

# Razvoj i validacija tekućinsko kromatografske metode za određivanje sadržaja benzalkonij klorida u različitim farmaceutskim proizvodima

---

**Perušić, Andrea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:812715>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Andrea Perušić**

**Razvoj i validacija tekućinsko kromatografske metode  
za određivanje sadržaja benzalkonij klorida u  
različitim farmaceutskim proizvodima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Analitika lijekova, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen u odjelu Razvojne analitike tvrtke Jadran Galenski Laboratorij u Rijeci pod stručnim vodstvom dr. sc. Danijele Štanfel, voditeljice Razvojne analitike.

*Zahvaljujem se Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu, Zavodu za Analitiku i kontrolu lijekova te Jadran Galenskom Laboratoriju što su mi kroz ovu suradnju omogućili izradu diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk što je pristala biti moj mentor, te prof. dr. sc. Biljani Nigović što je pristala biti član povjerenstva prilikom obrane diplomskog rada.*

*Zahvaljujem dr. sc. Danijeli Štanfel na stručnom vodstvu i podršci tijekom izrade diplomskog rada te na tome što je pristala biti član povjerenstva prilikom obrane mog diplomskog rada.*

*Hvala Marini Mavrinac na pomoći i strpljenju te svemu što me naučila tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Također, hvala osoblju odjela Razvojne analitike na ljubaznosti i kolegijalnosti prilikom mog boravka u JGL-u.*

*Zahvaljujem se roditeljima na bezuvjetnoj podršci, ljubavi i razumijevanju koji su me pratili tijekom cjelokupnog školovanja.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama, koji su bili uz mene tijekom studiranja.*

*Hvala Siniši koji mi je pružio bezuvjetnu podršku, strpljenje i razumijevanje od trenutka kada smo se upoznali.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Kvarterne amonijeve soli .....	2
1.1.1. Primjena kvarternih amonijevih soli .....	2
1.2. Benzalkonij klorid .....	3
1.2.1. Fizikalno - kemijska svojstva benzalkonij klorida .....	3
1.2.2. Benzalkonij klorid u kapima za oko .....	4
1.2.3. Benzalkonij klorid u kapima za nos .....	4
1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	5
1.3.1. Vrste tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.....	6
1.3.2. Nepokretne faze.....	6
1.3.3. Pokretne faze .....	7
1.3.4. Kromatografski parametri .....	8
1.4. Validacija analitičkih postupaka.....	10
1.4.1. Analitičke značajke postupka validacije .....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
3.1. Reagensi.....	15
3.2. Uzorci .....	15
3.3. Placebo uzorci.....	15
3.4. Poredbene supstancije.....	16
3.5. Aparatura .....	16
3.6. Priprema otopina.....	18
3.6.1. Priprema otapala.....	18
3.6.2. Fosfatni pufer pH 3,0 (0,01 M) za pripremu mobilne faze .....	18
3.6.3. Poredbena otopina .....	18
3.6.4. Osnovna otopina benzalkonij klorida (0,25 mg/ml).....	18
3.6.5. Otopine uzoraka .....	18

3.6.6.	Otopine placeba.....	20
3.6.7.	Radne otopine za linearnost (50, 75, 100, 125 i 150 %) .....	21
3.6.8.	<i>Radne otopine za točnost</i> (50, 100 i 150%) za svaki proizvod .....	21
3.7.	Kromatografska analiza .....	24
3.8.	Validacija metode .....	25
3.8.1.	Selektivnost .....	25
3.8.2.	Pouzdanost.....	25
3.8.3.	Točnost .....	25
3.8.4.	Linearnost.....	26
3.8.5.	Otpornost.....	26
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>28</b>
4.1.	Tijek razvoja metode .....	28
4.1.1.	Postavljanje metode.....	28
4.1.2.	Odabir kolone .....	28
4.1.3.	Odabir gradijenta pokretne faze .....	28
4.1.4.	Voda umjesto pufera u pokretnoj fazi .....	29
4.1.5.	Usporedba pokretne faze pripremljene u odvojenim bocama i pokretne faze pomiješane u bocama .....	30
4.2.	Validacija metode .....	32
4.2.1.	Selektivnost .....	32
4.2.2.	Preciznost .....	39
4.2.3.	Točnost .....	40
4.2.4.	Linearnost.....	41
4.2.5.	Područje rada.....	42
4.2.6.	Otpornost.....	43
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>47</b>

<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....</b>	<b>49</b>
<b>BASIC DOCUMENTATION CARD .....</b>	<b>50</b>

## 1. UVOD

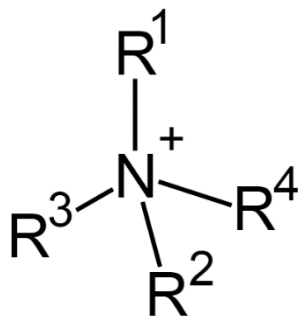
Benzalkonij klorid često se koristi u farmaceutskoj industriji kao aktivna supstancija ili pomoćna tvar. Prema kemijskoj strukturi je kvarterni amonijev spoj. Djeluje antimikrobno kao dezinficijens i konzervans te kao kation aktivni emulgator. U širokoj je primjeni kao konzervans u proizvodima koji se primjenjuju na kožu i sluznice poput kapi za oko, kapi za nos, pripravci za pranje lica i ruku, ispiranje usta, spermicidnim kremama i u mnogim drugim sredstvima za čišćenje i dezinficijensima.

Pokazalo se da se učestalim korištenjem benzalkonij klorida mogu pojaviti brojne nuspojave, stoga je potrebno redovito kontrolirati njegov sadržaj u farmaceutskim proizvodima.

Cilj ovog rada je razvoj i validacija prikladne i jednostavne metode za određivanje sadržaja C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub> homologa benzalkonij klorida u više, odnosno osam različitih farmaceutskih proizvoda: Brimonidin, kapi za oko, Dorzolamid, kapi za oko, Dorzolamid plus Timolol, kapi za oko, Latanoprost, kapi za oko, Timolol, kapi za oko, Olopatadin, kapi za oko, Ksilometazolin, kapi za nos te Septogal bez šećera, pastile.

## 1.1. Kvarterne amonijeve soli

Kvaterni amonijevi ioni su pozitivno nabijeni poliatomski ioni opće strukture  $\text{NR}_4^+$ , pri čemu R grupe mogu biti istovrsne ili različite alkilne ili arilne skupine, a mogu biti i međusobno povezane u cikličke strukture (**Slika 1.**) (McNaught, 1997).



**Slika 1.** Opći prikaz kvarternog amonijevog kationa.

Za razliku od amonijevog iona, ili primarnih, sekundarnih i tercijarnih amonijevih kationa, kvaterni amonijevi ioni su konstantno nabijeni, neovisno o pH medija u kojem se nalaze. Kvarterne amonijeve soli su soli kvarternih amonijevih kationa (Wikipedia, 2016).

Kvarterne amonijeve soli su neutralne, čvrste tvari bez mirisa. Važni su dijelovi mnogih biološki aktivnih molekula. Masne kiseline se prevode u amine, a zatim u kvarterne amonijeve soli koje se upotrebljavaju kao sapuni i detergentsi. Posjeduju bakteriostatska svojstva koja su vezana uz prisutnost kvaterne amonijeve skupine (Pine, 1994).

### 1.1.1. Primjena kvarternih amonijevih soli

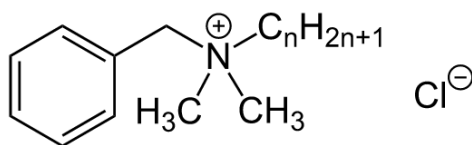
Kvaterne amonijeve soli koriste se kao: dezinficijensi, antiseptici, surfaktanti, omekšivači, antitstatički reagensi (npr. u šamponima); najčešće u obliku klorida ili sulfata.

Kvaterne amonijeve soli pokazale su izrazitu antimikrobnu aktivnost, posebice one soli s dugim alkilnim lancem, primjerice: benzalkonij klorid, cetrimid, cetrimonij bromid. Učinkoviti su u uništavanju gljivica, ameba, virusa s lipoproteinskim omotačem te većine bakterija, a nisu učinkoviti u uništavanju endospora, mikobakterija, bakterija iz roda pseudomonas te virusa bez lipoproteinskog omotača. Djeluju tako da razaraju staničnu membranu mikroorganizama (Mondal, 2011).



## 1.2. Benzalkonij klorid

Benzalkonij klorid je kvaterna amonijeva sol. Smjesa je alkilbenzildimetilamonij klorida različitih duljina alkilnog lanaca, najčešće C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> i C<sub>16</sub> (**Slika 2.**) (Council of Europe, 2013).



$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

**Slika 2.** Struktura benzalkonij klorida (Wikipedia, 2016).

Zbog svog antibakterijskog i antifungalnog djelovanja široko se primjenjuje kao konzervans u farmaceutskim proizvodima kao što su kapi za oko, kapi za nos te otopine za čuvanje leća. Svaki homolog benzalkonij klorida posjeduje nešto drugačija fizikalna, kemijska te biocidna svojstva. C<sub>12</sub> homolog najučinkovitiji je protiv kvasaca i gljivica, C<sub>14</sub> homolog protiv Gram-pozitivnih bakterija, dok je C<sub>16</sub> homolog najučinkovitiji protiv Gram-negativnih bakterija (Liu, 2009).

Benzalkonij klorid je farmakopejska supstanca opisana u Europskoj, Britanskoj i Američkoj Farmakopeji. Monografija Europske farmakopeje propisuje određivanje sva tri homologa benzalkonij klorida u odnosu na ukupni sadržaj. Sadržaj C<sub>12</sub> homologa ne smije biti manji od 40% u odnosu na ukupni sadržaj. Sadržaj C<sub>14</sub> homologa ne smije biti manji od 20% u odnosu na ukupni sadržaj, a zbroj sadržaja C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub> homologa ne smije biti manji od 70% od ukupnog sadržaja. (Council of Europe, 2013)

### 1.2.1. Fizikalno - kemijska svojstva benzalkonij klorida

Benzalkonij klorid je higroskopan i dolazi u obliku bijelog ili blago žutog praška, ili želatinoznih žuto-bijelih fragmenata. Vrlo je topljiv u vodi i etanolu (96%), a njegova vodena otopina se mućkanjem pjenu (Council of Europe, 2013).

Prosječna molarna masa iznosi 199,720, gustoća je jednaka 0,98 g/cm<sup>3</sup>, dok je talište je na 40 °C. pK<sub>a</sub> vrijednost iznosi 19,46. Vrijednost log *D* iznosi -1,38, neovisno o pH, što znači da je benzalkonij klorid hidrofilna tvar (Chemicalize, 2016).

### **1.2.2. Benzalkonij klorid u kapima za oko**

Benzalkonij klorid je najčešće primjenjivani konzervans u kapima za oko. Iako ima vrlo efektivan antimikrobni i antifungalni učinak, *in vitro* i *in vivo* studije pokazale su da benzalkonij klorid može imati štetne učinke na površinske epitelne stanice. Takav učinak od posebne je važnosti kod pripravaka koji se koriste tijekom dužeg vremenskog razdoblja za kronična stanja kao što je na primjer glaukom. (Noecker, 2011)

### **1.2.3. Benzalkonij klorid u kapima za nos**

Benzalkonij klorid često se koristi kao konzervans u kapima i sprejevima za nos. Studije su pokazale da benzalkonij klorid može pridonijeti egzacerbaciji medikamentoznog rinitisa, stanja koje se javlja kao posljedica dugotrajnog korištenja nazalnih dekonjestiva.

S obzirom na potencijalno štetne učinke benzalkonij klorida na sluznicu oka i nosa, vrlo je važno pratiti sadržaj benzalkonij klorida u pripravcima kao što su kapi za oko i kapi za nos.

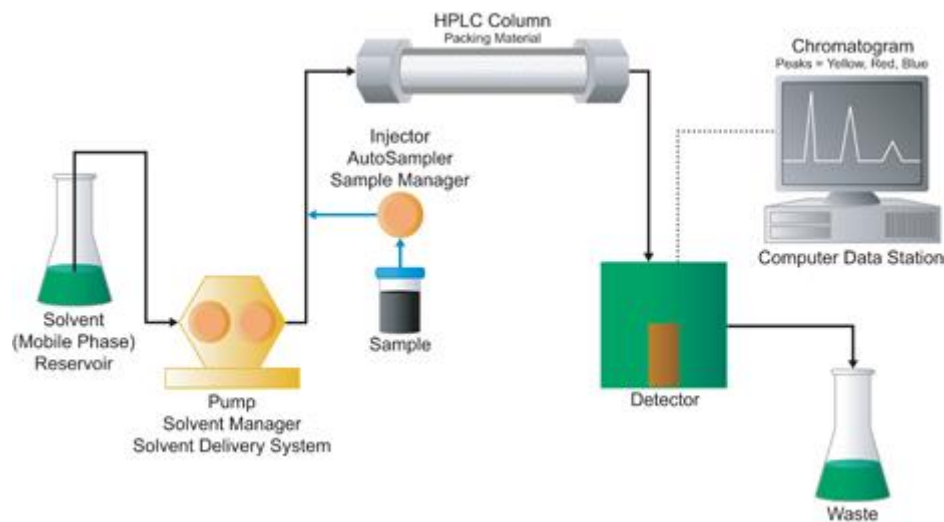
Pritom je važno pratiti sadržaj pojedinačnih homologa, posebice C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub>, te ukupni sadržaj, kako je i opisano u Europskoj farmakopeji. (Council of Europe, 2013) Najčešća analitička tehnika koja se koristi u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi benzalkonij klorida je obrnuto – fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) (Liu, 2009).

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

Kromatografske tehnike ubrajaju se među najčešće su primjenjivane instrumentalne tehnike u analitici i kontroli lijekova. One omogućavaju brzo i djelotvorno razdvajanje složenih smjesa te identifikaciju i određivanje odijeljenih sastojaka uzorka. U farmakopejskoj kontroli kakvoće lijekova primjenjuju se za identifikaciju, ispitivanje čistoće i određivanje sadržaja ljekovitih i pomoćnih tvari.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je analitička tehnika u kojoj tekuća pokretna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama nepokretne faze noseći sastavnice uzorka. Molekule uzorka putuju niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između pokretne i nepokretne faze. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti nepokretne faze i može se temeljiti na razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te stereokemijskim interakcijama.

