

Optimizacija metode za određivanje rosuvastatina u gotovim farmaceutskim oblicima

Benković, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:572437>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Andrea Benković

**Optimizacija metode za određivanje rosuvastatina u
gotovim farmaceutskim oblicima**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitička kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan na ukazanom povjerenju, strpljivosti, kolegijalnosti i susretljivosti te stručnom vodstvu prilikom izvođenja ovog diplomskog rada.

Od srca hvala svim prijateljima, bilo iz školskih ili studentskih dana, što ste mi uljepšali studiranje. Bez vaše podrške, pozitivne i motivacije ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala ti, Ivana, što si mi glas razuma i podrška u svemu.

Najiskrenije hvala onima koji su tu od početka, mojim roditeljima i cijeloj obitelji, na bezuvjetnoj ljubavi, razumijevanju, motivaciji, pomoći i podršci tijekom cijelog života, a posebice u studentskim danima – ovaj diplomski rad posvećujem vama.

SADRŽAJ:

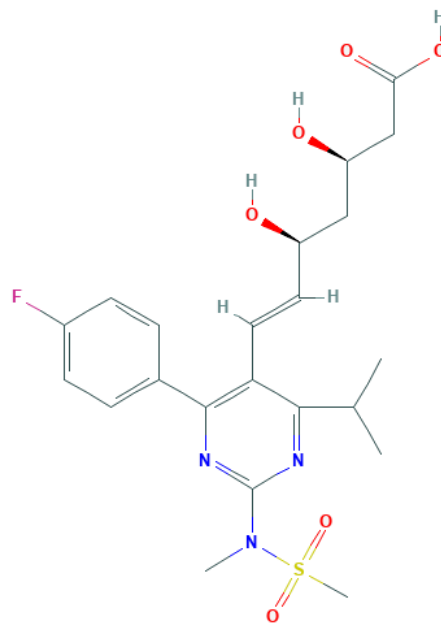
1. UVOD	1
1.1. Rosuvastatin	2
1. 2. Spektroskopske metode	3
1. 2. 1. UV-Vis spektrofotometrija	4
1. 2. 2. UV-Vis spektrofotometar.....	5
1. 2. 3. Primjena UV-Vis spektrofotometrije	6
1.2. 4. Prednosti i nedostaci metode	7
1.3. Validacija analitičkih postupaka	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3. 1. Materijali	15
3. 1. 1. Korištene kemikalije	15
3. 1. 2. Aparatura.....	15
3. 1. 3. Laboratorijski pribor i posuđe.....	15
3. 2. Metode	16
3. 2. 1. Priprema standardnih otopina rosuvastatina	16
3. 2. 2. Priprema uzoraka tableta za analizu rosuvastatin kalcija	17
3. 2. 3. Postupak određivanja koncentracije rosuvastatin kalcija u uzorcima.....	17
3. 2. 4. Statistička analiza.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4. 1. Validacija analitičke metode	20
4. 1. 1. Linearnost	20
4. 1. 2. Preciznost.....	21
4. 1. 3. Granica dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ).....	23
4. 1. 4. Točnost.....	23
4. 2. Određivanje mase rosuvastatin kalcija u uzorcima tableta	25

5. ZAKLJUČAK.....	27
6. LITERATURA	29
7. SAŽETAK / SUMMARY	33
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Rosuvastatin

Rosuvastatin pripada skupini statina, lijekovima koji reverzibilno inhibiraju 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktazu (engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A*, HMG-CoA). Inhibicijom djelovanja navedenoga enzima sprječava se biosinteza kolesterola u jetri. Posljedično dolazi do povećanja sinteze LDL (engl. *low density lipoprotein*) receptora u hepatocitima, preko kojih se LDL iz krvi unosi u stanice, te se tako smanjuje njegova koncentracija u sistemskej cirkulaciji (Schachter, 2005). Nadalje, statini sprječavaju oksidaciju LDL-a, poboljšavaju funkciju endotela, smanjuju upalni odgovor, doprinose stabilizaciji aterosklerotskih plakova i smanjuju agregaciju trombocita što ih čini lijekovima izbora u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Stancu i Sima, 2001). Rosuvastatin je novija generacija statina s dodanim polarnim grupama koje ga čine slabo lipofilnim i dodatno povećavaju njegov afinitet vezanja na HMG-CoA reduktazu ionskim interakcijama.



Slika 1. Struktura rosuvastatina (preuzeto i prilagođeno prema: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

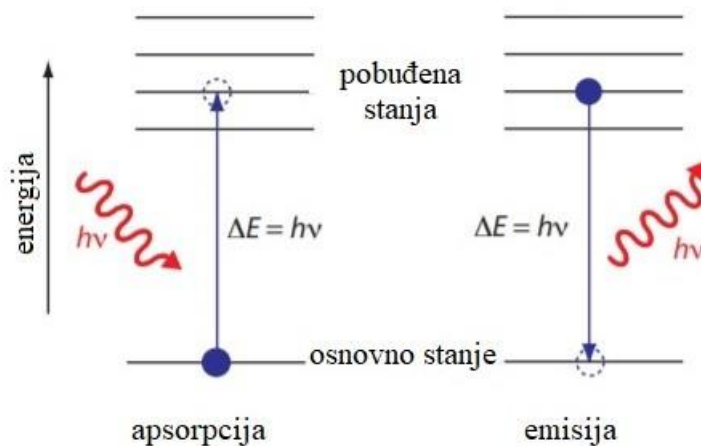
Također, djeluje i na povećanje HDL-a (engl. *high density lipoprotein*) te smanjuje razine triglicerida u krvi, i to najviše kod pacijenata s inicijalno niskim razinama HDL-a, odnosno visokim koncentracijama triglicerida. Njegova smanjena lipofilnost, u odnosu na prijašnje generacije statina, smanjuje mogućnost prodiranja u ekstrahepatička tkiva pasivnom

difuzijom, a time i nuspojave. Drugi inhibitori HMG-CoA reduktaze, poput simvastatina i atorvastatina, metaboliziraju se preko CYP3A4, kao i većina drugih lijekova, što dovodi do klinički značajnih interakcija s itrakonazolom, inhibitorima HIV proteaze i makrolidnim antibioticima. Međutim, studije metabolizma rosuvastatina na ljudskim hepatocitima pokazale su kako je slab supstrat za CYP450 enzime te se čak 90 % apsorbiranog lijeka izlučuje nepromijenjeno, dok se ostalih 10 % metabolizira preko CYP2C9 i CYP2C19 što ga čini sigurnijim za upotrebu, posebice kod pacijenata s mnogo komorbiditeta koji zahtijevaju politerapiju (Martin i sur., 2003; Luvai i sur., 2012). Dodatna mu je prednost i vrijeme poluživota u plazmi od 19 sati pa se može uzimati jednom dnevno. Pacijenti na HAART-u (engl. *highly active antiretroviral therapy*) pod povećanim su rizikom od razvoja kardiovaskularnih incidenata, često s povišenim razinama triglicerida i hiperkolesterolemijom. Rosuvastatin kod njih predstavlja lijek izbora u liječenju ovih stanja budući da ulazi u minimalne interakcije s drugim lijekovima. Kod pacijenata s oštećenom funkcijom bubrega i starijih osoba povećan je rizik nastanka ozbiljnijih nuspojava statina, poput rabdomiolize i posljedičnog zatajenja bubrega. Zbog visoke potentnosti, a time i mogućnosti primjene niskih doza, rosuvastatin i kod ovih skupina bolesnika pokazuje dobre rezultate (Olsson i sur., 2002; Luvai i sur., 2012).

