

# Primjena plinske kromatografije (GC) za određivanje ostatnog otapala u melatoninu

---

**Kassab, Joud**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:773221>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Joud Kassab

**Primjena plinske kromatografije (GC) za određivanje ostatnog otapala u  
melatoninu**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Joud Kassab

**Primjena plinske kromatografije (GC) za određivanje ostatnog otapala u  
melatoninu**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Ana Amić

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

**PRIMJENA PLINSKE KROMATOGRAFIJE (GC) ZA ODREĐIVANJE  
OSTATNOG OTAPALA U MELATONINU**

**Joud Kassab**

**Rad je izrađen u:** instrumentalnom laboratoriju Odjela Kontrola kvalitete Yassenka d.o.o.

**Mentor:** doc. dr. sc. Ana Amić

**Sažetak**

U ovom radu provedeni su razvoj i validacija HSS-GC-FID metode za određivanje ostatnih otapala (metanola, 2-propanola, *tert*-butil-metil-etera i etil acetata) u sirovini melatonina. Melatonin je hormon epifize s brojnim biološkim učincima na organizam pa se sintetski melatonin često koristi kao aktivna tvar u pripremi farmaceutskih preparata. Ključni parametri validacije bili su specifičnost, linearnost, raspon, preciznost, točnost, stabilnost te limit (granica) detekcije i kvantifikacije. Metoda je validirana prema ICH smjernicama i određene su kvantifikacijske i detekcijske granice za svako otapalo. Rezultati su pokazali da je metoda visoko specifična (selektivna), linearna, točna i precizna unutar ispitivanog područja. Otopine standarda i uzorka stabilne su 2 dana na sobnoj temperaturi i u hladnjaku. S obzirom da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti svih validacijskih parametara, može se zaključiti da je razvijena HSS-GC-FID metoda prikladna za određivanje ostatnih organskih otapala u sirovini melatonina.

**Diplomski rad obuhvaća:** 48 stranica, 24 slike, 16 tablica, 18 literaturnih navoda i 2 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** etil acetat / melatonin / metanol /ostatna otapala / plinska kromatografija / 2-propanol / *tert*-butil-metil-eter

**Rad prihvaćen:** 23. 7. 2021.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc. dr. sc. Olivera Galović, predsjednica
2. doc. dr. sc. Ana Amić, mentorica i članica
3. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, članica
4. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Sciences

Field: Chemistry

**THE APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY (GC) FOR  
DETERMINATION OF RESIDUAL SOLVENT IN MELATONIN**

**Joud Kassab**

**Thesis completed at:** the instrumental laboratory, Department of Quality Assurance, Yassenka d.o.o.

**Supervisor:** Assist. Prof. Ana Amić, PhD

**Abstract**

In this thesis HSS-GC-FID method for determination of residual solvents (methanol, 2-propanol, *tert*-butyl methyl ether and ethyl acetate) in melatonin was developed and validated. Melatonin is a hormone secreted by the human pineal gland and has many various effects on the body, hence synthetic melatonin is used as an active component in the preparation of pharmaceutical products. Key validation parameters were selectivity, linearity, range, precision, accuracy, stability, and limits of detection and quantification. Method has been validated in accordance with ICH guidelines and quantification and detection limit for all studied solvents was determined. Results of validation experiments confirmed that this method is highly selective, linear in working range, accurate and precise. Standard and sample solutions were stable for two days at room temperature and in the fridge. Considering all conditions for validation were met, it can be concluded that developed HSS-GC-FID method for the determination of residual organic solvents in melatonin raw material is suitable for its intended purpose.

**Thesis includes:** 48 pages, 24 figures, 16 tables, 18 references, 2 appendices

**Original in:** croatian

**Keywords:** ethyl acetate / melatonin / methanol / residual solvents / gas chromatography / 2-propanol / *tert*-butyl methyl ether

**Thesis accepted:** 23. 7. 2021.

**Reviewers:**

1. Assist. Prof. Olivera Galović, PhD, chair
2. Assist. Prof. Ana Amić, PhD, supervisor and member
3. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD, member
4. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, substitute member

**Thesis deposited:** at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	2
2.1. Melatonin .....	2
2.1.1. Kratki pregled metabolizma i mehanizma djelovanja melatonina ....	3
2.1.2. Kemijska sinteza melatonina .....	5
2.2. Plinska kromatografija .....	7
2.2.1. Injektor za plinsku kromatografiju i pećnica .....	8
2.2.2. Kolona za plinsku kromatografiju .....	10
2.2.3. Dektor za plinsku kromatografiju .....	12
2.3. Klasifikacija nečistoća u farmaceutskim proizvodima .....	14
3. MATERIJAL I METODE .....	18
3.1. Oprema i pribor .....	18
3.2. Referentne tvari i kemikalije .....	19
3.3. Programski paketi .....	19
3.4. Priprema standardnih otopina .....	19
3.5. Priprema otopina uzorka .....	21
3.6. Analitički uvjeti .....	22
3.7. HSS-GC-FID analiza .....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. Validacija metode .....	24
4.1.1. Specifičnost metode .....	24
4.1.2. Test prikladnosti sustava (SST) .....	27
4.1.3. Linearnost metode .....	28
4.1.4. Limit kvantifikacije (LOQ) .....	30
4.1.5. Limit detekcije (LOD) .....	32
4.1.6. Točnost metode .....	33
4.1.7. Preciznost metode .....	37
4.1.7.1. Ponovljivost metode .....	37
4.1.7.2. Intermedijska preciznost metode .....	37
4.1.8. Raspon metode .....	41
4.1.9. Stabilnost otopine standarda i uzorka .....	41

5. ZAKLJUČAK .....	43
6. LITERATURNÁ VRELA .....	44
7. PRILOZI .....	45
7.1. Popis kratica .....	45
7.2. Životopis.....	47

## 1. UVOD

Melatonin je hormon epifize koji regulira ciklus budnosti i spavanja odnosno cirkadijalni ili dnevni (bio)ritam, a glavni prekursor u biosintezi melatonina je esencijalna aminokiselina *L*-triptofan što znači da je melatonin zapravo derivat triptofana. Biosintezu melatonina potiče izlaganje organizma tami, dok ju inhibira izlaganje organizma svjetlu. Središnji živčani sustav (engl. *Central Nervous System*, CNS) odgovoran je za održavanje 24 satnog ciklusa koji regulira brojne tjelesne funkcije, od stanja budnosti i sna do funkcioniranja imunološkog sustava. Visoke koncentracije melatonina izazivaju pospanost i san, zbog čega se sintetski melatonin može koristiti u liječenju nesanicе i poremećaja cirkadijalnog ritma koji nastanu uslijed promijene vremenskih zona (tzv. *jet lag*). Zbog brojnih učinaka na organizam, sintetski melatonin je važna sirovina farmaceutske industrije (sirupi, tablete i slično) [1].

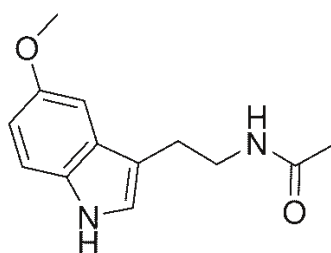
Kemijska sinteza melatonina odvija se u nekoliko koraka i uključuje uporabu nekoliko organskih otapala, koja se u niskim koncentracijama još mogu naći u finalnom proizvodu, odnosno u melatoninu. Cilj ovog rada bio je razviti i validirati metodu za određivanje ostalih otapala u sirovini melatoninu na temelju uporabe plinske kromatografije. Otapala koja se mogu naći u sirovini melatonina su metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat, pa je ovaj rad bio usmjeren na detekciju ovih otapala. Parametri na kojima se temeljila validacija bili su specifičnost, linearnost i raspon, preciznost, točnost, stabilnost te limit detekcije i kvantifikacije. Dobiveni rezultati pokazali su da je metoda selektivna, linearna, točna i precizna te da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti svih validacijskih parametara. Stoga je razvijena metoda prikladna za određivanje ostatnog metanola, 2-propanola, *tert*-butil-metil-etera i etil acetata u sirovini melatonina.



## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Melatonin

Melatonin ili prema IUPAC-u *N*-[2-(5-metoksi-1*H*-indol-3-il)etil] acetamid, kemijske formule C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, je hormon epifize koji je odgovoran za reguliranje budnosti i spavanja. To je biogeni amin koji se može naći u brojnim životinjama, biljkama i mikroorganizmima. Profesor Aaron B. Lerner zaslužan je za imenovanje ovog spoja i definiranje njegove kemijske strukture (strukturna formula prikazana je na *Slici 1.*) [1].



*Slika 1.* Strukturna formula melatonina [1].

