

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje hidroksiklorokina

Pek, Elvira

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:149:880634>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Elvira Pek

**RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRFSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE HIDROSIKLOROKINA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

dr. sc. Mirta Čizmić

Zagreb, srpanj 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu uz financijsku potporu Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 „Sudbina farmaceutika u okolišu i tijekom naprednih postupaka obrade vode“



Zahvala:

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na stručnom vođenju, pomoći i strpljenju pri izradi mog završnog rada. Također joj se zahvaljujem na pristupačnosti i vrlo ugodnoj radnoj atmosferi.

Također, iskreno se zahvaljujem i mag. chem. Dariju Dabiću na velikoj pomoći, razumijevanju i savjetima pri izvođenju eksperimentalnog dijela završnog rada.

Zahvalu dugujem i tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći, susretljivosti i suradnji tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i svim prijateljima koji su bili uz mene i bez kojih ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojoj mami. Hvala joj na ljubavi, strpljivosti, razumijevanju i velikoj potpori tijekom studija.

Velika HVALA svima!

SAŽETAK

Validacija analitičke metode prvi je korak osiguravanja kvalitete i nužan u sustavu kvalitete laboratorija radi sudjelovanja u međulaboratorijskim ispitivanjima koji su preduvjet akreditacije svakog laboratorija. Da bi se validirao analitički sustav, potrebno je provesti vrednovanje svih njegovih bitnih izvedbenih značajki: linearnost, selektivnost/specifičnost, osjetljivost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, područje primjene, preciznost i robusnost.

Cilj ovog rada bio je validirati prethodno razvijenu kromatografsku metodu za određivanje farmaceutika hidroksiklorokina, upoznati se s cjelokupnim postupkom validacije analitičke metode i na kraju na temelju rezultata zaključiti zadovoljavali li razvijena metoda kriterije prihvatljivosti. Pripremljene su otopine hidroksiklorokina u MilliQ i izvorskoj vodi te je provedeno ispitivanje svih izvedbenih značajki validacije tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda. Rezultati istraživanja pokazali su da je metoda prihvatljiva za određivanje hidroksiklorokina jer su gotovo sve izvedbene značajke unutar postavljenih granica prihvatljivosti.

Ovo istraživanje i rezultati koji su njime dobiveni poslužit će kao primjer kako treba provesti validaciju analitičke metode i dati uvid u valjanu analitičku metodu za određivanje hidroksiklorokina koja se može koristiti u budućim istraživanjima.

Ključne riječi: tekućinska kromatografija, validacija analitičke metode, farmaceutici, hidroksiklorokin

SUMMARY

Validation of the analytical method is the first step in ensuring quality and it is necessary in the laboratory quality system for participation in interlaboratory trials which are a prerequisite for accreditation of each laboratory. In order to validate the analytical system, it is necessary to evaluate all its essential parameters: linearity, selectivity/specificity, sensitivity, accuracy, limits of detection and quantification, the area of application, repeatability and robustness.

The aim of this work is to validate the previously developed chromatographic method for the determination of pharmaceutical hydroxychloroquine, to familiarize with the whole validation of analytical method and finally to conclude whether the developed method is suitable for intended purpose. Hydrochloric acid solutions in MilliQ and well water were prepared and validation of high performance liquid chromatography coupled to diode array detector was performed. The results of the research have shown that the method is acceptable for the determination of hydroxychloroquines since almost all parameters were within the established limits of eligibility.

This research and the results obtained will serve as an example of how to validate the analytical method and provide an insight into a valid analytical method for determining the hydroxychloroquine that can be used in future research.

Key words: liquid chromatography, validation of analytical method, pharmaceutical, hydroxychloroquine

Sadržaj

1. UVOD	8
2. TEORIJSKI DIO	9
2.1. Farmaceutici u okolišu.....	9
2.1.1. Hidroksiklorokin i desetilhidroksiklorokin	10
2.2. Kromatografija	12
2.2.1. Parametri kromatografskog razdvajanja	13
2.2.2. Tekućinska kromatografija	15
2.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC	16
2.2.4. Detektori	17
2.2.5. DAD detektor	18
2.3. Validacija analitičke metode.....	19
2.3.1. Izvedbene značajke metode.....	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Materijali	24
3.1.1. Kemikalije.....	24
3.1.2. Hidroksiklorokin	24
3.1.3. Izvorska voda.....	25
3.2. Instrumenti.....	25
3.2.1. Analitička vaga.....	25
3.2.2. Uređaj za filtraciju.....	26
3.2.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti.....	27
3.3. Metode rada.....	28
3.3.1. Kromatografska analiza na HPLC-DAD	28
3.3.2. Priprema temeljne standardne otopine hidroksiklorokina	28
3.3.3. Priprema standardnih otopina hidroksiklorokina u MiliQ i izvorskoj vodi za provjeru linearnosti.....	28
3.3.4. Priprema standardnih otopina hidroksiklorokina za procjenu preciznosti	29
3.3.5. Određivanje robusnosti.....	30
3.3.6. Stabilnost otopine hidroksiklorokina	30
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1. Validacija HPLC–DAD kromatografske metode za određivanje hidroksiklorokina u izvorskoj vodi	33
4.1.1. Specifičnost / selektivnost	33

4.1.2.	Linearnost	35
4.1.3.	Osjetljivost.....	38
4.1.4.	Preciznost.....	39
4.1.5.	Istinitost	43
4.1.6.	Granica kvantifikacije (GK) i granica detekcije (GD).....	44
4.1.7.	Radno područje.....	45
4.1.8.	Robusnost	45
4.1.9.	Stabilnost otopine hidroksiklorokina	52
4.1.10.	Sažetak rezultata.....	54
5.	ZAKLJUČAK.....	55
6.	LITERATURA	56
7.	ŽIVOTOPIS.....	58

1. UVOD

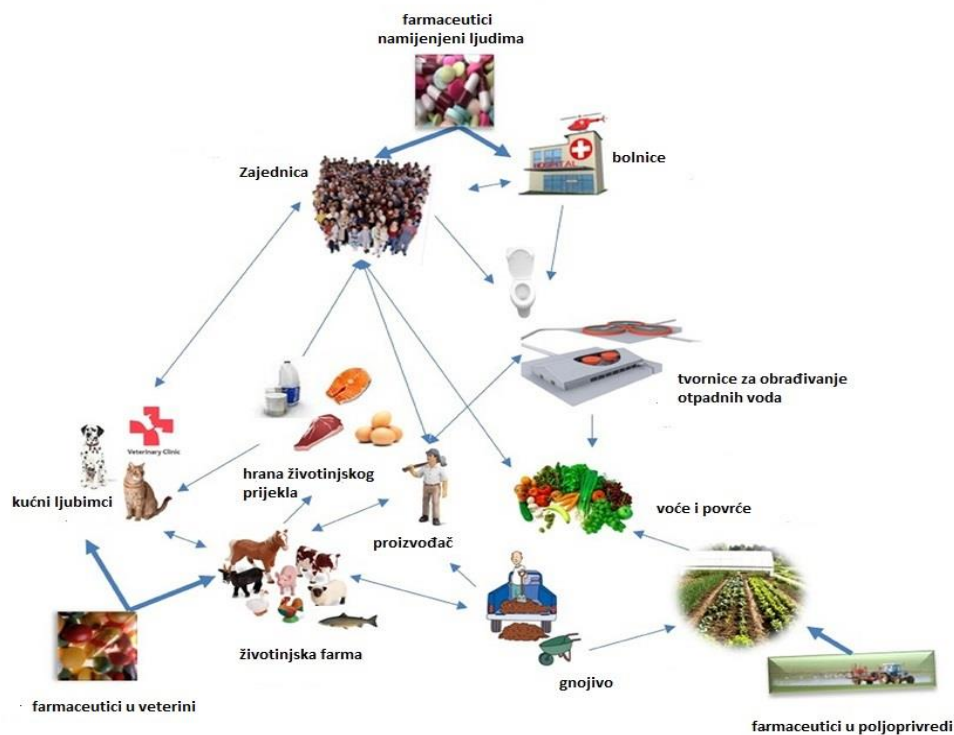
Kemijska analiza zadire danas u sve aspekte materijalnog života razvijajući se u problemski orijentiranu znanost koja je ne samo potpora drugim znanstvenim područjima, nego i nezavisna kemijska disciplina. Rezultati kemijske analize vezani su za proizvodnju, okoliš i ljudsko zdravlje. Važnost pouzdanosti analitičkih metoda je velika i iz toga razloga potrebno je raditi na njima, razvijajući nove metode, poboljšavajući već postojeće te ispitivati kvalitetu njihovih rezultata. Važno je na tom putu upoznati se s kromatografijom kao danas najraširenijom analitičkom tehnikom te ispitivati sve njene mogućnosti i granice izdržljivosti. Kako je koncentracija farmaceutika u okolišu iz godine u godinu sve veća što nikako nije pogodno za čovjekov život javlja se potreba za razvojem pouzdanih analitičkih metoda koje mogu dati kvalitetne i brze rezultate u svrhu kontrole i posljedično pravilnog zbrinjavanja farmaceutika u korist zdravije okoline i zdravlja ljudi i životinja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Farmaceutici u okolišu

Farmaceutici su spojevi koje danas znamo pod nazivom „nova zagađivala“. Donedavno im se nije pridodavalo puno značenja kao zagađivalima iako se sve češće ispuštaju u okoliš u količinama koje bi mogle predstavljati potencijalnu opasnost za ekosustav. Koriste se za liječenje ili sprječavanje bolesti ljudi i životinja te kao promotori rasta u veterinarskoj medicini, a posljedica upotrebe farmaceutika je njihova prisutnost u okolišu gdje se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava vežu na tlo i sediment ili podliježu procesima razgradnje. Rezultat procesa razgradnje vodi smanjenju koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanku novih spojeva koji mogu biti više ili manje stabilni i toksični u odnosu na početnu molekulu farmaceutika. U većini dosadašnjih istraživanja određivane su koncentracije farmaceutika u okolišu, a još se uvijek malo zna o njihovom ponašanju i sudbini u okolišu. Iako su prisutni u niskim koncentracijama, svakodnevnim ispuštanjem farmaceutika u okoliš kao vrlo kompleksnih smjesa može za posljedicu imati veće koncentracije koje mogu ostaviti dugoročne i negativne utjecaje na vodene i kopnene organizme. U okoliš se unose putem izlučevina, nepropisnim odlaganjem neupotrebljenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja, upotrebom u akvakulturi kao dodatak prehrani, čime se izravno unose u vodu te otpadnim vodama. Vrlo je bitno raditi na proučavanju i objašnjavanju procesa kojima su farmaceutici podvrgnuti u okolišu jer njihovom razgradnjom nastaju novi spojevi, tzv. razgradni i transformacijski produkti. Pojam transformacija podrazumijeva promjenu u strukturi početne molekule farmaceutika, pri čemu molekulska masa ostaje ista, dok razgradnjom dolazi do cijepanja početne molekule i nastajanja spojeva s drugačijom molekulskom masom. Razgradni i transformacijski produkti mogu imati drugačija fizikalno-kemijska svojstva od početne molekule farmaceutika, a u nekim slučajevima su produkti razgradnje i toksičniji od početne molekule. Procesi razgradnje farmaceutika mogu biti abiotički (hidroliza i fotoliza) ili biotički (biološka razgradnja bakterijama i gljivicama) [1]. Farmaceutici su svuda oko nas i njihov utjecaj na okoliš dolazi sa svih strana. Oni obuhvaćaju sve terapijske lijekove namijenjene ljudima te veterinarske lijekove i dodatke prehrani. Također prisutni su u proizvodima za osobnu njegu, mirisima, losionima, šamponima, kremama za sunčanje, sapunima i kozmetici kojima se svakodnevno izlažemo. Shematski prikaz glavnih

puteva ulaska humanih i veterinarskih farmaceutika u okoliš prikazuje slika 1. Istraživanjima je potvrđena prisutnost farmaceutika u površinskim vodama, tlu, vodovodnoj vodi te otpadnim vodama nakon obrade. Antibiotici i estrogeni samo su dvije od brojnih vrsta farmaceutika za koje postoji sumnja da opstaju u okolišu zato što se ne mogu prirodno biološki razgraditi ili zbog njihova trajnog ispuštanja u okoliš. Nedavno su istraživanja pokazala prisutnost druge kategorije farmaceutskih aktivnih tvari, poput antidepresiva koji kao i svi ostali do sada spomenuti farmaceutici mogu imati velik utjecaj na živi svijet. Na temelju toga možemo zaključiti da je potreba za nadziranjem ostataka farmaceutika u okolišu danas neophodna, a tu mogućnost imamo zbog razvitka osjetljivih, točnih i pouzdanih analitičkih metoda koje se uspješno koriste za određivanje farmaceutike i njihovih metabolita u uzorcima iz okoliša [2].



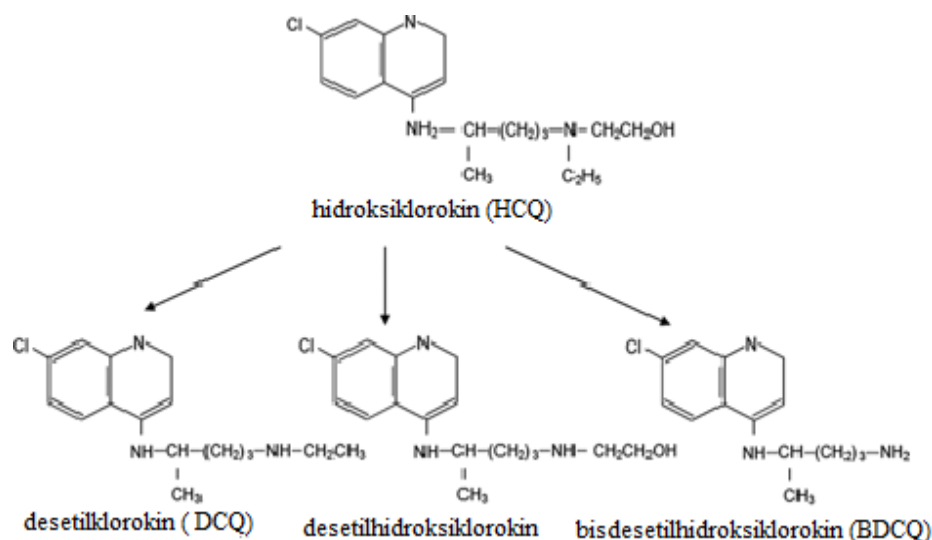
Slika 1. Glavni putevi ulaska humanih i veterinarskih farmaceutika u okoliš [3]

2.1.1. Hidroksiklorokin i desetilhidroksiklorokin

Hidroksiklorokin (HCQ) je antibiotik, derivat klorokina koji ima antimalarijsko i protuupalno djelovanje. Klorokin je otkrio Hans Andersag 1934. godine u Bayer-ovom laboratoriju. Desetljećima je bio ignoriran jer se smatrao previše toksičnim za ljudsku upotrebu. Tijekom Drugog Svjetskog rata, kliničke studije namijenjene razvoju

antimalarika sponzorirane vladom Sjedinjenih Američkih Država pokazale su da klorokin ima značajnu terapijsku vrijednost kao antimalarijski lijek. U kliničku praksu uveden je 1947. godine. Njegov derivat, hidroksiklorokin na tržištu se pojavljuje pod imenom Plaquenil. Nedavno je postao službeni lijek za reumatoidni artritis. Kemoterapijsko je sredstvo koje djeluje protiv eritrocitnih oblika malaričnih parazita. Točan mehanizam djelovanja nije poznat, ali pretpostavlja se da se temelji na njegovoj sposobnosti da se veže i mijenja DNA. Kao antireumatik, hidroksiklorokin djeluje kao blagi imunosupresiv. Lijek se uzima oralno i gotovo uvijek zajedno s drugim lijekovima. Da bi se postiglo poboljšanje potrebno je više mjeseci liječenja, a uzimanje hidroksiklorokina može dovesti do smanjivanja količina kortikosteroida potrebnih za pomoć kod olakšavanja bolova i upale. Kao nuspojave često se javlja mučnina, kožni osip, krv ili bjelančevine u mokraći te jetrene funkcije odstupaju od normale. Pacijenti se upućuju na pregled očiju svakih tri do šest mjeseci jer njegovim utjecajem može doći do oštećenja fundusa oka [4].

HCQ metabolizira u jetri pri čemu mogu nastati tri aktivna metabolita: desetilklorokin (DCQ), desetilhidroksiklorokin (DHCQ) i bisdesetilklorokin (BDCQ) (Slika 2).