1. 2. Spektroskopske metode

Elektromagnetsko zračenje jest oblik energije čija se priroda može objasniti svojstvima čestice, npr. kod promatranja apsorpcije i emisije, i vala kod opisivanja refrakcije. Čestična svojstva elektromagnetskog zračenja važna su u opisivanju interakcija svjetlosti s materijom. Elektromagnetski val karakterizira nekoliko važnih svojstava – brzina, amplituda, frekvencija, fazni kut, polarizacija i smjer širenja (Harvey, 2000). Prilikom apsorpcije fotona u uzorku njegova energija prenosi se na taj uzorak. Spektroskopsko mjerenje moguće je samo u slučaju kad interakcija fotona s uzorkom dovodi do promjene jednog ili više karakterističnih svojstava elektromagnetskog zračenja. Kod apsorpcijske spektroskopije atomi ili molekule uzorka apsorbiraju foton te pritom prelaze iz nižeg u više energetske stanje. Tip takvog prijelaza ovisi o energiji fotona. Prolaskom kroz uzorak koji apsorbira zračenje smanjuje se broj fotona. To smanjenje može se mjeriti, naziva se apsorbanacija i predstavlja koristan analitički signal. Prikaz apsorbanacije kao funkcije energije fotona naziva se apsorpcijskim spektrom. Važno je pritom napomenuti da do apsorpcije zračenja u uzorku neće doći ukoliko energija fotona točno ne odgovara razlici energije između dviju energetskih razina. Nadalje, ekscitirani atomi ili

molekule uzorka mogu pri povratku iz pobuđenog u osnovno stanje otpustiti foton u procesu emisije (Hofmann i sur., 2010; Harvey, 2000).



Slika 2. Shematski prikaz prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno energetske stanje (preuzeto i prilagođeno prema: www.chem.libretexts.org)

Druga skupina spektroskopskih tehnika temelji se na valnim svojstvima elektromagnetskog zračenja gdje dolazi do promjene amplitude, polarizacije, smjera kretanja i faznog kuta kao posljedice refrakcije, raspršivanja, refleksije i difrakcije u uzorku (Harvey, 2000).

1. 2. 1. UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis (engl. *ultraviolet visible spectrophotometry*) spektrofotometrija metoda je koja se koristi za dobivanje apsorpcijskog spektra uzorka koji može biti tekućina ili otopina. Na skali elektromagnetskog zračenja UV-Vis područje prostire se od 800 do 190 nm što odgovara energiji od 1,5 do 6,2 eV (George i sur., 2017; Harvey, 2000). Prolaskom elektromagnetskog zračenja kroz uzorak dolazi do apsorpcije energije te elektroni iz osnovnog prelaze u pobuđeno energetske stanje. Taj proces matematički se opisuje Beer-Lambertovim zakonom:

$$A = \epsilon cl,$$

gdje je A apsorbanca na danoj valnoj duljini, ϵ molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) koji je karakterističan za pojedinu molekulu i ovisi o valnoj duljini, l duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), a c koncentracija tvari u ispitivanom uzorku (mol L^{-1}). Apsoorbancija se definira i kao logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja (I_0) i zračenja propuštenog kroz uzorak (I):

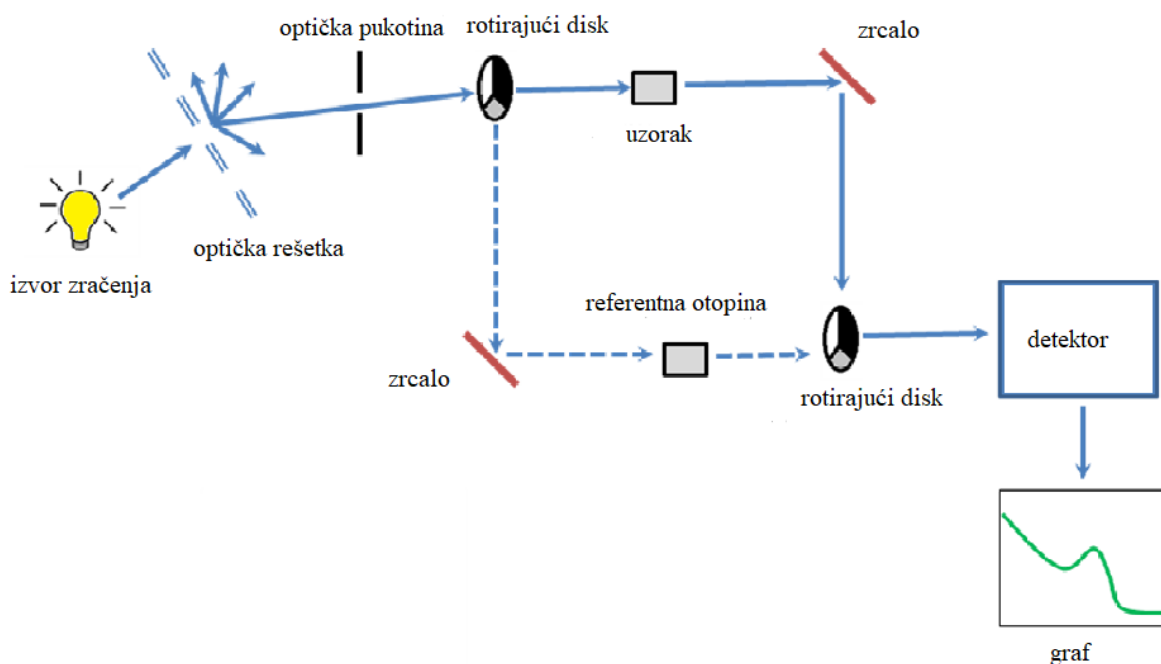
$$A = \log(I_0/I).$$

Ako uzorak ne apsorbira svjetlost na određenoj valnoj duljini, tada je $I = I_0$. Ukoliko dolazi do apsorpcije zračenja na određenoj valnoj duljini, I je manji od I_0 . Ta se razlika može predočiti grafom gdje se apsorbanacija prikazuje kao funkcija valne duljine. Valna duljina na kojoj se postiže maksimum apsorpcije karakteristična je za pojedinu tvar i označava se kao λ_{max} . Za molekule s jakim apsorpcijom, mjerenja se uvijek provode u razrijeđenim otopinama, a korištena otapala moraju u potpunosti propuštati svjetlost, pa se najčešće upotrebljavaju voda, etanol, heksan i cikloheksan. Također, kivete koje sadržavaju uzorak prilikom mjerenja moraju biti izrađene od kvarca ili silicijevog dioksida jer staklo apsorbira svjetlost u UV području (George i sur., 2017; Hofmann i sur., 2010; Harvey, 2000).

1. 2. 2. UV-Vis spektrofotometar

Dijelovi UV-Vis spektrofotometra su izvor zračenja, monokromator, nosač uzorka i detektor. Iako postoji više izvedbi samog instrumenta, kao izvori zračenja koriste se obično deuterijska ili živina lampa za UV te volframova za vidljivo područje (Hofmann i sur., 2010). Instrument s jednom zrakom (engl. *single beam instrument*) između izvora svjetlosti i uzorka ima filter ili monokromator koji propuštaju jednu zraku točno određene valne duljine koja potom prolazi kroz sam uzorak. Instrumenti s dvije zrake (engl. *double beam instrument*) češće su u primjeni. Prolaskom kroz prizmu ili optičku rešetku, emitirana polikromatska svjetlost razdvaja se na pripadajuće valne duljine. Pojedine zrake odgovarajuće valne duljine dalje se, pomoću sustava zrcala i polupropusnog zrcala, razdvajaju na dvije zrake jednakog intenziteta od čega jedna prolazi kroz uzorak, a druga kroz referentnu otopinu koju uglavnom čini samo otapalo. Rotacija prizme omogućuje kontinuirano povećanje valnih duljina zraka koje prolaze kroz optičke pukotine, a time i snimanje spektra u kratkom vremenu. Nakon prolaska kroz ispitivani uzorak i slijepu probu, zraka dolazi do detektora (Harvey, 2000). Njegova svrha jest pretvoriti svjetlosni signal u električni. U idealnom slučaju detektor je visoke osjetljivosti, s minimalnim pozadinskim šumom, brzog je i linearnog odziva te daje zadovoljavajuće rezultate s minimalnom potrošnjom uzorka i u širokom rasponu valnih duljina (Passos i sur., 2018). Nerijetko je u primjeni fotomultiplikator koji se sastoji od katode, niza elektroda (dinode) i anode. Zadaća je dinoda pojačavanje signala koji dolazi do katode. Udaranje fotona u katodu uzrokuje otpuštanje elektrona koji, ubrzani, na nizu elektroda potiču otpuštanje tzv. sekundarnih elektrona. Svi ti elektroni naposljetku dolaze do anode i posljedično je signal mnogostruko jači od početnog. Unapređivanjem metode razvijen je instrument koji kao detektor ima niz dioda. Izvedba ovakvog instrumenta nešto je drugačija u odnosu na dosad

spomenute. Bijela svjetlost, koju emitira izvor, prolazi prvo kroz uzorak, a potom se na optičkoj rešetki razdvaja na pripadajuće valne duljine te se usmjerava na linearni niz fotodioda, odnosno DAD (engl. *diode array detector*). Prednost je ovog detektora što mjeri cijeli spektar u ultraljubičastom i vidljivom području u vrlo kratkom vremenu. Bez obzira na njegovu izvedbu, svaki UV-Vis spektrofotometar povezan je s operacijskim sustavom koji zabilježeni analitički signal prevodi u graf, odnosno spektar, koji najčešće prikazuje apsorbanciju kao funkciju valne duljine (Passos i sur., 2018; Harvey, 2000).



