

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje smjese farmaceutika u vodi

Čakić, Leona

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:149:715995>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Leona Čakić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Leona Čakić

**RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRFSKE
METODE ZA ODREĐIVANJE SMJESE
FARMACEUTIKA U VODI**

ZAVRŠNI RAD

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

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

dr. sc. Kristina Tolić Čop

dr. sc. Ida Boček Pavlinac

Zagreb, rujan 2023.

Iskrene zahvale mojoj mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na pruženoj prilici za rad pod njezinim mentorstvom, na ukazanom povjerenju i svim savjetima i prijedlozima tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala asistentici, dr. sc. Kristini Tolić Čop na prenesenom znanju, savjetima, podršci i na svom vremenu provedenom sa mnom u labosu.

Zahvaljujem dragoj gospođi Anici Vlašić-Anić, dr. sc. na korekturi ovoga rada.

Najveću zahvalu upućujem roditeljima, sestri, ostaloj obitelji i prijateljima te Marinu na beskrajnoj podršci, utjehama i ohrabrenjima.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović.

SAŽETAK

RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRAFSKE METODE ZA ODREĐIVANJE SMJESE FARMACEUTIKA U VODI

Farmaceutici u okolišu i njihovo praćenje dva su značajna problema uzrokovana sve većim razvitkom farmaceutske industrije. Ovi spojevi u okolišu podliježu strukturnim promjenama pa tako mogu uzrokovati sinergijsko djelovanje s drugom tvari ili pak kemijski reagirati. Njihovo praćenje nužno je za pravovremeno sprječavanje ozbiljnijih posljedica.

U ovom radu prikazani su i objašnjeni razvoj i validacija kromatografske tekućinske metode na HPLC-DAD uređaju u svrhu detekcije, identifikacije i kvantifikacije farmaceutika u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi. Smjesa se sastojala od sljedećih farmaceutika: amoksisicilin, atenolol, prokain, ofloksacin, sulfametazin, sulfametoksazol, torasemid, karbamazepin, deksametazon, β -estradiol, diazepam i diklofenak. Razvijena je metoda gradijentna. Za nepokretnu fazu koristi Kinetex 5 μ m kolonu, a za pokretnu odabrani su voda kao anorganska i acetonitril kao organska faza. Mjerenje se provodilo pri valnim duljinama od 230, 240, 254, 275 i 290 nm, određenima snimanjem apsorpcijskih spektara farmaceutika u smjesi.

Razvijena metoda validirana je eksperimentima u svrhu ispitivanja analitičkih značajki te metode, koje uključuju: linearnost metode, granice detekcije i kvantifikacije farmaceutika, osjetljivost, preciznost, istinitost, radno područje i robusnost metode. Svi eksperimenti provedeni su pomoću otopina farmaceutika u deioniziranoj i vodovodnoj vodi.

Ključne riječi: *kromatografija, metoda, validacija, farmaceutici, vodovodna voda*

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHARMACEUTICALS MIXTURE IN WATER

Pharmaceuticals found in water and their monitoring seem to be two common problems due to the growth of pharmaceutical industry. These compounds can often interfere and act in synergy with other substances or materials. Pharmaceutical monitoring becomes inevitable in order to prevent serious consequences beforehand.

This present work deals with the development and validation of a liquid chromatographic method performed with the instrument HPLC-DAD for the detection, identification and quantification of pharmaceuticals in deionized and tap water. Mixture of pharmaceuticals used in this work includes amoxicilin, atenolol, procaine, ofloxacin, sulfamethazine, sulfametoxazole, torasemide, carbamazepine, dexamethazone, β -estradiol, diazepam and diclofenac. The developed method is gradient-based. A Kinetex 5 μ m column was chosen as the stationary phase. The mobile phase consisted of water as the inorganic component and acetonitrile as the organic component. The measurement was performed under defined conditions, at wavelengths of 230, 240, 254, 275 and 290 nm, which were selected based on the absorption maximums.

The developed method was validated by experiments to investigate validation parameters, such as linearity, limit of detection, limit of quantitation, sensitivity, precision, accuracy, range and robustness. All experiments were performed for pharmaceutical mixtures in both deionized and tap water.

Key Words: *chromatography, method, validation, pharmaceuticals, tap water*

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPĆI DIO | |
| 2.1. FARMACEUTICI | 2 |
| 2.1.1. Antibiotici | 2 |
| 2.1.2. β -blokatori | 3 |
| 2.1.3. Lokalni anestetici | 3 |
| 2.1.4. Diuretici | 4 |
| 2.1.5. Antiepileptici | 4 |
| 2.1.6. Kortikosteroidi | 4 |
| 2.1.7. Hormonska nadomjesna terapija | 4 |
| 2.1.8. Anksiolitici | 5 |
| 2.1.9. Nesteroidni protuupalni lijekovi | 5 |
| 2.2. FARMACEUTICI U OKOLIŠU | 5 |
| 2.3. KROMATOGRAFIJA | 7 |
| 2.3.1. Općenito o kromatografiji | 7 |
| 2.3.2. Podjela kromatografije | 8 |
| 2.3.3. Kromatografski sustav i parametri razdvajanja | 9 |
| 2.3.4. Visokoučinkovita tekućinska kromatografija s nizom dioda (HPLC-DAD) | 11 |
| 2.4. VALIDACIJA | 12 |
| 2.4.1. Svrha i načini provedbe | 12 |
| 2.4.2. Izvedbene značajke metode | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | |
| 3.1. MATERIJALI | 14 |
| 3.1.1. Kemikalije | 14 |
| 3.1.2. Kolona | 14 |
| 3.1.3. Vodovodna voda | 14 |
| 3.1.4. Farmaceutici | 15 |
| 3.2. INSTRUMENTI | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.3. OPIS RADA | |
| 3.3.1. Priprema temeljne standardne otopine farmaceutika | 30 |
| 3.3.2. Priprema temeljne standardne otopine i razrjeđenja za linearnost u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi | 30 |
| 3.3.3. Priprema standardne otopine i razrjeđenja za preciznost u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi | 30 |
| 3.3.4. Priprema radnih otopina za robusnost | 30 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | |
| 4.1. APSORPCIJSKI SPEKTRI FARMACEUTIKA | 31 |
| 4.2. LINEARNOST | 32 |
| 4.3. GRANICE DETEKCIJE I GRANICE KVANTIFIKACIJE | 41 |
| 4.4. OSJETLJIVOST | 42 |
| 4.5. SELEKTIVNOST | 43 |
| 4.6. PRECIZNOST | 44 |
| 4.7. ISTINITOST | 49 |
| 4.8. RADNO PODRUČJE | 56 |
| 4.9. ROBUSTNOST | 57 |
| 4.10. SAŽETAK REZULTATA | 59 |
| 5. ZAKLJUČAK | 71 |
| 6. LITERATURA | 73 |
| 7. ŽIVOTOPIS | 75 |

1. UVOD

Eksponencijalni razvoj industrije, posebice farmaceutske i kemijske, predstavlja veliki napredak čovječanstva. Razvoj novih spojeva, lijekova i proizvoda nužan je za normalno funkcioniranje modernog društva, a iziskuje velike količine sirovina, od kojih je većina organskoga podrijetla. Bilo koji takav proces, osim primarnim produktima, rezultira i ogromnim količinama otpada koji se, nerijetko otopljen u vodi, ispušta u okoliš. Praćenje ispuštanja ove vrste otpada u okoliš jedna je od glavnih tema aktivne strategije Zaštite okoliša.

Monitoring otpadnih voda u Republici Hrvatskoj sveden je na minimum. Prema *Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda*, za propisane maksimalne emisije pri proizvodnji farmaceutskih i kemijskih proizvoda dani su jednaki parametri, svojstveniji kemijskoj, nego li farmaceutskoj industriji, s obzirom da *Pravilnikom* nije propisana emisija niti jednog farmaceutika.

Vrlo je važno pridavati sve više značaja farmaceuticima kao novim zagađivalima, istraživati njihov utjecaj na okoliš te razvijati nove metode njihova praćenja, kao i ograničiti njihove emisije. Stoga, ovaj se rad bavi upravo razvojem i validacijom kromatografske metode za određivanje smjese, koju čine neki od najčešće upotrebljivanih farmaceutika.

2. OPĆI DIO

2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutici su farmakološki aktivni, složeni organski spojevi čija je upotreba u konstantnom usponu. U humanoj se medicini najčešće upotrebljavaju za liječenje bolesti i zdravstvenu zaštitu, a u veterini kao promotori rasta. Uza sve prednosti njihova korištenja, farmaceutici predstavljaju sve češći oblik zagađivala, posebice vodenog okoliša zbog svoje rezistentnosti i otpornosti na biorazgradnju. [1]

Najčešća je klasifikacija farmaceutika s obzirom na njihovu biološku aktivnost i svrhu. Primjerice, to su: antibiotici korišteni u liječenju bakterijskih upala i infekcija, analgetici za smanjenje boli te antineoplastici, poznatiji kao citostatici, za smanjenje rasta tumorskih stanica. Klasifikacija s obzirom na kemijsku strukturu uzima u obzir aktivni farmaceutski sastojak (API)¹ pa tako antibiotike dijelimo na β -laktame, peniciline, kinoline, cefalosporine itd. Ostale podjele uključuju način djelovanja aktivne tvari (MOA)². Na primjer, neke od podgrupa antineoplastika su antimetaboliti i alkilirajući agensi, koji se prema molekulskim strukturama mogu uvelike razlikovati pa tako i drukčije djelovati na okoliš. [2]

2.1.1. Antibiotici [3]

Antibiotici su kemoterapeutske agensi koji usporavaju ili sprječavaju rast mikroorganizama poput bakterija ili gljivica. Inicijalno je ovaj naziv obuhvaćao sve spojeve s biološkom aktivnošću protiv živućih organizama, no danas se odnosi isključivo na tvari s antibakterijskim, antigljivičnim i antiparazitskim djelovanjem.

2.1.1.1. Penicilini

➤ Amoksisilin [4, 5]

Amoksisilin je protuupalni lijek iz skupine aminopenicilina. Kako im samo ime govori, aminopenicilini sadrže amino skupinu vezanu na α -ugljiku postraničnog lanca molekule. Najčešća je primjena amoksisilina u liječenju bakterijskih infekcija i upala poput bronhitisa, infekcija uha, grla i urinarnog trakta, tifusa i gonoreje. Može se primjenjivati u obliku uljnih suspenzija, tableta, peroralnih pasta ili vodotopljivih prašaka.

¹ eng. *active pharmaceutical ingredient*, API

² eng. *mode of action*, MOA

2.1.1.2. Kinoloni

➤ Ofloksacin [6]

Ofloksacin je racemat ekvimolarne smjese levofloksacina i dekstrofloksacina. Poznati je fluorokinolon za liječenje bakterijskih infekcija urinarnog trakta, kože i mekih tkiva te sepse i gonoreje. U strukturi ima i dodatni morfolinski prsten i kiralni centar.

2.1.1.3. Sulfonamidi

➤ Sulfametazin [7]

Bijeli kristalinični prah sulfametazina djeluje antibakterijski i protuupalno. Riječ je o sulfonamidu s pirimidinom, metilnim supstituentom i aminobenzensulfonamidnom grupom. Na okoliš djeluje negativno te ga ubrajamo u ksenobiotike i okolišna zagađivala.

➤ Sulfametoksazol [5, 8]

Izoksazolnu molekulu sulfametoksazola čini metilna skupina na petom položaju i 4-benzensulfonamidni supstituent na trećem. Ovaj bakteriostatski sulfonamidni antibiotik zajedno s folnom kiselinom, poznatijom kao vitamin B9, djeluje usporavajući rast bakterija. Najčešće se primjenjuje u kombinaciji s trimetoprimom i kao takav se koristi u liječenju upale pluća, toksoplazmoze i nokardioze.

2.1.2. β -blokatori

➤ Atenolol [9]

Atenolol je kardioblokator druge generacije, β_1 - selektivan lijek, koji se široko primjenjuje u snižavanju visokog krvnog tlaka i liječenju angine pectoris. Sintetizirani je derivat izopropil-aminopropanola.

2.1.3. Lokalni anestetici

➤ Prokain [10]

Kao dietilaminoetilni derivat *p*-aminobenzojeve kiseline, poznat i pod nazivom *novokain*, prokain ima antiaritmička svojstva. Najčešće se koristi kao lokalni anestetik, depresor središnjeg živčanog sustava te kao lijek za periferni živčani sustav.

2.1.4. Diuretici

➤ Torasemid [5, 11]

Torasemid je diuretik Henleove petlje, strukturno piridin-sulfonilurea. Koristi se kao antihipertenzivni agens, a čest je izbor i u terapiji za liječenje srčanog zatajivanja. Inhibira $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ suprijenosnik u uzlaznom traku Henleove petlje.

2.1.5. Antiepileptici

➤ Karbamazepin [12]

Karbamazepin, poznat i kao *Tegretol*, nositelj je karbamoilne skupine na azepinskom dušiku. Pripada skupini antiepileptika, koji djeluju na presinaptički i postsinaptički neuron, a koristi se kod kronične boli i bipolarnog poremećaja.

2.1.6. Kortikosteriodi

➤ Deksametazon [13]

Ovaj sintetički kortikosteroid na devetom položaju ugljikova atoma nosi atom fluora te tri hidroksilne skupine na položajima 11-, 17-, 21-. Čest je u sastavu lijekova za tretiranje endokrinih, reumatskih, dermatoloških, hematoloških i alergijskih poremećaja. Procjena funkcije nadbubrežne žlijezde provodi se pomoću testa supresije deksametazona.

2.1.7. Hormonska nadomjesna terapija

➤ β -estradiol [14]

Ovaj je spoj prirodni hormon prisutan u tijelu žena, a u obliku farmaceutika koristi se u svrhu terapije kod slučajeva preniske koncentracije estrogena u organizmu. Izlučuje se i u obliku metabolita *Daphnie magne*.

2.1.8. Anksiolitici

➤ Diazepam [5, 15]

Diazepam je psihotropna tvar, supstituirana klorom, metilnom i fenilnom skupinom na pozicijama 7-,1- i 5-. Uvršten je u skupinu ksenobiotika, a koristi se kao anksiolitik. Čestu primjenu pronalazi kod sportaša kao miorelaksans.

2.1.9. Nesteroidni protuupalni lijekovi

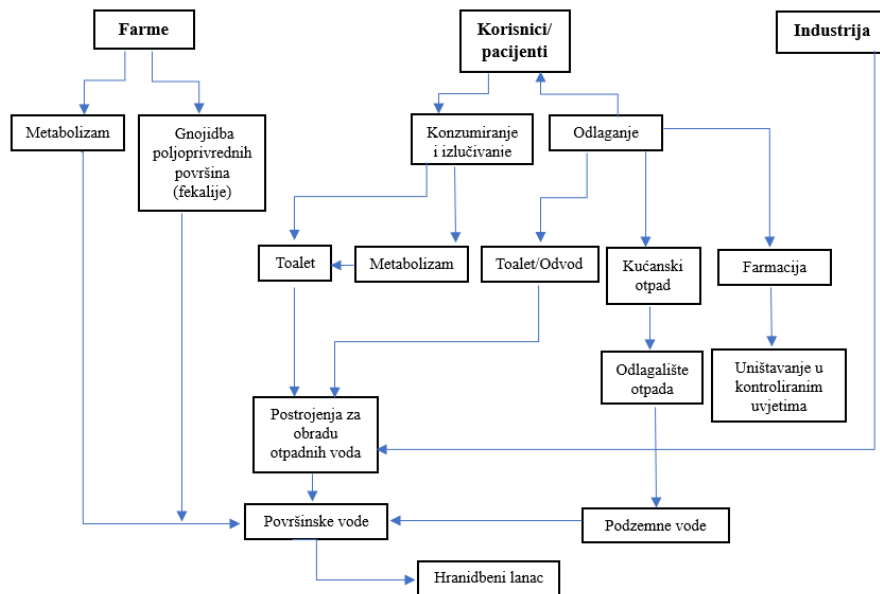
➤ Diklofenak [16]

Diklofenak je metilacetatna kiselina supstituirana (2,6-diklorofenil)amino skupinom na drugom položaju. Derivat je feniloctene kiseline. Uvršten je među ksenobiotike, a najčešće se koristi kao nesteroidni protuupalni lijek.

2.2. FARMACEUTICI U OKOLIŠU [1, 17]

Osim u podzemnim i površinskim vodama, farmaceutike često pronalazimo i u tlu, sedimentu i vodovodnoj vodi. Nerijetko nedovoljno obrađene, industrijske otpadne vode predstavljaju glavni izvor organskih i anorganskih štetnih tvari u okolišu, među kojima farmaceutici bivaju „novim zagađivalima“. Ovaj se pridjevak odnosi na tvari koje se do sada nisu smatrale zagađivalima te za koje ne postoji zakonska regulativa, a ispuštaju se u okoliš u količinama potencijalno opasnim za ekosustav. Još neki izvori njihova dospijeća u okoliš obuhvaćaju otpadne vode iz kućanstava, farmi, bolnica, odlagališta otpada te metabolite. **Slika 2.1.** prikazuje glavne izvore farmaceutika u okolišu.

Mnogi farmaceutici u ljudskom tijelu podliježu strukturnim promjenama, a njihovim izlučivanjem iz organizma zajedno s ostalim tvarima čine metabolite. Nadalje, njihovim dospijećem u okoliš moguće su slijedeće promjene biotičkim ili abiotičkim procesima razgradnje. Navedenim je procesima moguć nastanak novih stabilnih spojeva s kojima prvotni farmaceutici mogu djelovati sinergijski. Neka su istraživanja pokazala veću koncentraciju farmaceutika u izlaznom toku postrojenja za obradu otpadne vode nego li na ulaznom toku, što se najčešće pripisuje gore opisanim promjenama.



Slika 2.1. Izvori farmaceutika u okolišu [18]

Glavninu problema praćenja farmaceutika u okolišu pronalazimo u izostanku zakonskih regulativa kojima bi trebale biti definirane njihove granične vrijednosti u otpadnim vodama. Brojna istraživanja pokazuju zabrinjavajuće vrijednosti koncentracija farmaceutika u vodama. Primjerice, njemačko istraživanje rezultiralo je koncentracijama karbamazepina, diklofenaka i sulfametoksazola u vrijednostima 6,3, 2,1 i 2 $\mu\text{g/L}$ u uzorku efluenta te 1,1, 1,2 i 0,48 $\mu\text{g/L}$ u površinskoj vodi. [19] Kanadski znanstvenici proveli su istraživanje fitotoksičnog djelovanja čak 25 farmaceutika, od toga 22 iz skupine antibiotika, na vodenoj biljci *Lemma Gibba*. Zanimljivo je kako su isključivo farmaceutici iz skupina fluorokinolona, sulfonamida i tetraciklina pokazali najštetnije djelovanje. [20] Još jedan zabrinjavajući problem predstavlja torasemid, koji je prema ICPR³-u već uvršten u posebni program monitoringa rijeke Rajne, a pronađen je i u podzemnim vodama podno bivšeg postrojenja za obradu otpadnih voda, a u manjoj koncentraciji pronađen je i u pitkoj vodi. [21] Niske koncentracije farmaceutika i produkata njihove razgradnje, kao i fizikalne i kemijske karakteristike poput polarnosti, netopljivosti i nestabilnosti predstavljaju ograničavajuće faktore u izboru metode njihova određivanja. Neke od najprimjenjivanijih su plinska i tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) zajedno sa spektrometrijom masa (MS). Ipak je tekućinska kromatografija pronašla najširu primjenu upravo zbog mogućnosti određivanja polarnih i termolabilnih spojeva. Uz navedene, još jedna prednost HPLC-MS metode je i mogućnost određivanja molekulske mase spoja. Uzimajući u obzir važnost praćenja količine farmaceutika

³ eng. *International Commission for the Protection of the Rhine*, ICPR

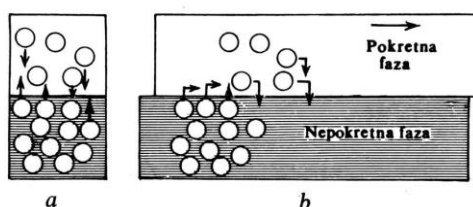
u okolišu, posebna se pozornost posvećuje razvoju novih metoda određivanja s ciljem smanjenja njihova utjecaja na okoliš.

