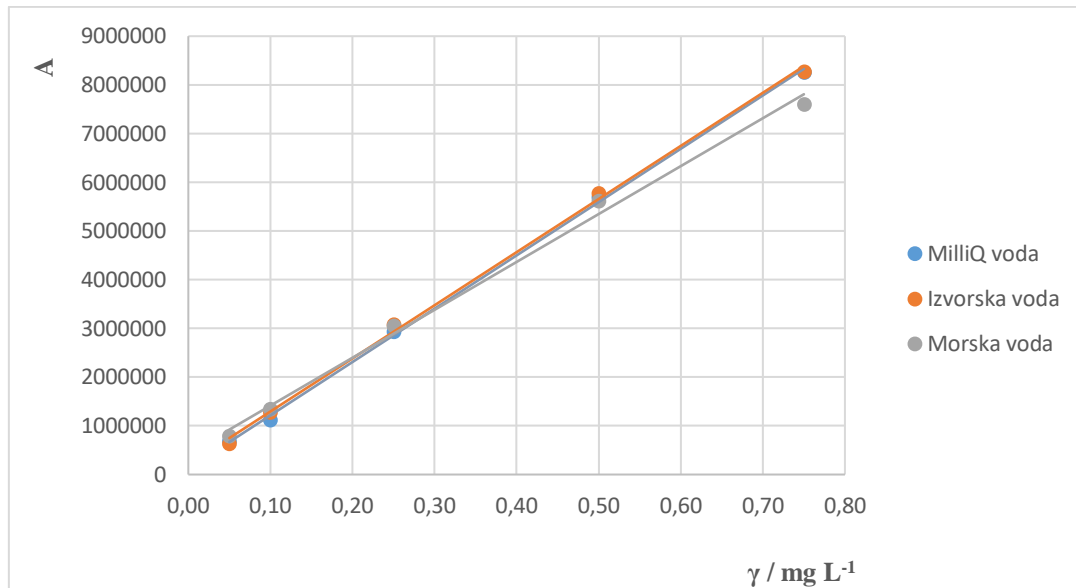
Slika 24. Umjerni pravac MCP u morskoj vodi za više koncentracijsko područje

Iz prethodnih grafova može se zaključiti kako u svim slučajevima, koeficijent determinacije zadovoljava postavljeni kriterij ($R^2 > 0,99$), čime potvrđujemo linearnost metode. Vidimo kako je faktor determinacije kod izvorske i morske vode veći u područjima viših koncentracija, dok je u slučaju MilliQ vode taj isti faktor veći u području nižih koncentracija. Razlog tome može biti utjecaj matrice izvorske i morske vode pri niskim koncentracijama ali i niz drugih faktora.

4.1.3. Osjetljivost

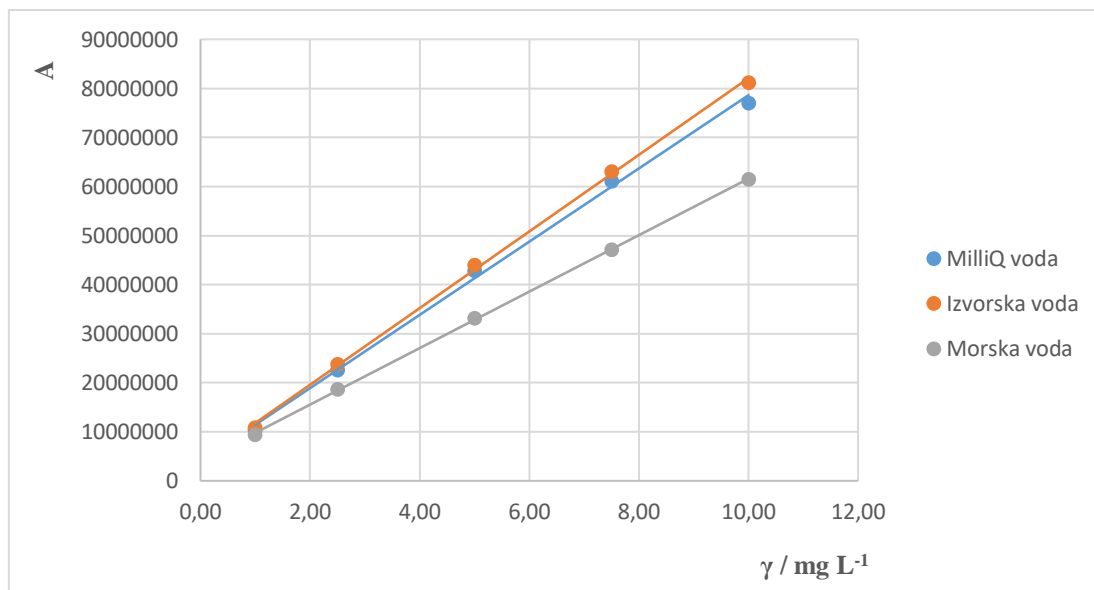
Osjetljivost metode definiramo kao mogućnost metode da prepozna male promjene u koncentraciji ispitivanog analita. U praksi, osjetljivost je nagib umjernog pravca i određuje se iz njegove jednadžbe. Usporedbu pravaca smo također podijelili u dva koncentracijska raspona kao i kod linearnosti. Usporedba umjernih pravaca MCP u

MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi za niže koncentracijske vrijednosti prikazana je na slici 25.



Slika 25. Usporedba umjernih pravaca MCP u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi pri nižem koncentracijskom području

Iz slike 25. vidimo kako se nagibi umjernih pravaca ne razlikuju puno. To se može potvrditi i iz dobivenih vrijednosti nagiba za niže koncentracijsko područje prikazanim na slikama 19,21 i 23, gdje se vidi kako su nagibi isti za sve ispitivane matice (1×10^7) pa nema potrebe statistički provjeravati njihovu razliku. Kod višeg koncentracijskog područja postoji mala razlika u vrijednostima nagiba (slike 20,22,24), što se vidi i iz same usporedbe umjernih pravaca (slika 26.), no treba se provjeriti je li ta razlika statistički značajna. Ne očekuje se da će razlika biti značajna zbog istog reda veličine ($\times 10^6$).



Slika 26. Usporedba umjernih pravaca MCP u MilliQ, izvorskoj i morskoj vodi pri višem koncentracijskom području

Statističkim t -testom provjeravamo razliku u nagibima, tj. ispitujemo nultu hipotezu prema kojoj nema razlike između nagiba, tj. da je srednja vrijednost dviju populacija jednaka. Test je proveden uz pretpostavku nejednakih varijanaca. Rezultati su prikazani u tablicama 3 – 5.