Slika 3. Shematski prikaz UV-Vis spektrofotometra (preuzeto i prilagođeno prema: www.chem.libretexts.org)

1. 2. 3. Primjena UV-Vis spektrofotometrije

Ova metoda prigodna je za provođenje i kvalitativnih i kvantitativnih ispitivanja. Bez obzira na to je li potrebna informacija o identitetu analita ili njegova koncentracija, potrebno je instrument „postaviti na nulu“ slijepom probom koju uglavnom čini otapalo. Kod kvantitativnih ispitivanja, praćenja reakcija ili degradacijskih studija potrebna je kalibracija. Napravi se koncentracijski niz otopina standarda ispitivane tvari, provedu se mjerenja i iz dobivenih podataka načini kalibracijska krivulja. Za izradu iste, potrebne su najmanje 3 različite koncentracije, a idealno 5 kako bi se postigla zadovoljavajuća točnost te ih je potrebno napraviti što preciznije koristeći precizno volumetrijsko posuđe. UV-Vis spektrofotometrija koristi se pri

detekciji onečišćenja u organskim molekulama, određivanju fizikalno kemijskih svojstava lijekova (topljivost, koeficijent raspodjele, stabilnost, pKa vrijednost, oslobađanje lijeka iz formulacije) i potvrdi identiteta lijekova (Hofmann i sur., 2010; Harvey, 2000).

1.2. 4. Prednosti i nedostaci metode

Najznačajnije prednosti metode su njena jednostavnost, preciznost, izdržljivost i ekonomičnost. Derivacijom UV spektra rješavaju se problemi osnovne metode, a rutinski se primjenjuje i za određivanje fizikalno kemijskih svojstava lijekova. S druge strane, uzorci s konzistencijom suspenzije svjetlost raspršuju više nego što je apsorbiraju pa ova metoda nije pogodna za njihovu analizu. Nadalje, potrebno je uvijek analizu provoditi uz slijepu probu i s visokom preciznošću napraviti standardne otopine kako bi podatak o koncentraciji analita bio što točniji, a pri odabiru otapala treba voditi računa o valnoj duljini ispod koje samo otapalo apsorbira svu svjetlost (Raja i Barron, 2020). Međutim, unatoč nekim nedostacima, ova metoda široko se primjenjuje i predstavlja vrijedan alat u analitici lijekova.

1.3. Validacija analitičkih postupaka

Validacija jest postupak kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičke metode za određenu primjenu. Analize sadržaja aktivne tvari, identifikacija i kvantifikacija onečišćenja u sirovinama ili gotovom obliku zahtijevaju ispitivanje prikladnosti metode za tu primjenu. Validaciju treba provesti pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode, ali i kod modifikacija prethodno validirane metode (revalidacija). Neke od tih modifikacija su poboljšanje i prilagodba metode, prenamjena, prenošenje u drugi laboratorij ili na drugi instrument te promjene u sintezi glavne komponente, analitičkom postupku i sastavu gotovog proizvoda. U analizi lijekova, ona čini sastavni dio procesa registracije ljekovitih oblika ili aktivnih tvari. Nužna je u sustavu osiguranja kvalitete i čini preduvjet za distribuciju i primjenu lijeka (Medić-Šarić i sur., 2006). Proces razvoja i validacije metode nije nimalo jednostavan i obuhvaća sve od nabave referentnog standarda i uzoraka, preko utvrđivanja kriterija prihvatljivosti rezultata, postavljanja validacijskog protokola, validacijskih mjerenja i obrade rezultata i u konačnici usporedbu istih s postavljenim kriterijima te donošenje odluke o prihvaćanju analitičkog postupka ili daljnjem razvoju metode. Parametri koji se procjenjuju ovise o namjeni analitičke metode što je prikazano u Tablici 1. Obično se ispituju točnost, preciznost, selektivnost, granica

dokazivanja (detekcije), granica određivanja (kvantifikacije), linearnost, koncentracijsko područje i izdržljivost (Nigović i sur., 2019; Riley i Rosanske, 1996; www.ema.europa.eu).

Tablica 1. Ovisnost parametara koji se procjenjuju o namjeni metode

Validacijski parametar	Identifikacija	Ispitivanje čistoće		Određivanje sadržaja
		kvantitativno	granično	
točnost	-	+	-	+
preciznost	-	+	-	+
specifičnost	+	+	+	+
granica dokazivanja	-	-	+	-
granica određivanja	-	+	-	-
linearnost	-	+	-	+
konc. područje	-	+	-	+

➤ **Specifičnost/selektivnost**

Specifičnost i selektivnost dva su pojma koja se najčešće poistovjećuju. Međutim, selektivnost metode je njena sposobnost da točno odredi analit u prisustvu ostalih komponenti uzorka poput pomoćnih tvari, onečišćenja i razgradnih produkata. Specifičnost je, pak, sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka što je u praksi rijetkost. Pri ispitivanju selektivnosti metode za određivanje sadržaja ili ispitivanje čistoće čistom analitu dodaju se pomoćne tvari ili onečišćenja te se potom provodi analiza. Ako onečišćenja nisu dostupna, uzorak se podvrgava stres uvjetima koji potiču njegovu razgradnju (Nigović i sur., 2019; Medić-Šarić i sur., 2006).

➤ **Linearnost**

Linearnost predstavlja sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Za utvrđivanje linearnosti potrebno je bar 3 – 6 mjerenja s najmanje pet različitih koncentracija analita. Iz dobivenih podataka izrađuje se kalibracijska krivulja koja prikazuje ovisnost izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita. Linearnost metode najčešće se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca, r koji je poželjno veći od 0,999 (Nigović i sur., 2019; Medić-Šarić i sur., 2006).

➤ **Radno područje**

Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracije analita unutar kojeg analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost. Potrebno ga je prilagoditi pojedinačnim primjenama validirane metode budući da se odstupanja od predviđene količine analita u uzorku mogu značajno razlikovati. Pri kvantitativnim analizama preporučeno radno područje iznosi 80 – 120 % (Nigović i sur., 2019; Medić-Šarić i sur., 2006).

➤ **Granica dokazivanja i određivanja**

Granica dokazivanja, LOD (engl. *limit of detection*), jest najmanja koncentracija analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena, pri zadanim uvjetima metode. Granica određivanja, LOQ (engl. *limit of quantification*) predstavlja najmanju koncentraciju analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima. Obje spomenute vrijednosti određuju se razrjeđivanjem ispitivane otopine. Jedan od načina njihovog određivanja je omjer signala i šuma gdje se signali uzorka poznatih koncentracija analita uspoređuju sa signalom slijepe probe. Prihvatljivi omjeri su 3:1 ili 2:1 za LOD te 10:1 za LOQ. Međutim, ovaj način primjenjiv je samo na metodama koje pokazuju šum bazne linije. Drugi način određivanja LOD i LOQ jest standardna devijacija signala i nagiba kalibracijskog pravca prema sljedećim formulama:

$$LOD = \frac{3,3 * \sigma}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 * \sigma}{a}$$

gdje je σ standardna devijacija odziva, a a nagib pravca (Nigović i sur., 2019; Medić-Šarić i sur., 2006; www.ema.europa.eu).