2.3. KROMATOGRAFIJA

2.3.1. Općenito o kromatografiji [22]

Kao najučinkovitija separacijska tehnika, kromatografija je čest izbor analitičara u slučajevima potrebe razdvajanja sastojaka ispitivanog uzorka. Svoj naziv dobila je kombinacijom grčkih riječi *χρώμα* [hroma] i *γράφειν* [grafein], čije značenje možemo interpretirati kao *pisanje bojom*. Ta sintagma već odaje da je riječ o zaostalim tragovima komponenata, a ovaj fenomen prvi je otkrio Mihail Cvet, ruski botaničar i biokemičar, 1900. godine u svom istraživanju pigmenata klorofila i ksantofila. U svom eksperimentu rabio je staklenu kolonu ispunjenu kalcijevim karbonatom.

Osim odjeljivanja, metoda je i analiziranja tvari prema različitoj sorpciji sastojaka smjese na pogodnom sorbensu, na koji se površinski vežu ili ih sorbens upija. Prilikom odjeljivanja karakteristično je reverzibilno djelovanje – molekule se, nošene pokretnom fazom, kontinuirano sorbiraju i desorbiraju iz nepokretne faze. Ovaj mehanizam prikazan je **slikom 2.2.**



Slika 2.2. Raspodjela tvari među fazama: *a* dinamička ravnoteža između mirujućih faza ; *b* model procesa [22]

Ta rutinska metoda jednostavna je i primjenjiva u mnogim analizama, a kromatografski uređaji ubrajaju se u standardnu laboratorijsku opremu. Osim odjeljivanja i određivanja sastojaka smjese, koristi se i za određivanje termodinamičkih i kinetičkih veličina ispitivanih tvari. Još jedna prednost je mogućnost regeneracije ispitivanih tvari, a nakon izoliranja one izlaze kromatografski čiste. Važno je spomenuti i činjenicu kako se kromatografskom analizom mogu izolirati i analizirati tvari čija prisutnost u analitu inicijalno nije pretpostavljena.

2.3.2. Podjela kromatografije [23]

Kromatografiju, upravo zbog široke primjene i svojstava, možemo podijeliti glede tri kriterija:

➤ **Podjela s obzirom na prirodu ravnoteže između dviju faza:**

- **razdjelna** – pri kojoj se ravnoteža uspostavlja između dvije faze, obje kapljevite, od kojih je nepokretna vezana na inertni čvrsti nosač
- **adsorpcijska** – za koju je karakteristična adsorpcija molekula na površinu adsorbensa te ravnoteža između čvrste nepokretne i pokretne faze, a potonja može biti kapljevina ili plin
- **afinitetna** – čiji naziv upućuje na interakcije ispitivanih molekula s ligandom, kemijski vezanim za površinu nepokretne faze te definiranim rasporedom u prostoru
- **isključenjem** – kod koje se molekule analita razdvajaju prolazeći kroz pore nepokretne faze, točno definiranih dimenzija, na temelju razlike u molekulskoj masi i volumenu
- **ionoizmjenjivačka** – pri kojoj se razdvajaju različiti ioni na temelju razlike u afinitetima prema ionskim izmjenjivačima

➤ **Podjela na temelju sastava pokretne faze:**

- **plinska** – s inertnim plinom kao pokretnom fazom
- **tekućinska** – kod koje je pokretna faza kapljevina male viskoznosti
- **fluidna u superkritičnim uvjetima** – uz kapljevinu iznad svoje kritične temperature i tlaka

➤ **Podjela prema obliku kromatografske podloge**

- **kromatografija na stupcu** – podrazumijeva gusto pakiranje znatog praška velike specifične površine u kromatografskom stupcu
- **plošna kromatografija:**
 - **tankoslojna** – kod koje je nepokretna faza nanosena na inertnu podlogu kao tanak homogeni film
 - **kromatografija na papiru** – ona koja za nepokretnu fazu koristi poseban kromatografski papir

2.3.3. Kromatografski sustav i parametri razdvajanja [23]

Pokretna i nepokretna faza te ispitivani uzorak čine kromatografski sustav. Gibanjem pokretne faze narušava se prethodno uspostavljena dinamička ravnoteža spoja između dviju faza, što uzrokuje selektivno gibanje skupina molekula zajedno s pokretnom fazom. Vrijeme zadržavanja pojedinih molekula u nepokretnoj fazi ključno je za mogućnost razdvajanja smjese i kao takvo predstavlja jedan od kromatografskih parametara. Optimalan izbor pokretne i nepokretne faze predstavlja najbitniji uvjet uspješne separacije komponenata.

Nepokretna faza uvijek je kruti ili kapljevit sorbens nošen inertnom krutinom, najčešće staklom, metalnom ili plastičnom folijom. Razlikujemo više vrsta sorbensa, poput polarnih i nepolarnih anorganskih, polarnih i nepolarnih vezanih te polarnih organskih. Pitanje izbora nepokretne faze rješava se analizirajući prirodu ispitivanog spoja, prirodu ravnoteže procesa i vrstu veze između spoja i podloge. Od brojnih opcija, ipak je najčešći odabir silikagel zbog mogućnosti kemijske modifikacije njegovih podloga.

Za uspješnu razdiobu potrebno je odabrati i pogodan sustav otapala pokretne faze, a njih dijelimo u skupine s obzirom na to tvore li vodikove veze. Otapala mogu biti: tekućine čije su molekule povezane višestrukim vodikovim vezama; iste koje mogu tvoriti vodikovu vezu i s molekulama ispitivanog spoja; tekućine kojima molekule sadrže atome kisika, od kojih neki mogu sudjelovati u vodikovoj vezi, ali pak ne sadrže atome vodika; tekućine s atomom vodika koji sudjeluje u vezi, no ne sadrže atome koji bi mogli imati udjela u vezi te naposljetku, ostale tekućine čije molekule mogu sudjelovati u vodikovoj vezi.

Zadržavanje predstavlja prvi parametar kromatografskog razlučivanja. Molekule prilikom prolaska dio vremena provode u pokretnoj, a dio u nepokretnoj fazi.

Zadržano vrijeme, t_m – zajedničko je svim molekulama koje se ne vežu na nepokretnu fazu, a jednako je vremenu od trenutka injektiranja do trenutka detekcije.

Vrijeme zadržavanja otopljene tvari, t_R – vrijeme je od trenutka unošenja uzorka do njegova maksimalnog odziva.

Prilagođeno vrijeme zadržavanja, t_R'' – predstavlja razliku prethodna dva vremena, odnosno vrijeme koje otopljena tvar provede vezana na nepokretnu fazu.

$$t_{R''} = t_R - t_m \quad (1)$$

Za što uspješniju separaciju bitan je omjer vremena koje otopljena tvar provede u pokretnoj i vremena provedenog u nepokretnoj fazi, a definiramo ga *faktorom zadržavanja*, k :

$$k = \frac{t_R''}{t_m} \quad (2)$$

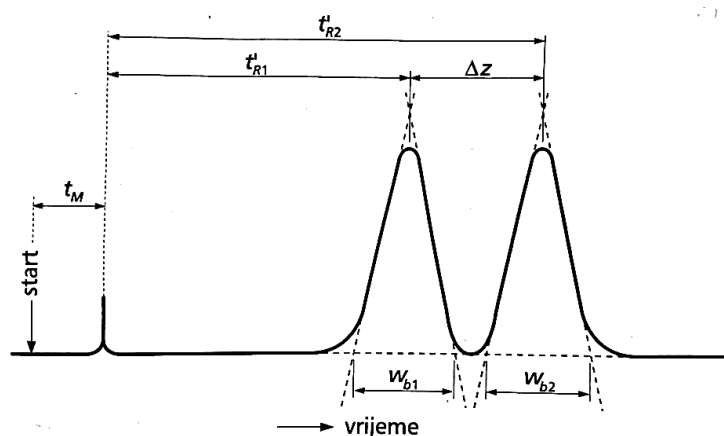
Separacijskim faktorom, α izražavamo mogućnost separacije dvaju spojeva, prema jednadžbi:

$$\alpha = \frac{t_{R''}(A)}{t_{R''}(B)} = \frac{k(A)}{k(B)} \quad (3)$$

Ovaj faktor ne daje informaciju o širini kromatografske zone, w , stoga se uvodi pojam *R_S -vrijednosti*, omjera razmaka između dviju susjednih krivulja i njihove širine:

$$R_S = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{w_{bA} - w_{bB}} \quad (4)$$

Opisane veličine karakteristične za kromatografske krivulje prikazane su na **slici 2.3**.



Slika 2.3. Kromatogram s karakterističnim veličinama [23]

Drugi parametar razlučivanja jest **protok kroz porozni medij**. Nepokretna faza ne može popunjavati sav volumen stupca pa u praznim međuprostorima zaostaje pokretna faza, koja uglavnom biva stagnirajuća. Brzina protjecanja pokretne faze ovisi o svojstvima otopljene tvari, o njezinoj sposobnosti prodiranja u pore, ali i o propusnosti stupca. Profil te brzine najčešće je laminaran pa se može opisati Darcyjevim zakonom.

Posljednji parametar je **širenje kromatografske zone**, koje je proporcionalno duljini puta ili vremenu, a ukazuje na učinkovitost kromatografskog razdvajanja. Uzroci ovog širenja uključuju otpor prijenosu mase kod obje faze, brzinu protoka kroz nepokretnu fazu, sorpciju i desorpciju molekula kao i uzdužnu difuziju.

2.3.4. Visokoučinkovita tekućinska kromatografija s nizom dioda (HPLC-DAD) [24]

Radi se o visokotlačnoj tekućinskoj kromatografiji, koju često nazivamo *visokoučinkovitom* s obzirom na veću djelotvornost naspram tekućinske kromatografije pri atmosferskom ili sniženom tlaku. Najčešće se primjenjuje u farmaceutskoj industriji, kod ispitivanja čistoće novih ili potencijalnih lijekova, testiranja u formuliranju lijekova ili u kontroli njihove kvalitete. Izbor je i za praćenje promjena *scale-up* sintetskih procesa. Tipični HPLC uređaj sadrži spremnike pokretne faze, pumpu, injektor, detektor, kolonu i uređaj za obradu podataka – računalo.

HPLC metoda počiva na četiri glavna pravila:

1. *Uzorak mora biti topljiv*, ukoliko uzorak nije otopljen, ne može biti analiziran HPLC-om
2. *Analiti u uzorku moraju biti zadržani i razlikovati se po vremenu zadržavanja*, kako bi mogli biti odvojeni
3. *Pokretna faza regulira cjelokupnu separaciju*, stoga je ključan odabir adekvatnog para otapala
4. *Analit treba biti otopljen u pokretnoj fazi*; poželjno je da je otapalo smjese jedno od otapala pokretne faze ili otapalo „slabije“ od pokretne faze

Za uspješnu separaciju i analiziranje uzorka nužno je voditi se gore navedenim aksiomima.

Detektor s nizom dioda može se koristiti i za provjeru čistoće pika, postotka podudarnosti signala eluata snimljenih pri nekoj dimenzijskoj veličini, a koja nije kromatografsko vrijeme. Česta je pojava da iz oblika pika nije moguće razabrati radi li se o zasebnom piku ili su sastojci koeluirali. Za rješavanje te nedoumice, u omjer se dovode apsorbancije pri različitim valnim duljinama. Kod HPLC-DAD metode, detektor s nizom dioda, mjereći apsorbancije u UV ili VIS spektru, prati koncentracije svih sastojaka u eluatu i na temelju mjerenja izrađuje se kromatogram.

S obzirom na sve rečeno, HPLC-DAD nedvojbeno je dobar izbor pri kvalitativnim i kvantitativnim analizama.

2.4. VALIDACIJA

2.4.1. Svrha i načini provedbe [25]

Validacija analitičkog sustava podrazumijeva ispitivanje i utvrđivanje prikladnosti svih njegovih sastavnica: uzorka i uzorkovanja, metodologije, metode i dobivenih podataka. Cilj validacije uzorka je utvrditi reprezentativnost i autentičnost uzorka predstavnika populacije. Validacija metodologije provodi se u svrhu ispunjavanja kriterija naručitelja i karakterizacije ispitnog postupka. Dobiveni podatci validiraju se postupcima provjere ispravne identifikacije uzoraka, provjere pogrešaka, provjere sastava uzorka i kemometrijskom analizom, sve u svrhu prihvaćanja ili odbacivanja podataka prije njihova konačnog izlaganja. Validacija metode obuhvaća određivanje njezinih izvedbenih značajki, a to su: linearnost, točnost, preciznost, selektivnost i specifičnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, osjetljivost, robusnost, radno područje i iskoristivost.

Dva su načina provedbe validacije. Unutarlaboratorijska obuhvaća validaciju vlastite razvijene metode ili validaciju metode inicijalno razvijene u nekom drugom laboratoriju. Međulaboratorijska ispitivanja provode se u nekoliko laboratorija, a sudjeluju samo oni laboratoriji koji su osposobljeni provesti ispitivanu metodu, a ona je razvijena za široku primjenu. Ovakvim ispitivanjima dobivaju se podatci o obnovljivosti podataka, ali ne govore o točnosti metode.

2.4.2. Izvedbene značajke metode [23, 26]

Linearnost predstavlja mogućnost metode da ostvaruje linearnu, tj. proporcionalnu funkcijsku vezu između rezultata i koncentracije analita. Praktično se određuje mjerenjem odziva na više mjerenja različitih poznatih koncentracija. Grafički se prikazuje jednadžbom pravca, a interpretira se koeficijentom determinacije.

Specifičnost ukazuje na svojstvo metode da specifično i nedvosmisleno odredi željeni analit u složenoj matici uzorka. **Selektivnost** metode pak označava svojstvo detekcije ili kvantifikacije željenog analita, s tim da se prvotno moraju ukloniti smetnje koje potencijalno mogu utjecati na rezultat analize. Sumarno, specifična metoda određuje točno jedan željeni analit, a selektivna više komponenata istovremeno, uz uvjet uklanjanja interferencija.

Radno područje obuhvaća sve koncentracije između graničnih, uključujući i potonje, unutar kojega analitički postupak zadovoljava kriterije točnosti, preciznosti i linearnosti. Za njegovo određivanje nije nužno provođenje eksperimentalnog ispitivanja, već se određuje iz podataka linearnosti.

Preciznost je stupanj podudaranja više nezavisnih ispitnih rezultata izvedenih iz istoga homogenog područja uzorka u propisanim uvjetima, a iskazuje se kao standardno odstupanje, relativno standardno odstupanje ili varijanca. S obzirom na uvjete provođenja analize razlikujemo **ponovljivost**, kao ocjenu preciznosti rada jednog analitičara u uvjetima jednog laboratorija te **međupreciznost**, kriterij preciznosti metode kod rada više analitičara s minimalnim promjenama uvjeta rada.

Istinitost metode odnosi se na podudarnost stvarnih podataka i srednje vrijednosti dobivene postupkom određeni broj puta. Matematički ju interpretiramo sustavnim odstupanjem, razlikom aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti.

Granica detekcije predstavlja minimalnu koncentraciju analita, koju je u određenim uvjetima točnosti i preciznosti tom metodom moguće detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti.

Granica kvantifikacije je minimalna koncentracija analita, koju je u određenim uvjetima točnosti i preciznosti tom metodom moguće kvantificirati.

Robusnost je sposobnost metode da ne reagira na male, namjerne promjene parametara poput protoka, koncentracije reagensa ili brzine zagrijavanja. Izražava se putem relativnog standardnog odstupanja.

Osjetljivost metode je mogućnost raspoznavanja uzoraka različitih koncentracija uz određenu pouzdanost. U kvantitativnoj analitičkoj kemiji predstavlja nagib kalibracijske krivulje ovisnosti izlaznog signala o koncentraciji analita.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Tablica 3.1. Popis korištenih kemikalija i njihove karakteristike

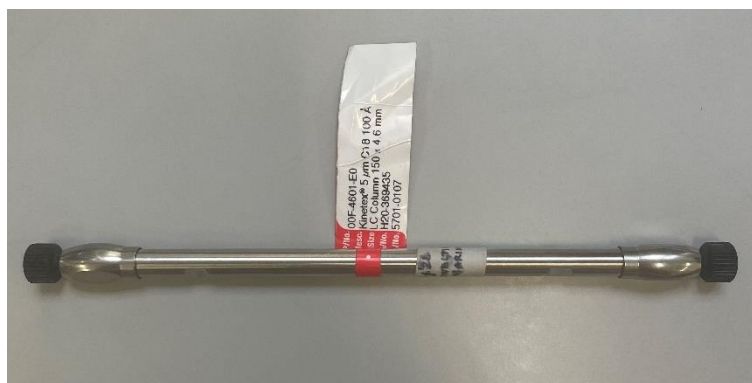
| Naziv | Kratica | Molekulska formula | Proizvođač | Čistoća |
|-------------|---------|---------------------------------|-------------------|---------|
| Acetonitril | ACN | C ₂ H ₃ N | VWR Chemicals | HPLC |
| Metanol | MeOH | CH ₃ OH | Fisher Scientific | HPLC |

Deionizirana voda, koja se koristila za otapanje nekih farmaceutika, ali i za provedbu ispitivanja validacije kao druga matica, dobivena je pomoću instrumenta za deionizaciju.

3.1.2. Kolona

U eksperimentalnom je dijelu rada korištena kolona prikazana na **slici 3.1.**

- Kinetex 5 μm C18 100 Å, Phenomenex
 - Dimenzije: 150 x 4,6 mm



Slika 3.1. Kinetex kolona korištena u radu

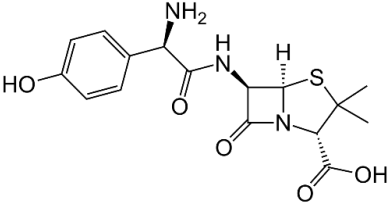
3.1.3. Vodovodna voda

Za potrebe provedbe validacije metode, korištena je vodovodna voda iz slavine laboratorija *Zavoda za analitičku kemiju FKIT-a*, prethodno profiltrirana vakuumskom dubinskom filtracijom (Slika 3.4.).

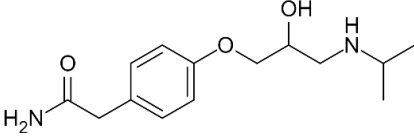
3.1.4. Farmaceutici

Farmakološki aktivne tvari korištene u ovom radu, kao i njihovi podatci dani su u tablicama 3.2.-3.13.

