

Određivanje fosfata ionskom kromatografijom u različitim ljekovitim tekućim oblicima uz ispitivanje razvojno-validacijskih parametara

Grbavac, Maria

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:163:331547>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



Maria Grbavac

**Određivanje fosfata ionskom kromatografijom u
različitim ljekovitim tekućim oblicima uz ispitivanje
razvojno-validacijskih parametara**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović, a izrađen je u Jadran-Galenskom Laboratoriju d.d., na odjelu Razvojna analitika, pod stručnim vodstvom dr. sc. Danijele Štanfel i suvodstvom Vlaste Bujan, mag. pharm.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Biljani Nigović koja je prepoznala priliku i time pokrenula ovo moje zanimljivo iskustvo.

Zahvaljujem se dr.sc. Danijeli Štanfel na vremenu, trudu i stručnom vodstvu prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se Vlasti Bujan koja je tijekom cijele odrade eksperimentalnog dijela rada bila uz mene u laboratoriju i vodila me uz puno strpljenja i razumijevanja.

Hvala svim djelatnicima odjela Razvojna analitika JGL d.d. što su pokazali iznimno gostoprimstvo, pogotovo u ovo zahtjevno vrijeme.

Veliko hvala mojoj obitelji koja mi je uvijek u životu bila podrška u svemu i što su me znali potaknuti da se dalje trudim, ali još važnije, ukazati mi kad je vrijeme da se opustim.

Hvala mojim kolegama i prijateljima uz koje je vrijeme studiranja bilo puno zabavnije, a svi problemi puno lakši nakon što bismo ih podijelili.

We are not thinking machines that feel, we are feeling machines that think.

– Antonio R. Damasio

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. KROMATOGRAFIJA | 2 |
| 1.1.1. KROMATOGRAFSKI POJMOVI | 2 |
| 1.1.2. VRSTE KROMATOGRAFIJE | 6 |
| 1.1.3. IONSKA KROMATOGRAFIJA | 7 |
| 1.1.3.1. PROCES IONSKE IZMJENE..... | 7 |
| 1.1.3.2. KOMPONENTE IONSKOG KROMATOGRAFA | 9 |
| 1.1.3.3. STACIONARNA FAZA | 9 |
| 1.1.3.4. MOBILNA FAZA | 11 |
| 1.1.3.5. SUPRESOR..... | 13 |
| 1.1.3.6. DETEKTOR | 14 |
| 1.2. RAZVOJ I VALIDACIJA METODE | 19 |
| 1.3. ULOGA FOSFATA U FARMACEUTSKIM FORMULACIJAMA..... | 24 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 27 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 29 |
| 3.1. STANDARDI..... | 30 |
| 3.2. REAGENSI | 30 |
| 3.3. APARATURA I MATERIJALI..... | 30 |
| 3.4. UZORCI..... | 31 |
| 3.5. PLACEBO UZORCI | 31 |
| 3.6. PRIPREMA OTOPINA..... | 32 |
| 3.7. UVJETI RADA U VALIDACIJI METODE..... | 37 |
| 3.8. PARAMETRI PRIKLADNOSTI SUSTAVA..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.9. PARAMETRI VALIDACIJE METODE | 38 |
| 3.10. PROVEDBA POSTUPKA VALIDACIJE METODE | 38 |
| 3.11. OBRADA PODATAKA | 41 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 42 |
| 4.1. PREGLED LITERATURE I ODABIR METODE | 43 |
| 4.2. OPTIMIRANJE UVJETA METODE | 45 |
| 4.3. SELEKTIVNOST | 48 |
| 4.4. TOČNOST | 49 |
| 4.5. LINEARNOST | 52 |
| 4.6. PODRUČJE RADA | 53 |
| 4.7. PRECIZNOST SUSTAVA | 53 |
| 4.8. PRECIZNOST METODE | 54 |
| 4.9. SREDIŠNJA PRECIZNOST | 56 |
| 4.10. ROBUSNOST/OTPORNOST – ISPITIVANJE UTJECAJA FILTRIRANJA | 58 |
| 4.11. ROBUSNOST/OTPORNOST – STABILNOST OTOPINA | 61 |
| 4.12. ROBUSNOST/OTPORNOST – PROMJENE UVJETA METODE | 64 |
| 5. ZAKLJUČCI | 68 |
| 6. LITERATURA | 70 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY | 73 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je široko rasprostranjena metoda za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju sastavnica u složenim smjesama. Nema metode odjeljivanja koja je toliko moćna i toliko opće primjenjiva poput kromatografije.

Ime kromatografija povezano je s nastankom tehnike. Ruski botaničar Mikhail Tswett, koji je razvio tehniku početkom 20. stoljeća, koristio ju je kako bi odvojio biljne pigmente propuštanjem otopina kroz staklene kolone punjene usitnjenim kalcijevim karbonatom, pri čemu su se na koloni stvarale obojene vrpce (grč. *chromos* – boja, *graphein* – pisati). (Skoog i sur., 2014)

Pojam kromatografija teško je strogo definirati zato što je primijenjen na nekoliko sustava i tehnika, ali ono što je zajedničko svim metodama je upotreba stacionarne faze i mobilne faze. Stacionarna faza je učvršćena na mjestu, na ravnoj površini ili u koloni. Mobilna faza se kreće preko ili kroz stacionarnu fazu noseći sastavnice smjese. Kromatografija je tehnika kojom se sastavnice smjese odjeljuju na temelju razlike u brzinama kojima putuju kroz stacionarnu fazu nošene mobilnom fazom. (Skoog i sur., 2014)

1.1.1. KROMATOGRAFSKI POJMOVI

Elucija je proces kojim se kretanjem mobilne faze kroz stacionarnu fazu ispiru analizirane sastavnice smjese ili analiti. Mobilna faza se naziva i eluent. Potpuna elucija analita postiže se primjenom dovoljne količine eluenta. Mobilna faza i analiti nakon prolaska kroz stacionarnu fazu čine eluat, koji se može analizirati.

Kromatogram je ispis funkcije koncentracije analita u ovisnosti o vremenu elucije ili volumenu elucije. Koristan je za kvalitativne i kvantitativne analize. Idealan kromatogram predstavlja niz *Gaussian* pikova na baznoj liniji. Pik je dio kromatograma koji sadrži odgovor detektora kada je pojedina sastavnica smjese (ili više neodijeljenih sastavnica smjese) prisutna u eluatu. Pik može biti definiran svojom površinom, visinom i širinom na polovici visine ili visinom i širinom između točaka infleksije. Pomoću položaja pika na vremenskoj ili volumnoj osi mogu se identificirati analiti. Pomoću visine ili površine pika mogu se kvantificirati analiti. (Skoog i sur., 2014; Ph. Eur.)

Mrtvo vrijeme (t_M) je vrijeme potrebno za prolazak nezadržane sastavnice smjese kroz stacionarnu fazu. Mjera je prosječne brzine kretanja mobilne faze. Sve sastavnice smjese moraju provesti barem toliko vremena u mobilnoj fazi. Vrijeme zadržavanja (t_R) je vrijeme potrebno za prolazak analita kroz stacionarnu fazu. Odjeljivanje se temelji na različitim vremenima koje sastavnice smjese provode u stacionarnoj fazi. Vrijeme provedeno u stacionarnoj fazi možemo označiti s (t_S). Tada za vrijeme zadržavanja vrijedi: $t_R = t_S + t_M$. (Skoog i sur., 2014)

Mrtvi volumen (V_M) je volumen mobilne faze potreban za eluciju nezadržane sastavnice smjese. Može se izračunati iz mrtvog vremena i brzine protoka mobilne faze. Volumen zadržavanja (V_R) je volumen mobilne faze potreban za eluciju analita. Može se izračunati iz vremena zadržavanja i brzine protoka mobilne faze. (Ph. Eur.)

Prosječna brzina kretanja molekula mobilne faze (u) je:

$$u = \frac{L}{t_M}$$

u – prosječna brzina kretanja molekula mobilne faze

L – duljina stacionarne faze

Prosječna brzina kretanja molekula analita (\bar{v}) je:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

\bar{v} – prosječna brzina kretanja molekula analita

L – duljina stacionarne faze

Kromatografska odjeljivanja temelje se na razlikama u raspodjeli sastavnica smjese između mobilne i stacionarne faze. Konstanta distribucije (K_c) je konstanta ravnoteže raspodjele između mobilne i stacionarne faze. (Skoog i sur., 2014)

$$K_c = \frac{a_S}{a_M} \approx \frac{c_S}{c_M}$$

K_c – konstanta distribucije za analiziranu tvar

a_S – aktivitet analizirane tvari u stacionarnoj fazi

a_M – aktivitet analizirane tvari u mobilnoj fazi

c_S – molarna koncentracija analizirane tvari u stacionarnoj fazi

c_M – molarna koncentracija analizirane tvari u stacionarnoj fazi

Brzina kretanja molekula analita udio je brzine kretanja molekula mobilne faze ovisan o vremenu koje molekule analita provode u mobilnoj fazi. Udio je jednak množini molekula analita u mobilnoj fazi podijeljen s ukupnom množinom molekula analita u obje faze u bilo kojem trenutku. (Skoog i sur., 2014)

Iz toga možemo izraziti brzinu kretanja molekula analita kao funkciju konstante distribucije:

$$\bar{v} = u^* \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u^* \frac{1}{1 + c_S V_S / c_M V_M} = u^* \frac{1}{1 + K_c V_S / V_M}$$

V_S – volumen stacionarne faze

V_M – volumen mobilne faze

Faktor zadržavanja k (ili faktor kapaciteta) je parametar koji opisuje kretanje analita kroz stacionarnu fazu i omogućuje usporedbu brzina kretanja analita.

$$k = \frac{K_c V_S}{V_M}$$

Brzinu kretanja analita možemo izraziti kao funkciju faktora zadržavanja:

$$\bar{v} = u^* \frac{1}{1+k}$$

Faktor zadržavanja moguće je odrediti iz kromatograma:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} * \frac{1}{1+k}$$

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

Faktor zadržavanja je vrijeme koje analit provodi u stacionarnoj fazi u odnosu na vrijeme koje provodi u mobilnoj fazi.

Relativno zadržavanje α (ili koeficijent selektivnosti) za dva analita je definiran kao omjer konstante distribucije snažnije zadržanog analita i konstante distribucije slabije zadržanog analita. (Skoog i sur., 2014)

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

K_A – konstanta distribucije za analit A

K_B – konstanta distribucije za analit B

Relativno zadržavanje može se izraziti i pomoću faktora zadržavanja.

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

k_A – faktor zadržavanja za analit A

k_B – faktor zadržavanja za analit B

Relativno zadržavanje se poput faktora zadržavanja može odrediti pomoću kromatograma.

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

$(t_R)_A$ – vrijeme zadržavanja za analit A

$(t_R)_B$ – vrijeme zadržavanja za analit B

Relativno zadržavanje mjera je učinkovitosti odjeljivanja analita.

Razlučivanje (R_s) govori o tome koliko su udaljeni signali dvaju analita s obzirom na širinu signala.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B}$$

w_A – širina signala na baznoj liniji za analit A

w_B – širina signala na baznoj liniji za analit B

Razlučivanje se može izračunati i prema jednadžbi iz Europske farmakopeje (Ph. Eur.):

$$R_s = \frac{1,18[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_{hA} + w_{hB}}$$

w_{hA} – širina pika na polovici visine pika za analit A

w_{hB} – širina pika na polovici visine pika za analit B

Razlučivanje je mjera odvajanja dva analita. Razlučivanje $\geq 1,5$ odgovara gotovo potpunom odjeljivanju analita uz preklapanje signala $\leq 0,3\%$. (Skoog i sur., 2014)

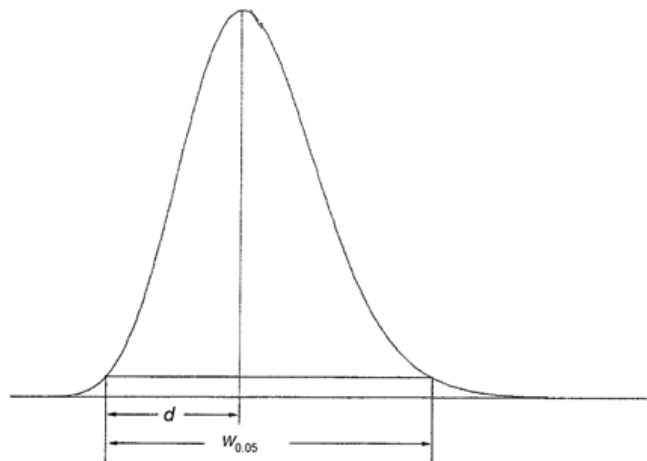
Faktor simetrije (A_s) mjera je simetrije pika. Računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ – širina pika na 1/20 visine pika

d – udaljenost između okomice iz vrha pika i vodećeg ruba pika na 1/20 visine pika (Slika 1).

Vrijednost od 1,0 odgovara simetričnom piku. Kada je vrijednost $> 1,0$ govorimo o *tailing-u* pika, a kada je $< 1,0$ govorimo o *fronting-u* pika.



Slika 1: Prikaz veličina potrebnih za računanje faktora simetrije (Ph. Eur.)

1.1.2. VRSTE KROMATOGRAFIJE

Kromatografske metode mogu se podijeliti na dva osnovna tipa. U kolonskoj kromatografiji stacionarna faza je podržana uskom cijevi, a mobilna faza se kreće kroz cijev pod utjecajem gravitacije ili tlaka. U plošnoj kromatografiji, stacionarna faza je podržana papirom ili ravnom plohom, a mobilna faza se kreće preko površine pod utjecajem gravitacije ili kapilarne sile. Kemijska ravnoteža temelj je i plošne i kolonske kromatografije. (Skoog i sur., 2014)

Kolonska kromatografija se može podijeliti na tri kategorije prema prirodi mobilne faze na: tekućinsku kromatografiju, plinsku kromatografiju i kromatografiju superkritičnim fluidom. Tekućinska kromatografija se prema prirodi stacionarne faze i vrsti kemijske ravnoteže između faza može podijeliti na:

- razdjelnu kromatografiju
- adsorpcijsku kromatografiju
- ionsku kromatografiju
- kromatografiju isključenjem (engl. *size exclusion chromatography*)
- afinitetnu kromatografiju (Skoog i sur., 2014)

1.1.3. IONSKA KROMATOGRAFIJA

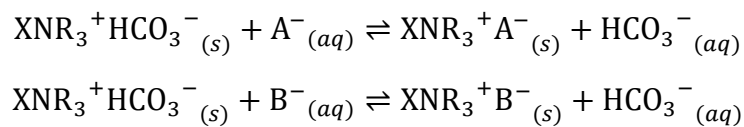
Ionska kromatografija je vrsta tekućinske kromatografije u kojoj se odjeljivanje temelji na procesu ionske izmjene kojim se ioni vezani za poroznu, u suštini netopljivu krutinu izmjenjuju s ionima u otopini koja se nalazi u dodiru s krutinom. Uvedena je kao nova analitička tehnika 1975. godine radom znanstvenika Smalla, Stevensa i Baumana. Vrlo se brzo razvila od novog načina odjeljivanja i detektiranja nekoliko odabranih anorganskih aniona i kationa do svestrane analitičke tehnike za ionske vrste općenito. (Skoog i sur., 2014; Weiss, 2004; Fritz i Gjerde, 2009)

1.1.3.1. PROCES IONSKE IZMJENE

Stacionarna faza za izmjenu kationa sadrži kisele skupine, dok ona za izmjenu aniona sadrži bazne skupine. Snažan kationski izmjenjivač sadrži sulfonske skupine ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$), dok slabi kationski izmjenjivač sadrži karboksilne skupine ($-\text{COO}^-\text{H}^+$). Snažan anionski izmjenjivač sadrži kvarterne amonijeve skupine [$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$], dok slabi anionski izmjenjivač sadrži tercijarne ili sekundarne amine. (Skoog i sur., 2014)

Stacionarne faze na mjestima za ionsku izmjenu nose funkcionalne skupine stalnog naboja, dok se odgovarajući protuioni nalaze u blizini funkcionalnih skupina i osiguravaju električnu neutralnost. Protuioni mjesta za ionsku izmjenu mogu biti zamijenjeni ionima iz otopine. Različiti ioni iz uzorka imaju različite afinitete prema stacionarnoj fazi, stoga je različito trajanje njihovog vezanja za stacionarnu fazu što dovodi do odjeljivanja. (Weiss, 2004)

Kada se kroz kolonu za anionsku izmjenu koja sadrži kvarterne amonijeve skupine propušta otopina koja sadrži hidrogenkarbonatne anione, funkcionalne skupine nalaze se isključivo u hidrogenkarbonatnom obliku. Ako se uzorak s anionima A^- i B^- unese u kolonu, oni se izmjenjuju s hidrogenkarbonatnim ionima prema sljedećim ravnotežnim reakcijama:



Konstante ravnoteže za navedene reakcije su:

$$K'_A = \frac{[A^-]_s [\text{HCO}_3^-]_{aq}}{[A^-]_{aq} [\text{HCO}_3^-]_s} \qquad K'_B = \frac{[B^-]_s [\text{HCO}_3^-]_{aq}}{[B^-]_{aq} [\text{HCO}_3^-]_s}$$

Konstanta ravnoteže reakcije je koeficijent selektivnosti. On se može eksperimentalno odrediti dodatkom određene količine stacionarne faze mobilnoj fazi s poznatom koncentracijom iona A^- , B^- i HCO_3^- . Nakon postizanja ravnotežnog stanja, odredi se koncentracija izmijenjenih iona u mobilnoj i stacionarnoj fazi. (Weiss, 2004)

Uobičajeno je da je koncentracija tvari u krutom stanju konstantna, ali u ovom slučaju koncentracije iona vezanih za stacionarnu fazu mogu varirati od nule do maksimalne vrijednosti kada se na svim mjestima ionske izmjene nalazi ista ionska vrsta. (Skoog i sur., 2014)

Odjeljivanja ionskom izmjenom uglavnom se provode u uvjetima u kojima jedan ion prevladava u obje faze. U navedenom primjeru, koncentracija hidrogenkarbonatnih iona prevladava nad koncentracijama iona A^- i B^- iz uzorka u obje faze te se može smatrati konstantom. (Skoog i sur., 2014)

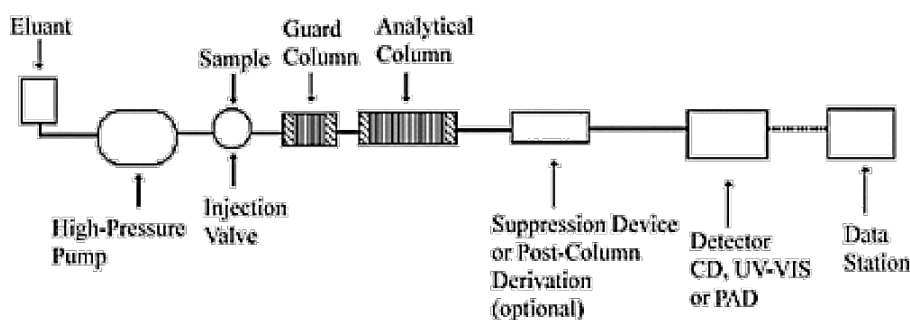
Time dolazimo do jednadžbe za konstantu distribucije:

$$K_A = \frac{[A^-]_s}{[A^-]_{aq}} \qquad K_B = \frac{[B^-]_s}{[B^-]_{aq}}$$

Konstanta distribucije predstavlja afinitet stacionarne faze za ione iz uzorka u odnosu na protuione iz mobilne faze. Odabirom referentnog iona iz mobilne faze moguće je usporediti konstante distribucije raznih iona na određenoj stacionarnoj fazi. Općenito, konstanta distribucije proporcionalna je sklonosti zadržavanja iona. (Skoog i sur., 2014)

1.1.3.2. KOMPONENTE IONSKOG KROMATOGRAFA

Instrumenti za ionsku kromatografiju vrlo su slični uobičajenim instrumentima za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti. Uglavnom uključuju komponente poput uređaja za automatsko uzimanje uzoraka, pumpe za stvaranje visokog tlaka, ventila za unošenje uzoraka s petljom, zaštitne kolone, analitičke kolone, supresora ili ostalih oblika reakcijskih sustava za derivatizaciju analita nakon kolone, protočnog detektora i sustava za prikupljanje podataka (Slika 2). (USP)



Slika 2: Prikaz komponenti ionskog kromatografa (USP)

Kolone za ionsku kromatografiju često su izrađene od poli(eter-eter.ketona) ili ostalih polimera koji su inertni, zato što dolaze u kontakt s razrijeđenim kiselinama, lužinama ili otopinama soli. Duljina kolone je u rasponu 3-30 cm, a unutarnji promjer u rasponu 1-7,8 mm. Između pumpe i analitičke kolone mogu se nalaziti kolone čistači čija je namjena da uklone čestice ili onečišćenja iz eluenta, a mogu poboljšati detekciju analita smanjenjem šuma. Osim kolona čistača, postoje zaštitne kolone smještene između injektora i analitičke kolone koje su punjene istim punjenjem poput analitičke kolone. Tvari iz uzorka koje bi onečistile analitičku kolonu ostaju zarobljene u zaštitnoj koloni. Zaštitna kolona se redovito obnavlja i/ili mijenja. Zaštitne kolone produljuju vijek trajanja analitičkih kolona. Manje su od analitičkih kolona, ali doprinose trajanju odjeljivanja i mogu uzrokovati dodatno širenje pikova. (Fritz i Gjerde, 2009)

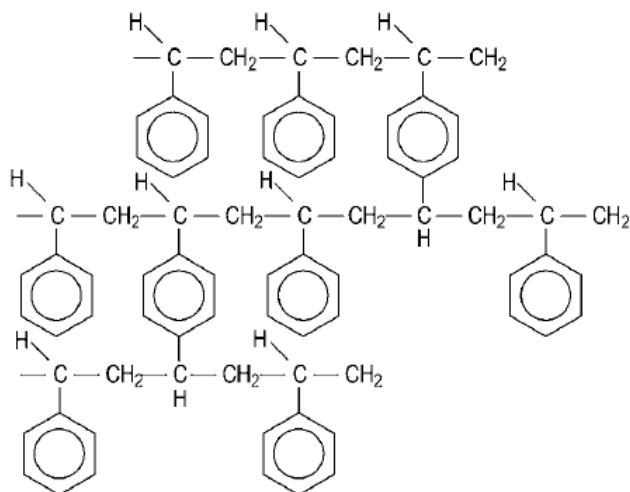
1.1.3.3. STACIONARNA FAZA

Usporedno s razvojem ionske kromatografije kao instrumentalne tehnike, raspon materijala za ionsku izmjenu se širio na temelju razumijevanja procesa koji se odvijaju na površini stacionarne faze. U klasičnoj tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti temelj

stacionarne faze su uglavnom silikati, dok se u ionskoj kromatografiji kao potporni materijali koriste uglavnom organski polimeri koji su stabilniji u širem rasponu pH vrijednosti. (USP)

Zbog polimerne strukture, stacionarne faze u ionskoj kromatografiji nazivamo smolama.