Kao što je već spomenuto, melatonin u sisavaca proizvodi epifiza. Epifiza (poznata i kao pinealna žlijezda) je endokrina žlijezda veličine zrna graška ili riže i oblika češera, po čemu je dobila naziv, smještena između moždanih hemisfera i izvan krvno-moždane barijere. Sinteza melatonina povećava se u mraku a smanjuje prilikom izlaganja svjetlosti [2], čime se regulira cirkadijalni ritam nekoliko bioloških funkcija. Na primjer, melatonin regulira ciklus spavanja i budnosti tako da izaziva osjećaj pospanosti i snižava tjelesnu temperaturu. Osim toga, melatonin je uključen u regulaciju raspoloženja, učenja i pamćenja, u aktivnosti imunološkog sustava, sanjanja, plodnosti i reprodukcije, a učinkovit je i kao antioksidans [1, 3-5].

Glavnina učinaka melatonina posredovana je vezanjem i aktiviranjem melatoninskih receptora. Osobe s oboljenjima karakterističnima za spektar autističnih poremećaja (engl. *Autism Spectrum disorders*, ASD) mogu imati niže razine melatonina od normalnih. Studija iz 2008. godine otkrila je da roditelji osoba s ASD poremećajem također imaju niže razine melatonina te da su ti deficiti povezani s niskom aktivnošću gena ASMT, koji kodira posljednji enzim sinteze melatonina. Smanjena proizvodnja melatonina smatra se

vjerojatnim čimbenikom odgovornim za znatno više stope karcinoma kod radnika koji rade noću [1].

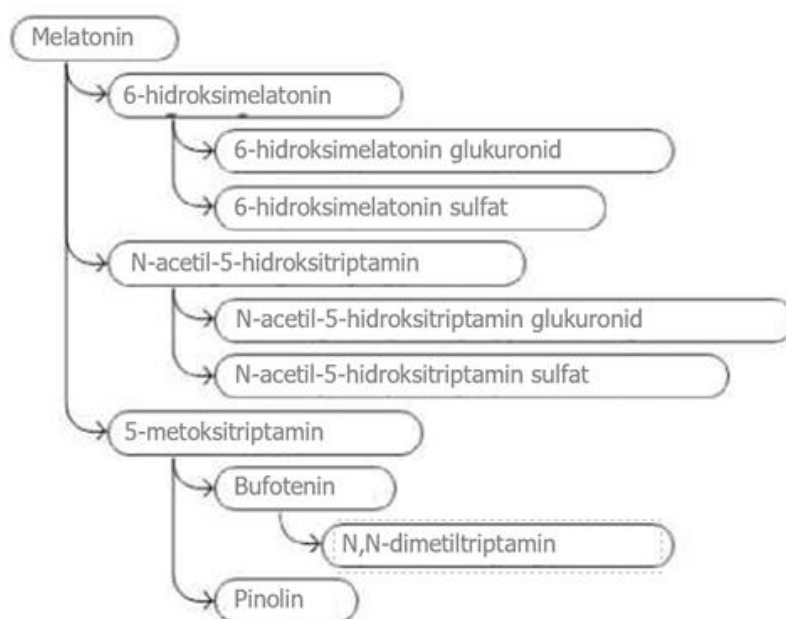
Melatonin se može koristiti za ublažavanje simptoma tzv. *jet lag-a*, u liječenju nesanice, poremećaja povezanih sa smjenskim radom, poremećaja cirkadijalnog ritma kod slijepih te prilikom odvikavanja od benzodiazepina i nikotina. Brojne studije su ukazale na učinkovitost melatonina u liječenju poremećaja cirkadijalnog ritma u slijepo djece i odraslih te kod mentalnih bolesnika [6-8]. Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) dodijelila je melatoninu status lijeka za rijetke i teške bolesti (engl. *orphan status*) kao oralnom lijeku [1].

### **2.1.1. Kratki pregled metabolizma i mehanizma djelovanja melatonina**

Poluživot melatonina je od 35 do 50 minuta, a glavna metabolizma melatonina odvija se u jetri putem CYP1A2, enzima iz skupine citokroma P450. U jetri se melatonin metabolizira u barem 14 metabolita (do sad je toliko identificiranih metabolita melatonina, a oni su detektirani u urinu miša) prikazanih na *Slici 2*. Među metabolitima melatonina su 6-hidroksimelatonin glukuronid, 6-hidroksimelatonin sulfat, *N*-acetil-serotonin glukuronid, *N*-acetilserotonin sulfat, 6-hidroksimelatonin, 2-okso-melatonin, 3-hidroksimelatonin, melatonin glukuronid, ciklički melatonin, ciklički *N*-acetilserotonin glukuronid, ciklički 6-hidroksimelatonin, 5-hidroksiindol-3-acetaldehid, di-hidroksi-melatonin i njegov konjugat glukuronida. Glavni metabolit, pronađen u urinu u najvećoj koncentraciji (65-88 %), je 6-hidroksimelatonin glukuronid. Spomenuti metaboliti rezultat su konjugacije sa sumpornom kiselinom ili glukuronskom kiselinom, kako bi se učinkovito eliminirali putem bubrega, odnosno urina. Samo oko 5 % melatonina se eliminira iz organizma u nepromijenjenom obliku [1].

Melatonin se veže za melatoninski receptor tip 1A, koji zatim djeluje na adenilat ciklazu i inhibiciju cikličkog adenozin monofosfat (cAMP) signalnog puta. Melatonin ne samo da inhibira adenilat ciklazu, već također aktivira fosfolipazu C, čime se potiče oslobađanje arahidonata u krvotok. Vežanje za melatoninske receptore 1 i 2 ima različit učinak na organizam. Melatoninski receptori su receptori spregnuti s G proteinom (engl. *G Protein-Coupled receptors*, GPCRs) a eksprimirani su u različitim tkivima. U ljudi postoje dvije podvrste receptora, to su melatoninski receptor 1 (MT1) i melatoninski receptor 2 (MT2), a i melatonin i agonisti melatoninskih receptora se vežu za oba tipa receptora i aktiviraju ih. Unatoč brojnim istraživanjima, vežanje agonista za melatoninske receptore

nije u potpunosti razjašnjeno. MT1 receptori su eksprimirani u brojnim dijelovima CNS-a, mrežnici, jajnicima, testisima, mliječnim žlijezdama, srčano žilnom sustavu, aorti, jetri i žučnom mjehuru, bubrezima, koži, imunološkom sustavu. MT2 receptori su uglavnom eksprimirani u CNS-u, ali i u plućima, srcu, aorti, imunološkom sustavu, maternici (miometriju), jajnicima, dvanaesniku i adipocitima [1].

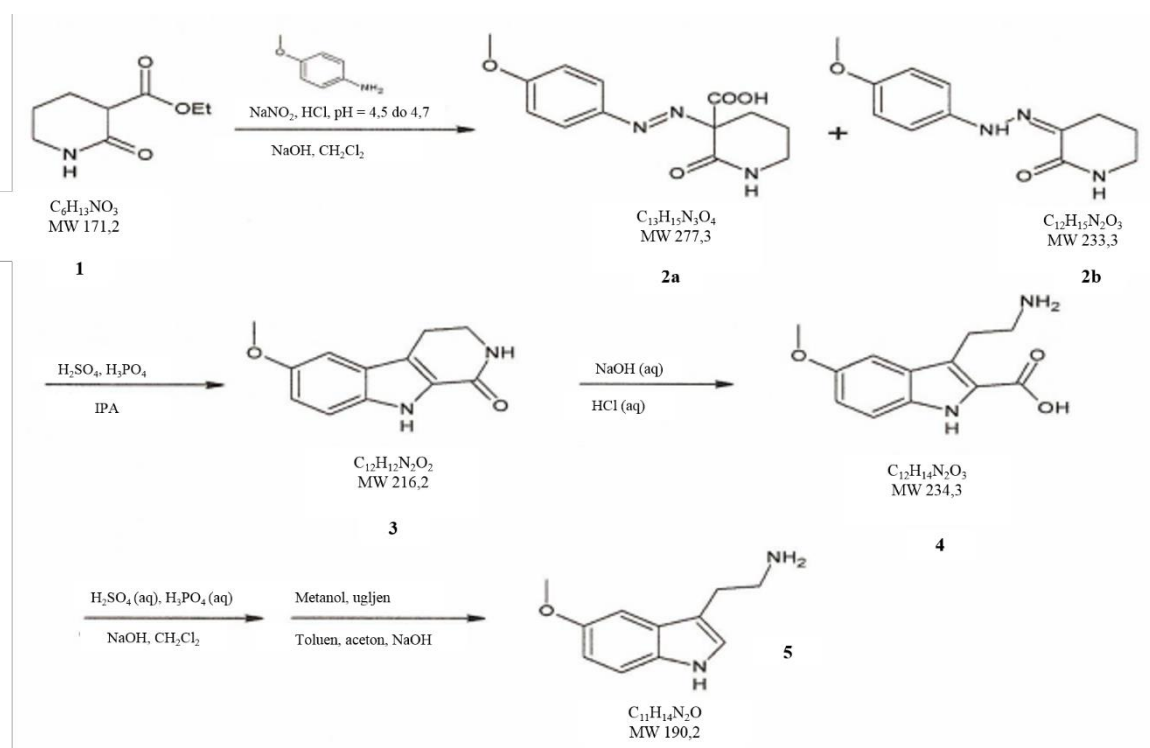


Slika 2. Metabolizam melatonina [1].