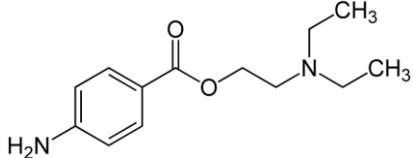
Tablica 3.2. Fizikalno-kemijska svojstva amoksicilina [4]

| FARMACEUTIK | AMOKSICILIN |
|---------------------|---|
| KRATICA | AMOX |
| NAZIV PO IUPAC-U | (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroksifenil)acetil]amino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tia-1-azabiciklo[3.2.0]heptan-2-karboksilna kiselina |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S |
| CAS BROJ | 26787-78-0 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Veterina d.o.o. |
| MOLARNA MASA, g/mol | 365,4 |
| VRELIŠTE, °C | 743,2 |
| TALIŠTE, °C | 194 |
| SVOJSTVA | bijela praškasta krutina |
| KONSTANTE | log K _{ov} = 0,87 pK _{k1} = 3,2 pK _{k2} = 11,7 |
| OTAPALO | deionizirana voda |
| KLASA FARMACEUTIKA | penicilini |
| TOPLJIVOST | 10,7 µg/mL H ₂ O |

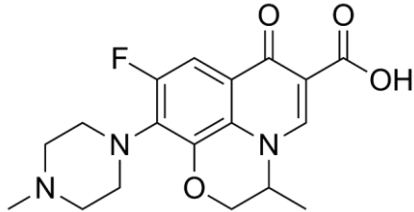
Tablica 3.3. Fizikalno-kemijska svojstva atenolola [9]

| | |
|----------------------------|--|
| FARMECUTIK | ATENOLOL |
| KRATICA | ATL |
| NAZIV PO IUPAC-U | 2-[4-[2-hidroksi-3-(propan-2-ilamino)propoksi]fenil]acetamid |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ |
| CAS BROJ | 29122-68-7 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Acros Organics B.V.B.A. |
| MOLARNA MASA, g/mol | 266,34 |
| VRELIŠTE, °C | 508 |
| TALIŠTE, °C | 158-160 |
| SVOJSTVA | bijela kristalinična krutina |
| KONSTANTE | log K_{ov} = 0,16 p <i>K</i> _k = 9,16 |
| OTAPALO | deionizirana voda |
| KLASA FARMACEUTIKA | β-blokatori |
| TOPLJIVOST | >40 μg/mL H ₂ O |

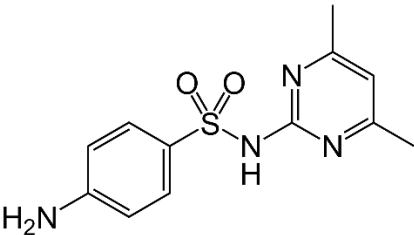
Tablica 3.4. Fizikalno-kemijska svojstva prokaina [10]

| | |
|----------------------------|--|
| FARMACEUTIK | PROKAIN |
| KRATICA | PROK |
| NAZIV PO IUPAC-U | 2-(dietilamino)etil 4-aminobenzoat |
| EMPIRIJSKA FORMULA | $C_{13}H_{20}N_2O_2$ |
| CAS BROJ | 59-46-1 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Sigma Aldrich |
| MOLARNA MASA, g/mol | 236,31 |
| VRELIŠTE, °C | 373,6 |
| TALIŠTE, °C | 61 |
| SVOJSTVA | krutina |
| KONSTANTE | $\log K_{ov} = 1,92$ $pK_k = 8,05$ |
| OTAPALO | ACN |
| KLASA FARMACEUTIKA | lokalni anestetici |
| TOPLJIVOST | 9450 mg/L H ₂ O pri 30°C |

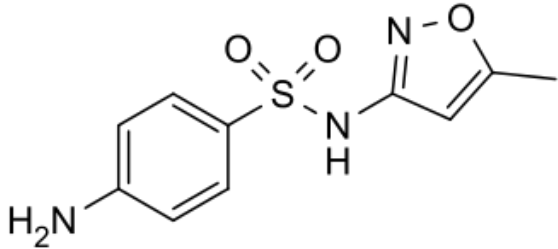
Tablica 3.5. Fizikalno-kemijska svojstva ofloksacina [6]

| FARMACEUTIK | OFLOKSACIN |
|---------------------|---|
| KRATICA | OFX |
| NAZIV PO IUPAC-U | 7-fluoro-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-10-okso-4-oks-a-1-azatriciklo[7.3.1.05,13]trideka-5(13),6,8,11-tetraen-11-karboksilna kiselina |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄ |
| CAS BROJ | 82419-36-1 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Acros Organics B.V.B.A. |
| MOLARNA MASA, g/mol | 361,4 |
| VRELIŠTE, °C | 571,5 |
| TALIŠTE, °C | 254 |
| SVOJSTVA | blijedožuti kristalinični prah |
| KONSTANTE | log K_{ov} = - 0,39 p K_k = 8,31 |
| OTAPALO | ACN |
| KLASA FARMACEUTIKA | kinolonski antibiotici |
| TOPLJIVOST | 28,3 mg/mL |

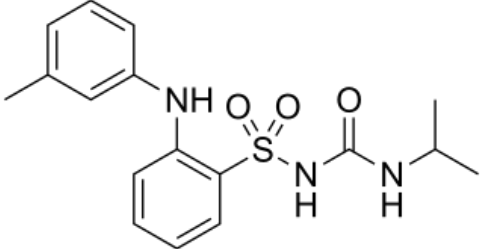
Tablica 3.6. Fizikalno-kemijska svojstva sulfametazina [7]

| | |
|----------------------------|--|
| FARMACEUTIK | SULFAMETAZIN |
| KRATICA | SMETH |
| NAZIV PO IUPAC-U | 4-amino-N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)benzen-1-sulfonamid |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S |
| CAS BROJ | 57-68-1 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Veterina d.o.o. |
| MOLARNA MASA, g/mol | 278,33 |
| VRELIŠTE, °C | 294 |
| TALIŠTE, °C | 198,5 |
| SVOJSTVA | bijeli kristalinični prah |
| KONSTANTE | $\log K_{ov} = 0,89$ $pK_{k1} = 2,65$ $pK_{k2} = 7,65$ |
| OTAPALO | deionizirana voda |
| KLASA FARMACEUTIKA | sulfonamidni antibiotik |
| TOPLJIVOST | 1500 mg/L pri 29°C |

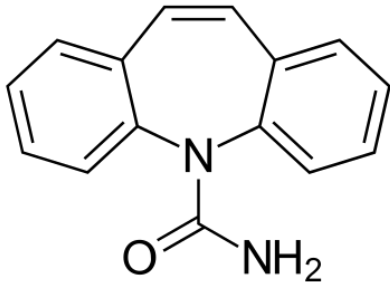
Tablica 3.7. Fizikalno-kemijska svojstva sulfametoksazola [8]

| | |
|----------------------------|--|
| FARMACEUTIK | SULFAMETOKSAZOL |
| KRATICA | SMETOX |
| NAZIV PO IUPAC-U | 4-amino-N-(5-metil-1,2-oksazol-3-il)benzensulfonamid |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S |
| CAS BROJ | 723-46-6 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Sigma-Aldrich Corporation |
| MOLARNA MASA, g/mol | 253,28 |
| VRELIŠTE, °C | 482,1 |
| TALIŠTE, °C | 167 |
| SVOJSTVA | kristalinični bijeli prah |
| KONSTANTE | $\log K_{ov} = 0,89$ $pK_{k1} = 1,6$ $pK_{k2} = 5,7$ |
| OTAPALO | MeOH |
| KLASA FARMACEUTIKA | sulfonamidni antibiotik |
| TOPLJIVOST | > 38 µg/mL pri pH=7,4 |

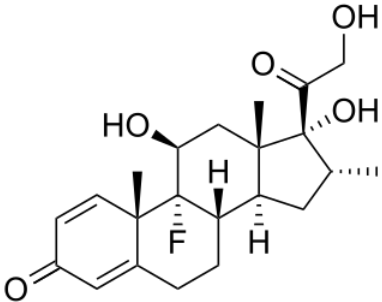
Tablica 3.8. Fizikalno-kemijska svojstva torasemida [11]

| | |
|----------------------------|--|
| FARMACEUTIK | TORASEMID |
| KRATICA | TOR |
| NAZIV PO IUPAC-U | 1-[4-(3-metilanilino)piridin-3-il]sulfonil-3-propan-2-ilurea |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S |
| CAS BROJ | 56211-40-6 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Pliva d.o.o. |
| MOLARNA MASA, g/mol | 348,4 |
| VRELIŠTE, °C | / |
| TALIŠTE, °C | 163-164 |
| SVOJSTVA | bijela krutina |
| KONSTANTE | log K_{ov} = 3,356 p K_k = 7,1 |
| OTAPALO | ACN |
| KLASA FARMACEUTIKA | diuretik |
| TOPLJIVOST | > 52,3 µg/mL pri pH=7,4 |

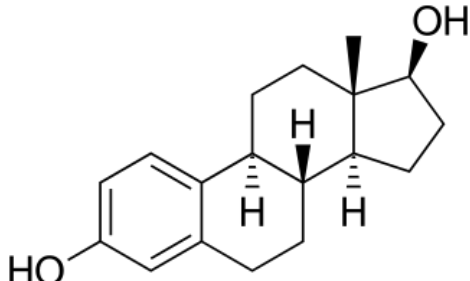
Tablica 3.9. Fizikalno-kemijska svojstva karbamazepina [12]

| | |
|----------------------------|--|
| FARMACEUTIK | KARBAMAZEPIN |
| KRATICA | KARBA |
| NAZIV PO IUPAC-U | benzo[b,f]benzazepin-11-karboksamid |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O |
| CAS BROJ | 298-46-4 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Sigma-Aldrich |
| MOLARNA MASA, g/mol | 236,27 |
| VRELIŠTE, °C | 399,6 ± 45,0 |
| TALIŠTE, °C | 189-192 |
| SVOJSTVA | bijela krutina/prah |
| KONSTANTE | $\log K_{ov} = 2,77$ $pK_{k1} = 15,96$ $pK_{k2} = - 3,8$ |
| OTAPALO | ACN |
| KLASA FARMACEUTIKA | antiepileptik |
| TOPLJIVOST | > 35,4 µg/mL pri pH=7,4 |

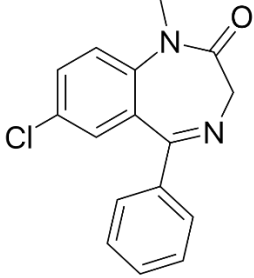
Tablica 3.10. Fizikalno-kemijska svojstva deksametazona [13]

| FARMACEUTIK | DEKSAMETAZON |
|---------------------|---|
| KRATICA | DEXA |
| NAZIV PO IUPAC-U | (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroksi-17-(2-hidroksiacetil)-10,13,16-trimetil-6,7,8,11,12,14,15,16-oktahidrociklopenta[a]fenantren-3-on |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₂₂ H ₂₉ FO ₅ |
| CAS BROJ | 50-02-2 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Acros Organics |
| MOLARNA MASA, g/mol | 392,5 |
| VRELIŠTE, °C | 568,2 ± 50,0 °C pri 760 mmHg |
| TALIŠTE, °C | 262-264 |
| SVOJSTVA | bijeli kristalinični prah |
| KONSTANTE | $\log K_{ov} = 1,83$ $pK_{k1} = 1,18$ $pK_{k2} = -3,4$ |
| OTAPALO | MeOH |
| KLASA FARMACEUTIKA | kortikosteriod |
| TOPLJIVOST | 89 mg/L pri 25°C |

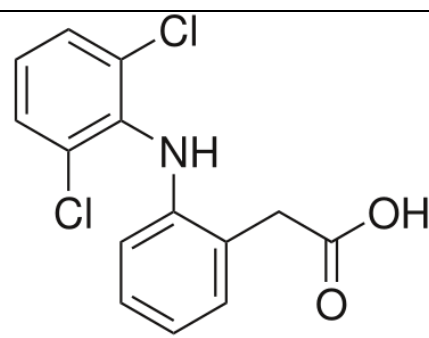
Tablica 3.11. Fizikalno-kemijska svojstva β -estradiola [14]

| | |
|----------------------------|--|
| FARMACEUTIK | β -ESTRADIOL |
| KRATICA | β -ESTRA |
| NAZIV PO IUPAC-U | (8R,9S,13S,14S,17S)-13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahidrociklopenta[a]fenantren-3,17-diol |
| EMPIRIJSKA FORMULA | $C_{18}H_{24}O_2$ |
| CAS BROJ | 50-28-2 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Acros Organics |
| MOLARNA MASA, g/mol | 272,4 |
| VRELIŠTE, °C | $445,9 \pm 45,0$ |
| TALIŠTE, °C | 178,5 |
| SVOJSTVA | bijeli kristalinični prah |
| KONSTANTE | $\log K_{ov} = 4,01$ $pK_k = 10,46 \pm 0,03$ |
| OTAPALO | ACN |
| KLASA FARMACEUTIKA | hormonska nadomjesna terapija |
| TOPLJIVOST | 3,6 mg/L pri 27°C |

Tablica 3.12. Fizikalno-kemijska svojstva diazepama [15]

| FARMACEUTIK | DIAZEPAM |
|---------------------|--|
| KRATICA | DIA |
| NAZIV PO IUPAC-U | 7-kloro-1-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-2-on |
| EMPIRIJSKA FORMULA | C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O |
| CAS BROJ | 439-14-5 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | JGL d.d. |
| MOLARNA MASA, g/mol | 284,74 |
| VRELIŠTE, °C | 497,4 |
| TALIŠTE, °C | 132 |
| SVOJSTVA | žućkasti kristalinični prah |
| KONSTANTE | log K_{ov} = 2,82 p K_k = 3,4 |
| OTAPALO | ACN |
| KLASA FARMACEUTIKA | anksiolitik |
| TOPLJIVOST | 50 mg/L pri 25°C |

Tablica 3.13. Fizikalno-kemijska svojstva diklofenaka [16]

| FARMACEUTIK | DIKLOFENAK |
|---------------------|--|
| KRATICA | DCF |
| NAZIV PO IUPAC-U | 2-[2-(2,6-dikloroanilino)fenil]octena kiselina |
| EMPIRIJSKA FORMULA | $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ |
| CAS BROJ | 15307-86-5 |
| STRUKTURA |  |
| PROIZVOĐAČ | Sigma Life Science |
| MOLARNA MASA, g/mol | 296,1 |
| VRELIŠTE, °C | / |
| TALIŠTE, °C | 283-285 |
| SVOJSTVA | kristali |
| KONSTANTE | $\log K_{ov} = 4,51$ $pK_k = 4,15$ |
| OTAPALO | deionizirana voda |
| KLASA FARMACEUTIKA | nesteroidni protuupalni lijek |
| TOPLJIVOST | 2,37 mg/L pri 25°C |

3.2. INSTRUMENTI

Analitička vaga

Vaganje farmaceutika za pripremu standardnih otopina provodilo se na *Mettler Toledo* analitičkoj vagi (Švicarska), XA105 Dual Range, ID: 1877 (**Slika 3.2.**).



Slika 3.2. Analitička vaga *Mettler Toledo*

Ultrazvučna kupelj

Pomoću ultrazvučne kupelji (**Slika 3.3.**) proizvođača *Iskra*, poboljšano je otapanje farmaceutika u prikladnim otapalima.



Slika 3.3. Ultrazvučna kupelj

Sustav za filtraciju

Vodovodna voda iz slavine laboratorija filtrirana je dubinskom vakuumskom filtracijom u sustavu za filtraciju (*Pall Life Sciences, SAD*), prikazanom na **slici 3.4**. Korišteni su PTFE membranski filtri (47 mm, 0,45 μm). Do provedbe eksperimenata, profiltrirana voda čuvana je u hladnjaku pri temperaturi od 4°C.



Slika 3.4. Sustav za dubinsku filtraciju

Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD)

Pomoću HPLC-DAD (*Agilent 1100 Series*) uređaja, prikazanog na **slici 3.5.**, provedene su analize uzoraka dvanaest farmaceutika, kao i njihove smjese, potrebne za sam razvoj i validaciju metode. Unutar uređaja postavljena je *Phenomenex* kolona tipa Kinetex 5 μm , dimenzija 150 x 4,6 mm. Odabrana otapala pokretne faze su 0,1 %-tna otopina HCOOH u deioniziranoj vodi kao anorganska (vodena) te acetonitril kao organska faza. Protok pokretne faze iznosio je 0,5 mL/min. Pri temperaturi od 30°C injektiralo se 30 μL uzorka, a analiza se provodila pri valnim duljinama od 230, 240, 254, 275 i 290 nm. Metoda korištena na HPLC uređaju je gradijentna. Promjena sastava pokretne faze prikazana je u **tablici 3.14.**



Slika 3.5. HPLC-DAD uređaj

Tablica 3.14. Gradijent razvijene metode

| <i>t</i>, min | <i>w</i>(0,1 % HCOOH u deioniziranoj vodi), % | <i>w</i>(acetonitril), % |
|----------------------|--|---------------------------------|
| 0,00 | 98,0 | 2,0 |
| 2,00 | 98,0 | 2,0 |
| 22,00 | 60,0 | 40,0 |
| 25,00 | 50,0 | 50,0 |
| 27,00 | 50,0 | 50,0 |
| 32,00 | 10,0 | 90,0 |
| 35,00 | 2,0 | 98,0 |
| 36,00 | 2,0 | 98,0 |
| 36,01 | 98,0 | 2,0 |
| 40,00 | 98,0 | 2,0 |

3.3. OPIS RADA

3.3.1. Priprema temeljne standardne otopine farmaceutika

Za pripremu temeljnih standardnih otopina masene koncentracije 1000 mg/L, vagano je 5 mg svakog od ispitivanih farmaceutika (osim OFX, koji je pripremljen u koncentraciji od 100 mg/L) i otopljeno u 5 mL (50 mL za OFX) pogodnog otapala.

3.3.2. Priprema standardne otopine i razrjeđenja za linearnost u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi

Standardna otopina potrebna za izvedbenu značajku linearosti pripravljena je u odmjernoj tikvici od 20 mL. Dodano je 2 mL OFX, 400 μ L AMOX, ATL i β -ESTRA te 200 μ L svih ostalih farmaceutika. Iz standardne otopine koncentracije 10 mg/L dalje su pripravljena razrjeđenja u vrijednostima 7,5, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,025, 0,01, 0,0025, 0,005, 0,001 mg/L.

3.3.3. Priprema standardne otopine i razrjeđenja za preciznost u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi

Prema rezultatima linearosti za pojedini farmaceutik, unutar radnog područja odabrane su i na isti način pripremljene četiri koncentracije (10, 7,5, 2 i 0,2 mg/L; odnosno 20, 15, 4, 0,4 mg/L) kako bi se odredila preciznost i istinitost razvijene kromatografske metode.

3.3.4. Priprema radnih otopina za robusnost

U svrhu ispitivanja robusnosti metode, pripravljena je standardna otopina koncentracije 7,5 mg/L s deioniziranom/vodovodnom vodom. Robusnost je ispitana promjenom protoka metode s 0,5 mL min⁻¹ na 0,45 mL min⁻¹ i 0,55 mL min⁻¹.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. APSORPCIJSKI SPEKTRI FARMACEUTIKA

U svrhu određivanja valnih duljina za maksimalnu apsorpciju pojedinih farmaceutika, snimljeni su njihovi odgovarajući apsorpcijski spektri. **Tablica 4.1.** prikazuje maksimume apsorpcijskih spektara farmaceutika pri kojima se provodila njihova kvalitativna i kvantitativna analiza.

Tablica 4.1. Maksimalne valne duljine farmaceutika

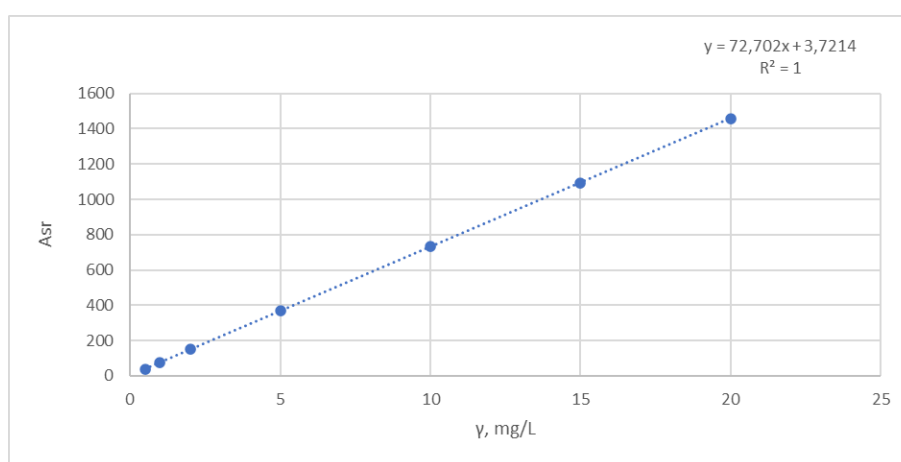
| FARMAECUTIK | VALNI MAKSIMUM, nm |
|----------------|--------------------|
| AMOX | 230 |
| ATL | 230 |
| PROK | 290 |
| OFX | 290 |
| SMETH | 275 |
| SMETOX | 275 |
| TOR | 290 |
| KARBA | 230 |
| DEXA | 240 |
| β -ESTRA | 230 |
| DIA | 230 |
| DCF | 275 |

4.2. LINEARNOST

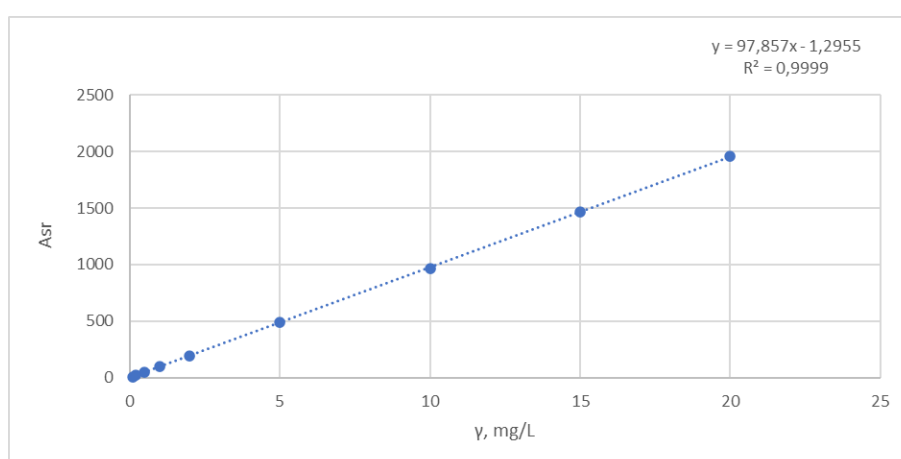
Kriterij linearnosti ispitan je u eksperimentima s deioniziranom i vodovodnom vodom te u oba slučaja zadovoljava. Vrijednosti koeficijenta korelacije (R^2) veći su od 0,99 za svaki farmaceutik u oba eksperimenta, što uz većinu relativnih standardnih odstupanja (RSD vrijednosti) manjih od 10 % potvrđuje linearnost metode za odabrane farmaceutike.