Slika 2. Metabolizam HCQ [5]

2.2. Kromatografija

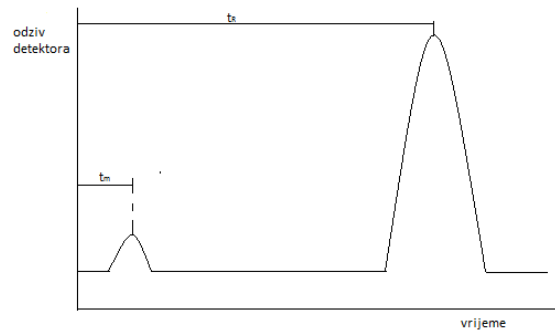
Kromatografija, kao najučinkovitija separacijska tehnika, najprimjenjivija je od brojnih analitičkih postupaka koji se danas koriste. Niti jedna druga metoda kemijske analize nije tako moćna i svestranih mogućnosti primjene kao kromatografija. Kada kažemo „kromatografija“ govorimo zapravo o izuzetno velikom broju analitičkih sustava i tehnika što nam potvrđuje njenu veliku primjenu i važnost u kemijskoj analizi. Kromatografska analiza služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka koji su prisutni u složenim smjesama [6]. Svaki kromatografski sustav sastoji se od dvije faze, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze te ispitivanog spoja. Ispitivani spoj se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između dviju navedenih faza. Kao posljedica gibanja faza dolazi do narušavanja ravnotežnog stanja što uzrokuje putovanje skupine molekula u smjeru gibanja pokretne faze koja nosi sastojke ispitivanog uzorka kroz nepokretnu fazu. Odjeljivanje sastojaka temelji se na njihovim različitim brzinama kretanja kroz nepokretnu fazu [7]. Važno je odabrati nepokretnu fazu tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, tj. da različiti sastojci smjese budu uz nju različito vezani, što rezultira razdvajanjem smjese jer je brzina različitih komponenata smjese kroz sustav proporcionalna njihovoj interakciji s nepokretnom fazom [8]. Kromatografiju dijelimo s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze na razdjelnu, adsorpcijsku, afinitetnu i kromatografiju isključenjem. Kada se ravnoteža uspostavlja između dviju kapljevina, što znači da je i nepokretna faza kapljevina vezana za inertni čvrsti nosač, govorimo o razdjelnoj kromatografiji. Adsorpcijska kromatografija je ona pri kojoj se ravnoteža uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa. Kada se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom govorimo o afinitetnoj kromatografiji. Kod takve kromatografije vezanje nastaje zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini pokretne faze. U slučaju kada je nepokretna faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom, a do razdvajanja molekula dolazi zbog razlike u molekularnoj masi i obujmu govorimo o kromatografiji isključenjem. Druga podjela kromatografskih tehnika izvršena je prema sastavu pokretne faze. Kad je pokretna faza plin, govorimo o plinskoj kromatografiji dok je kod tekućinske

kromatografije pokretna faza kapljevine male viskoznosti. Kada je pokretna faza tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka radi se o fluidnoj kromatografiji u superkritičnim uvjetima [7]. Tekućinska kromatografija izvodi se u kolonama i na ravnim površinama, a plinska kromatografija i kromatografija sa superkritičnim fluidom ograničene su na postupke u kolonama [6]. Svojstva nepokretne faze također definiraju vrstu kromatografske tehnike. Nepokretna faza uglavnom je porozni zrnasti prašak velike specifične površine koja se modificiranjem može dodatno aktivirati. Ako je ona gusto pakirana u kromatografskom stupcu govorimo o kromatografiji na stupcu, a ako je nanesena na inertnu podlogu kao tanak homogeni film govorimo o tankoslojnoj kromatografiji. Tankoslojna kromatografija i kromatografija na papiru predstavnice su plošne kromatografije. Uzorak koji želimo kromatografski odijeliti i dokazati unosi se u vrlo malom volumenu na pokretnu fazu, kada je riječ o kromatografiji na stupcu ili na nepokretnu fazu, ako primijenimo plošnu kromatografiju. Uspostavljanjem kromatografskog procesa nakon stanovitog vremena razdvajaju se sastojci smjese. Kao rezultat kromatografske analize koji nam daje informaciju o uspješnosti separacije je kromatogram, kojeg definiramo kao zapisak koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka nakon završenog procesa razdvajanja u ovisnosti o vremenu ili volumenu elucije [7]. Eluciju definiramo kao proces u kojem pokretna faza ispire analizirane uzorke s nepokretne faze, a eluens kao otapalo koje nosi sastojke smjese kroz nepokretnu fazu [6]. O složenosti ispitivanog uzorka možemo zaključiti iz broja opaženih koncentracijskih profila. Položaj kromatografske krivulje na kromatogramu ili položaj mrlje daje uvid i dokazuje kvalitativni sastav uzorka, a na temelju površine kromatografske krivulje, odnosno njezine visine, dobije se i kvantitativna procjena ispitivanog uzorka [7].

2.2.1. Parametri kromatografskog razdvajanja

Definiramo tri važna parametra kromatografskog razdvajanja za optimizaciju kromatografske analize, a to su zadržavanje, protok kroz porozni mediji i širenje kromatografske zone. Za vrijeme prolaska kroz stupac molekule uzorka dio vremena provedu u pokretnoj, a dio u nepokretnoj fazi. Vrijeme koje sve molekule provedu u pokretnoj fazi nazivamo *zadržano vrijeme*, t_m i ono je jednako za sve molekule [7]. Zadržano vrijeme nam govori o vremenu koje prođe od trenutka injektiranja tvari koja

se ne veže na nepokretnu fazu do trenutka njezine detekcije i često se naziva mrtvo vrijeme [6]. *Vrijeme zadržavanja otopljene tvari*, t_R definirano je kao vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu tvar, a *prilagođeno vrijeme zadržavanja*, t_R' , je vrijeme koje otopljena tvar provede vezana uz nepokretnu fazu [7]. Uzorak često sadrže tvari koje kolona ne zadržava. Ako uzorak ne sadrži takav sastojak on se u njega može dodati čime se olakšava identifikacija sastojaka. Mali pik s lijeve strane (Slika 3.) predstavlja sastojak koji se ne zadržava u koloni pa u detektor dolazi gotovo neposredno nakon početka elucije. Dakle, vrijeme zadržavanja t_m je približno jednako vremenu potrebnome da molekule pokretne faze prođu kroz kolonu [6].



Slika 3. Vrijeme zadržavanja (t_R) i zadržano vrijeme (t_m) [6]

Za optimizaciju kromatografske separacije važan je omjer vremena koje otopljena tvar provede u nepokretnoj fazi i vremenu koje provede u pokretnoj fazi što označujemo *faktorom zadržavanja* k :

$$k = \frac{t_R'}{t_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (1)$$

Iz faktora zadržavanja može se izračunati vrijeme zadržavanja bilo koje otopljenje tvari prema jednadžbi:

$$t_R = t_m(k + 1) \quad (2)$$

$$t_m = \frac{L}{v} \quad (3)$$

$$t_R = \frac{L}{v} \cdot (k + 1) \quad (4)$$

pri čemu je L duljina stupca, a v prosječna brzina pokretne faze. Mogućnost separacije dvaju spojeva, odnosno njihovo relativno zadržavanje izražava se separacijskim faktorom α :

$$\alpha = \frac{t_{R''}(A)}{t_{R''}(B)} \quad (5)$$

Separacijski faktor je mjera selektivnosti kromatografskog sustava [7].

Drugi parametar koji definiramo je protok kroz porozni medij. Govori o pokretnoj fazi koja kroz sloj nepokretne faze u stupcu protječe uglavnom njezinim međuprostorima. Pokretna faza koja je uhvaćena unutar poroznih čestica uglavnom je stagnirajuća. Eksperimentalno određena prosječna brzina pokretne faze jednaka je omjeru duljine stupca L i zadržanog vremena nezadržane otopljene tvari t_m , a ovisi o sposobnosti prodiranja nezadržane otopljene tvari u volumenu pora. U kromatografskim uvjetima profil brzine je obično laminaran, pa vrijedi Darcyjev zakon:

$$v(x) = \left(\frac{-K}{\eta}\right) \cdot \frac{dP}{dx} \quad (6)$$

gdje je $v(x)$ brzina pokretne faze u točki x , K propusnost stupca, η viskoznost pokretne faze.

Kako uzorak prolazi kroz kromatografski stupac, kromatografska zona se širi proporcionalno duljini putovanja ili vremenu. Upravo to širenje površine kromatografske zone predstavlja treći parametar kromatografskog razdvajanja i ukazuje na učinkovitost kromatografske separacije. U literaturi se obično označuje kao broj teorijskih tavana (odsječaka) N ili kao visina tavana (odsječaka) H . Glavni uzrok širenja kromatografske zone je otpor prijenosu mase u pokretnoj i nepokretnoj fazi, što onemogućuje trenutačno uspostavljanje ravnoteže. Uzrok širenju kromatografske zone može biti i brzina protoka kroz nepokretnu fazu koja varira u kromatografskom stupcu, uzdužna difuzija u aksijalnom smjeru koja uzrokuje širenje zone neovisno o brzini pokretne faze te nepredvidljivi sorpcijsko – desorpcijski proces [7].

2.2.2. Tekućinska kromatografija

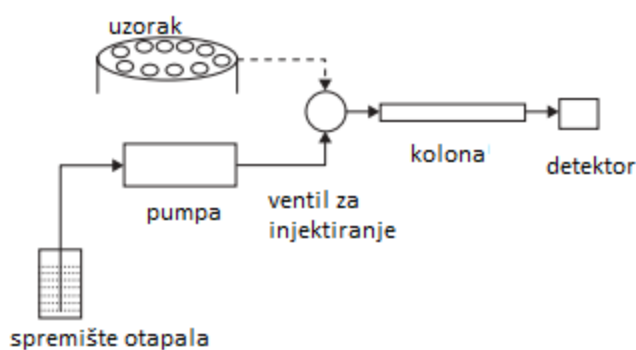
U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina, a nepokretnu fazu mogu činiti razni sorbensi. Dijelimo ju na adsorpcijsku kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza adsorbens te razdjelnu kromatografiju pri kojoj je kapljevinska

nepokretna faza nanosena na čvrsti inertni nosač. Tekućinska kromatografija ima izrazito velike mogućnosti uporabe za razdvajanje polarnih i nepolarnih spojeva i pogodna je za odjeljivanje smjesa koje se zbog niske hlapljivosti ili toplinske nestabilnosti ne mogu analizirati npr. plinskom kromatografijom. Ako pretpostavimo da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost kromatografskog stupca kod tekućinske kromatografije ovisi o duljini stupca, promjeru čestica punjenja i radnom tlaku. Također, i temperatura uvelike utječe na odjeljivanje pri tekućinskoj kromatografiji, posebice kad je riječ o otopinama male molekularne mase. Povišena temperatura poboljšava difuznost uzorka i reducira viskoznost pokretne faze, pa se time poboljšavaju kinetički parametri. Povišenjem temperature mijenja se i selektivnost stupca, a maksimalna dopuštena temperatura pri tekućinskoj kromatografiji je 20 °C niža od temperature vrelišta pokretne faze. Umjesto temperature, preporučuje se regulirati protok pokretne faze čime se poboljšava razdvajanje i smanjuje vrijeme zadržavanja. Kada govorimo o kromatografskom sustavu pri tekućinskoj kromatografiji važno je znati da je moguća upotreba normalnih i obratnih faza. Ta podjela izvršena je na temelju relativne polarnosti pokretne i nepokretne faze. Kromatografija normalnih faza pretpostavlja da je nepokretna faza polarna, a pokretna nepolarna i odjeljivanje smjese spojeva u tom slučaju ovisi o interakciji polarnog analita s polarnom nepokretnom fazom. U kromatografiji obrnutih faza pretpostavlja se da je nepokretna faza nepolarna, a pokretna polarna i mehanizam razdvajanja se temelji na hidrofobnosti analita. Primjenjiva je u razdvajanju homolognih i izomernih spojeva slične polarnosti, ali i onih vrlo polarnih i ioniziranih spojeva koji se zbog vrlo čvrste veze s nepokretnom fazom ne mogu razdvajati kromatografijom normalnih faza [7].

2.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC

Na početku razvitka tekućinske kromatografije primijećeno je da se najveća djelotvornost kromatografske kolone postiže smanjenjem dimenzije zrna punila, a tehnologija proizvodnje i primjene punila od 10 µm razvila se tek kasnijih 60-ih godina. Za primjenu te tehnologije bili su nužni mnogo složeniji uređaji od jednostavnih staklenih kolona, koje su se primjenjivale u klasičnoj tekućinskoj kromatografiji. Upravo se nazivom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) želi naglasiti razlika između novijih postupaka i klasičnih metoda, koje se još primjenjuju u preparativne svrhe [6].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u usporedbi s klasičnim tehnikama odjeljivanja izuzetna je po gotovo univerzalnoj primjenjivosti, izuzetnoj preciznosti analize (u većini slučajeva $\pm 0,5\%$ ili bolje), širokim rasponom opreme te je komercijalno dostupnija. Većina laboratorija koji se bave analizom kemijskih smjesa odlučuju se za HPLC kao prvi izbor opreme. HPLC je danas jedna od najkorisnijih i široko primijenjena analitička tehnika i zbog poboljšanja brzine te snage razdvajanja sastojaka u odnosu na prijašnje tehnike. Uspješna upotreba HPLC-a zahtjeva razumijevanje utjecaja određenih parametara kao što je promjena kolone, otapala, temperature i brzina protoka na razdvajanje komponenata. Shematski prikaz HPLC sustava (Slika 4.) prikazuje put otapala (pokretna faza) iz spremišta do detektora. Nakon ubrizgavanja uzorka, odvajanje komponente uzorka odvija se unutar kolone detekcijom odgovarajućim detektorom [9].

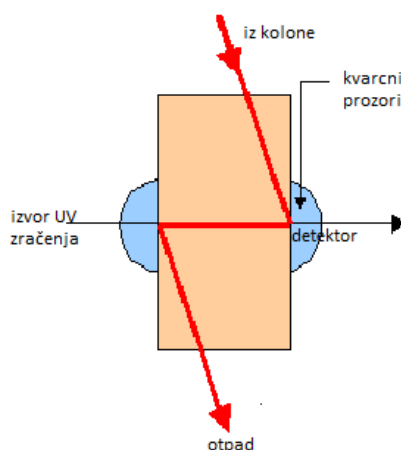


Slika 4. Shematski prikaz HPLC sustava [9]

2.2.4. Detektori

Detektor je uređaj koji se upotrebljava u kromatografiji kako bi se detektirale komponente smjese koje se eluiraju u kromatografskom stupcu. Definiran je i kao pretvornik koji pretvara fizička ili kemijska svojstva eluiranog analita u električni signal proporcionalan koncentraciji analita. Općenito, kromatografske detektore dijelimo na destruktivne i nedestruktivne. Destruktivni detektori obavljaju kontinuiranu transformaciju eluata iz kolone (gorenje, isparavanje ili miješanje s reagensima) uz naknadno mjerenje nekih fizikalnih svojstava dobivenih iz materijala (plazma, aerosol ili reakcijska smjesa). Nerazorni detektori izravno mjere neko svojstvo eluensa i time osiguravaju mogućnost daljnje analize istog uzorka. U tekućinskoj kromatografiji ne postoji jedinstveni detektor jer on ovisi o prirodi uzorka

i svojstvima koji su potrebni za detekciju određenog analita. Idealne značajke koje bi detektor za HPLC trebao imati su visoka osjetljivost za velik broj otapala, predvidljivi rezultat, pouzdanost i prikladnost za korištenje, rezultati koji se povećavaju proporcionalno s količinom otopljene tvari, ne razgrađuju otapalo i općenito pružaju kvalitetne informacije o otkrivenom analitu. Naravno, niti jedan detektor ne posjeduje sve te karakteristike u potpunosti, ali određeni detektori zadovoljavaju visoke kriterije koje HPLC tehnika zahtijeva [10]. Detektori koji se najčešće koriste u modernoj HPLC tehnici su fotometri temeljeni na apsorpciji ultraljubičastog (UV) (Slika 5.) ili vidljivog zračenja [6]. Takvi detektori imaju veliku osjetljivost za mnoga otapala, ali uvjet je da uzorci apsorbiraju u UV ili vidljivom dijelu spektra (190 – 600 nm). Pravilno dizajnirani detektori su relativno neosjetljivi na promjene protoka i temperature i imaju širok linearan raspon što omogućuje određivanje više komponenti u istom kromatogramu [9].

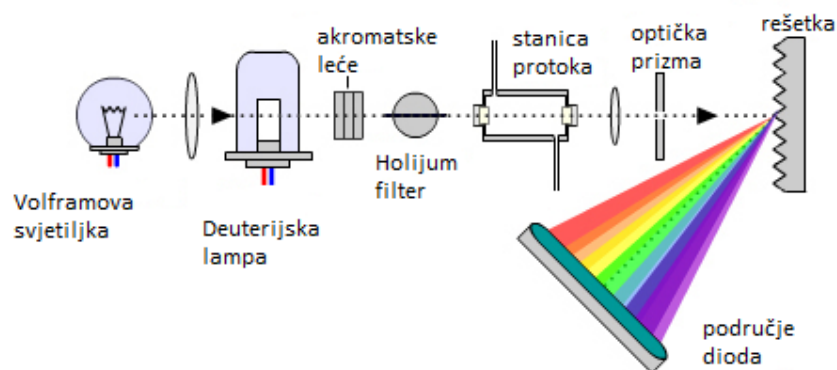


Slika 5. UV detektor za HPLC [6]

2.2.5. DAD detektor

Detektori s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD) koriste se za dobivanje spektralnih profila iz molekulskih smjesa ili kromatografskih odvojenih uzoraka. Ovi detektori daju iznimno brzu analizu spektra. Rezolucija im je određena brojem dioda raspoređenih u određenom rasponu valnih duljina. Princip rada DAD detektora (Slika 6.) zasniva se na emitiranju svjetlosti iz volframske svjetiljke u vidljivom dijelu spektra. Svjetlost zatim ulazi u deuterijsku svjetiljku koja dodaje UV (i vidljivo) svjetlo. Polikromatska zraka prolazi kroz stanicu protoka do rešetke koja ju dijeli na različite valne duljine različitih intenziteta koji se mjere pomoću fotodioda. Sve

raspoložive valne duljine mjere se istodobno i to je glavna karakteristika ovog detektora. DAD ima izuzetno visoku selektivnost. Volframova svjetiljka nudi prošireni vidljivi raspon valnih duljina, i nije potrebna referentna dioda kao kod nekih drugih detektora. DAD koristi referentnu valnu duljinu koja se odabire tako da se tijekom cijelog kromatografskog mjerenja na njoj ne javlja apsorpcija. Relativne promjene referentnog intenziteta se zatim koriste za korekciju proporcionalnih promjena drugih valnih duljina [11].



Slika 6. Shematski prikaz DAD detektora [12]

2.3. Validacija analitičke metode

Provjera analitičke metode jedna je od mjera koje su opće priznate kao nužan dio cjelokupnog sustava osiguranja kvalitete u analitičkoj kemiji. Radna skupina koja je definirala minimalne protokole za validaciju metoda ovlaštena je od strane IUPAC-a (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) da pripremi smjernice o općenitoj laboratorijskoj provjeri tj. validaciji određene metode. Te smjernice daju minimalne preporuke postupaka koji bi se trebali primjenjivati kako bi se osigurala prihvatljiva validacija analitičkih metoda [13]. U pravilu, kompletan, opće primjenjiv propis kako validirati analitičku metodu ne postoji [14]. Međutim, postoje postupci provođenja validacije analitičkih metoda propisani od ICH (eng. *International Council for Harmonisation*) smjernicom *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* [15].