Tablica 3. Rezultat t -testa za MilliQ i izvorsku vodu uz pretpostavku nejednakih varijanaca

	MilliQ voda	Izvorska voda
Srednja vrijednost	42786794	44582783
Varijanca	7,44E+14	8,14E+14
Broj uzoraka	5	5
Stupnjevi slobode	8	
t_{stat}	-0,102	
t_{krit}	2,306	

Pošto je t_{stat} unutar intervala $[-t_{krit}, t_{krit}]$, točnije -0,102 nalazi se u intervalu između -2,306 i 2,306 ne trebamo odbacivati nultu hipotezu te potvrđujemo da je točna.

Tablica 4. Rezultat t -testa za MilliQ i morsku vodu uz pretpostavku nejednakih varijanaca

	MilliQ voda	Morska voda
Srednja vrijednost	42786794	33963217
Varijanca	7,44E+14	4,42E+14
Broj uzoraka	5	5
Stupnjevi slobode	8	
t_{stat}	0,573	
t_{krit}	2,306	

Pošto je t_{stat} unutar intervala $[-t_{krit}, t_{krit}]$, točnije 0,573 nalazi se u intervalu između -2,306 i 2,306 ne trebamo odbacivati nultu hipotezu te potvrđujemo da je točna.

Tablica 5. Rezultat t -testa za izvorsku i morsku vodu uz pretpostavku nejednakih varijanaca

	Izvorska voda	Morska voda
Srednja vrijednost	44582783	33963217
Varijanca	8,14E+14	4,42E+14
Broj uzoraka	5	5
Stupnjevi slobode	7	
t_{stat}	0,670	
t_{krit}	2,365	

Pošto je t_{stat} unutar intervala $[-t_{krit}, t_{krit}]$, točnije 0,670 nalazi se u intervalu između -2,365 i 2,365 ne trebamo odbacivati nultu hipotezu te potvrđujemo da je točna.

Iz sva tri t -testa i njihovih rezultata možemo zaključiti kako razlika između nagiba umjernih pravaca MilliQ, izvorske i morske vode nije statistički značajna.

4.1.4. Preciznost

Preciznost je definirana kao izraz slaganja između niza mjerenja iz istog homogenog uzorka te je definirana ponovljivošću i međupreciznošću.

a) Ponovljivost

Rezultati mjerenja ponovljivosti površine ispod pika te određivanja koncentracija kao i vremena zadržavanja prikazani su u tablicama 6 – 11 za MilliQ, izvorsku i morsku vodu. Kriterij prihvatljivosti pod uvjetima ponovljivosti je $RSD < 10\%$. Ukupni podaci mjerenja prikazani su u tablicama P4 – P12.

Tablica 6. Rezultati preciznosti pod uvjetima ponovljivosti za određivanje koncentracija MCP u MilliQ vodi

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{A}	Izračunata koncentracija, $\bar{\gamma} / \text{mg L}^{-1}$	$s (A)$	$s (\gamma)$	RSD (A) / %	RSD (γ) / %
0,09	1083804	0,087964	54130,52	0,004945	4,99	5,62
2,25	20895994	2,266075	556094,6	0,074531	2,66	3,29
5,5	45634315	5,58164	1044595	0,140002	2,29	2,51

Tablica 7. Rezultati preciznosti pod uvjetima ponovljivosti za određivanje koncentracija MCP u MilliQ vodi

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{t}_R / min	$s (t_R)$	RSD (t_R) / %
0,09	4.193	0,014	0,32
2,25	4.133	0,0156	0,38
5,5	4.081	0,010056	0,25

Tablica 8. Rezultati preciznosti pod uvjetima ponovljivosti za određivanje koncentracija MCP u izvorskoj vodi

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{A}	Izračunata koncentracija, $\bar{\gamma} / \text{mg L}^{-1}$	$s (A)$	$s (\gamma)$	RSD (A) / %	RSD (γ) / %
0,09	1163767	0,088118	60475,09	0,005544	5,20	6,29
2,25	22968820	2,432958	323351,1	0,041396	1,41	1,70
5,5	46441553	5,437961	720103,5	0,092188	1,55	1,70

Tablica 9. Rezultati preciznosti pod uvjetima ponovljivosti za određivanje koncentracija MCP u izvorskoj vodi

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{t}_R / min	$s (t_R)$	RSD (t_R) / %
0,09	4.190	0,008462	0,20
2,25	4.131	0,007863	0,19
5,5	4,086	0,010009	0,24

Tablica 10. Rezultati preciznosti pod uvjetima ponovljivosti za određivanje koncentracija MCP u morskoj vodi

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{A}	Izračunata koncentracija, $\bar{\gamma} / \text{mg L}^{-1}$	$s (A)$	$s (\gamma)$	RSD (A) / %	RSD (γ) / %
0,09	1097601	0,067831	39552,82	0,004021	3,61	5,93
2,25	17467074	2,334206	538979,2	0,093634	3,09	4,01
5,5	34745778	5,33595	533206,5	0,092631	1,53	1,74

Tablica 11. Rezultati preciznosti pod uvjetima ponovljivosti za određivanje koncentracija MCP u morskoj vodi

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{t}_R / min	$s (t_R)$	RSD (t_R) / %
0,09	4.148	0,008168	0,19
2,25	4.148	0,009787	0,24
5,5	4.138	0,075995	1,84

Relativno standardno odstupanje ponovljenih mjerenja površine pika za određivanje MCP HPLC-MS/MS metodom u MilliQ vodi iznosi 4,99 % za 0,09 mg L⁻¹, 2,66 % za 2,25 mg L⁻¹ i 2,29 % za 5,5 mg L⁻¹. U izvorskoj vodi ona iznosi 5,20 % u 0,09 mg L⁻¹, 1,41 % u 2,25 mg L⁻¹ i 1,55 % u 5,5 mg L⁻¹. Što se tiče morske vode, RSD iznosi 3,61 % u 0,09 mg L⁻¹, 3,09 % u 2,25 mg L⁻¹ te 1,53 % u 5,5 mg L⁻¹. Za sva tri slučaja (MilliQ,

izvorska i morska voda) zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za cijeli raspon koncentracija.

Relativno standardno odstupanje ponovljenih određivanja koncentracija MCP HPLC-MS/MS metodom u MilliQ vodi iznosi 5,62 % u 0,09 mg L⁻¹, 3,29 % za 2,25 mg L⁻¹ i 2,51 % u 5,5 mg L⁻¹. U izvorskoj vodi iznosi 6,29 % u 0,09 mg L⁻¹ te 1,70 % za 2,25 i 5,5 mg L⁻¹. Za morsku vodu vrijednosti RSD su 5,93 % za 0,09 mg L⁻¹, 4,01 % za 2,25 mg L⁻¹ te 1,74 % za 5,5 mg L⁻¹. Vidimo kako je i ovdje za sva tri slučaja zadovoljen kriterij prihvatljivosti za cijeli raspon koncentracija.

b) Međupreciznost

Međupreciznost je određena dva dana poslije sa otopinama istima kao i kod određivanja pod uvjetima ponovljivosti. Rezultati procjene međupreciznosti prikazani su u tablicama 12 – 17 za MilliQ, izvorsku i morsku vodu. Kriterij prihvatljivosti međupreciznosti je RSD < 15 %. Ukupni podaci mjerenja prikazani su u tablici P13 – P18.