Tekućinski kromatograf sastoji se od spremnika pokretne faze, sustava za obradu otapala, crpke, sustava za unošenje uzorka, kolone i detektora (Slika 3.).



**Slika 3.** Shematski prikaz HPLC-a (Waters, 2016).

### 1.3.1. Vrste tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Na temelju mehanizma odjeljivanja analita između pokretne i nepokretne faze razlikujemo kromatografiju temeljenu na razdiobi, adsorpcijsku kromatografiju, ionsku kromatografiju, gel kromatografiju (engl. *size-exclusion*).

U adsorpcijskoj kromatografiji stacionarna faza je najčešće silika gel te se separacija temelji na adsorpciji analita na površinu silika gela. Razlikujemo dva tipa adsorpcijske kromatografije, obzirom na polarnost stacionarne faze:

- normalno – fazna kromatografija i
- revezno – fazna kromatografija.

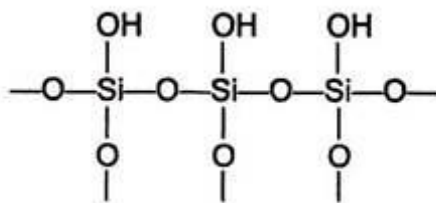
U normalno – faznoj kromatografiji nepokretna faza je polarna, a pokretna faza nepolarna dok je u obrnuto – faznoj kromatografiji nepokretna faza je nepolarna, a pokretna faza polarna. Danas je u analitici i kontroli lijekova većinom u primjeni obrnuto – fazna kromatografija (McPolin, 2009).

### 1.3.2. Nepokretne faze

Nepokretne faze u HPLC-u sastoje se od sitnih čestica, veličine 3-10  $\mu\text{m}$ , koje se nalaze u najčešće čeličnoj koloni (Nigović, 2013).

Najčešći materijal kojim se pune HPLC kolone je silikagel. Fizički je otporan i kemijski stabilan u različitim otapalima i pri niskim pH vrijednostima.

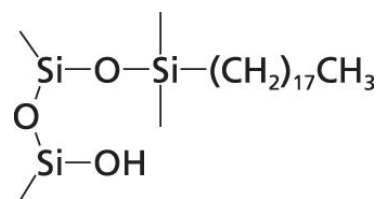
Silikagel se sastoji od atoma silicija trodimenzionalno omeđenih atomima kisika (**Slika 4**). Kromatografski najaktivnije su slobodne silanolne (Si-OH) skupine. Silikagel se koristi kao nepokretna faza u normalno – faznoj kromatografiji (McPolin, 2009).



**Slika 4.** Shematski prikaz strukture površine silikagela (Biologydiscussion, 2016).

U obrnuto – faznoj kromatografiji stacionarnu fazu čine nepolarne alkilne skupine koje su kovalentno vezane na silikagel. Najčešće su to C<sub>18</sub> alkilne skupine (oktadecilsilan), no koriste

se još i C<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>, te C<sub>1</sub> alkilne skupine vezane na silika gel. Polarnost stacionarne faze raste smanjenjem duljine alkilnog lanca (**Slika 5.**) (McPolin, 2009).



**Slika 5.** Struktura oktadecilsilana. (Biotage, 2013)

U obrnuto – faznoj kromatografiji također se koriste nepokretne faze koje sadrže fenilnu i cijano skupinu kovalentno vezanu na silikagel. Izbor nepokretne faze ovisi prvenstveno o fizikalno kemijskim svojstvima analita (McPolin, 2009).

### 1.3.3. Pokretne faze

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti pokretna faza je tekućina koja neprekidno protječe između čestica nepokretne faze noseći sastavnice uzorka. Sastav pokretne faze ovisi o vrsti nepokretne faze, te fizikalno – kemijskim svojstvima analita. Pokretna faza u HPLC-u najčešće je smjesa otapala različite polarnosti. Idealno otapalo karakterizira visoka čistoća, sigurnost u rutinskoj primjeni, prihvatljiva cijena te kompatibilnost s cijelim HPLC sustavom uključujući i detektor (Nigović, 2013).

Pokretnu fazu najčešće čini smjesa otapala različite polarnosti. U kromatografskom postupku može se primijeniti *izokratična elucija* nepromijenjenim sastavom pokretne faze ili *gradijentna elucija* tijekom koje se mijenja sastav pokretne faze. Prije kromatografskog postupka nužno je iz pokretne faze ukloniti otopljene plinove i profiltrirati je, kako bi se odstranile čestice veće od 0,45 mm. (Nigović, 2004)

U obrnuto – faznoj kromatografiji kao pokretna faza koriste se relativno polarna otapala. Najčešće je to voda s dodatkom organskih otapala koje se miješaju s vodom u svim omjerima. Povećavajući omjer organskog otapala postizemo smanjenje vremena zadržavanja analita, zbog toga što je analit najčešće bolje topljiv u organskom otapalu pa će ulaziti u manje interakcija s nepokretnom fazom (McPolin, 2009).

### 1.3.3.1. pH mobilne faze

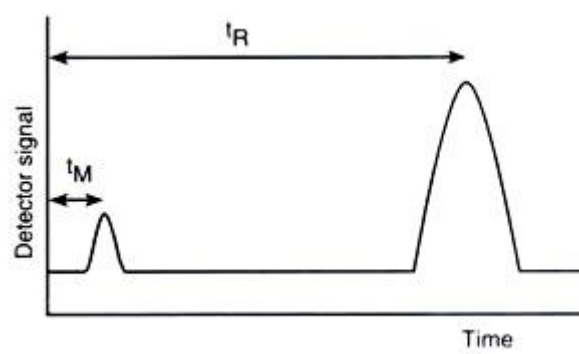
Kiseline i baze vrlo lako se ioniziraju pri promjeni pH. Ako analit od interesa sadrži kiselu ili bazičnu skupinu, pH pokretne faze određivati će da li će analiti biti prisutan u ioniziranom ili neioniziranom obliku prilikom razdjeljivanja. Ionizirani i neionizirani analiti različito stupaju u interakciju s nepokretnom i pokretnom fazom. Ionizirane molekule su hidrofilne, a neionizirane molekule hidrofobne, stoga zaključujemo da će ionizirane molekule manje stupati u interakciju s nepokretnom fazom u obrnuto – faznom HPLC-u. Prilikom povećanja pH vrijednosti kisele grupe postaju ionizirane, dok je kod baza obrnuto; prilikom smanjena pH vrijednosti bazične skupine postaju ionizirane.

$pK_a$  je vrijednost pri kojoj su kisele i bazične skupine u molekuli ionizirane. Male promjene pH oko vrijednosti  $pK_a$  mogu rezultirati velikim promjenama u vremenu zadržavanja analita, stoga je vrlo važno kontrolirati pH ukoliko u uzorku imamo prisutne sastavnice koje ioniziraju.

pH pokretne faze kontroliran je primjenom pufera. Najčešće korišteni puferi u kromatografiji su: fosfatni ( $pK_a$  2,1), citratni ( $pK_a$  3,1), formijatni ( $pK_a$  3,8), acetatni ( $pK_a$  4,8), karbonatni ( $pK_a$  6,4), te trietilamin ( $pK_a$  11,0). Da bi postigli dobru kontrolu, pH pokretne faze treba se razlikovati za  $\pm 1$  od vrijednosti  $pK_a$  pufera.

### 1.3.4. Kromatografski parametri

Prilikom razvoja metode postoji niz kromatografskih parametara koje je potrebno optimirati kao bi postigli zadovoljavajuću djelotvornost i preciznost metode (**Slika 6.**).



**Slika 6.** Kromatogram s istaknutim karakterističnim veličinama (Biologydiscussion, 2016).

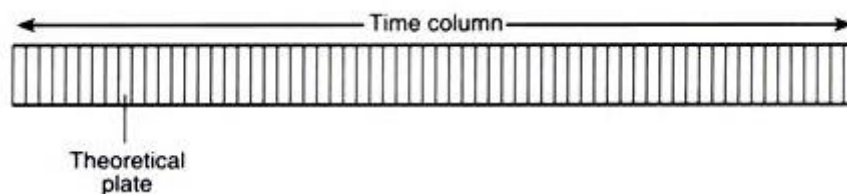
Vrijeme između injektiranja uzorka i odaziva detektora na kraju kolone karakterizirano je vremenom zadržavanja  $t_R$ . Vrijeme koje je potrebno da pokretna faza prođe kroz kolonu naziva se mrtvo vrijeme  $t_M$ .

Faktor kapaciteta  $k'$  često se koristi kako bi opisali brzinu kretanja analita na koloni. Također se naziva i faktor zadržavanja, a definira se kao:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Kada je faktor kapaciteta manji od 1 elucija se odvija prebrzo, dok kada je faktor kapaciteta veći od 20 elucija je prespora. Idealna vrijednost faktora kapaciteta je između 1 i 5.

J. P. Martin i R. L. Synge uveli su pojmove visina tavana i broj tavana radi primjene koncepta pojedinačnih koraka razdiobe na koloni (**Slika 7.**). U svakom tavanu dolazi do uravnoteženja između nepokretne i pokretne faze. Putovanjem analita uzduž kolone dolazi do postupnog prijelaza iz jednog koraka odjeljivanja (tj. uravnotežene pokretne faze) u slijedeći. Broj teorijskih tavana i visina ekvivalentna teorijskom tavanu (engl. *Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP) karakteriziraju efikasnost kolone: uz manji HETP veća je efikasnost kolone i bolja rezolucija. Vrijeme zadržavanja izravno raste s brojem teorijskih tavana  $N$  (Luterotti, 2011).



**Slika 7.** Prikaz teorijskih tavana (Biologysdiscussion, 2016).

Visinu teorijskih tavana može se izraziti kao:

$$HETP = N/L$$

gdje je  $N$  broj teorijskih tavana, a  $L$  duljina kolone.

Broj teorijskih tavana moguće je izraziti kao:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

gdje je  $t_R$  vrijeme zadržavanja tvari na koloni, a  $w_{1/2}$  širina pika na polovici maksimalne visine.

Vrsta uzorka, polarnost i topljivost analita određuju izbor nepokretne faze i kromatografske tehnike. Prikladan izbor nepokretne faze i polarnosti otapala za određeni uzorak osigurava dobru djelotvornost kolone koja se izražava brojem teorijskih tavana.

Ostali parametri koji određuju djelotvornost kolone i dobro odjeljivanje sastojaka uzorka su koeficijent selektivnosti i razlučivanje. Koeficijent selektivnosti ili relativno zadržavanje kolone za dva sastojka smjese moguće je izraziti kao:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Razlučivanje kolone je kvantitativna mjera kojom se izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka na koloni, a definira se izrazom:

$$R_s = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{1/2}1 + w_{1/2}2}$$

Razlučivanje veće od 1,5 odgovara odjeljivanju dvaju susjednih pikova na baznoj liniji. Pri razlučivanju od 1,5 preklapanje susjednih pikova iznosi svega 0,3% (Nigović, 2004).

#### **1.4. Validacija analitičkih postupaka**

Validacijom analitičkog postupka se utvrđuje i dokumentira prikladnost ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. Validacija analitičkog postupka osigurava da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti valjani rezultati.

*Međunarodna konferencija o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutika primijenjenih na ljudima* (engl. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) donosi dokumente koji daju smjernice za validaciju analitičkih postupaka.

Prema regulatornim zahtjevima *Dobre proizvođačke prakse* (engl. *Good Manufacturing Praxis*, GMP) i *Dobre laboratorijske prakse* (engl. *Good Laboratory Praxis*, GLP) postupci validacije analitičkih postupaka postali su obveza. Validaciju treba provesti pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode, kao i pri promjeni bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode.



Analitičke značajke koje se određuju u postupku validacije su: preciznost, specifičnost/selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i radno područje, točnost i izdržljivost (otpornost). Koji parametri će se ispitivati u postupku validacije, ovisit će o primjeni analitičke metode. Analitički postupak se razvija i validira sve dok validacijski parametri ne zadovolje zahtjeve predviđene određenim propisima. Na temelju usporedbe dobivenih rezultata s postavljenim kriterijima donosi se odluka o prihvaćanju analitičke metode ili nastavku njezinog razvoja. Analitički postupak treba detaljno opisati kako bi ga svaki analitičar mogao ponoviti. Opis analitičkog postupka uključuje pripremu uzorka, poredbenih tvari i reagensa, opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize, kao i primjenu formula za izračunavanje rezultata analize. (Nigović, 2004)

Pristup validaciji sastoji se od definiranja problema i plana rada, mjerenja i obrade podataka te izrade dokumentacije koja se sastoji od standardnih operativnih postupaka te izvješća o eksperimentima i rezultatima validacije.

#### **1.4.1. Analitičke značajke postupka validacije**

**Točnost** (engl. *Accuracy*) pokazuje slaganje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Provodi se analizom uzoraka poznate koncentracije te usporedbom izmjerenih i stvarnih vrijednosti koncentracije analita. Potrebna su najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Izražava se kao analitički prinos (engl. *recovery*).

**Preciznost** (engl. *Precision*) pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Provodi se 5-6 određivanja na 2-3 različite koncentracije. Izražava se kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Granice prihvatljivosti za RSD vrijednosti ovise o tipu analize i koncentraciji analita.

Preciznost se iskazuje kao:

1. Ponovljivost (engl. *Repeatability*) – podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom, pri istim uvjetima.

2. Središnja preciznost (engl. *Intermediate precision*) – odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka, istom metodom pri različitim uvjetima u istom laboratoriju.
3. Obnovljivost ili reproducibilnost (engl. *Reproducibility*) – podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem nekoliko istih uzoraka, istom metodom u različitim laboratorijima.

### **Specifičnost/selektivnost**

Specifičnost je sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje jedan analit od ostalih sastavnica uzorka. Selektivnost je mogućnost metode da može točno odrediti željeni analiti u prisutnosti ostalih sastavnica uzorka.

**Granica dokazivanja** (engl. *Limit of Detection, LOD*) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće dokazati, ali ne i odrediti, pri zadanim uvjetima metode.