Potrebne su pouzdane analitičke metode za usklađivanje s nacionalnim i međunarodnim propisima u svim područjima analize. Stoga svaki laboratorij mora poduzeti odgovarajuće mjere kako bi osigurao da je vjerodostojan izdati podatke o potrebnoj kvaliteti. Mjere koje to uključuju su korištenje validiranih metoda analize,

korištenje internih postupaka kontrole kvalitete, sudjelovanje u shemama za testiranje sposobnosti metode te konačno dobivanje akreditacije prema međunarodnoj normi, uobičajeno ISO/IEC 17025. Valjanost metode bitna je mjera koju određeni laboratorij mora implementirati kako bi omogućio sigurnost da pruža pouzdane analitičke podatke. Obično potpuna validacija analitičke metode obuhvaća ispitivanje karakteristika metode u izvedbi međulaboratorijskog ispitivanja. Uspostavljeni su protokoli, međunarodno prihvaćeni, za potpunu validaciju metode poput Međunarodnog harmoniziranog protokola [15] ili ISO postupka [16]. Ti protokoli tj. norme zahtijevaju minimalan broj laboratorija i ispitnih materijala koji su uključeni u kolaborativno ispitivanje kako bi se u potpunosti validirala analitička metoda.

Provjera metode koristi skup testova koji ispituju bilo koje pretpostavke na kojima je analitička metoda temeljena i dokumentira karakteristike izvedbe metode čime pokazuje da li je metoda prikladna za određenu analitičku svrhu. Tipične izvedbene značajke koje se ispituju su: selektivnost/specifičnost, linearnost, osjetljivost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, područje primjene, preciznost i robusnost. Strogo govoreći, validacija bi se trebala odnositi na analitički sustav, a ne na analitičku metodu. Analitički sustav definira metodu, raspon koncentracija za analit i vrstu materijala koji se analizira. Provjera valjanosti metode razlikuje se od uobičajenih aktivnosti poput unutarnje kontrole kvalitete ili ispitivanja sposobnosti. Validacija metode provodi se jednom ili u rijetkim intervalima tijekom radnog vijeka metode. Govori nam kakvu izvedbu metode možemo očekivati u budućnosti. Unutarnja kontrola kvalitete govori nam o načinu na koji metoda radi cijelo vrijeme. Unutarnja kontrola kvalitete se zbog toga tretira kao zasebna aktivnost u IUPAC programu.

Validacija se odnosi na definiranu metodu za određivanje određenog analita i raspona koncentracija u određenoj vrsti materijala u kojem se određuje analit. Potvrda da laboratorij može adekvatno primjenjivati neku metodu zahtijeva da laboratorij osigurava objektivni dokazni materijal. Najčešće su ključni zahtjevi točnost i preciznost koje odražavaju mjernu nesigurnost. Objektivni dokaz je točnost i preciznost dobivena iz stvarnih laboratorijskih podataka dobivenih analizom realnog uzorka [16].

2.3.1. Izvedbene značajke metode

Prije spomenute izvedbene značajke definirale su različite nacionalne i međunarodne organizacije i kao takve opisane su u literaturi. Najuspješnija harmonizacija parametara napravljena je od strane ICH u sklopu kojeg djeluju regulatorne agencije iz Europe, SAD-a i Japana (Tablica 1.). Uz pomoć cjelovitih pojmova i definicija koje su proizašle iz ove harmonizacije, premostilo se puno razlika koje često postoje između različitih kompanija i regulatora [15].

Tablica 1. Izvedbene značajke metode prema ICH-u [15]

Izvedbene značajke	Identifikacijski testovi	Analiza tragova		Sadržaj
		Kvantitativna	Test onečišćenja	
Selektivnost	DA	DA	DA	DA
Linearnost	NE	DA	NE	DA
Točnost	NE	DA	NE	DA
Preciznost	NE	DA	NE	DA
Međupreciznost	NE	DA	NE	DA
Granica detekcije	NE	NE	DA	NE
Granica kvantifikacije	NE	DA	NE	NE
Područje primjene	NE	DA	NE	DA
Robusnost	NE	DA	NE	DA

Izvedbene značajke metode su:

1. Specifičnost/selektivnost

Specifičnost se definira kao sposobnost procjenjivanja tj. određivanja analita u prisutnosti komponente za koju se može očekivati prisutnost. Prema IUPAC-u, selektivnost je definirana kao stupanj do kojega druge tvari prisutne u uzorku interferiraju s analitom. Što je veći utjecaj interferencija, metoda je manje selektivna.

2. Linearnost

Linearnost analitičkog postupka je njezina sposobnost unutar radnog područja, da se dobiju rezultati ispitivanja koji su izravno proporcionalni koncentraciji (količini) analita u uzorku.

3. Preciznost

Preciznost analitičke metode izražava podudaranje između niza mjerenja dobivenih iz višestrukog uzorkovanja istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Iskazuje se kao ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost.

➤ Ponovljivost

Izražava preciznost pod istim radnim uvjetima tijekom kraćeg vremenskog perioda.

➤ Međupreciznost

Izražava promjene unutar laboratorija, npr. rezultate dobivene u različitim danima, od različitih analitičara ili rezultate dobivene s drugom opremom.

➤ Obnovljivost

Izražava preciznost između više laboratorija i određuje se na temelju međulaboratorijskih usporedbi. Obično se primjenjuje za standardizaciju metoda.

4. Istinitost

Istinitost izražava slaganje srednje vrijednosti beskonačnog broja ponovljenih mjerenja i referentne vrijednosti [17].

5. Točnost

Točnost se razlikuje od istinitosti. Točnost rezultata analize izražava podudaranje vrijednosti koja je prihvaćena kao stvarna ili referentna vrijednost s jednom eksperimentalno dobivenom vrijednosti. Stoga na točnost rezultata utječu sustavna i slučajna pogreška, i stoga se izražava putem istinitosti i preciznosti.

6. Područje primjene

Područje primjene analitičkog postupka (radno područje) predstavlja raspon, odnosno interval između gornje i donje koncentracije (količine) analita u uzorku za koje je dokazano da analitički postupak ima odgovarajuću linearnost, preciznost i točnost.

7. Granica detekcije (eng. *limit of detection*, LOD)

Granica detekcije predstavlja najnižu količinu analita koja se može otkriti, ali ne nužno i kvantificirati određenom analitičkom metodom.

8. Granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ)

Granica kvantifikacije određene analitičke metode predstavlja najnižu količinu analita u uzorku koji se može otkriti i kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću.

9. Robusnost

Robusnost analitičke metode mjera je njezine sposobnosti da ostane dosljedna rezultatima unatoč namjernoj promjeni nekih eksperimentalnih uvjeta provedbe metode. Pravi je pokazatelj pouzdanosti metode u realnim uvjetima ispitivanja [15].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije i proizvođači kemikalija koje su korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada prikazani su tablici 2.

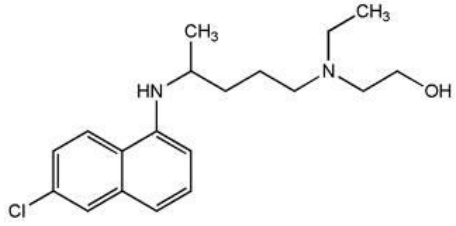
Tablica 2. Popis kemikalija i njihove specifikacije

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	CH ₃ CN	p.a.	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
Mravlja kiselina	CH ₂ OH	p.a.	T.T.T. d.o.o. Sveta Nedjelja, Hrvatska
Ultračista voda	H ₂ O	p.a.	Millipore Corporation, Billerica, MA, SAD
Desetilhidroksiklorokin	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
Hidroksiklorokin	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O	p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.2. Hidroksiklorokin

Fizikalno-kemijska svojstva ispitivanog farmaceutika hidroksiklorokina prikazana su u tablici 3.

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva hidroksiklorokina

Generičko ime	Hidroksiklorokin
Grupa farmaceutika	Antireumatik
Strukturna formula	

Molekulska formula	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O
CAS broj	118-42-3
Molarna masa	335.876 g/mol
Naziv po IUPAC-u	2-[4-[(7-klorkinolin-4-il)amino]pentil-etilamino]etanol
Topljivost u vodi, S	0,0261 mg/mL
pK_a [18]	9,76

3.1.3. Izvorska voda

Tijekom validacije kromatografske metode za određivanje hidrosiklorokina i njegovog razgradnog produkta, desetilhidrosiklorokina, korišteni su uzorci izvorske vode prikupljeni na izvoru Vrelo u Fužinama (pH 5.07, električna provodnost 35.9 μS/cm, Cl⁻ 1.7 mg/L, NO₃⁻ 7.8 mg/L, SO₄²⁻ 1.9 mg/L, NPOC 0.2622 mg/L).

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Analitičke vage su skupi i vrlo osjetljivi instrumenti za precizno određivanje mase tvari. Smještaju se u staklene ormariće koji ih štite od prašine i zračnih struja koje bi mogle poremetiti položaj ravnoteže. Stalak vage pričvršćen je na debelu staklenu ili kamenu ploču kako bi se smanjile vibracije, dok se horizontalnost vage provjerava ugrađenom okruglom libelom. Moderne elektroničke laboratorijske vage temelje svoj rad na mjerenju struje potrebne da se pokretna elektromagnetna zavojnica vrati na svoju nultu poziciju iz koje je pomaknuta zbog opterećivanja vage tijelom čija se masa mjeri. Danas, moderne analitičke vage imaju mnogobrojne mogućnosti i prednosti u odnosu na prijašnje. Imaju čitljivi LCD zaslon koji omogućava jasan prikaz rezultata, a postoji mogućnost prikazivanja dodatnih poruka i podataka na zaslonu poput naziva proizvoda ili tara vrijednosti, internetsku vezu i povećani broj mjernih jedinica što svakako može olakšati tijek vaganja. O ispravnosti i preciznosti vage ovisi točnost rezultata ispitivanja. Ni jednu kvantitativnu kemijsku analizu nije moguće napraviti bez upotrebe vage jer, bez obzira na metodu koju koristimo pri ispitivanju, uvijek treba odvagati uzorak za analizu i potrebne količine reagensa za pripremu otopina [19].

Tijekom provođenja ispitivanja korištena je analitička vaga XS204 Delta Range proizvođača Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska) (Slika 7.).



Slika 7. Analitička vaga XS204 DeltaRange, Mettler Toledo 15¹⁷

Specifikacije korištene analitičke vage su :

- maksimalni kapacitet: 220 g
- ponovljivost: 0,07 mg (10 g)
- očitavanje: 0,1 mg
- minimalna odvaga ($U=1\%$, $s=2$): 8 mg
- područje tare: 0 - 220 g
- linearnost: $\pm 0,2$ mg
- ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu (s): 0,1 mg¹⁷

3.2.2. Uređaj za filtraciju

Prije pripreme otopina i početka ispitivanja, uzorak izvorske vode profiltriran je kako bi se uklonile suspendirane čestice. Tijekom ovog ispitivanja korišten je instrument za filtraciju PALL Life Sciences (Washington, SAD) (Slika 8.), pri čemu je korišten

polipropilenski membranski filter (GH Polypro, 47 mm, 0,45 μm) pri tlaku od 600 mmHg.



Slika 8. Uređaj za filtraciju vode

3.2.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u svrhu kvalitativnog i kvantitativnog određivanja hidrosiklorokina i njegovog razgradnog produkta desetihidroksiklorokina provedena je na Waters 2795 Alliance HPLC System s 2996 DAD detektorom. (Slika 9.)



Slika 9 . Waters 2795 Alliance HPLC System s 2996 DAD detektorom

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

3.3. Metode rada

3.3.1. Kromatografska analiza

Kromatografsko odjeljivanje hidroksiklorokina i njegovog fotorazgradnog produkta provedeno je kromatografijom obrnutih faza korištenjem pokretne faze koja se sastojala od 0,1 % mravlje kiseline (CH_2OH) u MilliQ vodi (A) te 0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu (ACN) (B) uz gradijentno eluiranje (Tablica 4.) pri protoku pokretne faze od 0,5 mL/min. Temperatura u koloni održavana je na 40 °C. Trajanje analize iznosilo je 30 minuta. Volumen injektiranja iznosio je 20 μL . Svi spojevi su praćeni na valnoj duljini od 343,4 nm. Kontrola instrumenta, prikupljanje i obrada podataka provedeni su primjenom računalnog programa MassLynx V4.1 SCN 714 Waters.

Tablica 4. Sastav pokretne faze tijekom 30 min kromatografske analize

t/min	% A	% B
0	94	6
8	94	6
23	50	50
30	94	6

3.3.2. Priprema temeljne standardne otopine hidroksiklorokina

Temeljna standardna otopina (TSO) hidroksiklorokina masene koncentracije 1000 mg/L pripravljena je vaganjem 5 mg standarda hidroksiklorokina na analitičkoj vagi. Odvaga standarda kvantitativno je prenesena u odmjernu tikvicu volumena 5 mL koja je nadopunjena MilliQ vodom do oznake.

3.3.3. Priprema standardnih otopina hidroksiklorokina u MilliQ i izvorskoj vodi za provjeru linearnosti

Iz prethodno pripravljene temeljne standardne otopine (TSO) hidroksiklorokina pripravljeno je 11 standardnih otopina masenih koncentracija u rasponu od 0,05 mg/L do 12,5 mg/L s MilliQ vodom. Ovisno o željenoj masenoj koncentraciji pojedine standardne otopine (0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L, 0,75 mg/L, 1,00

mg/L, 2,50 mg/L, 5,00 mg/L, 7,50 mg/L, 10,00 mg/L, 12,5 mg/L) u odmjernu tikvicu od 10 mL dodan je određeni volumen TSO hidroksiklorokina (0,0005 mL, 0,0010 mL, 0,0025 mL, 0,0050 mL, 0,0075 mL, 0,0100 mL, 0,0250 mL, 0,0500 mL, 0,0750 mL, 0,1000 mL, 0,1200 mL) te je tikvica nadopunjena MilliQ vodom do oznake (Tablica 5.) Isti postupak pripreme standardnih otopina ponovljen je s profiltriranom izvorskom vodom.

Tablica 5. Priprema umjernih standarda hidroksiklorokina

Koncentracija (mg/L)	Faktor razrjeđenja	Koncentracija (mg/L)	Volumen osnovnog standarda (mL)	Volumen tikvice (mL)
	1	1000	-	-
C-1	20000	0,05	0,0005	10
C-2	10000	0,10	0,0010	10
C-3	4000	0,25	0,0025	10
C-4	2000	0,50	0,0050	10
C-5	1333	0,75	0,0075	10
C-6	1000	1,00	0,0100	10
C-7	400	2,50	0,0250	10
C-8	200	5,00	0,0500	10
C-9	133	7,50	0,0750	10
C-10	100	10,00	0,1000	10
C-11	80	12,50	0,1200	10

Za provjeru linearnosti pripremljeno je 3 uzorka (3 vijale) od svake gore navedene standardne otopine (za MilliQ i za izvorsku vodu) hidroksiklorokina (ukupno 66 uzorka). Standardne otopine čuvane su u mraku na temperaturi od 4 °C.

3.3.4. Priprema standardnih otopina hidroksiklorokina za procjenu preciznosti

Za procjenu preciznosti (ponovljivost i međupreciznost) pripremljene su tri standardne otopine čije su koncentracije unutar radnog područja, a nisu korištene za izradu umjernog pravca (0,3 mg/L, 4 mg/L i 11 mg/L). Otopine koncentracije 4 mg/L i 11 mg/L su pripremljene izravno iz temeljne standardne otopine hidroksiklorokina. U odmjerne tikvice otpipetirani su odgovarajući volumeni TSO (0,04 mL i 0,11 mL) te je tikvica nadopunjena MilliQ vodom do oznake. Otopina koncentracije 0,3 mg/L pripremljena je međurazrijeđenjem. Prvotno je pripremljena otopina koncentracije 20 mg/L (volumen TSO = 0,20 mL) u volumenu od 10 mL. Zatim je uzeto 0,15 mL

otopine koncentracije 20 mg/L kako bi dobili otopinu koncentracije 0,3 mg/L u volumenu od 10 mL. Isti postupak pripreme standardnih otopina za ispitivanje preciznosti ponovljen je s profiltriranom izvorskom vodom.

a) Ponovljivost

Za provjeru ponovljivosti, pripremljeno je 10 vijala za svaku prethodno pripremljenu standardnu otopinu koncentracija 0,3 mg/L, 4 mg/L i 11 mg/L u izvorskoj i MilliQ vodi (ukupno 60 vijala).

b) Međupreciznost

Provjera međupreciznosti izvršena je tako da je cijeli postupak pripreme otopina prethodno opisan i očitavanja površine ispod kromatografskih pikova, ponovljen drugi dan. Tako je dobiven drugi set rezultata za ponovljivost standardnih otopina koncentracija 0,3 mg/L, 4 mg/L i 11 mg/L. Usporedivši dobivene rezultate ponovljivosti ta dva puta dobivena je međupreciznost.

3.3.5. Određivanje robusnosti

Robusnost nam govori o otpornosti metode na male promjene, odnosno sposobnost metode da daje odgovarajuće rezultate kada dođe do manjih promjene nekih eksperimentalnih uvjeta. Određena je praćenjem promjene površine ispod pika, odnosno koncentracije, kada se promjeni sastav pokretne faze, temperatura kolone te protok pokretne faze u odnosu na početne uvjete metode. Sastav pokretne faze smanjen je na 92% odnosno povećan na 96% u odnosu na početni sastav koji je bio 94%. Temperatura kolone smanjena je na 38 °C , tj. povećana na 42 °C u odnosu na standardnu temperaturu koja je iznosila 40 °C. Protok pokretne faze smanjili smo na 0,4 mL/min, odnosno povećali na 0,6 mL/min u odnosu na početni protok koji je iznosio 0,5 mL/min. Svaka promjena određenog parametra zasebno je praćena analizom standardne otopine koncentracije 10 mg/L i 1 mg/L s MilliQ vodom analizirajući po 3 uzorka (3 vijale) za svaku koncentraciju (ukupno 36 vijala).