4.2.1. Linearnost u deioniziranoj vodi

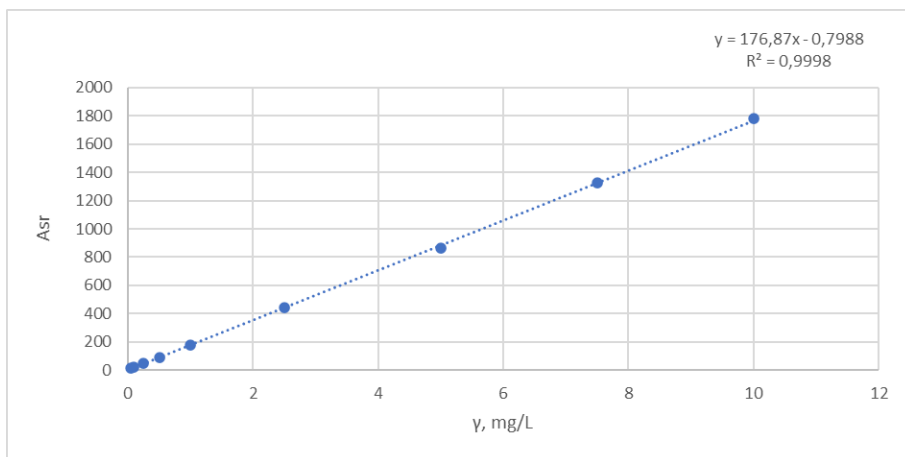
Slike 4.1. do 4.12. prikazuju grafove linearnosti pojedinih farmaceutika u deioniziranoj vodi.



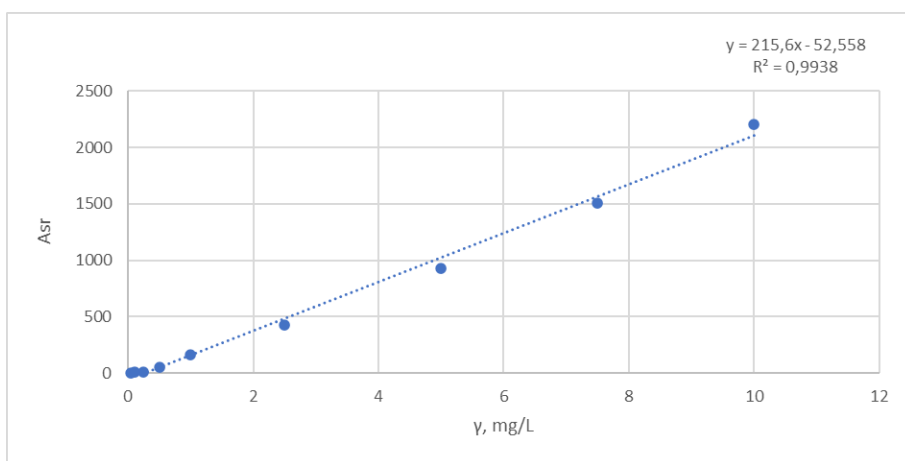
Slika 4.1. Graf linearnosti za amoksisicilin u deioniziranoj vodi



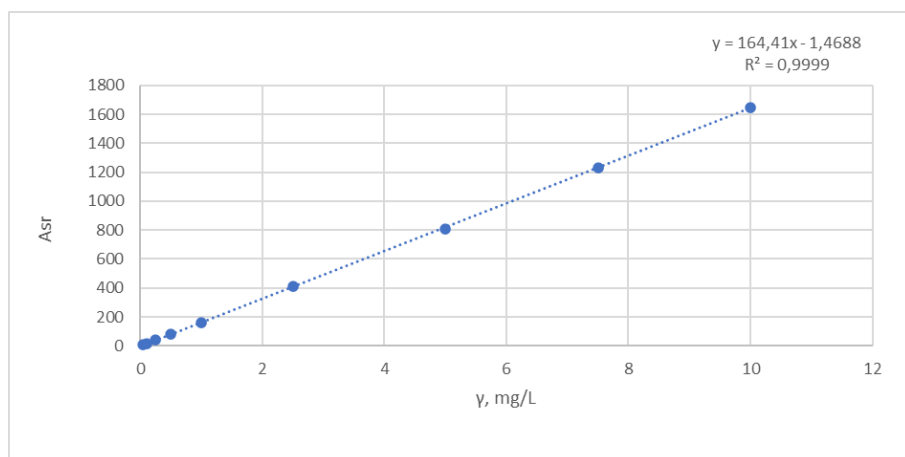
Slika 4.2. Graf linearnosti za atenolol u deioniziranoj vodi



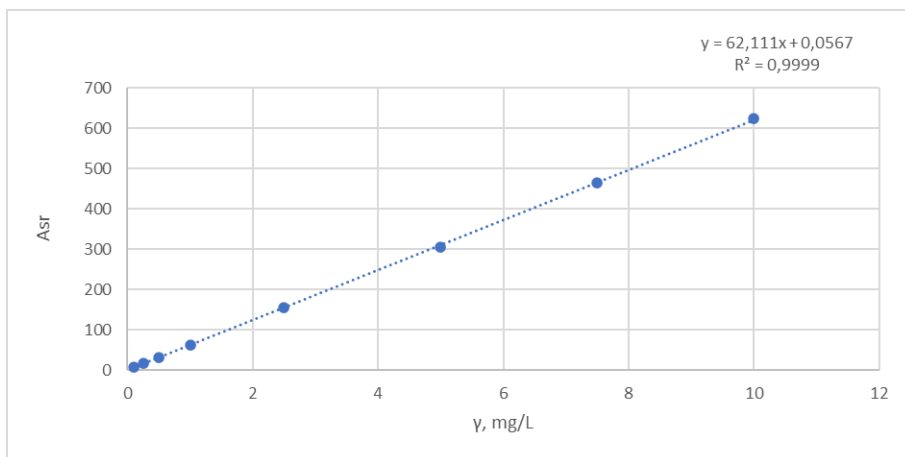
Slika 4.3. Graf linearnosti za prokain u deioniziranoj vodi



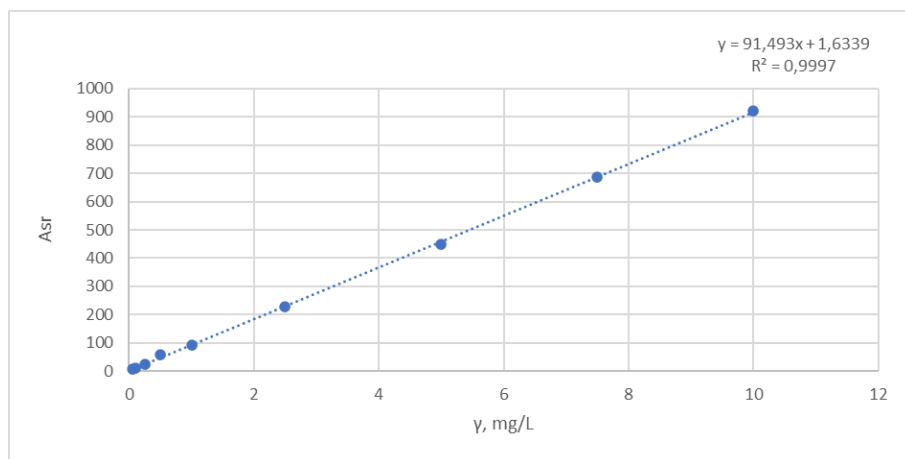
Slika 4.4. Graf linearnosti za ofloksacin u deioniziranoj vodi



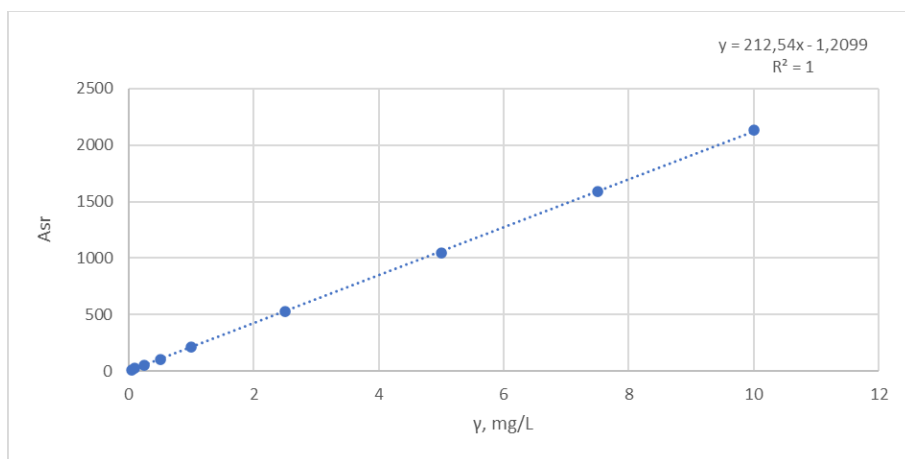
Slika 4.5. Graf linearnosti za sulfametazin u deioniziranoj vodi



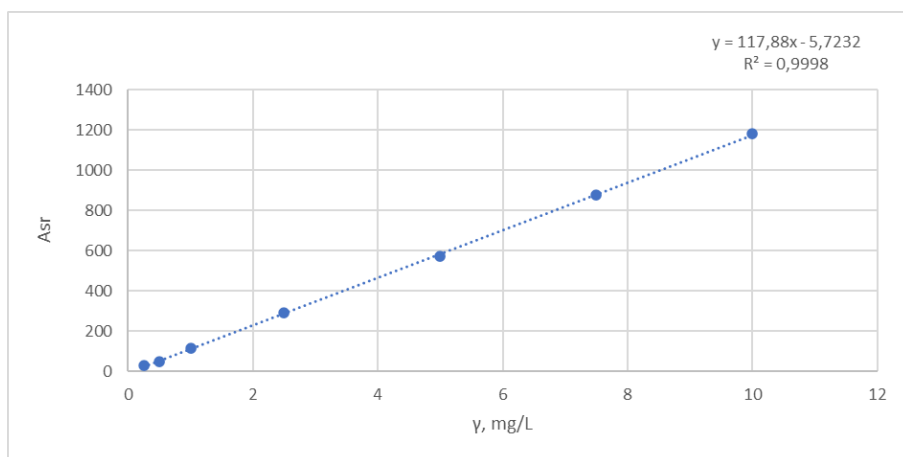
Slika 4.6. Graf linearnosti za sulfametoksazol u deioniziranoj vodi



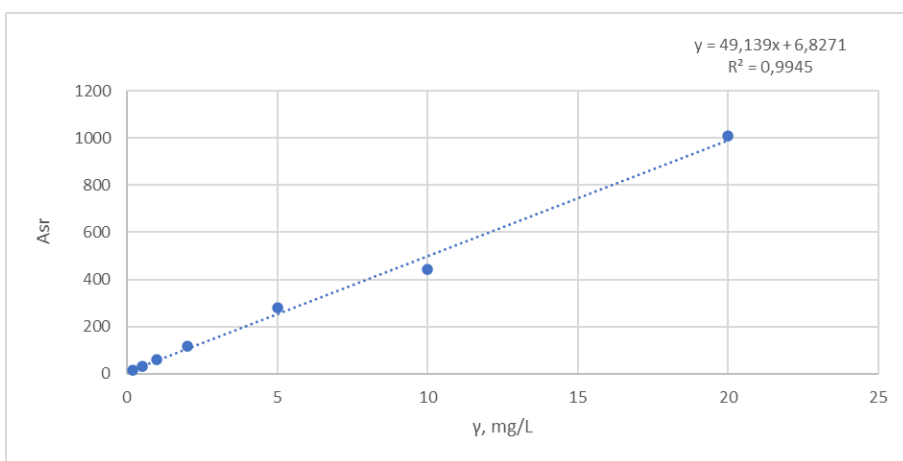
Slika 4.7. Graf linearnosti za torasemid u deioniziranoj vodi



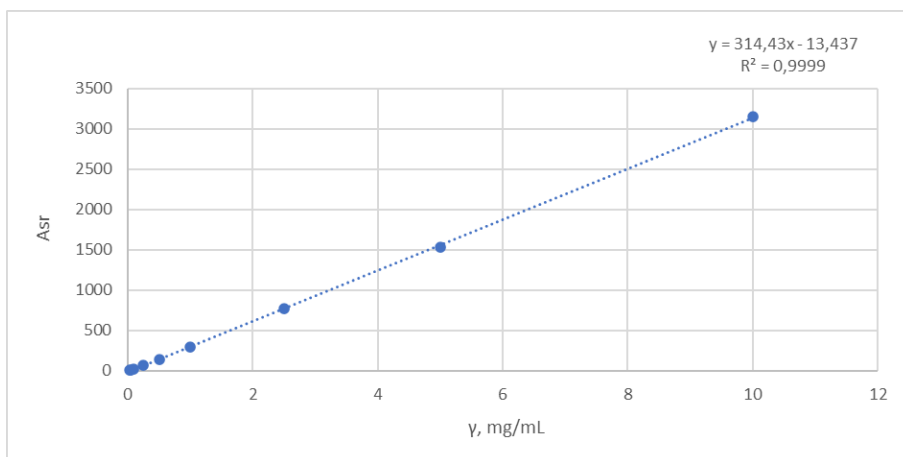
Slika 4.8. Graf linearnosti za karbamazepin u deioniziranoj vodi



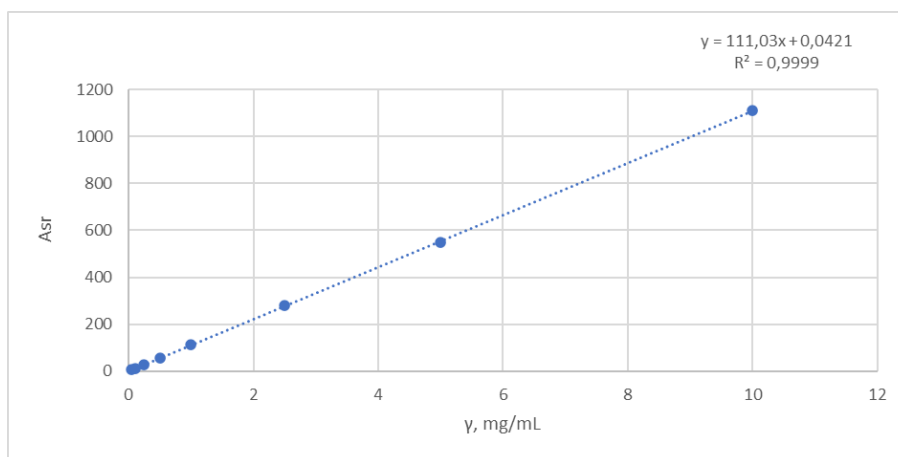
Slika 4.9. Graf linearnosti za deksametazon u deioniziranoj vodi



Slika 4.10. Graf linearnosti za β -estradiol u deioniziranoj vodi



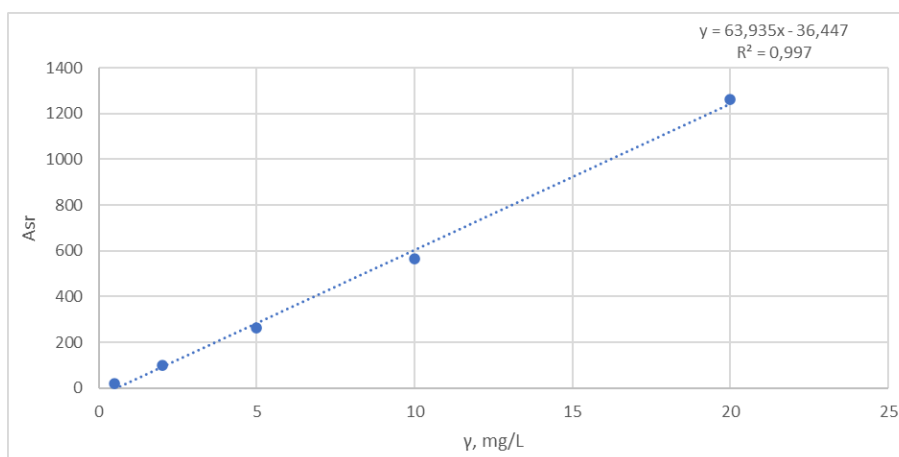
Slika 4.11. Graf linearnosti za diazepam u deioniziranoj vodi



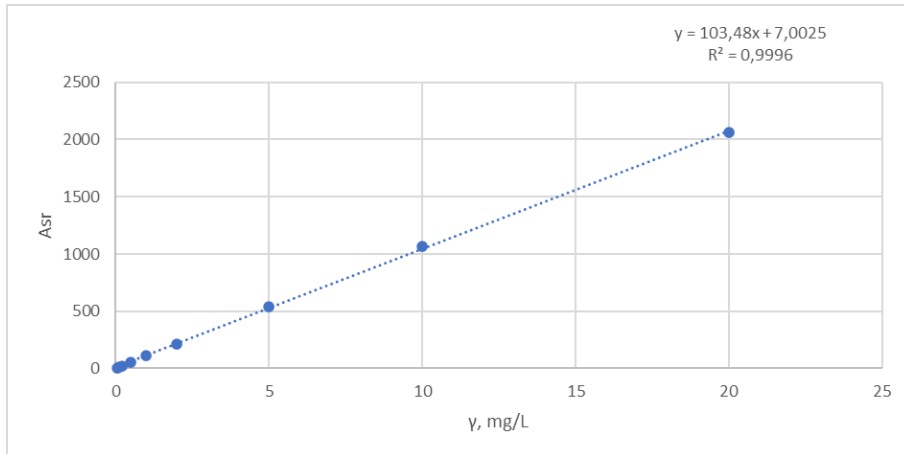
Slika 4.12. Graf linearnosti za diklofenak u deioniziranoj vodi

4.2.2. Linearnost u vodovodnoj vodi

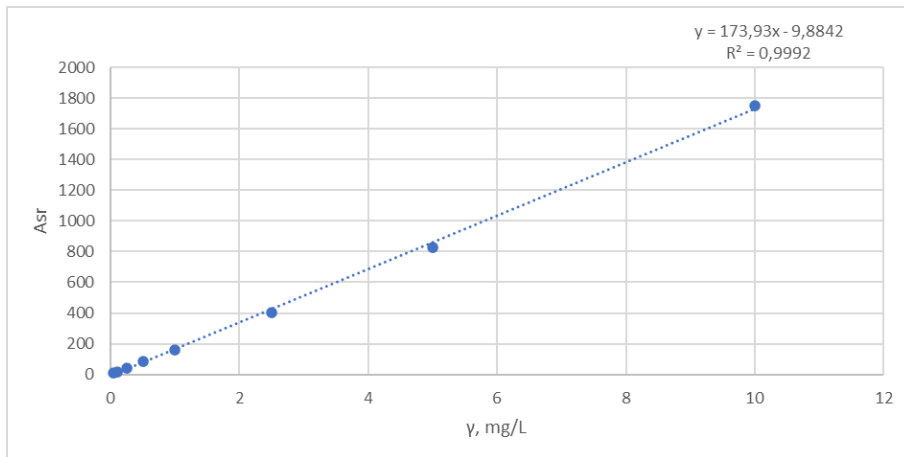
Na slikama 4.13. do 4.24. prikazani su grafovi linearnosti za pojedine farmaceutike u vodovodnoj vodi.