Tablica 12. Rezultati procjene međupreciznosti za MilliQ vodu

Koncentracija pripremljenih otopina, γ / mg L ⁻¹	\bar{A}	Izračunata koncentracija, $\bar{\gamma}$ / mg L ⁻¹	$s(A)$	$s(\gamma)$	RSD (A) / %	RSD (γ) / %
0,09	1213465	0,099808	53086,97	0,00485	4,37	4,86
2,25	21441580	2,339197	674894,3	0,090453	3,15	3,87
5,5	46432282	5,688588	1306936	0,175163	2,81	3,08

Tablica 13. Rezultati procjene međupreciznosti za MilliQ vodu

Koncentracija pripremljenih otopina, γ / mg L ⁻¹	\bar{t}_R / min	$s(t_R)$	RSD (t_R) / %
0,09	4,396	0,050386	1,15
2,25	4,345	0,055983	1,29
5,5	4,259	0,074835	1,76

Tablica 14. Rezultati procjene međupreciznosti za izvorsku vodu

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{A}	Izračunata koncentracija, $\bar{\gamma} / \text{mg L}^{-1}$	$s(A)$	$s(\gamma)$	RSD (A) / %	RSD (γ) / %
0,09	1291531	0,09983	73232,76	0,006369	5,67	6,38
2,25	22462696	2,368164	401825,2	0,051442	1,79	2,17
5,5	44371133	5,172904	1026063	0,131358	2,31	2,54

Tablica 15. Rezultati procjene međupreciznosti za izvorsku vodu

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{t}_R / min	$s(t_R)$	RSD (t_R) / %
0,09	4,266	0,011255	0,26
2,25	4,201	0,013423	0,32
5,5	4,155	0,027304	0,66

Tablica 16. Rezultati procjene međupreciznosti za morsku vodu

Koncentracija pripremljenih otopina, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{A}	Izračunata koncentracija, $\bar{\gamma} / \text{mg L}^{-1}$	$s(A)$	$s(\gamma)$	RSD (A) / %	RSD (γ) / %
0,09	1242892	0,082601	69232,09	0,007038	5,57	8,52
2,25	16846365	2,226373	421612,1	0,073245	2,50	3,29
5,5	31961632	4,852274	558737,7	0,097067	1,75	2,00

Tablica 17. Rezultati procjene međupreciznosti za morsku vodu

Koncentracija pripremljenih otopina, γ / mg L ⁻¹	\bar{t}_R / min	s (t_R)	RSD (t_R) / %
0,09	4,278	0,016347	0,38
2,25	4,205	0,03639	0,87
5,5	4,322	0,046073	1,07

Relativno standardno odstupanje ponovljenih mjerenja površine pika za određivanje MCP u uvjetima međupreciznosti HPLC-MS/MS metodom u MilliQ vodi iznosi 4,37 % za 0,09 mg L⁻¹, 3,15 % za 2,25 mg L⁻¹ te 2,81 % za 5,5 mg L⁻¹. U izvorskoj vodi je 5,67 % za 0,09 mg L⁻¹, 1,79 % za 2,25 mg L⁻¹ i 2,54 % za 5,5 mg L⁻¹. Kod slučaja morske vode RSD iznosi 5,57 % za 0,09 mg L⁻¹, 2,50 % za 2,25 mg L⁻¹ te 1,75 % za 5,5 mg L⁻¹. Za sva tri slučaja (MilliQ, izvorska i morska voda) zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za cijeli raspon koncentracija.

Relativno standardno odstupanje ponovljenih određivanja koncentracija MCP u uvjetima međupreciznosti HPLC-MS/MS metodom u MilliQ vodi iznosi 4,86 % za 0,09 mg L⁻¹, 3,87 % za 2,25 mg L⁻¹, 3,08 % za 5,5 mg L⁻¹. U izvorskoj vodi RSD iznosi 6,38 % za 0,09 mg L⁻¹, 2,17 % za 2,25 mg L⁻¹ te 2,54 % za 5,5 mg L⁻¹. Što se tiče morske vode, RSD vrijednosti su 8,52 % za 0,09 mg L⁻¹, 3,29 % za 2,25 mg L⁻¹ i 2,00 % za 5,5 mg L⁻¹. Kao i u prethodnom primjeru, za sva tri slučaja zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za cijeli raspon koncentracija.

Iz rezultata vremena zadržavanja vidimo kako t_R ne pokazuje velike razlike u vrijednostima što nam govori kako je do maksimalnog odziva krivulje dolazilo uvijek u isto vrijeme. Trend koji se može isto može uočiti je taj da povećanjem koncentracije otopina, smanjuje se i relativno standardno odstupanje, izuzev malih odstupanja u jednom slučaju kod izvorske i morske vode.

4.1.5. Istinitost

Istinitost nam govori o slaganju tj. odstupanju srednje vrijednosti niza izmjerenih vrijednosti s referentnom vrijednosti. Istinitost je ispitivana sa standardnim otopinama istih koncentracija kao i kod određivanja preciznosti (0,09 mg L⁻¹, 2,25 mg L⁻¹ i 5,5 mg L⁻¹). Iz dobivenih umjernih pravaca dobivene su jednadžbe pravca. Iz srednje vrijednosti apsorbancije, koja je uvrštena u jednadžbu pravca, određena je masena koncentracija ispitivane otopine. Njenom usporedbom sa referentnom masenom koncentracijom, izračunatom na temelju odvage MCP i volumena pripremljene otopine, dobivena je vrijednost iskorištenja koja je izražena u postotku. Kako bi kriterij prihvatljivosti bio zadovoljen, iskorištenje (I) mora biti veće od 90 %. U MilliQ vodi iskorištenje za 0,09 mg L⁻¹ iznosi 97,73 %, za 2,25 mg L⁻¹ iznosi 100,71%, a za 5,5 mg L⁻¹ 101,48 %. U izvorskoj vodi iskorištenje za otopinu koncentracije 0,09 mg L⁻¹ iznosi 97,91 %, za 2,25 mg L⁻¹ iznosi 108,13 % a za 5,5 mg L⁻¹ 98,87 %. Što se tiče morske vode iskorištenje za otopinu koncentracije 0,09 mg L⁻¹ iznosi 75,37 %, 2,25 mg L⁻¹ iznosi 103,74 %, a za 5,5 mg L⁻¹ iskorištenje je 97,02 %. Kao što vidimo iz rezultata za

MilliQ i izvorsku vodu kriterij prihvatljivosti je zadovoljen za sve tri koncentracije, dok u morskoj vodi iskorištenje za otopinu koncentracije 0,09 mg L⁻¹ iznosi manje od 90%, te nije zadovoljen kriterij, dok je za preostale dvije koncentracije kriterij zadovoljen.