3.3.6. Stabilnost otopine hidroksiklorokina

Stabilnost otopina hidroksiklorokina u MilliQ vodi masenih koncentracija 10 mg/L i 1 mg/L praćena je u vremenskom periodu od mjesec dana. Svaka analiza i očitavanje

površine ispod pika za stabilnost otopina kroz tih mjesec dana izvršena je iz iste vijale za otopinu određene koncentracije. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi tijekom vremenskog perioda praćenja stabilnosti.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovim istraživanjem provjereni su svi parametri validacije metode za određivanje hidroksiklorokina. Linearnost je utvrđena izradom umjernog pravca koji se sastoji od jedanaest umjernih koncentracijskih standardnih otopina s tri mjerenja za svaku koncentraciju. Dobiveni koeficijenti determinacije u standardnim otopinama i s izvorskom vodom zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti ($R^2 > 0,995$). Rezultati u MilliQ vodi pri 343,4 nm dali su vrijednost koeficijenta determinacije 0,9973, a u izvorskoj vodi on iznosi 0,9985 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti. Rezultati su očitani i pri valnoj duljini od 220,4 nm. Pri toj valnoj duljini koeficijent determinacije iz umjernog pravca standardnih otopina u MilliQ vodi iznosi 0,9962, a u izvorskoj vodi 0,9981 što je također unutar kriterija prihvatljivosti, ali su vrijednosti manje nego pri valnoj duljini od 343,4 nm. Vidimo da su rezultati za linearnosti bolji pri valnoj duljini od 343,3 nm. Iz toga razloga su sve ostale izvedbene značajke promatrane na toj valnoj duljini.

Radno područje, odnosno područje primjene metode u izvorskoj vodi nalazi se između 0,05 mg/L i 12,5 mg/L, dok je u MilliQ vodi taj raspon između 0,10 mg/L i 12,5 mg/L.

Dobivena statistička vrijednost t je unutar intervala $[-t_{\text{kritični}}, t_{\text{kritični}}]$, tj. $-4,30 < -2,90 < 4,30$ što znači da između nagiba umjernih pravaca određenih s uzorcima izvorske i MilliQ vode ne postoji statistički značajna razlika.

Preciznost (ponovljivost i međupreciznost) je ispitana pri tri koncentracije standardnih otopina hidroksiklorokina (0,3 mg/L, 4 mg/L te 11 mg/L) u izvorskoj i MilliQ vodi.

Točnost metode ispitivana je računajući iskorištenje s otopinama triju koncentracija (0,3 mg/L, 4 mg/L te 11 mg/L). Iskorištenje za otopinu koncentracije od 11 mg/L iznosi 97,9 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 96,9 %, a za otopinu koncentracije 0,3 mg/L iskorištenje iznosi 121,6 %.

Granica detekcije u izvorskoj vodi iznosi 0,0579 mg/L, a granica kvantifikacije 0,1929 mg/L. U MilliQ vodi granica detekcije iznosi 0,0256 mg/L, a granica kvantifikacije 0,0854 mg/L.

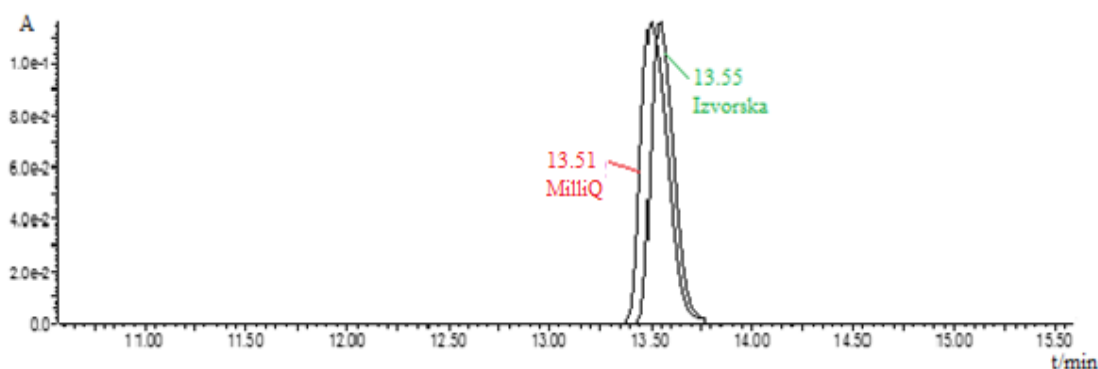
Nakon ispitivanja parametara validacije za metodu određivanja hidroksiklorokina, ispitani su i određeni parametri validacije za njegov razgradni produkt desetilhidroksiklorokin, ali s obzirom da rezultati nisu bili zadovoljavajući zaključeno je da treba još raditi na razvijanju i validaciji metode za određivanje desetilhidroksiklorokina.

4.1. Validacija HPLC-DAD kromatografske metode za određivanje hidroksiklorokina u izvorskoj vodi

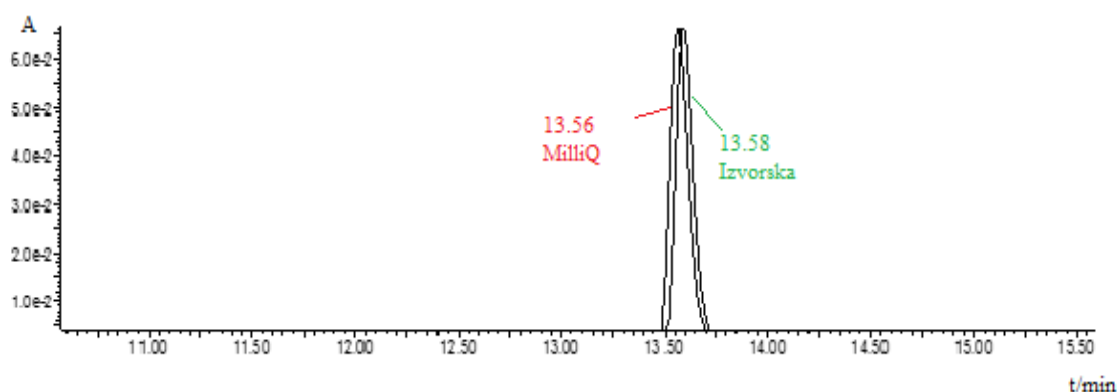
Prvi korak u validaciji metode je postavljanje kriterija prihvatljivosti za izabrane izvedbene značajke na temelju zakonskih zahtjeva, zahtjeva norme ili dobre laboratorijske prakse. Kriteriji validacije za HPLC-DAD metodu određivanja hidroksiklorokina u izvorskoj vodi prikazani su s ukupnim rezultatima u tablici 10.

4.1.1. Specifičnost / selektivnost

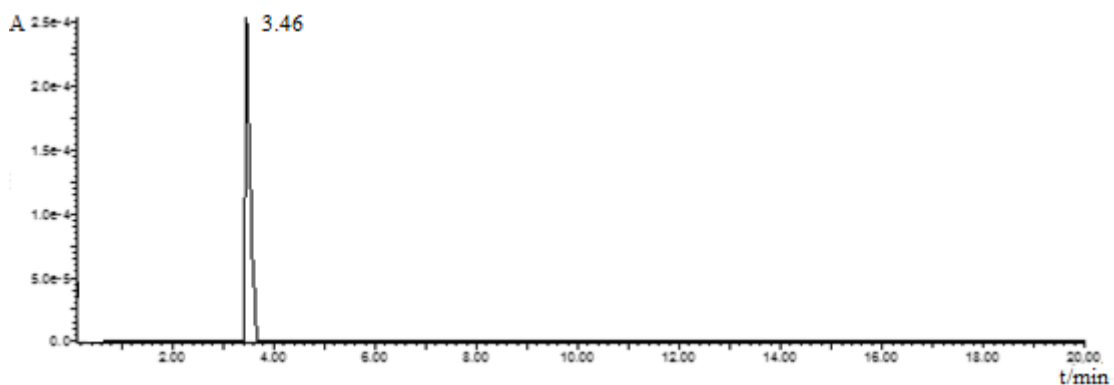
Specifičnom metodom nedvojbeno možemo odrediti i razlikovati jedan analit od ostalih komponenti, dok kod selektivne metode možemo odrediti više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj. Dokazuje se usporedbom kromatograma standarda s kromatogramom realnog uzorka (smjese komponenti) ili uzorka sa standardnim dodatkom analita. Selektivnost odnosno specifičnost ove metode određuje se usporedbom kromatograma standarda s kromatogramom hidroksiklorokina dobivenog analizom izvorske vode u koju je dodan HCQ (slike 10 i 11).



Slika 10. Preklapljeni kromatogrami hidroksiklorokina (12 mg/L) u MilliQ i izvorskoj vodi



Slika 11. Preklopljeni kromatogrami hidroksiklorokina (5 mg/L) u MilliQ i izvorskoj vodi



Slika 12. Kromatogram slijepog uzorka

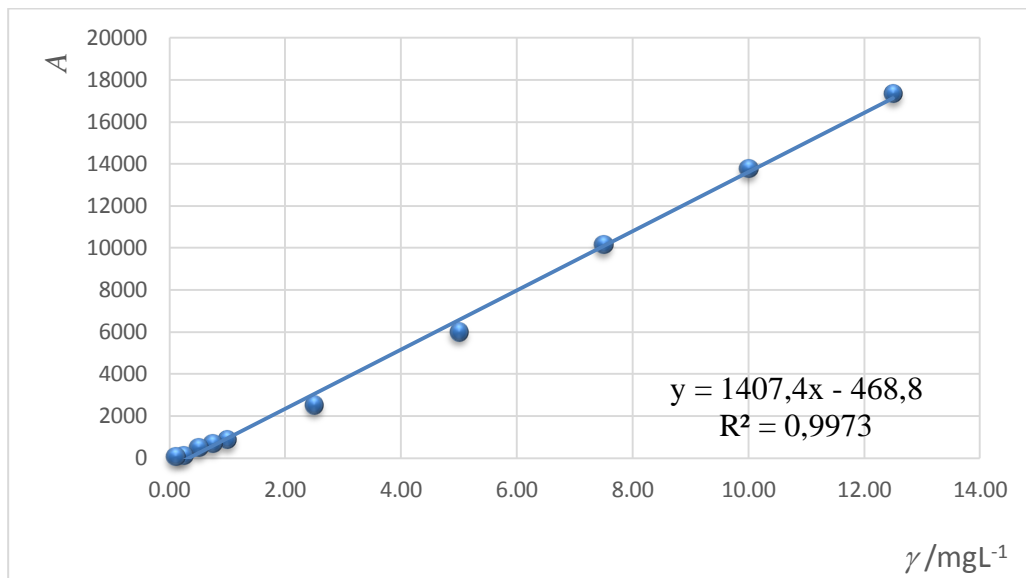
Vrijeme zadržavanja HCQ (12 mg/L) u MilliQ vodi iznosi 13,51 min, a u izvorskoj vodi 13,55 min. Za 5 mg/L otopine HCQ u MilliQ vodi vrijeme zadržavanja iznosi 13,56 min., dok u izvorskoj vodi iznosi 13,58 min. Na slici 12. može se uočiti da na kromatogramu slijepog uzorka (izvorska voda), pri vremenu zadržavanja HCQ nisu prisutne druge tvari koje bi mogle utjecati na njegovo određivanje. Pik na početku kromatograma slijepog uzorka ($t_R=3,46$) predstavlja pik pokretne faze. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da matica uzorka, izvorska voda, ne utječe značajno na vrijeme zadržavanja i oblik kromatografske krivulje HCQ, te da u izvorskoj vodi nisu prisutne druge tvari koje ometaju određivanje HCQ čime je potvrđena selektivnosti metode.

4.1.2. Linearnost

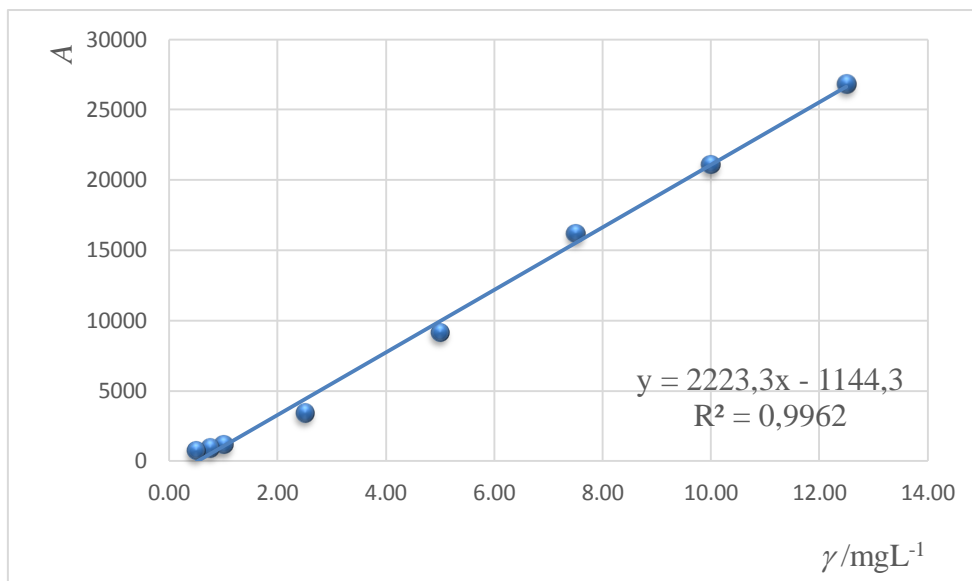
Linearnost definiramo kao mogućnost metode da u određenom području daje odziv proporcionalan koncentraciji analita u uzorku. Izradom umjernog pravca utvrđujemo linearnost.

Pripremom i analizom jedanaest standardnih otopina hidroksiklorokina dobiveno je jedanaest umjernih točaka za izradu umjernog pravca za MilliQ i izvorsku vodu.

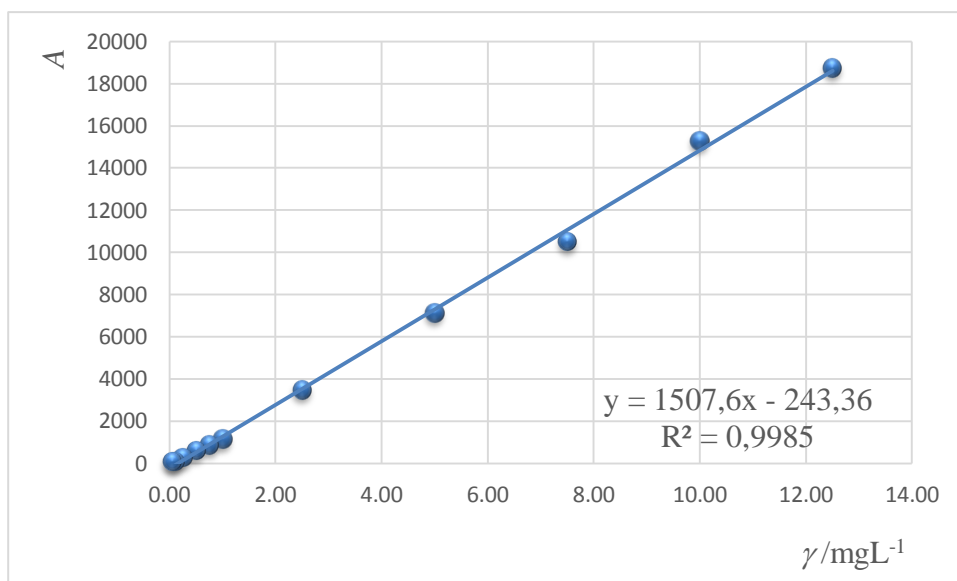
Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama P1-P4 i na slikama 13-16. Rezultati su očitavani pri valnim duljinama od 220,4 nm te na 343,4 nm (maksimumi apsorpcijskog spektra HCQ, slika 17).



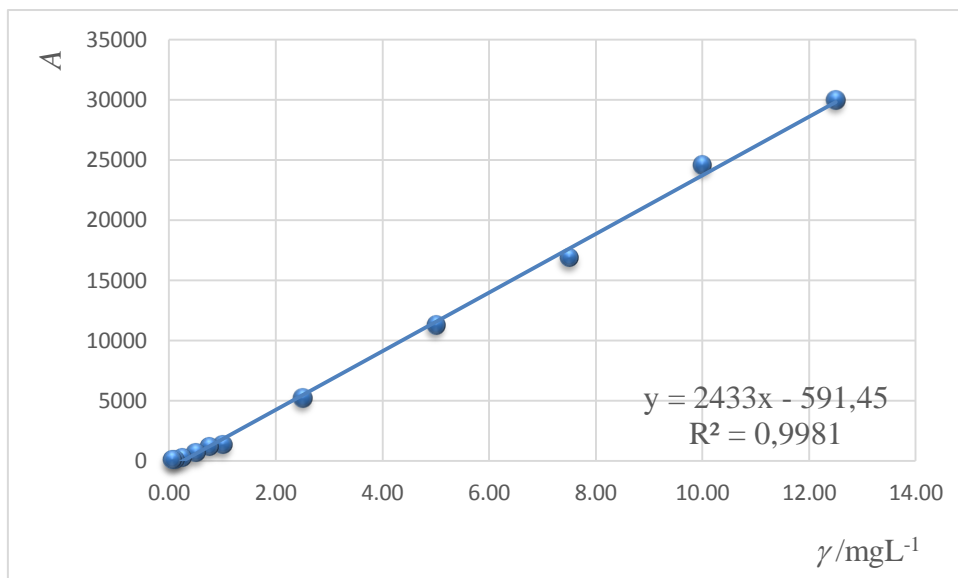
Slika 13. Umjerni pravac HCQ u MilliQ vodi pri 343,4 nm



Slika 14. Umjerni pravac HCQ u MilliQ vodi pri 220,4 nm



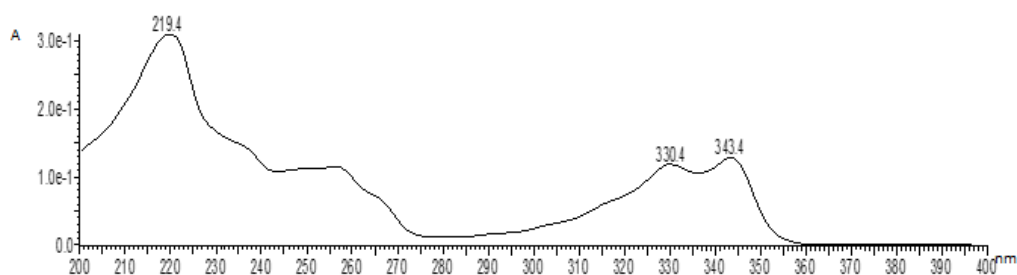
Slika 15. Umjerni pravac HCQ u izvorskoj vodi pri 343,4 nm



Slika 16. Umjerni pravac HCQ u izvorskoj vodi pri 220,4 nm

Kako se može vidjeti iz dobivenih vrijednosti koeficijenta determinacije, u sva četiri slučaja zadovoljen je postavljeni kriterij $R^2 \geq 0,995$ čime je potvrđena linearnost metode. Usporedbom nagiba (a) dobivenih pravaca, koji predstavlja osjetljivost metode, uočeno je da se bolja osjetljivost (veći nagib) postiže kada se rezultati očitavaju pri 220,4 nm. Međutim, pri 220,4 nm bilo je poteškoća ili nije bilo moguće očitati površine ispod kromatografskih vrpca pri najnižim koncentracijama. Nadalje, bolja ponovljivost mjerenja iste koncentracije, iskazana kao relativno standardno odstupanje (RSD, %) postignuta je pri 343,4 nm (tablice P1-P4). S obzirom na to i činjenicu da su farmaceutici u okolišu prisutni u niskim koncentracijama, u daljnjim analizama kromatogrami su analizirani samo pri valnoj duljini od 343,4 nm.