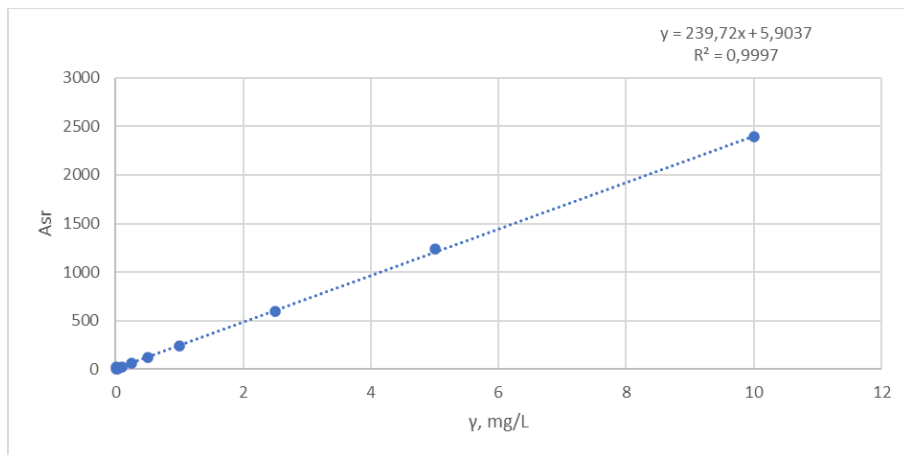
Slika 4.13. Graf linearnosti za amoksicilin u vodovodnoj vodi



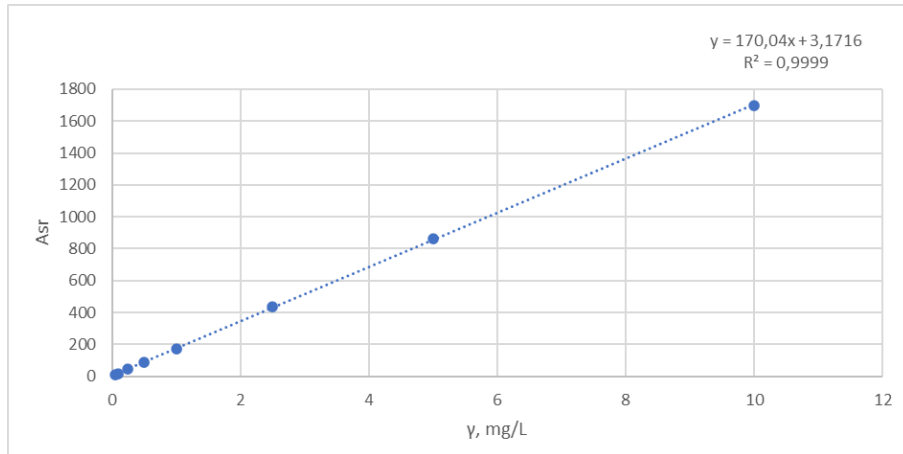
Slika 4.14. Graf linearnosti za atenolol u vodovodnoj vodi



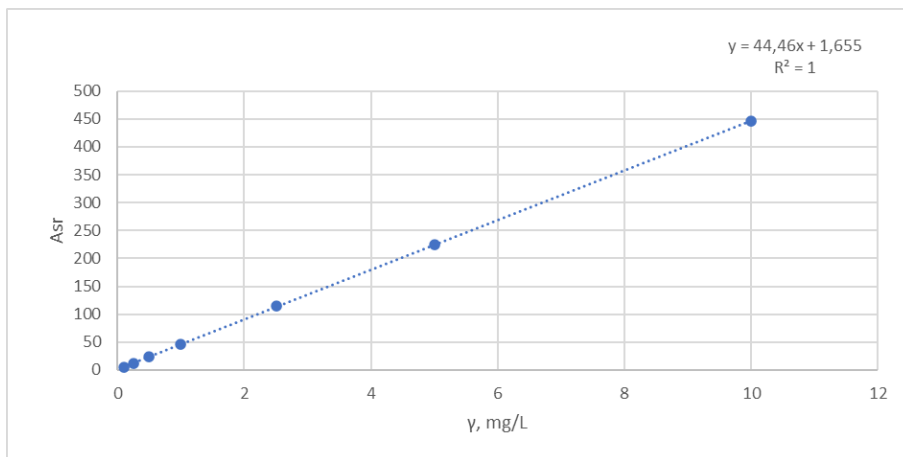
Slika 4.15. Graf linearnosti za prokain u vodovodnoj vodi



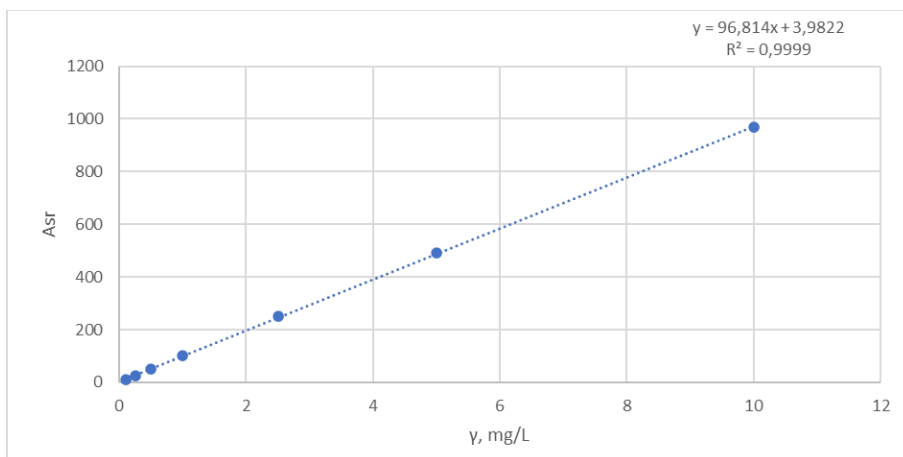
Slika 4.16. Graf linearnosti za ofloksacin u vodovodnoj vodi



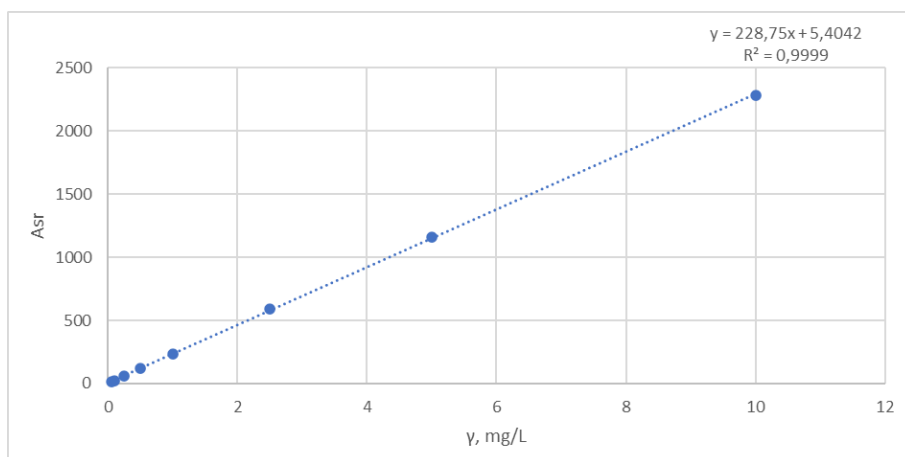
Slika 4.17. Graf linearnosti za sulfametazin u vodovodnoj vodi



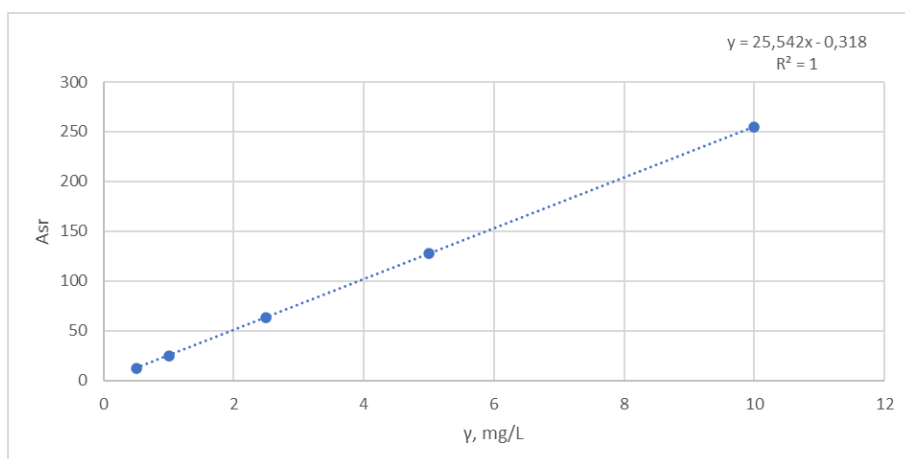
Slika 4.18. Graf linearnosti za sulfametoksazol u vodovodnoj vodi



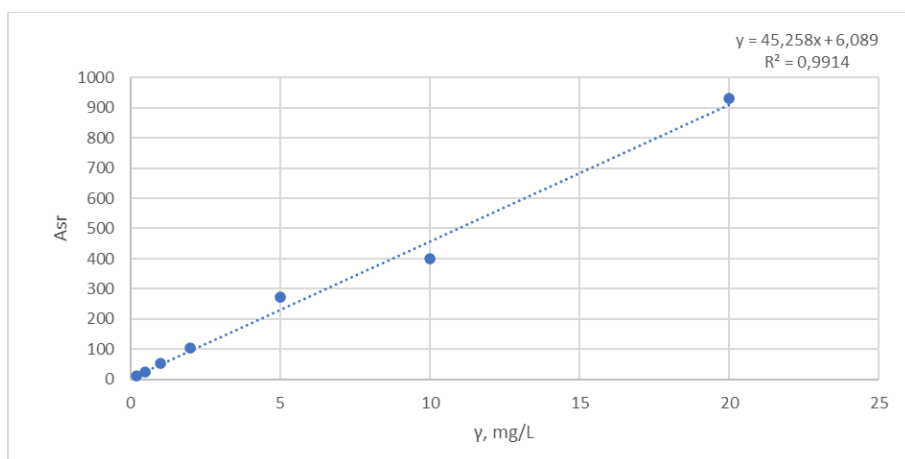
Slika 4.19. Graf linearnosti za torasemid u vodovodnoj vodi



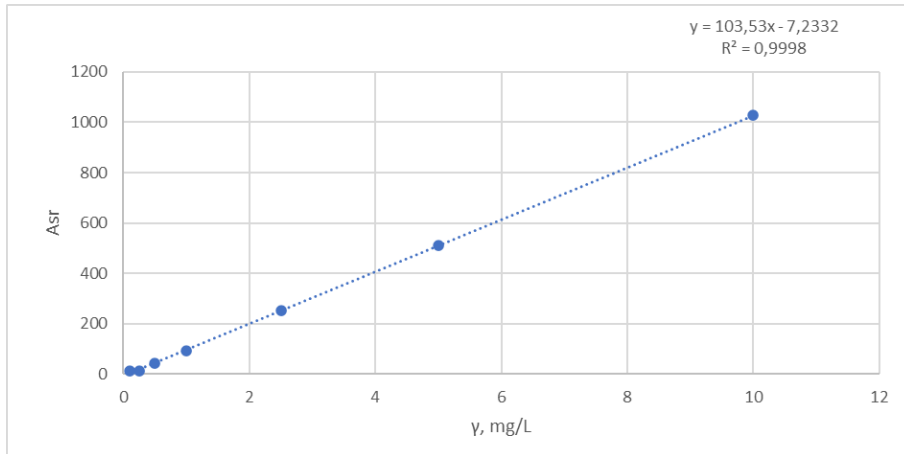
Slika 4.20. Graf linearnosti za karbamazepin u vodovodnoj vodi



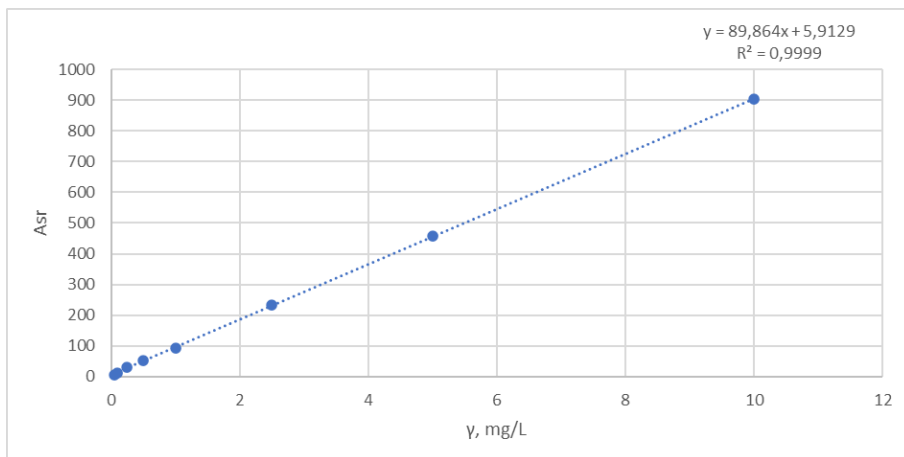
Slika 4.21. Graf linearnosti za deksametazon u vodovodnoj vodi



Slika 4.22. Graf linearnosti za β -estradiol u vodovodnoj vodi



Slika 4.23. Graf linearnosti za diazepam u vodovodnoj vodi



Slika 4.24. Graf linearnosti za diklofenak u vodovodnoj vodi

4.3. GRANICE DETEKCIJE I GRANICE KVANTIFIKACIJE

Granice detekcije određene su kod prvih uspješno integriranih vrijednosti površina na HPLC uređaju za svaki farmaceutik, a predstavljaju minimalne koncentracije farmaceutika koje uređaj ovom metodom može detektirati, ali ne i kvantificirati. Analogno, granice kvantifikacije određene su kao druge najniže vrijednosti koncentracija farmaceutika, a koje se mogu kvantificirati. Određene vrijednosti ovih granica prikazane su u **tablici 4.2.**

Tablica 4.2. Granice detekcije i granice kvantifikacije farmaceutika

| Farmaceutik | Deionizirana voda | | Vodovodna voda | |
|----------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | Granica detekcije, mg/L | Granica kvantifikacije, mg/L | Granica detekcije, mg/L | Granica kvantifikacije, mg/L |
| AMOX | 0,50 | 0,99 | 0,50 | 1,00 |
| ATL | 0,10 | 0,20 | 0,05 | 0,10 |
| PROK | 0,05 | 0,10 | 0,05 | 0,10 |
| OFX | 0,05 | 0,10 | 0,05 | 0,10 |
| SMETH | 0,05 | 0,10 | 0,05 | 0,10 |
| SMETOX | 0,10 | 0,25 | 0,10 | 0,25 |
| TOR | 0,05 | 0,10 | 0,10 | 0,25 |
| KARBA | 0,05 | 0,10 | 0,05 | 0,10 |
| DEXA | 0,25 | 0,50 | 0,50 | 0,99 |
| β -ESTRA | 0,20 | 0,50 | 0,20 | 0,51 |
| DIA | 0,02 | 0,05 | 0,10 | 0,25 |
| DCF | 0,05 | 0,10 | 0,05 | 0,10 |

4.4. OSJETLJIVOST

Iz podataka linearnosti konstruira se pravac, a njegov nagib predstavlja osjetljivost metode. Za svaki farmaceutik načinjeni su pravci, a u **tablici 4.3.** prikazane su osjetljivosti metode na pojedine farmaceutike u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi.

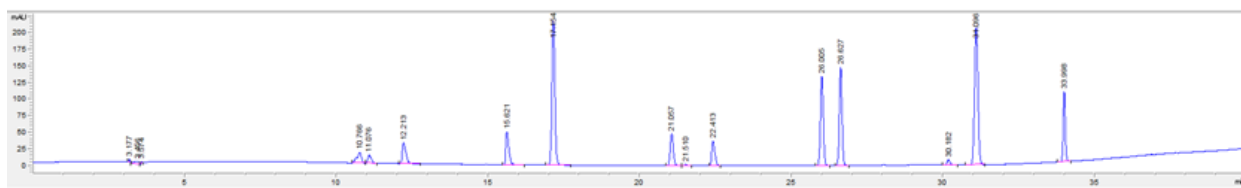
Tablica 4.3. Vrijednosti nagiba pravaca farmaceutika u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi

| | Deionizirana voda | Vodovodna voda |
|----------------|--------------------|----------------|
| FARMACEUTIK | NAGIB PRAVCA, L/mg | |
| AMOX | 72,70 | 63,94 |
| ATL | 97,86 | 103,48 |
| PROK | 176,87 | 173,93 |
| OFX | 215,60 | 239,72 |
| SMETH | 164,41 | 170,04 |
| SMETOX | 62,11 | 44,46 |
| TOR | 91,49 | 96,81 |
| KARBA | 212,54 | 228,75 |
| DEXA | 117,88 | 25,54 |
| β -ESTRA | 49,14 | 45,26 |
| DIA | 314,43 | 103,53 |
| DCF | 111,03 | 89,86 |

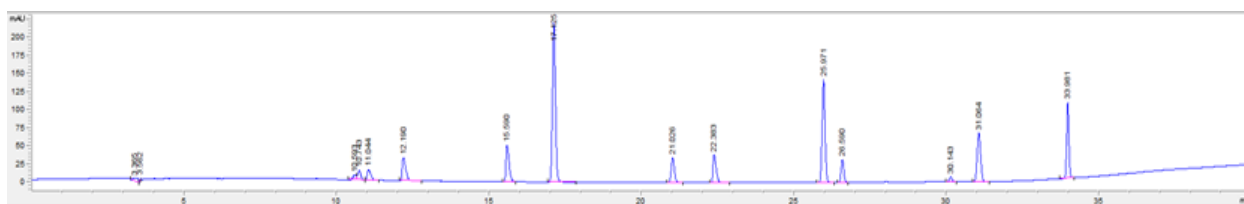
Metoda pokazuje najveću osjetljivost prema OFX, a iznosi 239,72 L/mg u vodovodnoj i 215,60 L/mg u deioniziranoj vodi. Najmanju osjetljivost metoda ima prema β -ESTRA. Osjetljivost prema tom farmaceutiku iznosi 45,26 L/mg u vodovodnoj i 49,14 L/mg u deioniziranoj vodi. Činjenicu da matica smanjuje osjetljivost metode potvrđuje i pojava manjeg nagiba pravca u vodovodnoj vodi kod većine farmaceutika.

4.5. SELEKTIVNOST

Procjena selektivnosti metode provodi se usporedbom dobivenih kromatograma u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi. **Slika 4.25.** i **slika 4.26.** prikazuju kromatograme smjese farmaceutika u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi pri 254 nm, dobivene HPLC-DAD analizom. Prikazan je odziv detektora i vrijeme zadržavanja pojedinih farmaceutika u smjesi.



Slika 4.25. Kromatogram smjese farmaceutika u deioniziranoj vodi



Slika 4.26. Kromatogram smjese farmaceutika u vodovodnoj vodi

Na kromatogramima je vidljivo 12 kromatografskih krivulja, od kojih je za SMETH u oba slučaja dobivena najoštrija kromatografska krivulja, koja je ujedno i najveće površine, shodno njegovu apsorpcijskom maksimumu. Vrijeme zadržavanja SMETH u deioniziranoj vodi iznosi 17,154 min, a u vodovodnoj vodi 17,125 min, pri čemu je očitana površina u deioniziranoj vodi veća nego u vodovodnoj. S obzirom na apsorpcijski maksimum pri 230 nm, najmanju površinu kromatografske krivulje ima β -ESTRA s vremenom zadržavanja od 30,18 min u deioniziranoj vodi te 30,14 min u vodovodnoj vodi. Oštre, uske kromatografske krivulje ukazuju na dobru separaciju, izuzev AMX i ATL u oba slučaja, za koje su dobivene bliske kromatografske krivulje. Nešto veća razlika u krivuljama javlja se kod deksametazona, za koga je u vodovodnoj vodi ona znatno manja od one u deioniziranoj vodi, no vrijeme zadržavanja mu je, uz ostale farmaceutike, podjednako.