**Granica određivanja** (engl. *Limit of Quantitation, LOQ*) je najniža koncentracija analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.

Postoji više načina određivanja LOD i LOQ vrijednosti, a jedan od njih je primjenom razrjeđenih ispitivanih otopina.

### **Linearnost (linearity) i radno područje (range)**

Linearnost je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Provodi se analizom serije uzoraka s različitim koncentracijama analita. Potrebna su najmanje 3 određivanja na najmanje 5 koncentracija, nakon čega se izradi kalibracijska krivulja koja prikazuje ovisnost signala o koncentraciji analita. Nagib regresijskog pravca  $k$ , mora biti veći od 0,999.

Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracije analita unutar kojega analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost. Preporučeno radno područje za određivanje sadržaja aktivne tvari je 80-120%.

**Otpornost** (engl. *Robusstnes*) je mjera sposobnosti analitičkog postupka da ostane nepromjenjen pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Procjenjuje se variranjem jednog faktora dok svi ostali ostaju nepromijenjeni (Nigović, 2013).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Jadran Galenski laboratorij u svom portfelju ima više proizvoda koji u svom sastavu imaju benzalkonij klorid kao konzervans. Ovim radom obuhvaćeno je osam proizvoda: Bimanox kapi za oko, Dorzol kapi za oko, Glaumax kapi za oko, Latanox kapi za oko, Nazol N 0,05 i 0,1% kapi za nos, Olopax kapi za oko, Holyplant Septogal bez šećera, pastile, te Timalen 0,25 i 0,5% kapi za oko. Za svaki od navedenih proizvoda sadržaj benzalkonij klorida određuje se drukčijom analitičkom metodom. Cilj ovog diplomskog rada je razvoj i validacija jedinstvene metode tekućinske kromatografije koja bi bila prikladna za analizu sadržaja benzalkonij klorida u svim navedenim proizvodima, u svrhu optimizacije troškova i vremena analize.

Pretraživanjem literature doznajemo kako najčešće korištene HPLC kolone prilikom određivanja sadržaja benzalkonij klorida sadrže obrnuto-faznu cijano (CN) nepokretnu fazu. Problem kod korištenja takvih kolona su velike razlike u vremenu zadržavanja komponenti korištenjem dviju istih kolona različitih serijskih brojeva. Ova promjena u vremenu zadržavanja može biti problematična za rutinske analize kontrole kvalitete jer je vrijeme zadržavanja često jedno od kritičnih parametara prikladnosti korištenja metode. Iz tog razloga, u razvoj metode krenulo se C18 kolonom.

Benzalkonij klorid je kvaterna amonijeva sol čiji  $pK_a$  iznosi 19,48 u čitavom području pH te u teoriji nije ovisan o promjenama pH vrijednosti. Stoga ćemo kao sastavnicu pokretne faze, umjesto pufera, ispitati vodu za kromatografiju.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Reagensi**

- Kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Merck, Damstadt, Njemačka
- Voda za kromatografiju R, Aqua solutions, Middleborough, SAD
- Fosfatna kiselina R, Carlo Erba Reagens, Milano, Italija
- Acetonitril za kromatografiju R, J.T.Baker, Avantor, Center Valley, SAD
- Vodikov peroksid otopina R (30%), Carlo Erba Reagens, Milano, Italija

#### **3.2. Uzorci**

- Brimonidin tartarat 2 mg/ml, kapi za oko, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Latanoprost 0,005 %, kapi za oko, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Ksilometazolin hidroklorid 0,05 %, kapi za nos, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Septogal bez šećera pastile, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Timolol 0,25 %, kapi za oko, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska

#### **3.3. Placebo uzorci**

- Brimonidin tartarat 2 mg/ml, kapi za oko, placebo pripravak bez benzalkonij klorida, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko, placebo pripravak bez benzalkonij klorida, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska

- Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko, placebo pripravak bez benzalkonij klorida, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Latanoprost 0,005 %, kapi za oko, placebo pripravak bez benzalkonij klorida i latanoprost, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Ksilometazolin hidroklorid 0,05 %, kapi za nos, placebo pripravak bez benzalkonij klorida, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko, placebo pripravak bez benzalkonij klorida, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Septogal bez šećera, pastile, placebo pripravak bez benzalkonij klorida Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska
- Timolol 0,25 %, kapi za oko, placebo pripravak bez benzalkonij klorida Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska

### **3.4. Poredbene supstancije**

- Benzalkonij klorid, radni standard, deklarirani sadržaj 97,1%, lot. RRST-007/14
- Latanoprost, radni standard, deklarirani sadržaj 101,0%, lot. WS0075501

### **3.5. Aparatura**

- Tekućinski kromatograf s PDA detektorom, Agilent 1290 Infinity series, Hewlett Packard, Njemačka
- Analitička vaga XS4002S/A, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- Analitička vaga MX5/A, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- Analitička vaga XP205DR/A, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- pH metar SevenMulti S47-K, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- Sustav za pročišćavanje vode, Aqua solutions, Middleborough, SAD
- Kolona Symmetry Shield RP18 150 x 4.6 mm, 5 µm, RA-K-C18-36, Waters, Wilmslow, Velika Britanija

- Kolona Symmetry Shield RP18 150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, RA-K-C18-36(2), Waters, Wilmslow, Velika Britanija

## 3.6. Priprema otopina

### 3.6.1. Priprema otapala

Kao otapalo korištena je pokretna faza A.

### 3.6.2. Fosfatni pufer pH 3,0 (0,01 M) za pripremu mobilne faze

U odmjernu tikvicu od 1000 ml odvagane se 1,36 g kalij dihidrogen fosfata R ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), otopi u vodi za kromatografiju R, te razrijedi do oznake istim otapalom. pH fosfatnog pufera podesi se na  $3,0 \pm 0,05$  fosfatnom kiselinom R. Pripremljeni pufer profiltrira se kroz membranski RC filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.3. Poredbena otopina

U posudicu za vaganje odvagane se 12,5 mg *poredbene supstancije*, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 ml, otopi u *otapalu* te dopuni do oznake istim otapalom.

1,0 ml te otopine razrijedi se do 10,0 ml *otapalom* i dobro promućka.

### 3.6.4. Osnovna otopina benzalkonij klorida (0,25 mg/ml)

U posudicu za vaganje odvagane se 12,5 mg *poredbene supstancije*, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 ml, otopi u *otapalu* te dopuni do oznake istim otapalom.

### 3.6.5. Otopine uzoraka

#### *Brimonidin tartarat 2 mg/ml, kapi za oko*

U Erlenmayerovu tikvicu s ubrušenim čepom udruži se sadržaj 2 spremnika očnih kapi i dobro promućka. U odmjernu tikvicu od 10 ml pipetira se 5,0 ml udruženog uzorka, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

#### *Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko*

U Erlenmayerovu tikvicu s ubrušenim čepom udruži se sadržaj 2 spremnika očnih kapi i dobro promućka. U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 7,0 ml udruženog uzorka, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.



***Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko***

U Erlenmayerovu tikvicu s ubrušenim čepom udruži se sadržaj 2 spremnika očnih kapi i dobro promućka. U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 7,0 ml udruženog uzorka, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Latanoprost 0,005 %, kapi za oko***

Uzorak se prenese u Erlenmayerovu tikvicu s ubrušenim čepom. U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2.0 ml uzorka, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Ksilometazolin hidroklorid 0,05 %, kapi za nos***

Uzorak se prenese u Erlenmayerovu tikvicu s ubrušenim čepom. U odmjernu tikvicu od 50 ml pipetira se 5,0 ml uzorka, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko***

U Erlenmayerovu tikvicu s ubrušenim čepom udruži se sadržaj 2 spremnika očnih kapi i dobro promućka. U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 5,0 ml udruženog uzorka, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Septogal bez šećera, pastile***

Odredi se prosječna masa pastila (n=20). Pastile se smrve u fini prah te homogeno izmješaju. U odmjernu tikvicu od 20 ml odvagane se 1 g praha, doda 10 ml *otapala* i postavi u ultrazvučnu kupelj 10 minuta. Tikvica se ohladi na sobnu temperaturu i dopuni *otapalom* do oznake. Dio suspenzije se filtrira kroz filter PTFE veličine pora 0,45 µm. Prvih par mililitara filtrata se odbaci.

***Timolol 0.25 %, kapi za oko***

U Erlenmayerovu tikvicu s ubrušenim čepom udruži se sadržaj 2 spremnika očnih kapi i dobro promućka. U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 5,0 ml udruženog uzorka, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

### **3.6.6. Otopine placebo**

#### ***Brimonidin tartarat 2 mg/ml, kapi za oko, otopina placebo***

5,0 ml placebo razrijedi se otapalom do 10,0 ml i dobro promućka.

#### ***Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko, otopina placebo***

7,0 ml placebo razrijedi se otapalom do 20,0 ml i dobro promućka.

#### ***Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko, otopina placebo***

7,0 ml placebo razrijedi se otapalom do 20,0 ml i dobro promućka.

#### ***Placebo Latanoprost 0,005 %, kapi za oko,***

U posudicu za vaganje odvagane se 7,878 mg *standarda latanoprosta* i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 150 ml te nadopuni placebom latanoprosta do oznake.

#### ***Latanoprost 0,005 %, kapi za oko, otopina placebo***

2,0 ml placebo razrijedi se otapalom do 20,0 ml i dobro promućka.

#### ***Ksilometazolin hidroklorid 0,05 %, kapi za nos, otopina placebo***

5,0 ml placebo razrijedi se otapalom do 50,0 ml i dobro promućka.

#### ***Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko, otopina placebo***

5,0 ml placebo razrijedi se otapalom do 20,0 ml i dobro promućka.

#### ***Septogal bez šećera pastile, otopina placebo***

Odredi se prosječna masa pastila (n=20). Pastile se smrve u fini prah te homogeno promiješaju. Odvagane se 1 g praha u tikvicu od 20 ml, doda 10 ml otapala i postavi u ultrazvučnu kupelj 10 minuta. Tikvica se ohladi na sobnu temperaturu i dopuni otapalom do oznake. Dio suspenzije se filtrira kroz filter veličine pora 0,45 µm. Prvih par mililitara filtrata se odbaci.

#### ***Timolol maleat 0,25 %, kapi za oko, otopina placebo***

5,0 ml placebo razrijedi se otapalom do 20,0 ml i dobro promućka.

### 3.6.7. Radne otopine za linearnost (50, 75, 100, 125 i 150 %)

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida*.

Pripreme se po 3 *radne otopine za linearnost* za svaku koncentraciju, svaka iz jedne od triju *osnovnih otopina benzalkonij klorida* (**Tablica 1.**).

**Tablica 1:** Koncentracije otopina za ispitivanje linearnosti.

<b>Koncentracija (%, mg/ml)</b>	<b>volumen <i>osnovne otopine benzalkonij klorida</i> (ml)</b>
<b>50%</b> (0,0125 mg/ml)	1,0
<b>75%</b> (0,01875 mg/ml)	1,5
<b>100%</b> (0,025 mg/ml)	2,0
<b>125%</b> (0,03125 mg/ml)	2,5
<b>150%</b> (0,0375 mg/ml)	3,0

### 3.6.8. Radne otopine za točnost (50, 100 i 150%) za svaki proizvod

Napomena: za svaki proizvod pripreme se po 3 *radne otopine za točnost* za svaku koncentraciju, svaka iz jedne od triju *osnovnih otopina benzalkonij klorida* (**Tablica 2.**).

**Tablica 2:** Koncentracije otopina za ispitivanje točnosti.

<b>Koncentracija (%, mg/ml)</b>	<b>volumen <i>osnovne otopine benzalkonij klorida</i> (ml)</b>
<b>50%</b> (0,0125 mg/ml)	1,0
<b>100%</b> (0,025 mg/ml)	2,0
<b>150%</b> (0,0375 mg/ml)	3,0

***Brimonidin tartarat 2 mg/ml, kapi za oko***

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 10,0 ml *placeba brimonidina*, doda se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida*, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko***

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 7,0 ml *placeba dorzolamida*, doda se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida*, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko***

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 7,0 ml *placeba dorzolamida i timolola*, doda se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida*, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Latanoprost 0,005 %, kapi za oko***

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2,0 ml *placeba Latanoxa*, doda se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida*, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Ksilometazolin hidroklorid 0,05 %, kapi za nos***

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2,0 ml *placeba ksilometazolina*, doda se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida*, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko***

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 5,0 ml *placeba Olopatadina*, doda se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida*, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

***Septogal bez šećera pastile***

Odvagne se 1 g praha *placeba Septogala* u tikvicu od 20 ml, doda se zadani volumen *osnovne otopine benzalkonij klorida* i oko 10 ml *otapala* te postavi u ultrazvučnu kupelj 10 minuta. Tikvica se ohladi na sobnu temperaturu i dopuni *otapalom* do oznake. Dio suspenzije filtrira se kroz filter veličine pora 0,45 µm. Prvih par mililitara filtrata se odbaci.

***Timolol maleat 0,25 %, kapi za oko***

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 5,0 ml *placeba timolola*, doda se zadani volumen osnovne otopine benzalkonij klorida, razrijedi do oznake *otapalom* i dobro promućka.

### 3.7. Kromatografska analiza

#### Pokretna faza:

Pokretna faza razvijene metode sastoji se od pokretne faze A i pokretne faze B čiji se omjer mijenja tijekom analize prema zadanom gradijentu prikazanom u **Tablici 3**. Pokretna faza A sadrži fosfatni pufer pH 3,0 te acetonitril za kromatografiju R u omjeru 52:48, dok pokretna faza B sadrži fosfatni pufer pH 3,0 te acetonitril za kromatografiju R u omjeru 42:58.