Niz polimernih supstrata može se koristiti za sintezu ionsko-izmjenjivačkih smola, uključujući polimere estera, amida i alkil halida, ali su prve po zastupljenosti smole temeljene na stiren-divinilbenzen kopolimerima. Većinu smole čini stiren, no mala količina divinilbenzena dodaje se tijekom procesa polimerizacije kako bi umrežila smolu (Slika 3). Umreženje dovodi do mehaničke stabilnosti polimerne čestice i smanjuje topljivost povećanjem molekulske mase prosječnog polimernog lanca. (Fritz i Gjerde, 2009)

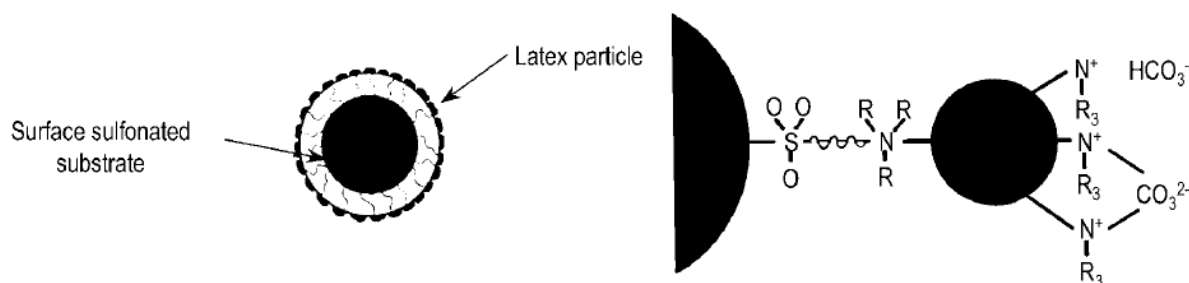


Slika 3: Prikaz strukture stiren-divinilbenzen kopolimera (Weiss, 2004)

Osim prema vrsti potpornog materijala, stacionarne faze mogu se klasificirati prema kapacitetu ionske izmjene i prema veličini pora. Kapacitet ionske izmjene je broj mjesta za ionsku izmjenu određene mase smole. Obično se izražava u količini (mol) jednostruko nabijenih skupina za ionsku izmjenu ili ekvivalentima (equiv) po gramu smole. Vrijeme zadržavanja iona proporcionalno je kapacitetu ionske izmjene smole. Kako bi došlo do elucije iona sa smole visokog kapaciteta, potrebna je velika ionska jakost eluenta, što otežava detekciju. Iz tog su razloga zastupljenije smole niskog kapaciteta. Prema veličini pora, polimerne smole mogu biti mikroporozne ili makroporozne. (Weiss, 2004)

Procesom funkcionalizacije, odnosno uvođenja prikladnih funkcionalnih skupina u polimerni matriks, nastaju ionski izmjenjivači. Kako bi došlo do potpune funkcionalizacije, mikroporozne smole moraju biti nabubrene, kako bi bile dostupne reakcijskom otapalu. Kod makroporoznih smola bubrenje nije nužno zato što je njihova površina dostupna otapalu. (Fritz i Gjerde, 2009)

Potpuna funkcionalizacija uglavnom nije poželjna, zato što površinski funkcionalizirane smole pokazuju puno višu kromatografsku učinkovitost. Takve smole nazivamo pelikularnim smolama. Poseban oblik pelikularnih smola su lateks smole. Lateks smole se sastoje od površinski sulfoniranih polistiren-divinilbenzen čestica promjera 5-25 μm i potpuno aminiranih polivinilbenzil klorid ili polimetakrilat čestica promjera 0,1 μm koje nazivamo lateks česticama (Slika 4). Manje čestice su aglomerirane na površinu većih čestica zahvaljujući elektrostatskim i van der Waalsovima interakcijama koje su kemijski stabilne. Lateks čestice imaju visoki ionski kapacitet zbog potpune aminacije, ali smola je niskog ionskog kapaciteta. Struktura smole odgovorna je za visoku kromatografsku učinkovitost. Mala veličina lateks čestica osigurava brzi proces ionske izmjene, dok naboj na velikim česticama sprječava difuziju iona u njihovu unutrašnjost. Zbog površinske funkcionalizacije potporne čestice su otpornije na bubrenje i pružaju mehaničku stabilnost. (Weiss, 2004)



Slika 4: Prikaz strukture lateks smole (Weiss, 2004)

1.1.3.4. MOBILNA FAZA

Mobilne faze obično se pripremaju otapanjem pufera, kiselina ili baza u vodenom otapalu ili u smjesi vodenog i organskog otapala. Mobilna faza koja ulazi u sustav ne bi smjela sadržavati čestice zato što one mogu ometati proces pumpanja i oštetiti dijelove pumpe. Čestice se mogu nakupljati i uzrokovati povećanje tlaka u sustavu. Mobilne faze ili voda i otopine soli, koje se koriste za pripremu mobilnih faza, filtriraju se kroz 0,2 ili 0,45 μm najlonski filter. (Fritz i Gjerde, 2009)

Mobilna faza koja će se koristiti za anionsku kromatografiju ovisi prvenstveno o odabranom detektoru. Budući da se u većini slučajeva detekcija anorganskih i organskih aniona temelji na konduktometrijskom mjerenju, mobilne faze mogu se podijeliti u dvije skupine:

- mobilne faze za konduktometrijsku detekciju s kemijskom supresijom pozadinske vodljivosti
- mobilne faze za konduktometrijsku detekciju s elektronskom kompenzacijom za pozadinsku vodljivost

Mobilne faze prve skupine uključuju soli slabih anorganskih kiselina koje pokazuju nisku vodljivost nakon kemijske modifikacije unutar sustava supresora. Smjesa natrijevog karbonata i natrijevog hidrogenkarbonata nalazi se u širokoj primjeni zato što jačina elucije i selektivnost koja slijedi ovise isključivo o omjeru koncentracija navedenih tvari. Široki raspon anorganskih i organskih aniona može biti odijeljen ovom kombinacijom. Produkt reakcije supresije je ugljična kiselina koja je slabo disocirana, stoga je pozadinska vodljivost niska. Kao alternativa smjesi karbonata/hidrogenkarbonata mogu se koristiti aminokiseline. U lužnatom području, aminokiseline se nalaze u anionskom obliku zbog disocijacije karboksilne skupine i mogu biti eluenti. Produkt reakcije supresije je *Zwitterion* oblik s odgovarajuće niskom pozadinskom vodljivosti. Primjena natrijevog hidroksida ranije se smatrala nepogodnom zato što hidroksidni ioni pokazuju slab afinitet prema stacionarnoj fazi i kako bi se eluirali anioni višestrukog naboja potrebno je koristiti visoke koncentracije. To ima štetan učinak na pozadinsku vodljivost zato što su ranije korišteni sustavi za supresiju imali ograničen kapacitet ionske izmjene. Nakon uvođenja mikromembranskih supresora visokog kapaciteta postalo je moguće koristiti visoke koncentracije natrijevog hidroksida koji nakon reakcije supresije prelazi u vodu koja praktički nema pozadinske vodljivosti. Natrijev hidroksid je posebno pogodan za gradijentnu eluciju aniona u kombinaciji s konduktometrijskom detekcijom. (Weiss, 2004)

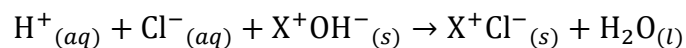
Mobilne faze druge skupine trebale bi imati nisku pozadinsku vodljivost kako bi omogućile osjetljivu konduktometrijsku detekciju analiziranih aniona. Najčešće se koriste benzoati, *o*-sulfobenzoati i ftalati zato što pokazuju dovoljan afinitet prema stacionarnoj fazi i relativno nisku vodljivost. Kada se aromatske karboksilne kiseline koriste kao eluenti, potrebno je prilagoditi i održavati pH vrijednost zato što ona utječe na stupanj disocijacije kiseline i određuje retenciju analita. Uz to, potrebno je gotovo neutralizirati eluent kako bi se smanjila koncentracija oksonijevih iona visoke vodljivosti. (Weiss, 2004)

Vrsta mobilne faze za kationsku kromatografiju također ovisi o odabranoj metodi detekcije. Za odjeljivanje alkalijskih metala, amonijaka i malih alifatskih amina na jakim kationskim smolama koriste se mineralne kiseline poput klorovodične kiseline, sumporne kiseline ili dušične kiseline, neovisno o tome hoće li se konduktometrijska detekcija provoditi nakon kemijske supresije. Organske mobilne faze poput metansulfonske kiseline koriste se samo uz elektrolitički regeneriran sustav supresije. (Weiss, 2004)

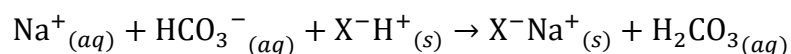
1.1.3.5. SUPRESOR

Supresor se koristi za osjetljivu detekciju iona na temelju njihove električne vodljivosti. Funkcija supresora je kemijski smanjiti pozadinsku vodljivost elektrolita koji se koristi kao eluent prije ulaska u konduktometrijsku ćeliju. Sustav supresora može se smatrati dijelom sustava za detekciju. (Weiss, 2004)

Supresor je potreban samo kada se analiti detektiraju konduktometrijskim detektorom. Problem visoke vodljivosti eluenta riješen je uvođenjem kolone za supresiju eluenta odmah nakon kolone za ionsku izmjenu. Supresijska kolona punjena je smolom za ionsku izmjenu koja učinkovito prevodi ione iz eluenta u molekularnu vrstu ograničene ionizacije, bez utjecaja na ione analita. Prilikom odjeljivanja i određivanja kationa, klorovodična kiselina koristi se kao eluent, a supresor je anionsko-izmjenjivačka smola u hidroksidnom obliku. Reakcija koja se odvija u supresoru je sljedeća:



Za odjeljivanje i određivanje aniona, punjenje supresora je kiseli oblik kationsko-izmjenjivačke smole, a natrijev karbonat ili hidrogenkarbonat je eluent. Reakcija koja se odvija u supresoru je sljedeća:

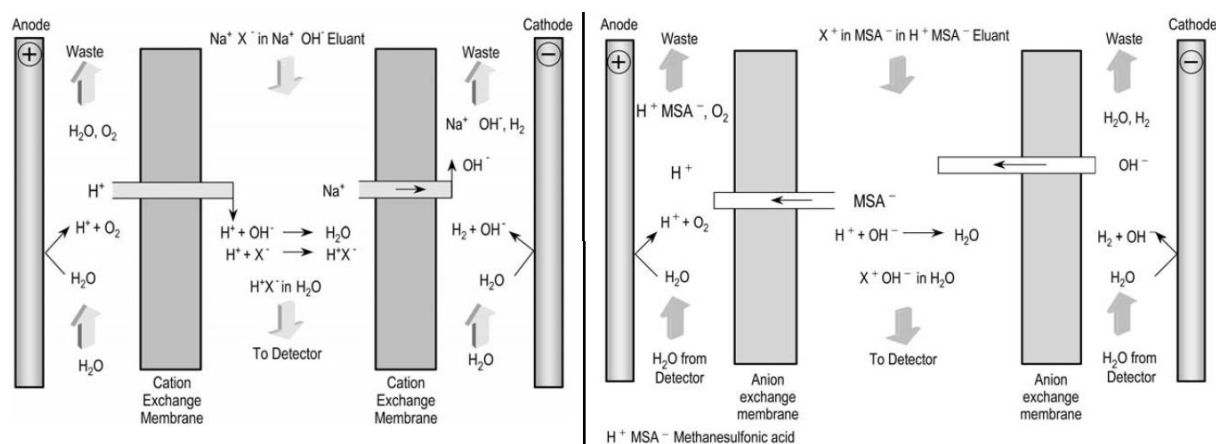


Voda kao produkt reakcije supresije nema vodljivosti, dok ugljična kiselina većinom nije disocirana i ne doprinosi znatno vodljivosti. (Skoog i sur., 2014)

Kolone supresora je potrebno periodično regenerirati kako bi se punjenje vratilo natrag u kiseli ili lužnati oblik. Zato su razvijeni mikromembranski supresori koji rade kontinuirano. Mobilna

faza prolazi nizom ultra-tankih membrana koji je odjeljuju od toka regeneracijske otopine u suprotnom smjeru. Ioni iz mobilne faze izmjenjuju se s ionima na unutarnjoj površini izmjenjivačke membrane, zatim putuju do vanjske površine membrane i izmjenjuju se s ionima iz regeneracijske otopine. Ioni iz regeneracijske otopine putuju u suprotnom smjeru, stoga je očuvana električna neutralnost. (Skoog i sur., 2014)

Izvorni mikromembranski supresori zahtijevali su protok regeneracijske otopine tri do deset puta veći od protoka eluenta. Problem je riješen uvođenjem samo-regeneracijskog supresora (*Self Regenerating Suppressor, SRS*). U ovom sustavu, vodikovi ili hidroksidni ioni za supresiju stvaraju se elektrolizom vode na platinskoj anodi ili katodi smještenoj u regeneracijsku komoru (Slika 5). Struja potrebna za početak elektrolize proporcionalna je koncentraciji eluenta koji treba suprimirati. (Fritz i Gjerde, 2009)



Slika 5: Mehaniizam supresije u samo-regeneracijskom supresoru. (Weiss, 2004)

Viša osjetljivost je glavna prednost tehnike koja koristi supresor u usporedbi s izravnom konduktometrijskom detekcijom. Uz to, povećava se i specifičnost metode, zato što kemijska modifikacija u sustavu supresora prevodi konduktometrijski detektor iz detektora svojstva otopine u detektor specifičan za otopljenu tvar. U anionskoj kromatografiji detektiraju se samo anioni, dok se u kationskoj kromatografiji detektiraju samo kationi. (Weiss, 2004)

1.1.3.6. DETEKTOR

U ionskoj kromatografiji, detektor mora izabrati i izmjeriti ione iz uzorka u prisutnosti pozadinskih iona mobilne faze. Postoji nekoliko metoda koje se mogu primijeniti kako bi se to postiglo. Prva metoda je primjena izravne detekcije odabirom detektora koji odgovara samo na

ione analita, a ne odgovara na ione eluenta. Ako se detekcija provodi izravnim mjerenjem fizičkog svojstva iona analita, ion analita i ion eluenta moraju se bitno razlikovati u tom svojstvu. Međutim, ioni analita i eluenta često pokazuju slična svojstva, zato je izravna detekcija izvediva samo kod selektivne detekcije ograničenog broja iona analita. Druga metoda je primjena neizravne detekcije koja mjeri promjene određenog fizičkog svojstva eluenta koje su uzrokovane elucijom iona analita. Glavni uvjet za primjenu neizravne detekcije je da se vrijednost odabranog svojstva razlikuje kod iona eluenta i iona analita. Eluent stvara pozadinski signal. Prisutnost iona analita dovodi do smanjenja koncentracije iona eluenta procesom zamjene iona. Detektor mjeri smanjenje koncentracije iona eluenta prilikom elucije analita i detektira promjenu pozadinskog signala. (Fritz i Gjerde, 2009)

Široko korištena metoda za detekciju u ionskoj kromatografiji je modifikacija mobilne faze prije detekcije kako bi ioni eluenta izazivali slabiji odgovor, a ioni analita snažniji odgovor detektora. Uobičajeni primjer opisane metode je kemijska supresija korištena kod konduktometrijske detekcije. Još jedan primjer je post-kolonska reakcija s reagensom za stvaranje boje. Kelirajući agens dodaje se u mobilnu fazu nakon izlaska iz kolone i kelira metalne ione kako bi se mogli mjeriti spektrofotometrijskim detektorom. Ioni eluenta ne reagiraju s kelirajućim agensom. (Fritz i Gjerde, 2009)

Detektori se mogu svrstati u opće ili selektivne detektore. Opći detektor odgovara na sve ili većinu iona koji prolaze kroz detektorsku ćeliju. I opći i selektivni detektori imaju svoje mjesto u ionskoj kromatografiji. Kada bi samo jedan detektor bio dostupan, poželjniji bi bio opći detektor zbog svoje svestranosti. Međutim, selektivan detektor može biti učinkovitiji prilikom mjerenja određenog iona ili manje skupine iona u prisutnosti visoke koncentracije iona eluenta ili iona matriksa. Prednost selektivnog detektora je i mogućnost postizanja veće osjetljivosti. (Fritz i Gjerde, 2009)

Elektrokemijski detektori mjere tri temeljna parametra napona: potencijal, otpor ili struju. Elektrokemijski detektori su konduktometrijski, potenciometrijski, amperometrijski i kulometrijski detektori. Konduktometrijski detektori se smatraju općim detektorima, dok se potenciometrijski, amperometrijski i kulometrijski detektori smatraju selektivnim detektorima. Elektrokemijski detektori donose mnoge prednosti poput visoke osjetljivosti, visoke selektivnosti i širokog linearnog raspona. Često su jednostavni, relativno jeftini i robusni.