4.6. PRECIZNOST

U svrhu ispitivanja ponovljivosti i međupreciznosti metode, pripravljene su otopine farmaceutika koncentracija 10, 7,5, 2 i 0,2 mg/L (20, 14, 4 i 0,4 mg/L za AMOX, ATL i β -ESTRA). Svaka otopina testirana je u 5 vijalica, a dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 4.4.** za deioniziranu i **tablici 4.5.** za vodovodnu vodu. Mjerenja su se za obje vrste vode provodila dva puta, u dva različita dana.

Tablica 4.4. Vrijednosti relativnih standardnih odstupanja za ponovljivost u deioniziranoj vodi izmjerene prvog i drugog dana

| γ , mg/L | Prvi dan | | | | Drugi dan | | | |
|--------------------|---------------|------|------|------|---------------|-------|------|------|
| | 0,2 | 2 | 7,5 | 10 | 0,2 | 2 | 7,5 | 10 |
| FARMACEUTIK | RSD, % | | | | RSD, % | | | |
| AMOX | 1,21 | 0,33 | 0,28 | 2,00 | 5,39 | 0,64 | 0,40 | 1,75 |
| ATL | 1,45 | 0,38 | 0,16 | 0,44 | 1,61 | 0,40 | 0,15 | 0,11 |
| PROK | 3,64 | 0,36 | 0,27 | 0,63 | 5,09 | 0,37 | 0,26 | 0,57 |
| OFX | 32,82 | 3,33 | 7,10 | 5,70 | 2,74 | 13,00 | 6,74 | 1,89 |
| SMETH | 1,19 | 0,31 | 0,18 | 0,34 | 1,12 | 0,36 | 0,12 | 0,19 |
| SMETOX | 3,85 | 0,39 | 0,21 | 0,54 | 4,24 | 0,54 | 0,17 | 0,26 |
| TOR | 21,77 | 0,35 | 0,45 | 0,52 | 2,88 | 0,33 | 0,21 | 0,23 |
| KARBA | 1,55 | 0,40 | 0,21 | 0,46 | 4,80 | 3,80 | 0,17 | 0,07 |
| DEXA | / | 0,89 | 0,38 | 0,32 | / | 1,57 | 0,15 | 0,26 |
| β -ESTRA | 45,08 | 1,27 | 4,40 | 7,27 | 2,74 | 2,09 | 5,28 | 4,80 |
| DIA | 8,13 | 0,81 | 0,87 | 0,39 | 4,86 | 0,85 | 0,79 | 3,87 |
| DCF | 0,54 | 0,30 | 0,16 | 0,42 | 3,16 | 0,52 | 0,16 | 0,33 |

Tablica 4.5. Vrijednosti relativnog standardnog odstupanja za ponovljivost u vodovodnoj vodi izmjerene prvog i drugog dana

| γ , mg/L | Prvi dan | | | | Drugi dan | | | |
|--------------------|---------------|------|-------|-------|---------------|------|------|------|
| | 0,2 | 2 | 7,5 | 10 | 0,2 | 2 | 7,5 | 10 |
| FARMACEUTIK | RSD, % | | | | RSD, % | | | |
| AMOX | 2,57 | 3,69 | 2,61 | 2,13 | 39,26 | 3,30 | 3,21 | 5,63 |
| ATL | 3,02 | 1,00 | 0,77 | 0,50 | 3,00 | 3,13 | 0,44 | 0,59 |
| PROK | 3,33 | 0,95 | 0,65 | 0,48 | 2,40 | 0,68 | 0,54 | 1,16 |
| OFX | 2,97 | 1,32 | 0,19 | 0,53 | 2,97 | 1,32 | 0,19 | 0,53 |
| SMETH | 3,53 | 0,47 | 0,60 | 0,25 | 1,46 | 0,46 | 0,18 | 0,19 |
| SMETOX | 7,90 | 1,15 | 0,61 | 0,30 | 1,52 | 0,29 | 0,20 | 0,08 |
| TOR | 2,48 | 0,64 | 0,55 | 0,45 | 0,76 | 0,50 | 0,25 | 0,18 |
| KARBA | 6,33 | 0,55 | 0,48 | 0,26 | 2,71 | 0,61 | 0,32 | 0,17 |
| DEXA | 1,38 | 0,80 | 0,57 | 0,31 | 1,53 | 9,58 | 0,24 | 0,15 |
| β -ESTRA | 0,66 | 0,60 | 10,08 | 10,73 | 3,62 | 0,79 | 5,95 | 3,99 |
| DIA | 7,56 | 1,53 | 0,26 | 0,36 | 8,02 | 0,59 | 0,26 | 0,22 |
| DCF | 2,70 | 0,48 | 0,67 | 0,33 | 2,27 | 0,40 | 0,25 | 0,23 |

Uz određivanje preciznosti, iz podataka ponovljivosti određuje se i međupreciznost kao izvedbena značajka metode, a provodi se pomoću *F*-testa. Ovaj statistički test uspoređuje varijance nizova u svrhu prihvatanja ili odbacivanja nulte hipoteze. *F*-vrijednost dobivena je kao omjer standardnih odstupanja mjerenja iste koncentracije u dva ponavljanja. Dobivene vrijednosti prikazane su u **tablicama 4.6. i 4.7.**

Tablica 4.6. *F*-vrijednosti farmaceutika za deioniziranu vodu

| | γ , mg/L | σ_1 | σ_2 | $F_{\text{rač}}$ | F_{tabl} | $F_{\text{rač}} < F_{\text{tabl}}$ |
|--------|-----------------|------------|------------|------------------|-------------------|------------------------------------|
| AMOX | 0,4 | 0,3808 | 1,5738 | 0,06 | 6,39 | DA |
| | 4 | 0,9960 | 1,9235 | 0,27 | 6,39 | DA |
| | 15 | 3,3186 | 4,4913 | 0,55 | 6,39 | DA |
| | 20 | 23,8358 | 20,2731 | 1,38 | 6,59 | DA |
| ATL | 0,4 | 0,5612 | 0,6107 | 0,85 | 6,39 | DA |
| | 4 | 1,4639 | 1,5172 | 0,93 | 6,39 | DA |
| | 15 | 2,3510 | 2,2063 | 1,14 | 6,39 | DA |
| | 20 | 8,8370 | 2,1847 | 16,36 | 6,39 | NE |
| PROK | 0,2 | 0,9311 | 1,6529 | 0,32 | 6,39 | DA |
| | 2 | 1,2832 | 1,3084 | 0,96 | 6,59 | DA |
| | 7,5 | 3,7875 | 3,4361 | 1,22 | 6,39 | DA |
| | 10 | 11,5337 | 10,3033 | 1,25 | 6,39 | DA |
| OFX | 0,2 | 5,3756 | 0,9074 | 35,10 | 19,25 | NE |
| | 2 | 10,8501 | 38,7754 | 0,08 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 111,6258 | 102,8991 | 1,18 | 6,39 | DA |
| | 10 | 124,4672 | 39,9593 | 9,70 | 6,39 | NE |
| SMETH | 0,2 | 0,4062 | 0,3578 | 1,29 | 6,39 | DA |
| | 2 | 1,0330 | 1,1323 | 0,83 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 2,4191 | 1,4481 | 2,79 | 6,39 | DA |
| | 10 | 5,9325 | 3,0458 | 3,79 | 6,39 | DA |
| SMETOX | 0,2 | 0,3082 | 0,4743 | 0,42 | 6,39 | DA |
| | 2 | 0,2881 | 0,5431 | 0,28 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 0,5848 | 0,6261 | 0,87 | 6,39 | DA |
| | 10 | 2,0416 | 1,3103 | 2,43 | 6,39 | DA |
| TOR | 0,2 | 3,2300 | 0,5367 | 36,23 | 6,39 | NE |
| | 2 | 0,6611 | 0,6058 | 1,19 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 3,2775 | 1,4082 | 5,42 | 6,39 | DA |
| | 10 | 5,0727 | 2,1617 | 5,51 | 6,39 | DA |

Tablica 4.6. (nastavak) F -vrijednosti farmaceutika za deioniziranu vodu

| | γ , mg/L | σ_1 | σ_2 | $F_{\text{rač}}$ | F_{tabl} | $F_{\text{rač}} < F_{\text{tabl}}$ |
|---------------------------------|-----------------|------------|------------|------------------|-------------------|------------------------------------|
| KARBA | 0,2 | 0,6380 | 1,9870 | 0,10 | 6,39 | DA |
| | 2 | 1,6709 | 16,1847 | 0,01 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 3,4172 | 2,6454 | 1,67 | 6,39 | DA |
| | 10 | 9,9761 | 1,5859 | 39,57 | 6,39 | NE |
| DEXA | 0,2 | / | / | / | / | |
| | 2 | 0,4722 | 0,7981 | 0,35 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 0,7842 | 0,2864 | 7,50 | 6,39 | NE |
| | 10 | 0,8961 | 0,6782 | 1,75 | 6,39 | DA |
| β-ESTRA | 0,4 | 14,8206 | 0,5560 | 710,46 | 9,28 | NE |
| | 4 | 2,5264 | 4,1963 | 0,36 | 6,59 | DA |
| | 15 | 30,1362 | 38,8132 | 0,60 | 6,39 | DA |
| | 20 | 71,8639 | 48,9253 | 2,16 | 6,39 | DA |
| DIA | 0,2 | 1,2339 | 0,7969 | 2,40 | 6,39 | DA |
| | 2 | 1,6410 | 1,8780 | 0,76 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 7,4791 | 6,8321 | 1,20 | 6,39 | DA |
| | 10 | 4,0893 | 47,3374 | 0,01 | 6,39 | DA |
| DCF | 0,2 | 0,1304 | 0,6979 | 0,03 | 6,39 | DA |
| | 2 | 0,7369 | 1,2116 | 0,37 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 1,0700 | 1,4167 | 0,57 | 6,39 | DA |
| | 10 | 5,3323 | 3,96081 | 1,81 | 6,39 | DA |

Izračunate F -vrijednosti većine farmaceutika manje su od teorijskih, što zadovoljava kriterij međupreciznosti u deioniziranoj vodi. Veća odstupanja javljaju se pri nižim koncentracijama kod OFX, TOR, i β -ESTRA. Navedena odstupanja mogu biti posljedica viših granica detekcije i kvantifikacije, posebice kod β -ESTRA, čija granica kvantifikacije iznosi 0,5 mg/L.

U vodovodnoj vodi također većina farmaceutika zadovoljava kriterij međupreciznosti, s obzirom da su im računske F -vrijednosti manje od tabličnih. Manja odstupanja javljaju se kod OFX i SMETH pri 7,5 mg/L te kod TOR i KARBA pri nižim koncentracijama.

Tablica 4.7. *F*-vrijednosti farmaceutika za vodovodnu vodu

| | γ , mg/L | σ_1 | σ_2 | $F_{ra\check{c}}$ | F_{tabl} | $F_{ra\check{c}} < F_{tabl}$ |
|---------------|-----------------|------------|------------|-------------------|------------|------------------------------|
| AMOX | 0,4 | 0,5718 | 13,1409 | 0,001 | 9,12 | DA |
| | 4 | 9,4862 | 8,3482 | 1,29 | 6,39 | DA |
| | 15 | 25,3008 | 29,9667 | 0,71 | 6,39 | DA |
| | 20 | 27,7232 | 67,6329 | 0,17 | 6,39 | DA |
| ATL | 0,4 | 1,1818 | 1,2396 | 0,91 | 9,28 | DA |
| | 4 | 3,8639 | 12,5932 | 0,09 | 6,39 | DA |
| | 15 | 11,5410 | 6,5922 | 3,07 | 6,39 | DA |
| | 20 | 9,8646 | 11,6886 | 0,71 | 6,39 | DA |
| PROK | 0,2 | 1,1798 | 0,8515 | 1,92 | 6,39 | DA |
| | 2 | 2,1902 | 2,2731 | 0,93 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 5,8824 | 4,8790 | 1,45 | 6,39 | DA |
| | 10 | 5,9095 | 14,0496 | 0,18 | 6,39 | DA |
| OFX | 0,2 | 1,7911 | 1,3240 | 1,83 | 6,39 | DA |
| | 2 | 5,7790 | 5,9789 | 0,93 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 9,6533 | 3,4107 | 8,01 | 6,39 | NE |
| | 10 | 10,7400 | 12,5876 | 0,73 | 6,39 | DA |
| SMETH | 0,2 | 1,1760 | 0,4827 | 5,94 | 6,39 | DA |
| | 2 | 1,5156 | 1,5007 | 1,02 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 7,4559 | 2,2354 | 11,12 | 6,39 | NE |
| | 10 | 4,1776 | 3,1329 | 1,78 | 6,39 | DA |
| SMETOX | 0,2 | 0,6658 | 0,5070 | 1,73 | 6,94 | DA |
| | 2 | 0,9290 | 0,9581 | 0,94 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 1,8929 | 2,5036 | 0,57 | 6,39 | DA |
| | 10 | 1,2337 | 1,2834 | 0,92 | 6,39 | DA |
| TOR | 0,2 | 0,4930 | 0,1483 | 11,05 | 6,39 | NE |
| | 2 | 1,1925 | 0,9503 | 1,57 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 3,9298 | 1,7527 | 5,03 | 6,39 | DA |
| | 10 | 4,3062 | 1,7286 | 6,21 | 6,39 | DA |

Tablica 4.7. (nastavak) F -vrijednosti farmaceutika za vodovodnu vodu

| | γ , mg/L | σ_1 | σ_2 | $F_{ra\check{c}}$ | F_{tabl} | $F_{ra\check{c}} < F_{tabl}$ |
|---------------------------------|-----------------|------------|------------|-------------------|------------|------------------------------|
| KARBA | 0,2 | 2,6402 | 0,8620 | 9,38 | 6,59 | NE |
| | 2 | 2,3480 | 2,5821 | 0,83 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 8,0807 | 5,2295 | 2,39 | 6,39 | DA |
| | 10 | 5,8357 | 3,7206 | 2,46 | 6,39 | DA |
| DEXA | 0,2 | 0,1291 | 0,5541 | 0,002 | 6,59 | DA |
| | 2 | 0,7829 | 21,3395 | 2,00 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 2,2007 | 2,1279 | 0,01 | 6,39 | DA |
| | 10 | 1,6125 | 1,8185 | 0,57 | 6,39 | DA |
| β-ESTRA | 0,4 | 0,1915 | 0,7649 | 0,06 | 6,59 | DA |
| | 4 | 1,6503 | 1,7312 | 0,91 | 6,94 | DA |
| | 15 | 70,5061 | 48,0983 | 2,15 | 6,59 | DA |
| | 20 | 106,1277 | 45,8191 | 5,36 | 6,39 | DA |
| DIA | 0,2 | 1,13358 | 5,3125 | 0,05 | 6,39 | DA |
| | 2 | 3,2094 | 3,6297 | 0,78 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 2,2260 | 6,1138 | 0,13 | 6,39 | DA |
| | 10 | 4,1033 | 6,8431 | 0,36 | 6,39 | DA |
| DCF | 0,2 | 0,6164 | 0,5225 | 1,39 | 6,59 | DA |
| | 2 | 1,0310 | 0,8849 | 1,36 | 6,39 | DA |
| | 7,5 | 4,3684 | 2,1036 | 4,31 | 6,59 | DA |
| | 10 | 2,8448 | 2,5677 | 1,23 | 6,39 | DA |

4.7. ISTINITOST

Kriterij istinitosti provjerava se na temelju podataka ponovljivosti. **Tablice 4.8. do 4.19.** prikazuju detektirane i stvarne koncentracije farmaceutika u oba uzorka vode te vrijednosti iskorištenja izračunatih kao omjer detektirane i stvarne koncentracije, odnosno omjer površine ispod kromatografske krivulje i površine izračunate prema umjernim pravcima.

Tablica 4.8. Podatci istinitosti za amoksicilin

| γ , mg/L | 0,40 | | 3,98 | | 19,88 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,35 | 89,25 | 4,14 | 104,20 | 15,57 | 78,31 |
| | 0,36 | 91,32 | 4,07 | 102,36 | 16,23 | 81,65 |
| | 0,31 | 79,21 | 4,10 | 103,13 | 16,14 | 81,19 |
| | 0,37 | 93,40 | 4,09 | 102,92 | 15,90 | 79,96 |
| | 0,35 | 88,21 | 4,10 | 103,19 | 15,72 | 79,07 |
| Srednje | 0,35 | 88,28 | 4,10 | 103,16 | 15,91 | 80,04 |
| Vodovodna | 1,23 | 303,92 | 4,52 | 112,22 | 18,79 | 93,23 |
| | 0,95 | 236,04 | 4,72 | 117,08 | 19,63 | 97,39 |
| | 1,31 | 324,87 | 4,55 | 112,92 | 20,71 | 102,72 |
| | 0,89 | 220,13 | 4,48 | 111,00 | 17,89 | 88,75 |
| | / | / | 4,36 | 108,17 | 19,69 | 97,65 |
| Srednje | 1,09 | 271,24 | 4,53 | 112,28 | 19,34 | 95,95 |

Tablica 4.9. Podatci istinitosti za atenolol

| γ , mg/L | 0,40 | | 4,03 | | 20,16 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,30 | 73,81 | 3,62 | 89,66 | 18,75 | 93,00 |
| | 0,31 | 75,73 | 3,61 | 89,54 | 18,79 | 93,22 |
| | 0,30 | 73,81 | 3,58 | 88,89 | 18,78 | 93,16 |
| | 0,30 | 75,49 | 3,62 | 89,81 | 18,80 | 93,26 |
| | 0,29 | 72,14 | 3,62 | 89,71 | 18,79 | 93,23 |
| Srednje | 0,30 | 74,20 | 3,61 | 89,52 | 18,78 | 93,17 |
| Vodovodna | 0,35 | 86,52 | 3,99 | 99,06 | 19,32 | 95,85 |
| | 0,33 | 81,24 | 3,67 | 91,10 | 19,10 | 94,74 |
| | / | / | 3,88 | 96,30 | 19,02 | 94,35 |
| | 0,32 | 79,57 | 3,78 | 93,64 | 19,19 | 95,20 |
| | 0,33 | 81,96 | 3,78 | 93,78 | 19,18 | 95,15 |
| Srednje | 0,33 | 82,32 | 3,82 | 94,78 | 19,16 | 95,06 |

Tablica 4.10. Podatci istinitosti za prokain

| γ , mg/L | 0,20 | | 1,99 | | 9,96 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,20 | 97,92 | 2,00 | 100,42 | 10,08 | 101,21 |
| | 0,19 | 93,38 | 2,00 | 100,25 | 10,21 | 102,51 |
| | 0,17 | 87,13 | 2,01 | 100,73 | 10,21 | 102,50 |
| | 0,20 | 99,05 | 1,99 | 100,08 | 10,18 | 102,21 |
| | 0,19 | 94,80 | 1,99 | 99,74 | 10,22 | 102,65 |
| Srednje | 0,19 | 94,45 | 2,00 | 100,24 | 10,18 | 102,21 |
| Vodovodna | 0,27 | 134,74 | 1,98 | 99,31 | 6,97 | 69,98 |
| | 0,26 | 129,55 | 1,97 | 98,65 | 7,09 | 71,16 |
| | 0,26 | 132,15 | 1,96 | 98,30 | 7,17 | 71,97 |
| | 0,26 | 128,68 | 1,99 | 99,89 | 7,00 | 70,29 |
| | 0,26 | 129,84 | 1,96 | 98,50 | 7,01 | 70,34 |
| Srednje | 0,26 | 130,99 | 1,97 | 98,93 | 7,05 | 70,75 |