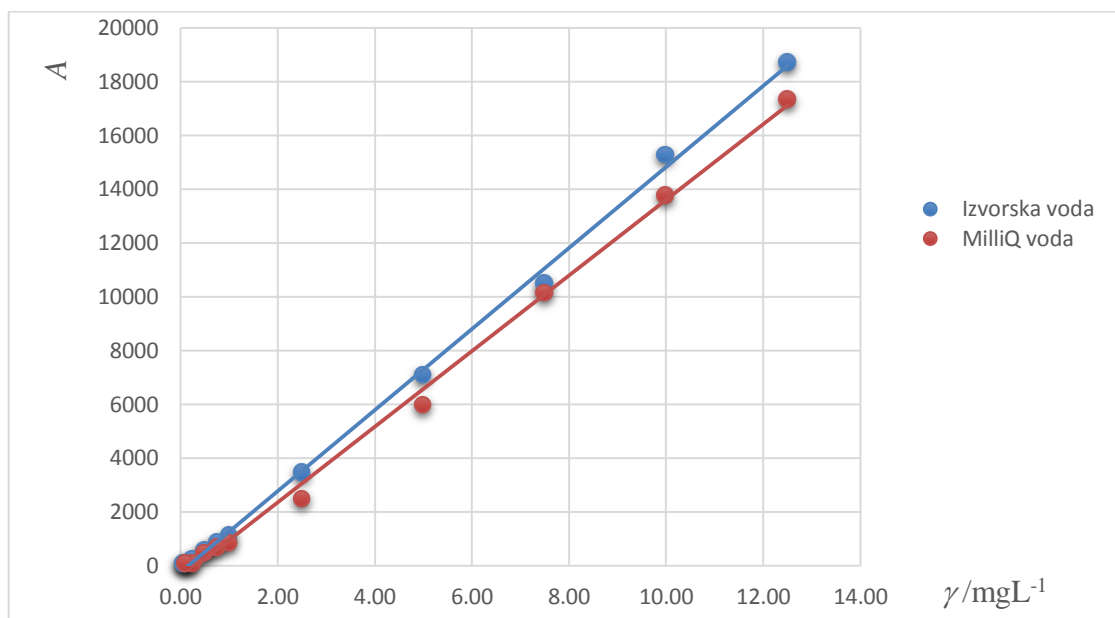
Mogući razlog nemogućnosti detekcije analita pri nižim koncentracijama pri valnoj duljini od 220,4 nm je u tome što pri toj valnoj duljini apsorbira i otapalo (acetonitril) (Slika 17.) koje čini pokretnu fazu.



Slika 17. Apsorpcijski spektri HCQ i acetonitrila

4.1.3. Osjetljivost

Osjetljivost metode određuje se iz jednadžbe umjernog pravca i jednaka je nagibu umjernog pravca. Umjerni pravci HCQ u MilliQ i izvorskoj vodi prikazani su na slici 18.



Slika 18. Usporedba umjernih pravaca HCQ u MilliQ i izvorskoj vodi pri 343,4nm

Na slici 18. vidljivo je da se nagibi umjernih pravaca u MilliQ i izvorskoj vodi razlikuju. Kako bi se utvrdilo da li je ta razlika značajna, nagibi su uspoređeni statističkim *t*-testom. Prije provođenja *t*-test, potrebno je utvrditi da li su varijancije dviju populacija koje se uspoređuju jednake. Varijancije (s^2) dva niza mjerenja uspoređujemo statističkim *F*-testom. Rezultati *F*-testa prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati *F*-testa

	<i>Izvorska voda</i>	<i>MilliQ</i>
Srednja vrijednost	1411,6	1507,6
Varijancija	3266,6	13,4
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	2	2
<i>F</i>	243,96	
<i>F</i> _{kritični}	19	

U slučaju kad je $F > F_{\text{kritični}}$ odbacujemo nultu hipotezu i varijance dviju populacija definiraju se kao nejednake, što je ovdje slučaj pa iz toga slijedi da varijacije ova dva uzorka nisu jednake i prema tome računamo t -test uz pretpostavku nejednakih varijancija.

t -test se koristi kako bi ispitali nultu hipotezu prema kojoj je srednja vrijednost dviju populacija jednaka. S obzirom da smo F -testom utvrdili da varijancije populacija koje uspoređujemo nisu jednake, pri provođenju t -test korišten je t -test za dva uzorka nejednakih varijancija. Rezultati t -testa prikazani su u tablici 7.

Tablica 7 . Rezultat t -test uz pretpostavku nejednakih varijancija

	<i>Izvorska voda</i>	<i>MilliQ</i>
Srednja vrijednost	1411,6	1507,6
Varijancija	3266,6	13,4
Broj uzoraka	3	3
Stupnjevi slobode	2	
t	-2,90	
$t_{\text{kritični}}$	4,30	

S obzirom da je dobivena vrijednost t unutar intervala $[-t_{\text{kritični}}, t_{\text{kritični}}]$, tj. $-4,30 < -2,90 < 4,30$ potvrđujemo da je nulta hipoteza točna. Prema tome zaključujemo da između nagiba umjernih pravaca određenih s uzorcima izvorske i MilliQ vode ne postoji statistički značajna razlika.

4.1.4. Preciznost

Preciznost je izraz slaganja među nizom mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. U ovom radu preciznost je iskazana kao ponovljivost i međupreciznost.

a) PONOVLJIVOST

Ponovljivost mjerenja površine ispod kromatografske vrpce, vremena zadržavanja te koncentracije HCQ ispitana je u izvorskoj vodi pri tri koncentracije unutar radnog područja. Podaci mjerenja prikazani su u tablicama P5 i P6, a rezultati u tablici 8.

Tablica 8. Rezultati procjene preciznosti određivanja koncentracija HCQ u standardnim otopinama i izvorskoj vodi

		\bar{x}	s	RSD (%)
MilliQ voda				
11 mg/L	<i>A</i>	17564,71	230,88	1,31
	t_R	13,58	0,01	0,11
	γ (mg/L)	12,81	0,16	1,28
4 mg/L	<i>A</i>	5883,44	270,48	4,60
	t_R	13,63	0,01	0,08
	γ (mg/L)	4,51	0,19	4,26
0,3 mg/L	<i>A</i>	247,35	37,12	15,25
	t_R	14,06	0,75	5,32
	γ (mg/L)	0,51	0,03	5,27
Izvorska voda				
11 mg/L	<i>A</i>	15874,45	442,95	2,79
	t_R	13,57	0,01	0,09
	γ (mg/L)	10,69	0,29	2,75
4 mg/L	<i>A</i>	5600,72	282,88	5,05
	t_R	13,61	0,004	0,03
	γ (mg/L)	3,88	0,19	4,84
0,3 mg/L	<i>A</i>	306,46	85,16	27,79
	t_R	13,66	0,01	0,06
	γ (mg/L)	0,36	0,06	15,49

Ponovljivost mjerenja površine pika za određivanje HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u MilliQ vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 1,31 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 4,60 % dok ponovljivost mjerenja površine pika za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 15,25 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) ZADOVOLJEN je za koncentracije HCQ 11 mg/L i 4 mg/L.

Ponovljivost mjerenja površine pika za određivanje HCQ u izvorskoj vodi HPLC–DAD metodom za koncentraciju 11 mg/L iznosi 2,79 % što ZADOVOLJAVA kriterij

prihvatljivosti (RSD < 10 %). Ponovljivost mjerenja površine pika za koncentracije 4 mg/L iznosi 5,05 % što također ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) dok ponovljivost mjerenja površine pika za koncentraciju od 0,3 mg/L NE ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti jer je iznos od 27,79 % iznad postavljenog kriterija (RSD < 10 %).

Ponovljivost vremena zadržavanja za HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u MilliQ vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 0,11 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 0,08 % dok ponovljivost za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 5,32 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) ZADOVOLJEN je za sve koncentracije HCQ.

Ponovljivost vremena zadržavanja za HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u izvorskoj vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 0,09 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 0,03 % dok ponovljivost za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 0,06 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) ZADOVOLJEN je za sve koncentracije HCQ.

Ponovljivost određivanja koncentracija za HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u MilliQ vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 1,28 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 4,26 % dok ponovljivost za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 5,27 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) ZADOVOLJEN je za sve koncentracije HCQ.

Ponovljivost određivanja koncentracija za HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u izvorskoj vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 2,75 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 4,84 % dok ponovljivost za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 15,49 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) ZADOVOLJEN je za koncentracije HCQ 11 mg/L i 4 mg/L.

Bolji rezultati ponovljivosti (niže RSD vrijednosti) postignute su za MilliQ vodu što je i očekivano.

b) MEĐUPRECIZNOST

Međupreciznost je određena iz rezultata ponovljenih mjerenja provedenih u dva različita dana. Podaci mjerenja prikazani su u tablicama P7 i P8, a rezultati u tablici 9.

Tablica 9. Rezultati procjene međupreciznosti

		\bar{x}	s	RSD (%)
MilliQ voda				
11 mg/L	<i>A</i>	15799,75	1894,08	11,99
	t_R	13,60	0,03	0,24
	γ (mg/L)	11,57	1,35	11,63
4 mg/L	<i>A</i>	4783,59	1129,60	23,61
	t_R	13,62	0,01	0,09
	γ (mg/L)	3,78	0,80	21,16
0,3 mg/L	<i>A</i>	185,88	66,64	35,85
	t_R	14,75	0,86	5,82
	γ (mg/L)	0,47	0,05	10,18
Izvorska voda				
11 mg/L	<i>A</i>	15405,88	623,94	4,05
	t_R	13,56	0,01	0,09
	γ (mg/L)	10,38	0,41	3,99
4 mg/L	<i>A</i>	5599,27	214,10	3,82
	t_R	13,60	0,02	0,12
	γ (mg/L)	3,88	0,14	3,66
0,3 mg/L	<i>A</i>	302,49	62,87	20,78
	t_R	13,65	0,02	0,12
	γ (mg/L)	0,36	0,04	11,52

Međupreciznost mjerenja površine pika za određivanje HCQ, HPLC–DAD metodom u MilliQ vodi za koncentraciju 11 mg/L iznosi 11,99 %, ponovljivost mjerenja površine pika za koncentracije 4 mg/L iznosi 23,61 %, a ponovljivost mjerenja površine pika za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 35,85 % . Vrijednosti NE ZADOVOLJAVAJU kriterij prihvatljivosti (RDS < 15 %) za koncentracije HCQ 4 mg/L i 0,3 mg/L, dok je za koncentraciju HCQ 11 mg/L, kriterij prihvatljivosti ZADOVOLJEN.

Međupreciznost mjerenja površine pika za određivanje HCQ, HPLC–DAD metodom u izvorskoj vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 4,05 %, ponovljivost mjerenja površine pika za koncentracije 4 mg/L iznosi 3,82 % i obje koncentracije ZADOVOLJAVAJU kriterij prihvatljivosti (RDS < 15 %), dok ponovljivost mjerenja površine pika za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 20,78 % i NE ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti.

Međupreciznost vremena zadržavanja za HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u MilliQ vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 0,24 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 0,09 %, a za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 5,82 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 15 %) ZADOVOLJEN je za sve koncentracije HCQ.

Međupreciznost vremena zadržavanja za HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u izvorskoj vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 0,09 % dok za koncentraciju od 4 mg/L i 0,3 mg/L iznosi 0,12 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 15 %) ZADOVOLJEN je za sve koncentracije HCQ.

Međupreciznost određivanja koncentracija za HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u MilliQ vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 11,63 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 21,16 % dok ponovljivost za koncentraciju od 0,3 mg/L iznosi 10,18 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 15 %) je ZADOVOLJEN za koncentracije od 11 mg/L i 0,3 mg/L.

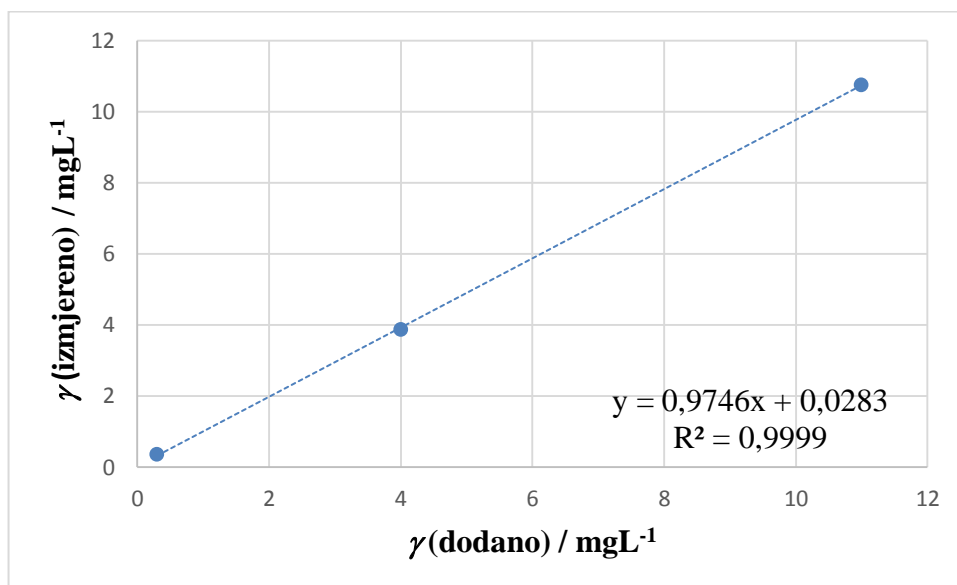
Međupreciznost određivanja koncentracije HCQ, HPLC–DAD kromatografskom metodom u izvorskoj vodi za koncentraciju od 11 mg/L iznosi 3,99 %, za koncentraciju od 4 mg/L iznosi 3,66 % dok ponovljivost za koncentraciju 0,3 mg/L iznosi 11,52 %. Kriterij prihvatljivosti (RSD < 15 %) ZADOVOLJEN je za sve ispitivane koncentracije.

4.1.5. Istinitost

Istinitost se određuje kao odstupanje srednje vrijednosti niza izmjerenih vrijednosti od prave ili referentne vrijednosti, odnosno poznate koncentracije analita dodane u uzorak. Procjena istinitosti rezultata mjerenja trebala bi obuhvatiti cijelo radno područje tako da se ispituje pri nekoliko koncentracija unutar radnog područja. U ovom radu istinitost rezultata mjerenja određena je na temelju deset uzastopnih

mjerenja standardnih otopina hidroksiklorokina koncentracije 11 mg/L, 4 mg/L i 0,3 mg/L. Na temelju dobivenih podataka (tablice P9 – P11) izračunato je srednje iskorištenje određivanja hidroksiklorokina u izvorskoj vodi. Za izvorsku vodu srednja vrijednost iskorištenja za koncentraciju 11 mg/L iznosi $(97,9 \pm 2,7) \%$, za koncentraciju 4 mg/L $(96,9 \pm 4,8) \%$, a za koncentraciju 0,3 mg/L $(117,9 \pm 13,4) \%$. S obzirom da je prethodno postavljeni kriterij prihvatljivosti za istinitost $\pm 10 \%$, može se zaključiti da metoda ZADOVOLJAVA za koncentracija 11 mg/L i 4 mg/L dok za najnižu koncentraciju 0,3 mg/L ne zadovoljava.

Na slici 19. grafički je prikazana ovisnost izmjerene koncentracije HCQ u odnosu na dodanu količinu u uzorak izvorske vode.



Slika 19. Ispitivanje istinitosti

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

Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK) određene su prema slijedećim jednadžbama [20]:

$$GD = 3,3 \cdot s'_0 \quad (6)$$

$$GK = 10 \cdot s'_0 \quad (7)$$

s'_0 računamo prema jednadžbi (8):

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}}$$

gdje je s_0 procjena standardnog odstupanja n ponovljenih mjerenja koncentracije HCQ pri koncentraciji blizu nule.

Na temelju gore navedenih jednadžbi i uz $n=10$ te $s_0(\text{MilliQ})=0,027$ mg/L i $s_0(\text{izvorska})=0,061$ mg/L izračunate su granice detekcije i kvantifikacije:

$$\text{GD (MilliQ)} = 0,0256 \text{ mg/L}$$

$$\text{GK (MilliQ)} = 0,0854 \text{ mg/L}$$

$$\text{GD (izvorska)} = 0,0579 \text{ mg/L}$$

$$\text{GK (izvorska)} = 0,1929 \text{ mg/L}$$

4.1.7. Radno područje

Radno područje metode definirano je kao raspon među donjom i gornjom koncentracijom analita u uzorku unutar kojega se analit može kvantificirati uz zadovoljavajuću linearnosti, preciznost i istinitost (točnost). Određuje se iz umjernog pravca. Radno područje određeno je na temelju umjernih pravaca dobivenih na temelju rezultata očitanih pri 343,4 nm te na temelju procjene preciznosti i istinitosti. S obzirom na lošije rezultate postignute tijekom procjene preciznosti i istinitosti pri niskoj koncentraciji, za donju granicu radnog područja postavljena je koncentracija 0,50 mg/L.