➤ **Preciznost**

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri istim, strogo propisanim uvjetima. Ona ukazuje na slučajne pogreške metode. Ispitivanje preciznosti provodi se u 5 – 6 određivanja na 2 – 3 različite koncentracije u području linearnosti. Obično se iskazuje kao relativna standardna devijacija (RSD):

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} * 100$$

gdje je SD standardna devijacija, a \bar{x} srednja vrijednost dobivenih rezultata. Granice prihvatljivosti za RSD vrijednosti ovisne su o tipu analize i koncentraciji analita. Preciznost se može razmatrati na tri razine – ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost podrazumijeva podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka, istom metodom i pod istim uvjetima u kratkom vremenskom razmaku. Srednja preciznost izražava varijabilnost unutar istog laboratorija, dakle odstupanje rezultata koji su dobiveni mjerenjem istog uzorka, istom metodom, ali pod različitim uvjetima, primjerice razlika je u instrumentu ili analitičaru. Također, srednja preciznost podrazumijeva mjerenja u dužem periodu, obično par dana, te daje odgovor na pitanje hoće li razvijena metoda davati iste rezultate tijekom kontinuirane upotrebe u laboratoriju. Obnovljivost obuhvaća podudaranje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima, uzastopnim mjerenjem nekolicine istih uzoraka istom metodom te ukazuje na to daje li metoda iste rezultate u različitim laboratorijima (Nigović i sur., 2019; Medić-Šarić i sur., 2006).

➤ **Točnost**

Točnost metode parametar je koji ukazuje na podudaranje srednje vrijednosti dobivenih rezultata sa stvarnim ili prihvaćenim referentnim vrijednostima. Pri određivanju ovog parametra provode se analize uzoraka poznatih koncentracija te se dobivene vrijednosti uspoređuju sa stvarnima. Izvode se najmanje tri ponovljena mjerenja uzorka s najmanje tri različite koncentracije u radnom području metode. Izražava se kao postotak iskorištenja R (engl. *recovery*), tj. analitički prinos:

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} * 100$$

gdje je \bar{x} izmjerena, a \hat{x} stvarna količina analita u uzorku. Ovaj validacijski parametar ukazuje na sustavne pogreške metode (Nigović i sur., 2019).

➤ **Izdržljivost**

Izdržljivost metode mjera je njene sposobnosti da ostane nepromijenjena pri malim, ali namjernim promjenama parametara metode. Procjena izdržljivosti vrši se variranjem jednog parametra metode dok ostali ostaju nepromijenjeni. Izbor parametra koji će

varirati ovisi o samoj metodi. Izdržljivost predstavlja indikator pouzdanosti metode tijekom njene primjene uz male promjene uvjeta što se i događa u realnom provođenju analize (Nigović i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dislipidemija, odnosno hiperlipidemija, stanje je povišene koncentracije kolesterola i/ili triglicerida u krvi, a često i snižene koncentracije HDL-a (engl. *high density lipoprotein*). Ona je jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj ateroskleroze. Nužno ju je liječiti kako bi se smanjila progresija krvožilnih bolesti i razvoj komplikacija (www.msd-prirucnici.placebo.hr). Prema izvješćima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, bolesti cirkulacijskog sustava na vrhu su ljestvice uzroka smrtnosti u Republici Hrvatskoj (www.hzjz.hr). Najvažnija skupina lijekova u farmakoterapiji hiperlipidemije jesu statini – inhibitori hidroksimetilglutaril koenzim A reduktaze. Inhibicijom ovog enzima zaustavlja se sinteza kolesterola u jetri. Međutim, u tom sintetskom putu nastaju i spojevi važni za proliferaciju mišićnih stanica pa je miopatija jedna od značajnijih nuspojava. Rosuvastatin je najpotentniji lijek iz ove skupine dostupan na hrvatskom tržištu. Učinkovito snižava koncentracije LDL-a, triglicerida i ukupnog kolesterola u krvi, uz povećanje koncentracije HDL-a, pri nižim dozama od ostalih statina što pridonosi i manjoj vjerojatnosti nuspojava. Usto, rosuvastatin nije supstrat CYP3A4 enzima te je i time manja vjerojatnost interakcija s drugim lijekovima. Koristi se u primarnoj – u osoba bez kliničkih simptoma, i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti. U navedenim indikacijama rosuvastatin se primjenjuje u obliku filmom obloženih tableta ili kapsula. Posljedice po zdravlje pojedinca ukoliko se unosi pogrešna doza mogu biti ozbiljne, bilo da je primarna bolest nedovoljno kontrolirana zbog preniske doze ili je pacijentovo zdravlje ugroženo pojavom ozbiljnih nuspojava unosom previsoke doze. Stoga je stroga provjera kvalitete gotovih lijekova nužna kako bi se pacijentu osigurala sigurna i učinkovita terapija.

Cilj ovog diplomskog rada jest validirati metodu za određivanje sadržaja rosuvastatina u ljekovitim oblicima te ju potom primijeniti za pouzdano i precizno određivanje sadržaja rosuvastatina u ispitivanim uzorcima gotovih lijekova dostupnih na tržištu. Usporedbom dobivenih podataka s deklariranim sadržajem utvrđuje se zadovoljavaju li ispitani ljekoviti oblici deklarirane norme.

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. Materijali

3. 1. 1. Korištene kemikalije

- standard rosuvastatin kalcija (Sigma, Aldrich, Njemačka)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

3. 1. 2. Aparatura

- UV-Vis spektrofotometar (Agilent 8453, SAD)
- ultrazvučna kupelj Transsonic 570 (Elma Ultrasonic, Singen, Njemačka)
- centrifuga (EBA 20, Hettich, Njemačka)
- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Švicarska)

3. 1. 3. Laboratorijski pribor i posuđe

- odmjerne tikvice veličine 10,00 mL, 50,00 mL
- automatske pipete veličine 50 – 200 μ L i 200 – 1000 μ L
- tarionik s pistilom
- staklene čaše volumena 100 mL i 200 mL
- plastične kapaljke
- plastična kartica
- staklene kivete
- ladice za vaganje
- metalna špatula
- stakleni lijevak

3. 2. Metode

3. 2. 1. Priprema standardnih otopina rosuvastatina

Otopina primarnog standarda rosuvastatin kalcija (otopina Stock 1 koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$) dobivena je vaganjem 50 mg standarda. Odvagnuta količina standarda kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 50,00 mL, a zatim se doda 30 mL metanola i otopina se sonicira 15 minuta. Po završetku soniciranja otopini se doda metanol do 50,00 mL. Razrjeđivanjem 5 mL primarnog standarda u odmjernoj tikvici od 50,00 mL pripremi se standardna otopina rosuvastatin kalcija (otopina Stock 2) koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$. Razrjeđivanjem Stock 2 otopine izradi se koncentracijski niz standardnih otopina (Gupta i sur., 2009). 0,2 mL radnog standarda razrijedi se u odmjernoj tikvici od 10,00 mL metanolom i dobije otopina S1 koncentracije 2 $\mu\text{g/mL}$. Na isti način pripremaju se i ostale standardne otopine rosuvastatin kalcija – S2, S3, S4, S5 i S6 – za izradu kalibracijskog pravca, a detalji izrade prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Priprema standardnih otopina rosuvastatin kalcija

Standard	Koncentracija otopine rosuvastatin kalcija ($\mu\text{g/mL}$)	Postupak pripreme radnih standarda iz Stock 2 otopine rosuvastatin kalcija koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$	Razrjeđenje u odnosu na Stock 2 otopinu
S1	2	0,2 mL Stock 2 otopine u odmjernoj tikvici od 10,00 mL nadopuni se metanolom	50x
S2	5	0,5 mL Stock 2 otopine u odmjernoj tikvici od 10,00 mL nadopuni se metanolom	20x
S3	10	1,0 mL Stock 2 otopine u odmjernoj tikvici od 10,00 mL nadopuni se metanolom	10x
S4	15	1,5 mL Stock 2 otopine u odmjernoj tikvici od 10,00 mL nadopuni se metanolom	6,67x
S5	20	2,0 mL Stock 2 otopine u odmjernoj tikvici od 10,00 mL nadopuni se metanolom	5x
S6	30	3,0 mL Stock 2 otopine u odmjernoj tikvici od 10,00 mL nadopuni se metanolom	3,33x

3. 2. 2. Priprema uzoraka tableta za analizu rosuvastatin kalcija

Uzorci filmom obloženih tableta rosuvastatin kalcija prikupljeni su od tri različita proizvođača. Opisani postupak ponovljen je dva puta za svaki od triju uzoraka tako da je ukupno analizirano 6 različitih otopina uzoraka.