Nedostatak elektrokemijskih detektora je osjetljivost na brzinu protoka i sastavnice eluenta poput otopljenog kisika kojeg je teško kontrolirati ili ukloniti. (Fritz i Gjerde, 2009)

Konduktometrijski detektori imaju mnoga svojstva idealnih detektora: mogu biti visoko osjetljivi, univerzalni su detektori za nabijene vrste, odgovaraju na promjene koncentracije na predvidljiv način, lako se mogu smanjiti na željene dimenzije, jednostavni su za korištenje, jeftini za postavljanje i održavanje te se obično dugo koriste bez problema. Konduktometrijski detektori prate svojstvo eluata da provodi struju. Nisu ranije postali opće primijenjeni u ionskoj kromatografiji zbog visokih koncentracija iona potrebnih kako bi se eluirala većina iona analita u razumnom vremenu. Vodljivost iona iz mobilne faze preplavi detektor i znatno smanji njegovu osjetljivost prema ionima analita. Opisani problemi popravljani su primjenom ionsko-izmjenjivačkih smola nižeg kapaciteta kako bi bila potrebna manja koncentracija iona u mobilnoj fazi i uvođenjem kemijske supresije mobilne faze. Međutim, konduktometrijska detekcija nije bez nedostataka. Temperatura utječe na vodljivost, stoga uređaj za održavanje stalne temperature postaje sastavni dio sustava za ionsku kromatografiju. Kod suprimirane konduktometrijske detekcije potreban je i uređaj za supresiju koji uzrokuje dodatno širenje kromatografskih pikova. (Skoog i sur., 2014; Fritz i Gjerde, 2009)

Potenciometrijski detektori mjere razliku potencijala kroz membranu koja je posljedica razlike koncentracije analita u eluatu i u referentnoj otopini. Potenciometrijska detekcija je primjenjiva kada je dostupna elektroda koja odgovara brzo, reverzibilno i reproducibilno na koncentraciju iona analita. Tada je moguće detektirati određeni ion ili skupinu iona s velikom selektivnosti. Svojstvo indikatorske elektrode da odgovara samo na određenu vrstu iona je i prednost i nedostatak, zato što je nova elektroda potrebna za svaku vrstu iona. (Fritz i Gjerde, 2009)

Amperometrijski i kulometrijski detektori koriste svojstvo tvari da se oksidira ili reducira na elektrodi primjenom određenog potencijala. Nakon odjeljivanja, eluat ulazi u elektrokemijsku ćeliju. Prolaskom iona preko radne elektrode, oni mogu primiti elektrone i oksidirati se ili donirati elektrone i reducirati se. Elektroaktivnost tvari ovisi o molekularnoj strukturi, prisutnim funkcionalnim skupinama i dostupnosti molekularnih orbitala. Brzina elektrokemijske reakcije očituje se kao struja. Vrijednost nastale struje ovisi o površini elektrode, difuziji iona, koncentraciji iona, primijenjenom potencijalu, fizičkim i kemijskim svojstvima eluenta i

elektrode. Nastala struja se može mjeriti u amperima ili u kulonima prilikom integracije signala. (Fritz i Gjerde, 2009)

Potenciometrijske i amperometrijske tehnike pate od sporog odaziva detektora i komplicirane su za primjenu zbog heterogenog procesa prilikom detekcije. Sastavnice eluata moraju difundirati do površine elektrode, što može dovesti do onečišćenja površine elektrode. Mnoge tehnike zahtijevaju svakodnevno poliranje površine elektrode. Pulsna elektrokemijska detekcija (*Pulsed Electrochemical Detection*, PED) razvijena je kako bi smanjila opisane komplikacije. Elektrokemijska detekcija je spojena s automatskim čišćenjem površine elektrode kako bi se održala ujednačena i reproducibilna aktivnost elektrode. (Fritz i Gjerde, 2009)

Detektor indeksa loma svjetlosti ili refraktometar može se smatrati općim detektorom zato što bilo koja sol, kiselina ili baza dodana u vodu uzrokuje promjenu indeksa loma svjetlosti otopine. Razlike u indeksima mogu se mjeriti prilikom prolaska iona analita kroz otvor detektora pri čemu zamjenjuju ione eluenta. Ovisno o relativnoj promjeni, pik može biti pozitivan ili negativan. Indeks loma svjetlosti u otopini povećava se s molekularnom masom i koncentracijom otopljenih tvari. Organski ioni uglavnom dovode do veće promjene od anorganskih iona. Izravno mjerenje indeksa loma svjetlosti moguće je kada je analit organski ion uz anorganske ione u eluentu. Neizravno mjerenje moguće je kada se organski ion nalazi u eluentu. Detekcija indeksa loma svjetlosti dozvoljava primjenu širokog raspona vrste, pH vrijednosti i ionske jakosti eluenta, odnosno dozvoljava primjenu ionskih izmjenjivača visokog kapaciteta. Refraktometri su umjerene osjetljivosti i skloni interferencijama koje se mogu smanjiti kontrolom temperature detektorske ćelije. (Fritz i Gjerde, 2009)

Jedan od boljih selektivnih detektora je spektrofotometrijski detektor. Ovi su detektori stabilni i osjetljivi. Mogućnost snimanja spektra na različitim valnim duljinama korisna je kako bi se iskoristile relativno male razlike apsorbancije raznih iona. Spektrofotometrijska detekcija primijenjena je za analizu iona kroz dva pristupa, izravnom detekcijom iona analita i neizravnom detekcijom. Izravna spektrofotometrijska detekcija vjerojatno je najjednostavniji i jedan od najosjetljivijih načina za praćenje odjeljivanja iona koji apsorbiraju u ultraljubičastom ili vidljivom spektru valnih duljina. Potrebno je pronaći odgovarajuću mobilnu fazu s ionima koji ne apsorbiraju na odabranoj valnoj duljini. Metoda je često primjenjiva na uzorcima na kojima je konduktometrijska detekcija problematična, na primjer određivanje analita u

tragovima u visokoj koncentraciji iona matriksa. Kod neizravne spektrofotometrijske detekcije potrebno je odabrati mobilnu fazu s ionima koji apsorbiraju u ultraljubičastom ili vidljivom spektru. Elucija iona analita prati se mjerenjem smanjenja apsorbanije eluata, zato što ioni analita koji ne apsorbiraju zamjenjuju dio iona eluenta koji apsorbiraju zračenje. Koncentracija iona eluenta mora biti dovoljno visoka kako bi eluirala ione analita u razumnom vremenu i bila veća od koncentracije bilo kojeg iona analita u točki maksimuma pika, ali mora biti dovoljno niska kako bi smanjenje apsorbanije bilo mjerljivo i kako ne bi bilo prekriveno šumovima bazne linije. Točnije, ion eluenta za indirektnu spektrofotometrijsku detekciju mora imati visoki afinitet za ionski izmjenjivač kako bi relativno niska koncentracija uspješno eluirala analite i mora imati visoku molarnu apsorbaniju. Postoji i mogućnost post-kolonske reakcije s reagensom za stvaranje boje. (Fritz i Gjerde, 2009)

Fluorescencijska detekcija je usko povezana sa spektrofotometrijskom detekcijom, ali se u ovom slučaju mjeri emisija, a ne apsorpcija svjetlosti. Dio molekula koje su planarne i krute imaju sposobnost fluorescencije. Takve molekule nazivamo fluorescentnim bojama. Fluorescencija je emisija svjetlosti niže energije koja slijedi nakon apsorpcije svjetlosti više energije. Valna duljina apsorbirane i emitirane svjetlosti su specifične za molekulu. Emisijski spektar se snima na stalnoj valnoj duljini apsorbirane svjetlosti mjerenjem signala emitirane svjetlosti na različitim valnim duljinama. Ovaj se pristup koristi kod kromatografske analize DNA i RNA. Fluorescencijska detekcija se koristi i u kombinaciji s post-kolonskom reakcijom, zato što većina anorganskih aniona i kationa nema sposobnost fluorescencije. (Fritz i Gjerde, 2009; Weiss, 2004)

S vremenom je povezivanje ionske kromatografije s metodama detekcije specifičnima za određene elemente dobilo na važnosti. Specifična detekcija se provodi atomsko-apsorpcijskom spektrometrijom (*Atomic Absorption Spectrometry*, AAS), atomsko-emisijskom spektrometrijom (*Atomic Emission Spectrometry*, AES) i masenom spektrometrijom (*Mass Spectrometry*, MS). To su spregnute tehnike koje uključuju induktivno spregnutu plazmu (*Inductively Coupled Plasma*, ICP). (Weiss, 2004)

1.2. RAZVOJ I VALIDACIJA METODE

Kad se pristupa rješavanju problema koji zahtijeva odgovor analitičkom metodom, potrebno je pažljivo definirati analitički problem i odrediti analitičke informacije potrebne kako bi se pružio razuman odgovor. Zatim treba opisati očekivani sastav uzorka što je potpunije moguće. Tada se može procesom logičkog zaključivanja doći do radne metode za novu vrstu ispitivanja. Metoda se može temeljiti na već objavljenoj metodi iz literature ili na standardnoj metodi objavljenoj od strane regulatornih organizacija ili metoda može biti potpuno nova, ovisno o problemu koji postavlja smjesa analita i matriksa. Vjerojatno postoji više metoda koje bi se mogle razviti kako bi riješile problem. Odluka o razvoju jedne od mogućih kromatografskih metoda često se temelji na dostupnosti određene kolone ili detektora. Odabrana metoda ne mora biti idealna, već je metoda koja jednostavno radi dovoljna. Ona je odraz dostupnog osoblja i opreme te osobnih preferencija analitičara koji razvija metodu. (Fritz i Gjerde, 2009)

Metode koje zahtijevaju minimalnu pripremu uzorka su poželjnije. Priprema uzorka uključuje jednostavne postupke poput razrjeđivanja, filtriranja ili centrifugiranja, ali i složene postupke poput pasivne ili aktivne dijalize, ukoncentriravanja, spaljivanja ili taloženja. U pojedinim slučajevima, odabir ispravnog sustava za kromatografiju može isključiti potrebu za složenom pripremom uzorka. (Fritz i Gjerde, 2009)

Općenito, validacija analitičkih metoda je proces dokazivanja da su analitički postupci prikladni za određenu namjenu. Točnije, validacija analitičke metode pitanje je uspostavljanja dokumentiranih dokaza koji ulijevaju visok stupanj sigurnosti da će specificirana metoda dosljedno pružati točne rezultate za vrednovanje proizvoda prema karakteristikama kvalitete i specifikacijama. Kvaliteta proizvoda može odstupati od standarda, ali prilikom provođenja analize treba osigurati da kvaliteta same analize ne odstupa od potrebnog standarda. Budući da proces validacije oduzima puno vremena, metode ne bi trebale ulaziti u fazu validacije dok nisu u potpunosti razvijene. Validacija nije alat za razvoj metode, ne može učiniti metodu učinkovitom. Validacija je vrlo važna i kako bi se udovoljilo zahtjevima regulatornih agencija. Zato što je validacija jedna od aktivnosti propisanih „Dobrom proizvođačkom praksom“ (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP), mora biti propisno dokumentirana te provedena na kvalificiranoj i kalibriranoj opremi. (Crowther, 2001; Watson, 1999; Fritz i Gjerde, 2004)

Važno je odrediti pojmove koji se koriste u smjernicama regulatornih tijela kako bi se moglo govoriti o validaciji metode: točnost, preciznost (ponovljivost, središnja preciznost, reproducibilnost), specifičnost/selektivnost, linearnost, osjetljivost, granica detekcije, granica kvantifikacije, robusnost/otpornost.

Točnost metode je podudarnost između rezultata ispitivanja i stvarne vrijednosti, odnosno prihvaćene referentne vrijednosti. Točnost metode može se odrediti ispitivanjem analitičkog prinosa (engl. *Recovery*), postupkom standardnog dodatka, ispitivanjem referentnih materijala ili usporedbom s rezultatima dobivenim dobro karakteriziranim referentnim postupkom. Točnost se često određuje ispitivanjem analitičkog prinosa dodatkom ispitivane tvari u otopinu matriksa. Matriks (ili placebo) ne bi trebao interferirati s određivanjem tvari od interesa. Predlaže se da se ispitivanje točnosti provodi pomoću minimalno devet mjerenja na tri razine koncentracije koje pokrivaju određeno radno područje. (Crowther, 2001; Fritz i Gjerde, 2009)

Preciznost analitičkog postupka izražava podudarnost između niza mjerenja iz višestrukog uzorkovanja istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Obično se izražava kao standardna devijacija ili relativna standardna devijacija. Preciznost se može promatrati na tri razine: ponovljivost, središnja preciznost i reproducibilnost. (Crowther, 2001; Fritz i Gjerde, 2009)

Ponovljivost analize izražava preciznost pod istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog intervala. Ispituje se višestrukom pripremom i mjerenjem uzoraka koje provodi isti analitičar tijekom istog dana. Ponovljivost injektiranja mjeri se višestrukim injektiranjem referentnog standarda i ukazuje na izvedbu instrumenta pod istim uvjetima tijekom jednog dana u jednom laboratoriju. (Crowther, 2001)

Središnja preciznost izražava varijacije unutar laboratorija: različiti dani, različiti analitičari, različita oprema, itd. Ispituje se provođenjem analize od strane dva različita kvalificirana tehničara, na različitim instrumentima, s različitim serijskim brojevima kolona ili različitim dana. (Crowther, 2001)

Reproducibilnost izražava preciznost između različitih laboratorija. (Crowther, 2001)

Specifičnost/selektivnost je sposobnost da se nedvosmisleno odredi analit uz ostale komponente uzorka čija se prisutnost može očekivati. To je jedna od najvažnijih karakteristika metode i trebala bi se odrediti kao jedna od najranijih validacijskih stavki. Specifična metoda može točno mjeriti tvar od interesa u prisutnosti ostalih sastavnica uzorka. Kada kriteriji specifičnosti nisu zadovoljeni, to ukazuje da metoda nije do kraja razvijena. Uz to, vjerojatno kriteriji za točnost, preciznost i linearnost neće biti zadovoljeni. (Crowther, 2001)

Linearnost analitičkog postupka je njegova sposobnost (unutar definiranog raspona) da osigura rezultate mjerenja koji su izravno proporcionalni koncentraciji (ili količini) analita u uzorku. Većina analitičkih metoda temelji se na procesima u kojima metoda proizvodi odgovor koji je linearan i ovisi o koncentraciji analita. Jednadžba kojom opisujemo linearnu ovisnost je:

$$y = a - bx$$

a – sjecište pravca s y-osi

b – nagib pravca

Jednadžba pravca koja odgovara dobivenim rezultatima može se odrediti računanjem faktora a i b pomoću sljedećih formula:

$$b = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = y - bx$$

Korelacijski koeficijent r je statistička mjera prikladnosti ravne linije rezultatima. Korelacijski koeficijent može se izračunati pomoću sljedeće formule:

$$r = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i(x_i - \bar{x})^2 \sum_i(y_i - \bar{y})^2}}$$

Linearnost znači da su rezultati ispitivanja izravno proporcionalni koncentraciji analita unutar određenog raspona. (Fritz i Gjerde, 2009)

Raspon je interval između gornje i donje razine analita koje se mogu odrediti s prikladnom razinom preciznosti, točnosti i linearnosti. (Fritz i Gjerde, 2009)

Osjetljivost analitičke metode ukazuje na to koliko dobro metoda odgovara na male promjene u koncentraciji analita. Može se promatrati kao nagib pravca te može biti funkcija same metode ili funkcija kalibracije instrumenta. Osjetljivost metode nije isto što i granica detekcije. Granica detekcije rezultat je kombinacije osjetljivosti i radnog područja metode. (Watson, 1999)

Granica detekcije u analitičkom postupku je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali se ne mora nužno odrediti točna vrijednost prisutne količine. Može se potvrditi kako je količina analita ispod ili iznad određene vrijednosti, ali se ne može znati točna količina analita. (Crowther, 2001; Fritz i Gjerde, 2009)

Definira se pomoću formule:

$$x - x_B = 3SD_B$$

x – signal uzorka

x_B – signal slijepe probe

SD_B – standardna devijacija mjerenja slijepe probe

Kriterij za mjerenje koje ukazuje na prisutnost analita u uzorku je da razlika između vrijednosti dobivene mjerenjem uzorka i vrijednosti dobivene mjerenjem slijepe probe bude barem tri puta veća od standardne devijacije mjerenja slijepe probe. Stvarna granica dokazivanja odraz je svih procesa koje analit prolazi tijekom analize i nije samo razrjeđenje čistog standarda analita sve dok se više ne može detektirati. (Watson, 1999)

Granica kvantifikacije u analitičkom postupku je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati s odgovarajućom preciznosti i točnosti. Granicom kvantifikacije obično se smatra količina analita koja daje signal deseterostruko veći od šuma detektora. (Crowther, 2001; Fritz i Gjerde, 2009)

Robusnost ili otpornost analitičkog postupka je mjera otpornosti na male, ali namjerne varijacije u parametrima metode. Koristi se kako bi se odredilo koliko reproducibilno metoda može biti provedena namjernom promjenom parametara metode unutar unaprijed definiranih raspona. Naznaka je pouzdanosti metode tijekom upotrebe. (Crowther, 2001; Fritz i Gjerde, 2009)

Kada jedna ili više stavki tijekom validacije metode ne zadovoljava kriterije, treba odlučiti hoće li se rezultati prihvatiti uz obrazloženje, hoće li se provesti ponovljeno ispitivanje na istoj pripremi uzorka, hoće li se ponoviti ispitivanje na novoj pripremi uzorka, hoće li se prilagoditi metoda ili će se postaviti ograničenje na metodu. Sva odstupanja od postupka validacije trebaju biti dokumentirana i odobrena, te uključena u konačni izvještaj. (Crowther, 2001)

Nakon što se provede validacija metode, potrebno je znati da metoda i dalje nastavlja davati točne rezultate tijekom primjene. Korištenje kontrolnog grafikona je vjerojatno najjednostavniji i najuobičajeniji način da se pokaže kako je kvaliteta kemijske analize na razini. Kontrolni grafikon je kronološki prikaz rezultata periodičnih analiza referentnog uzorka. Kontrolni grafikon može pokazati bilo koje značajne trendove i ukazati na bilo koju postupno narušavanje rezultata. Cilj je ispraviti nedostatke prije pojave ozbiljnih posljedica. (Fritz i Gjerde, 2009)

1.3. ULOGA FOSFATA U FARMACEUTSKIM FORMULACIJAMA

Fosfati su glavni anioni unutarstanične tekućine, uključeni u mnoge fiziološke procese i nalaze se u velikoj količini u ljudskom organizmu. Većina hrane sadrži dovoljne količine fosfata, zbog čega je hipofosfatemija, nedostatak fosfata, iznimno rijetka i uglavnom povezana s određenim bolestima ili s potpunom parenteralnom prehranom. Uglavnom se liječi oralnom primjenom fosfata. Otprilike 60% fosfata iz hrane apsorbira se u gastrointestinalnom traktu i uglavnom se eliminira urinom. Pretjerani unos fosfata oralnim putem rijetko je povezan s ozbiljnijim štetnim posljedicama, ali može dovesti do gastrointestinalnih smetnji poput dijareje, mučnine i povraćanja zato što fosfati djeluju kao laksativi. Pretjerani unos fosfata intravenskim putem, rektalnim putem ili kod pacijenata s bubrežnim zatajenjem može uzrokovati hiperfosfatemiju, višak fosfata, koja može dovesti do ozbiljne neravnoteže elektrolita. (Rowe i sur., ured., 2009)