MilliQ voda : donja koncentracija: 0,50 mg/L

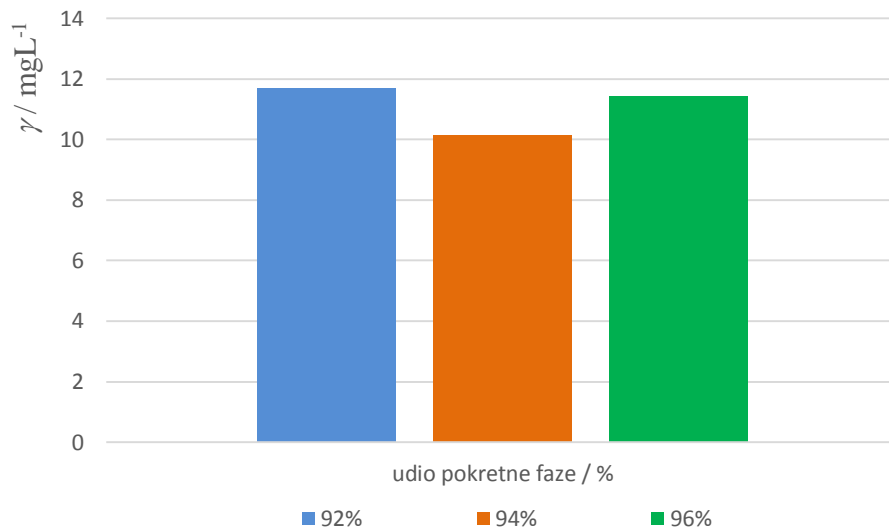
gornja koncentracija: 12,5 mg/L

Izvorska voda : donja koncentracija: 0,50 mg/L

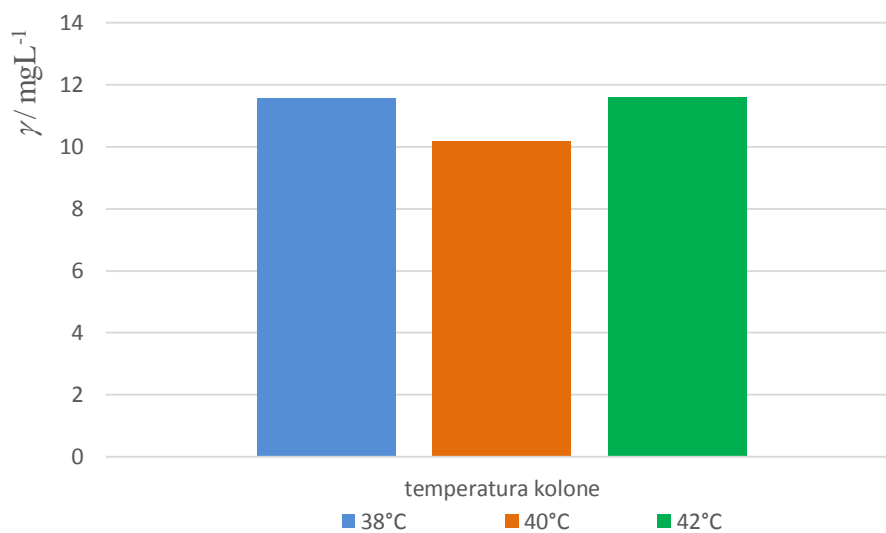
gornja koncentracija: 12,5 mg/L

4.1.8. Robusnost

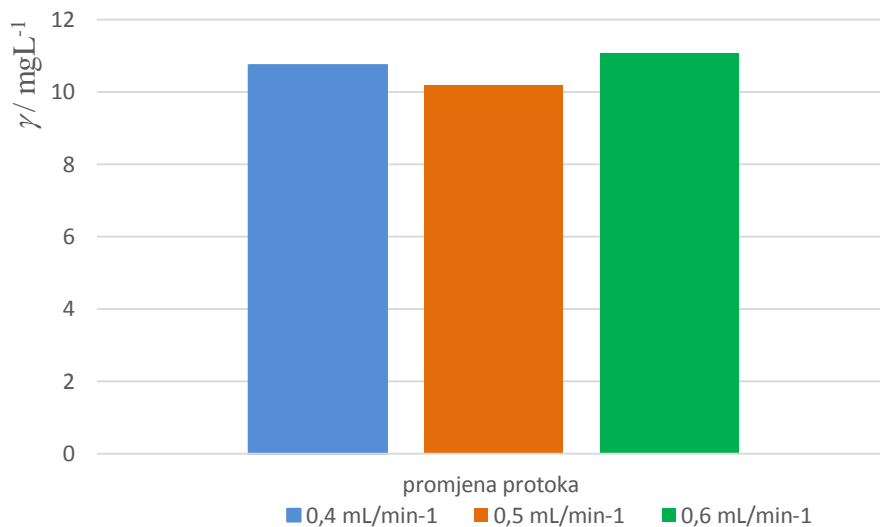
Robusnost prikazuje otpornost metode na male promjene, odnosno sposobnost metode da daje odgovarajuće rezultate kada dođe do manjih promjene eksperimentalnih uvjeta. Određuje se tako da se namjerno mijenjaju parametri za koje se pretpostavlja da mogu utjecati na određivanje analita i provjeravaju dobiveni rezultati. Dobiveni rezultati prikazani su tablično (tablica P12) i grafički (slike 20-25).



Slika 20. Grafički prikaz utjecaja promjene sastava pokretne faze na određivanje HCQ u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 10 mg/L

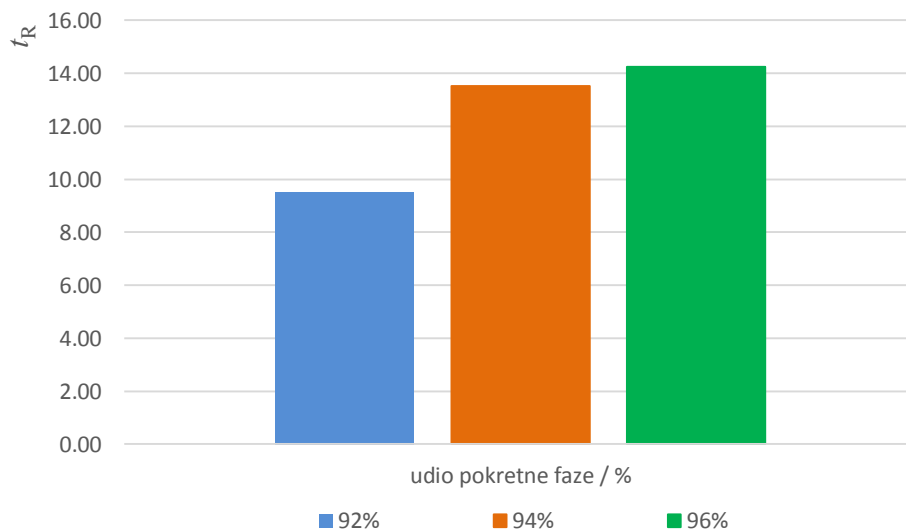


Slika 21. Grafički prikaz utjecaja promjene temperature kolone ($^{\circ}\text{C}$) na određivanje HCQ u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 10 mg/L



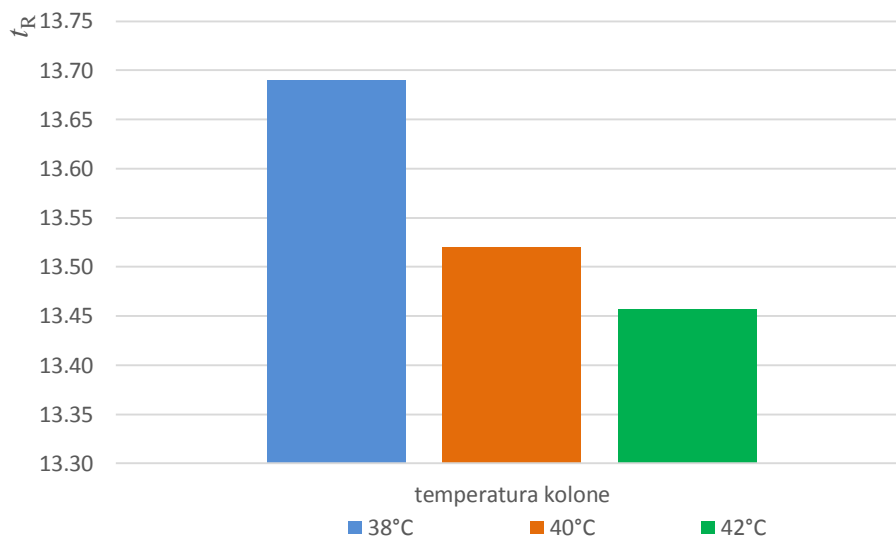
Slika 22. Grafički prikaz utjecaja promjene protoka (mL/min) na određivanje HCQ u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 10 mg/L

Na temelju dobivenih rezultata vidimo da promjena eksperimentalnih uvjeta utječe na rezultate koncentracije ispitivane otopine. Promjenom udjela pokretne faze, temperature te promjene protoka dobivena koncentracija analita se povećava u odnosu na koncentraciju pri optimalnim uvjetima metode koji su 94 % pokretne faze, temperaturi od 40 °C te protoku od 0,5mL/min.



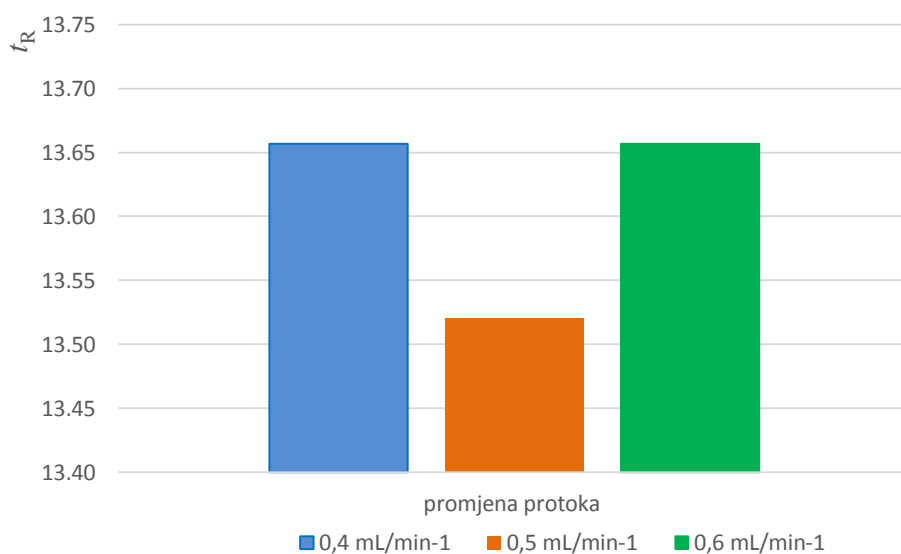
Slika 23. Grafički prikaz utjecaja promjene sastava pokretne faze na promjenu vremena zadržavanja za HCQ otopinu koncentracije 10 mg/L, MilliQ voda

Iz grafičkog prikaza vidimo da smanjenje udjela pokretne faze sa standardnih 94 % na 92 % utječe na promjenu vremena zadržavanja, tako da se vrijeme zadržavanja smanji. Povećanjem udjela pokretne faza na 96 % dolazi do povećanja vremena zadržavanja.



Slika 24. Grafički prikaz utjecaja promjene temperature kolone ($^{\circ}\text{C}$) na promjenu vremena zadržavanja za HCQ otopinu koncentracije 10 mg/L, MilliQ voda

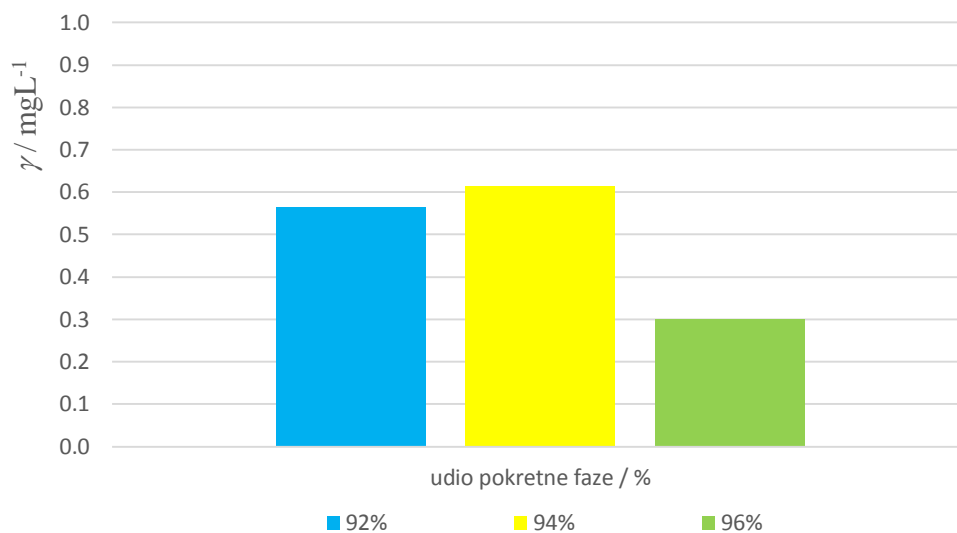
Iz grafičkog prikaza vidimo da promjena temperature kolone sa standardnih 40 $^{\circ}\text{C}$ na 38 $^{\circ}\text{C}$ za posljedicu ima povećanje vremena zadržavanja, a u slučaju kad temperaturu kolone povećamo na 42 $^{\circ}\text{C}$ vrijeme zadržavanja je kraće.



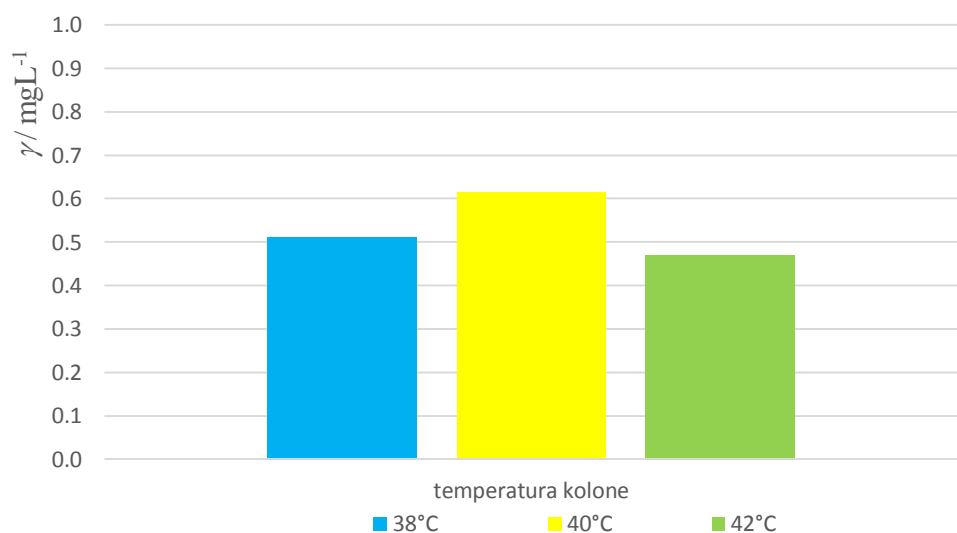
Slika 25. Grafički prikaz utjecaja promjene protoka (mL/min) na promjenu vremena zadržavanja za HCQ otopinu koncentracije 10 mg/L, MilliQ voda

Povećanjem protoka na 0,6 mL/min i smanjenjem na 0,4 mL/min u odnosu na standardni protok od 0,5 mL/min dolazi do povećanja vremena zadržavanja.

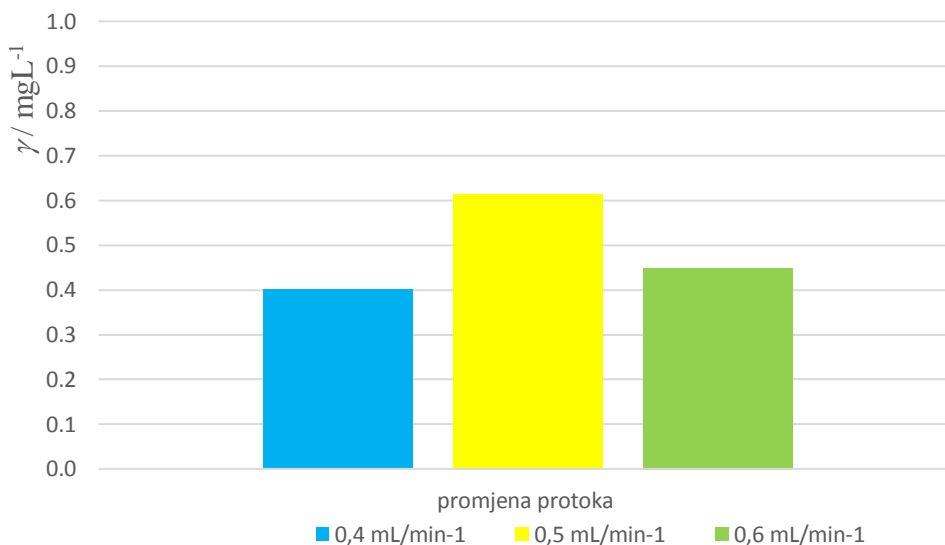
Robusnost je ispitana i za koncentraciju HCQ 1 mg/mL, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici P13 i grafički (slike 26.- 31.)