Vežanje melatonina na melatoninske receptore aktivira nekoliko signalnih putova. Aktivacija MT1 receptora inhibira enzim adenilat ciklazu, a njegova inhibicija ima domino učinak počevši od smanjenog stvaranja cAMP-a, zatim se smanji aktivnost protein kinaze A (PKA), što pak ometa fosforilaciju CREB-vezujućeg proteina (engl. *cAMP Responsive Element-Binding Protein*) u P-CREB. MT1 receptori također aktiviraju fosfolipazu C (PLC), utječu na ionske kanale i reguliraju unos iona u stanice. Vežanje melatonina na MT2 receptore inhibira adenilat ciklazu što smanjuje stvaranje cAMP-a. Također ometa gvanilat ciklazu, a time i stvaranje cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP). Vežanje na MT2 receptore vjerojatno utječe na PLC koji povećava aktivnost protein kinaze C (PKC), a aktivacija receptora može dovesti do ulaska iona u stanice [1].

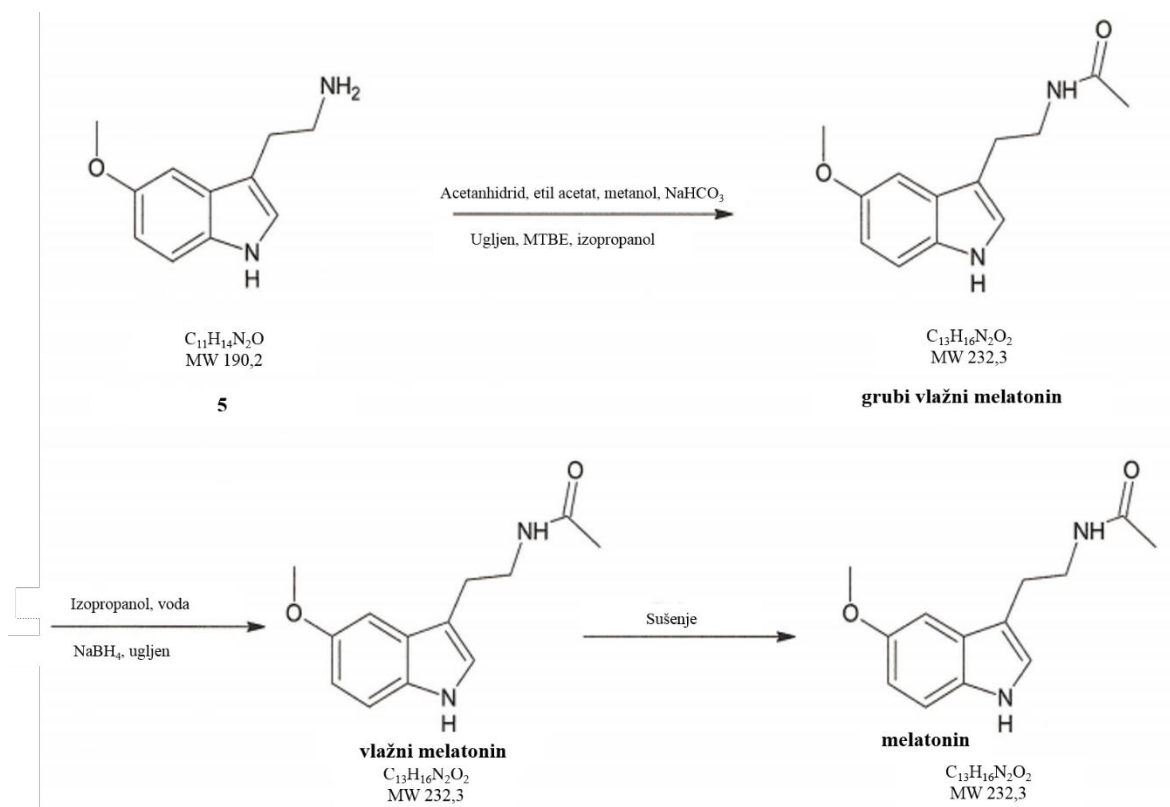
## 2.1.2. Kemijska sinteza melatonina

Kemijska sinteza melatonina prikazana je shematski na *Slikama 3. i 4.* Kao što je prikazano na *Slici 3.*, sinteza melatonina započinje sa spojem 3-etoksikarbonil-2-piperidonom (**1**) koji u kiselom mediju (pH 4,5 do 4,7) i uz dodatak anilina, NaNO<sub>2</sub>, NaOH i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> daje dva produkta, spoj (**2a**) i (**2b**). U ovom se koraku koriste nitriti (s tim da se NaNO<sub>2</sub> dodaje u malom suvišku u odnosu na anilin), ali bez dodatka sekundarnih ili tercijarnih amina. Nastali produkti se izoliraju centrifugom iz vodene otopine te dodatno ispiru vodom kako bi se odstranio sav suvišni NaNO<sub>2</sub>. U procesu sinteze se uz nitrite ne koriste otapala i katalizatori koji su podložni raspadu na sekundarne ili tercijarne amine. Međutim, u idućem koraku nastaje spoj koji sadrži sekundarni amin. U ovom koraku, reakcijom **2a** i **2b** uz dodatak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> te izopropanola nastaje produkt 6-metoksi-2,3,4,9-tetrahidropirido[3,4-b]indol-1-on (**3**) koji u vodenoj otopini uz dodatak HCl i NaOH daje 2-karboksi-5-metoksitriptamin (**4**). U idućem koraku, prvo uz dodatak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a potom uz dodatak metanola, ugljena, toluena, octene kiseline i NaOH, nastaje 5-metoksitriptamin (**5**).



*Slika 3.* Shematski prikaz sinteze melatonina do koraka u kojem se sintetizira 5-metoksitriptamin (**5**).

Na *Slici 4.* shematski je prikazan preostali reakcijski put sinteze melatonina. 5-metoksitriptamin (**5**) u reakciji s acetanhidridom, metanolom, etil acetatom, NaHCO<sub>3</sub>, ugljenom, izopropanolom i *tert*-butil-metil-eterom daje grubi vlažni melatonin. Nakon dodatka izopropanola, vode, NaBH<sub>4</sub> i ugljena dobije se vlažni melatonin, koji nakon dodatnog sušenja daje finalni proizvod, melatonin.



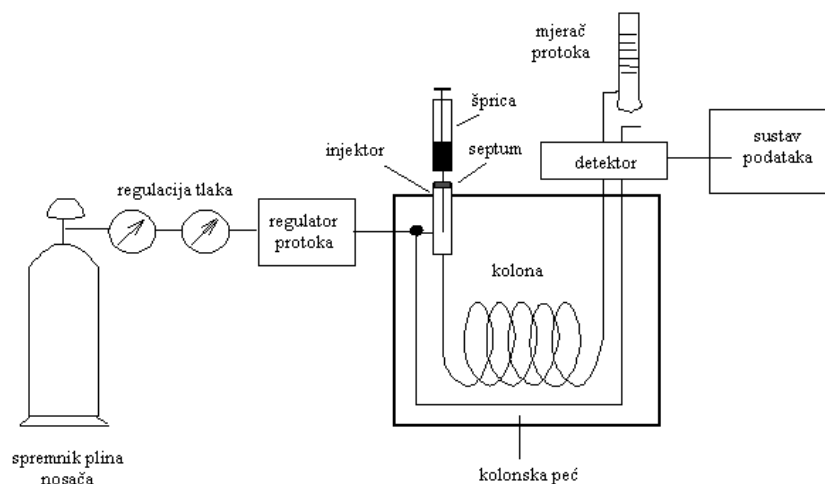
*Slika 4.* Shematski prikaz preostalih koraka sinteze melatonina.

## 2.2. Plinska kromatografija (GC)

Analitička plinska kromatografija je tehnika razdvajanja komponenata smjese s ciljem dobivanja podataka o njihovom molekularnom sastavu i količini. Podaci dobiveni kromatografskom analizom mogu uključivati kromatogram, podatke o visinama i površinama pikova na kromatogramu, njihovom molekularnom identitetu i dr. [9].