4.1.6. Granica kvantifikacije i granica detekcije

Iz jednadžbe (11) dobivene su vrijednosti s'_0 (MilliQ) = 0,001564 mg L⁻¹, s'_0 (Izvorska) = 0,001848 mg L⁻¹ i s'_0 (morska) = 0,001272 mg L⁻¹. Daljnjim izračunom iz jednadžbi (9 i 10) dobivene su vrijednosti za granice kvantifikacije i detekcije:

$$\text{GK (MilliQ)} = 0,0156 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{GD (MilliQ)} = 0,0052 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{GK (izvorska)} = 0,0185 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{GD (izvorska)} = 0,0061 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{GK (morska)} = 0,0127 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{GD (morska)} = 0,0042 \text{ mg L}^{-1}$$

4.1.7. Radno područje

Radno područje definira se intervalom unutar granica između kojih se analit u uzorku može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuće kriterije linearnosti, preciznosti i istinitosti. Pošto nisu provedeni eksperimenti ponovljivosti i istinitosti pri GK te nije potvrđeno da se nalazi u linearnom području (najniža točka umjernog pravca), za donju granicu radnog područja uzima se najniža točka umjernog pravca.

Tablica 18. Granice radnog područja metode za MilliQ, izvorsku i morsku vodu

	Donja granica / mg L ⁻¹	Gornja granica / mg L ⁻¹
MilliQ voda	0,05	10
Izvorska voda	0,05	10
Morska voda	0,05	10

4.1.8. Robusnost

Robusnost metode provjeravamo tako da ciljanom promjenom radnih uvjeta promatramo hoće li doći do promjene u odzivu analita. Rezultati mjerenja prikazani su u tablicama P19 i P20, a statističkim *t*-testom uz pretpostavku nejednakih varijanaca utvrđeno je postoji li značajna razlika kada se uvjeti izmijene (tablice 19 – 24). Pretpostavka nulte hipoteze je da nema razlike u vrijednostima.

Tablica 19. Rezultati t -testa nejednakih varijanaca za smanjenje sastava pokretne faze (83,3 % A)

	Sastav 85 %	Sastav 83,30 %
Srednja vrijednost	41459572	40534904
Varijanca	8,03E+11	1,29E+12
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	4	
t_{stat}	1,107	
t_{krit}	2,776	

Tablica 20. Rezultati t -testa nejednakih varijanaca za povećanje sastava pokretne faze (86,7 % A)

	Sastav 85 %	Sastav 86,70 %
Srednja vrijednost	41459572	42346552
Varijanca	8,03E+11	4,5E+10
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	2	
t_{stat}	-1,668	
t_{krit}	4,303	

Kao što se i vidi, i kod smanjenja i kod povećanja volumnog udjela eluensa A u pokretnoj fazi, t_{stat} vrijednost se nalazi u intervalu $[-t_{krit}, t_{krit}]$ i zbog toga ne odbacujemo nultu hipotezu, te možemo zaključiti kako nema značajne razlike u površinama pika nakon promjene sastava pokretne faze.

Tablica 21. Rezultati t -testa nejednakih varijanaca za smanjenje protoka pokretne faze (0,19 mL min⁻¹)

	Protok 0,2 mL min ⁻¹	Protok 0,19 mL min ⁻¹
Srednja vrijednost	41054282	39519647
Varijanca	6,79E+11	3,11E+11
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	4	
t_{stat}	2,671	
t_{krit}	2,776	

Tablica 22. Rezultati t -testa nejednakih varijanaca za povećanje protoka pokretne faze (0,21 mL min⁻¹)

	Protok 0,2 mL min ⁻¹	Protok 0,21 mL min ⁻¹
Srednja vrijednost	41054282	40672669
Varijanca	6,79E+11	4,36E+11
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	4	
t_{stat}	0,626	
t_{krit}	2,776	

Isto kao i kod promjene sastava pokretne faze, u oba slučaja smanjenja i povećanja protoka pokretne faze t_{stat} nalazi se u intervalu $[-t_{krit}, t_{krit}]$, što znači da i kod promjene ovog uvjeta nema značajne razlike u površinama pika.

Tablica 23. Rezultati t -testa nejednakih varijanaca za smanjenje napona kapilare (3950 V)

	Napon 4000 V	Napon 3950 V
Srednja vrijednost	42368670	42218530
Varijanca	2,03E+10	4,31E+10
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	4	
t_{stat}	1,032	
t_{krit}	2,776	

Tablica 24. Rezultati t -testa nejednakih varijanaca za povećanje napona kapilare (4050 V)

	Napon 4000 V	Napon 4050 V
Srednja vrijednost	42368670	42167960
Varijanca	2,03E+10	2,61E+11
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	2	
t_{stat}	0,656	
t_{krit}	4,303	

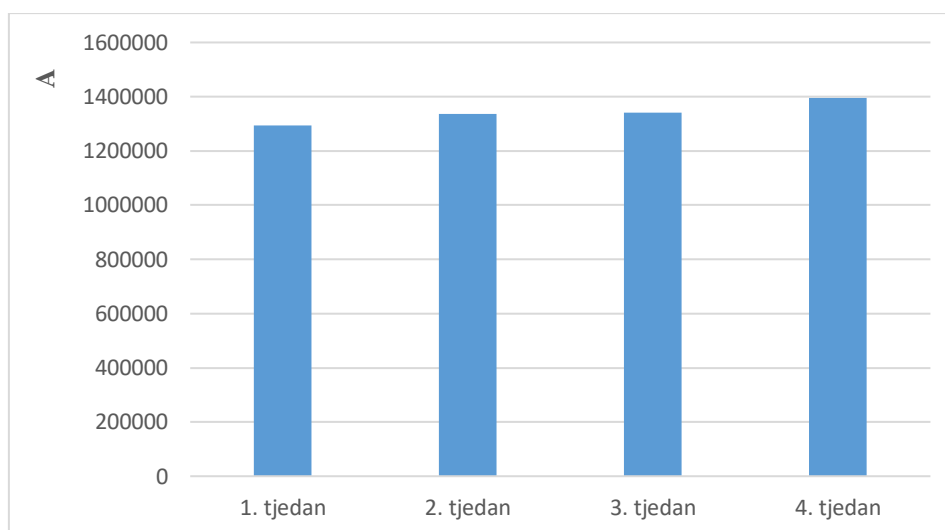
I kod promjene napona kapilare može se uočiti kako je vrijednost t_{stat} u intervalu $[-t_{krit}, t_{krit}]$, što znači da ne odbacujemo nultu hipotezu te da nema značajne promjene u površinama pika.