Tablica 4.11. Podatci istinitosti za ofloksacin

| γ , mg/L | 0,20 | | 2,01 | | 10,04 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,39 | 196,24 | 1,58 | 78,90 | 10,03 | 99,90 |
| | 0,24 | 121,40 | 1,76 | 87,42 | 9,92 | 98,85 |
| | 0,40 | 196,93 | 1,34 | 66,91 | 9,86 | 98,24 |
| | 0,40 | 200,17 | 1,80 | 89,66 | 10,32 | 102,77 |
| | 0,24 | 121,40 | 1,65 | 82,29 | 10,17 | 101,32 |
| Srednje | 0,34 | 167,23 | 1,63 | 81,03 | 10,06 | 100,22 |
| Vodovodna | 0,16 | 78,10 | 1,86 | 92,82 | 9,89 | 98,48 |
| | 0,16 | 79,97 | 1,83 | 91,07 | 9,88 | 98,36 |
| | 0,16 | 77,69 | 1,88 | 93,63 | 9,91 | 98,66 |
| | 0,16 | 81,01 | 1,89 | 94,00 | 9,92 | 98,85 |
| | 0,17 | 84,54 | 1,84 | 91,72 | 9,79 | 97,49 |
| Srednje | 0,16 | 80,27 | 1,86 | 92,65 | 9,88 | 98,37 |

Tablica 4.12. Podatci istinitosti za sulfametazin

| γ , mg/L | 0,20 | | 2,00 | | 10,02 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,20 | 101,58 | 1,95 | 97,08 | 9,99 | 99,66 |
| | 0,20 | 101,58 | 1,95 | 97,27 | 9,97 | 99,48 |
| | 0,20 | 101,58 | 1,95 | 97,11 | 9,94 | 99,20 |
| | 0,20 | 99,76 | 1,93 | 96,42 | 9,96 | 99,44 |
| | 0,21 | 102,80 | 1,95 | 97,21 | 9,95 | 99,26 |
| Srednje | 0,20 | 101,46 | 1,94 | 97,02 | 9,96 | 99,41 |
| Vodovodna | 0,18 | 88,12 | 1,91 | 95,18 | 9,74 | 97,23 |
| | 0,17 | 86,65 | 1,89 | 94,06 | 9,72 | 97,04 |
| | 0,18 | 88,42 | 1,90 | 95,03 | 9,74 | 97,24 |
| | 0,18 | 89,30 | 1,90 | 94,77 | 9,74 | 97,24 |
| | 0,17 | 85,77 | 1,89 | 94,53 | 9,70 | 96,82 |
| Srednje | 0,18 | 87,65 | 1,90 | 94,71 | 9,73 | 97,11 |

Tablica 4.13. Podatci istinitosti za sulfametoksazol

| γ , mg/L | 0,20 | | 2,02 | | 10,08 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,18 | 91,39 | 1,63 | 80,78 | 8,19 | 81,21 |
| | 0,18 | 88,99 | 1,61 | 79,98 | 8,22 | 81,55 |
| | 0,17 | 86,60 | 1,61 | 79,74 | 8,17 | 81,05 |
| | 0,17 | 84,20 | 1,61 | 79,82 | 8,22 | 81,51 |
| | 0,19 | 93,78 | 1,62 | 80,38 | 8,19 | 81,27 |
| Srednje | 0,18 | 88,99 | 1,62 | 80,14 | 8,20 | 81,32 |
| γ , mg/L | 0,20 | | 2,00 | | 10,04 | |
| Vodovodna | 0,72 | 357,82 | 7,28 | 362,41 | 37,34 | 371,87 |
| | 0,71 | 354,46 | 7,31 | 363,87 | 37,37 | 372,23 |
| | 0,70 | 347,74 | 7,33 | 365,21 | 37,39 | 372,43 |
| | 0,73 | 362,30 | 7,31 | 363,87 | 37,40 | 372,47 |
| | 0,71 | 351,10 | 7,32 | 364,76 | 37,34 | 371,89 |
| Srednje | 0,71 | 354,69 | 7,31 | 364,02 | 37,37 | 372,18 |

Tablica 4.14. Podatci istinitosti za torasemid

| γ , mg/L | 0,20 | | 2,00 | | 10,00 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,19 | 93,26 | 1,99 | 99,66 | 10,17 | 101,71 |
| | 0,19 | 93,26 | 1,99 | 99,28 | 10,22 | 102,20 |
| | 0,18 | 88,89 | 1,99 | 99,50 | 10,17 | 101,73 |
| | 0,18 | 92,17 | 1,98 | 99,22 | 10,22 | 102,18 |
| | 0,19 | 97,09 | 2,00 | 100,04 | 10,19 | 101,91 |
| Srednje | 0,19 | 92,94 | 1,99 | 99,54 | 10,19 | 101,95 |
| Vodovodna | 0,16 | 80,66 | 1,90 | 95,09 | 9,85 | 98,46 |
| | 0,16 | 79,63 | 1,89 | 94,42 | 9,87 | 98,69 |
| | 0,16 | 80,14 | 1,91 | 95,66 | 9,85 | 98,50 |
| | 0,16 | 81,69 | 1,91 | 95,40 | 9,87 | 98,71 |
| | 0,16 | 80,66 | 1,91 | 95,50 | 9,83 | 98,27 |
| Srednje | 0,16 | 80,56 | 1,90 | 95,21 | 9,85 | 98,52 |

Tablica 4.15. Podatci istinitosti za karbamazepin

| γ , mg/L | 0,20 | | 2,00 | | 10,02 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,19 | 96,75 | 2,14 | 106,78 | 10,02 | 100,05 |
| | 0,19 | 94,40 | 2,02 | 100,58 | 10,04 | 100,25 |
| | 0,21 | 105,20 | 1,99 | 99,10 | 10,03 | 100,12 |
| | 0,20 | 100,04 | 1,95 | 97,46 | 10,04 | 100,17 |
| | 0,21 | 104,27 | 1,96 | 97,81 | 10,04 | 100,17 |
| Srednje | 0,20 | 100,13 | 2,01 | 100,35 | 10,03 | 100,15 |
| Vodovodna | 0,15 | 75,86 | 1,98 | 98,96 | 10,20 | 101,81 |
| | 0,16 | 78,67 | 2,00 | 99,85 | 10,20 | 101,84 |
| | 0,15 | 75,62 | 2,01 | 100,16 | 10,19 | 101,73 |
| | 0,16 | 80,32 | 2,02 | 100,61 | 10,24 | 102,16 |
| | 0,15 | 76,56 | 2,01 | 100,07 | 10,20 | 101,76 |
| Srednje | 0,16 | 77,41 | 2,00 | 99,93 | 10,21 | 101,86 |

Tablica 4.16. Podatci istinitosti za deksametazon

| γ , mg/L | 0,20 | | 2,00 | | 9,98 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | / | / | 0,49 | 24,53 | 2,29 | 22,99 |
| | / | / | 0,47 | 23,60 | 2,30 | 23,05 |
| | / | / | 0,48 | 23,90 | 2,29 | 22,90 |
| | / | / | 0,48 | 24,07 | 2,29 | 22,97 |
| | / | / | 0,48 | 24,07 | 2,30 | 23,02 |
| Srednje | / | / | 0,48 | 24,03 | 2,29 | 22,99 |
| γ , mg/L | 0,20 | | 1,98 | | 9,92 | |
| Vodovodna | 1,46 | 736,41 | 9,10 | 458,84 | 46,38 | 467,57 |
| | 1,43 | 720,63 | 9,06 | 456,47 | 46,56 | 469,31 |
| | 1,41 | 708,79 | 9,15 | 461,40 | 46,45 | 468,24 |
| | 1,43 | 718,65 | 7,24 | 364,71 | 46,39 | 467,61 |
| | 1,41 | 710,76 | 9,10 | 458,44 | 46,41 | 467,85 |
| Srednje | 1,43 | 719,05 | 8,73 | 439,97 | 46,44 | 468,12 |

Tablica 4.17. Podatci istinitosti za β -estradiol

| γ , mg/L | 0,40 | | 4,04 | | 20,20 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,28 | 70,38 | 4,05 | 100,18 | 20,50 | 101,48 |
| | 0,27 | 67,87 | / | 0,00 | 21,85 | 108,17 |
| | / | 0,00 | 3,84 | 95,09 | 19,25 | 95,30 |
| | 0,28 | 68,87 | 3,95 | 97,86 | 21,25 | 105,17 |
| | 0,26 | 63,84 | 3,92 | 96,95 | 20,20 | 100,02 |
| Srednje | 0,27 | 67,74 | 3,94 | 97,52 | 20,61 | 102,03 |
| Vodovodna | 0,31 | 76,08 | 4,72 | 116,83 | 24,33 | 120,45 |
| | 0,33 | 82,10 | 4,70 | 116,23 | 25,93 | 128,35 |
| | 0,34 | 83,74 | 4,76 | 117,81 | 24,33 | 120,47 |
| | 0,33 | 81,00 | 4,67 | 115,57 | 26,61 | 131,73 |
| | 0,35 | 87,57 | 4,75 | 117,65 | 24,91 | 123,33 |
| Srednje | 0,33 | 82,10 | 4,72 | 116,82 | 25,22 | 124,87 |

Tablica 4.18. Podatci istinitosti za diazepam

| γ , mg/L | 0,20 | | 1,97 | | 9,87 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,09 | 46,80 | 0,75 | 38,25 | 3,87 | 39,22 |
| | 0,10 | 49,54 | 0,74 | 37,69 | 3,88 | 39,32 |
| | 0,10 | 49,38 | 0,75 | 37,82 | 4,20 | 42,61 |
| | 0,09 | 47,12 | 0,75 | 37,77 | 3,86 | 39,17 |
| | 0,09 | 47,60 | 0,76 | 38,35 | 3,86 | 39,09 |
| Srednje | 0,09 | 48,09 | 0,75 | 37,97 | 3,93 | 39,88 |
| γ , mg/L | 0,20 | | 2,00 | | 9,98 | |
| Vodovodna | 0,75 | 377,62 | 5,97 | 299,32 | 30,53 | 305,90 |
| | 0,72 | 362,62 | 5,93 | 297,05 | 30,68 | 307,46 |
| | 0,76 | 380,52 | 6,00 | 300,38 | 30,56 | 306,17 |
| | 0,66 | 331,65 | 6,02 | 301,69 | 30,62 | 306,79 |
| | 0,65 | 325,35 | 6,00 | 300,58 | 30,53 | 305,96 |
| Srednje | 0,71 | 355,55 | 5,98 | 299,80 | 30,58 | 306,45 |

Tablica 4.19. Podatci istinitosti za diklofenak

| γ , mg/L | 0,20 | | 1,99 | | 9,94 | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Voda | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % | Detekt. konc., mg/L | Iskorištenje, % |
| Deionizirana | 0,21 | 104,92 | 2,07 | 104,36 | 10,70 | 107,69 |
| | 0,19 | 96,76 | 2,09 | 105,31 | 10,76 | 108,22 |
| | 0,19 | 97,67 | 2,08 | 104,73 | 10,69 | 107,50 |
| | 0,20 | 99,93 | 2,10 | 105,63 | 10,77 | 108,33 |
| | 0,20 | 99,93 | 2,10 | 105,54 | 10,75 | 108,12 |
| Srednje | 0,20 | 99,84 | 2,09 | 105,12 | 10,73 | 107,97 |
| Vodovodna | 0,19 | 93,97 | 2,36 | 118,88 | 12,27 | 123,42 |
| | 0,18 | 92,29 | 2,37 | 119,00 | 12,29 | 123,65 |
| | 0,19 | 97,88 | 2,37 | 119,39 | 12,30 | 123,77 |
| | 0,19 | 95,65 | 2,39 | 120,00 | 12,35 | 124,21 |
| | 0,20 | 99,56 | 2,38 | 119,84 | 12,31 | 123,84 |
| Srednje | 0,19 | 95,87 | 2,37 | 119,42 | 12,30 | 123,78 |

Zadovoljavajuće vrijednosti za kriterij istinitosti su ona iskorištenja koja se nalaze u intervalu od 90 % do 110 %. U slučaju deionizirane vode, metoda je potpuno zadovoljavajuća za PROK, SMETH, TOR, KARBA i DCF, a kod ATL i β -ESTRA metoda zadovoljava u dvjema višim koncentracijama. U slučaju vodovodne vode, metoda pri svim trima koncentracijama ne zadovoljava niti za jedan farmaceutik, ali za dvije više koncentracije zadovoljava za ATL, OFX, SMETH, TOR i KARBA.

4.8. RADNO PODRUČJE

Kako je već definirano, radno područje podrazumijeva interval vrijednosti koncentracija između graničnih, uključujući ih – kao interval unutar kojega metoda zadovoljava kriterije, a određuje se iz podataka linearnosti.

Radna područja iznose:

- AMOX:
Deionizirana voda: 0,99 – 20,00 mg/L
Vodovodna voda: 1,00 – 20,00 mg/L
- ATL:
Deionizirana voda: 0,20 – 20,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,05 – 20,00 mg/L
- PROK:
Deionizirana voda: 0,10 – 20,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,10 – 20,00 mg/L
- OFX:
Deionizirana voda: 0,10 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,10 – 10,00 mg/L
- SMETH:
Deionizirana voda: 0,10 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,10 – 10,00 mg/L
- SMETOX:
Deionizirana voda: 0,25 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,25 – 10,00 mg/L

- TOR:
Deionizirana voda: 0,10 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,25 – 10,00 mg/L
- KARBA:
Deionizirana voda: 0,10 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,10 – 10,00 mg/L
- DEKSA:
Deionizirana voda: 0,50 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 1,00 – 10,00 mg/L
- β -ESTRA:
Deionizirana voda: 0,50 – 20,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,50 – 20,00 mg/L
- DIA:
Deionizirana voda: 0,05 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,25 – 10,00 mg/L
- DCF:
Deionizirana voda: 0,10 – 10,00 mg/L
Vodovodna voda: 0,10 – 10,00 mg/L

Sumarno, može se reći kako je radno područje metode u objema vrstama vode od 0,05 mg/L do 20 mg/L.

4.9. ROBUSTNOST

U svrhu provedbe ispitivanja robusnosti metode, protok pokretne faze promijenjen je s 0,5 mL/min na 0,45 mL/min i 0,55 mL/min, kako bi se testirala promjena odziva detektora. Priređene su otopine farmaceutika nazivne koncentracije 7,5 mg/L, a odziv se mjerio u 5 vijalica za svaki farmaceutik. Dobivene vrijednosti srednjih površina pikova te relativna standardna odstupanja i koeficijenti korelacije prikazani su u **tablici 4.20.** za deioniziranu vodu, a u **tablici 4.21.** za vodovodnu vodu.

Sve vrijednosti RSD odstupanja manje su od 3 % izuzev β -ESTRA, čiji RSD iznosi 28,32 % u deioniziranoj te 13,76 % u vodovodnoj vodi. Možemo zaključiti kako metoda zadovoljava kriterij robusnosti.

Tablica 4.20. Vrijednosti za ispitivanje robusnosti metode u deioniziranoj vodi

| PROTOK | 0,45 mL/min | | | 0,50 mL/min | | | 0,55 mL/min | | |
|----------------|-----------------|-------|-----------|-----------------|-------|-----------|-----------------|--------|-----------|
| | A _{sr} | STD | RSD, % | A _{sr} | STD | RSD, % | A _{sr} | STD | RSD, % |
| AMOX | 1313,32 | 1,61 | 0,12 | 1172,40 | 5,84 | 0,50 | 1062,56 | 1,86 | 0,17 |
| ATL | 1669,60 | 2,41 | 0,14 | 1504,80 | 6,56 | 0,44 | 1358,56 | 3,29 | 0,24 |
| PROK | 1507,86 | 10,58 | 0,70 | 1358,46 | 5,59 | 0,41 | 1224,92 | 3,85 | 0,31 |
| OFX | 1801,44 | 63,99 | 3,55 | 1680,46 | 36,78 | 2,19 | 1429,92 | 76,01 | 5,32 |
| SMETH | 1444,22 | 1,95 | 0,13 | 1289,72 | 5,10 | 0,40 | 1161,32 | 1,51 | 0,13 |
| SMETOX | 1392,98 | 3,09 | 0,22 | 1244,50 | 1,81 | 0,15 | 1130,40 | 3,37 | 0,30 |
| TOR | 875,06 | 2,80 | 0,32 | 793,38 | 7,27 | 0,92 | 718,26 | 1,22 | 0,17 |
| KARBA | 1894,08 | 2,52 | 0,13 | 1710,62 | 4,36 | 0,25 | 1557,50 | 3,31 | 0,21 |
| DEXA | 213,32 | 0,89 | 0,42 | 192,46 | 0,50 | 0,26 | 175,20 | 0,52 | 0,30 |
| β -ESTRA | 798,68 | 40,29 | 5,04 | 722,72 | 9,16 | 1,27 | 1060,54 | 300,44 | 28,32 |
| DIA | 837 | 5,73 | 0,68 | 731,32 | 4,20 | 0,57 | 709,80 | 15,49 | 2,18 |
| DCF | 1061,08 | 2,26 | 0,21 | 1041,38 | 45,78 | 4,40 | 871,14 | 1,66 | 0,19 |

Tablica 4.21. Vrijednosti za ispitivanje robusnosti metode u vodovodnoj vodi

| PROTOK | 0,45 mL/min | | | 0,5 mL/min | | | 0,55 mL/min | | |
|----------------|-----------------|-------|-----------|-----------------|--------|-----------|-----------------|--------|-----------|
| | A _{sr} | STD | RSD, % | A _{sr} | STD | RSD, % | A _{sr} | STD | RSD, % |
| AMOX | 924,18 | 58,10 | 6,29 | 755,50 | 117,96 | 15,61 | 760,82 | 22,56 | 2,97 |
| ATL | 1644,12 | 8,12 | 0,49 | 1484,06 | 11,25 | 0,76 | 1325,32 | 7,59 | 0,57 |
| PROK | 1369,54 | 12,60 | 0,92 | 1205,90 | 21,53 | 1,79 | 1097,74 | 2,99 | 0,27 |
| OFX | 1975,06 | 9,57 | 0,48 | 1773,40 | 11,30 | 0,64 | 1601,78 | 14,80 | 0,92 |
| SMETH | 1369,94 | 2,95 | 0,22 | 1222,10 | 2,57 | 0,21 | 1103,58 | 4,40 | 0,40 |
| SMETOX | 1392,98 | 3,08 | 0,22 | 1244,50 | 1,81 | 0,15 | 1130,40 | 3,37 | 0,30 |
| TOR | 793,48 | 2,56 | 0,32 | 714,30 | 2,06 | 0,29 | 650,32 | 1,58 | 0,24 |
| KARBA | 1759,96 | 3,66 | 0,21 | 1586,12 | 2,42 | 0,15 | 1444,86 | 5,08 | 0,35 |
| DEXA | 993,06 | 1,97 | 0,20 | 894,86 | 2,70 | 0,30 | 813,20 | 3,08 | 0,38 |
| β -ESTRA | 823,64 | 2,80 | 0,35 | 763,60 | 22,63 | 2,96 | 756,18 | 104,03 | 13,76 |
| DIA | 2484,64 | 7,37 | 0,30 | 2220,14 | 3,30 | 0,15 | 2070,22 | 5,42 | 0,26 |
| DCF | 984,88 | 3,58 | 0,36 | 907,86 | 41,69 | 4,59 | 807,86 | 2,84 | 0,35 |

4.10. SAŽETAK REZULTATA

Tablica 4.22. Sažetak rezultata za amoksicilin

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 1,0000 / 0,9970 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,4970 / 0,5040 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,9940 / 1,0080 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 72,702 / 63,935 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 10,77 / 10,74 | DA/DA |
| Preciznost | RSD $\leq 10\%$ | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 1,21 / 2,57 | DA/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 0,33 / 3,69 | DA/DA |
| | $\gamma = 15$ mg/L | 0,28 / 2,61 | DA/DA |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 1,20 / 2,13 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 5,39 / 39,26 | DA/NE |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 0,64 / 3,30 | DA/DA |
| | $\gamma = 15$ mg/L | 0,40 / 3,21 | DA/DA |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 1,75 / 5,63 | DA/DA |
| F-test | $F_{\text{rač}} < F_{\text{teor}}$ | | |
| | $\gamma = 0,4$ mg/L, 6,39/9,12 | 0,06 / 0,02 | DA/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,27 / 1,29 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39 / 6,39 | 0,55 / 0,71 | DA/DA |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L, 6,59/6,39 | 1,38 / 0,17 | DA/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 88,21 / 271,24 | NE/NE |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 103,16 / 112,28 | DA/NE |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 80,04 / 95,95 | NE/DA |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,9940 – 20,0000 / 1,0080 – 20,0000 | |