- Priprema uzoraka rosuvastatin kalcija

Pet tableta rosuvastatin kalcija različitih proizvođača izvaže se pojedinačno te se izračuna prosječna masa jedne tablete. Zatim se po dvije tablete u tarioniku usitne pistilom, a od dobivenog praha odvagane se prosječna masa jedne tablete, odnosno ekvivalent 20 mg rosuvastatin kalcija. Odvagnuta količina praha kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 50,00 mL i nadopuni s 30 mL metanola. Tako pripremljena otopina sonicira se 15 minuta, a zatim se nadopuni metanolom do oznake i centrifugira 10 minuta na 2000 rpm (Karunakaran i sur., 2011).

Kako bi se mogla provesti analiza UV-Vis spektrofotometrom, otopinu uzorka potrebno je razrijediti. Otpipetira se 500 μ L otopine u odmjernu tikvicu od 10,00 mL te nadopuni do oznake metanolom. Tako pripremljen uzorak može se analizirati UV-Vis spektrofotometrijom.

- Priprema uzoraka rosuvastatin kalcija metodom standardnog dodatka

Po 500 μ L otopine uzorka otpipetira se u odmjerne tikvice od 10,00 mL. Zatim se u svaku tikvicu doda standardna otopina rosuvastatin kalcija koncentracije 100 μ g/mL u količinama od 1, 2 i 5 mL te nadopuni metanolom do oznake da bi konačna koncentracija dodanog standarda u tikvicama bila 10, 20 i 30 μ g/mL.

3. 2. 3. Postupak određivanja koncentracije rosuvastatin kalcija u uzorcima

Princip korištene metode jest određivanje koncentracije rosuvastatin kalcija pomoću mjerenja apsorbancije. Uzorak se u kvarcnoj kivetici, debljine 1 cm, izlaže monokromatskom zračenju na valnoj duljini od 244 nm (UV područje) gdje rosuvastatin pokazuje apsorpcijski maksimum (Gupta i sur., 2008). Prolaskom kroz uzorak pada intenzitet zračenja što se bilježi detektorom (Harvey, 2000). Temeljem te promjene i softverskom obradom podataka dobiva se

apsorbancija uzorka. Daljnjom matematičkom obradom dobivenih podataka izračuna se sadržaj rosuvastatin kalcija u ispitivanim uzorcima.

Određivanju koncentracije rosuvastatin kalcija prethodi postavljanje instrumenta na nulu slijepom probom za što se koristi čisto otapalo – metanol, a on se koristi i za ispiranje kivete između svakog pojedinog mjerenja. Potom se provodi kalibracija instrumenta nizom standardnih otopina, a zatim se izrađuje kalibracijski pravac. Nakon kalibracije može se pristupiti mjerenjima uzoraka i određivanju koncentracije rosuvastatin kalcija u odabranim tabletama. Prije svakog mjerenja, uzorke u odmjernim tikvicama potrebno je homogenizirati protresivanjem tikvice, a zatim se kiveta ispere malom količinom uzorka, potom napuni i stavlja u držač kivete u instrumentu. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja te se izračunala srednja vrijednost dobivenih podataka.

3. 2. 4. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 8* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, SAD, www.graphpad.com). Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Svi doneseni zaključci u radu provedeni su uz razinu pouzdanosti od 95 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4. 1. Validacija analitičke metode

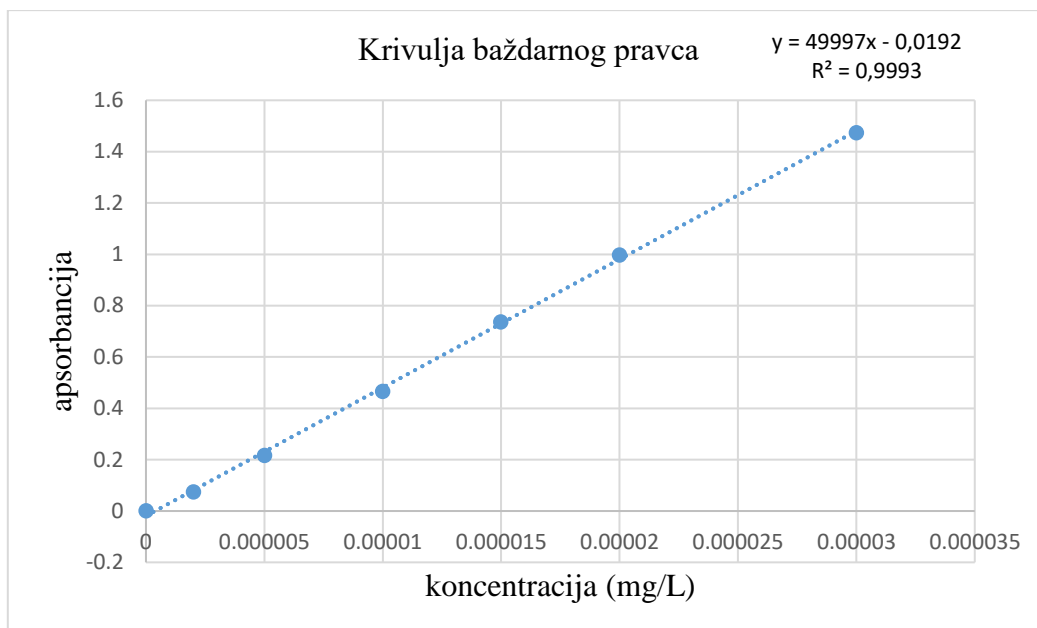
Korištenjem izrađenih otopina standarda i uzoraka rosuvastatin kalcija te slijepa probe provedena je analiza UV-Vis spektrofotometrom. Ispitani validacijski parametri uključuju linearnost, preciznost, točnost, granicu određivanja i granicu dokazivanja.

4. 1. 1. Linearnost

Procjena linearnosti metode zahtijeva 3 – 6 mjerenja na najmanje 5 različitih koncentracija (Nigović i sur., 2019). Prikazom ovisnosti izmjenjenog analitičkog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja karakterizirana jednačinom pravca $y = ax + b$ i koeficijentom korelacije čija vrijednost mora biti veća od 0,999 te se koristi za procjenu linearnosti analitičke metode (Nigović i sur., 2019; Stauffer, 2018; Medić-Šarić i sur., 2006).

Tablica 3. Prikaz apsorbancija standardnih otopina za izradu kalibracijske krivulje

c (mg/L) x 10⁻⁵	apsorbancija
0,2	0,0743
0,5	0,2157
1	0,4660
1,5	0,7362
2	0,9976
3	1,4736



Slika 4. Kalibracijska krivulja – ovisnost koncentracije standardnih otopina rosuvastatin kalcija i apsorbancije

Za izradu kalibracijske krivulje korišten je koncentracijski niz standardnih otopina rosuvastatin kalcija. Za svaku koncentraciju mjerenje je provedeno tri puta te je izračunata srednja vrijednost dobivenih apsorbancija. Iz podataka prikazanih u Tablici 3. regresijskom analizom dobivena je jednadžba kalibracijskog pravca $y = 49997x - 0,0192$ i koeficijent korelacije koji iznosi 0,9993. Vrijednost koeficijenta korelacije pokazuje da metoda ima prihvatljivu linearnost.

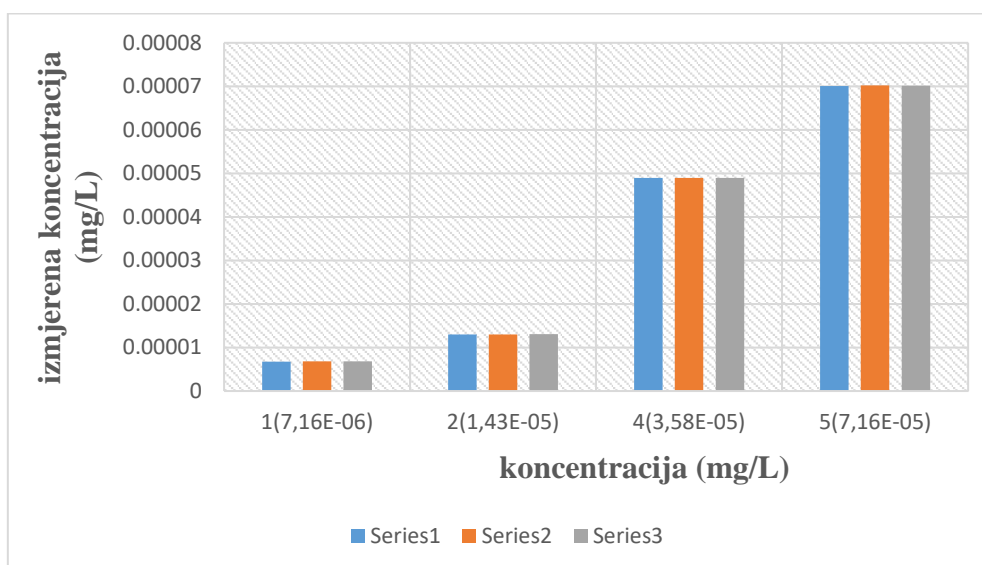
4. 1. 2. Preciznost

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Određuje se provođenjem 5 – 6 određivanja na 2 – 3 različite koncentracije te se izražava kao relativna standardna devijacija, RSD (%). Može se iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (Nigović i sur., 2019; Medić-Šarić i sur., 2006).