Za podatke vremena zadržavanja (tablica P20) isto možemo reći kako nema značajnih promjena u položaju pika na kromatogramu. Pri malim promjenama radnih uvjeta vidljive su male promjene i u položaju pika, npr. povećanjem sastava A, položaj pika će biti pomaknut prema većim, a smanjenjem sastava A prema manjim vrijednostima t_R . Iz promjene protoka vidimo kako pri manjim protocima MCP izlazi kasnije nego pri većim, dok kod promjene u naponu kapilare skoro pa i nema promjene.

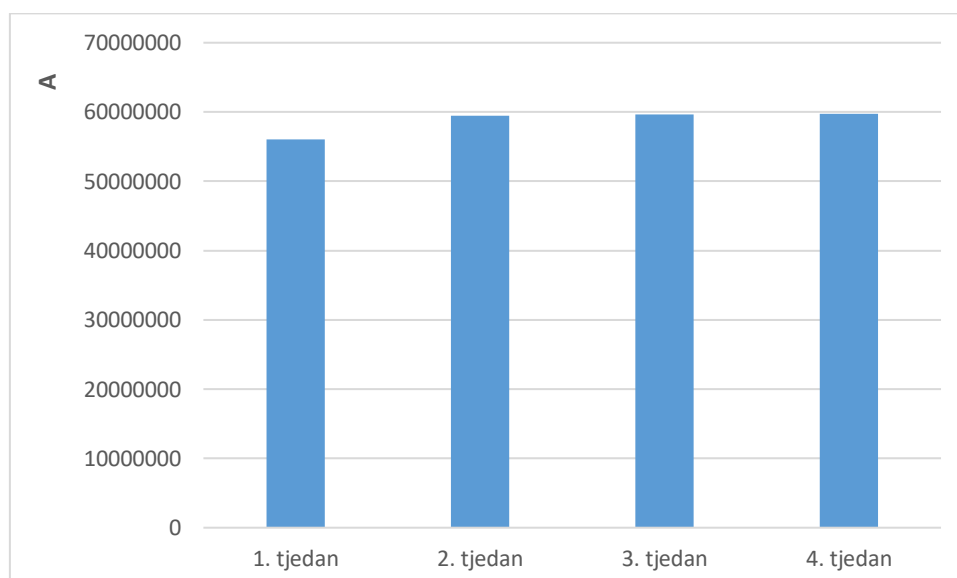
Ovakvi rezultati nam govore kako je metoda robusna te kako male promjene radnih uvjeta neće utjecati na rezultat analize.

4.1.9. Stabilnost otopine metoklopramida

Stabilnost otopine metoklopramida ispitivana je u razmaku od četiri tjedna, svaki tjedan po jedno mjerenje. Ispitivane su otopine koncentracija $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ i $5,5 \text{ mg L}^{-1}$ u MilliQ vodi, te su rezultati mjerenja prikazani u tablicama P21 i P22.



Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o broju dana za otopinu masene koncentracije $0,09 \text{ mg L}^{-1}$



Slika 28. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o broju dana za otopinu masene koncentracije $5,5 \text{ mg L}^{-1}$

Na temelju dobivenih rezultata u periodu od četiri tjedna možemo zaključiti kako je stabilnost standardne otopine MCP, obiju koncentracija zadovoljavajuća. Otopine ne pokazuju nikakve velike razlike u površinama kroz sva četiri tjedna. Nema smanjenja u površini ispod pika, tj. koncentracije kako bi se moglo zaključiti da je MCP sklon raspadu unutar 28 dana, a blagi porast u površini pika a samim time i koncentraciji možemo pripisati mogućem hlapljenju otopine pri samom tijeku analize dok su otopine bile na sobnoj temperaturi.

4.1.10. Sažetak rezultata

Tablica 25. Sažetak ukupnih rezultata ispitivanja metode

Izvedbena značajka	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat MilliQ / izvorska / morska	Zadovoljenost kriterija DA / NE
Specifičnost/selektivnost		Metoda je selektivna (Slike 14 - 18)	DA
Linearnost	$R^2 > 0,99$		
Niže koncentracije		0,9992 / 0,9984 / 0,9951	DA / DA / DA
Više koncentracije		0,9975 / 0,9991 / 0,9998	DA / DA / DA
Preciznost			
Ponovljivost	RSD < 10 %		
0,09 mg L ⁻¹		5,62 % / 6,29 % / 5,93 %	DA / DA / DA
2,25 mg L ⁻¹		3,29 % / 1,70 % / 4,01 %	DA / DA / DA
5,5 mg L ⁻¹		2,51 % / 1,70 % / 1,74 %	DA / DA / DA
Međupreciznost	RSD < 15 %		
0,09 mg L ⁻¹		4,86 % / 6,38 % / 8,52 %	DA / DA / DA
2,25 mg L ⁻¹		3,87 % / 2,17 % / 3,29 %	DA / DA / DA
5,5 mg L ⁻¹		3,08 % / 2,54 % / 2,00 %	DA / DA / DA
Istinitost	$\eta > 90 \%$		
0,09 mg L ⁻¹		97,73 % / 97,91 % / 75,37 %	DA / DA / NE
2,25 mg L ⁻¹		100,71 % / 108,13 % / 103,74 %	DA / DA / DA
5,5 mg L ⁻¹		101,4 % / 98,87 % / 97,02 %	DA / DA / DA
Granica kvantifikacije (GK) (mg L⁻¹)		0,0156 / 0,0185 / 0,0127	
Granica detekcije (GD) (mg L⁻¹)		0,0052 / 0,0061 / 0,0042	
Radno područje			
Donja granica (mg L ⁻¹)		0,05 / 0,05 / 0,05	
Gornja granica (mg L ⁻¹)		10 / 10 / 10	

Iz prikazane tablice možemo vidjeti kako su u većini slučajeva zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti metode, osim kod istinitosti za najnižu koncentraciju u uzorku morske vode gdje je iskorištenje manje od 90 %.

5. ZAKLJUČAK

Svrha ovog završnog rada bila je validacija HPLC-MS/MS metode za određivanje metoklopramida u uzorcima realnih voda. Validacija je provedena s uzorcima MilliQ, izvorske i morske vode, te su ispitivane izvedbene karakteristike metode i obradom rezultata provjeravani kriteriji prihvatljivosti.