Tehniku moderne plinske kromatografije (engl. *Gas Chromatography*, GC) uveli su James i Martin 1952. godine. Osnovni princip rada GC-a uključuje isparavanje uzorka u grijanom ulazu ili injektoru plinskog kromatografa, nakon čega slijedi odvajanje komponenata smjese u posebno pripremljenoj koloni. Za GC analizu prikladni su samo oni spojevi koji mogu ispariti bez razgradnje. Ti spojevi uključuju većinu otapala i pesticida, brojne sastojke u aromama, esencijalna ulja, ugljikovodična goriva i mnoge lijekove. Kiseline, aminokiseline, amini, amidi, nehlapljivi lijekovi, saharidi i steroidi ubrajaju se u klase spojeva koje često zahtijevaju kemijsku pretvorbu kako bi se povećala njihova hlapljivost [10].

Osnovni dijelovi plinskog kromatografa su injektor, pećnica, kolona i detektor [9]. Na *Slici 5.* shematski su prikazani dijelovi plinskog kromatografa [11]. Izvedba današnjeg plinskog kromatografa može se razlikovati, npr. mogu postojati dva ili više ulaza ili injektora, a na plinski kromatograf se može instalirati nekoliko detektora. Sustavima upravlja računalo koje kontrolira fizičke parametre sustava poput temperaturnih zona i protoka plina. Računalo također obrađuje podatke generirane tijekom GC postupka [9].



*Slika 5.* Shematski prikaz plinskog kromatografa [11].

### 2.2.1. Injektor za plinsku kromatografiju i pećnica

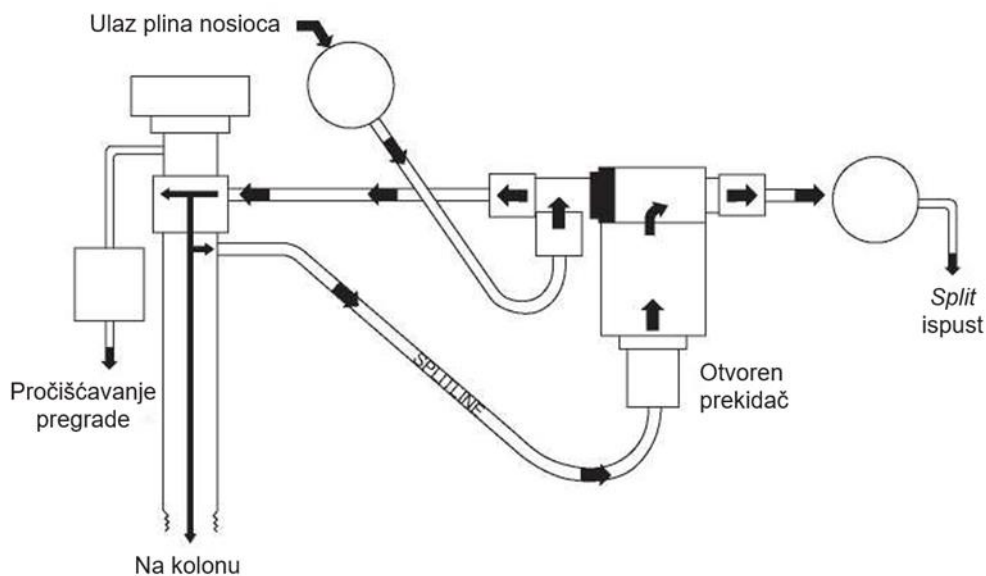
Najstariji i najčešće korišteni injektor prikazan na *Slici 6.* je jednostavno rečeno dio kromatografa gdje se uzorak uvodi u kolonu, odnosno to je sustav za unošenje uzorka [12]. Ovaj injektor može raditi na dva načina: *split* (djelomično unošenje uzorka) i *splitless* (potpuno unošenje uzorka). Odabir *split* ili *splitless* načina rada ovisi o koncentraciji analita u uzorku [10, 13].



*Slika 6.* Injektor SSL (*split/splitless*) [12].

I *split* i *splitless* načini injektiranja su tehnike vrućeg izotermičkog injektiranja. Naime, injektor se postavlja na temperaturu koja je dovoljno visoka da ispari otapalo i analit u uzorku, a ta temperatura je konstantna tijekom cijelog GC postupka [10].

*Split* injektiranje (djelomično unošenje uzorka) koristi se za „čiste“ uzorke (koji nisu otopljeni u otapalu) ili uzorke u kojima su analiti otopljeni u otapalu u relativno visokim koncentracijama [10]. *Split* način injektiranja pogodan je za analizu uzoraka visoke koncentracije, „*headspace*“ analizu i izotermnu analizu. U ovom načinu injektiranja, uzorak se injektira u stakleni umetak (*liner*) unutar grijane komore za isparavanje [12]. Pri tome se samo dio uzorka prenosi u kolonu (obično između 0,5 % i 5 %), a ostatak se ispušta kroz *split* liniju. Na *Slici 7.* shematski je prikazan tipični *split* injektor. Omjer *split* protoka prema protoku u koloni određuje količinu uzorka koja ulazi u kromatografsku kolonu [10, 12].



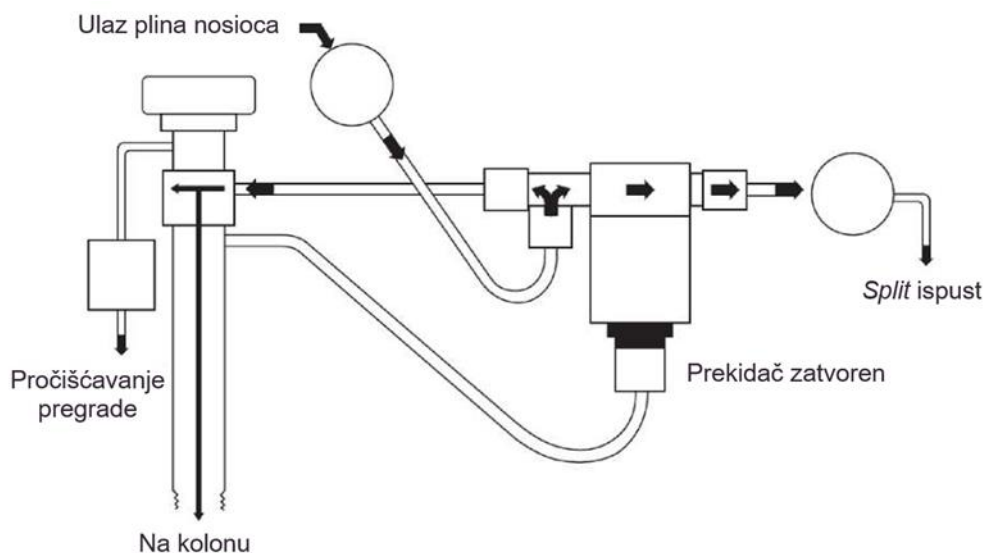
Slika 7. Shematski prikaz *split* injektora [10].

Uobičajeni *split* omjeri kreću se od 10 : 1 do 400 : 1 i mogu se izračunati pomoću formule (1) [10]:

$$\text{Split omjer} = \frac{\text{Protok kolone} + \text{Protok ispusta}}{\text{Protok kolone}} \quad (1)$$

*Splitless* način rada odnosno *splitless* injektiranje (potpuno unošenje uzorka) koristi se za uzorke koji sadrže analite u tragovima. *Splitless* način injektiranja pogodan je za analizu spojeva prisutnih u niskim koncentracijama [10], te omogućuje ulazak cijelog uzorka u kolonu. Uzorak se injektira u vrući stakleni umetak sa zatvorenim *split* ispustom. Većina uzorka se usmjerava na kolonu. Nakon jedne minute ili manje, *split* ispust se otvara, a preostalo otapalo i mali dio uzorka usmjeravaju se van kroz *split* ispust [12]. Na Slici 8. shematski je prikazan tipični *splitless* injektor.



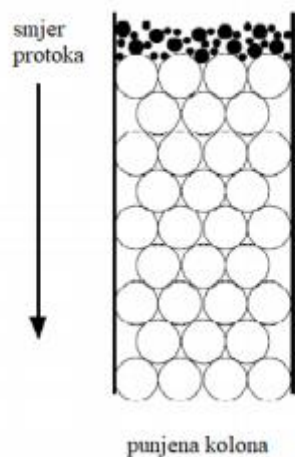


Slika 8. Shematski prikaz *splitless* injektora [10].

Pećnica je termostatirana komora za kromatografsku kolonu. Rad pećnice je presudan za održavanje ponovljivog odvajanja u koloni, a temperatura pećnice se točno i precizno kontrolira. Pećnica ima dva načina rada koja utječu na separacijsku sposobnost tehnike, a to su izotermički i temperaturno-programirani GC. U izotermičkom načinu rada, pećnica održava konstantnu temperaturu (koja se unaprijed odredi) tijekom cijelog trajanja kromatografskog rada. U temperaturno-programiranom GC-u, temperatura pećnice se mijenja tijekom kromatografskog rada (npr. 50 °C tijekom 2 minute, nakon čega slijedi linearni gradijent temperature od 10 °C/min do temperature od 220 °C, s konačnom temperaturom zadržavanja od 2 minute) [12].