**Tablica 3:** Gradijent mobilne faze.

Vrijeme (min)	0	10	12	12,1	16
A (V/V %)	100	0	0	100	100
B (V/V %)	0	100	100	0	0

#### LC uvjeti rada:

Pumpa: Agilent

Protok mobilne faze: 0,6 ml/min

Vakuumski degazer: on line Agilent

Injektor: automatski Agilent

Volumen injektiranja: 10  $\mu$ l

Kolona: Waters Symmetry Shield RP18 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m (ili druga odgovarajuća kolona punjena oktadecilsilan stacionarnom fazom koja odgovara testu prikladnosti kromatografskog sustava)

Temperatura kolone: 35 °C

Vrijeme kromatografiranja: 16 minuta

Detektor: DAD detektor,  $\lambda$  = 208 nm

## **3.8. Validacija metode**

Validacija metode ispitana je kroz sljedeće parametre: selektivnost, pouzdanost (preciznost sistema, ponovljivost metode, središnja preciznost), točnost, linearnost, područje rada te otpornost (stabilnost mjernih otopina, manje promjene uvjeta metode).

Ispitivanja su provedena na svih 8 proizvoda.

### **3.8.1. Selektivnost**

Pripremljene su i injektirane sljedeće otopine: otapalo, poredbena otopina, otopina placeba svakog pojedinačnog proizvoda te otopina uzorka svakog pojedinačnog proizvoda.

Snimljen je UV spektar u području 200-300 nm za sve analizirane otopine.

#### **3.8.1.1. Potaknuta razgradnja (stres test)**

Pripremljene su i injektirane sljedeće otopine za svaki proizvod pojedinačno: poredbena otopina, otopina uzorka i otopina placeba koje su netretirane, otopina uzorka i otopina placeba tretirane UV/VIS zračenjem tijekom 6 dana, otopina uzorka i otopina placeba tretirane zagrijavanjem na 70 °C tijekom 6 dana te otopina uzorka i otopina placeba tretirane vodikovim peroksidom tijekom 24 h.

Snimljen je UV spektar u području 200-300 nm za sve analizirane otopine.

### **3.8.2. Pouzdanost**

#### **3.8.2.1. Preciznost sistema**

Pripremljene su 2 poredbene otopine. Prva priprema injektirana je 6 puta, a druga 2 puta.

#### **3.8.2.2. Ponovljivost metode**

Pripremljene su 2 poredbene otopine. Prva priprema injektirana je 6 puta, a druga 2 puta. Pripremljene su i injektirane otopine uzorka za svaki proizvod pojedinačno.

### **3.8.3. Točnost**

Pripremljena je i injektirana poredbena otopina (2 pripreme). Pripremljene su 3 osnovne otopine te je iz svake osnovne otopine pripremljen set koncentracija (50, 100 i 150%). Svaka je otopina injektirana 2 puta.

### **3.8.4. Linearnost**

Pripremljena je i injektirana poredbena otopina (2 pripreme). Pripremljene su 3 osnovne otopine te je iz svake osnovne otopine pripremljen set koncentracija (50, 75, 100, 125, 150%). Svaka je otopina injektirana 2 puta.

### **3.8.5. Otpornost**

#### **3.8.5.1. Stabilnost mjernih otopina**

Pripremljena je poredbena otopina te otopine uzoraka koje su odmah potom injektirane. Otopine su zatim podijeljene u dva dijela te je jedan dio pohranjen na sobnoj temperaturi (15-25 °C), a drugi dio u hladnjaku (4-8 °C). Otopine su injektirane nakon ~12 h, ~24 h, ~48 h te ~72 h.

#### **3.8.5.2. Manje promjene uvjeta metode**

Pripremljene su poredbena otopina i otopine uzoraka te su injektirane pod standardnim uvjetima. Zatim su injektirane prema promijenjenim uvjetima, a to su: promjena koncentracije pufera ( $\pm 5\%$ ), promjena sastava pokretne faze B ( $\pm 2\%$  acetonitrila za kromatografiju R) te promjena kolone drugog serijskog broja.

U **Tablici 4.** prikazani su parametri validacije i granice prihvatljivosti koje razvijena metoda mora zadovoljavati da bi bila validirana.



**Tablica 4:** Parametri validacije i granice prihvatljivosti.

<b>Parametar</b>	<b>Granica prihvatljivosti</b>
<p>1. Selektivnost</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- otapalo</li> <li>- otopina placeba</li> <li>- poredbena otopina</li> <li>- otopine uzoraka</li> </ul>	<p>1. Informacija</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- placebo i otapalo nemaju utjecaja na glavne signale, odnosno spektre</li> <li>- razlučivanje između pikova benzalkonij klorida i ostalih pikova u otopini uzorka <math>\geq 1,5</math></li> </ul>
<p>1.1. Potaknuta razgradnja (stres test)</p> <p>1.1.1. UV/VIS zračenje</p> <p>1.1.2. Zagrijavanje</p> <p>1.1.3. Oksidacija</p>	<p>1.1. Informacija</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- placebo i otapalo nemaju utjecaja na glavne signale, odnosno spektre</li> <li>- vidljivi dodatni pikovi na kromatogramima tretiranih uzoraka i placeba u odnosu na kromatograme netretiranih uzoraka i placebo nemaju utjecaj na ispitivane signale, odnosno spektre</li> </ul>
<p>2. Pouzdanost</p> <p>2.1. Preciznost sistema</p> <p>2.2. Ponovljivost metode</p>	<p>2.1. RSD: <math>\leq 2,0 \%</math></p> <p>2.2. RSD: <math>\leq 3,0 \%</math></p>
<p>3. Točnost</p>	<p>Povrat: 95,0 – 105,0 %</p> <p>RSD: <math>\leq 3,0 \%</math></p>
<p>4. Linearnost</p>	<p>Koeficijent korelacije (r): <math>\geq 0,99</math></p> <p>% y: <math>\leq 2,0 \%</math></p>
<p>5. Područje rada</p>	<p>Informacija</p>
<p>6. Otpornost</p> <p>6.1. Stabilnost mjernih otopina</p> <p>6.2. Manje promjene uvjeta metode</p>	<p>6.1.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- relativno odstupanje površine pika u otopini ispitanoj u vremenu <math>t</math> u odnosu na površinu pika u otopini ispitanoj odmah nakon pripreme: <math>\leq 2,0 \%</math></li> <li>- u odnosu na kromatogram dobiven u vremenu <math>t=0</math> nema dodatnih pikova</li> </ul> <p>6.2. Zadovoljeni zahtjevi za prikladnost sustava</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- relativna standardna devijacija određena na ponovljenim iniciranjima <i>poredbene otopine</i> (<math>n=6</math>) (izraženo na zbroju površina pikova <math>C_{12}</math> i <math>C_{14}</math>): <math>\leq 2,0 \%</math></li> <li>- faktor simetrije pikova <math>C_{12}</math> i <math>C_{14}</math>: <math>&lt; 2,0</math></li> <li>- broj teoretskih tavana za kolonu izražen na pikovima <math>C_{12}</math> i <math>C_{14}</math>: <math>\geq 2000</math></li> </ul>

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Tijek razvoja metode

#### 4.1.1. Postavljanje metode

Razvoj je započet prema uvjetima metode za određivanje sadržaja benzalkonij klorida u Timalen kapima za oko: Kolona Waters Symmetry Shield RP18 250 x 4,6 mm, 5 µm, protok: 1 ml/min, temperature kolone: 25 °C, gradijent 1, volumen injektiranja: 40 µl.

#### 4.1.2. Odabir kolone

Odabrana je kolona Waters Symmetry Shield RP18 150 x 4,6 mm, 5 µm te je prema duljini kolone korigiran protok pokretne faze koji iznosi 0,6 ml/min

#### 4.1.3. Odabir gradijenta pokretne faze

Isprobani su različiti gradijenti te izokratna metoda kako bi dobili odgovarajuće razlučivanje za pikove u uzorcima. Naposljetku je odabran gradijent 1 (**Tablica 5**) kojim su uspješno razdvojeni svi pikovi u uzorcima od pikova C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub> frakcija benzalkonij klorida.

Posebice su bili problematični uzorci latanoprosta i septogala. (**Slika 8**). Rezultati tijekom razvoja metode su prikazani u **Tablici 6**.

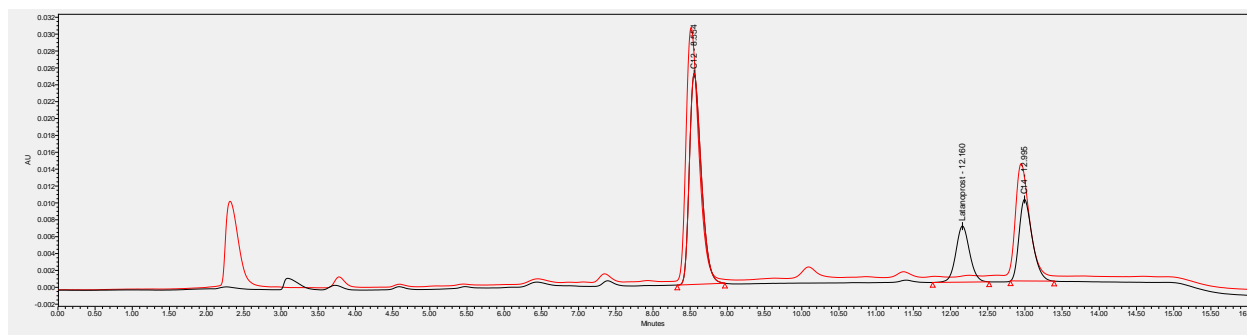
#### Gradijent 1:

Pokretna faza A: fosfatni pufer pH 3.0

Pokretna faza B: acetonitril za kromatografiju R

**Tablica 5:** Gradijent 1.

Vrijeme (min)	0	10	12	12,1	16
B (%)	48	58	58	48	48



**Slika 8:** Kromatogrami septogala i latanoprosta dobiveni gradijentom 1 kada su sastavnice PF pomiješane u bocama: septogal (crveno), latanoprost (crno).

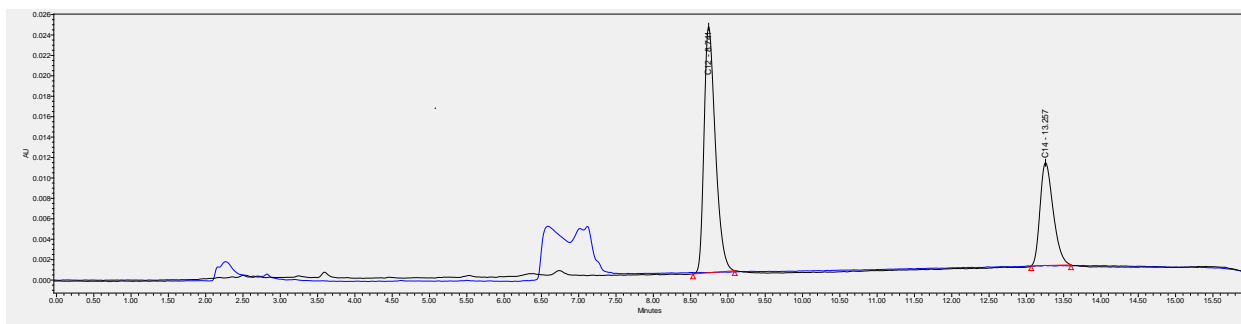
**Tablica 6:** Tijek razvoja metode.

Kolona	Protok	T <sub>kolone</sub>	Mobilna faza Fosfatni pufer pH 3.0 : ACN	Volumen injektiranja	Razlučivanje Septogal (pik C14 i pik jedne od ostalih sastavnica)	Razlučivanje Latanoprost (pik C14 i pik latanoprosta)
Waters Symmetry Shield RP18 250 x 4,6 mm, 5 µm RA-K-C18-5(4)	1 ml/min	25 °C	Gradijent 1	40 µl	/ <sup>1</sup>	/
			Gradijent 1		1,49	3,08
			Gradijent 2		0,94	/
			Gradijent 3		1,04	/
			Gradijent 4		nema pika jedne od sastavnice septogala	/
Waters Symmetry Shield RP18 150 x 4,6 mm, 5 µm RA-K-C18- 36(2)	1 ml/min	35 °C	Izokratno	10 µl	nema pika jedne od sastavnica septogala	nema pika latanoprosta
			Izokratno		nema pika jedne o sastavnica septogala	nema pika latanoprosta
			Gradijent 5		nema pika jedne od sastavnica septogala	0,91
			Gradijent 6		nema pika jedne od sastavnica septogala	nema pika latanoprosta
			Gradijent 1		nema pika jedne od sastavnica septogala	1,57
	0.6 ml/min		Gradijent 7		nema pika jedne od sastavnica septogala	1,40
			Gradijent 8		/	preklopljeni
			Gradijent 9		/	preklopljeni
			Gradijent 10		/	preklopljeni
			Gradijent 11		/	preklopljeni
Waters Symmetry Shield RP18 150 x 4.6 mm, 5 µm RA-K-C18-36			Gradijent 12		/	preklopljeni
			Gradijent 1		/	preklopljeni
			Gradijent 1		/	2,60
			Gradijent 1 pomješano u bocama		nema pika jedne od sastavnica septogala	2,93
			Gradijent 1 voda		nema pikova	nema pikova

#### 4.1.4. Voda umjesto pufera u pokretnoj fazi

Benzalkonij klorid je kvaterna amonijeva sol, log D iznosi -1,40 u cijelom području pH.  $pK_a$  iznosi 19,48 te u teoriji nije ovisan o promjenama pH vrijednosti. Stoga je isprobana voda kao mobilna faza A, no pikovi benzalkonij klorida nisu bili vidljivi, odnosno razvučeni su na baznoj liniji (**Slika 9**).

<sup>1</sup> Uzorak nije analiziran pod tim uvjetima



**Slika 9:** Kromatogram poredbene otopine analizirane mobilnom fazom koja sadrži fosfatni pufer i acetonitril (crno) i mobilnom fazom koja sadrži vodu umjesto fosfatnog pufera i acetonitrila (plavo).

Prema kromatogramima na **Slici 9**, moguće je zaključiti kako se benzalkonij klorid bolje zadržava na koloni u prisustvu fosfatnog pufera pH 3,0 te korištenje vode kao sastavnice pokretne faze ne bi bilo prikladno.