Ponovljivost metode utvrđena je provođenjem 3 mjerenja na 4 različite koncentracije standarda unutar jednog dana, a rezultati su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Ponovljivost metode

c (mg/L)	$7,16 \times 10^{-6}$	$1,43 \times 10^{-5}$	$3,58 \times 10^{-5}$	$7,16 \times 10^{-5}$
izmjerena koncentracija (mg/L)	$6,7432 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$	$4,89 \times 10^{-5}$	$7,01 \times 10^{-5}$
	$6,7893 \times 10^{-6}$	$1,31 \times 10^{-5}$	$4,89 \times 10^{-5}$	$7,02 \times 10^{-5}$
	$6,7963 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$	$4,90 \times 10^{-5}$	$7,02 \times 10^{-5}$
\bar{c}	$6,77627 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$	$4,89567 \times 10^{-5}$	$7,02 \times 10^{-5}$
SD ($\times 10^{-8}$)	2,88	2,44	2,67	5,11
RSD (%)	0,426	0,188	0,054	0,073



Slika 5. Graf ponovljivosti

Temeljem dobivenih vrijednosti RSD u rasponu 0,05 – 0,42 % zaključuje se da je metoda zadovoljavajuće ponovljivosti.

Uz ponovljivost, ispitana je i srednja preciznost mjerenjem apsorbancije četiri različite koncentracije standarda kroz tri dana. Temeljem dobivenih podataka, iz jednadžbe kalibracijske krivulje izračunate su stvarne koncentracije otopina. Statističkom analizom dobiveni su rezultati iskazani kao RSD i prikazani u Tablici 5. Iz dobivenih vrijednosti RSD može se zaključiti da je metoda zadovoljavajuće preciznosti. Najveće odstupanje od referentnih

vrijednosti uočeno je kod najmanje koncentracije standarda (2×10^{-6} mg/L) što može biti objašnjeno manjom stabilnošću standarda pri niskim koncentracijama.

Tablica 5. Srednja preciznost metode

c (mg/L)	2×10^{-6}	1×10^{-5}	2×10^{-5}	3×10^{-5}
1. dan	$2,614 \times 10^{-6}$	$9,988 \times 10^{-6}$	$2,038 \times 10^{-5}$	$2,994 \times 10^{-5}$
2. dan	$2,028 \times 10^{-6}$	$9,886 \times 10^{-6}$	$2,034 \times 10^{-5}$	$2,985 \times 10^{-5}$
3. dan	$2,248 \times 10^{-6}$	$1,003 \times 10^{-5}$	$2,0003 \times 10^{-5}$	$2,944 \times 10^{-5}$
\bar{c}	$2,30 \times 10^{-6}$	$9,97 \times 10^{-6}$	$2,02 \times 10^{-5}$	$2,97 \times 10^{-5}$
SD	$2,836 \times 10^{-7}$	$7,405 \times 10^{-8}$	$2,076 \times 10^{-7}$	$2,526 \times 10^{-7}$
RSD (%)	12,3	0,74	1,03	0,85

4. 1. 3. Granica dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ)

Granice određivanja i dokazivanja određuju se razrjeđivanjem ispitivane otopine. Mogu se odrediti iz omjera signala i šuma što je primjenjivo za metode koje pokazuju šum bazne linije. U većini slučajeva određuju se računski iz standardne devijacije odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepe probe, ostatne standardne devijacije regresijskog pravca ili y-odsječka regresijskog pravca i nagiba regresijskog pravca (Nigović i sur., 2019; Armbruster i Pry, 2008; Medić-Šarić i sur., 2006).

Standardna devijacija σ iznosi 0,0093, a nagib pravca a 50 490. Prema formulama za izračun granice određivanja (LOD) i određivanja (LOQ) danima u poglavlju 1.3., njihove vrijednosti su:

$$\text{LOD} = 6,078 \times 10^{-7} \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 1,842 \times 10^{-6} \text{ mg/L.}$$

4. 1. 4. Točnost

Točnost analitičke metode ukazuje na slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata sa stvarnom, odnosno prihvaćenom referentnom vrijednosti. Za procjenu točnosti potrebno je provesti najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode (Nigović i sur., 2019; Peters i sur., 2007). Točnost se izražava kao analitički prinos (engl. recovery), a izračunava se prema formuli:

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} * 100$$

gdje je \bar{x} izmjerena, a \hat{x} stvarna količina analita u uzorku (Nigović i sur., 2019).

Točnost je ispitana mjerenjem apsorbancije otopine Uzorka 1. U otopine uzorka dodano je po 1, 2 i 5 mL Stock 2 otopine koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$ da bi konačna koncentracija dodanog standarda u tikvicama bila 10, 20 i 30 $\mu\text{g/mL}$. te je ponovno izmjerena apsorbancija. Iz dobivenih podataka izračunata je koncentracija rosuvastatin kalcija te analitički prinos. Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa kreću se između 95,34 % i 102,76 % temeljem čega se može zaključiti da je metoda prihvatljive točnosti. Podaci i rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Analitički prinos rosuvastatin kalcija u Uzorku 1

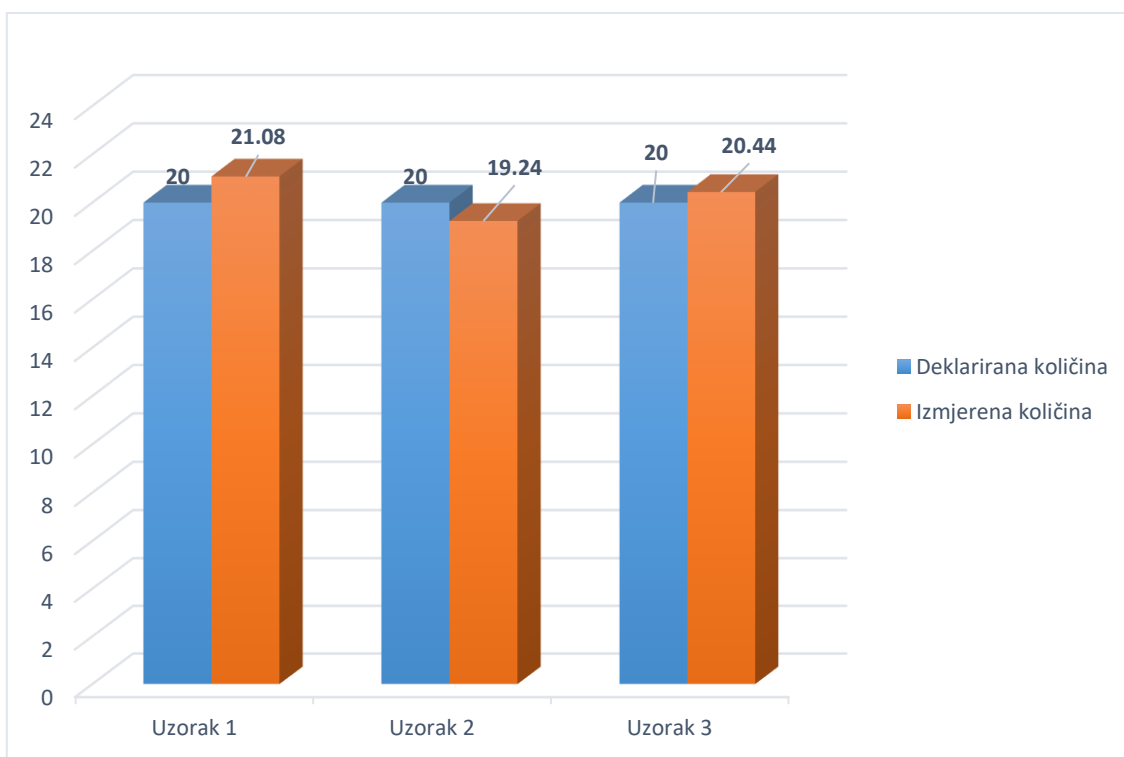
\bar{c} ($\mu\text{g/mL}$) uzorka + c ($\mu\text{g/mL}$) dodanog standarda	ukupna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	izmjerena koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	koncentracija dodanog standarda ($\mu\text{g/mL}$)	analitički prinos (%)
20,876 + 10	30,876	31,414	10,17	101,74
20,876 + 20	40,876	42,0052	20,55	102,76
20,876 + 30	50,876	72,754	28,60	95,35