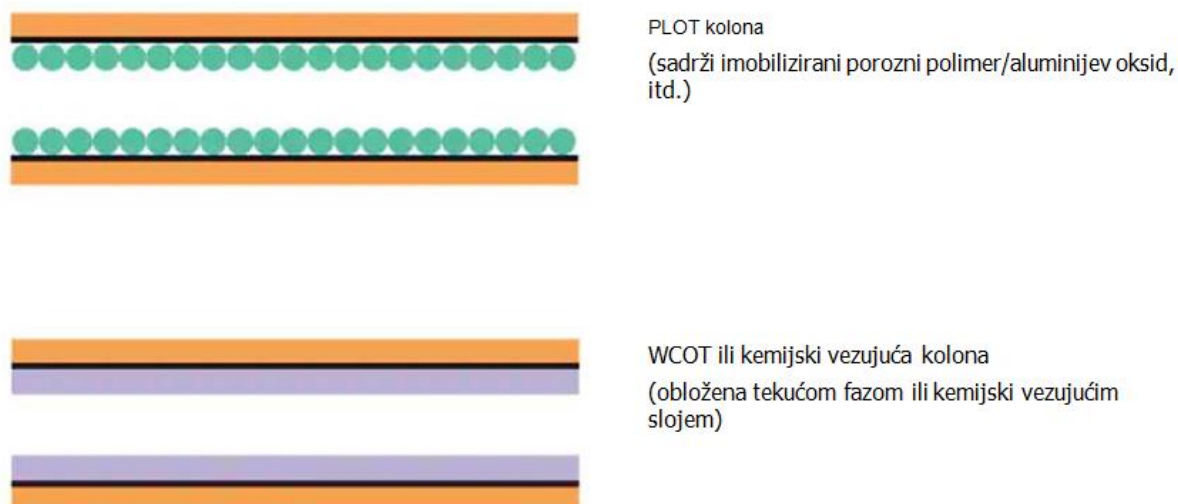
### 2.2.2. Kolona za plinsku kromatografiju

Punjene kolone (engl. *packed column*) su kratki, debeli stupci izrađeni od staklenih cijevi ili cijevi od nehrđajućeg čelika a pune se malim česticama inertne čvrste tvari (Slika 9.). Punjene kolone daju široke oblike pikova i imaju nizak učinak separacije, ali također mogu podnijeti velike volumene uzoraka i nisu osjetljive na onečišćenje. I danas se koriste u službenim analitičkim metodama i za analizu plinova [14].



Slika 9. Shematski prikaz punjene kolone [14].

Kapilarne kolone (engl. *capillary column*) danas prevladavaju u odnosu na punjene kolone, budući da daju oštre oblike pikova, postižu izvrstan učinak separacije i pogodne su za analizu visoke osjetljivosti. S druge strane, tipične kapilarne kolone sastoje se od tanke cijevi od nehrđajućeg čelika ili stakla ispunjene materijalom punjenja u obliku čestica čiji su unutarnji zidovi obloženi tankim slojem tekuće faze (engl. *Wall-Coated Open Tubular*, WCOT) ili impregnirani čvrstom fazom (engl. *Porous-Layer Open-Tubular Columns*, PLOT) (Slika 10.). Kapilarne kolone su razvijene nakon punjenih kolona, a iako postoji manje tipova kapilarnih kolona, njihov učinak separacije puno je bolji u odnosu na punjene kolone [14].



Slika 10. Vrste kapilarne kolone [14].

### 2.2.3. Detektor za plinsku kromatografiju

Velika prednost GC-a je raznolikost dostupnih detektora gdje se detektiraju razdvojeni spojevi uzorka [10]:

- Detektor termičke vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD)

TCD je uistinu univerzalni detektor i može detektirati sve spojeve koji mogu proći kroz GC kolonu. U GC laboratoriju, TCD se obično koristi za detektiranje permanentnih plinova umjesto organskih spojeva, s obzirom da se organski spojevi mogu detektirati pri nižim razinama s drugim GC detektorima i masenim spektrometrima [10].

- Dušik–fosforni detektor (engl. *Nitrogen Phosphorous Detector*, NPD)

Ovaj se detektor još naziva i termionski specifični detektor (engl. *Thermionic Specific Detector*, TSD). Reagira na spojeve u uzorku koji sadrže dušik i/ili fosfor. Dušikovi spojevi općenito daju dobar odgovor ako je prisutna C–N veza, a detektor je općenito koristan za sve organske dušikove spojeve i za cijanovodik. Većina hlapljivih organskih i anorganskih spojeva fosfora reagiraju u ovom detektoru [10].

- Detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD)

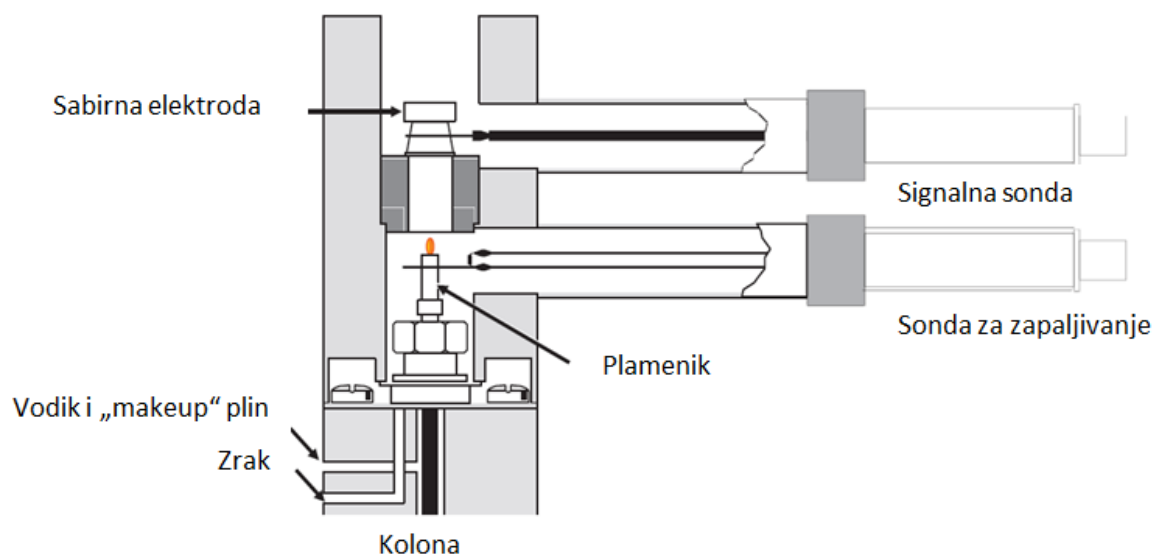
ECD ima vrlo nisku granicu detekcije za materijale koji lako hvataju elektrone (elektrofilni analiti) i daje snažan odgovor na halogenirane spojeve, kao i na mnoge druge molekule poput N<sub>2</sub>O, nitro-organskih spojeva, diketona i diacetala. Nedostaci ECD-a uključuju relativno malen raspon linearnog odziva ( $10^3$ – $10^4$ ) [10].

- Plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID)

FID reagira na spojeve s vezom ugljik–vodik. On je najčešće korišteni GC detektor. Detektor zahtjeva prisutnost vodika i zraka s tipičnim omjerom zrak : vodik = 10 : 1.

Plinovi se miješaju i izgaraju neposredno iznad plamena, a poprečni presjek plameno-ionizacijskog detektora prikazan je na *Slici 11*. [10].

Budući da se kod ovog detektora formira voda, lako se može provjeriti gori li plamen držanjem predmeta glatke površine iznad detektora i promatranjem vodene pare koja se kondenzira na površini. Između vrha plamena i sabirne elektrode primjenjuje se negativni polarizacijski napon. Kako analiti eluiraju iz kolone, prolaze kroz plamen i izgaraju dajući ione. Elektroni koji nastaju u plamenu uzrokuju tok struje u prostoru između vrha plamena i elektrode. Pojačavanjem ovog strujnog toka stvara se signal. FID-ovi imaju široko područje linearnog odziva ( $\sim 10^7$ ) [10].



*Slika 11.* Poprečni presjek plameno-ionizacijskog detektora (FID) [10].

### 2.3. Klasifikacija nečistoća u farmaceutskim proizvodima

Nečistoće u kemijski sintetiziranim farmakološki aktivnim tvarima, npr. lijekovima, se mogu klasificirati u sljedeće kategorije [15]:

- organske nečistoće,
- anorganske nečistoće,
- ostatna otapala.

Otapala su anorganske ili organske tekućine koje se koriste kao sredstvo za pripremu otopina ili suspenzija u sintezi novih supstancija lijekova. Budući da su otapala uglavnom toksična, odabir odgovarajućih kontrola lako se postiže pomoću ICH smjernica Međunarodne konferencije o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) [15]. Cilj smjernica Q3A(R2) je dati preporuku za prihvatljive količine ostatnih otapala u farmaceutskim proizvodima radi sigurnosti pacijenata. Smjernice preporučuju uporabu manje toksičnih otapala i opisuju razine koje se smatraju toksikološki prihvatljivim za neka ostatna otapala [16].