#### 4.1.5. Usporedba pokretne faze pripremljene u odvojenim bocama i pokretne faze pomiješane u bocama

Isprobana je analiza kada su sastavnice mobilne faze odvojene u posebnim bocama, te kada su sastavnice pomiješane u bocama (**Tablice 7. i 8.**):

##### Gradijent 1:

Pokretna faza A: fosfatni pufer pH 3,0

Pokretna faza B: acetonitril za kromatografiju R

**Tablica 7:** Gradijent 1.

<b>Vrijeme (min)</b>	0	10	12	12,1	16
<b>B (%)</b>	48	58	58	48	48

##### Gradijent 1 (sastavnice pomiješane u bocama):

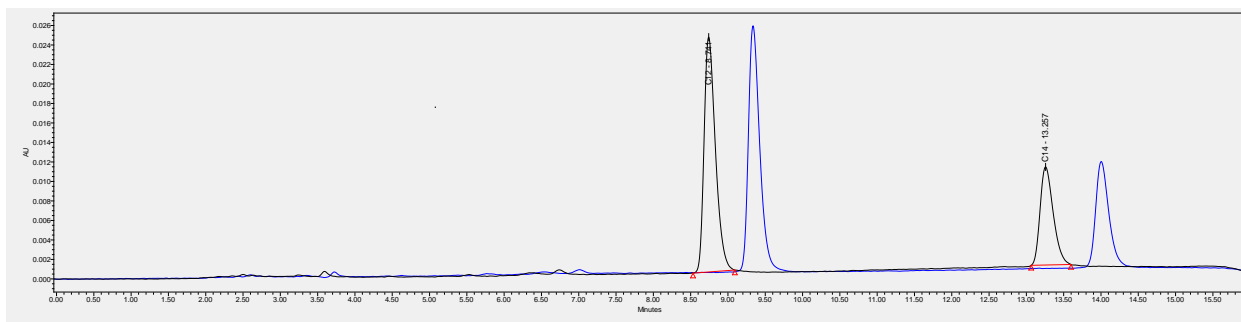
Pokretna faza A: fosfatni pufer pH 3,0 : acetonitril za kromatografiju R = 52 : 48

Pokretna faza B: fosfatni pufer pH 3,0 : acetonitril za kromatografiju R = 42 : 58

**Tablica 8:** Gradijent 1 – sastavnice pomiješane u bocama.

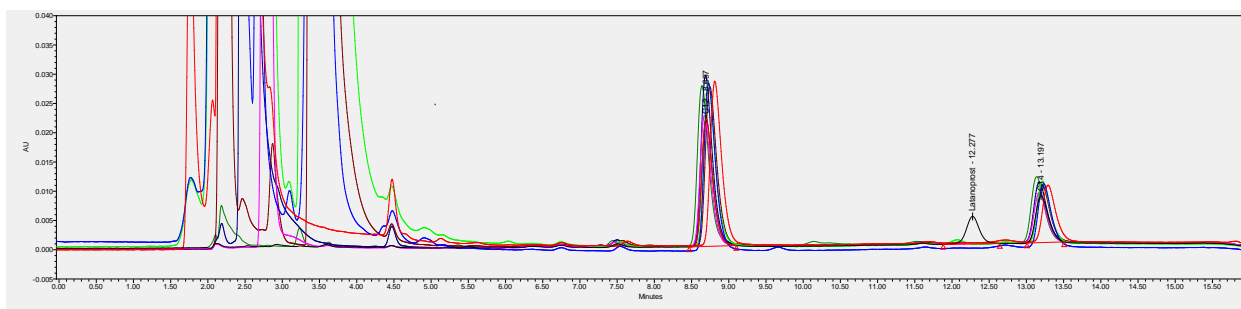
<b>Vrijeme (min)</b>	0	10	12	12,1	16
<b>A (%)</b>	100	0	0	100	100
<b>B (%)</b>	0	100	100	0	0

Na **Slici 10.** vidimo kako je kromatogram dobiven kada su pokretne faze pomiješane u bocama malo pomaknut u odnosu na onaj dobiven kada su pokretne faze pripravljene u odvojenim bocama, no to ne utječe na učinkovitost analize.



**Slika 10:** Kromatogrami poredbene otopine analizirane PF odvojene u bocama (plavo) i MF pomiješane u bocama (crno).

Na **Slici 11.** prikazani su preklapljeni kromatogrami svih uzoraka. Vidljivo je da su pikovi  $C_{12}$  i  $C_{14}$  frakcije benzalkonij klorida preklapljeni, te da su razdvojeni od pikova ostalih sastavnica uzoraka.

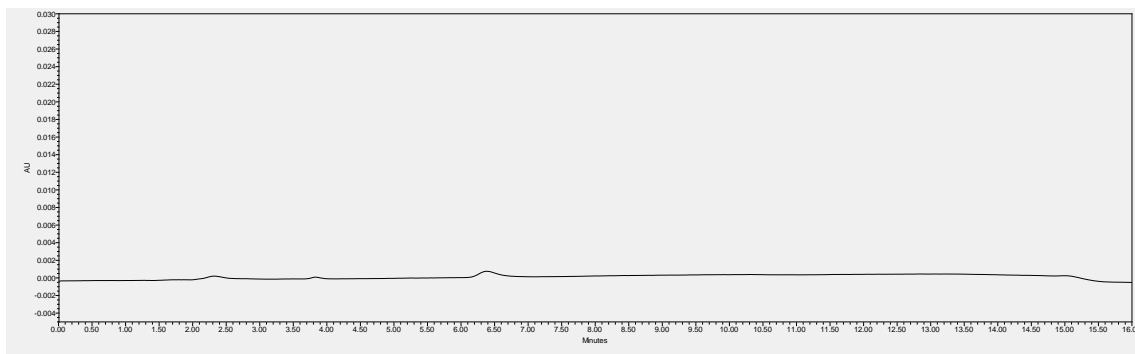


**Slika 11:** Preklapljeni kromatogrami svih uzoraka analizirani PF pomiješanom u bocama.

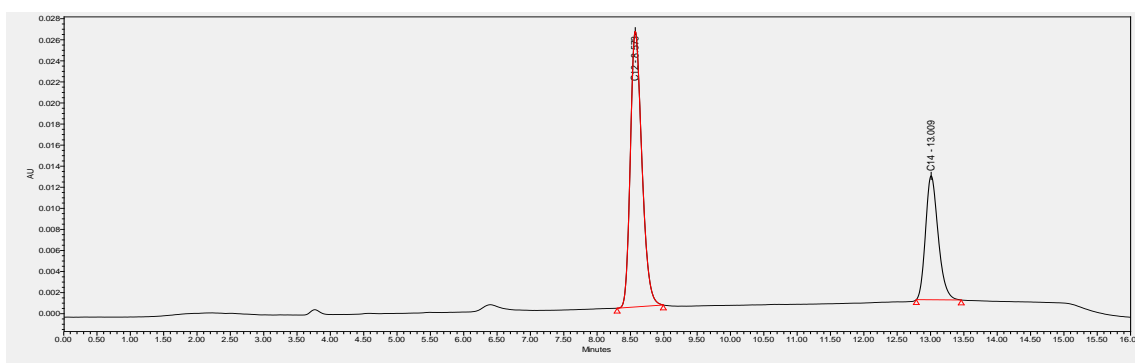
## 4.2. Validacija metode

### 4.2.1. Selektivnost

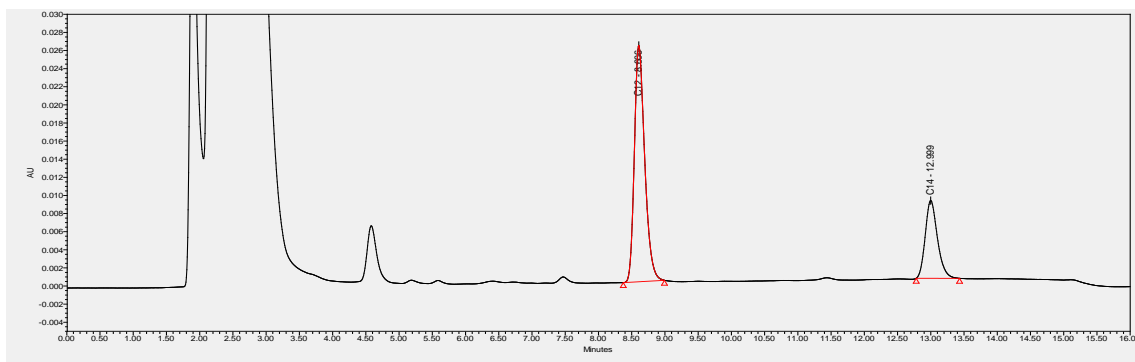
Selektivnost je ispitana injektiranjem poredbene otopine, otopina uzoraka i otopina placeba. Promatrano je vrijeme zadržavanja pojedinih pikova, razlučivanje pikova benzalkonij klorida te razlučivanje pikova benzalkonij klorida i drugih sastavnica u uzorku. Kromatogrami su prikazani na **Slikama 12-29**.



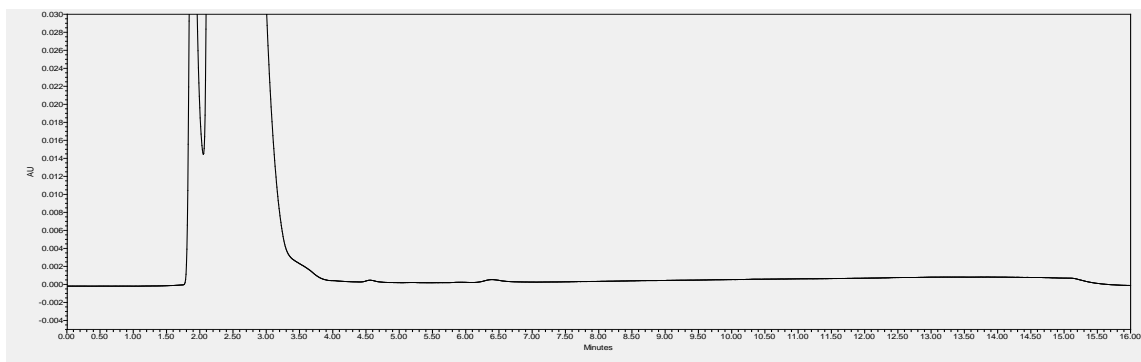
Slika 12: Kromatogram otopala.



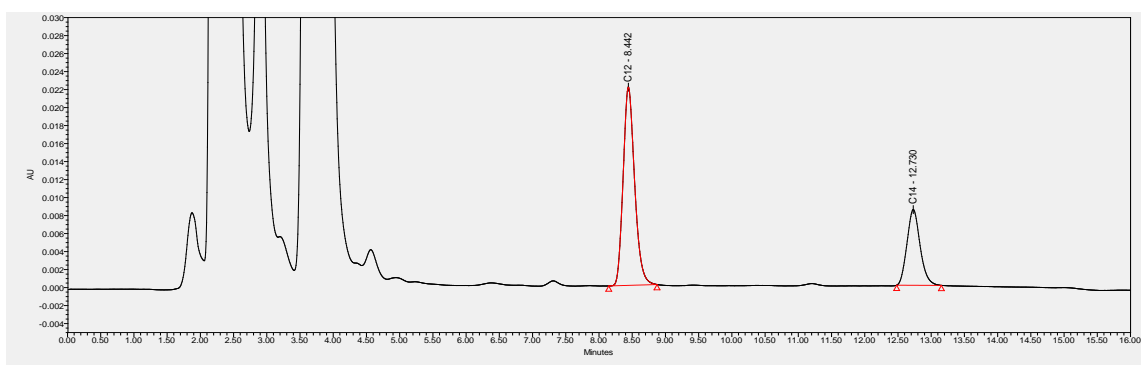
Slika 13: Kromatogram poredbene otopine.



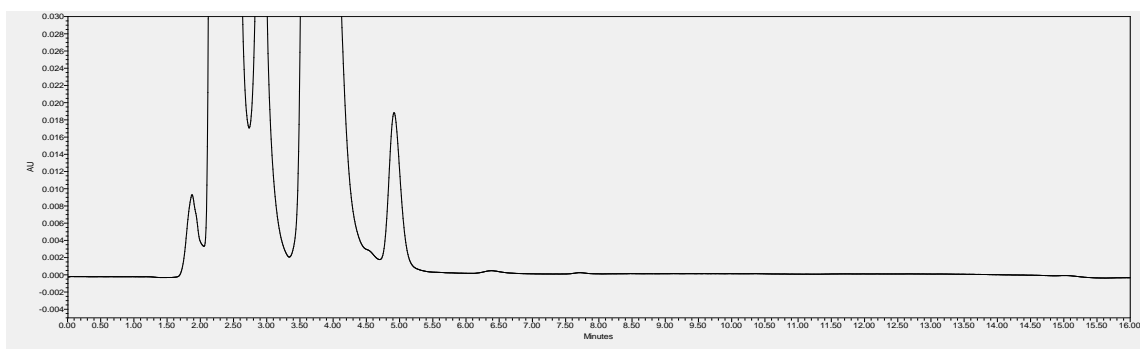
Slika 14: Kromatogram otopine uzorka Brimonidin 2 mg/ml, kapi za oko.