Tablica 4.23. Sažetak rezultata za atenolol

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|---|--|---|--|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9999 / 0,9996 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,1008 / 0,0504 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,2016 / 0,1008 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 97,857 / 103,48 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 11,08 / 11,04 | DA/DA |
| Preciznost | RSD \leq 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 1,45 / 3,02 | DA/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 0,38 / 1,00 | DA/DA |
| | $\gamma = 15$ mg/L | 0,16 / 0,77 | DA/DA |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 0,44 / 0,50 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 1,61 / 3,00 | DA/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 0,40 / 3,13 | DA/DA |
| | $\gamma = 15$ mg/L | 0,15 / 0,44 | DA/DA |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 0,11 / 0,59 | DA/DA |
| F-test | $F_{\text{rač}} < F_{\text{teor}}$ | | |
| | $\gamma = 0,4$ mg/L, 6,39/9,28 | 0,84 / 0,91 | DA/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,93 / 0,09 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L 6,39 / 6,38 $\gamma = 20,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,38 / 0,71 16,36 / 0,71 | DA/DA NE/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,4$ mg/L $\gamma = 4,0$ mg/L $\gamma = 20,0$ mg/L | 74,20 / 82,32 89,52 / 94,78 93,17 / 95,06 | NE/NE DA/DA DA/DA |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,2016 – 20,0000 / 0,0504 – 20,0000 | |

Tablica 4.24. Sažetak rezultata za prokain

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|------------------------------------|------------------------------------|--|-------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9998 / 0,9992 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,0498 / 0,0498 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,0996 / 0,0996 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 176,87 / 173,93 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 12,21 / 12,19 | DA/DA |
| Preciznost | RSD ≤ 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 3,64 / 3,33 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,36 / 0,95 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,27 / 0,65 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,63 / 0,48 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 5,09 / 2,40 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,37 / 0,68 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,26 / 0,54 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,57 / 1,16 | DA/DA |
| F-test | $F_{rač} < F_{teor}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,32 / 1,92 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,59/6,39 | 0,96 / 0,93 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,22 / 1,45 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,25 / 0,18 | DA/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 94,45 / 130,99 | DA/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 100,24 / 98,93 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 102,21 / 70,75 | DA/NE |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,0996 – 10,0000 / 0,0996 – 10,0000 | |

Tablica 4.25. Sažetak rezultata za ofloksacin

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|------------------------------|---|-------------------------------------|-------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9938 / 0,9997 | NE/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,0502 / 0,0502 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,1004 / 0,1004 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 215,6 / 239,72 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 15,62 / 15,59 | DA/DA |
| Preciznost | RSD \leq 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 32,82 / 3,90 | NE/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 3,33 / 1,28 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 7,10 / 0,19 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 5,70 / 0,45 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 2,74 / 2,97 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 13,00 / 1,32 | NE/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 6,74 / 0,19 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 1,89 / 0,53 | DA/DA |
| F-test | $F_{rač} < F_{teor}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 19,25/6,39 | 35,10 / 1,83 | NE/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,08 / 0,93 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,18 / 8,01 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 9,70 / 0,73 | NE/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 167,23 / 80,27 | NE/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 81,03 / 92,65 | NE/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 100,22 / 98,37 | DA/DA |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,1004 – 10,0000 / 0,1004 – 10,0000 | |

Tablica 4.26. Sažetak rezultata za sulfametazin

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|------------------------------------|------------------------------------|--|-------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9999 / 0,9999 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,0501 / 0,0501 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,1002 / 0,1002 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 164,41 / 170,04 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 17,15 / 17,13 | DA/DA |
| Preciznost | RSD ≤ 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 1,19 / 3,53 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,31 / 0,47 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,18 / 0,60 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,34 / 0,25 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 1,12 / 1,46 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,36 / 0,46 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,12 / 0,18 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,19 / 0,19 | DA/DA |
| F-test | $F_{rač} < F_{teor}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,29 / 5,94 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,83 / 1,02 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 2,79 / 11,12 | DA/NE |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 3,79 / 1,78 | DA/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 101,46 / 87,65 | DA/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 97,02 / 94,71 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 99,41 / 97,11 | DA/DA |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,1002 – 10,0000 / 0,1002 – 10,0000 | |

Tablica 4.27. Sažetak rezultata za sulfametoksazol

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|------------------------------|---|-------------------------------------|-------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9999 / 1,0000 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,1008 / 0,1004 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,2520 / 0,2510 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 62,11 / 44,46 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 21,06 / 21,03 | DA/DA |
| Preciznost | RSD \leq 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 3,85 / 7,90 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,39 / 1,15 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,21 / 0,61 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,54 / 0,30 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 4,24 / 1,52 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,54 / 0,29 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,17 / 0,20 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,26 / 0,08 | DA/DA |
| F-test | $F_{rač} < F_{teor}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 6,39/6,94 | 0,42 / 1,73 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,28 / 0,94 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,87 / 0,57 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 2,43 / 0,92 | DA/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 88,99 / 354,69 | NE/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 80,14 / 364,02 | NE/NE |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 81,32 / 372,18 | NE/NE |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,2520 – 10,0000 / 0,2510 – 10,0000 | |

Tablica 4.28. Sažetak rezultata za torasemid

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|------------------------------------|------------------------------------|--|-------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9997 / 0,9999 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,0500 / 0,1000 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,1000 / 0,2500 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 91,49 / 96,81 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 22,41 / 22,38 | DA/DA |
| Preciznost | RSD ≤ 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 21,77 / 2,48 | NE/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,35 / 0,64 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,45 / 0,55 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,52 / 0,45 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 2,88 / 0,76 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,33 / 0,50 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,21 / 0,25 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,23 / 0,18 | DA/DA |
| F-test | $F_{rač} < F_{teor}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 6,39/6,39 | 36,23 / 11,05 | NE/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,19 / 1,57 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 5,42 / 5,03 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 5,51 / 6,21 | DA/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 92,94 / 80,56 | DA/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 99,54 / 95,21 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 101,95 / 98,52 | DA/DA |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,1000 – 10,0000 / 0,2500 – 10,0000 | |

Tablica 4.29. Sažetak rezultata za karbamazepin

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|---|------------------------------------|--|--------------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 1,0000 / 0,9999 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,0501 / 0,0501 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,1002 / 0,1002 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 212,54 / 228,75 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 26,01 / 26,59 | DA/DA |
| Preciznost | RSD ≤ 10 % | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 1,55 / 6,33 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,40 / 0,55 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,21 / 0,48 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,46 / 0,26 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 4,79 / 2,71 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 3,80 / 0,61 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,17 / 0,32 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,07 / 0,17 | DA/DA |
| F-test | $F_{rač} < F_{teor}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 6,39/6,59 | 0,10 / 9,38 | DA/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,01 / 0,83 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,67 / 2,39 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 39,57 / 2,46 | NE/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 100,13 / 77,41 | DA/NE |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 100,35 / 99,93 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 100,15 / 101,86 | DA/DA |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,1002 – 10,0000 / 0,1002 – 10,0000 | |

Tablica 4.30. Sažetak rezultata za deksametazon

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|---|--|--|--|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9998 / 1,0000 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,2495 / 4960 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,4990 / 0,9920 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 117,88 / 25,54 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 26,63 / 26,59 | DA/DA |
| Preciznost | RSD \leq 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | - / 1,38 | NE/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,89 / 0,80 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,38 / 0,57 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,32 / 0,31 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | - / 1,53 | NE/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 1,57 / 9,58 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,15 / 0,24 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,26 / 0,15 | DA/DA |
| F-test | $F_{rač} < F_{teor}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, - / 6,59 | - / 0,00 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,35 / 2,00 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 7,50 / 0,01 | NE/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,75 / 0,57 | DA/DA |
| Istinitost Iskoristivost | 90 % - 110 % $\gamma = 0,2$ mg/L $\gamma = 2,0$ mg/L $\gamma = 10,0$ mg/L | - / 719,05 24,04 / 439,97 22,99 / 468,12 | NE/NE NE/NE NE/NE |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,4990 – 10,0000 / 0,9920 – 10,0000 | |

Tablica 4.31. Sažetak rezultata za β -estradiol

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|---|------------------------------------|--|--------------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9945 / 0,9914 | DA/NE |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,2020 / 0,2020 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,5050 / 0,5050 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 49,149 / 45,258 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 30,18 / 30,14 | DA/DA |
| Preciznost | RSD \leq 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 45,08 / 0,66 | NE/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 1,27 / 0,60 | DA/DA |
| | $\gamma = 15$ mg/L | 4,40 / 10,08 | DA/NE |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 7,27 / 10,73 | DA/NE |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 2,74 / 3,62 | DA/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 2,09 / 0,79 | DA/DA |
| | $\gamma = 15$ mg/L | 5,28 / 5,95 | DA/DA |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 4,80 / 3,99 | DA/DA |
| F-test | $F_{\text{rač}} < F_{\text{teor}}$ | | |
| | $\gamma = 0,4$ mg/L, 6,39/9,28 | 710,46 / 0,06 | NE/DA |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L, 6,59/6,94 | 0,36 / 0,91 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L 6,39/6,59 | 0,60 / 2,15 | DA/DA |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L, 6,59/6,39 | 2,16 / 5,36 | DA/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,4$ mg/L | 67,74 / 82,10 | NE/NE |
| | $\gamma = 4,0$ mg/L | 97,52 / 116,82 | DA/NE |
| | $\gamma = 20,0$ mg/L | 102,03 / 124,87 | DA/NE |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,5050 – 20,0000 / 0,5050 – 20,0000 | |

Tablica 4.32. Sažetak rezultata za diazepam

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|---|--|--|----------------------------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9999 / 0,9998 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,0247 / 0,0998 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,0493 / 0,2495 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 314,43 / 103,53 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 31,06 / 31,10 | DA/DA |
| Preciznost | RSD \leq 10% | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 11,20 / 7,56 | NE/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,81 / 1,53 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,87 / 0,26 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,39 / 0,36 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 4,86 / 8,02 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,85 / 0,59 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,79 / 0,26 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 3,87 / 0,22 | DA/DA |
| F-test | $F_{\text{rač}} < F_{\text{teor}}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 6,39/6,39 | 4,22 / 0,05 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,76 / 0,78 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,20 / 0,13 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,01 / 0,36 | DA/DA |
| Istinitost Iskoristivost | 90 % - 110 % $\gamma = 0,2$ mg/L $\gamma = 2,0$ mg/L $\gamma = 10,0$ mg/L | 48,09 / 355,55 37,97 / 299,80 39,88 / 306,45 | NE/NE NE/NE NE/NE |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,0493 – 20,0000 / 0,2495 – 20,0000 | |

Tablica 4.33. Sažetak rezultata za diklofenak

| IZVEDBENA ZNAČAJKA | KRITERIJ | REZULTAT Deionizirana/Vodovodna | ZADOVOLJAVA |
|-------------------------------------|------------------------------------|---|--------------------|
| Linearnost | $R^2 > 0,995$ | 0,9999 / 0,9999 | DA/DA |
| Granica detekcije, mg/L | rezultat | 0,0497 / 0,0497 | |
| Granica kvantifikacije, mg/L | rezultat | 0,0994 / 0,0994 | |
| Osjetljivost, L/mg | rezultat | 111,030 / 89,864 | |
| Selektivnost, min | rezultat | 33,98 / 34,00 | DA/DA |
| Preciznost | RSD ≤ 10 % | | |
| Ponovljivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 0,54 / 2,70 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,30 / 0,48 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,16 / 0,67 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,42 / 0,33 | DA/DA |
| Međupreciznost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 3,16 / 2,27 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 0,52 / 0,40 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L | 0,16 / 0,25 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 0,33 / 0,23 | DA/DA |
| F-test | $F_{\text{rač}} < F_{\text{teor}}$ | | |
| | $\gamma = 0,2$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,03 / 1,39 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,37 / 1,36 | DA/DA |
| | $\gamma = 7,5$ mg/L, 6,39/6,39 | 0,57 / 4,31 | DA/DA |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L, 6,39/6,39 | 1,81 / 1,23 | DA/DA |
| Istinitost | 90 % - 110 % | | |
| Iskoristivost | $\gamma = 0,2$ mg/L | 99,84 / 95,87 | DA/DA |
| | $\gamma = 2,0$ mg/L | 105,12 / 119,42 | DA/NE |
| | $\gamma = 10,0$ mg/L | 107,97 / 123,78 | DA/NE |
| Radno područje, mg/L | rezultat | 0,0994 – 20,0000 / 0,0994 – 20,0000 | |

5. ZAKLJUČAK

Ovim radom razvijena je kromatografska metoda za određivanje smjese farmaceutika u deioniziranoj i u vodovodnoj vodi. Uporabljivost metode ispitana je eksperimentima, koji uključuju ispitivanje njezinih izvedbenih značajki. Uza sve do sada rečeno, može se zaključiti:

- ✓ Metoda je **linearna** za sve farmaceutike u objema vrstama vode.
- ✓ Najmanja vrijednost **granice detekcije** u deioniziranoj vodi iznosi $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ za DIA, a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ u vodovodnoj vodi za ATL, PROK, OFX, SMETH, KARBA, DCF.
- ✓ Najmanja vrijednost **granice kvantifikacije** u deioniziranoj vodi iznosi $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ za DIA, a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ u vodovodnoj vodi za istih šest farmaceutika: ATL, PROK, OFX, SMETH, KARBA, DCF.
- ✓ Metoda je kod većine farmaceutika **osjetljivija** u deioniziranoj nego li u vodovodnoj vodi; najosjetljivija je na OFX, čija je osjetljivost $215,60 \text{ L/mg}$ u deioniziranoj te $239,72 \text{ L/mg}$ u vodovodnoj vodi; najmanje je osjetljiva na β -ESTRA, za koji je osjetljivost $49,14 \text{ L/mg}$ u deioniziranoj te $45,26 \text{ L/mg}$ u vodovodnoj vodi.
- ✓ Metoda je **selektivna** za sve farmaceutike u objema vrstama vode, s obzirom na gotovo jednake vrijednosti vremena njihova zadržavanja.
- ✓ Metoda u potpunosti **zadovoljava kriterij preciznosti** za AMOX, PROK, SMETOX, DIA i DCF, s obzirom da je kriterij F -testa za te farmaceutike ostvaren kod svih koncentracija. ATL, SMETH, TOR i DEXA zadovoljavaju F -test kod tri od četiriju koncentracija. Kod ATL i SMETH javljaju se manja odstupanja pri višim koncentracijama, a TOR i β -ESTRA pokazuju odstupanja kod nižih koncentracija. Uvjet vrijednosti relativnog standardnog odstupanja, $R^2 \leq 10\%$ – u potpunosti je ispunjen za ATL, PROK, SMETH, SMETOX, KARBA, DCF. Odstupanja pri nižim koncentracijama javljaju se kod AMOX, DEXA, β -ESTRA i DIA u deioniziranoj vodi, te kod AMOX i DEXA u vodovodnoj vodi.
- ✓ Metoda je u deioniziranoj vodi **istinita** za PROK, SMETH, TOR, KARBA i DCF pri svim koncentracijama, za ATL i β -ESTRA pri dvjema višim koncentracijama, za AMOX pri 4 mg/L , a za OFX pri 10 mg/L .

Metoda je u vodovodnoj vodi **istinita** za AMOX, ATL, OFX, SMETH, TOR i KARBA pri dvjema od triju koncentracija, za PROK pri srednjoj koncentraciji, za DCF pri najnižoj koncentraciji, a za β -ESTRA **nije istinita**. Metoda za SMETOX, DEXA i DIA **nije istinita** niti u jednoj od dvije vrste vode.

- ✓ Sumarno **radno područje metode** je od 0,05 mg/L do 20 mg/L u objema vrstama vode.
- ✓ Metoda je u objema vrstama vode **robustna** na promjene protoka za većinu farmaceutika, osim za OFX i β -ESTRA u deioniziranoj vodi te za AMOX i β -ESTRA, kod kojih se javljaju odstupanja RSD vrijednosti iznad 3 % pri promjeni protoka.

Razvijena kromatografska metoda validirana je i ispravna za većinu farmaceutika. Može se zaključiti da je najprikladnija za određivanje atenolola, prokaina, diazepama, sulfametoksazola, karbamazepina i diklofenaka, a najmanje je pouzdana pri određivanju ofloksacina i β -estradiola. Ovom metodom dokazana je mogućnost jednostavnog praćenja smjese farmaceutika u vodi, što je neizmjerljivo važno u održavanju ispravnosti voda. Ispuštanje nekontrolirane otpadne vode u okoliš predstavlja sve veći problem – ali s ipak postojećim rješenjem. Nužno je pokrenuti detaljnije ispitivanje kakvoće voda prije njihova ispuštanja, kako za dobrobit okoliša, tako i za vlastito zdravlje.

6. LITERATURA

- [1] M. Periša, S. Babić: Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* **65** (9-10) (2016) 471–482.
- [2] K. Kummerer, Pharmaceuticals in the Environment, *Annu. Rev. Environ. Resour.* **35** (2010) 57–75.
- [3] K. Kummerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, *Chemosphere* **75** (2009) 417–434.
- [4] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin> (pristup: 3.5.2023.)
- [5] B.G Katzung, Basic & clinical pharmacology (14th), McGraw-Hill, New York, 2018., str. 262-263; 437; 795-801; 834-837.
- [6] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ofloxacin> (pristup: 3.5.2023.)
- [7] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethazine> (pristup: 3.5.2023.)
- [8] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole> (pristup: 3.5.2023.)
- [9] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atenolol> (pristup: 3.5.2023.)
- [10] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Procaine> (pristup: 3.5.2023.)
- [11] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Torseמידe> (pristup: 3.5.2023.)
- [12] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbamazepine> (pristup: 3.5.2023.)
- [13] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone> (pristup: 3.5.2023.)
- [14] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estradiol> (pristup: 3.5.2023.)
- [15] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diazepam> (pristup: 3.5.2023.)
- [16] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac> (pristup: 3.5.2023.)
- [17] M. Šabić, M. Vuković Domanovac, Z. Findrik Blaževića i E. Meštrović, Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode, *Kem. Ind.* **64** (5-6) (2015) 229–236.

- [18] A. Tomić, H. Kušić, T. Bolanča i A. Lončarić Božić, Nova mikroonečišćivala u vodenom okolišu, *Hrvatske vode* **29** (118)(2021), 241-254.
- [19] B. Ferrari, R. Mons, B. Vollat, B. Fraysse, N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio, J. Garric, Environmental risk assessment of six human pharmaceutical: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23** (2004) 1344-1354.
- [20] R. Brian, D. Johnson, S. Richards, H. Sanderson, P. Sibley, K. Solomon, Effects of 25 pharmaceutical compounds to Lemma Gibba using a seven-day static-renewal test, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23** (2004) 371-382.
- [21] F. Wode, P. van Baar, U. Dünnbier, F. Hecht, T. Taute, M. Jekel, T. Reemtsma, Search for over 2000 current and legacy micropollutants on a wastewater infiltration site with a UPLC-high resolution MS target screening method, *Water research*, **69** (2015) 274-283.
- [22] Skupina autora, Tehnička enciklopedija (1963.-1997.)
- [23] M. Kaštelan-Macan: Kemijska analiza u sustavu kvalitete (2003), str. 217-235.
- [24] S. Ahuja, M. W. Dong, Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC, Elsevier (2005)
- [25] The Fitness for Purpose od Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation on Related Topics 2nd Edition, Eurachem (2014)
- [26] K. Lazarić: Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Laboratoriji* **62** (2012) 61-64.

7. ŽIVOTOPIS

Leona Čakić [REDACTED] Osnovnu školu Dore Pejačević upisuje 2007. godine, a završava 2015. Iste godine završava i Osnovnu glazbenu školu Kontesa Dora te upisuje Isusovačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Osijeku, koju završava 2019., nakon čega upisuje smjer Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odrađuje 2022. godine u Saponiji d.d. pod vodstvom mentorice Silvije Margeta. Na fakultetu sudjeluje u dvjema CeSaR radionicama.