Ostatna otapala u farmaceutskim proizvodima ovdje su definirana kao organske hlapljive kemikalije koje se koriste ili proizvode u proizvodnji supstancija lijekova ili pomoćnih tvari ili u pripremi lijekova. Odgovarajući odabir otapala za sintezu supstancije lijeka može povećati iskorištenje ili odrediti karakteristike kao što su kristalni oblik, čistoća i topljivost spoja. Stoga otapalo ponekad može biti kritični parametar u procesu sinteze. Budući da ostatna otapala ne pridonose liječenju, sva se ostatna otapala trebaju ukloniti u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se zadovoljile specifikacije proizvoda, dobra proizvodna praksa ili drugi zahtjevi koji se temelje na kvaliteti. Lijekovi ne bi smjeli sadržavati više razine ostatnih otapala od onih koje mogu potvrditi sigurnosni podaci. Međutim, otapala često nisu u potpunosti uklonjena praktičnim tehnikama proizvodnje [16].

Ostatna otapala obično se određuju kromatografskim tehnikama kao što je plinska kromatografija. Ako je izvedivo, treba koristiti bilo koji usklađeni postupak za određivanje razine ostatnih otapala kako je opisano u farmakopejama. U suprotnom, proizvođači su slobodni odabrati najprikladniji važeći analitički postupak za određenu primjenu [16].

Međunarodni program za kemijsku sigurnost (engl. *International Program on Chemical Safety*, IPCS) koristi izraz „tolerirani dnevni unos“ (engl. *Tolerable Daily Intake*, TDI) za opisivanje graničnih vrijednosti izloženosti toksičnim kemikalijama, a Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) i druga nacionalna i međunarodna tijela i instituti zdravstvene zaštite koriste izraz „prihvatljivi dnevni unos“ (engl. *Acceptable Daily Intake*, ADI). Novi izraz „dopuštena dnevna izloženost“ (engl. *Permitted Daily Exposure*, PDE) definiran je u smjernicama kao farmaceutski prihvatljiv unos ostalih otapala. Ostala otapala su procijenjena i svrstana u jednu od tri klase na temelju mogućeg rizika za ljudsko zdravlje [16].

Ostala otapala klase 1 su otapala koja treba izbjegavati. Dokazano su karcinogena za ljude ili postoji snažna sumnja na karcinogenost za ljude i predstavljaju opasnost za okoliš. Međutim, ako je njihova uporaba neizbježna za proizvodnju lijeka sa značajnim terapijskim napretkom, tada se njihove razine trebaju ograničiti kako je prikazano u *Tablici 1*. [16].

*Tablica 1.* Otapala klase 1 u farmaceutskim proizvodima [16].

<i>Otapalo</i>	<i>Granična vrijednost koncentracije (ppm)</i>	<i>Uzrok zabrinutosti</i>
benzen	2	karcinogen
ugljičkov tetraklorid	4	toksičan i opasan za okoliš
1,2-dikloroetan	5	toksičan
1,1-dikloroeten	8	toksičan
1,1,1-trikloroetan	1500	opasan za okoliš

Otapala klase 2 su otapala koja treba ograničiti. Radi se o ne-genotoksičnim karcinogenima za životinje ili mogućim uzročnicima neke druge ireverzibilne toksičnosti, kao što je neurotoksičnost ili teratogenost. To su otapala za koja postoji sumnja na druge značajne ali reverzibilne toksičnosti pa se njihove razine trebaju ograničiti kako je prikazano u *Tablici 2*. [16].

Tablica 2. Otapala klase 2 u farmaceutskim proizvodima [16].

<i>Otapalo</i>	<i>PDE (mg/dan)</i>	<i>Granična vrijednost koncentracije (ppm)</i>
acetonitril	4,1	410
klorobenzen	3,6	360
kloroform	0,6	60
kumen	0,7	70
cikloheksan	38,8	3880
1,2-dikloroeten	18,7	1870
diklormetan	6,0	600
1,2-dimetoksietan	1,0	100
<i>N, N</i> -dimetilacetamid	10,9	1090
<i>N, N</i> -dimetilformamid	8,8	880
1,4-dioksan	3,8	380
2-etoksietanol	1,6	160
etilenglikol	6,2	620
formamid	2,2	220
heksan	2,9	290
metanol	30,0	3000
2-metoksietanol	0,5	50
metilbutilketon	0,5	50
metilcikloheksan	11,8	1180
metilizobutilketon	45	4500
<i>N</i> -metilpirolidon	5,3	530
nitrometan	0,5	50
piridin	2,0	200
sulfolan	1,6	160
tetrahidrofuran	7,2	720
tetralin	1,0	100
toluen	8,9	890
1,1,2-trikloroeten	0,8	80
ksilen	21,7	2170

Otapala klase 3 su otapala s niskim toksičnim potencijalom za čovjeka, pa nije potrebna granična vrijednost za izloženost u pogledu štetnosti za zdravlje. Ove vrste otapala prikazane su u *Tablici 3*. Smatra se da su količine ovih ostalih otapala od 50 mg dnevno ili manje (što odgovara 5000 ppm) prihvatljive. Veće količine također mogu biti prihvatljive pod uvjetom da su realne u odnosu na proizvodne mogućnosti i dobru proizvodnu praksu (engl. *good manufacturing practice*, GMP) [16].

*Tablica 3.* Otapala klase 3 koja bi trebalo ograničiti GMP-om ili drugim zahtjevima na temelju kvalitete [16].

octena kiselina	heptan
acetone	izobutil acetat
anisole	izopropil acetat
1-butanol	metil acetat
2-butanol	3-metil-1-butanol
butil acetat	metil etil keton
<i>tert</i> -butil-metil-eter	2-metil-1-propanol
dimetil sulfoksid	pentan
etanol	1-pentanol
etil acetat	1-propanol
etil eter	2-propanol
etil format	propil acetat
mravlja kiselina	triethylamin



### 3. MATERIJALI I METODE

Prema Britanskoj farmakopeji (BP) nije navedena metoda za određivanje ostatnih otapala, a sva se ostatna otapala trebaju ukloniti u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se zadovoljile specifikacije proizvoda. Cilj ovog rada je razviti i validirati metodu za određivanje ostatnih otapala nakon kemijske sinteza melatonina. Prema sintetskom postupku proizvođača, u proizvodnji melatonina korištena otapala su *tert*-butil-metil-eter, etil acetat, metanol i 2-propanol. Za sva ova otapala u *Tablici 4.* su prikazane klase, limit prema ICH smjernica i limit koji je definirao proizvođač.

*Tablica 4.* Sva otapala korištena u proizvodnji melatonina i njihova maksimalna dopuštena koncentracija

<i>Otapalo</i>	<i>Klasa</i>	<i>ICH limit</i>	<i>Specifikacijski limit prema proizvođača</i>
<i>tert</i> -butil-metil-eter	3	≤ 5000 ppm	≤ 1000 ppm
etil acetat	3	≤ 5000 ppm	≤ 1000 ppm
metanol	2	≤ 3000 ppm	≤ 1000 ppm
2-propanol	3	≤ 5000 ppm	≤ 2000 ppm

#### 3.1. Oprema i pribor

Od opreme i pribora u radu su korišteni:

- plinski kromatograf TRACE 1310 s plameno-ionizacijskim detektorom FID, (Thermo Scientific, Švicarska)
- kolona: DB-1301, (30 m × 0,320 mm × 1,00 μm, Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- analitička vaga, d = 0,001 mg (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD)
- odmjerne tikvice (10,0 mL, 50,0 mL, 100,0 mL)
- automatske pipete (LLG, Njemačka)
- bočice za uzorkovanje *headspace* tehnikom s aluminijskim čepom (vijalice), 20 mL (Thermo Scientific, Švicarska)
- otvarač bočica s aluminijskim čepom (Thermo Scientific, Švicarska)

- zatvarač bočica s aluminijskim čepom (Thermo Scientific, Švicarska)

### 3.2. Referentne tvari i kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće. Popis korištenih kemikalija:

- metanol (J.T. Baker, Poljska)
- etil acetat (Kemika, Hrvatska)
- *tert*-butil-metil-eter (Merck, Njemačka)
- 2-propanol (Fisher, SAD)
- 1-metil-2-pirolidon (Merck, Njemačka)

### 3.3. Programski paketi

Za obradu podataka su korišteni slijedeći programski paketi:

- Chromeleon™ Chromatography Data System (7.3 CDS) Software (Thermo Scientific, SAD)
- Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Seattle, Washington, SAD)

### 3.4. Priprema standardih otopina

- ***Stock 1* (koncentracija(metanol, etil acetat, *tert*-butil-metil-eter) = 1000 ppm; koncentracija(2-propanol) = 1000 ppm)**

U odmjernu tikvicu od 50,0 mL pipetirati 10,0 mL 1-metil-2-pirolidona, dodati 50±5 mg metanola, 50±5 mg etil acetata, 50±5 mg *tert*-butil-metil-etera i 50±5 mg 2-propanola. Nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake s 1-metil-2-pirolidonom.