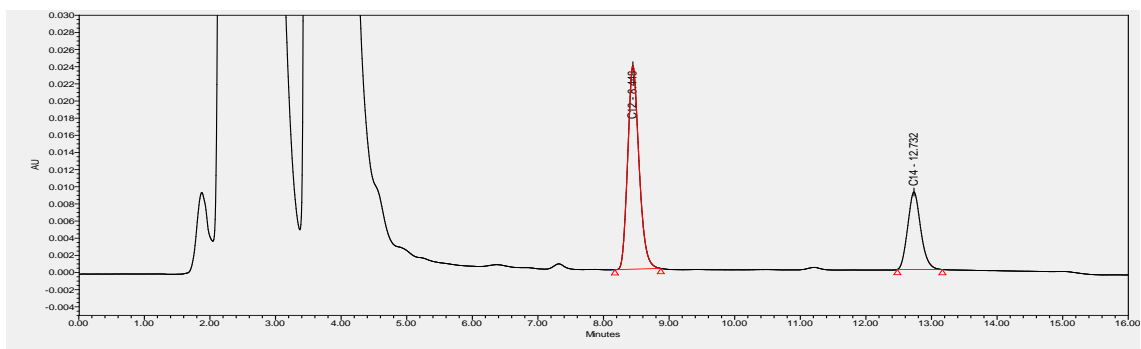
**Slika 15:** Kromatogram otopine placeba *Brimonidin 2 mg/ml, kapi za oko.*



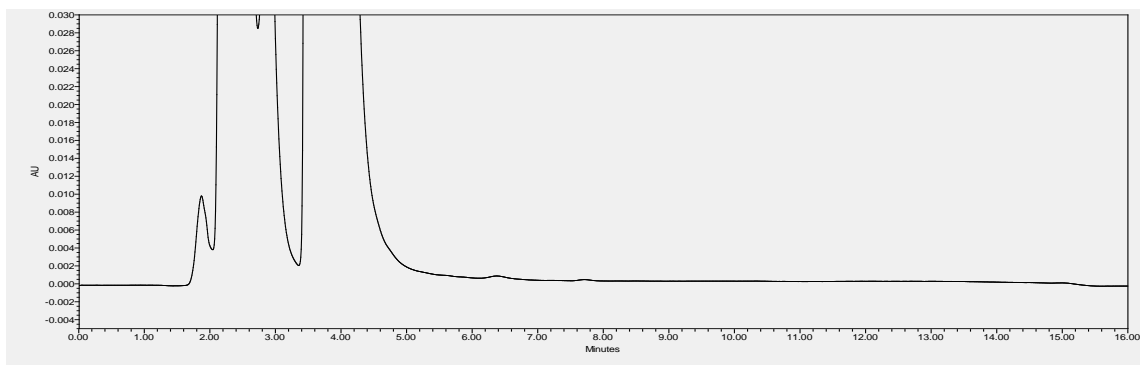
**Slika 16:** Kromatogram otopine uzorka *Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko.*



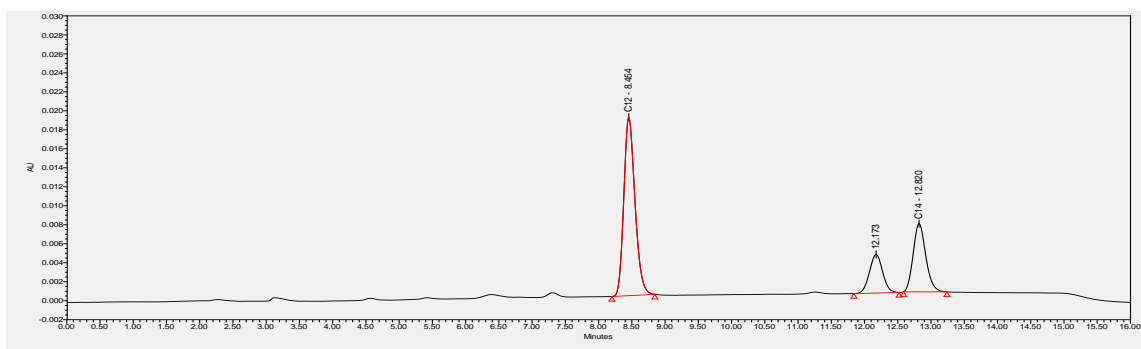
**Slika 17:** Kromatogram otopine placeba *Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko.*



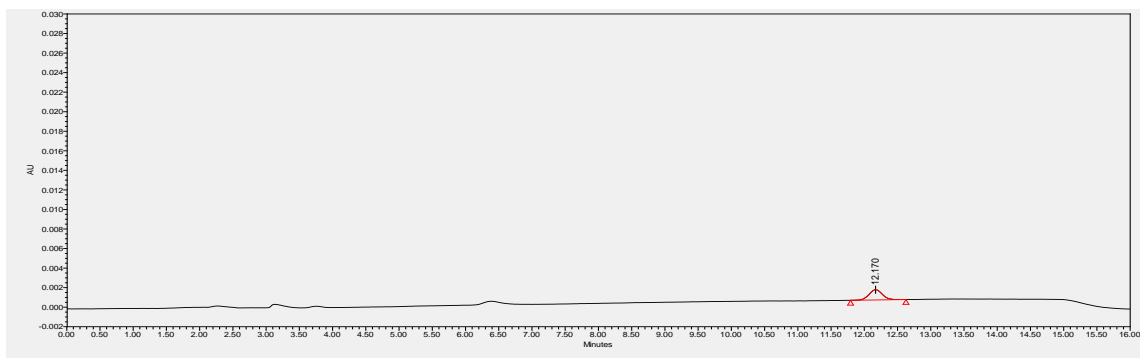
**Slika 18:** Kromatogram otopine uzorka *Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko.*



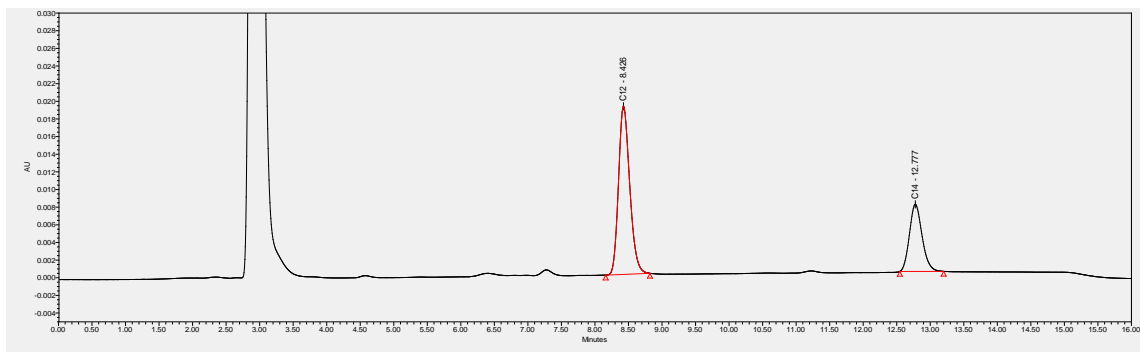
**Slika 19:** Kromatogram otopine placeba *Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko.*



**Slika 20:** Kromatogram otopine uzorka *Latanoprost 0,005% kapi za oko.*

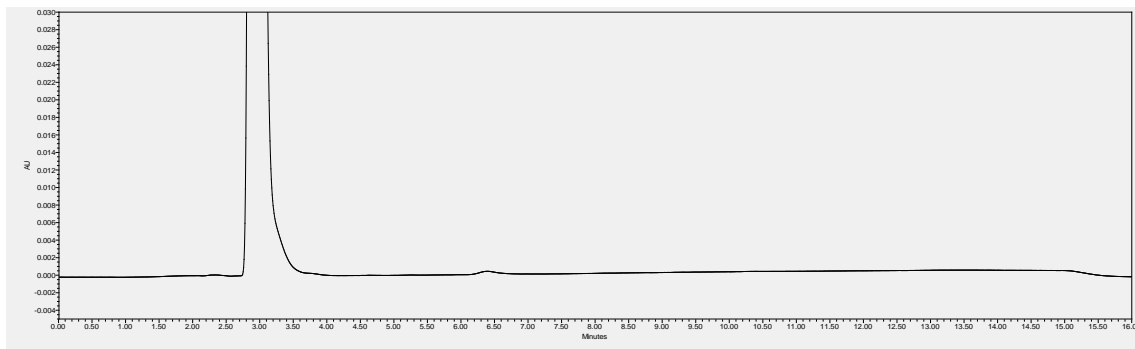


**Slika 21:** Kromatogram otopine placeba *Latanoprost 0,005% kapi za oko.*

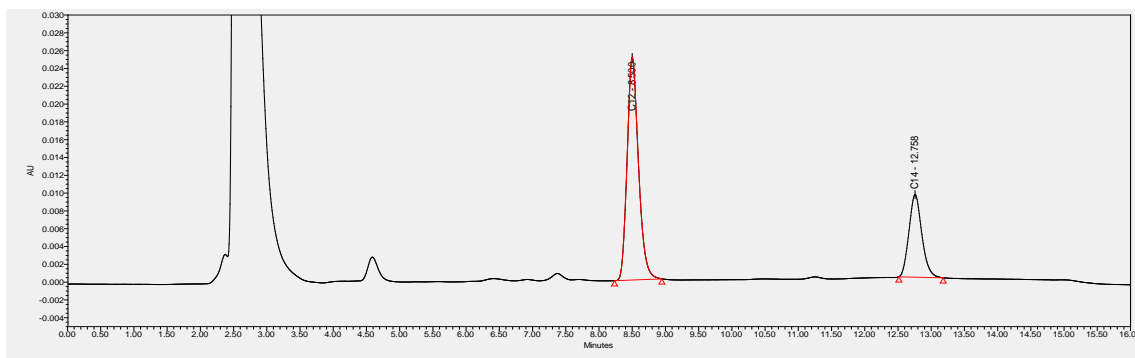


**Slika 22:** Kromatogram otopine uzorka *Ksilometazolin 0,05%, kapi za nos.*

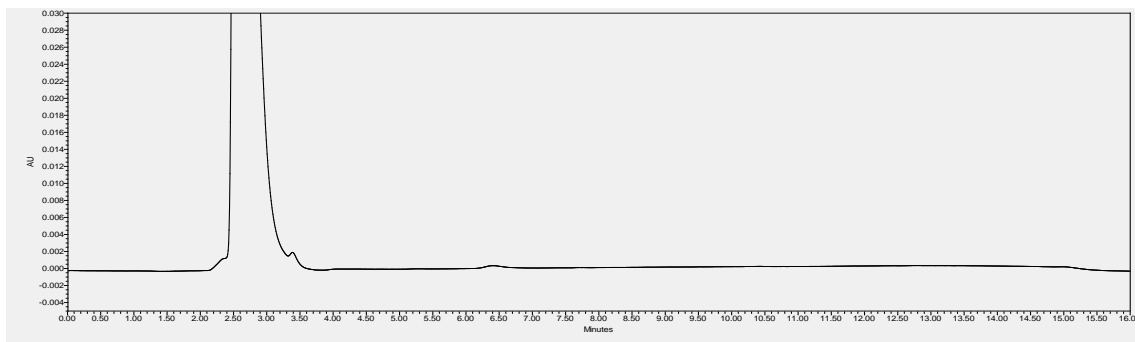




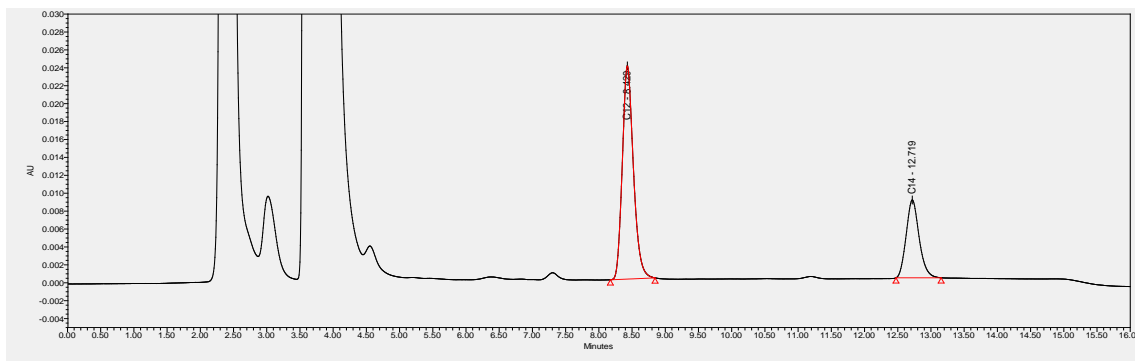
**Slika 23:** Kromatogram otopine placeba *Ksilometazolin 0,05%, kapi za nos.*



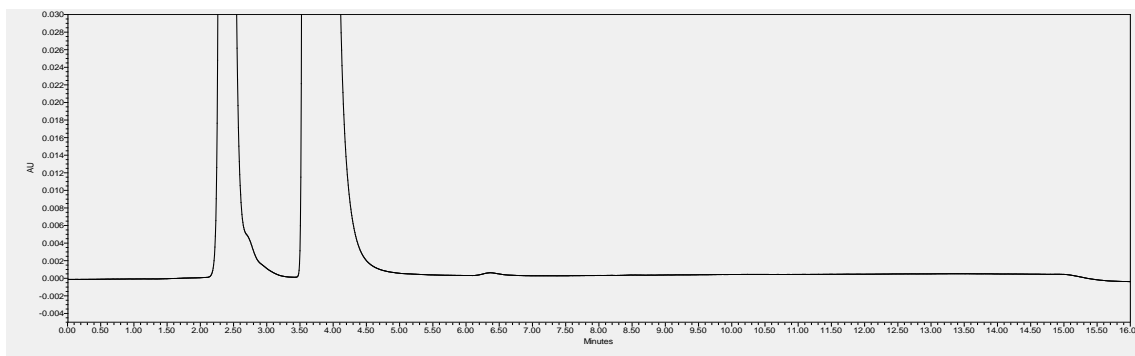
**Slika 24:** Kromatogram otopine uzorka *Olopatadin 1 mg/ml, kapi za oko.*



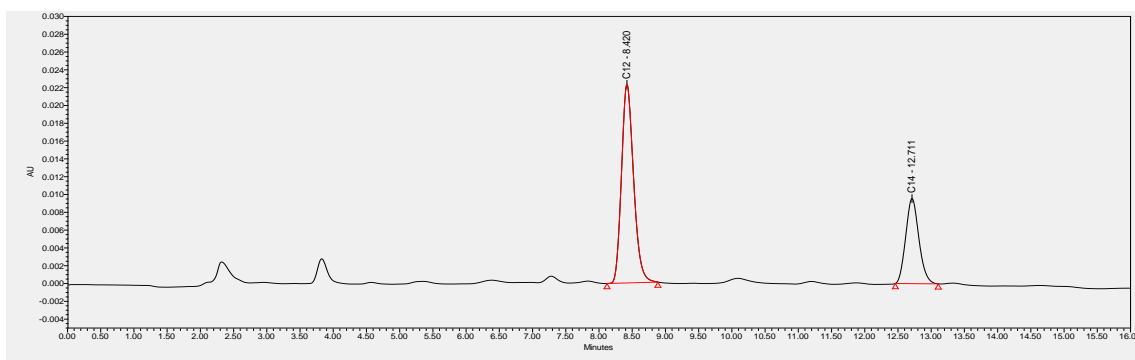
**Slika 25:** Kromatogram otopine placeba *Olopatadin 1 mg/ml, kapi za oko.*



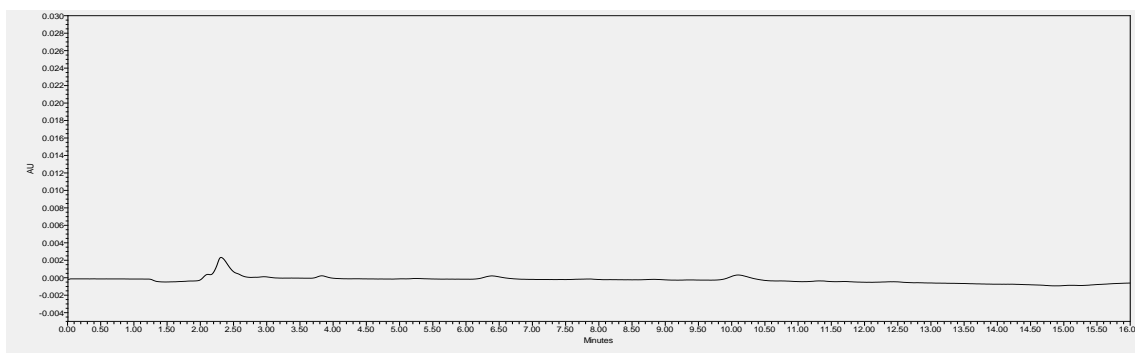
**Slika 26:** Kromatogram otopine uzorka *Timolol 0,25%, kapi za oko.*



**Slika 27:** Kromatogram otopine placeba *Timolol 0,25%, kapi za oko.*



**Slika 28:** Kromatogram otopine uzorka *Septogal bez šećera, pastile.*



**Slika 29:** Kromatogram otopine placeba *Septogal bez šećera, pastile.*

Iz kromatograma (**Slike 12.–29.**) vidljivo je da nema pikova koji eluiraju istovremeno s pikovima  $C_{12}$  i  $C_{14}$  benzalkonij klorida. Pikovi benzalkonij klorida razdvojeni su jedan od drugoga te od ostalih pikova prisutnih na kromatogramima. Stoga je moguće utvrditi kako je predložena metoda je selektivna.