Smatralo se kako se fosfati u hrani nalaze uglavnom u mliječnim proizvodima ili proizvodima s visokim sastavom proteina. Posljednjih godina, istraživanja su istaknula dodatne izvore fosfata u hrani, aditive u prehranbenim proizvodima i pićima. Poznato je i kako farmaceutski proizvodi sadrže fosfate kao pomoćne tvari (Slika 6). Postoje 34 kemijske tvari koje sadrže fosfate i odobrene su za upotrebu u farmaceutskim proizvodima od strane Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Agency*, FDA). Pomoćne tvari često se nazivaju inertnim sastojcima lijekova, što ukazuje na izostanak učinka na ljudsko tijelo, ali to nije točno. Pomoćne tvari koje sadrže fosfate nisu u potpunosti inertne i mogu doprinijeti dnevnom unosu fosfata. Količine fosfata u farmaceutskim proizvodima predstavljaju manji udio dnevnog unosa fosfata kod zdravih osoba (koji iznosi otprilike 1000 mg), ali mogu biti klinički značajne kod pacijenata u krajnjem stadiju bubrežnog zatajenja kojima je potrebna dijaliza. Na farmaceutskim proizvodima je istaknuto kako sadrže pomoćne tvari koje sadrže fosfate, ali nisu točno označene količine sadržanih fosfata. Ukoliko originalni lijek sadrži fosfate, često i generički lijekovi sadrže fosfate, ali u različitim količinama, što ukazuje na bitne razlike između proizvođača po pitanju sastava pomoćnih tvari lijeka. Nedostatak pouzdanih informacija o sastavu fosfata u farmaceutskim proizvodima predstavlja dodatan rizik prilikom skrbi za pacijente. Istraživanja su pokazala kako je visoki unos fosfata povezan s ubrzanom proliferacijom stanica raka kod ljudi i životinja, stoga dnevni unos fosfata nije samo pitanje skrbi o rizičnim pacijentima, nego i javnozdravstveno pitanje. Potencijalno rješenje je isticanje sastava fosfata u farmaceutskim proizvodima kako bi se omogućio izbor lijeka s manjim

sastavom fosfata kada je dostupno više lijekova odgovarajuće učinkovitosti, sigurnosti i cijene. Smatra se kako bi pristup bio opravdan kod rizičnih pacijenata i kod kronične terapije. (Sherman i sur., 2015)

| - Effervescent Tablets | |
|------------------------|--|
| Ingredients | Phosphate Function |
| Monocalcium Phosphate | Production of carbon dioxide (CO ₂) via acid-base reaction with sodium bicarbonate |

| - Intravenous Fluids | |
|-------------------------|---------------------------------|
| Ingredients | Phosphate Function |
| Monopotassium Phosphate | Potassium replacing electrolyte |

| - Ophthalmic | |
|---|--------------------------------|
| Ingredients | Phosphate Function |
| Mono- and Di- sodium phosphates Mono and Di-potassium phosphates | Buffers to maintain a given pH |

| - Prescription and Over the Counter (OTC) Tablets | |
|---|--|
| Ingredients | Phosphate Function |
| Dicalcium Phosphate Tricalcium phosphate Sodium Monofluorophosphate | Tableting aid so that active ingredient can be consumed Fluoride source to protect enamel from bacterial attack |

| - Vitamins and Mineral Supplements | |
|---|---|
| Ingredients | Phosphate Function |
| Tricalcium Phosphate Dimagnesium Phosphate | Provide Calcium, Magnesium and Phosphorus |

Slika 6: Uloge fosfata u farmaceutskim proizvodima (www.phosphatesfacts.org)

Fosfati su soli fosforne kiseline, točnije ortofosforne kiseline formule H₃PO₄. Koncentrirana fosforna kiselina je viskozna tekućina bez boje i bez mirisa. U koncentriranom obliku je vrlo nagrizajuća kiselina. U farmaceutskim formulacijama se nalazi u vrlo razrijeđenom obliku i općenito se smatra netoksičnim i nenadražujućim sredstvom. Fosforna kiselina se koristi kao sredstvo za zakiseljavanje u raznim farmaceutskim formulacijama. Koristi se kao dio puferskog sustava u kombinaciji sa solima fosfata poput natrijevog fosfata, monobazičnog ili dibazičnog. Fosforna kiselina se koristi i u pripravcima za liječenje mučnine i povraćanja, a gel fosforne kiseline koristi se za nagrizanje zubne cakline i za poboljšanje distribucije lijekova kroz nokte. U hrani se koristi za postizanje kiselog okusa, kao sinergistički antioksidans i sekvestrant. (Rowe i sur., ured., 2009)

Dinatrijev hidrogen fosfat je natrijeva sol fosforne kiseline koja dolazi u bezvodnom obliku i u različitim hidratnim oblicima ovisno o broju uklopljenih molekula vode. Različiti oblici imaju različita organoleptička i fizikalna svojstva. Koristi se u raznim farmaceutskim formulacijama kao dio puferskog sustava i sekvestrant. Koristi se kao pomoćno sredstvo u parenteralnim, oralnim i topikalnim farmaceutskim formulacijama. Količina dinatrijevog hidrogen fosfata prisutnog u oralnim farmaceutskim formulacijama do sad nije povezana s izravnim štetnim učincima. U terapijske svrhe se koristi kao laksativ i za liječenje hipofosfatemije. U prehrambenoj industriji se koristi kao emulgator. (Rowe i sur., ured., 2009)

Natrijev dihidrogen fosfat je natrijeva sol fosforne kiseline koja dolazi u bezvodnom obliku, obliku monohidrata i obliku dihidrata. Koristi se kao pomoćno sredstvo u parenteralnim, oralnim i topikalnim farmaceutskim formulacijama. Količina natrijevog dihidrogen fosfata prisutnog u oralnim farmaceutskim formulacijama do sad nije povezana s izravnim štetnim učincima. (Rowe i sur., ured., 2009)

Ukoliko molekula lijeka ima slabu topljivost u vodi, teško se pročišćava ili izolira, ali je slaba kiselina ili baza, tada bi mogla biti korisna pretvorba u oblik soli. Prilikom formiranja soli mijenjaju se brojna fizikalno-kemijska svojstva. Bilo koja promjena svojstava molekule lijeka može biti korisna ili štetna. Rasprostranjenost soli ljekovitih tvari ukazuje na to da su koristi formiranja soli veće od nedostataka. Svaku novu sol ljekovite tvari regulatorna tijela smatraju novim entitetom. (Gaisford, 2013)

| Anion | Frequency (%) | Cation | Frequency (%) |
|---------------|---------------|--------------|---------------|
| Hydrochloride | 39.96 | Sodium | 62.79 |
| Sulphate | 10.58 | Potassium | 11.05 |
| Acetate | 6.70 | Calcium | 8.72 |
| Phosphate | 4.97 | Aluminium | 4.65 |
| Chloride | 4.54 | Benzathine | 2.33 |
| Maleate | 3.67 | Meghimine | 2.33 |
| Citrate | 3.02 | Zinc | 2.33 |
| Mesilate | 2.59 | Magnesium | 1.74 |
| Succinate | 2.38 | Tromethamine | 1.74 |
| Nitrate | 2.38 | Lysine | 1.16 |

Slika 7: Učestalost farmaceutskih aniona i kationa ljekovitih tvari u USP 29 (Gaisford, 2013)

Fosfati nisu u farmaceutskim proizvodima prisutni samo kao pomoćne tvari, nego i kao soli ljekovite tvari (Slika 7).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Strateški fokus kompanije JGL d.d. su sterilni farmaceutski proizvodi u tekućem obliku za primjenu u oftalmologiji i otorinolaringologiji, te farmaceutski proizvodi na bazi morske vode. Stoga odjel Razvojne analitike JGL d.d. ima postavljen sustav za ionsku kromatografiju i razvijene metode za određivanje ionskog sastava morske vode.

Cilj ovog rada bio je razviti i validirati metodu praktičnu za rutinsko korištenje koja će moći pouzdano odrediti sadržaj fosfata u tekućim farmaceutskim oblicima prema postavljenim zahtjevima za pomoćne tvari unutar odjela Razvojna analitika JGL d.d. Metoda bi trebala biti potpora procesu razvoja formulacije i omogućiti obrnuti inženjering, analizu kojom se utvrđuju karakteristike proizvoda bez dodatnog poznavanja postupaka koji su uključeni u izvornu proizvodnju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANDARDI

- Standardna otopina fosfata za ionsku kromatografiju 1 mg/mL, kontrolni broj: BCBX4361, BCCB6423; proizvođač: Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD

3.2. REAGENSI

- Voda za kromatografiju R, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska; datum izrade: 26.02.2020.-13.03.2020.; 01.06.2020.-16.06.2020.
- Metanol R2, kontrolni broj: RM-08/2018, proizvođač: J.T. Baker, Avantor, Center Valley, SAD

3.3. APARATURA I MATERIJALI

- Ionski kromatograf Dionex ICS-5000+, Dionex - Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, California, SAD
 - Dionex ICS-5000+ DP
 - Dionex ICS-5000+ EG
 - Dionex ICS-5000+ DC
 - Dionex AS-AP
- Pretkolona Dionex IonPac AG14A, kontrolni broj: 01719071, proizvođač: Dionex - Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, California, SAD
- Kolona Dionex IonPac AS14A-5 μm (3x150 mm), kontrolni broj: 01719071, proizvođač: Dionex - Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, California, SAD
- Filter za špicu OnGuard II RP, volumena 2,5 cc, kontrolni broj: 057084, proizvođač: Dionex - Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, California, SAD
- Filter za špicu PES, promjer 25 mm, veličina pora 0,22 μm , kontrolni broj: 20180403003, proizvođač: Nantong FilterBio Membrane Co., Nantong City, Jiangsu, Kina
- Automatska pipeta Proline Plus Mechanical Pipette 728070 (100-1000 μL), Sartorius Weighing Technology, Goettingen, Njemačka
- Sustav za pročišćavanje vode, Aqua solutions, Middleborough, Massachusetts, SAD

- Termostatirana ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex RK 1028H, Bandelin Electronic, Berlin, Njemačka

3.4. UZORCI

- *Razvojni proizvod 1*, sprej za nos, kontrolni broj: 174-080519, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska
- *Razvojni proizvod 2*, kapi za oko, kontrolni broj: 285-100719, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska
- *Vizol S 0,21%*, kapi za oko, kontrolni broj: 21459, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska
- *Nazol 0,1%*, kapi za nos, kontrolni broj: 13039, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska

3.5. PLACEBO UZORCI

- *Razvojni proizvod 1*, sprej za nos, placebo bez soli koje sadrže fosfate, kontrolni broj: PLACEBO-060-100220, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska; datum izrade: 10.02.2020.
- *Razvojni proizvod 2*, kapi za oko, placebo bez soli koje sadrže fosfate, kontrolni broj: PLACEBO-061-020320, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska; datum izrade: 02.03.2020.
- *Vizol S 0,21%*, kapi za oko, placebo bez soli koje sadrže fosfate, kontrolni broj: VS21-058-110220, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska; datum izrade: 11.02.2020.
- *Nazol 0,1%*, kapi za nos, placebo bez soli koje sadrže fosfate, kontrolni broj: NF1-057-110220, proizvođač: JGL d.d., Rijeka, Hrvatska; datum izrade: 11.02.2020.

3.6. PRIPREMA OTOPINA

Osnovna otopina fosfata (10 µg/mL)

Otpipetirati 2,5 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 250,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

Poredbena otopina fosfata (2 µg/mL)

Otpipetirati 5,0 mL osnovne otopine fosfata (10 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 25,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu poredbenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Poredbena otopina fosfata (5 µg/mL)

Otpipetirati 5,0 mL osnovne otopine fosfata (10 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu poredbenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Poredbena otopina fosfata (8 µg/mL)

Otpipetirati 4,0 mL osnovne otopine fosfata (10 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 5,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu poredbenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Filtriranje kroz FilterBio PES filter

Nije potrebna priprema filtera. Koristiti špricu za jednokratnu upotrebu, volumena 10 mL. Izvaditi klip, spojiti filter na donju stranu šprice i pridržavajući filter napuniti špricu ispitivanom otopinom s gornje strane do volumena 10 mL, a zatim pažljivo vratiti klip. Prilikom filtriranja potrebno je držati špricu i filter u vertikalnom smjeru. Odbaciti 2 mL filtrata i napuniti plastičnu vialu za analizu.

Osnovna otopina fosfata (50 µg/mL)

Otpipetirati 5,0 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 100,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

Otopine koncentracijskog niza fosfata (5, 10, 25, 40 i 50 µg/mL)

- 1) Otpipetirati 1,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

- 2) Otpipetirati 2,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 3) Otpipetirati 5,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 4) Otpipetirati 8,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 5) Osnovna otopina fosfata (50 µg/mL)

Pripremljene otopine filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopina kontrolnog standarda fosfata (25 µg/mL)

Otpipetirati 5,0 mL osnovne otopine fosfata u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopine koncentracijskog niza fosfata (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL)

- 1) Otpipetirati 2,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 2) Otpipetirati 4,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 3) Otpipetirati 6,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 4) Otpipetirati 8,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 5) Osnovna otopina fosfata (50 µg/mL)

Pripremljene otopine filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Poredbena otopina fosfata (10 µg/mL)

Otpipetirati 2,0 mL osnovne otopine fosfata (50 µg/mL) u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu poredbenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopina uzorka Razvojnog proizvoda 1

Otpipetirati 1,0 mL uzorka u odmjernu tikvicu volumena 200,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopina uzorka Razvojnog proizvoda 2

Otpipetirati 1,0 mL uzorka u odmjernu tikvicu volumena 200,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Filtrirati kroz Dionex OnGuard II RP (2,5cc) uložak uz odbacivanje 6 mL filtrata.

Filtriranje kroz Dionex OnGuard II RP uložak

Prije korištenja, uložak je potrebno isprati s metanolom R2 (10 mL) i vodom za kromatografiju R (15 mL). Koristiti špricu za jednokratnu upotrebu, volumena 10 mL. Izvaditi klip, spojiti uložak na donju stranu šprice i pridržavajući uložak napuniti špricu metanolom R2 s gornje strane do volumena 10 mL, a zatim pažljivo vratiti klip. Isprati uložak metanolom R2. Izvaditi klip i napuniti špricu vodom za kromatografiju R s gornje strane do volumena 10 mL, a zatim pažljivo vratiti klip. Isprati uložak. Napuniti špricu vodom za kromatografiju R do volumena 5 mL. Isprati uložak. Uzeti novu špricu. Izvaditi klip, spojiti uložak na donju stranu šprice i spojiti filter na donju stranu uloška. Pridržavajući uložak i filter napuniti špricu ispitivanom otopinom s gornje strane do volumena 10 mL, a zatim pažljivo vratiti klip. Prilikom filtriranja potrebno je držati špricu, uložak i filter u vertikalnom smjeru. Odbaciti 6 mL filtrata i napuniti plastičnu vialu za analizu.

Otopina uzorka Vizola S 0,21%

Otpipetirati 4,0 mL uzorka u odmjernu tikvicu volumena 100,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopina uzorka Nazola 0,1%

Otpipetirati 1,0 mL uzorka u odmjernu tikvicu volumena 100,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopina placebo uzorka Razvojnog proizvoda 1

Otpipetirati 1,0 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 200,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopina placebo uzorka Razvojnog proizvoda 2

Otpipetirati 1,0 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 200,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Filtrirati kroz Dionex OnGuard II RP (2,5cc) uložak uz odbacivanje 6 mL filtrata.

Otopina placebo uzorka Vizola S 0,21%

Otpipetirati 4,0 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 100,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Otopina placebo uzorka Nazola 0,1%

Otpipetirati 1,0 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 100,0 mL i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake. Pripremljenu otopinu filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Razvojnog proizvoda 1 (10, 30 i 50 µg/mL)

- 1) Otpipetirati 0,10 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,20 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 2) Otpipetirati 0,10 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,60 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 3) Otpipetirati 0,10 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 1,00 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

Pripremljene otopine filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Razvojnog proizvoda 2 (10, 30 i 50 µg/mL)

- 1) Otpipetirati 0,10 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,20 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 2) Otpipetirati 0,10 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,60 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 3) Otpipetirati 0,10 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 1,00 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

Pripremljene otopine filtrirati kroz Dionex OnGuard II RP (2,5cc) uložak uz odbacivanje 6 mL filtrata.

Koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Vizola S 0,21% (10, 30 i 50 µg/mL)

- 1) Otpipetirati 0,80 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,20 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 2) Otpipetirati 0,80 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,60 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 3) Otpipetirati 0,80 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 1,00 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

Pripremljene otopine filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

Koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Nazola 0,1% (10, 30 i 50 µg/mL)

- 1) Otpipetirati 0,20 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,20 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

- 2) Otpipetirati 0,20 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 0,60 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.
- 3) Otpipetirati 0,20 mL placebo uzorka u odmjernu tikvicu volumena 20,0 mL.
Otpipetirati 1,00 mL standardne otopine fosfata (1 mg/mL) u odmjernu tikvicu i nadopuniti vodom za kromatografiju R do oznake.

Pripremljene otopine filtrirati kroz PES filter veličine pora 0,22 µm uz odbacivanje 2 mL filtrata.

3.7. UVJETI RADA U VALIDACIJI METODE

Tablica 1: Sustav i uvjeti rada sustava za ionsku kromatografiju propisani validacijskim protokolom

| | |
|------------------------------------|---|
| Instrument | Dionex ICS-5000+ |
| Injektor | Automatski injektor Dionex AS-AP |
| Volumen injektiranja | 25 µL |
| Generator mobilne faze | Dionex ICS-5000+ EG |
| Sastav mobilne faze | 4 mM K₂CO₃/0,5 mM KHCO₃ |
| Pumpa | Dionex ICS-5000+ DP |
| Brzina protoka mobilne faze | 0,6 mL/min |
| Pretkolona/Kolona | IonPac AG14A/IonPac AS14A (3x150 mm) |
| Temperatura | 30°C |
| Detektor | Konduktometrijski detektor Dionex ICS 5000+ DC |
| Trajanje | 16 min |

3.8. PARAMETRI PRIKLADNOSTI SUSTAVA

Tablica 2: Parametri za ispitivanje prikladnosti sustava propisani validacijskim protokolom

| Parametar | Zahtjev |
|---|-----------------------|
| Vrijeme zadržavanja fosfata | 11,1 ± 0,5 min |
| Faktor simetrije pika fosfata | 0,80 – 2,00 |
| Visina pika na poredbenoj otopini fosfata (30 µg/mL) | ≥ 4,00 µS |
| Preciznost sustava na poredbenoj otopini fosfata (10 µg/mL) (n=3) | ≤ 2,0% |
| Točnost na otopini kontrolnog standarda fosfata (25 µg/mL) | 97,0-103,0% |

3.9. PARAMETRI VALIDACIJE METODE

Tablica 3: Parametri validacije metode i određene granice prihvatljivosti

| Parametar | Zahtjev |
|--|--|
| Selektivnost | U otopinama slijepe probe i placebo uzorka ne smije biti prisutan signal na vremenu zadržavanja fosfata u poredbenoj otopini. Razlučivanje između pika fosfata i ostalih pikova na kromatogramima uzoraka: $\geq 1,3$ |
| Točnost | Analitički prinos: 97,0-103,0% Relativna standardna devijacija analitičkog prinosa: $\leq 3,0\%$ |
| Linearnost | Koeficijent korelacije: $\geq 0,99$ |
| Preciznost sustava | Relativna standardna devijacija: $\leq 2,0\%$ |
| Preciznost metode | Relativna standardna devijacija: $\leq 3,0\%$ |
| Središnja preciznost | Relativna standardna devijacija operatera: $\leq 3,0\%$ Apsolutna razlika srednjih vrijednosti različitih operatera: $\leq 3,0\%$ |
| Robusnost/otpornost –utjecaj filtriranja | Relativna razlika signala filtrirane i nefiltrirane otopine: $\leq 2,0\%$ |
| Robusnost/otpornost –stabilnost otopina | Relativno odstupanje signala: $\leq 2,0\%$ |
| Robusnost/otpornost –promjene uvjeta | Trebaju biti zadovoljeni parametri prikladnosti sustava: vrijeme zadržavanja, faktor simetrije, visina signala i preciznost sustava. |

3.10. PROVEDBA POSTUPKA VALIDACIJE METODE

Selektivnost

Pripremljene su i injektirane sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL), placebo uzorka Razvojnog proizvoda 1, uzorka Razvojnog proizvoda 1, placebo uzorka Razvojnog proizvoda 2, uzorka Razvojnog proizvoda 2, placebo uzorka Vizola S 0,21%, uzorka Vizola S 0,21%, placebo uzorka Nazola 0,1% i uzorka Nazola 0,1%.