- **Otopina 5 % (50 ppm)**

U odmjernu tikvicu od 100,0 mL pipetirati 5 mL *stock 1* otopine i nadopuniti do oznake s 1-metil-2-pirolidonom.

- **Otopina 50 % (koncentracija(metanol, etil acetat, *tert*-butil-metil-eter) = 500 ppm; koncentracija(2-propanol) = 1000 ppm)**

U odmjernu tikvicu od 10,0 mL pipetirati 5 mL *stock 2* otopine i nadopuniti do oznake s 1-metil-2-pirolidonom.

- **Otopina 80 % (koncentracija(metanol, etil acetat, *tert*-butil-metil-eter) = 800 ppm; koncentracija(2-propanol) = 1600 ppm)**

U odmjernu tikvicu od 10,0 mL pipetirati 8 mL *stock 2* otopine i nadopuniti do oznake s 1-metil-2-pirolidonom.

- ***Stock 2* 100 % (koncentracija(metanol, etil acetat, *tert*-butil-metil-eter) = 1000 ppm; koncentracija(2-propanol) = 2000 ppm)**

U odmjernu tikvicu od 50,0 mL pipetirati 10,0 mL 1-metil-2-pirolidona, dodati 50±5 mg metanola, 50±5 mg etil acetata, 50±5 mg *tert*-butil-metil-etera i 100±10 mg 2-propanola. Nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake s 1-metil-2-pirolidonom.

- ***Stock 3* 120 % (koncentracija(metanol, etil acetat, *tert*-butil-metil-eter) = 1200 ppm; koncentracija(2-propanol) = 2400 ppm )**

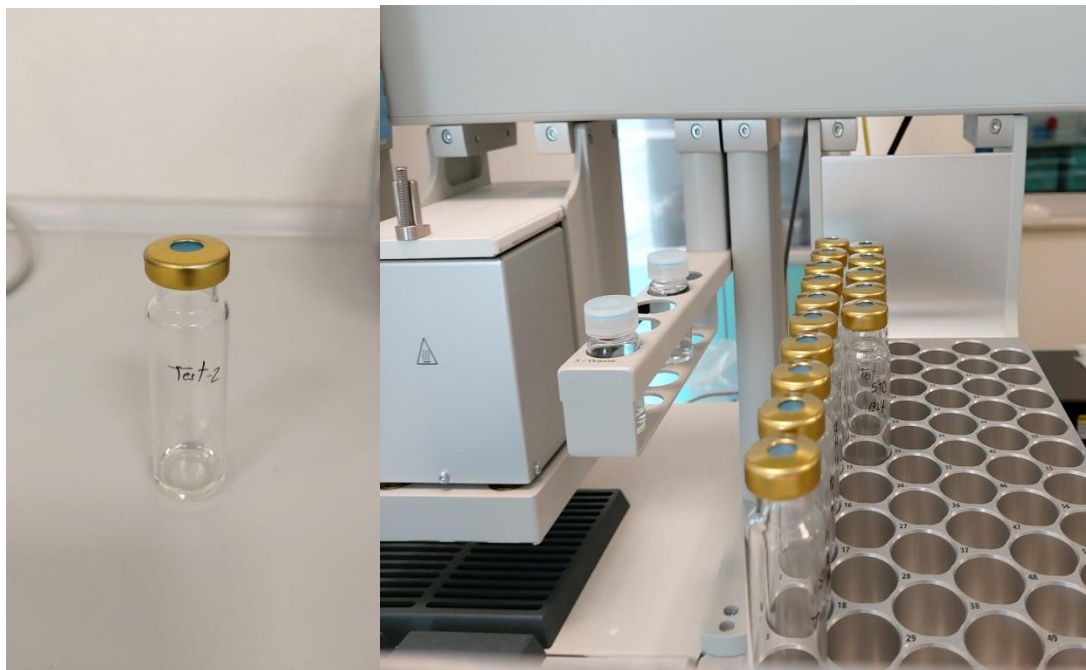
U odmjernu tikvicu od 50,0 mL pipetirati 10,0 mL 1-metil-2-pirolidona, dodati 60±6 mg metanola, 60±6 mg etil acetata, 60±6 mg *tert*-butil-metil-etera i 120±12 mg 2-propanola. Nadopuniti odmejrnu tikvicu do oznake s 1-metil-2-pirolidonom.

- **Standard za test prikladnost sustava (koncentracija(metanol, etil acetat, *tert*-butil-metil-eter) = 50 ppm; koncentracija(2-propanol) = 100 ppm)**

U odmjernu tikvicu od 100,0 mL pipetirati 5 mL *stock 2* otopine i nadopuniti do oznake s 1-metil-2-pirolidonom.

### 3.5. Priprema otopina uzorka

Odvagati  $50 \pm 5$  mg uzorka u *headspace* vijalici (Slika 12.) i dodati 1 mL 1-metil-2-pirolidona, promiješati i zatvoriti vijalicu septom.



Slika 12. Vijalice korištene u radu.

### 3.6. Analitički uvjeti

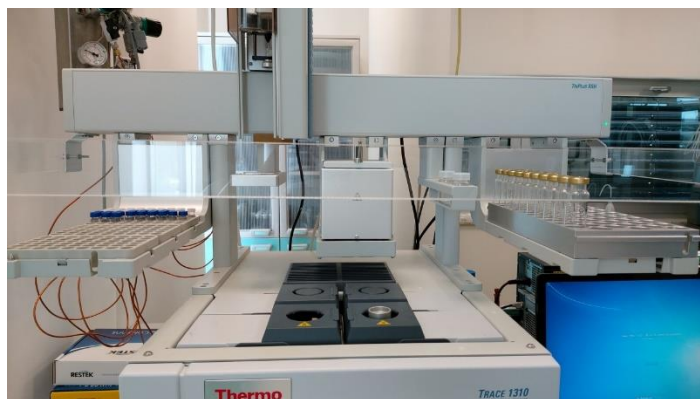
Analitički uvjeti pri kojima je odrađen diplomski rad prikazani su u *Tablici 5*.

*Tablica 5.* Kromatografski uvjeti pri kojima je izrađen diplomski rad.

<b>Kolona</b>	0,320 mm × 30 m kapilarna kolona; debljina filma: 1,00 μm (DB-1301)			
<b>Temperatura injektora</b>	140 °C			
<b>Detektor</b>	plameno-ionizacijski detektor (FID)			
<b>Temperatura detektora</b>	260 °C			
<b>Plin nosilac</b>	dušik			
<b>Protok plina nosioca</b>	1,8 mL/min			
<b>Protok zraka</b>	350,0 mL/min			
<b>Protok vodika</b>	35,0 mL/min			
<b>Protok <i>makeup</i> plina</b>	25,0 mL/min			
<b>Mod</b>	<i>split</i>			
<b><i>Split ratio</i></b>	25 : 1			
<b>Temperaturni program pećnice (<i>Temperatura kolone</i>)</b>	Retencijsko vrijeme (min)	Brzina (°C/min)	Temperatura (°C)	<i>Hold time</i> (min)
	5,0	0,0	40,0	5,0
	20,667	15,0	200,0	5,0
	32,667	25,0	250,0	10,0
<b><i>Headspace uvjeti</i></b>				
<b>Temperatura agitatora / šprice</b>	90 °C			
<b>Vrijeme ekvilibriranja / inkubacije</b>	7 minuta			
<b>Volumen injektiranja</b>	1 mL			
<b>Vrijeme analize</b>	37,7 minuta			

### 3.7. HSS-GC-FID analiza

Nakon što se uzorci pripreme prema prethodno navedenom postupku, prenesu se u instrument za HSS analizu (plinska kromatografija s *headspace* injektiranjem, engl. *Head Space Sampling*, HSS, uređaj je prikazan na *Slici 13.*) i analiziraju prema kromatografskim uvjetima navedenima u *Tablici 5.*



*Slika 13.* Plinski kromatograf TRACE 1310 s plameno-ionizacijskim detektorom (FID), (Thermo Scientific, Švicarska).