Metoda se pokazala selektivnom za određivanje metoklopramida. Koeficijenti determinacije su za sva tri uzorka realnih voda $R^2 > 0,99$ što je potvrdilo linearnost te metode u dva koncentracijska područja (niže $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ – $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ i više 1 mg L^{-1} – 10 mg L^{-1}). Standard i matice oba uzorka pokazale su neznatne razlike između umjernih pravaca što nam daje zaključak kako nisu utjecale na osjetljivost metode, a to je potvrđeno statističkim *t*-testom. Kod slučaja preciznosti, metoda je uspješno zadovoljila kriterije prihvatljivosti preciznosti pod uvjetima ponovljivosti kao i međupreciznost. Parametrom iskorištenja dokazano je da metoda zadovoljava i kriterij prihvatljivosti istinitosti osim najniže koncentracije ($0,09 \text{ mg L}^{-1}$) uzorka morske vode. U razmaku od četiri tjedna potvrđena je i stabilnost otopine. Na temelju svih zaključaka možemo konačno zaključiti kako je metoda prihvatljiva za određivanje metoklopramida.

6. LITERATURA

- [1] M. Periša, S. Babić: Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. 65 (9-10) (2016) 471-482.
- [2] Metoclopramide, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4168> (pristup 05.07.2020.)
- [3] Metoclopramide, <https://www.nhs.uk/medicines/metoclopramide/> (pristup 06.07.2020.)
- [4] D. Ašperger, S. Babić, T. Bolanča, D. Mutavdžić Pavlović, Š. Ukić : Kromatografska analiza u sustavu kvalitete analitičkog procesa u Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Kem. Ind. 68 (9-10) (2019) 535-546.
- [5] D. A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, Mary Finch, 9. izdanje, 2004, str. 861 - 883. i 940 - 950.
- [6] L. S. Ettre, Nomenclature for Chromatography, Pure & Appl. Chem., Vol 65, No. 4, (1993) 819-872.
- [7] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217 - 235.
- [8] S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, 2002, IX.1.1, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, URL - http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/ (pristup 10.07.2020.)
- [9] L. R. Snyder, J.J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, John - Wiley & Sons, Orinda, CA, (1979) str. 221 - 229.
- [10] Md. S. Azim, M. Mitra, P. Bhasin: HPLC Method Development and Validation, Int. Res. J. Pharm. 2013 (4), str. 39 - 46.
- [11] T. Bolanča, Š. Ukić, Ionska kromatografija, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb 2013, str 79 - 80.
- [12] E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry; Principles and Applications, John Wiley & Sons, West Sussex, 2007, str. 167 - 181.
- [13] W. M. A. Niessen, D. Falck, Introduction to Mass Spectrometry, a Tutorial, u J. Kool, W. M. A. Niessen (ur.), Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry, Wiley, Weinheim, 2015, str. 1-54.
- [14] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, Med. Flum. 45 (2009) 218-232.
- [15] URL - https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/13_AK2_MS_i_sprengute_tehnike.pdf (pristup 20.07.2020)

[16] Eurachem Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second edition, 2014, str. 20 - 27.

[17] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, Svijet po mjeri, 1 (2012) 61-64.

[18] International Council for Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, European Medicines Agency, London, 1995, str. 4 - 7.

PRILOG

Tablica P1. Rezultati mjerenja linearnosti otopina MCP različitih koncentracija u MilliQ vodi

UZORAK	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}
1.	0,05	692246	644462	705840	680849
2.	0,10	1159495	1086738	1088104	1111446
3.	0,25	2903912	2912737	2958815	2925155
4.	0,50	5669937	5650348	5763215	5694500
5.	0,75	8249518	8327780	8186797	8254698
6.	1,00	10499844	10354405	10005729	10286659
7.	2,50	22350460	22960128	22638820	22649803
8.	5,00	42734931	43053074	42548453	42778819
9.	7,50	60956557	60642650	61820724	61139977
10.	10,00	76958038	77299387	76978712	77078712

Tablica P2. Rezultati mjerenja linearnosti otopina MCP različitih koncentracija u izvorskoj vodi

UZORAK	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}
1.	0,05	669913	592880	610742	624512
2.	0,10	1253457	1270544	1284725	1269575
3.	0,25	2973060	3185741	3069324	3076042
4.	0,50	5746933	5758570	5809978	5771827
5.	0,75	8222130	8282771	8305714	8270205
6.	1,00	10656581	11041389	10877364	10858445
7.	2,50	23524730	23591998	24132036	23749588
8.	5,00	43931411	44457787	43703954	44031051
9.	7,50	62266586	63994668	62913612	63058289
10.	10,00	82163838	81437469	80048322	81216543

Tablica P3. Rezultati mjerenja linearnosti otopina MCP različitih koncentracija u morskoj vodi

UZORAK	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}
1.	0,05	773953	825287	757116	785452
2.	0,10	1311094	1341499	1359289	1337294
3.	0,25	3053956	3028096	3066479	3049510
4.	0,50	5666649	5610581	5556474	5611235
5.	0,75	7619849	7532059	7644797	7598902
6.	1,00	9467306	9424556	9222647	9371503
7.	2,50	18788577	18852199	18470527	18703768
8.	5,00	34064728	32421514	33013118	33166453
9.	7,50	46809025	46936180	47682730	47142645
10.	10,00	60618563	61662629	62013962	61431718

Tablica P4. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 0,09 mg L⁻¹ u MilliQ vodi

UZORAK	A	γ / mg L ⁻¹	t _R / min
1.	1083979	0,0880	4,188
2.	1032783	0,0833	4,188
3.	1153111	0,0943	4,214
4.	1047074	0,0846	4,188
5.	1164580	0,0953	4,180
6.	1030908	0,0831	4,205
7.	1137588	0,0929	4,180
8.	1020178	0,0822	4,188
9.	1109914	0,0903	4,214
10.	1057923	0,0856	4,180
Srednja vrijednost	1083804	0,0880	4,193
SD	54130,52	0,0049	0,014
RSD / %	4,99	5,62	0,32

Tablica P5. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 2,25 mg L⁻¹ u MilliQ vodi

UZORAK	A	γ / mg L ⁻¹	t _R / min
1.	20203308	2,1732	4.120
2.	20354700	2,1935	4.120
3.	20559133	2,2209	4.137
4.	20944090	2,2725	4.120
5.	20615734	2,2285	4.146
6.	20515389	2,2151	4.129
7.	21660963	2,3686	4.129
8.	21112632	2,2951	4.171
9.	21099091	2,2933	4.129
10.	21894896	2,4000	4.129
Srednja vrijednost	20895994	2,2661	4,133
SD	556094,6	0,0745	0,0156
RSD / %	2,66	3,29	0,38

Tablica P6. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 5,5 mg L⁻¹ u MilliQ vodi