#### 4.2.1.1. Potaknuta razgradnja (stres test)

Kako bi se ispitala potaknuta razgradnja uzorak i placebo svakog proizvoda tretirani su sljedećim uvjetima:

- UV/VIS zračenje – 6 dana,
- Zagrijavanje na 70°C – 6 dana i
- Oksidacija (30% vodikov peroksid) – 24 sata.

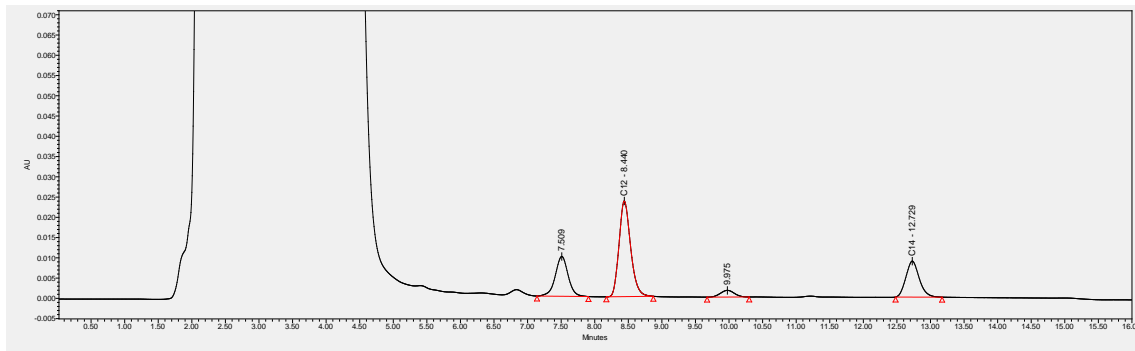
Kromatogrami otopina tretiranih uzoraka i placeba su uspoređeni s kromatogramima otopina netretiranih uzoraka i placeba. Izračunat je sadržaj benzalkonij klorida u svakom tretiranom uzorku i uspoređen sa sadržajem benzalkonij klorida u netretiranom uzorku. Dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 9**.

**Tablica 9:** Potaknuta razgradnja (stres test).

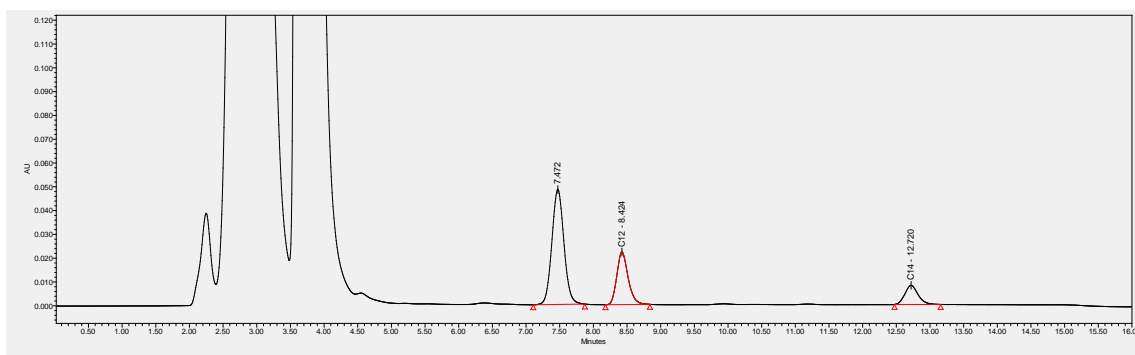
Proizvod	Netretirani	UV/VIS	Zagrijavanje	Oksidacija
	Sadržaj benzalkonij klorida (%)			
<i>Brimonidin tartarat 2 mg/ml, kapi za oko</i>	96,3	94,6	96,0	96,4
<i>Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko</i>	90,2	91,3	89,0	95,3
<i>Dorzolamid 20 mg/ml i Timolol 5 mg/ml, kapi za oko</i>	97,5	78,9	91,1	96,8
<i>Latanoprost 0,005%, kapi za oko</i>	96,3	96,4	96,2	95,0
<i>Ksilometazolin hidroklorid 0,05%, kapi za nos</i>	98,6	99,5	99,2	99,2
<i>Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko</i>	106,3	95,5	80,7	106,0
<i>Timolol , 0,25%, kapi za oko</i>	101,0	81,5	98,9	93,9
<i>Septogal bez šećera, pastile</i>	101,3	101,1	99,3	100,6

Najveća razgradnja postignuta je u uzorku *Dorzolamid 20 mg/ml i Timolol 5 mg/ml, kapi za oko*, tretiranim UV/VIS zračenjem. Također, značajan pad sadržaja uočen je kod uzorka *Timolol, 0,25%, kapi za oko*, tretiranog UV/VIS zračenjem te uzorka *Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko*, tretiranog zagrijavanjem. Dodatni pikovi javljaju se u uzorcima i *Dorzolamid 20 mg/ml i Timolol 5 mg/ml, kapi za oko*, tretiran vodikovim peroksidom (**Slika**

30.) i, *Timolol*, 0,25%, kapi za oko, tretiran vodikovim peroksidom (Slika 31.), no metoda učinkovito razdvaja dodatne pikove od pikova benzalkonij klorida (C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub> frakcije).



Slika 30: Kromatogram uzorka *Dorzolamid* 20 mg/ml i *Timolol* 5 mg/ml, kapi za oko, tretiranog vodikovim peroksidom.



Slika 31: Kromatogram uzorka *Timolol*, 0,25%, kapi za oko, tretiranog vodikovim peroksidom.

Iz dobivenih rezultata moguće je utvrditi kako je predložena metoda selektivna i stabilitetno indikativna.

## 4.2.2. Preciznost

### 4.2.2.1. Preciznost instrumenta

U svrhu određivanja preciznosti instrumenta poredbena otopina injektirana je 6 puta. Izračunata je srednja vrijednost zbroja površina C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub> frakcije, standardna devijacija te relativna standardna devijacija koje su prikazane u **Tablici 10**.

**Tablica 10:** Preciznost instrumenta.

Broj injektiranja	Površina pika benzalkonij klorida		
	Površina pika C <sub>12</sub>	Površina pika C <sub>14</sub>	Ukupna površina
1	308839	155848	464687
2	310187	156151	466338
3	309986	156076	466062
4	311138	156044	467182
5	311678	155811	467489
6	311057	157453	468510
Srednja vrijednost			466711
Standardna devijacija (%)			1320
RSD (%) (Zahtjev: ≤ 2,0 %)			0,3

Iz **Tablice 10**, vidljivo je da je relativna standardna devijacija površina za 6 uzastopnih injektiranja manja od 2,0% iz čega je moguće zaključiti da je preciznost instrumenta zadovoljavajuća.

#### 4.2.2.2. Preciznost metode

Preciznost metode je ispitana na 6 uzoraka svakog proizvoda te je izračunata srednja vrijednost sadržaja benzalkonij klorida te relativna standardna devijacija koje su prikazane u **Tablici 11.**

**Tablica 11:** Preciznost metode.

Uzorak	Srednja vrijednost sadržaja benzalkonij klorida (mg/ml)	Srednja vrijednost sadržaja benzalkonij klorida (%)	Relativna standardna devijacija (%)
<i>Brimonidin tartarat, 2mg/ml, kapi za oko</i>	0,0484	96,9	2,2
<i>Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko</i>	0,0736	95,8	1,2
<i>Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko</i>	0,0726	94,7	2,0
<i>Latanoprost 0,005 %, kapi za oko</i>	0,194	96,8	0,5
<i>Ksilometazolin hidroklorid 0,05 %, kapi za nos</i>	0,205	102,6	0,7
<i>Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko</i>	0,103	103,1	0,7
<i>Timolol 0,25 %, kapi za oko</i>	0,0963	96,3	0,4
<i>Septogal bez šećera, pastile</i>	0,485	97,0	0,6

Iz **Tablice 11.** vidljivo je da su relativne standardne devijacije sadržaja benzalkonij klorida u pojedinim proizvodima manje od 3,0 %, stoga je moguće utvrditi da je preciznost metode zadovoljavajuća.

#### 4.2.3. Točnost

Točnost metode izražena je kao srednja vrijednost povrata i relativna standardna devijacija za svaki proizvod te su prikazane u **Tablici 12.**

**Tablica 12:** Točnost.

Uzorak	Srednja vrijednost povrata (%)	Relativna standardna devijacija (%)
<i>Brimonidin tartarat, 2mg/ml, kapi za oko</i>	100,5	<b>1,0</b>
<i>Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko</i>	101,3	1,3
<i>Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko</i>	101,3	0,7
<i>Latanoprost 0,005 %, kapi za oko</i>	99,3	0,8
<i>Ksilometazolin hidroklorid 0,05 %, kapi za nos</i>	100,7	1,7
<i>Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko</i>	98,5	0,9
<i>Timolol 0,25 %, kapi za oko</i>	99,8	0,8
<i>Septogal bez šećera, pastile</i>	99,8	0,8

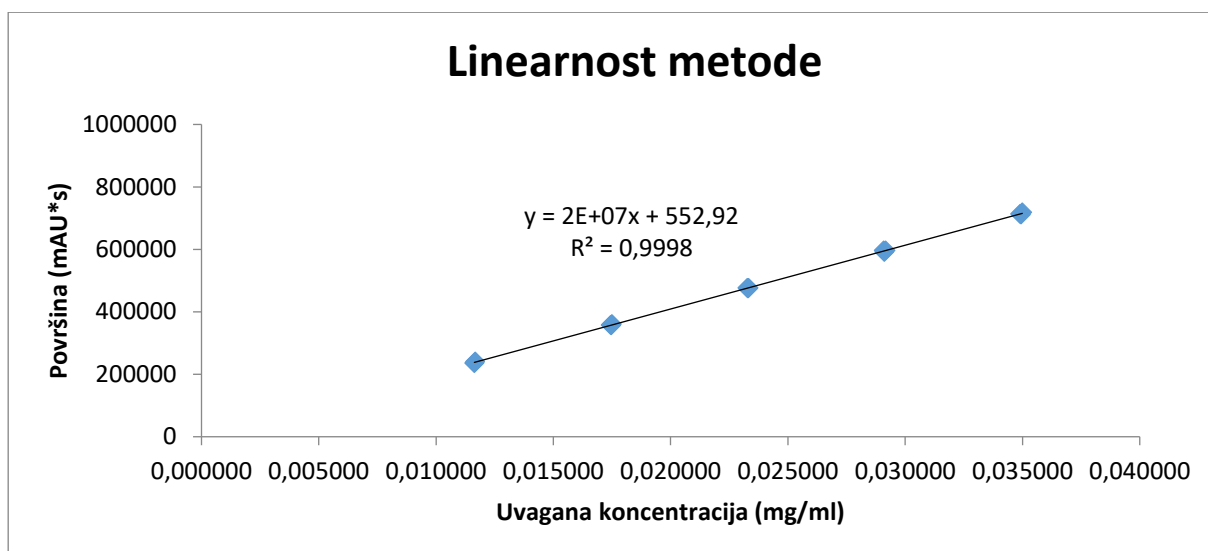
Iz **Tablice 12.**, vidljivo je da je srednja vrijednost povrata kod svih 8 proizvoda unutar zahtjeva (95-105%), dok je relativna standardna devijacija kod svih ispitanih proizvoda manja od 3,0%. Dakle, predložena metoda zadovoljava kriterije točnosti.

#### 4.2.4. Linearnost

Linearnost metode prikazuje se grafički, kao ovisnost zbroja površine C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub> frakcije benzalkonij klorida i uvagane koncentracije (mg/ml) (**Slika 32.**). Prikazana je jednadžba pravca, nagib pravca, odsječak na y osi, koeficijent determinacije, koeficijent korelacije te odsječak na y osi u odnosu na očekivanu koncentraciju analita (**Tablice 13. i 14.**).