Točnost

Pripremljene su sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL), koncentracijski niz otopina fosfata (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL), kontrolni standard fosfata (25 µg/mL), koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Razvojnog proizvoda 1 (10, 30 i 50 µg/mL), koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Razvojnog proizvoda 2 (10, 30 i 50 µg/mL), koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Vizola S 0,21% (10, 30 i 50 µg/mL) i koncentracijski niz cijepljenog placebo uzorka Nazola 0,1% (10, 30 i 50 µg/mL). Priprema

osnovne otopine fosfata ponovljena je dva puta kako bi se različite otopine koristile za pripremu koncentracijskog niza fosfata i kontrolnog standarda fosfata. Priprema otopina koncentracijskih nizova placebo uzoraka ponovljena je tri puta. Otapalo, koncentracijski niz fosfata i kontrolni standard fosfata injektirani su jedan put. Otopine koncentracijskih nizova placebo uzoraka injektirane su dva puta po pripremi. Sve otopine određenog proizvoda injektirane su u nizu, od svih priprema najniže koncentracije do svih priprema najviše koncentracije.

Linearnost

Pripremljene su sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL) i koncentracijski niz otopina fosfata (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL). Priprema osnovne otopine fosfata ponovljena je tri puta i svaka se koristila za pripremu koncentracijskog niza fosfata. Otapalo je injektirano jedan put, a zatim su injektirane otopine koncentracijskog niza fosfata dva puta po pripremi od svih priprema najniže koncentracije do svih priprema najviše koncentracije.

Preciznost sustava

Pripremljene su sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL) i poredbena otopina fosfata (10 µg/mL). Otapalo je injektirano jedan put na početku i na kraju analize, a poredbena otopina fosfata injektirana je šest puta.

Preciznost metode

Pripremljene su sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL), koncentracijski niz otopina fosfata (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL), kontrolni standard fosfata (25 µg/mL), otopina uzorka Razvojnog proizvoda 1, otopina uzorka Razvojnog proizvoda 2, otopina uzorka Vizola S 0,21% i otopina uzorka Nazola 0,1%. Priprema osnovne otopine fosfata ponovljena je dva puta kako bi se različite otopine koristile za pripremu koncentracijskog niza fosfata i kontrolnog standarda fosfata. Priprema uzoraka proizvoda ponovljena je šest puta. Otapalo, koncentracijski niz i kontrolni standard injektirani su jedan put, osim prve otopine koncentracijskog niza koja je injektirana tri puta. Otopine uzoraka proizvoda injektirane su dva puta po pripremi.

Središnja preciznost

*Priprema i analiza su provedene na način opisan za **Preciznost metode**, ali je postupak proveo drugi analitičar.*

Robusnost/otpornost – Ispitivanje utjecaja filtriranja

Pripremljene su sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL), poredbena otopina fosfata (10 µg/mL), otopina uzorka Razvojnog proizvoda 1, otopina uzorka Razvojnog proizvoda 2, otopina uzorka Vizola S 0,21% i otopina uzorka Nazola 0,1%. Sve otopine su se punile u viala za analizu nefiltrirane, filtrirane kroz FilterBio PES filter uz odbacivanje 2 mL, 4 mL i 6 mL filtrata, te filtrirane kroz Dionex OnGuard RP II uložak i FilterBio PES filter uz odbacivanje 3 mL, 6 mL i 9 mL filtrata. Svi filtrati iste otopine injektirani su u nizu po dva puta.

Robusnost/otpornost – Stabilnost otopina

Pripremljene su sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL), koncentracijski niz fosfata (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL), otopina uzorka Razvojnog proizvoda 1, otopina uzorka Razvojnog proizvoda 2, otopina uzorka Vizola S 0,21% i otopina uzorka Nazola 0,1%. Priprema koncentracijskog niza fosfata je provedena u 2,5 puta većem volumenu kako bi bilo dovoljno za predviđena ispitivanja. Ispitivala se stabilnost otopina tijekom 72 sata u laboratorijskom posuđu na sobnoj temperaturi (15 – 25°C) i u vialama za analizu (20°C). Svježe pripremljene otopine napunjene su u viala i injektirane. Nakon 24 sata injektirane su otopine koje su stajale u vialama u instrumentu, a zatim su otopine koje su stajale u laboratorijskom posuđu napunjene u nove viala i injektirane. Postupak je ponovljen nakon 48 sati i nakon 72 sata.

Robusnost/otpornost – Promjene uvjeta metode

Pripremljene su sljedeće otopine: otapalo (voda za kromatografiju R), osnovna otopina fosfata (50 µg/mL), koncentracijski niz fosfata (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL), otopina uzorka Razvojnog proizvoda 1, otopina uzorka Razvojnog proizvoda 2, otopina uzorka Vizola S 0,21% i otopina uzorka Nazola 0,1%. Ispitivale su se sljedeće promjene uvjeta metode: brzina protoka mobilne faze ± 10%, promjena temperature kolone ± 10% i promjena sastava mobilne faze ± 10%. Ispitivanje je provedeno na način da se provela analiza svih otopina na smanjenoj brzini protoka mobilne faze (0,54 mL/min), na povećanoj brzini protoka mobilne faze (0,66 mL/min), na smanjenoj temperaturi kolone (27°C), na povećanoj temperaturi kolone (33°C), sa smanjenom koncentracijom mobilne faze (3,6 mM K₂CO₃/0,45 mM KHCO₃) i sa povećanom koncentracijom mobilne faze (4,4 mM K₂CO₃/0,55 mM KHCO₃). Otapalo i otopine

koncentracijskog niza injektirani su po jedan put, osim prve otopine koncentracijskog niza koja je injektirana tri puta. Otopine uzoraka proizvoda injektirane su dva puta.

3.11. OBRADA PODATAKA

Obrada kromatografskih podataka provodila se u softveru Chromeleon™ (Dionex - Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, California, SAD). Određivanje sadržaja provedeno je na temelju metode s kalibracijskom krivuljom koristeći površine pikove. Za statističku obradu podataka korišten je program Microsoft Excel™ (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Formule za izračun rezultata validacije preuzete su iz validacijskog protokola internog propisa odjela Razvojne analitike (JGL d.d., Rijeka, Hrvatska).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PREGLED LITERATURE I ODABIR METODE

Pregled metoda za određivanje fosfata ionskom kromatografijom obuhvatio je široki spektar različitih uzoraka (otopine za grgljanje, paste za zube, ulja, otpadne vode). Priprema uzoraka nije uzeta u obzir prilikom odabira metode zato što su matrice uzoraka za koje se metoda razvija značajno jednostavnije od matrica u pregledanim metodama. U obzir su uzete koncentracija fosfata u injektiranom uzorku i volumen injektiranog uzorka. Pregledane metode su se znatno razlikovale u sastavu mobilne faze (Tablica 4). Korišteni su karbonatni puferi i gradijenti hidroksida. Metode koje koriste gradijente hidroksida i smjesu karbonatnog pufera s acetonom su odbačene zato što je dostupan generator mobilne faze s pripadajućim spremnikom kalijevog karbonata. Naposljetku je odabrana preporučena metoda za analizu aniona na sustavu Dionex ICS-5000+. Odabrana metoda nije nužno bolja od ostalih metoda iz pregledane literature, ali je jednostavnija i jeftinija za implementaciju u postojeći analitički laboratorij.

Tablica 4: Pregled metoda za određivanje fosfata ionskom kromatografijom

| Autori | Mobilna faza | Brzina | Koncentracija | Volumen |
|-------------------------|--|-------------|---------------|---------|
| Zhang i sur., 2007 | <u>Gradijent KOH</u> 0-5 min: 0,5~2,0 mM 5-12 min: 2,0~4,0 mM 12-20 min: 4,0~12,0 mM 20-28 min: 20~28 mM 28-33 min: 28~50 mM 33-38 min: 50 mM 38-43 min: 0,5 mM | 0,25 mL/min | 0,8 µg/mL | 25 µL |
| Chen i sur., 2006 | <u>Gradijent KOH</u> 0-5 min: 1,0~3,5 mM 5-12 min: 4 mM 12-20 min: 4~12 mM 20-28 min: 12~28 mM 28-40 min: 80 mM | 0,25 mL/min | 4 µg/mL | 25 µL |
| Dugo i sur., 2007 | CO ₃ ²⁻ (3,12 mM)/ HCO ₃ ⁻ (3,25 mM)/ Aceton (2%) | 0,5 mL/min | 10 µg/mL | 20 µL |
| Buldini i sur., 1997 | Na ₂ CO ₃ (2,0 mM)/ NaHCO ₃ (0,75 mM) | 1,0 mL/min | | 100 µL |
| Manning i Bewsher, 1997 | <u>Gradijent NaOH</u> 0-7 min – 50/50 Voda/NaOH (0,75 mM) 7-7,1 min – 85/15 Voda/NaOH (200 mM) 7,1 min – 50/50 Voda/NaOH (0,75 mM) | 2,0 mL/min | 150 µg/mL | 50 µL |
| Dionex | K ₂ CO ₃ (8 mM) /KHCO ₃ (1,0 mM) | 0,5 mL/min | | 50 µL |

4.2. OPTIMIRANJE UVJETA METODE

Tablica 5: Početni uvjeti metode

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Volumen injektiranja | 25 μ L |
| Sastav mobilne faze | 8,0 mM K_2CO_3 /1,0 mM $KHCO_3$ |
| Brzina protoka mobilne faze | 0,5 mL/min |
| Temperatura | 30°C |
| Trajanje | 20 min |

Pripremljena je osnovna otopina fosfata (10 μ g/mL) i poredbene otopine fosfata (2, 5 i 8 μ g/mL). Na početku i na kraju injektirana je voda za kromatografiju R, a između su po dva puta injektirane navedene otopine prema rastućoj koncentraciji. Cilj je bio odrediti vrijeme zadržavanja i raspon koncentracija koje daju zadovoljavajući signal, odnosno visinu pika na kromatogramu, ispitati simetriju dobivenog pika na kromatogramu, slaganje ponovljenih mjerenja i prijenos ispitivane tvari između mjerenja. Početni uvjeti metode navedeni su u Tablici 5. Vrijeme zadržavanja je bilo 6,8 – 6,9 minuta zbog čega je vrijeme analize skraćeno. Nije bilo znatnih odstupanja između ponovljenih mjerenja i nije uočen prijenos ispitivane tvari, ali su dobiveni slabi signali (pikovi male visine i površine).

Pripremljena je osnovna otopina fosfata (50 μ g/mL) i koncentracijski niz fosfata (5, 10, 25, 40 i 50 μ g/mL). Na početku i na kraju injektirana je voda za kromatografiju R, a između su po dva puta injektirane otopine koncentracijskog niza. Prema dobivenim signalima odabrano je radno područje 10 – 50 μ g/mL zbog zadovoljavajuće jačine signala (visina pika > 1,5 μ S i površina pika > 0,5 μ S*min) te dobre korelacije između signala i koncentracije (koeficijent korelacije \geq 0,99).

Budući da je namjera odrediti sadržaj fosfata u uzorku metodom kalibracijske krivulje koja prikazuje ovisnost površine pika o koncentraciji otopine, pristupilo se optimiranju uvjeta metode kako bi se poboljšala simetrija pika te time utjecalo na parametre metode (preciznost, ponovljivost, točnost). Ispitivanjima provedenim na početnim uvjetima metode dobiveni su pikovi faktora simetrije 1,5 – 1,9. Uvjeti metode čiji se utjecaj na simetriju pikova ispitivao su volumen injektiranja, temperatura, sastav mobilne faze i brzina protoka mobilne faze. Prema očekivanoj promjeni vremena zadržavanja, produljeno je vrijeme trajanja metode. Ispitivanja su provedena na prethodno pripremljenoj osnovnoj otopini fosfata (50 μ g/mL) koja se

injektirala po dva puta, a prilikom svake promjene uvjeta injektirana je voda za kromatografiju R po dva puta.

Smanjenjem volumena injektiranja (na 15 i 5 μL) nije došlo do poboljšanja simetrije i smanjila se visina pikova, stoga su ispitivanja nastavljena s volumenom injektiranja 25 μL .

Promjena temperature (za $\pm 5^\circ\text{C}$) nije značajno utjecala na simetriju pika, odnosno nije uočena korelacija između temperature kolone i simetrije pika, stoga su ispitivanja nastavljena na temperaturi 30°C .

Koncentracija pufera u mobilnoj fazi mijenjala se za -25%, +25% i +50% na način da omjer sastavnica pufera ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$) ostane isti. Smanjenje koncentracije pufera u mobilnoj fazi dovelo je do produljenja vremena zadržavanja, smanjenja visine, povećanja površine i bolje simetrije pika.

Ispitivala su se svojstva pika ovisno o promjeni brzine protoka mobilne faze: 0,4 mL/min, 0,6 mL/min i 0,8 mL/min. Povećanje brzine protoka dovelo je do skraćivanja vremena zadržavanja, smanjenja visine, smanjenja površine i blagog poboljšanja simetrije pika.

Kako bi se pokušala postići bolja simetrija, a zadržala dobivena visina i površina pika, ispitane su kombinacije različitih koncentracija pufera u mobilnoj fazi (4,0 mM $\text{K}_2\text{CO}_3/0,50$ mM KHCO_3 , 6,0 mM $\text{K}_2\text{CO}_3/0,75$ mM KHCO_3) i brzina protoka (0,6 mL/min, 0,7 mL/min, 0,8 mL/min). Ispitivanja su provedena na prethodno pripremljenoj osnovnoj otopini fosfata (50 $\mu\text{g/mL}$) koja se injektirala po dva puta, a prilikom svake promjene uvjeta injektirana je voda za kromatografiju R po dva puta. Pregledom dobivenih kromatograma odabrana je nova vodeća metoda kojom je faktor simetrije pika smanjen na približno 1,4.

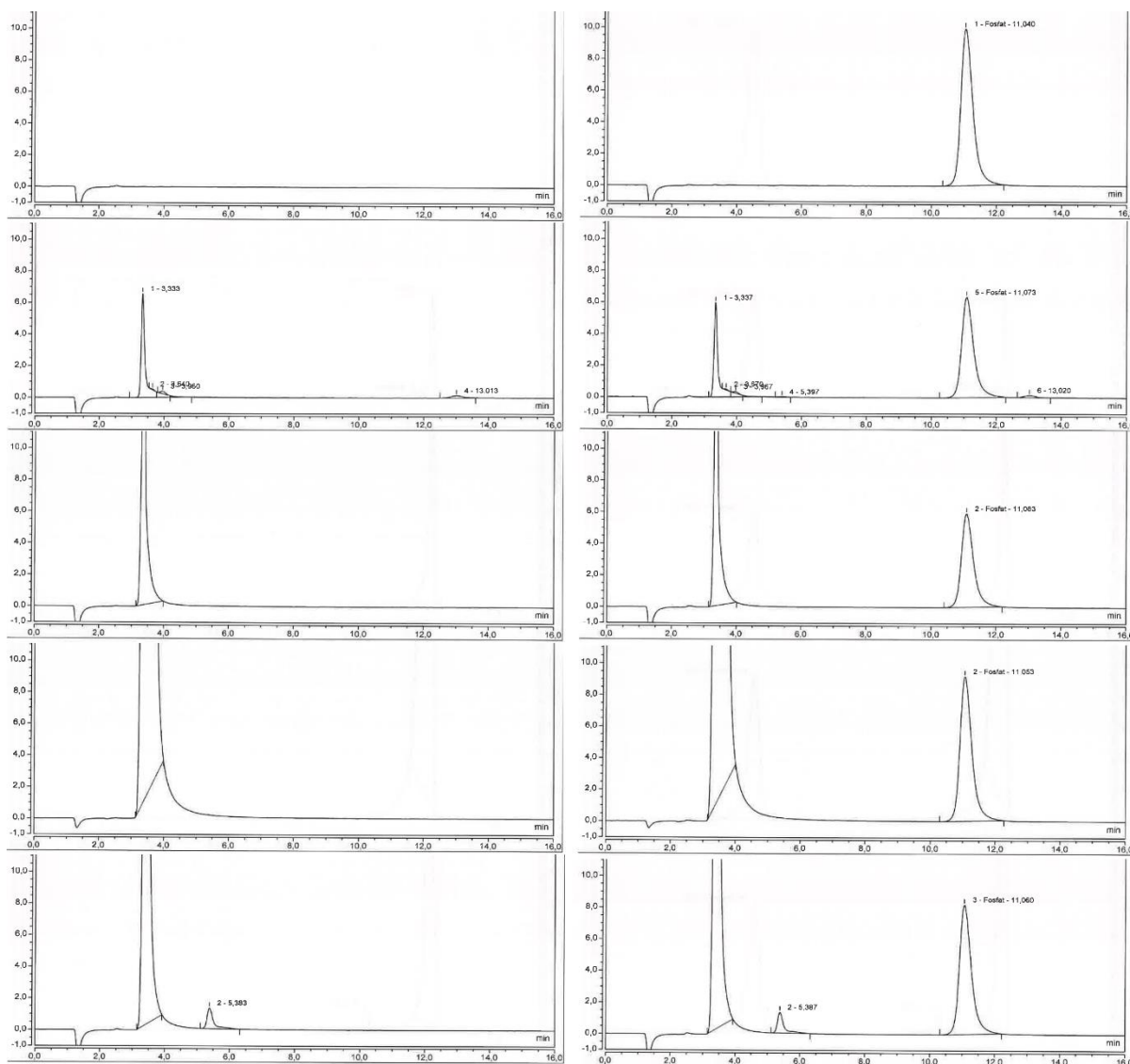
Tablica 6: Usporedba uvjeta konačne i početne metode u razvoju

| Konačna metoda | | Početna metoda | |
|----------------------|---|----------------------|---|
| Mobilna faza | 4,0 mM $\text{K}_2\text{CO}_3/$ 0,5 mM KHCO_3 | Mobilna faza | 8 mM $\text{K}_2\text{CO}_3/$ 1 mM KHCO_3 |
| Brzina | 0,6 mL/min | Brzina | 0,5 mL/min |
| Temperatura | 30°C | Temperatura | 30°C |
| Volumen injektiranja | 25 μL | Volumen injektiranja | 25 μL |
| Trajanje | 20 min | Trajanje | 15 min |

Pripremljena je osnovna otopina fosfata (50 $\mu\text{g/mL}$) i otopine uzoraka na način da pretpostavljena koncentracija fosfata u otopini koja će se injektirati bude unutar raspona 10 – 50 $\mu\text{g/mL}$. Cilj je ispitati ponašanje uzoraka tijekom analize vodećim metodama, prije svega hoće li se postići odjeljivanje sastavnica uzorka i dovoljno dobro razlučivanje pika fosfata od susjednih pikova te koliko će metoda trajati. Konačnom metodom postignuto je odjeljivanje fosfata i sulfata u uzorku Razvojnog proizvoda 1 (razlučivanje veće od 3), bolja simetrija, manja visina i površina pikova te metoda dulje traje. Početnom metodom nije se postiglo zadovoljavajuće odjeljivanje fosfata i sulfata u uzorku Razvojnog proizvoda 1 (razlučivanje manje od 2) i lošija je simetrija pikova, stoga je, usprkos većoj visini i površini pikova te kraćem trajanju, ona odbačena.

4.3. SELEKTIVNOST

Selektivnost metode ispitana je usporedbom kromatograma dobivenih analizom uzoraka Razvojnog proizvoda 1, Razvojnog proizvoda 2, Vizola S 0,21% i Nazola 0,1% s kromatogramima dobivenim analizom pripadajućih placebo uzoraka bez soli fosfata, uz osnovnu otopinu fosfata za identifikaciju pika fosfata. U placebo uzorcima nisu prisutni pikovi koji bi interferirali s pikom fosfata što odgovara zahtjevu za selektivnost metode (Slika 8).



Slika 8: Selektivnost: u lijevom stupcu otapalo i placebo uzorci Razvojni proizvod 1, Razvojni proizvod 2, Vizol S 0,21% i Nazol 0,1%; u desnom stupcu osnovna otopina fosfata i uzorci Razvojni proizvod 1, Razvojni proizvod 2, Vizol S 0,21% i Nazol 0,1%

4.4. TOČNOST

Točnost metode ispitana je na tri pripreme tri koncentracije cijepljenih placebo uzoraka Razvojnog proizvoda 1, Razvojnog proizvoda 2, Vizola S 0,21% i Nazola 0,1% kako bi se obuhvatilo postavljeno radno područje, s time da se svaka otopina injektirala u duplikatu. Točnost je izražena kao analitički prinos između teorijske koncentracije i eksperimentalne koncentracije koja je određena metodom kalibracijske krivulje preko površine pika.