UZORAK	A	γ / mg L ⁻¹	t _R / min
1.	44479196	5,4268	4,077
2.	45923170	5,6204	4,086
3.	45000909	5,4967	4,069
4.	45069062	5,5059	4,077
5.	44849700	5,4765	4,103
6.	45453992	5,5575	4,069
7.	45200639	5,5235	4,077
8.	46238530	5,6626	4,086
9.	45970123	5,6266	4,086
10.	48157826	5,9199	4,077
Srednja vrijednost	45634315	5,5816	4,081
SD	1044595	0,140002	0,010056
RSD / %	2,29	2,51	0,25

Tablica P7. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 0,09 mg L⁻¹ u izvorskoj vodi

UZORAK	A	γ / mg L ⁻¹	t _R / min
1.	1233801	0,0945	4,188
2.	1255748	0,0965	4,197
3.	1176006	0,0892	4,197
4.	1213897	0,0927	4,188
5.	1160269	0,0878	4,188
6.	1126797	0,0847	4,188
7.	1083047	0,0807	4,197
8.	1114399	0,0836	4,171
9.	1109935	0,0832	4,197
10.	1866118	0,1525	4,18
Srednja vrijednost	1163767	0,0881	4,190
SD	60475,09	0,005544	0,008462
RSD / %	5,196497	6,29	0,20

Tablica P8. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 2,25 mg L⁻¹ u izvorskoj vodi

UZORAK	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	23140297	2,4549	4,129
2.	23750332	2,5330	4,137
3.	22898298	2,4239	4,146
4.	23099690	2,4497	4,120
5.	22944001	2,4298	4,129
6.	22942245	2,4296	4,129
7.	22837665	2,4162	4,129
8.	22597510	2,3854	4,129
9.	22647478	2,3918	4,120
10.	22830682	2,4153	4,137
Srednja vrijednost	22968820	2,4330	4,131
SD	323351,1	0,041396	0,007863
RSD / %	1,41	1,70	0,19

Tablica P9. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 5,5 mg L⁻¹ u izvorskoj vodi

UZORAK	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	46304109	5,4204	4,077
2.	45594703	5,3295	4,077
3.	45582911	5,3280	4,086
4.	46950935	5,5032	4,077
5.	45770212	5,3520	4,086
6.	46981072	5,5070	4,103
7.	45821701	5,3586	4,103
8.	47187316	5,5334	4,077
9.	47532544	5,5776	4,086
10.	46690027	5,4698	4,086
Srednja vrijednost	46441553	5,4380	4,086
SD	720103,5	0,092188	0,010009
RSD / %	1,55	1,70	0,24

Tablica P10. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 0,09 mg L⁻¹ u morskoj vodi

UZORAK	A	γ / mg L ⁻¹	t _R / min
1.	1089842	0,0670	4,222
2.	1048945	0,0629	4,214
3.	1094231	0,0675	4,197
4.	1154026	0,0736	4,205
5.	1106803	0,0688	4,222
6.	1061989	0,0642	4,205
7.	1088996	0,0670	4,205
8.	1044382	0,0624	4,205
9.	1142051	0,0723	4,205
10.	1144740	0,0726	4,205
Srednja vrijednost	1097601	0,0678	4,148
SD	39552,82	0,004021	0,008168
RSD / %	3,60	5,93	0,19

Tablica P11. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 2,25 mg L⁻¹ u morskoj vodi

UZORAK	A	γ / mg L ⁻¹	t _R / min
1.	17116575	2,2733	4,137
2.	16670685	2,1959	4,154
3.	16663850	2,1947	4,171
4.	17088965	2,2685	4,146
5.	17915850	2,4122	4,154
6.	17853413	2,4013	4,146
7.	17789700	2,3903	4,146
8.	18055802	2,4365	4,146
9.	17980103	2,4233	4,137
10.	17535795	2,3461	4,146
Srednja vrijednost	17467074	2,3342	4,148
SD	538979,2	0,093634	0,009787
RSD / %	3,09	4,01	0,24

Tablica P12. Rezultati mjerenja za ponovljivost otopina MCP koncentracije 5,5 mg L⁻¹ u morskoj vodi

UZORAK	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	35022378	5,3840	4,094
2.	35047165	5,3883	4,077
3.	35143283	5,4050	4,094
4.	34075303	5,2195	4,103
5.	34851317	5,3543	4,111
6.	34139565	5,2306	4,129
7.	34198555	5,2409	4,094
8.	34568348	5,3051	4,129
9.	34635480	5,3168	4,231
10.	35776390	5,5150	4,316
Srednja vrijednost	34745778	5,3359	4,138
SD	533206,5	0,092631	0,075995
RSD / %	1,53	1,74	1,84

Tablica P13. Rezultati mjerenja međupreciznosti u MilliQ vodi za otopine MCP koncentracija 0,09 i 2,25 mg L⁻¹

UZORAK	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	0,09	1215955	0,1000	4,370	2,25	20855674	2,2607	4,376
2.		1253951	0,1035	4,353		21064246	2,2886	4,210
3.		1115659	0,0909	4,47		21061072	2,2882	4,376
4.		1233709	0,1017	4,444		21499804	2,3470	4,284
5.		1196726	0,0983	4,444		20749811	2,2465	4,376
6.		1285057	0,1063	4,370		21327291	2,3239	4,376
7.		1238210	0,1021	4,353		21512660	2,3487	4,333
8.		1214177	0,0999	4,354		21099898	2,2934	4,378
9.		1132815	0,0924	4,344		22798932	2,5211	4,376
10.		1248394	0,1030	4,453		22446412	2,4739	4,360
Srednja vrijednost		1213465	0,0998	4,396		21441580	2,3392	4,345
SD		53086,97	0,00485	0,050386		674894,3	0,090453	0,055983
RSD / %		4,37	4,86	1,15		3,15	3,87	1,29

Tablica P14. Rezultati mjerenja međupreciznosti u MilliQ vodi za otopinu MCP koncentracije 5,5 mg L⁻¹

UZORAK	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	45132995	5,5145	4,325
2.	45879837	5,6145	4,318
3.	45596359	5,5766	4,325
4.	45255018	5,5308	4,325
5.	45851351	5,6107	4,325
6.	46611316	5,7126	4,256
7.	45930611	5,6214	4,197
8.	46599627	5,7110	4,197
9.	48906348	6,0202	4,197
10.	48559361	5,9737	4,125
Srednja vrijednost	46432282	5,6886	4,259
SD	1306936	0,175163	0,074835
RSD / %	2,81	3,08	1,76

Tablica P15. Rezultati mjerenja međupreciznosti u izvorskoj vodi za otopine MCP koncentracija 0,09 i 2,25 mg L⁻¹