4. 2. Određivanje mase rosuvastatin kalcija u uzorcima tableta

Nakon provedene validacije i optimizacije metode provedeno je ispitivanje količine rosuvastatin kalcija u uzorcima tableta triju različitih proizvođača. Uzorci su pripremljeni prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Za svaki od tri uzorka otopine su rađene u duplikatu, pa je dobiveno šest uzoraka koji su podvrgnuti analizi. Svaka ispitivana otopina mjerena je tri puta. Iz izmjerene apsorbancije izračunate su koncentracije rosuvastatin kalcija u svakoj otopini, a daljnjom obradom podataka dobivene su mase rosuvastatin kalcija, izražene u miligramima po jednoj tableti, za svaki uzorak. Deklarirani sadržaj rosuvastatina u tabletama svih proizvođača iznosi 20 mg po tableti. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 6.

Tablica 7. Izmjerene mase rosuvastatina u uzorcima tableta

	Uzorak 1 (mg/tbl)	Uzorak 2 (mg/tbl)	Uzorak 3 (mg/tbl)
\bar{m}	21,08	19,24	20,44
$\bar{m} \pm SD$	21,08 \pm 0,29	19,24 \pm 0,065	20,44 \pm 0,023



Slika 6. Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja rosuvastatina (mg/tableta)

Usporedbom dobivenih vrijednosti kod svih ispitivanih uzoraka s deklariranim sadržajem pokazalo se da ne postoji statistički značajno odstupanje od stvarnih vrijednosti. Iz dijagrama na slici 6. vidljivo je da količina rosuvastatina u uzorcima 1 i 3 nadmašuje deklarirani sadržaj od 20 mg po tableti, dok je u uzorku 2 nešto niža od deklarirane. U uzorku 3 vrijednost je najbliža deklariranoj, a najveće odstupanje pokazuje uzorak 1. Ovakva neslaganja mogu se objasniti sustavnim, grubim i slučajnim pogreškama tijekom cjelokupne analize (Harvey, 2009). Odstupanja u rezultatima mogu biti posljedica sistemskih pogrešaka. One se odnose na korišteni instrument i proces mjerenja. Nadalje, u svim analizama ključna je čistoća laboratorijskog posuđa i pribora koji se koristi kako bi dobiveni rezultati bili točni. Pogreške i propusti analitičara tijekom cijele analize, a posebice prilikom osjetljivijih radnji, poput pipetiranja malih volumena ili nadopunjavanja odmjernih tikvica, također utječu na rezultate. Ekstrakcija rosuvastatina iz filmom obloženih tableta može biti nepotpuna zbog nejednake veličine čestica nakon usitnjavanja tableta kao i zaostajanja manje količine analita na stijenkama tarionika i ostalog korištenog posuđa što može biti uzrok dobivanja vrijednosti manjih od deklariranih.

Unatoč ovim odstupanjima, primijenjena metoda je linearna, precizna i točna (Lahare i sur., 2014). UV-Vis je široko dostupna metoda te predstavlja dodatnu i jednostavnu opciju za analizu rosuvastatin kalcija u gotovim pripravcima uz metode koje su za tu svrhu u širokoj primjeni, poput HPLC-a (engl. *high-performance liquid chromatography*) – tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (Deshpande i Gunge, 2018; Baldut i sur., 2015; Gomes i sur., 2009; Gupta i sur., 2009).

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedene analize, obrade dobivenih rezultata i rasprave, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Inhibitori HMG-CoA, među kojima je i rosuvastatin, nalaze se među skupinama lijekova koje se najviše primjenjuju, stoga su potrebne jednostavne, precizne, brze i jeftine metode za njihovu analizu.
- UV-Vis je brza, jednostavna i jeftina metoda za određivanje koncentracije rosuvastatin kalcija. Metoda je u širokoj primjeni, naročito u analitici lijekova gdje se koristi za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava lijekova, određivanje sadržaja, ispitivanje čistoće i identifikaciju.
- Temeljem dobivenih podataka zaključeno je da je metoda linearna, precizna i točna te se može primijeniti za određivanje koncentracije rosuvastatin kalcija u gotovim oblicima.
- U ispitivanim uzorcima rosuvastatin kalcij je nađen u količinama od 19,24 do 21,08 mg/tbl što ne predstavlja statistički značajno odstupanje od deklariranih vrijednosti.

6. LITERATURA

Armbruster DA, Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev*, 2008, 29, 49-52.

Baldut M, Bonafede SL, Petrone L, Simionato LD, Segall AI. Development and Validation of a Complexometric Titration Method for the Determination of Rosuvastatin Calcium in Raw Material. *Advances in Research*, 2015, 5, 1-8.

Deshpande P, Gunge A. Simultaneous Estimation of Rosuvastatin Calcium and Ezetimibe as Bulk Drug and in Tablet Dosage Form by RP-HPLC Method. *Indo Am J Pharm Res*, 2018, 5, 3197-3202.

Dislipidemija, 2014, www.msd-prirucnici.placebo.hr, pristupljeno 10. 1. 2021.

George G, Wilson R, Joy J. Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization: Ultraviolet spectroscopy: A Facile Approach for the Characterization of Nanomaterials. Thomas S, Thomas R, Zachariah AK, Mishra RK, Amsterdam, Elsevier, 2017, str. 55-72

Gomes FP, Garcia PL, Alves JMP, Singh AK, Kedor-Hackmann ERM, Santoro MIRM. Development and Validation of Stability-Indicating HPLC Methods for Quantitative Determination of Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, and Rosuvastatin in Pharmaceuticals. *Analytical Letters*, 2009, 42, 1784-1804.

Gupta A, Mishra P, Shah K. Simple UV Spectrophotometric Determination of Rosuvastatin Calcium in Pure Form and in Pharmaceutical Formulations. *J Chem*, 2009, 6, 89-92.

Harvey D. Modern Analytical Chemistry: Spectroscopic Methods. New York, McGraw-Hill, 2000, str. 543-599

Harvey D. Analytical Chemistry 2.0: Evaluating Analytical Data, 2009, str. 63-152

ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995, www.ema.europa.eu, pristupljeno 5. 11. 2020.

Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2019. godini, 2020, www.hzjz.hr, pristupljeno 10. 1. 2021.

Karunakaran A, Subhash V, Chinthala R, Muthuvijayan J. Simultaneous Estimation of Rosuvastatin Calcium and Fenofibrate in Bulk and in Tablet Dosage Form by UV-Spectrophotometry and RP-HPLC. *S J Pharm Sci*, 2011, 4, 58-63.

Lahare RY, Phuge AN, Gite AL, Jadhav AK. A Review on Ultraviolet Spectrophotometric Determination of Rosuvastatin Calcium in Marketed Formulation. *Int J Pure App Biosci*, 2014, 2, 169-174.

Luvai A, Mbagaya W, Hall AS, Barth JH. Rosuvastatin: A review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. *Clin Med Insights: Cardiol*, 2012, 6, 17-33.

Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Hill SJ, Giles BP, Lenz E. Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics of Rosuvastatin in Healthy Adult Male Volunteers. *Clin Ther*, 2003, 25, 2822-2835.

Medić-Šarić M, Jasprica I, Debeljak Ž. Uvod u validaciju metoda analize lijekova. *Farm Glas*, 2006, 1-8.