**Tablica 13:** Linearnost metode.

Uzorak	Uvagana koncentracija (mg/ml)	Površina (C <sub>12</sub> + C <sub>14</sub> )
50%	0,011664	241394
50%	0,011632	236362
50%	0,011645	236517
75%	0,017496	360827
75%	0,017449	357673
75%	0,017468	356368
100%	0,023328	476608
100%	0,023265	476753
100%	0,023291	474255
125%	0,029160	596420
125%	0,029081	596816
125%	0,029113	591419
150%	0,034992	718531
150%	0,034897	713346
150%	0,034936	711644



Slika 32: Linearnost metode – baždarni pravac.

Tablica 14: Linearnost metode – prikaz rezultata.

Validacijski parametar	Vrijednost
Jednadžba regresijskog pravca:	$y = 20435501x + 553$
Nagib pravca:	20435501
Odsječak na osi y:	553
Koeficijent determinacije ( $R^2$ ):	0,9998
Koeficijent korelacije ( $r$ ):	0,9999
Odsječak na osi y u odnosu na očekivanu koncentraciju analita (% y)	0,1

Iz **Slike 32.** moguće je uočiti kako odziv benzalkonij klorida linearan u području od 0,0125 – 0,035 mg/ml, odnosno od 50% – 150% radne koncentracije te metoda zadovoljava kriterije prihvatljivosti za linearnost.

#### 4.2.5. Područje rada

Prema podacima ispitivanja linearnosti i točnosti metode možemo zaključiti da je radno područje koncentracija benzalkonij klorida 0,0125 – 0,035 mg/ml (50% -150%).



## 4.2.6. Otpornost

### 4.2.6.1. Stabilnost mjernih otopina

Stabilnost mjernih otopina prikazana je kao relativno odstupanje površine pika u otopini ispitanoj u vremenu  $t$  u odnosu na površinu pika u otopini ispitanoj odmah nakon pripreme. Rezultat je izražen kao relativna standardna devijacija površina pikova benzalkonij klorida u ispitivanim otopinama koje su injektirane tijekom ~ 69 h (**Tablica 15.**).

**Tablica 15:** Stabilnost mjernih otopina na sobnoj temperaturi.

Uzorak	Srednja vrijednost površine benzalkonij klorida (C <sub>12</sub> +C <sub>14</sub> )	Relativna standardna devijacija (%)
<i>Poredbena otopina</i>	458225	0,6
<i>Brimonidin tartarat, 2mg/ml, kapi za oči</i>	495207	0,8
<i>Dorzolamid 20 mg/ml, kapi za oko</i>	517909	0,6
<i>Dorzolamid 20 mg/ml i timolol 5 mg/ml, kapi za oko</i>	508540	0,6
<i>Latanoprost 0,005%, kapi za oko</i>	393155	0,9
<i>Ksilometazolin hidroklorid 0,05%, kapi za nos</i>	403726	0,6
<i>Olopatadin hidroklorid 1 mg/ml, kapi za oko</i>	524006	0,8
<i>Timolol 0,25%, kapi za oko</i>	491953	0,6
<i>Septogal bez šećera, pastile</i>	509039	1,0

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 15.** moguće je ustanoviti da su poredbena otopina te otopine uzoraka stabilne najmanje 69 h na sobnoj temperaturi (15-25 °C).

#### 4.2.6.2. Manje promjene u uvjetima metode

Otpornost metode ispitana je injektiranjem poredbene otopine i otopina uzoraka pri „normalnim“ uvjetima i pri promijenjenim uvjetima. Relativna standardna devijacija površine pikova benzalkonij klorida, faktor simetrije pikova te broj teorijskih tavana navedeni su u **Tablici 16**.

**Tablica 16:** Manje promjene u uvjetima metode

Sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi B (%)	Koncentracija soli u otopini pufera (mol/l)	Serijski broj kolone	RSD površine pikova benzalkonij klorida (C <sub>12</sub> +C <sub>14</sub> ) (%)	Faktor simetrije		Broj teorijskih tavana	
			C <sub>12</sub> + C <sub>14</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>
58	0,01	RA-K-C18-36	0,4	1,229	1,191	11631	22699
<b>56</b>	0,01	RA-K-C18-36	0,1	1,233	1,167	10273	18677
<b>60</b>	0,01	RA-K-C18-36	0,1	1,233	1,178	12635	23778
58	<b>0,0095</b>	RA-K-C18-36	0,1	1,229	1,190	11214	20402
58	<b>0,0105</b>	RA-K-C18-36	0,1	1,218	1,170	10513	18801
58	0,01	<b>RA-K-C18-36(3)</b>	0,1	1,123	1,059	10161	18447

Legenda:

	- naslov
	- „normalni“ uvjeti i rezultati analize
	- promijenjeni uvjeti i rezultati analize

Iz **Tablice 16**. moguće je zaključiti da manje promjene uvjeta ne utječu na efikasnost metode. Budući da su zadovoljeni su zahtjevi za prikladnost sustava, proizlazi da predložena metoda zadovoljava zahtjeve za otpornost.

## 5. ZAKLJUČCI

Razvijena je i validirana LC metoda za određivanje sadržaja benzalkonij klorida u 8 različitih farmaceutskih proizvoda: Brimonidin kapi za oko, Dorzolamid kapi za oko, Dorzolamid plus Timolol kapi za oko, Latanoprost kapi za oko, Timolol kapi za oko, Olopatadin kapi za oko, Ksilometazolin kapi za nos te Septogal bez šećera pastile. Metoda sadrži fosfatni pufer (0,01M) pH 3,0 i acetonitril za kromatografiju R kao mobilnu fazu u promjenjivim omjerima, Nepokretna faza je kolona Waters Symmetry Shield RP18 150 x 4,6 mm, 5 µm. Vrijeme trajanja analize je 16 minuta uz protok mobilne faze 0,6 ml/min. Postignuta je zadovoljavajuća efikasnost metode prema određenim parametrima kao što su broj teorijskih tavana, faktor simetrije pikova te razlučivanje između pikova.

Metoda je uspješno validirana kroz slijedeće parametre: selektivnost, pouzdanost (preciznost sistema, ponovljivost metode, središnja preciznost), točnost, linearnost, područje rada te otpornost (stabilnost mjernih otopina, manje promjene uvjeta metode).

Dokazano je da je razvijena metoda selektivna, točna i linearna u području 0,0125 – 0,035 mg/ml koncentracije benzalkonij klorida. Otopine uzoraka te poredbeno otopina stabilne su najmanje 69 sati na sobnoj temperaturi. Metoda je otporna na manje promjene uvjeta kao što su promjena udjela acetonitrila u pokretnoj fazi B, promjena koncentracije soli pufera te promjena serijskog broja kolone.

## 6. LITERATURA

Benzalkonium chloride, <https://en.wikipedia.org/>, pristupljeno 15.06.2016.

Chromatography: Basics, Principles and Theories, <http://www.biologydiscussion.com>, pristupljeno 21.06.2016.

European pharmacopoeia 8th ed., Council of Europe, 2013.

How Does High Performance Liquid Chromatography Work, <http://www.waters.com/>, pristupljeno 20.06.2016.

Liu XR. Determination of Individual Homologues and Total Content of Benzalkonium Chloride by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using a Short Butyl Column, *J AOAC Int*, 2009, 92, 1644-1651.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. 4. izdanje. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko - biokemijski fakultet, 2011.

McNaught AD. Compendium of Chemical Terminology. 2nd ed. Blackwell Science, Cambridge, 1997.

McPolin O. An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis. Mourne Training Services, Warrenpoint, 2009.

Mondal D, Zhanel GG, Schweizer F. Synthesis and antibacterial properties of carbohydrate-templated lysine surfactants. *Carbohydr Res*, 2011, 346, 588-594.

Nigović B, Predavanja iz analitike lijekova, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko - biokemijski fakultet, 2013.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M, Analitika lijekova - praktikum, skripta, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko - biokemijski fakultet, 2004.

Noecker R. Benzalkonium Chloride in Glaucoma Medications, *Ocul Surf*, 2011, 9, 159-162.

Pine S, Organska kemija, Zagreb, Školska knjiga, 1994.

Structure of octadecylsilane, <http://www.biotage.com/>, pristupljeno 21.06.2016.

Structure of benzalkonium chloride, <http://www.chemicalize.org>, pristupljeno 17.06.2016.

Quaternary ammonium cation, <https://en.wikipedia.org/>, pristupljeno 15.06.2016.

Thin Layer Chromatography, <http://www.biologydiscussion.com>, pristupljeno 21.06.2016.

## 7. SAŽETAK

Predložena je obrnuto fazna LC metoda za određivanje sadržaja benzalkonij klorida u 8 različitih farmaceutskih proizvoda iz portfelja tvrtke Jadran Galenski Laboratorij. To su proizvodi: Brimonidin kapi za oko, Dorzolamid kapi za oko, Dorzolamid plus Timolol kapi za oko, Latanoprost kapi za oko, Timolol kapi za oko, Olopatadin kapi za oko, Ksilometazolin kapi za nos te Septogal bez šećera pastile, koji u svom sastavu sadrže benzalkonij klorid kao konzervans.

Razvijena metoda kao sastavnice pokretne faze sadrži fosfatni pufer (0,01M) pH 3,0 te acetonitril za kromatografiju u promjenjivim omjerima. Nepokretna faza je kolona Waters Symmetry Shield RP18 duljine 150 mm, promjera 4,6 mm i veličine čestica punjenja 5 µm. Vrijeme kromatografiranja je 16 minuta uz protok mobilne faze 0,6 ml/min. Sastavnice uzorka detektirane su DAD detektorom na valnoj duljini 208 nm.

Metoda je uspješno validirana prema sljedećim parametrima: selektivnost, pouzdanost (preciznost sistema, ponovljivost metode, središnja preciznost), točnost, linearnost, područje rada te otpornost (stabilnost mjernih otopina, manje promjene uvjeta metode).

**Ključne riječi:** *benzalkonij klorid, HPLC, validacija*

## SUMMARY

A reversed phase LC method has been developed for determination of assay of benzalkonium chloride in 8 different pharmaceutical products from the portfolio of Jadran Galenski Laboratorij pharmaceutical company. These products (Brimonidine eye drops, Dorzolamide eye drops, Dorzolamide and Timolol eye drops, Latanoprost eye drops, Xylometazoline nasal drops, Olopatadine eye drops, Timolol eye drops, Septogal sugar free lozenges) contain benzalkonium chloride as a preservative.

Developed method contains phosphate buffer (0.01M) pH 3,0 and acetonitrile for chromatography as a mobile phase. Stationary phase is a column Waters Symmetry Shield RP18 length 150 mm, diameter 4.6 mm and particle size 5  $\mu\text{m}$ . Time of analysis is 16 minutes with the mobile phase flow of 0.6 ml/min. Components of samples are detected with DAD detector on a wavelength of 208 nm.

Method is successfully validated by the following parameters: selectivity, precision (instrument precision, method precision, method reproducibility), accuracy, linearity, range and robustness (solution stability, minor changes in method condition).

**Keywords:** *benzalkonium chloride, HPLC, validation*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova,  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## RAZVOJ I VALIDACIJA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA BENZALKONIJ KLORIDA U RAZLIČITIM FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA

**Andrea Perušić**

### SAŽETAK

Predložena je obrnuto fazna LC metoda za određivanje sadržaja benzalkonij klorida u 8 različitih farmaceutskih proizvoda iz portfelja tvrtke Jadran Galenski Laboratorij. To su proizvodi: Brimonidin kapi za oko, Dorzolamid kapi za oko, Dorzolamid plus Timolol kapi za oko, Latanoprost kapi za oko, Timolol kapi za oko, Opatadin kapi za oko, Ksilometazolin kapi za nos te Septogal bez šećera pastile, koji u svom sastavu sadrže benzalkonij klorid kao konzervans.

Razvijena metoda kao sastavnice pokretne faze sadrži fosfatni pufer (0,01M) pH 3,0 te acetonitril za kromatografiju u promjenjivim omjerima. Nepokretna faza je kolona Waters Symmetry Shield RP18 duljine 150 mm, promjera 4,6 mm i veličine čestica punjenja 5  $\mu$ m. Vrijeme kromatografiranja je 16 minuta uz protok mobilne faze 0,6 ml/min. Sastavnice uzorka detektirane su DAD detektorom na valnoj duljini 208 nm.

Metoda je uspješno validirana prema sljedećim parametrima: selektivnost, pouzdanost (preciznost sistema, ponovljivost metode, središnja preciznost), točnost, linearnost, područje rada te otpornost (stabilnost mjernih otopina, manje promjene uvjeta metode).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 32 slike, 16 tablica i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: benzalkonij klorid, HPLC, validacija

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta,*

Komentor: **Dr. sc. Danijela Štanfel**, voditeljica Razvojne analitike, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta,*

**Dr. sc. Biljana Nigović**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta,*

**Dr. sc. Danijela Štanfel**, voditeljica Razvojne analitike, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka

Rad prihvaćen: travanj 2017.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR ASSAY DETERMINATION OF BENZALKONIUM CHLORIDE IN DIFFERENT PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

Andrea Perušić

### SUMMARY

A reversed phase LC method has been developed for determination of assay of benzalkonium chloride in 8 different pharmaceutical products from the portfolio of Jadran Galenski Laboratorij pharmaceutical company. These products (Brimonidine eye drops, Dorzolamide eye drops, Dorzolamide and Timolol eye drops, Latanoprost eye drops, Xylometazoline nasal drops, Olopatadine eye drops, Timolol eye drops, Septogal sugar free lozenges) contain benzalkonium chloride as a preservative.

Developed method contains phosphate buffer (0.01M) pH 3,0 and acetonitrile for chromatography as a mobile phase. Stationary phase is a column Waters Symmetry Shield RP18 length 150 mm, diameter 4.6 mm and particle size 5  $\mu\text{m}$ . Time of analysis is 16 minutes with the mobile phase flow of 0.6 ml/min. Components of samples are detected with DAD detector on a wavelength of 208 nm.

Method is successfully validated by the following parameters: selectivity, precision (instrument precision, method precision, method reproducibility), accuracy, linearity, range and robustness (solution stability, minor changes in method condition).

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 32 figures, 16 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: benzalkonium chloride, HPLC, validation

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Danijela Štanfel, Ph.D.**, Analytical Development Manager, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Biljana Nigović, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Danijela Štanfel, Ph.D.**, Analytical Development Manager, Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka

The thesis was accepted: April 2017.