Slika 26. Grafički prikaz utjecaja promjene sastava pokretne faze na određivanja HCQ u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 1 mg/L

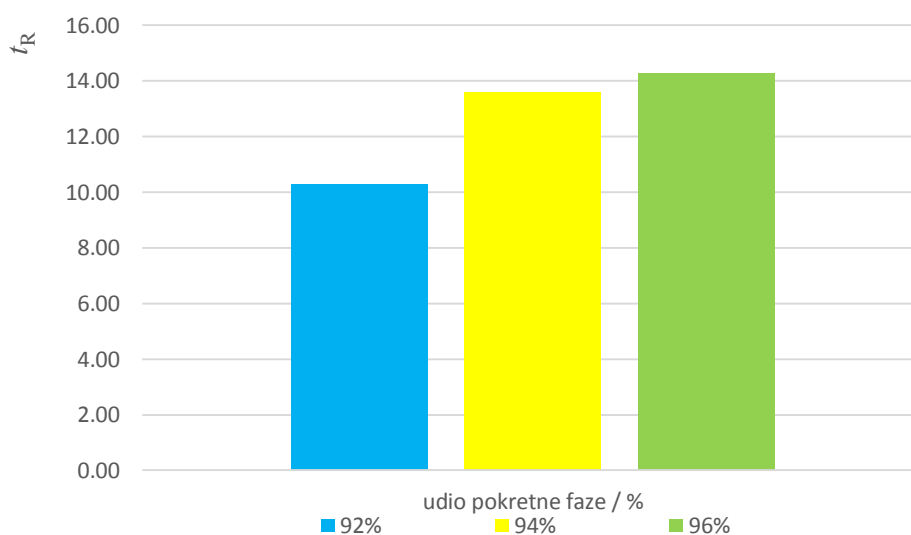


Slika 27. Grafički prikaz utjecaja promjene temperature kolone (°C) na određivanje HCQ u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 1 mg/L



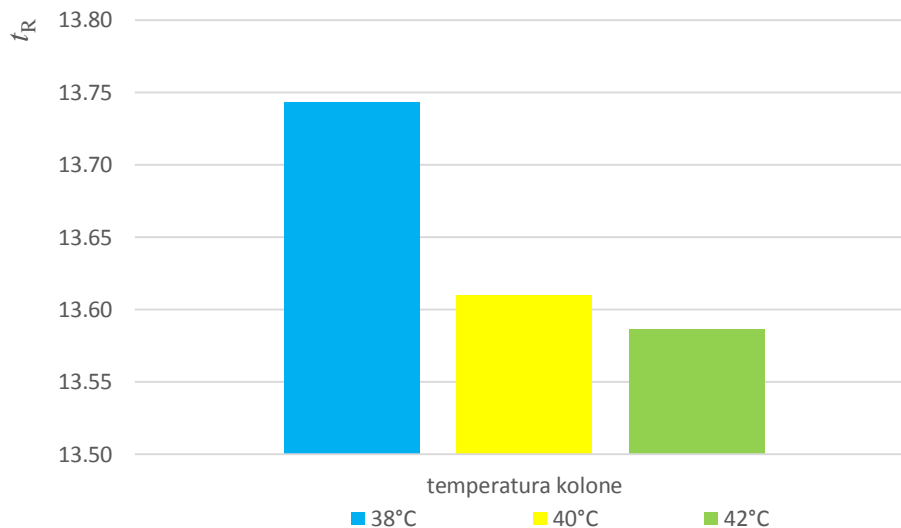
Slika 28. Grafički prikaz utjecaja promjene protoka (mL/min) na određivanje HCQ u MilliQ vodi za otopinu koncentracije 1 mg/L

Na temelju dobivenih rezultata vidimo da promjenom udjela pokretne faze, temperature te promjene protoka, koncentracija analita određena iz umjernog pravca je manja u odnosu na koncentraciju određenu pri optimalnim uvjetima metode koji su 94 % pokretne faze, temperaturi 40 °C te protoku 0,5 mL/min.



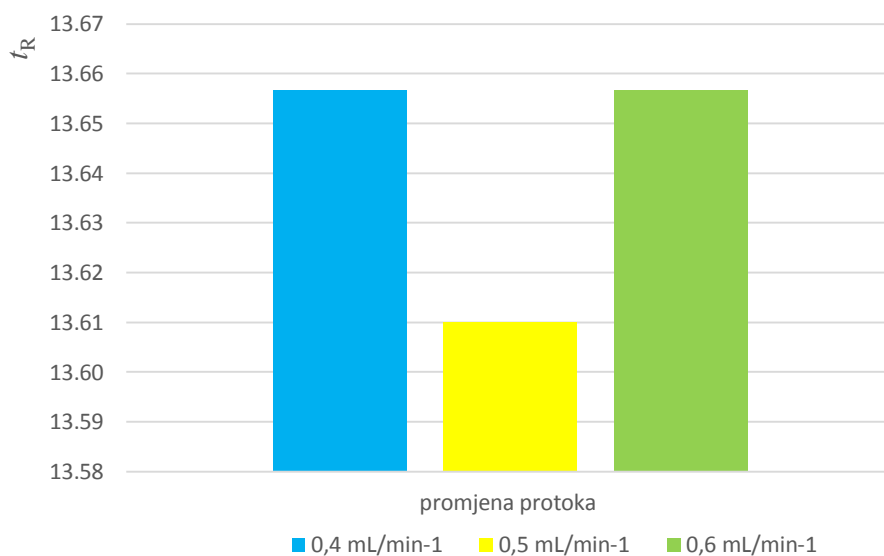
Slika 29. Grafički prikaz utjecaja promjene sastava pokretne faze na promjenu vremena zadržavanja za HCQ otopinu koncentracije 1 mg/L, MilliQ voda

Iz grafičkog prikaza vidimo da smanjenje udjela pokretne faze sa standardnih 94 % na 92 % utječe na promjenu vremena zadržavanja, tako da se vrijeme zadržavanja smanji. Povećanjem udjela pokretne faza na 96 % dolazi do povećanja vremena zadržavanja.



Slika 30. Grafički prikaz utjecaja promjene temperature kolone (°C) na na promjenu vremena zadržavanja za HCQ otopinu koncentracije 1 mg/L, MilliQ voda

Iz grafičkog prikaza vidimo da promjena temperature kolone sa standardnih 40 °C na 38 °C za posljedicu ima povećanje vremena zadržavanja, a u slučaju kad temperaturu kolone povećamo na 42 °C vrijeme zadržavanja se smanjuje.

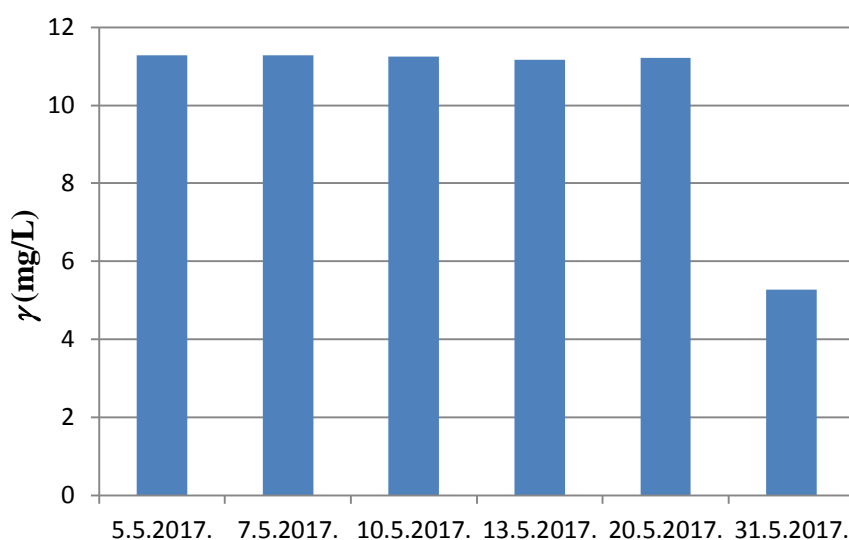


Slika 31. Grafički prikaz utjecaja promjene protoka (mL/min) na promjenu vremena koncentracije za HCQ otopinu koncentracije 1 mg/L, MilliQ voda

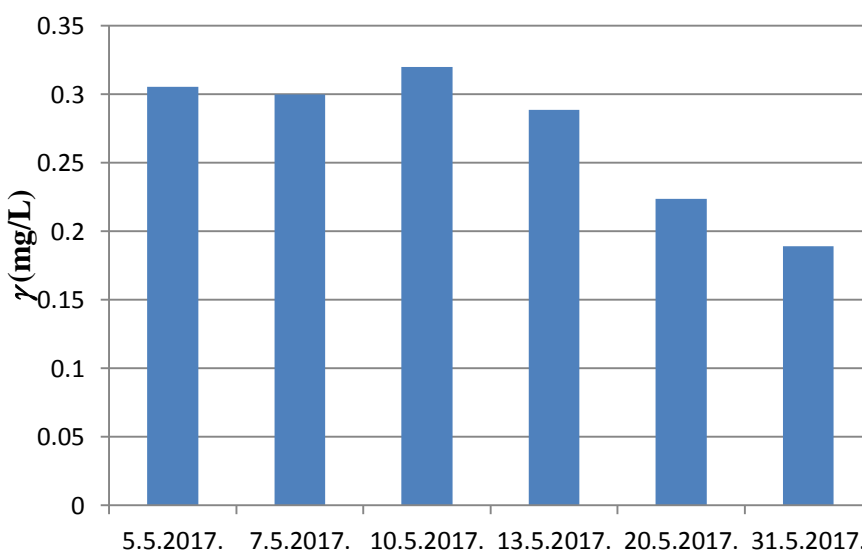
Povećanjem protoka na 0,6 mL/min i smanjenjem na 0,4 mL/min u odnosu na standardni protok od 0,5 mL/min dolazi do povećanja vremena zadržavanja.

4.1.9. Stabilnost otopine hidroksiklorokina

Stabilnost otopine HCQ koncentracija 10 mg/L i 0,3 mg/L ispitana je u vremenskom periodu od mjesec dana. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama P14 i P15 i na slikama 32 i 33.



Slika 32. Stabilnost standardne otopine HCQ, 10 mg/L



Slika 33. Stabilnost standardne otopine HCQ, 0,3 mg/L

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je stabilnost standardne otopine HCQ, koncentracije 10 mg/L zadovoljavajuća prvih 20 dana. Nakon toga, vrijednost masene koncentracije se smanjuje za polovinu početne vrijednosti. Razlog tomu je raspadanje i razgradnja hidroksiklorokina, a treba napomenuti da su uzorci čuvani na sobnoj temperaturi što je također moglo utjecati na razgradnju. Rezultati za otopinu HCQ, koncentracije 0,3 mg/L pokazuju manju stabilnost u odnosu na koncentraciju od 10 mg/L. Već nakon 8 dana masena koncentracija se počinje smanjivati u odnosu na početnu vrijednost.

4.1.10. Sažetak rezultata

Tablica 10. Ukupni prikaz rezultata ispitivane metode

Izvedbena značajka	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat MilliQ /izvorska	Zadovoljava kriterij (MilliQ /izvorska)
Specifičnost/selektivnost	informacija	slike 10 i 11	DA
Linearnost			
Koeficijent determinacije	$R^2 \geq 0,995$	0,9973 / 0,9985	DA/DA
Preciznost			
	RSD ≤ 10 %		
Ponovljivost, t_R	$\gamma = 11$ mg/L	0,11 % / 0,09 %	DA/DA
	$\gamma = 4$ mg/L	0,08 % / 0,03 %	DA/DA
	$\gamma = 0,3$ mg/L	5,32 % / 0,06 %	DA/DA
Ponovljivost, γ	$\gamma = 11$ mg/L	1,28 % / 2,75 %	DA/DA
	$\gamma = 4$ mg/L	4,26 % / 4,84 %	DA/DA
	$\gamma = 0,3$ mg/L	5,27 % / 15,49 %	DA/NE
	RSD ≤ 15 %		
Međupreciznost, t_R	$\gamma = 11$ mg/L	0,24 % / 0,09 %	DA/DA
	$\gamma = 4$ mg/L	0,09 % / 0,12 %	DA/DA
	$\gamma = 0,3$ mg/L	5,82 % / 0,12 %	DA/DA
Međupreciznost, γ	$\gamma = 11$ mg/L	11,63 % / 3,99 %	DA/DA
	$\gamma = 4$ mg/L	21,61 % / 3,66 %	NE/DA
	$\gamma = 0,3$ mg/L	10,18 % / 11,52 %	DA/DA
Istinitost	90 - 110 %		
Iskorištenje	$\gamma = 11$ mg/L	(97,9 \pm 2,7) %	DA
	$\gamma = 4$ mg/L	(96,9 \pm 4,8) %	DA
	$\gamma = 0,3$ mg/L	(121,6 \pm 15,5) %	NE
Granica detekcije (mg/L)	informacija	0,03 / 0,06	
Granica kvantifikacije (mg/L)	informacija	0,09 / 0,19	
Radno područje	informacija	MilliQ: 0,50 mg/L - 12,5 mg/L Izvorska: 0,50 mg/L - 12,5 mg/L	

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je ova metoda prihvatljiva za određivanje hidroksiklorokina u izvorskoj vodi jer su svi parametri unutar zadanih kriterija prihvatljivosti. Do prekoračenja postavljenog kriterija dolazi kod međupreciznosti za koncentraciju (4 mg/L) te ponovljivosti i istinitosti za nisku koncentraciju (0,3 mg/L).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je provjera analitičke metode za određivanje farmaceutika hidroksiklorokina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti vezanom s detektorom s nizom dioda (HPLC–DAD). Istraživanja su provedena sa standardnim otopinama (MilliQ) i otopinama HCQ u izvorskoj vodi. Ispitane su izvedbene značajke metode. Na kraju provjere svih izvedbenih značajki i obrade rezultata zaključci su sljedeći:

- Metoda je selektivna za određivanje hidroksiklorokina u izvorskoj vodi
- Vrijednosti koeficijenta determinacije, u sva četiri slučaja zadovoljile su postavljeni kriterij $R^2 \geq 0,995$ čime je potvrđena linearnost metode što potvrđuje da su rezultati ispitivanja izravno proporcionalni koncentraciji (količini) analita u uzorku.
- Primjenom statističkih F - i t -testa zaključujemo da između nagiba umjernih pravaca određenih s uzorcima izvorske i MilliQ vode ne postoji statistički značajna razlika te je time potvrđeno da matica uzorka ne utječe na osjetljivost metode.
- Ponovljivost u vremenu zadržavanja zadovoljava postavljeni kriterij. Ponovljivost određivanja koncentracija HCQ također zadovoljava postavljeni kriterij, osim za najnižu ispitivanu koncentraciju.
- Iskorištenje metode zadovoljava postavljene kriterije pa možemo potvrditi istinitost metode. Iznimka je najniža ispitivana koncentracija koja kriterij istinitosti nije zadovoljila.

Na temelju svih dobivenih rezultata možemo zaključiti da je ova analitička metoda prihvatljiva za određivanje hidroksiklorokina.

6. LITERATURA

- [1] M. Periša, S. Babić: Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. 65 (9-10) (2016) 471–482.
- [2] M. Kaštelan–Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
- [3] L. Cantas, S.Q. Shah, L.M. Cavaco, C.M. Manaia, F. Walsh, M. Popowska, H. Garelick, H. Bürgmann, H. Sørum, A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. Front. Microbiol. 14 (4-96) (2003), str 2.
- [4]URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydroxychloroquine#section=Top> (pristup 15.6.2017.)
- [5] H.-S. Lim, J.-S. Im, J.-Y. Cho, K.-S. Bae, T. A. Klein, J.-S. Yeom, T.-S. Kim, J.-S. Choi, I.-J. Jang, J.-W. Park, Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine and Its Clinical Implications in Chemoprophylaxis against Malaria Caused by Plasmodium vivax, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 53 (4) (2009) 1468-1475.
- [6] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Osnove analitičke kemije, Zagreb, 1999, str. 645. - 698.
- [7] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Zagreb, 2003, str 217. – 235.
- [8] J.M. Miler, Chromatography: Concepts and contrast, 2. izd., Wiley, New Jersey, 2009, str. 41. - 80.
- [9] L.R.Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3. izd., Willey, New Jersey, 2010.
- [10] R.P.W. Scott, Liquid chromatography detectors, 2.izd., Elsevier, Amsterdam, 1986, str. 4 – 34.
- [11]URL:http://www.teamcag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/detectors/dadPrinciple.html (pristup 14.6.2017.)

- [12] URL: <http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-Diode-Array-Detector-Settings.html> (pristup 14.6.2017.)
- [13] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood., Harmonized guidelines for single laboratoria validation of methods of analysis, IUPAC, 2002, 836. – 853.
- [14] H. Sučić, Validacija analitičke metode za određivanje citrata u urinu metodom ionske kromatografije, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Osijek, 2015.
- [15] International Committee for Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
- [16] AOAC International, How to meet ISO 17025, Requirements for method Verification, 2007.
- [17] International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), 3. izdanje, JCGM, 2012.
- [18] D.C. Warhurst, J.C.P. Steele, I.S. Adagu, J.C. Craig, C. Cullander, Hydroxychloroquine is much less active than chloroquine against chloroquine – resistana Plasmodium falciparum, in agreement with its physicochemical properties, J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003) 188-193.
- [19] URL: http://www.mt.com/hr/hr/home/products/Laboratory_Weighing_Solutions/Analytical/XSE_Analytical_Balance.html (pristup 5.6.2017.)
- [20] E. Generalić, Analitička vaga, Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. Kemijsko tehnološki fakultet, Split, 2015.
- [21] EURACHEM Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 2. Izd., 2014.