Tablica 7: Točnost metode - Razvojni proizvod 1

| Priprema | Teorijska koncentracija (µg/mL) | Eksperimentalna koncentracija (µg/mL) | Prinos (%) | Prosječni prinos po pripremi (%) | Prosječni prinos po koncentraciji (%) | Prosječni prinos (%) |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 1 2 3 | 10,00 | 10,1544 | 101,5 | 101,5 | 101,9 | 100,2 |
| | | 10,1464 | 101,5 | | | |
| | | 10,2277 | 102,3 | 102,1 | | SD (%) |
| | | 10,1968 | 102,0 | | | |
| | | 10,1968 | 102,0 | 102,2 | | 1,9 |
| | | 10,2380 | 102,4 | | | |
| 1 2 3 | 30,00 | 29,2020 | 97,3 | 97,6 | 97,7 | RSD (%) |
| | | 29,3302 | 97,8 | | | |
| | | 29,5099 | 98,4 | 98,0 | | 1,9 |
| | | 29,3085 | 97,7 | | | |
| | | 29,2798 | 97,6 | 97,6 | | |
| | | 29,3016 | 97,7 | | | |
| 1 2 3 | 50,00 | 50,4118 | 100,8 | 100,9 | 101,0 | |
| | | 50,4736 | 100,9 | | | |
| | | 50,7575 | 101,5 | 101,2 | | |
| | | 50,4919 | 101,0 | | | |
| | | 50,5125 | 101,0 | 101,0 | | |
| | | 50,4541 | 100,9 | | | |

Tablica 8: Točnost metode - Razvojni proizvod 2

| Priprema | Teorijska koncentracija (µg/mL) | Eksperimentalna koncentracija (µg/mL) | Prinos (%) | Prosječni prinos po pripremi (%) | Prosječni prinos po koncentraciji (%) | Prosječni prinos (%) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 1 | 10,00 | 10,1898 | 101,9 | 102,1 | 102,8 | 99,8 |
| | | 10,2295 | 102,3 | | | SD (%) |
| 2 | | 10,3270 | 103,3 | 103,6 | | |
| | | 10,3916 | 103,9 | | | |
| 3 | | 10,2816 | 102,8 | 102,7 | | |
| | | 10,2635 | 102,6 | | | 2,5 |
| 1 | 30,00 | 29,0725 | 96,9 | 97,3 | 97,0 | RSD (%) |
| | | 29,3061 | 97,7 | | | |
| 2 | | 29,0000 | 96,7 | 96,7 | | |
| | | 28,9977 | 96,7 | | | |
| 3 | | 29,3401 | 97,8 | 96,9 | | |
| | | 28,7982 | 96,0 | | | 2,5 |
| 1 | 50,00 | 49,7157 | 99,4 | 99,5 | 99,8 | |
| | | 49,8075 | 99,6 | | | |
| 2 | | 49,9730 | 99,9 | 99,8 | | |
| | | 49,8460 | 99,7 | | | |
| 3 | | 50,0512 | 100,1 | 99,9 | | |
| | | 49,8925 | 99,8 | | | |

Tablica 9: Točnost metode – Vizol S 0,21%

| Priprema | Teorijska koncentracija (µg/mL) | Eksperimentalna koncentracija (µg/mL) | Prinos (%) | Prosječni prinos po pripremi (%) | Prosječni prinos po koncentraciji (%) | Prosječni prinos (%) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 1 | 10,00 | 10,2089 | 102,1 | 102,4 | 102,7 | 100,3 |
| | | 10,2664 | 102,7 | | | SD (%) |
| 2 | | 10,2258 | 102,3 | 102,4 | | |
| | | 10,2450 | 102,4 | | | |
| 3 | | 10,4330 | 104,3 | 103,2 | | |
| | | 10,2134 | 102,1 | | | 2,2 |
| 1 | 30,00 | 29,3009 | 97,7 | 97,7 | 97,6 | RSD (%) |
| | | 29,3020 | 97,7 | | | |
| 2 | | 29,2390 | 97,5 | 97,4 | | |
| | | 29,1860 | 97,3 | | | |
| 3 | | 29,3921 | 98,0 | 97,9 | | |
| | | 29,3313 | 97,8 | | | 2,2 |
| 1 | 50,00 | 50,4018 | 100,8 | 100,6 | 100,7 | |
| | | 50,2261 | 100,5 | | | |
| 2 | | 50,5043 | 101,0 | 100,9 | | |
| | | 50,3545 | 100,7 | | | |
| 3 | | 50,3500 | 100,7 | 100,6 | | |
| | | 50,2014 | 100,4 | | | |

Tablica 10: Točnost metode – Nazol 0,1%

| Priprema | Teorijska koncentracija (µg/mL) | Eksperimentalna koncentracija (µg/mL) | Prinos (%) | Prosječni prinos po pripremi (%) | Prosječni prinos po koncentraciji (%) | Prosječni prinos (%) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 1 | 10,00 | 10,3024 | 103,0 | 102,9 | 102,5 | 100,2 |
| | | 10,2686 | 102,7 | | | SD (%) |
| 2 | | 10,2799 | 102,8 | 102,4 | | |
| | | 10,1999 | 102,0 | | | |
| 3 | | 10,3193 | 103,2 | 102,2 | | 2,2 |
| | | 10,1290 | 101,3 | | | |
| 1 | 30,00 | 29,0959 | 97,0 | 97,2 | 97,5 | RSD (%) |
| | | 29,2322 | 97,4 | | | |
| 2 | | 29,3572 | 97,9 | 97,8 | | |
| | | 29,3031 | 97,7 | | | |
| 3 | | 29,2604 | 97,5 | 97,5 | | 2,2 |
| | | 29,2221 | 97,4 | | | |
| 1 | 50,00 | 50,1845 | 100,4 | 100,5 | 100,5 | |
| | | 50,3568 | 100,7 | | | |
| 2 | | 50,1620 | 100,3 | 100,5 | | |
| | | 50,3849 | 100,8 | | | |
| 3 | | 50,2622 | 100,5 | 100,3 | | |
| | | 50,0876 | 100,2 | | | |

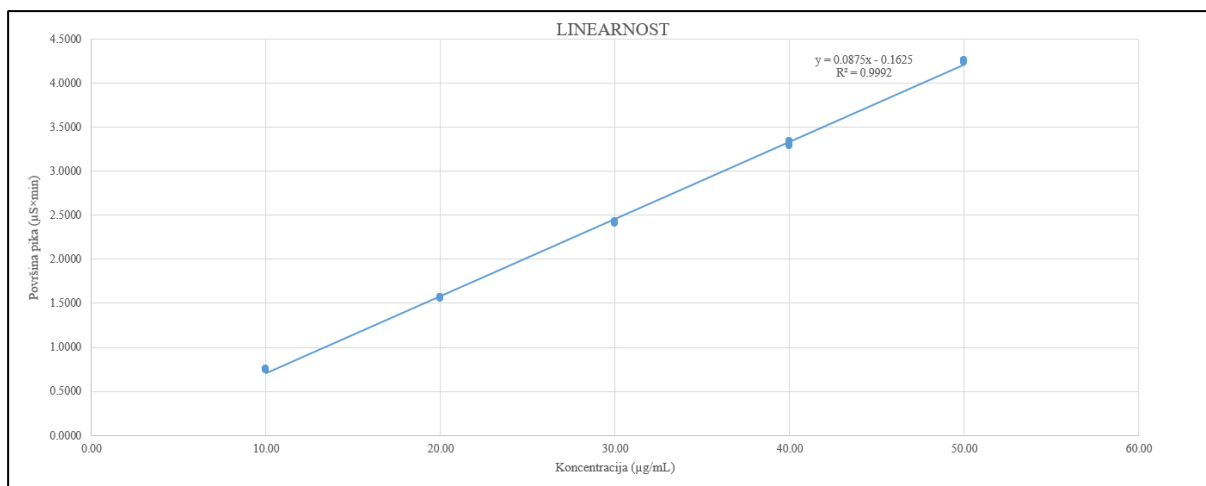
Na početku ispitivanja postavljen je zahtjev za analitički prinos 97,0 – 103,0%, prema zahtjevu za pomoćne tvari (antioksidanse i konzervanse) iz internog propisa laboratorija. U Tablicama 7 - 10 kosim su brojkama označeni rezultati koji odstupaju od postavljenog zahtjeva. Može se uočiti da su rezultati na nižoj i srednjoj koncentraciji manje točni od rezultata na višoj koncentraciji. Rezultati ne zadovoljavaju postavljeni zahtjev točnosti zbog male površine pikova. Prema iskustvu s radom na sustavu za ionsku kromatografiju u laboratoriju, postavljenim zahtjevima za postojeće metode i pripadajuće površine pikova analita u tim metodama, odlučilo se proširiti zahtjev za analitički prinos na 96,0 – 104,0% što se smatra dovoljnim za namjenu metode i metoda odgovara tom zahtjevu. Ukoliko u budućnosti bude nužno zadovoljiti strože zahtjeve, potrebno je povećati površinu pikova na način da se smanji razrjeđenje uzoraka, što bi se trebalo dodatno ispitati.

4.5. LINEARNOST

Linearnost metode ispitana je na tri pripreme koncentracijskog niza (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL) s time da se svaka pripremljena otopina injektirala u duplikatu. Linearnost metode izražena je jednadžbom regresijskog pravca ($y = ax + b$), koeficijentom korelacije (r) i koeficijentom determinacije (r^2). Zahtjev za koeficijent korelacije je $\geq 0,99$. Rezultati ispitivanja pokazali su kako metoda odgovara postavljenom zahtjevu (Tablica 11 i Slika 9).

Tablica 11: Linearnost metode

| Priprema | Koncentracija (µg/mL) | Površina pika (µS×min) | Jednadžba regresijskog pravca |
|----------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|
| 1 | 10,00 | 0,7523 | $y = 0,0875x - 0,1625$ |
| | | 0,7524 | |
| 2 | | 0,7576 | Koeficijent korelacije |
| | | 0,7527 | |
| 3 | | 0,7393 | 0,9996 |
| | | 0,7497 | |
| 1 | 20,00 | 1,5685 | Koeficijent determinacije |
| | | 1,5566 | |
| 2 | | 1,5783 | 0,9992 |
| | | 1,5631 | |
| 3 | | 1,5752 | |
| | | 1,5727 | |
| 1 | 30,00 | 2,4090 | |
| | | 2,4231 | |
| 2 | | 2,4344 | |
| | | 2,4271 | |
| 3 | | 2,4261 | |
| | | 2,4273 | |
| 1 | 40,00 | 3,2985 | |
| | | 3,3137 | |
| 2 | | 3,3426 | |
| | | 3,3422 | |
| 3 | | 3,2867 | |
| | | 3,3202 | |
| 1 | 50,00 | 4,2376 | |
| | | 4,2511 | |
| 2 | | 4,2662 | |
| | | 4,2587 | |
| 3 | | 4,2556 | |
| | | 4,2418 | |



Slika 9: Linearnost metode - regresijski pravac

4.6. PODRUČJE RADA

U postavljenom području rada 10 - 50 µg/mL ispitivanja su pokazala zadovoljavajuću točnost i linearnost metode.

4.7. PRECIZNOST SUSTAVA

Preciznost sustava ispitana je na šest uzastopnih injektiranja poredbene otopine fosfata (10 µg/mL). Izračunate su standardna devijacija i relativna standardna devijacija površine pika fosfata. Zahtjev za relativnu standardnu devijaciju je $\leq 2,0\%$. Rezultati ispitivanja pokazali su kako metoda odgovara postavljenom zahtjevu (Tablica 12).

Tablica 12: Preciznost sustava

| Površina pika (µS×min) | Srednja vrijednost površine pika (µS×min) | Standardna devijacija (µS×min) | Relativna standardna devijacija (%) |
|------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|
| 0,7558 | 0,7514 | 0,0066 | 0,87 |
| 0,7460 | | | |
| 0,7541 | | | |
| 0,7598 | | | |
| 0,7507 | | | |
| 0,7420 | | | |

4.8. PRECIZNOST METODE

Preciznost metode ispitana je na šest priprema otopina uzoraka s time da se svaka otopina injektirala u duplikatu. Uz to je pripremljena osnovna otopina fosfata (50 µg/mL) te je jedna korištena za pripremu koncentracijskog niza (10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL), a jedna za pripremu kontrolnog standarda (25 µg/mL). Koncentracijski niz korišten je za izradu, a kontrolni standard za provjeru kalibracijskog pravca. Iz kalibracijskog pravca izračunata je koncentracija fosfata u otopinama uzoraka, a potom i srednja vrijednost, standardna devijacija, relativna standardna devijacija i interval pouzdanosti na 95% vjerojatnosti. Zahtjev za relativnu standardnu devijaciju je ≤ 3,0%. Rezultati ispitivanja pokazali su kako metoda odgovara postavljenom zahtjevu za sve proizvode (Tablice 13-18).

Tablica 13: Podaci kalibracijskog pravca za ispitivanje na Razvojnem proizvodu 1 i Razvojnem proizvodu 2

| Koncentracija (µg/mL) | Površina pika (µS×min) |
|--------------------------|------------------------|
| 10,00 | 0,7549 |
| 10,00 | 0,7595 |
| 10,00 | 0,7621 |
| 20,00 | 1,5698 |
| 30,00 | 2,4291 |
| 40,00 | 3,3751 |
| 50,00 | 4,2788 |
| Odsječak na osi y | -0,1381 |
| Nagib pravca | 0,0876 |

Tablica 14: Preciznost metode - Razvojni proizvod 1

| Priprema | Površina pika (µS×min) | Koncentracija (µg/mL) | Srednja vrijednost koncentracije (µg/mL) | SD (µg/mL) |
|----------|------------------------|-----------------------|--|-------------------------------------|
| 1 | 2,8445 | 33,8745 | 33,2923 | 0,3185 |
| | 2,8269 | 33,6745 | | RSD (%) |
| 2 | 2,7897 | 33,2517 | | |
| | 2,7857 | 33,2063 | | 0,96 |
| 3 | 2,7562 | 32,8710 | | Interval pouzdanosti (µg/mL) |
| | 2,7783 | 33,1222 | | |
| 4 | 2,7873 | 33,2245 | | 33,0899 – 33,4947 |
| | 2,7986 | 33,3529 | | |
| 5 | 2,7486 | 32,7847 | | |
| | 2,7758 | 33,0938 | | |
| 6 | 2,8162 | 33,5529 | | |
| | 2,8114 | 33,4983 | | |

Tablica 15: Preciznost metode - Razvojni proizvod 2

| Priprema | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Srednja vrijednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | |
|----------|---|---|--|--|-------------------|
| 1 | 2,6664 | 31,8505 | 32,2020 | 0,2740 | |
| | 2,6571 | 31,7448 | | RSD (%) | |
| 2 | 2,6955 | 32,1812 | | | 0,85 |
| | 2,7047 | 32,2858 | | | |
| 3 | 2,7270 | 32,5392 | | Interval pouzdanosti ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | |
| | 2,7256 | 32,5233 | | | |
| 4 | 2,7042 | 32,2801 | | | 32,0278 – 32,3761 |
| | 2,7238 | 32,5028 | | | |
| 5 | 2,6910 | 32,1301 | | | |
| | 2,6696 | 31,8869 | | | |
| 6 | 2,6858 | 32,0710 | | | |
| | 2,7172 | 32,4278 | | | |

Tablica 16: Podaci kalibracijskog pravca za ispitivanje na Vizolu S 0,21% i Nazolu 0,1%

| Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) |
|---|---|
| 10,00 | 0,7706 |
| 10,00 | 0,7606 |
| 10,00 | 0,7657 |
| 20,00 | 1,5754 |
| 30,00 | 2,4453 |
| 40,00 | 3,3808 |
| 50,00 | 4,3067 |
| Odsječak na osi y | -0,1363 |
| Nagib pravca | 0,0880 |

Tablica 17: Preciznost metode - Vizol S 0,21%

| Priprema | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Srednja vrijednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | |
|----------|---|---|--|--|-------------------|
| 1 | 3,8983 | 46,0651 | 46,0296 | 0,2127 | |
| | 3,9098 | 46,1964 | | RSD (%) | |
| 2 | 3,8975 | 46,0560 | | | 0,46 |
| | 3,9005 | 46,0902 | | | |
| 3 | 3,8576 | 45,6006 | | Interval pouzdanosti ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | |
| | 3,8701 | 45,7433 | | | |
| 4 | 3,9073 | 46,1678 | | | 45,8945 – 46,1648 |
| | 3,9301 | 46,4280 | | | |
| 5 | 3,8955 | 46,0332 | | | |
| | 3,8888 | 45,9567 | | | |
| 6 | 3,9008 | 46,0936 | | | |
| | 3,8860 | 45,9247 | | | |

Tablica 18: Preciznost metode - Nazol 0,1%

| Priprema | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Srednja vrijednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|----------|---|---|--|--|
| 1 | 3,5314 | 41,8779 | 41,9549 | 1,1136 |
| | 3,5374 | 41,9464 | | RSD (%) |
| 2 | 3,5054 | 41,5812 | | |
| | 3,5111 | 41,6462 | | Interval pouzdanosti ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
| 3 | 3,7664 | 44,5598 | | |
| | 3,7147 | 43,9698 | | |
| 4 | 3,4662 | 41,1338 | | |
| | 3,4834 | 41,3301 | | |
| 5 | 3,4747 | 41,2308 | | |
| | 3,4786 | 41,2753 | | |
| 6 | 3,4912 | 41,4191 | | |
| | 3,4973 | 41,4887 | | |

4.9. SREDIŠNJA PRECIZNOST

Ispitivanje je proveo novi analitičar na način opisan za **Preciznost metode**.

Izračunata je koncentracija fosfata u otopinama uzoraka pomoću kalibracijskog pravca, a potom i srednja vrijednost, standardna devijacija, relativna standardna devijacija i interval pouzdanosti na 95% vjerojatnosti. Zahtjev za relativnu standardnu devijaciju je $\leq 3,0\%$. Rezultati ispitivanja pokazali su kako metoda odgovara postavljenom zahtjevu za sve proizvode (Tablice 19-23). Zatim su se usporedili rezultati različitih analitičara. Zahtjev za relativnu razliku srednjih vrijednosti koncentracija između ispitivanja koja su proveli različiti analitičari je $\leq 3,0\%$. Rezultati ispitivanja pokazali su kako metoda odgovara postavljenom zahtjevu (Tablica 24).