Nigović B, Mornar Turk A, Sertić M, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J. Vježbe iz analitike lijekova – priručnik za studente farmacije: Validacija analitičkog postupka. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2019, str. 150-155.

Olsson AG, Istad H, Luurila O, Ose L, Stender S, Tuomilehto J, Wiklund O, Southworth H, Pears J, Wilpshaar JW. Effects of rosuvastatin and atorvastatin compared over 52 weeks of treatment in patients with hypercholesterolemia. *Am Heart J*, 2002, 144, 1044-1051.

Passos MLC, Saraiva MLMF. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems and detection strategies. *Measurement*, 2018, 897-902.

Peters FT, Drummer OH, Musshof S. Validation of new methods, *Forensic Sci Int*, 2007, 165, 216-224.

Raja PMV, Barron AR. Physical Methods in Chemistry and Nanoscience: UV-Visible Spectroscopy. Houston, Rice University, 2020, str. 248-249

Riley CM, Rosanske TW. Development and Validation of Analytical Methods. New York, Pergamon, 1996, str. 3

Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005, 19, 117-125.

Stancu S, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 2001, 5, 378-387.

Stauffer MT. Calibration and Validation of Analytical Methods – A Sampling of Current Approaches: Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. London, IntechOpen, 2018, str. 109-127.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Inhibitori HMG-CoA reduktaze, odnosno statini, važna su skupina lijekova u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Inhibicijom biosinteze kolesterola u jetri umanjuju njegove mnoge negativne učinke na organizam te se njihovom primjenom može smanjiti nastanak kardiovaskularnih incidenata. Rosuvastatin je najpotentniji lijek iz ove skupine dostupan na hrvatskom tržištu. Njegova kemijska svojstva i potentnost, u odnosu na prijašnje generacije statina, omogućuju primjenu u nižim dozama što posljedično dovodi do manje nuspojave od kojih neke, poput rabdomiolize, mogu ozbiljno ugroziti zdravlje i život pacijenta. Budući da se gotovo ne metabolizira CYP enzimima, pogodan je za kombiniranje s ostalim lijekovima koji su nužni u terapiji kardiovaskularnih bolesti, ali i drugih stanja.

Cilj ovog istraživanja bio je validirati UV-Vis metodu i primijeniti ju za točno i precizno određivanje koncentracije rosuvastatina u odabranim gotovim formulacijama. Usporedbom dobivenih rezultata i sadržaja deklariranog na ispitivanim uzorcima utvrđena je njihova podudarnost.

Analiza uzoraka provedena je na UV-Vis spektrofotometru. Prikupljena su tri uzorka filmom obloženih tableta rosuvastatin kalcija različitih proizvođača. Kvantitativnom ekstrakcijom rosuvastatina iz tableta dobivene su otopine koje su podvrgnute soniciranju i centrifugiranju, a zatim razrijeđene i analizirane. Nakon trodnevne analize dobiveni su podaci statistički obrađeni i izračunata je masa rosuvastatina u svakom uzorku. Dobiveni rezultati uspoređeni su s deklariranom masom rosuvastatina u tabletama. Odstupanja koja su uočena mogu biti posljedica sustavnih, grubih i slučajnih pogrešaka prilikom analize.

HMG-CoA inhibitors, also known as statins, are drugs with an important role in primary and secondary prevention of cardiovascular diseases. By inhibiting cholesterol biosynthesis in the liver, they reduce its negative effects on the body and lower the likelihood of cardiovascular adverse events. Rosuvastatin is the most effective statin on the Croatian market. Its chemical properties and potency allow us to use the drug in lower doses. Consequently, lower doses result in less side effects, some of which, such as rhabdomyolysis, pose a significant threat to patients' life and health. In addition, because rosuvastatin is minimally metabolised by CYP enzymes, the probability of interactions with drugs that are used to treat cardiovascular or other diseases is reduced.

The aim of this study was to validate the UV-Vis method and investigate its application for a precise and accurate determination of rosuvastatin concentration in selected drug formulations. A comparison of the measured data with the data reported by the tablet manufacturers was performed to ensure consistency.

The measurements were carried out on a UV-Visible spectrophotometer. Three samples of film-coated tablets were purchased from different manufacturers. To quantitatively extract rosuvastatin from the formulations, the solutions were sonicated, centrifuged, and then diluted for the analysis. After a three-day measurement, the results were statistically analysed. The masses of rosuvastatin obtained were compared to those reported by the manufacturers. Some minor deviations that were found can be attributed to systematic and random errors.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE ROSUVASTATINA U GOTOVIM FARMACEUTSKIM OBLICIMA

Andrea Benković

SAŽETAK

Inhibitori HMG-CoA reduktaze, odnosno statini, važna su skupina lijekova u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Inhibicijom biosinteze kolesterola u jetri umanjuju njegove mnoge negativne učinke na organizam te se njihovom primjenom može smanjiti nastanak kardiovaskularnih incidenata. Rosuvastatin je najpotentniji lijek iz ove skupine dostupan na hrvatskom tržištu. Njegova kemijska svojstva i potentnost, u odnosu na prijašnje generacije statina, omogućuju primjenu u nižim dozama što posljedično dovodi do manje nuspojava od kojih neke, poput rabdomiolize, mogu ozbiljno ugroziti zdravlje i život pacijenta. Budući da se gotovo ne metabolizira CYP enzimima, pogodan je za kombiniranje s ostalim lijekovima koji su nužni u terapiji kardiovaskularnih bolesti, ali i drugih stanja.

Cilj ovog istraživanja bio je validirati UV-Vis metodu i primijeniti ju za točno i precizno određivanje koncentracije rosuvastatina u odabranim gotovim formulacijama. Usporedbom dobivenih rezultata i sadržaja deklariranog na ispitivanim uzorcima utvrđena je njihova podudarnost.

Analiza uzoraka provedena je na UV-Vis spektrofotometru. Prikupljena su tri uzorka filmom obloženih tableta rosuvastatin kalcija različitih proizvođača. Kvantitativnom ekstrakcijom rosuvastatina iz tableta dobivene su otopine koje su podvrgnute soniciranju i centrifugiranju, a zatim razrijeđene i analizirane. Nakon trodnevne analize dobiveni su podatci statistički obrađeni i izračunata je masa rosuvastatina u svakom uzorku. Dobiveni rezultati uspoređeni su s deklariranom masom rosuvastatina u tabletama. Odstupanja koja su uočena mogu biti posljedica sustavnih, grubih i slučajnih pogrešaka prilikom analize.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 6 grafičkih prikaza, 7 tablica i 24 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: rosuvastatin, UV-Vis spektrofotometrija, validacija analitičke metode

Mentor: **doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

METHOD OPTIMIZATION FOR DETERMINATION OF ROSUVASTATIN IN MARKETED FORMULATIONS

Andrea Benković

SUMMARY

HMG-CoA inhibitors, also known as statins, are drugs with an important role in primary and secondary prevention of cardiovascular diseases. By inhibiting cholesterol biosynthesis in the liver, they reduce its negative effects on the body and lower the likelihood of cardiovascular adverse events. Rosuvastatin is the most effective statin on the Croatian market. Its chemical properties and potency allow us to use the drug in lower doses. Consequently, lower doses result in less side effects, some of which, such as rhabdomyolysis, pose a significant threat to patients' life and health. In addition, because rosuvastatin is minimally metabolised by CYP enzymes, the probability of interactions with drugs that are used to treat cardiovascular or other diseases is reduced.

The aim of this study was to validate the UV-Vis method and investigate its application for a precise and accurate determination of rosuvastatin concentration in selected drug formulations. A comparison of the measured data with the data reported by the tablet manufacturers was performed to ensure consistency.

The measurements were carried out on a UV-Visible spectrophotometer. Three samples of film-coated tablets were purchased from different manufacturers. To quantitatively extract rosuvastatin from the formulations, the solutions were sonicated, centrifuged, and then diluted for the analysis. After a three-day measurement, the results were statistically analysed. The masses of rosuvastatin obtained were compared to those reported by the manufacturers. Some minor deviations that were found can be attributed to systematic and random errors.

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

Thesis includes: 35 pages, 6 figures, 7 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: rosuvastatin, UV-Visible spectrophotometry, validation

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2021.