PRILOG

Tablica P1. Rezultati analize standardnih otopina HCQ različitih koncentracija u MilliQ vodi pri 343,4 nm

UZORCI	γ (mg/L)	A	\bar{A}	RSD _A (%)	t_R	\bar{t}_R
1	0,05	-	-		-	-
	0,05	-			-	-
	0,05	-			-	-
2	0,10	58,05	56,54	3,82	13,67	13,67
	0,10	55,00			13,67	
	0,10	56,58			13,67	
3	0,25	88,44	75,29	16,46	13,65	13,64
	0,25	73,58			13,63	
	0,25	63,84			13,64	
4	0,50	555,02	465,46	16,75	13,62	13,61
	0,50	428,69			13,60	
	0,50	412,67			13,62	
5	0,75	629,92	670,64	5,47	13,62	13,60
	0,75	701,07			13,59	
	0,75	680,93			13,60	
6	1,00	843,75	832,05	1,56	13,60	13,61
	1,00	834,33			13,62	
	1,00	818,07			13,60	
7	2,50	2856,26	2477,72	14,70	13,58	13,59
	2,50	2129,82			13,59	
	2,50	2447,08			13,60	
8	5,00	5902,34	5967,19	1,13	13,56	13,57
	5,00	6037,27			13,57	
	5,00	5961,95			13,58	
9	7,50	10777,67	10126,12	6,70	13,53	13,54
	7,50	9423,49			13,54	
	7,50	10177,19			13,54	
10	10,00	15072,51	13756,50	9,01	13,52	13,52
	10,00	12611,72			13,50	
	10,00	13585,27			13,53	
11	12,50	16163,73	17321,02	6,80	13,49	13,50
	12,50	17279,39			13,50	
	12,50	18519,93			13,51	
					\bar{t}_R	13,58
					RSD _t (%)	0,39

Tablica P2. Rezultati analize standardnih otopina HCQ različitih koncentracija u MilliQ vodi pri 220,4 nm

UZORCI	γ (mg/L)	A	\bar{A}	t_R	\bar{t}_R
1	0,05	-	-	-	-
	0,05	-		-	
	0,05	-		-	
2	0,10	-	-	-	-
	0,10	-		-	
	0,10	-		-	
3	0,25	-	-	-	-
	0,25	-		-	
	0,25	-		-	
4	0,50	822,43	693,98	13,62	13,61
	0,50	685,10		13,60	
	0,50	574,40		13,62	
5	0,75	736,93	877,06	13,62	13,60
	0,75	842,02		13,59	
	0,75	1052,23		13,60	
6	1,00	1068,60	1152,09	13,60	13,61
	1,00	1195,80		13,62	
	1,00	1191,87		13,60	
7	2,50	4117,13	3399,24	13,58	13,60
	2,50	2832,47		13,61	
	2,50	3248,13		13,60	
8	5,00	8818,23	9114,03	13,56	13,57
	5,00	9539,21		13,57	
	5,00	8984,66		13,58	
9	7,50	18454,61	16118,76	13,53	13,54
	7,50	14301,76		13,54	
	7,50	15599,92		13,54	
10	10,00	22778,75	21055,38	13,52	13,52
	10,00	19425,25		13,50	
	10,00	20962,15		13,53	
11	12,50	24677,93	26809,39	13,49	13,50
	12,50	26836,91		13,50	
	12,50	28913,34		13,51	

Tablica P3. Rezultati analize standardnih otopina HCQ različitih koncentracija u izvorskoj vodi pri 343,4 nm

UZORCI	γ (mg/L)	A	\bar{A}	t_R	\bar{t}_R
1	0,05	44,43	53,18	13,65	13,65
	0,05	68,38		13,66	
	0,05	46,72		13,65	
2	0,10	53,28	53,83	13,65	13,65
	0,10	51,37		13,66	
	0,10	56,85		13,65	
3	0,25	227,81	220,45	13,64	13,65
	0,25	214,86		13,66	
	0,25	218,67		13,65	
4	0,50	596,20	571,51	13,63	13,63
	0,50	597,42		13,62	
	0,50	520,92		13,63	
5	0,75	847,43	848,13	13,63	13,63
	0,75	854,81		13,63	
	0,75	842,14		13,63	
6	1,00	1135,78	1104,56	13,62	13,62
	1,00	1126,28		13,63	
	1,00	1051,62		13,62	
7	2,50	3492,87	3447,53	13,62	13,61
	2,50	3413,26		13,61	
	2,50	3436,45		13,61	
8	5,00	6945,55	7100,43	13,58	13,59
	5,00	7158,79		13,59	
	5,00	7196,96		13,59	
9	7,50	10322,78	10483,63	13,57	13,57
	7,50	10614,18		13,57	
	7,50	10513,93		13,58	
10	10,00	15300,84	15259,92	13,55	13,55
	10,00	15168,24		13,54	
	10,00	15310,69		13,56	
11	12,50	18718,95	18710,06	13,55	13,55
	12,50	18718,95		13,55	
	12,50	18692,28		13,56	

Tablica P4. Rezultati analize standardnih otopina HCQ različitih koncentracija u izvorskoj vodi pri 220,4 nm

UZORCI	γ (mg/L)	A	\bar{A}	t_R	\bar{t}_R
1	0,05	62,60	62,60	13,62	13,63
	0,05	-		13,62	
	0,05	-		13,65	
2	0,10	70,58	70,58	13,62	13,61
	0,10	-		13,61	
	0,10	-		13,60	
3	0,25	227,81	227,81	13,68	13,65
	0,25	-		13,64	
	0,25	-		13,63	
4	0,50	674,47	632,74	13,63	13,63
	0,50	618,47		13,62	
	0,50	605,27		13,63	
5	0,75	1184,33	1174,31	13,63	13,62
	0,75	1190,73		13,61	
	0,75	1147,87		13,63	
6	1,00	1361,77	1353,58	13,62	13,62
	1,00	1417,57		13,63	
	1,00	1281,40		13,62	
7	2,50	5028,01	5143,74	13,62	13,61
	2,50	5103,74		13,61	
	2,50	5299,46		13,61	
8	5,00	10175,59	11208,65	13,58	13,59
	5,00	11773,83		13,59	
	5,00	11676,54		13,59	
9	7,50	16676,63	16870,49	13,58	13,58
	7,50	16927,59		13,57	
	7,50	17007,26		13,58	
10	10,00	24991,51	24517,02	13,55	13,55
	10,00	24052,22		13,54	
	10,00	24507,33		13,56	
11	12,50	30487,42	29917,86	13,55	13,55
	12,50	29170,98		13,55	
	12,50	30095,17		13,56	

Tablica P5. Podaci za ponovljivosti mjerenja standardnih otopina HCQ u izvorskoj vodi

UZORCI	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R
1	11	16080.43	10.83	13.57	4	5400.78	3.74	13.61	0.3	247.72	0.33	13.67
2		14845.25	10.01	13.58		5378.27	3.73	13.61		354.56	0.40	13.67
3		15666.56	10.55	13.58		5746.02	3.97	13.62		256.73	0.33	13.67
4		15696.10	10.57	13.55		5359.02	3.72	13.61		196.12	0.29	13.67
5		16137.24	10.87	13.55		5351.78	3.71	13.61		176.44	0.28	13.67
6		15562.61	10.48	13.58		6028.33	4.16	13.61		343.45	0.39	13.66
7		16180.39	10.89	13.57		5960.05	4.11	13.61		335.10	0.38	13.66
8		16271.81	10.95	13.57		5805.88	4.01	13.61		351.98	0.39	13.66
9		16059.37	10.81	13.56		5723.05	3.96	13.61		454.76	0.46	13.65
10		16244.77	10.94	13.56		5254.02	3.65	13.62		347.70	0.39	13.65
Srednja vrijednost		15874.45	10.69	13.57		5600.72	3.88	13.61		306.46	0.36	13.66
SD		442.95	0.29	0.01		282.88	0.19	0.0042		85.16	0.06	0.008
RSD(%)		2.79	2.75	0.09		5.05	4.84	0.03		27.79	15.49	0.06

Tablica P6. Podaci za ponovljivosti mjerenja standardnih otopina HCQ u MilliQ vodi

UZORCI	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R
1	11	17651,14	12,87	13,58	4	5759,18	4,43	13,63	0,3	289,39	0,54	13,71
2		17934,61	13,08	13,59		6085,58	4,66	13,65		240,44	0,50	15,47
3		17389,82	12,69	13,57		6136,01	4,69	13,64		296,63	0,54	13,73
4		17665,70	12,89	13,57		6242,78	4,77	13,62		250,63	0,51	13,72
5		17519,28	12,78	13,58		5498,71	4,24	13,63		256,76	0,52	13,70
6		17048,45	12,45	13,62		6035,84	4,62	13,63		169,52	0,45	13,70
7		17550,52	12,80	13,59		5740,48	4,41	13,63		282,42	0,53	15,48
8		17663,23	12,88	13,58		5482,49	4,23	13,64		227,88	0,50	13,69
9		17535,76	12,79	13,58		5763,77	4,43	13,62		239,53	0,50	13,69
10		17688,59	12,90	13,58		6089,51	4,66	13,61		220,29	0,49	13,68
Srednja vrijednost		17564,71	12,81	13,58		5883,44	4,51	13,63		247,35	0,51	14,06
SD		230,88	0,16	0,01		270,48	0,19	0,01		37,72	0,03	0,75
RSD(%)		1,31	1,21	0,11		4,60	4,26	0,08		15,25	5,27	5,32

Tablica P7. Podaci za međupreciznost u izvorskoj vodi

UZORCI	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R
1		15042,91	10,14	13,56		5333,59	3,6992	13,59		293,13	0,36	13,63
2		15917,60	10,72	13,54		5638,03	3,9012	13,60		306,62	0,36	13,64
3		15038,92	10,14	13,56		5740,01	3,9688	13,58		290,53	0,35	13,63
4		15031,70	10,13	13,54		5764,62	3,9851	13,58		359,68	0,40	13,62
5		14465,43	9,76	13,55		5676,78	3,9269	13,57		312,00	0,37	13,64
6		14909,35	10,05	13,56		5369,17	3,7228	13,58		304,13	0,36	13,63
7		14829,24	10,00	13,55		5667,47	3,9207	13,58		311,27	0,37	13,65
8		14312,41	9,65	13,55		5686,31	3,9332	13,58		311,68	0,37	13,63
9		14985,96	10,10	13,54		5578,69	3,8618	13,57		292,37	0,36	13,63
10		14839,50	10,00	13,55		5523,44	3,8252	13,59		203,80	0,30	13,64
11		16080,43	10,83	13,57		5400,78	3,7438	13,61		247,72	0,33	13,67
12		14845,25	10,01	13,58		5378,27	3,7289	13,61		354,56	0,40	13,67
13		15666,56	10,55	13,58		5746,02	3,9728	13,62		256,73	0,33	13,67
14		15696,10	10,57	13,55		5359,02	3,7161	13,61		196,12	0,29	13,67
15		16137,24	10,87	13,55		5351,78	3,7113	13,61		176,44	0,28	13,67
16		15562,61	10,48	13,58		6028,33	4,1600	13,61		343,45	0,39	13,66
17		16180,39	10,89	13,57		5960,05	4,1147	13,61		335,10	0,38	13,66
18		16271,81	10,95	13,57		5805,88	4,0125	13,61		351,98	0,39	13,66
19		16059,37	10,81	13,56		5723,05	3,9575	13,61		454,76	0,46	13,65
20		16244,77	10,94	13,56		5254,02	3,6464	13,62		347,70	0,39	13,65
Srednja vrijednost		15405,88	10,38	13,56		5599,27	3,88	13,60		302,49	0,36	13,65
SD		623,94	0,41	0,01		214,10	0,14	0,02		62,87	0,04	0,02
RSD(%)	11	4,05	3,99	0,09	4	3,82	3,66	0,12	0,3	20,78	11,52	0,12

Tablica P8. Podaci za međupreciznost u MilliQ vodi

UZORCI	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R	γ (mg/L)	A	γ (mg/L)	t_R
1						3597,16	2,8889	13,61		117,38	0,42	15,46
2		13489,73	9,9307	13,68		3048,79	2,4993	13,61		127,89	0,42	15,44
3		12762,23	9,4138	13,65		3542,90	2,8504	13,62		135,27	0,43	15,44
4		13642,57	10,0393	13,65		3578,34	2,8756	13,61		116,26	0,42	15,46
5		14202,68	10,4373	13,63		3977,51	3,1592	13,62		129,84	0,43	15,45
6		13753,37	10,1181	13,63		3903,95	3,1069	13,62		118,03	0,42	15,45
7		14173,49	10,4166	13,60		3913,81	3,1139	13,62		120,37	0,42	15,44
8		14088,23	10,3559	13,58		3662,48	2,9354	13,62		121,40	0,42	15,44
9		14220,49	10,4499	13,56		3871,53	3,0839	13,60		133,97	0,43	15,45
10		14215,41	10,4463	13,58		3740,92	2,9911	13,61		123,62	0,42	15,44
11		17651,14	12,8876	13,58		5759,18	4,4252	13,63		289,39	0,54	13,71
12		17934,61	13,0889	13,59		6085,58	4,6571	13,65		240,44	0,50	15,47
13		17389,82	12,7018	13,57		6136,01	4,6929	13,64		296,63	0,54	13,73
14		17665,70	12,8978	13,57		6242,78	4,7688	13,62		250,63	0,51	13,72
15		17519,28	12,7938	13,58		5498,71	4,2401	13,63		256,76	0,52	13,70
16		17048,45	12,4593	13,62		6035,84	4,6217	13,63		169,52	0,45	13,70
17		17550,52	12,8160	13,59		5740,48	4,4119	13,63		282,42	0,53	15,48
18		17663,23	12,8961	13,58		5482,49	4,2286	13,64		227,88	0,49	13,69
19		17535,76	12,8056	13,58		5763,77	4,4284	13,62		239,53	0,50	13,69
20		17688,59	12,9142	13,58		6089,51	4,6599	13,61		220,29	0,49	13,68
Srednja vrijednost		15799,75	11,57	13,60		4783,59	3,78	13,62		185,88	0,47	14,75
SD		1894,08	1,35	0,03		1129,60	0,80	0,01		66,64	0,05	0,86
RSD(%)	11	11,99	11,63	0,24	4	23,61	21,16	0,09	0,3	35,85	10,18	5,81

Tablica P9. Podaci mjerenja za određivanje iskorištenja (11 mg/L), izvorska voda

UZORCI	γ (pripremljeno) / mgL ⁻¹	γ (izmjerena) / mgL ⁻¹	iskorištenje (%)
1	11,000	10,828	98,43
2	11,000	10,008	90,99
3	11,000	10,553	95,94
4	11,000	10,573	96,12
5	11,000	10,865	98,78
6	11,000	10,484	95,31
7	11,000	10,894	99,04
8	11,000	10,955	99,59
9	11,000	10,814	98,31
10	11,000	10,937	99,42
	Srednja vrijednost	10,767	97,881
	SD	0,294	2,671
	RSD(%)	2,73	2,73

Tablica P10. Podaci mjerenja za određivanje iskorištenja (4 mg/L), izvorska voda

UZORCI	γ (pripremljeno) / mgL ⁻¹	γ (izmjerena) / mgL ⁻¹	iskorištenje (%)
1	4.000	3.744	93.59
2	4.000	3.729	93.22
3	4.000	3.973	99.32
4	4.000	3.716	92.90
5	4.000	3.711	92.78
6	4.000	4.160	104.00
7	4.000	4.115	102.87
8	4.000	4.012	100.31
9	4.000	3.958	98.94
10	4.000	3.646	91.16
	Srednja vrijednost	3.876	96.91
	SD	0.188	4.69
	RSD(%)	4.84	4.84

Tablica P11. Podaci mjerenja za određivanje iskorištenja (0,3 mg/L), izvorska voda

UZORCI	γ(pripremljeno) / mgL⁻¹	γ (izmjerena) / mgL⁻¹	iskorištenje (%)
1	0.300	0.326	108.58
2	0.300	0.397	132.20
3	0.300	0.332	110.57
4	0.300	0.292	97.17
5	0.300	0.278	92.82
6	0.300	0.389	129.74
7	0.300	0.384	127.90
8	0.300	0.395	131.63
9	0.300	0.463	154.36
10	0.300	0.392	130.68
	Srednja vrijednost	0.365	121.57
	SD	0.056	18.83
	RSD(%)	15.49	15.49

Tablica P12. Rezultati mjerenja određivanja HCQ koncentracije 10 mg/L u MilliQ vodi ovisno o promjeni eksperimentalnih uvjeta

	t_R	A	$\gamma_{izmj.} \text{ (mg/L)}$		t_R	A	$\gamma_{izmj.} \text{ (mg/L)}$
pokretna faza, A=92%	9,53	16017,03	11,838	pokretna faza, A=96%	14,24	15546,19	11,490
	9,52	15667,81	11,580		14,24	15041,72	11,117
	9,50	15816,88	11,690		14,25	15816,65	11,690
temperatura 38 °C	13,70	15542,39	11,487	temperatura 42 °C	13,44	15807,47	11,683
	13,68	15668,15	11,580		13,46	15261,76	11,280
	13,69	15688,62	11,595		13,47	15993,10	11,820
protok pokretne faze 0,4 mL/min	13,54	15596,67	11,527	protok pokretne faze 0,6 mL/min	13,55	15619,27	11,544
	13,57	12532,41	9,263		13,58	13710,19	10,133
	13,56	15498,17	11,455		13,54	15554,76	11,496

Tablica P13. Rezultati određivanja HCQ koncentracije 1 mg/L u MilliQ vodi ovisno o promjeni eksperimentalnih uvjeta

	t_R	A	$\gamma_{izmj.} \text{ (mg/L)}$		t_R	A	$\gamma_{izmj.} \text{ (mg/L)}$
pokretna faza, A=92%	10,43	772,75	0,571	pokretna faza, A=96%	14,29	444,28	0,328
	10,25	750,95	0,555		14,27	475,07	0,351
	10,18	769,80	0,569		14,29	299,63	0,221
temperatura 38 °C	13,76	666,95	0,493	temperatura 42 °C	13,59	671,74	0,496
	13,74	768,93	0,568		13,58	676,15	0,500
	13,73	639,22	0,472		13,59	559,98	0,414
protok pokretne faze 0,4 mL/min	13,66	565,68	0,418	protok pokretne faze 0,6 mL/min	13,66	467,13	0,345
	13,67	564,77	0,417		13,65	685,80	0,507
	13,64	501,43	0,371		13,66	668,59	0,494

Tablica P14. Stabilnost otopine koncentracije 10 mgL⁻¹ u vremenskom periodu od mjesec dana

	<i>t_R</i>	<i>A</i>	<i>γ</i> _{izmjerena (mg/L)}
5.5.2017.	13,57	14996,36	11,084
	13,55	15552,82	11,495
	13,54	11199,10	8,277
7.5.2017.	13,56	15543,83	11,488
	13,56	14015,63	10,359
	13,56	15006,09	11,091
10.5.2017.	13,58	15302,09	11,310
	13,58	15210,06	11,242
	13,58	15181,34	11,221
13.5.2017.	13,64	13883,23	10,261
	13,62	15072,59	11,140
	13,61	15171,34	11,213
20.5.2017.	13,65	15422,35	11,399
	13,65	15130,86	11,183
	13,66	14993,63	11,082
31.5.2017.	13,63	7116,00	5,259
	13,62	6954,99	5,140
	13,65	7345,55	5,429

Tablica P15. Stabilnost otopine koncentracije 1 mgL⁻¹ u vremenskom periodu od mjesec dana

	<i>t_R</i>	<i>A</i>	<i>γ</i> _{izmjerena (mg/L)}
5.5.2017.	13,63	421,21	0,311
	13,64	404,60	0,299
	13,63	344,60	0,255
7.5.2017.	13,64	368,07	0,272
	13,62	824,77	0,610
	13,65	577,38	0,427
10.5.2017.	13,65	555,20	0,410
	13,66	429,83	0,318
	13,65	435,18	0,322
13.5.2017.	13,70	450,07	0,333
	13,68	249,61	0,184
	13,68	330,45	0,244
20.5.2017.	13,66	483,98	0,358
	13,67	315,40	0,233
	13,67	290,16	0,214
31.5.2017.	13,62	379,70	0,281
	13,63	255,13	0,189
	13,62	256,19	0,189