Tablica 19: Podaci kalibracijskog pravca za ispitivanje središnje preciznosti

| Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) |
|---|---|
| 10,00 | 0,7639 |
| 10,00 | 0,7598 |
| 10,00 | 0,7586 |
| 20,00 | 1,5868 |
| 30,00 | 2,4564 |
| 40,00 | 3,3668 |
| 50,00 | 4,2801 |
| Odsječak na osi y | -0,1305 |
| Nagib pravca | 0,0876 |

Tablica 20: Središnja preciznost - Razvojni proizvod 1

| Priprema | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Srednja vrijednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|----------|---|---|--|--|
| 1 | 2,8085 | 33,5641 | 33,5439 | 0,1657 |
| | 2,8096 | 33,5767 | | RSD (%) |
| 2 | 2,7952 | 33,4123 | | |
| | 2,7995 | 33,4614 | | Interval pouzdanosti ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
| 3 | 2,8345 | 33,8611 | | |
| | 2,8244 | 33,7457 | | |
| 4 | 2,8020 | 33,4899 | | |
| | 2,8117 | 33,6007 | | |
| 5 | 2,8206 | 33,7023 | | |
| | 2,7889 | 33,3403 | | |
| 6 | 2,7998 | 33,4648 | | |
| | 2,7860 | 33,3072 | | |

Tablica 21: Središnja preciznost - Razvojni proizvod 2

| Priprema | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Srednja vrijednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|----------|---|---|--|--|
| 1 | 2,6988 | 32,3113 | 32,3029 | 0,0502 |
| | 2,6996 | 32,3205 | | RSD (%) |
| 2 | 2,7020 | 32,3479 | | |
| | 2,6916 | 32,2291 | | Interval pouzdanosti ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
| 3 | 2,6990 | 32,3136 | | |
| | 2,7064 | 32,3981 | | |
| 4 | 2,6984 | 32,3068 | | |
| | 2,6973 | 32,2942 | | |
| 5 | 2,6995 | 32,3193 | | |
| | 2,6977 | 32,2988 | | |
| 6 | 2,6892 | 32,2017 | | |
| | 2,6972 | 32,2931 | | |

Tablica 22: Središnja preciznost – Vizol S 0,21%

| Priprema | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Srednja vrijednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|----------|---|---|--|--|
| 1 | 3,8742 | 45,7349 | 45,8481 | 0,1446 |
| | 3,8960 | 45,9838 | | RSD (%) |
| 2 | 3,8748 | 45,7417 | | |
| | 3,8651 | 45,6309 | | Interval pouzdanosti ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
| 3 | 3,8919 | 45,9370 | | |
| | 3,8679 | 45,6629 | | |
| 4 | 3,9105 | 46,1494 | | |
| | 3,8884 | 45,8970 | | |
| 5 | 3,8851 | 45,8594 | | |
| | 3,8819 | 45,8228 | | |
| 6 | 3,8838 | 45,8445 | | |
| | 3,8898 | 45,9130 | | |

Tablica 23: Središnja preciznost – Nazol 0,1%

| Priprema | Površina pika (μS×min) | Koncentracija (μg/mL) | Srednja vrijednost koncentracije (μg/mL) | SD (μg/mL) |
|----------|------------------------|-----------------------|--|-------------------------------------|
| 1 | 3,5696 | 42,2562 | 42,4042 | 0,2146 |
| | 3,5784 | 42,3567 | | RSD (%) |
| 2 | 3,5664 | 42,2197 | | |
| | 3,5722 | 42,2859 | | Interval pouzdanosti (μg/mL) |
| 3 | 3,6194 | 42,8250 | | |
| | 3,5680 | 42,2379 | | |
| 4 | 3,5714 | 42,2768 | | |
| | 3,5694 | 42,2539 | | |
| 5 | 3,5743 | 42,3099 | | |
| | 3,5885 | 42,4721 | | |
| 6 | 3,5963 | 42,5611 | | |
| | 3,6168 | 42,7953 | | |

Tablica 24: Usporedba rezultata različitih analitičara

| Proizvod | Srednja vrijednost koncentracije (μg/mL) Analitičar 1 | Srednja vrijednost koncentracije (μg/mL) Analitičar 2 | Apsolutna razlika (μg/mL) | Relativna razlika (%) |
|---------------------|---|---|---------------------------|-----------------------|
| Razvojni proizvod 1 | 33,4540 | 33,5439 | 0,0898 | 0,27 |
| Razvojni proizvod 2 | 32,3591 | 32,3029 | 0,0563 | 0,17 |
| Vizol S 0,21% | 46,0296 | 45,8481 | 0,1815 | 0,39 |
| Nazol 0,1% | 41,9549 | 42,4042 | 0,4493 | 1,07 |

4.10. ROBUSNOST/OTPORNOST - ISPITIVANJE UTJECAJA FILTRIRANJA

Utjecaj filtriranja ispitan je na otapalu (voda za kromatografiju R), poredbenoj otopini fosfata (10 μg/mL) i otopinama uzoraka. Svaka se otopina analizirala nefiltrirana, filtrirana kroz FilterBio PES filter uz odbacivanje prva 2 mL, 4 mL i 6 mL filtrata, te filtrirana kroz Dionex OnGuard RP II uložak i FilterBio PES filter uz odbacivanje prva 3 mL, 6 mL i 9 mL filtrata. Svaka se otopina za analizu injektirala u duplikatu. Na kromatogramu filtriranog otapala ne smije biti novih pikova u odnosu na kromatogram nefiltriranog otapala, što je metoda zadovoljila. U ostalim otopinama za analizu, relativna razlika površine pika fosfata između nefiltriranih i filtriranih otopina mora biti ≤ 2,0%. Rezultati ispitivanja pokazali su kako svi ispitani načini filtriranja odgovaraju postavljenom zahtjevu (Tablice 25-29). U svim ostalim

ispitivanjima prihvatile su se upute proizvođača i prilikom filtriranja kroz FilterBio PES filter odbacivala su se barem 2 mL filtrata, a prilikom filtriranja kroz OnGuard RP II uložak i FilterBio PES filter odbacivalo se barem 6 mL filtrata. Sve pripremljene otopine u svim ispitivanjima filtrirane su kroz FilterBio PES filter kako bi se uklonile krute čestice prije unošenja u sustav za analizu, osim otopina uzoraka i placebo uzoraka Razvojnog proizvoda 2 koje su dodatno filtrirane kroz Dionex OnGuard RP II uložak kako bi se uklonile površinski aktivne tvari koje ovaj proizvod sadrži.

Tablica 25: Utjecaj filtriranja - Poredbena otopina

| Filter | Volumen odbačenog filtrata (mL) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Srednja vrijednost površine pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|---------------------|---------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Nefiltrirana | | 0,7518 | 0,7528 | |
| | | 0,7538 | | |
| PES | 2 | 0,7541 | 0,7612 | 1,1 |
| | | 0,7682 | | |
| PES | 4 | 0,7479 | 0,7560 | 0,4 |
| | | 0,7641 | | |
| PES | 6 | 0,7549 | 0,7562 | 0,4 |
| | | 0,7574 | | |
| OnGuard RP II i PES | 3 | 0,7568 | 0,7597 | 0,9 |
| | | 0,7625 | | |
| OnGuard RP II i PES | 6 | 0,7658 | 0,7640 | 1,5 |
| | | 0,7622 | | |
| OnGuard RP II i PES | 9 | 0,7542 | 0,7584 | 0,7 |
| | | 0,7625 | | |

Tablica 26: Utjecaj filtriranja - Razvojni proizvod 1

| Filter | Volumen odbačenog filtrata (mL) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Srednja vrijednost površine pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|---------------------|---------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Nefiltrirana | | 2,7793 | 2,7818 | |
| | | 2,7842 | | |
| PES | 2 | 2,7691 | 2,7667 | 0,5 |
| | | 2,7642 | | |
| PES | 4 | 2,7637 | 2,7659 | 0,6 |
| | | 2,7681 | | |
| PES | 6 | 2,7589 | 2,7650 | 0,6 |
| | | 2,7711 | | |
| OnGuard RP II i PES | 3 | 2,7397 | 2,7358 | 1,7 |
| | | 2,7319 | | |
| OnGuard RP II i PES | 6 | 2,7655 | 2,7585 | 0,8 |
| | | 2,7515 | | |
| OnGuard RP II i PES | 9 | 2,7329 | 2,7386 | 1,6 |
| | | 2,7443 | | |

Tablica 27: Utjecaj filtriranja - Razvojni proizvod 2

| Filter | Volumen odbačenog filtrata (mL) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Srednja vrijednost površine pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|---------------------|---------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Nefiltrirana | | 2,5799 | 2,5871 | |
| | | 2,5943 | | |
| PES | 2 | 2,5949 | 2,6002 | 0,5 |
| | | 2,6055 | | |
| PES | 4 | 2,5822 | 2,5820 | 0,2 |
| | | 2,5818 | | |
| PES | 6 | 2,5863 | 2,5976 | 0,4 |
| | | 2,6088 | | |
| OnGuard RP II i PES | 3 | 2,5899 | 2,5951 | 0,3 |
| | | 2,6002 | | |
| OnGuard RP II i PES | 6 | 2,5739 | 2,5704 | 0,6 |
| | | 2,5669 | | |
| OnGuard RP II i PES | 9 | 2,5955 | 2,5871 | 0,0 |
| | | 2,5787 | | |

Tablica 28: Utjecaj filtriranja – Vizol S 0,21%

| Filter | Volumen odbačenog filtrata (mL) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Srednja vrijednost površine pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|---------------------|---------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Nefiltrirana | | 3,9247 | 3,9265 | |
| | | 3,9283 | | |
| PES | 2 | 3,9103 | 3,8957 | 0,8 |
| | | 3,8810 | | |
| PES | 4 | 3,8894 | 3,9130 | 0,3 |
| | | 3,9365 | | |
| PES | 6 | 3,9077 | 3,9073 | 0,5 |
| | | 3,9068 | | |
| OnGuard RP II i PES | 3 | 3,8895 | 3,8823 | 1,1 |
| | | 3,8751 | | |
| OnGuard RP II i PES | 6 | 3,8788 | 3,8803 | 1,2 |
| | | 3,8817 | | |
| OnGuard RP II i PES | 9 | 3,8905 | 3,8861 | 1,0 |
| | | 3,8816 | | |

Tablica 29: Utjecaj filtriranja – Nazol 0,1%

| Filter | Volumen odbačenog filtrata (mL) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Srednja vrijednost površine pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|---------------------|---------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Nefiltrirana | | 3,4841 | 3,4987 | |
| | | 3,5133 | | |
| PES | 2 | 3,4779 | 3,5005 | 0,1 |
| | | 3,5230 | | |
| PES | 4 | 3,4843 | 3,4842 | 0,4 |
| | | 3,4840 | | |
| PES | 6 | 3,5237 | 3,5091 | 0,3 |
| | | 3,4945 | | |
| OnGuard RP II i PES | 3 | 3,4532 | 3,4642 | 0,1 |
| | | 3,4751 | | |
| OnGuard RP II i PES | 6 | 3,4231 | 3,4337 | 1,9 |
| | | 3,4442 | | |
| OnGuard RP II i PES | 9 | 3,4506 | 3,4412 | 1,6 |
| | | 3,4317 | | |

4.11. ROBUSNOST/OTPORNOST - STABILNOST OTOPINA

Stabilnost otopina ispitana je na koncentracijskom nizu (10, 20, 30, 40 i 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i otopinama uzoraka koje su se čuvale tijekom 72 sata u staklenom laboratorijskom posuđu na sobnoj temperaturi (15-25°C) i u plastičnim vialama u sustavu za ionsku kromatografiju (20°C). Relativna razlika površine pika fosfata između svježe pripremljenih otopina, otopina koje su stajale u laboratorijskom posuđu i u vialama treba biti $\leq 2,0\%$. Rezultati ispitivanja pokazali su kako se sve otopine mogu čuvati tijekom navedenog vremena u navedenim uvjetima (Tablice 30-34), osim otopine Razvojnog proizvoda 2 koja odstupa od zahtjeva nakon 48 sati u plastičnim vialama (označeno kosim brojkama u Tablici 32). Uobičajena praksa u laboratoriju je čuvati otopine za analizu do 24 sata u plastičnim vialama i do 72 sata u staklenom laboratorijskom posuđu te se s tom praksom prema rezultatima ispitivanja može nastaviti.

Tablica 30: Stabilnost otopina – Koncentracijski niz

| Koncentracija otopine ($\mu\text{g/mL}$) | Vrijeme (h) | Mjesto čuvanja | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|--|-------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 10,00 | 0 | | 0,7549 | 0,7588 |
| | 0 | | 0,7595 | |
| | 0 | | 0,7621 | |
| | 24 | Viale | 0,7610 | 0,29 |
| | 24 | Posude | 0,7706 | 1,55 |
| | 48 | Viale | 0,7592 | 0,05 |
| | 48 | Posude | 0,7469 | 1,57 |
| | 72 | Viale | 0,7530 | 0,77 |
| 72 | Posude | 0,7590 | 0,02 | |
| 20,00 | 0 | | 1,5698 | |
| | 24 | Viale | 1,5819 | 0,77 |
| | 24 | Posude | 1,5754 | 0,36 |
| | 48 | Viale | 1,5818 | 0,76 |
| | 48 | Posude | 1,5516 | 1,16 |
| | 72 | Viale | 1,5682 | 0,10 |
| | 72 | Posude | 1,5560 | 0,88 |
| 30,00 | 0 | | 2,4291 | |
| | 24 | Viale | 2,4548 | 1,06 |
| | 24 | Posude | 2,4453 | 0,67 |
| | 48 | Viale | 2,4077 | 0,88 |
| | 48 | Posude | 2,4329 | 0,16 |
| | 72 | Viale | 2,4101 | 0,78 |
| | 72 | Posude | 2,4192 | 0,41 |
| 40,00 | 0 | | 3,3751 | |
| | 24 | Viale | 3,3541 | 0,62 |
| | 24 | Posude | 3,3808 | 0,17 |
| | 48 | Viale | 3,3104 | 1,92 |
| | 48 | Posude | 3,3397 | 1,05 |
| | 72 | Viale | 3,3107 | 1,91 |
| | 72 | Posude | 3,3827 | 0,23 |
| 50,00 | 0 | | 4,2788 | |
| | 24 | Viale | 4,2982 | 0,45 |
| | 24 | Posude | 4,3067 | 0,65 |
| | 48 | Viale | 4,2403 | 0,90 |
| | 48 | Posude | 4,2648 | 0,33 |
| | 72 | Viale | 4,2036 | 1,76 |
| | 72 | Posude | 4,2565 | 0,52 |

Tablica 31: Stabilnost otopina – Razvojni proizvod 1

| Vrijeme (h) | Mjesto čuvanja | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|-------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 0 | | 2,8300 | |
| 24 | Viale | 2,8385 | 0,30 |
| 24 | Posuđe | 2,8265 | 0,12 |
| 48 | Viale | 2,7979 | 1,13 |
| 48 | Posuđe | 2,8102 | 0,70 |
| 72 | Viale | 2,7977 | 1,14 |
| 72 | Posuđe | 2,8439 | 0,49 |

Tablica 32: Stabilnost otopina – Razvojni proizvod 2

| Vrijeme (h) | Mjesto čuvanja | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|-------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 0 | | 2,6753 | |
| 24 | Viale | 2,6632 | 0,45 |
| 24 | Posuđe | 2,6682 | 0,27 |
| 48 | Viale | 2,6062 | 2,58 |
| 48 | Posuđe | 2,6494 | 0,97 |
| 72 | Viale | 2,6702 | 0,19 |
| 72 | Posuđe | 2,6470 | 1,06 |

Tablica 33: Stabilnost otopina – Vizol S 0,21%

| Vrijeme (h) | Mjesto čuvanja | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|-------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 0 | | 3,9139 | |
| 24 | Viale | 3,9453 | 0,80 |
| 24 | Posuđe | 3,9239 | 0,26 |
| 48 | Viale | 3,8828 | 0,79 |
| 48 | Posuđe | 3,9085 | 0,14 |
| 72 | Viale | 3,9361 | 0,57 |
| 72 | Posuđe | 3,8797 | 0,87 |

Tablica 34: Stabilnost otopina – Nazol 0,1%

| Vrijeme (h) | Mjesto čuvanja | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Relativna razlika površine pika (%) |
|-------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 0 | | 3,5355 | |
| 24 | Viale | 3,5447 | 0,26 |
| 24 | Posuđe | 3,5618 | 0,74 |
| 48 | Viale | 3,5051 | 0,86 |
| 48 | Posuđe | 3,5127 | 0,64 |
| 72 | Viale | 3,4945 | 1,16 |
| 72 | Posuđe | 3,5608 | 0,72 |

4.12. ROBUSNOST/OTPORNOST – PROMJENE UVJETA METODE

Otpornost na promjene uvjeta metode ispitana je na otopinama koncentracijskog niza (10, 20, 30, 40 i 50 $\mu\text{g/mL}$) i otopinama uzoraka. Ispitane su sljedeće promjene uvjeta metode: brzina protoka mobilne faze $\pm 10\%$, promjena temperature kolone $\pm 10\%$ i promjena sastava mobilne faze $\pm 10\%$. Vrijeme zadržavanja fosfata treba biti u rasponu $11,1 \pm 1,5$ min u svim otopinama. Preciznost sustava izražena kao relativna standardna devijacija površine pika fosfata određena na tri uzastopna injektiranja poredbene otopine (10 $\mu\text{g/mL}$) treba biti $\leq 2,0\%$. Visina pika fosfata u poredbenoj otopini (30 $\mu\text{g/mL}$) treba biti $\geq 4,00$ μS . Faktor simetrije pika fosfata treba biti u rasponu 0,80 – 2,00 u svim otopinama. Iz rezultata ispitivanja vidljivo je kako metoda i pod promijenjenim uvjetima zadovoljava sve navedene zahtjeve (Tablice 35-41), stoga se može tvrditi da je metoda otporna na odstupanja uvjeta koji se mogu očekivati prilikom rutinske primjene u laboratoriju.

Tablica 35: Promjene uvjeta metode – Standardni uvjeti

| Otopina | Vrijeme zadržavanja (min) | Visina pika (μS) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | SD ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Faktor simetrije |
|--|---------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------------|------------------|
| Poredbena otopina (10 $\mu\text{g/mL}$) | 11,073 | 1,68 | 0,7615 | 0,0078 | 1,40 |
| | 11,070 | 1,69 | 0,7758 | | 1,42 |
| | 11,070 | 1,69 | 0,7634 | | 1,39 |
| Poredbena otopina (20 $\mu\text{g/mL}$) | 11,057 | 3,56 | 1,6041 | RSD (%) | 1,42 |
| Poredbena otopina (30 $\mu\text{g/mL}$) | 11,047 | 5,54 | 2,4605 | 1,0 | 1,41 |
| Poredbena otopina (40 $\mu\text{g/mL}$) | 11,023 | 7,65 | 3,3772 | | 1,41 |
| Poredbena otopina (50 $\mu\text{g/mL}$) | 11,010 | 9,85 | 4,3098 | | 1,42 |
| Razvojni proizvod 1 | 11,040 | 6,32 | 2,7952 | | 1,41 |
| | 11,033 | 6,33 | 2,8050 | | 1,41 |
| Razvojni proizvod 2 | 11,047 | 5,88 | 2,5935 | | 1,40 |
| | 11,037 | 5,90 | 2,6193 | | 1,41 |
| Vizol S 0,21% | 11,020 | 9,01 | 3,9398 | | 1,43 |
| | 11,013 | 9,09 | 3,9913 | | 1,43 |
| Nazol 0,1% | 11,020 | 8,03 | 3,5242 | | 1,41 |
| | 11,020 | 8,03 | 3,5152 | | 1,41 |

Tablica 36: Promjene uvjeta metode – Brzina protoka mobilne faze -10% (0,54 mL/min)

| Otopina | Vrijeme zadržavanja (min) | Visina pika (μS) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | SD ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Faktor simetrije |
|---|---------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------------|------------------|
| Poredbena otopina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 12,287 | 1,72 | 0,8519 | 0,0047 | 1,44 |
| | 12,287 | 1,74 | 0,8609 | | 1,43 |
| | 12,287 | 1,73 | 0,8587 | | 1,45 |
| Poredbena otopina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 12,270 | 3,62 | 1,7694 | RSD (%) | 1,43 |
| Poredbena otopina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 12,260 | 5,63 | 2,7272 | 0,5 | 1,42 |
| Poredbena otopina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 12,240 | 7,80 | 3,7531 | | 1,43 |
| Poredbena otopina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 12,223 | 10,02 | 4,8051 | | 1,45 |
| Razvojni proizvod 1 | 12,247 | 6,44 | 3,1072 | | 1,43 |
| | 12,247 | 6,42 | 3,1192 | | 1,44 |
| Razvojni proizvod 2 | 12,247 | 6,00 | 2,9022 | | 1,44 |
| | 12,257 | 6,01 | 2,9183 | | 1,44 |
| Vizol S 0,21% | 12,230 | 9,24 | 4,4210 | | 1,45 |
| | 12,227 | 9,20 | 4,3937 | | 1,45 |
| Nazol 0,1% | 12,233 | 8,19 | 3,9464 | | 1,44 |
| | 12,237 | 8,23 | 3,9597 | | 1,45 |