UZORAK	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	0,09	1349524	0,1051	4,256	2,25	22509032	2,3741	4,197
2.		1318013	0,1023	4,274		22940295	2,4293	4,214
3.		1292148	0,0999	4,282		22202904	2,3349	4,214
4.		1239452	0,0951	4,256		22113150	2,3234	4,205
5.		1312790	0,1018	4,256		21947480	2,3022	4,180
6.		1399267	0,1097	4,282		22827002	2,4148	4,180
7.		1345558	0,1048	4,274		22191122	2,3334	4,214
8.		1272151	0,0981	4,256		22266718	2,3431	4,214
9.		1134895	0,0855	4,256		22443676	2,3657	4,197
10.		1251507	0,0962	4,265		23185580	2,4607	4,197
Srednja vrijednost		1291531	0,0998	4,266		22462696	2,3682	4,201
SD		73232,76	0,006369	0,011255		401825,2	0,051442	0,013423
RSD / %		5,67	6,38	0,26		1,79	2,17	0,32

Tablica P16. Rezultati mjerenja međupreciznosti u izvorskoj vodi za otopinu MCP koncentracije 5,5 mg L⁻¹

UZORAK	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	46143190	5,3998	4,146
2.	45801150	5,3560	4,146
3.	45011293	5,2549	4,146
4.	44295865	5,1633	4,171
5.	44400470	5,1767	4,137
6.	43535717	5,0660	4,154
7.	44088831	5,1368	4,171
8.	43986043	5,1236	4,129
9.	42825755	4,9751	4,128
10.	43623015	5,0771	4,220
Srednja vrijednost	44371133	5,1729	4,155
SD	1026063	0,131358	0,027304
RSD / %	2,31	2,54	0,66

Tablica P17. Rezultati mjerenja međupreciznosti u morskoj vodi za otopine MCP koncentracija 0,09 i 2,25 mg L⁻¹

UZORAK	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	A	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	t_R / min
1.	0,09	1266383	0,0850	4,274	2,25	17175506	2,2836	4,222
2.		1325073	0,0910	4,291		17507935	2,3413	4,257
3.		1304571	0,0889	4,256		17376808	2,3185	4,239
4.		1112059	0,0693	4,256		16808207	2,2197	4,197
5.		1261061	0,0844	4,274		16397744	2,1484	4,197
6.		1310518	0,0895	4,299		16307548	2,1328	4,222
7.		1214580	0,0797	4,299		16806958	2,2195	4,120
8.		1149298	0,0731	4,265		16525135	2,1706	4,197
9.		1227757	0,0811	4,274		16491201	2,1647	4,197
10.		1257615	0,0841	4,291		17066612	2,2646	4,205
Srednja vrijednost		1242892	0,0826	4,278		16846365	2,2264	4,2053
SD		69232,09	0,007038	0,016347		421612,1	0,073245	0,03639
RSD / %		5,57	8,52	0,38		2,52	3,29	0,87

Tablica P18. Rezultati mjerenja međupreciznosti u morskoj vodi za otopinu MCP koncentracije 5,5 mg L⁻¹

UZORAK	A	γ / mg L ⁻¹	t _R / min
1.	32036004	4,8652	4,325
2.	31844188	4,8319	4,316
3.	32217986	4,8968	4,325
4.	32100953	4,8765	4,325
5.	31667377	4,8012	4,333
6.	31457685	4,7647	4,316
7.	31559402	4,7824	4,414
8.	31100847	4,7027	4,325
9.	32782254	4,9948	4,220
10.	32849624	5,0065	4,325
Srednja vrijednost	31961632	4,8523	4,3224
SD	558737,7	0,097067	0,046073
RSD / %	1,75	2,00	1,07

Tablica P19. Rezultati mjerenja promjene radnih uvjeta otopine MCP koncentracije 5 mg L⁻¹ u uzorku MilliQ vode

	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}
Sastav 83,30 %	39246468	40964420	41393825	40534904
Sastav 85 %	41786851	40445706	42146160	41459572
Sastav 86,70 %	42120910	42376638	42542108	42346552
Protok 0,19 mL min⁻¹	38896486	39690377	39972079	39519647
Protok 0,20 mL min⁻¹	40163291	41210369	41789186	41054282
Protok 0,21 mL min⁻¹	40591793	40056152	41370061	40672669
Napon kapilare 3950 V	42075479	42456761	42123349	42218530
Napon kapilare 4000 V	42209810	42410532	42485667	42368670
Napon kapilare 4050 V	42083403	42715681	41704797	42167960

Tablica P20. Rezultati mjerenja promjene radnih uvjeta otopine MCP koncentracije 5 mg L⁻¹ u uzorku MilliQ vode

	t _{R1}	t _{R2}	t _{R3}	\bar{t}_R
Sastav 83,30 %	4,180	4,197	4,180	4,186
Sastav 85 %	4,180	4,197	4,222	4,200
Sastav 86,70 %	4,198	4,272	4,354	4,275
Protok 0,19 mL min ⁻¹	4,185	4,244	4,253	4,227
Protok 0,20 mL min ⁻¹	4,18	4,222	4,222	4,208
Protok 0,21 mL min ⁻¹	4,109	4,198	4,158	4,155
Napon kapilare 3950 V	4,146	4,180	4,197	4,174
Napon kapilare 4000 V	4,180	4,180	4,197	4,186
Napon kapilare 4050 V	4,163	4,180	4,180	4,174

Tablica P21. Rezultati mjerenja stabilnosti otopine MCP koncentracije 0,09 mg L⁻¹ u vremenskom periodu od četiri tjedna

UZORAK	A (1. tjedan)	A (2. tjedan)	A (3.tjedan)	A (4.tjedan)
1.	1818712	1286222	1200449	1347572
2.	1303055	1310199	1386557	1253184
3.	1398703	1320578	1339481	1383018
4.	1153063	1378988	1343172	1396842
5.	1351593	1291638	1338040	1402147
6.	1353190	1352256	1346981	1417950
7.	1278958	1317332	1281557	1481482
8.	1254781	1339472	1402437	1464647
9.	1246774	1400034	1438433	1412836
10.	1303055	1358217	1325792	1391737
Srednja vrijednost	1293686	1335494	1340290	1395142

Tablica P22. Rezultati mjerenja stabilnosti otopine MCP koncentracije 5,5 mg L⁻¹ u vremenskom periodu od četiri tjedna

UZORAK	A (1. tjedan)	A (2. tjedan)	A (3.tjedan)	A (4.tjedan)
1.	54700244	59254829	59506737	59361842
2.	56737956	59000406	60691244	58399712
3.	56245401	58125029	60483229	58674448
4.	56118760	60564122	59151421	59820044
5.	57457040	58739202	61075256	60496501
6.	56382404	59692764	59512607	62279860
7.	55161187	59839769	59987457	58907416
8.	57540856	59627292	58744128	59139957
9.	55542764	59157246	59208960	59575426
10.	54254397	60559873	58522232	60568961
Srednja vrijednost	56014101	59456053	59688327	59722417