Tablica 37: Promjene uvjeta metode – Brzina protoka mobilne faze +10% (0,66 mL/min)

| Otopina | Vrijeme zadržavanja (min) | Visina pika (μS) | Površina pika ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | SD ($\mu\text{S}\times\text{min}$) | Faktor simetrije |
|---|---------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------------|------------------|
| Poredbena otopina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 10,073 | 1,65 | 0,7013 | 0,0065 | 1,44 |
| | 10,077 | 1,65 | 0,6935 | | 1,41 |
| | 10,080 | 1,66 | 0,7064 | | 1,44 |
| Poredbena otopina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 10,063 | 3,44 | 1,4436 | RSD (%) | 1,40 |
| Poredbena otopina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 10,047 | 5,41 | 2,2316 | 0,9 | 1,39 |
| Poredbena otopina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 10,040 | 7,47 | 3,0752 | | 1,39 |
| Poredbena otopina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 10,017 | 9,51 | 3,8801 | | 1,41 |
| Razvojni proizvod 1 | 10,043 | 6,11 | 2,5202 | | 1,40 |
| | 10,043 | 6,09 | 2,5260 | | 1,41 |
| Razvojni proizvod 2 | 10,053 | 5,77 | 2,3922 | | 1,42 |
| | 10,043 | 5,71 | 2,3626 | | 1,40 |
| Vizol S 0,21% | 10,027 | 8,67 | 3,5432 | | 1,42 |
| | 10,023 | 8,72 | 3,5585 | | 1,42 |
| Nazol 0,1% | 10,037 | 7,75 | 3,1914 | | 1,41 |
| | 10,037 | 7,83 | 3,2124 | | 1,41 |

Tablica 38: Promjene uvjeta metode – Temperatura kolone -10% (27°C)

| Otopina | Vrijeme zadržavanja (min) | Visina pika (μS) | Površina pika (μS×min) | SD (μS×min) | Faktor simetrije |
|------------------------------|---------------------------|------------------|------------------------|----------------|------------------|
| Poredbena otopina (10 μg/mL) | 11,020 | 1,65 | 0,7610 | 0,0075 | 1,44 |
| | 11,020 | 1,66 | 0,7665 | | 1,45 |
| | 11,020 | 1,64 | 0,7516 | | 1,39 |
| Poredbena otopina (20 μg/mL) | 11,000 | 3,48 | 1,5952 | RSD (%) | 1,42 |
| Poredbena otopina (30 μg/mL) | 10,983 | 5,42 | 2,4533 | 1,0 | 1,41 |
| Poredbena otopina (40 μg/mL) | 10,977 | 7,46 | 3,3552 | | 1,41 |
| Poredbena otopina (50 μg/mL) | 10,953 | 9,60 | 4,2893 | | 1,42 |
| Razvojni proizvod 1 | 10,977 | 6,15 | 2,7645 | | 1,41 |
| | 10,977 | 6,16 | 2,7753 | | 1,42 |
| Razvojni proizvod 2 | 10,993 | 5,75 | 2,5985 | | 1,42 |
| | 10,987 | 5,77 | 2,5990 | | 1,41 |
| Vizol S 0,21% | 10,970 | 8,84 | 3,9422 | | 1,43 |
| | 10,963 | 8,77 | 3,9143 | | 1,43 |
| Nazol 0,1% | 10,967 | 7,87 | 3,5296 | | 1,43 |
| | 10,970 | 7,94 | 3,5567 | | 1,42 |

Tablica 39: Promjene uvjeta metode – Temperatura kolone +10% (33°C)

| Otopina | Vrijeme zadržavanja (min) | Visina pika (μS) | Površina pika (μS×min) | SD (μS×min) | Faktor simetrije |
|------------------------------|---------------------------|------------------|------------------------|----------------|------------------|
| Poredbena otopina (10 μg/mL) | 11,130 | 1,74 | 0,7781 | 0,0042 | 1,44 |
| | 11,130 | 1,75 | 0,7862 | | 1,44 |
| | 11,137 | 1,74 | 0,7801 | | 1,42 |
| Poredbena otopina (20 μg/mL) | 11,120 | 3,70 | 1,6502 | RSD (%) | 1,41 |
| Poredbena otopina (30 μg/mL) | 11,100 | 5,76 | 2,5421 | 0,5 | 1,41 |
| Poredbena otopina (40 μg/mL) | 11,080 | 7,96 | 3,4861 | | 1,42 |
| Poredbena otopina (50 μg/mL) | 11,070 | 10,24 | 4,4521 | | 1,43 |
| Razvojni proizvod 1 | 11,097 | 6,55 | 2,8825 | | 1,42 |
| | 11,090 | 6,55 | 2,8907 | | 1,42 |
| Razvojni proizvod 2 | 11,100 | 6,10 | 2,6792 | | 1,42 |
| | 11,093 | 6,13 | 2,7027 | | 1,42 |
| Vizol S 0,21% | 11,077 | 9,39 | 4,0908 | | 1,44 |
| | 11,070 | 9,36 | 4,0585 | | 1,44 |
| Nazol 0,1% | 11,083 | 8,43 | 3,6832 | | 1,43 |
| | 11,080 | 8,44 | 3,6842 | | 1,42 |

Tablica 40: Promjene uvjeta metode – Sastav mobilne faze -10% (3,6 mM K₂CO₃/0,45 mM KHCO₃)

| Otopina | Vrijeme zadržavanja (min) | Visina pika (μS) | Površina pika (μS×min) | SD (μS×min) | Faktor simetrije |
|------------------------------|---------------------------|------------------|------------------------|----------------|------------------|
| Poredbena otopina (10 μg/mL) | 12,327 | 1,56 | 0,7839 | 0,0071 | 1,39 |
| | 12,347 | 1,56 | 0,7782 | | 1,37 |
| | 12,347 | 1,54 | 0,7698 | | 1,37 |
| Poredbena otopina (20 μg/mL) | 12,337 | 3,23 | 1,5939 | RSD (%) | 1,36 |
| Poredbena otopina (30 μg/mL) | 12,313 | 5,04 | 2,4511 | 0,9 | 1,36 |
| Poredbena otopina (40 μg/mL) | 12,300 | 6,92 | 3,3519 | | 1,36 |
| Poredbena otopina (50 μg/mL) | 12,280 | 8,90 | 4,2845 | | 1,39 |
| Razvojni proizvod 1 | 12,307 | 5,73 | 2,7878 | | 1,36 |
| | 12,300 | 5,76 | 2,8041 | | 1,37 |
| Razvojni proizvod 2 | 12,303 | 5,35 | 2,6070 | | 1,36 |
| | 12,313 | 5,34 | 2,5989 | | 1,35 |
| Vizol S 0,21% | 12,287 | 8,18 | 3,9320 | | 1,38 |
| | 12,283 | 8,15 | 3,9057 | | 1,38 |
| Nazol 0,1% | 12,287 | 7,33 | 3,5287 | | 1,36 |
| | 12,290 | 7,30 | 3,5285 | | 1,38 |

Tablica 41: Promjene uvjeta metode – Sastav mobilne faze +10% (4,4 mM K₂CO₃/0,55 mM KHCO₃)

| Otopina | Vrijeme zadržavanja (min) | Visina pika (μS) | Površina pika (μS×min) | SD (μS×min) | Faktor simetrije |
|------------------------------|---------------------------|------------------|------------------------|----------------|------------------|
| Poredbena otopina (10 μg/mL) | 10,033 | 1,82 | 0,7672 | 0,0049 | 1,50 |
| | 10,037 | 1,82 | 0,7647 | | 1,48 |
| | 10,030 | 1,84 | 0,7741 | | 1,51 |
| Poredbena otopina (20 μg/mL) | 10,017 | 3,83 | 1,5943 | RSD (%) | 1,47 |
| Poredbena otopina (30 μg/mL) | 10,000 | 5,92 | 2,4316 | 0,6 | 1,48 |
| Poredbena otopina (40 μg/mL) | 9,987 | 8,18 | 3,3340 | | 1,47 |
| Poredbena otopina (50 μg/mL) | 9,977 | 10,66 | 4,3135 | | 1,47 |
| Razvojni proizvod 1 | 10,003 | 6,75 | 2,7458 | | 1,44 |
| | 9,997 | 6,76 | 2,7669 | | 1,46 |
| Razvojni proizvod 2 | 10,003 | 6,33 | 2,6041 | | 1,47 |
| | 10,003 | 6,32 | 2,5890 | | 1,48 |
| Vizol S 0,21% | 9,990 | 9,62 | 3,8909 | | 1,47 |
| | 9,983 | 9,66 | 3,9003 | | 1,47 |
| Nazol 0,1% | 9,987 | 8,62 | 3,5051 | | 1,47 |
| | 9,983 | 8,68 | 3,5307 | | 1,48 |

5. ZAKLJUČCI

- 1) Razvijena je metoda za određivanje fosfata u tekućim oblicima ionskom kromatografijom i proveden je postupak validacije metode.
- 2) Metoda je razvijena i validirana za analizu sljedećih proizvoda: Razvojni proizvod 1 (sprej za nos), Razvojni proizvod 2 (kapi za oko), Vizol S 0,21% (kapi za oko) i Nazol 0,1% (kapi za nos).
- 3) Uvjeti rada konačne metode su: volumen injektiranja 25 μL , brzina protoka mobilne faze 0,6 mL/min, sastav mobilne faze 4 mM K_2CO_3 /0,5 mM KHCO_3 , temperatura kolone 30°C, pretkolona Dionex IonPac AG14A, kolona Dionex IonPac AS14A (3x150 mm) i trajanje metode 16 min.
- 4) Filtriranje kao posljednji korak u pripremi nije pokazalo znatnog utjecaja na koncentraciju fosfata u uzorcima za analizu, stoga se filtriralo prema uputama proizvođača, uz odbacivanje barem 2 mL filtrata kod FilterBio PES filtera i barem 6 mL filtrata kod Dionex OnGuard RP II uloška.
- 5) Sve su otopine filtrirane kroz PES filter, a otopine Razvojnog proizvoda 2 dodatno su filtrirane kroz OnGuard RP II uložak kako bi se uklonile površinski aktivne tvari.
- 6) Stabilnost otopina koncentracijskog niza i otopina uzoraka potvrđena je do 72 sata u staklenom laboratorijskom posudu na sobnoj temperaturi, a do 24 sata u plastičnim vialama za analizu u uređaju za automatsko uzimanje uzoraka na temperaturi 20°C.
- 7) Određeno je radno područje metode 10 – 50 $\mu\text{g/mL}$ fosfata.
- 8) Parametri validacije koje je metoda zadovoljila u odabranom radnom području su selektivnost, linearnost, točnost, preciznost sustava, preciznost metode, središnja preciznost i otpornost na promjene uvjeta metode.

6. LITERATURA

Buldini P, Ferri D, Sharma J. Determination of some inorganic species in edible vegetable oils and fats by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997, 789(1-2), 549-555.

Chen Y, Ye M, Cui H, Wu F, Zhu Y, Fritz J. Determination of glycerophosphate and other anions in dentifrices by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1118(1), 155-159.

Chromatography, USP32, <http://www.uspbpep.com>, pristupljeno 08.09.2020.

Council of Europe. Chromatographic separation techniques. U European pharmacopeia (Ph.Eur.) 8th edition, 2013.

Crowther JB. Validation of Pharmaceutical Test Methods. U: Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. Ahuja S, Scypinski S, urednici, San Diego, Academic Press, 2001, str. 415-443

Dugo G, Pellicano T, Pera L, Turco V, Tamborrino A, Clodoveo M. Determination of inorganic anions in commercial seed oils and in virgin olive oils produced from de-stoned olives and traditional extraction methods, using suppressed ion exchange chromatography (IEC). *Food Chemistry*. 2007, 102(3), 599-605.

Fritz JS, Gjerde DT. Ion Chromatography. Weinheim, WILEY-VCH, 2009.

Gaisford S. Pharmaceutical preformulation. U: Aulton's Pharmaceutics. Aulton ME, Taylor KMG, urednici, London, Churchill Livingstone, 2013, str. 367-394.

Ion chromatography, USP32, <http://www.uspbpep.com>, pristupljeno 08.09.2020.

Komaba H, Fukagawa M. Phosphate – a poison for humans?, *Kidney International*, 2016, 90, 753-763.

Manning D, Bewsher A. Determination of anions in landfill leachates by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997, 770(1-2), 203-210.

Pharmaceuticals & Personal Care Products, <https://phosphatesfacts.org>, pristupljeno 11.01.2021.

Rasmussen HT. Method Development. U: Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. Ahuja S, Scypinski S, urednici, San Diego, Academic Press, 2001, str. 345-386

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients, London, Pharmaceutical Press, 2009.

Sherman RA, Ravella S, Kapoian T. The Phosphate Content of Prescription Medication: A New Consideration. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 2015, 49(6), 886-889.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Introduction to Analytical Separations. U: Fundamentals of Analytical Chemistry. Simpson C, Kiselica S, Landsberg A. Schwartz RB, urednici, Belmont, Brooks/Cole, 2014, str. 847-886.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. High-Performance Liquid Chromatography. U: Fundamentals of Analytical Chemistry. Simpson C, Kiselica S, Landsberg A. Schwartz RB, urednici, Belmont, Brooks/Cole, 2014, str. 912-934.

Watson DG, Control of the quality of analytical methods. U: Pharmaceutical Analysis, London, Churchill Livingstone, 1999, str. 1-16.

Weiss J. Handbook of Ion Chromatography. Weinheim, WILEY-VCH, 2004.

Zhang, Y, Zhou Y, Liu L, Zhu Y. Simultaneous determination of fluoride, chloride, sulfate, phosphate, monofluorophosphate, glycerophosphate, sorbate, and saccharin in gargles by ion chromatography. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 2007, 8(7), 507-511.

7. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Određivanje fosfata ionskom kromatografijom u različitim ljekovitim tekućim oblicima uz ispitivanje razvojno-validacijskih parametara

Sterilni farmaceutski proizvodi u tekućem obliku za primjenu u oftalmologiji i otorinolaringologiji su strateški fokus kompanije JGL d.d., stoga je svrha rada bila razviti i validirati metodu koja će moći pouzdano odrediti sadržaj fosfata takvim proizvodima te koja bi trebala biti potpora procesu razvoja formulacije.

Metoda je razvijena na sustavu za ionsku kromatografiju Dionex ICS-5000+ sa sljedećim komponentama: Dionex ICS-5000+ DP, Dionex ICS-5000+ EG, Dionex ICS-5000+ DC i Dionex AS-AP. Definirani su sljedeći radni uvjeti metode: volumen injektiranja 25 μ L, brzina protoka mobilne faze 0,6 mL/min, sastav mobilne faze 4 mM K_2CO_3 /0,5 mM $KHCO_3$, temperatura kolone 30°C, pretkolona Dionex IonPac AG14A, kolona Dionex IonPac AS14A (3x150 mm) i trajanje metode 16 min. Primijenjena je konduktometrijska metoda detekcije uz supresiju mobilne faze.

Metoda je u radnom području 10-50 μ g/mL fosfata zadovoljila zahtjeve za sljedeće parametre validacije: selektivnost, linearnost, točnost, preciznost sustava, preciznost metode, središnja preciznost i otpornost na promjene uvjeta metode. Ispitan je i utjecaj filtriranja na koncentraciju fosfata u uzorcima za analizu, te stabilnost otopina standarda, koncentracijskog niza i otopina uzoraka.

Ključne riječi: ionska kromatografija, fosfati, tekući oblici, razvoj metode, validacija metode

SUMMARY

Development and validation of method for phosphate determination by ion chromatography in liquid pharmaceutical products

Sterile liquid pharmaceutical products for use in ophthalmology and otorhinolaryngology are the strategic focus of JGL d.d. Therefore, the purpose of this work was to develop and validate a reliable method for determination of phosphate content in such products and support the formulation development process.

The method was developed on the Dionex ICS-5000+ ion chromatography system with the following components: Dionex ICS-5000+ DP, Dionex ICS-5000+ EG, Dionex ICS-5000+ DC and Dionex AS-AP. Defined operating conditions of the method are: injection volume 25 μ L, mobile phase flow rate 0,6 mL/min, mobile phase composition 4 mM K_2CO_3 /0,5 mM $KHCO_3$, column temperature 30°C, pre-column Dionex IonPac AG14A, column Dionex IonPac AS14A (3x150 mm) and duration 16 min. Conductometric detection with mobile phase suppression was applied as a method of detection.

The method met the requirements for the following validation parameters: selectivity, linearity, accuracy, repeatability, precision, intermediate precision and robustness within the working range of 10-50 μ g/mL phosphate concentration. The impact of filtering on phosphate concentration in final analysis samples, the stability of calibration solutions and sample solutions were also assessed.

Keywords: ion chromatography, phosphates, liquid pharmaceutical products, method development, method validation

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
/BASIC DOCUMENTATION CARD

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

ODREĐIVANJE FOSFATA IONSKOM KROMATOGRAFIJOM U RAZLIČITIM LJEKOVITIM TEKUĆIM OBLICIMA UZ ISPITIVANJE RAZVOJNO-VALIDACIJSKIH PARAMETARA

Maria Grbavac

SAŽETAK

Sterilni farmaceutski proizvodi u tekućem obliku za primjenu u oftalmologiji i otorinolaringologiji su strateški fokus kompanije JGL d.d., stoga je svrha rada bila razviti i validirati metodu koja će moći pouzdano odrediti sadržaj fosfata takvim proizvodima te koja bi trebala biti potpora procesu razvoja formulacije.

Metoda je razvijena na sustavu za ionsku kromatografiju Dionex ICS-5000+ sa sljedećim komponentama: Dionex ICS-5000+ DP, Dionex ICS-5000+ EG, Dionex ICS-5000+ DC i Dionex AS-AP. Definirani su sljedeći radni uvjeti metode: volumen injektiranja 25 μ L, brzina protoka mobilne faze 0,6 mL/min, sastav mobilne faze 4 mM K_2CO_3 /0,5 mM $KHCO_3$, temperatura kolone 30°C, pretkolona Dionex IonPac AG14A, kolona Dionex IonPac AS14A (3x150 mm) i trajanje metode 16 min. Primijenjena je konduktometrijska metoda detekcije uz supresiju mobilne faze.

Metoda je u radnom području 10-50 μ g/mL fosfata zadovoljila zahtjeve za sljedeće parametre validacije: selektivnost, linearnost, točnost, preciznost sustava, preciznost metode, središnja preciznost i otpornost na promjene uvjeta metode. Ispitan je i utjecaj filtriranja na koncentraciju fosfata u uzorcima za analizu, te stabilnost otopina standarda, koncentracijskog niza i otopina uzoraka.

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

Rad sadrži: 75 stranica, 8 grafičkih prikaza, 41 tablicu i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ionska kromatografija, fosfati, tekući oblici, razvoj metode, validacija metode

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ana Mornar Turk, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Daniela Štanfel, Jadran-Galenski Laboratorij d.d., Rijeka

Rad prihvaćen: ožujak 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia
ili druga adresa

Diploma thesis

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR PHOSPHATE DETERMINATION BY ION CHROMATOGRAPHY IN LIQUID PHARMACEUTICAL PRODUCTS

Maria Grbavac

SUMMARY

Sterile liquid pharmaceutical products for use in ophthalmology and otorhinolaryngology are the strategic focus of JGL d.d. Therefore, the purpose of this work was to develop and validate a reliable method for determination of phosphate content in such products and support the formulation development process.

The method was developed on the Dionex ICS-5000+ ion chromatography system with the following components: Dionex ICS-5000+ DP, Dionex ICS-5000+ EG, Dionex ICS-5000+ DC and Dionex AS-AP. Defined operating conditions of the method are: injection volume 25 μ L, mobile phase flow rate 0,6 mL/min, mobile phase composition 4 mM K_2CO_3 /0,5 mM $KHCO_3$, column temperature 30°C, pre-column Dionex IonPac AG14A, column Dionex IonPac AS14A (3x150 mm) and duration 16 min. Conductometric detection with mobile phase suppression was applied as a method of detection.

The method met the requirements for the following validation parameters: selectivity, linearity, accuracy, repeatability, precision, intermediate precision and robustness within the working range of 10-50 μ g/mL phosphate concentration. The impact of filtering on phosphate concentration in final analysis samples, the stability of calibration solutions and sample solutions were also assessed.

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

Thesis includes: 75 pages, 8 figures, 41 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ion chromatography, phosphates, liquid pharmaceutical products, method development, method validation

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

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Danijela Štanfel, Ph.D. Jadran-Galenski Laboratorij d.d., Rijeka

The thesis was accepted: March 2021.