Izraz *headspace* u plinskoj kromatografiji označava parnu fazu unutar zatvorene posude koja također sadrži tekućinu ili krutu tvar. Obično je para iznad tekućine ili krute tvari u gornjem dijelu spremnika, pa otuda i izraz *headspace*. *Headspace* ekstrakcija odnosi se na prikupljanje i analizu parne faze u spremniku. Pare se općenito uzimaju iz sustava koji je doveden u ravnotežu prije uzorkovanja. U tipičnoj *headspace* ekstrakciji, tekući ili kruti uzorak stavlja se u zatvorenu bočicu i zagrijava na unaprijed određenu temperaturu dok se ne postigne ravnoteža, omogućujući konstantnu smjesu plinova u parnoj fazi. Alikvot ove smjese parne faze izvlači se iz spremnika i prenosi u plinski kromatograf za odvajanje i analizu komponenata [9].

Popularnost *headspace* tehnike plinske kromatografije porasla je tijekom posljednjih 40 godina. Neka uobičajena područja primjene uključuju analizu polimera, hlapljivih komponenata u pićima i prehrambenim proizvodima, analizu alkohola u krvi te mirisa u parfemima i kozmetici. U farmaceutskoj industriji se *headspace* tehnika plinske kromatografije široko koristi za određivanje ostalih otapala u aktivnim farmaceutskim sastojcima i supstancijama lijekova [9].

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

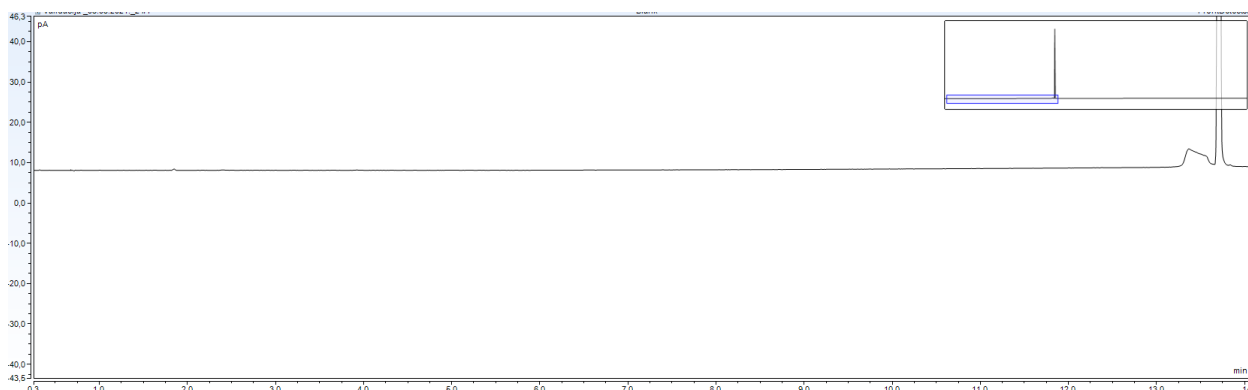
### 4.1. Validacija metode

Cilj validacije analitičkog postupka je pokazati da je postupak prikladan za namjenu svrhu. Karakteristike provjere valjanosti koje treba uzeti u obzir su: specifičnost, granica ili limit kvantifikacije (LOQ), granica detekcije (LOD), linearnost, točnost, preciznost (ponovljivost, intermedijaska preciznost), raspon metode te stabilnost otopine [17, 18].

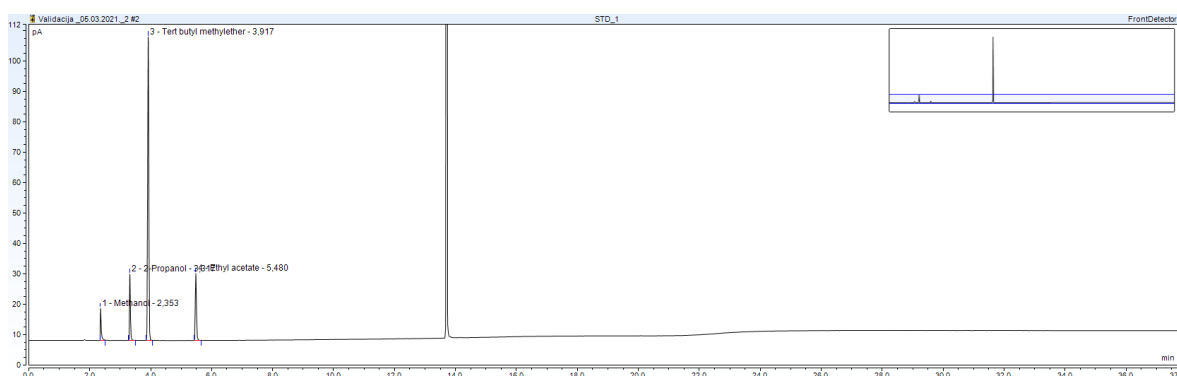
#### 4.1.1. Specifičnost metode

Specifičnost metode je sposobnost točnog određivanja željenog analita u prisutnosti ostalih komponenata u uzorku. Specifičnost se provjerava ispitivanjem utjecaja placeba i forsiranom razgradnjom. Cilj testiranja predložene metode na specifičnost je da se osigura da u uvjetima analize nijedna druga komponenta prisutna u uzorku ne utječe na konačni rezultat analize [17, 18].

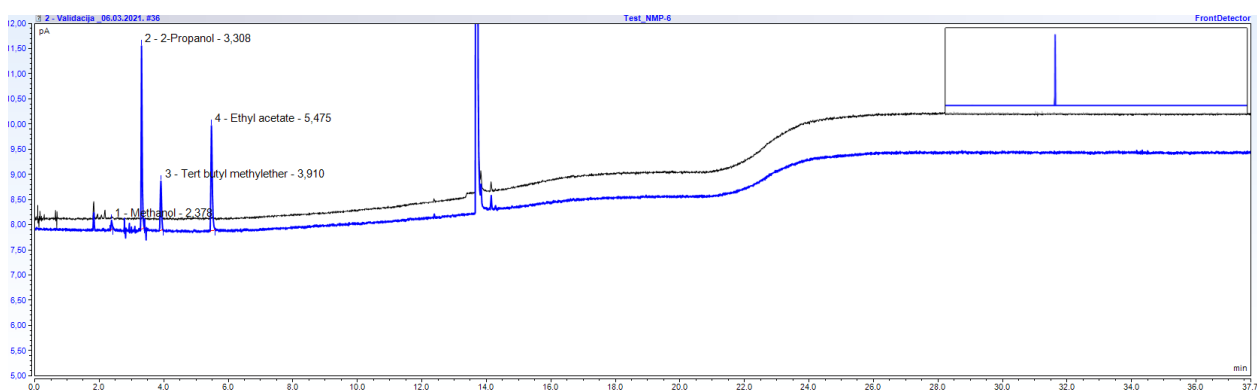
Na kromatogramu slijepog kontrolnog uzorka (engl. *Blank*) ne bi se trebao javiti značajan interferirajući pik u vremenu zadržavanja metilnog alkohola (metanol), 2-propanola, *tert*-butil-metil-etera i etil acetata. U tom slučaju možemo reći da je primijenjena metoda dobro odabrana jer je specifična za ispitivani uzorak. Kromatogrami su prikazani na *Slikama 14.-16.*



*Slika 14.* Kromatogram *Blank* (1-metil-2-pirolidon).



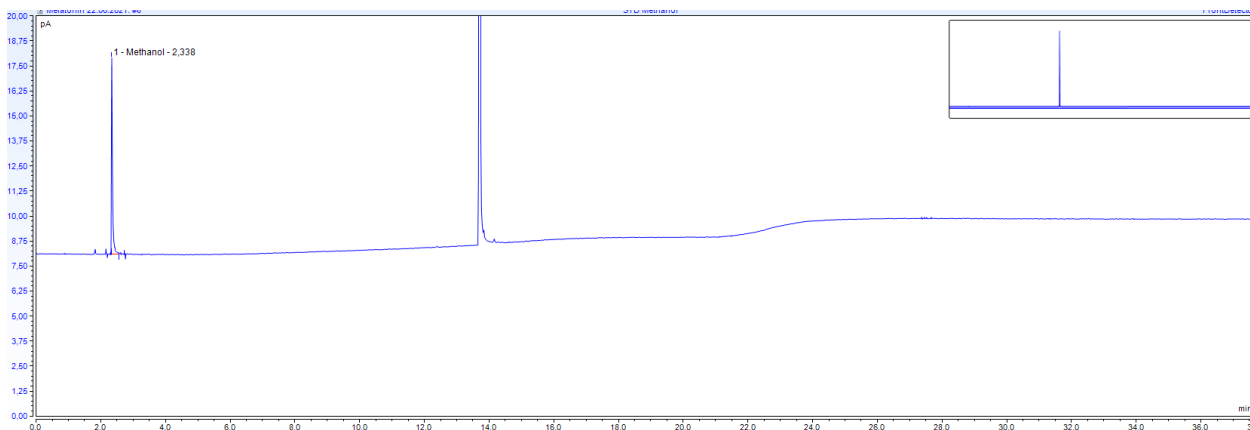
Slika 15. Kromatogram kalibracijski standrad (SST).



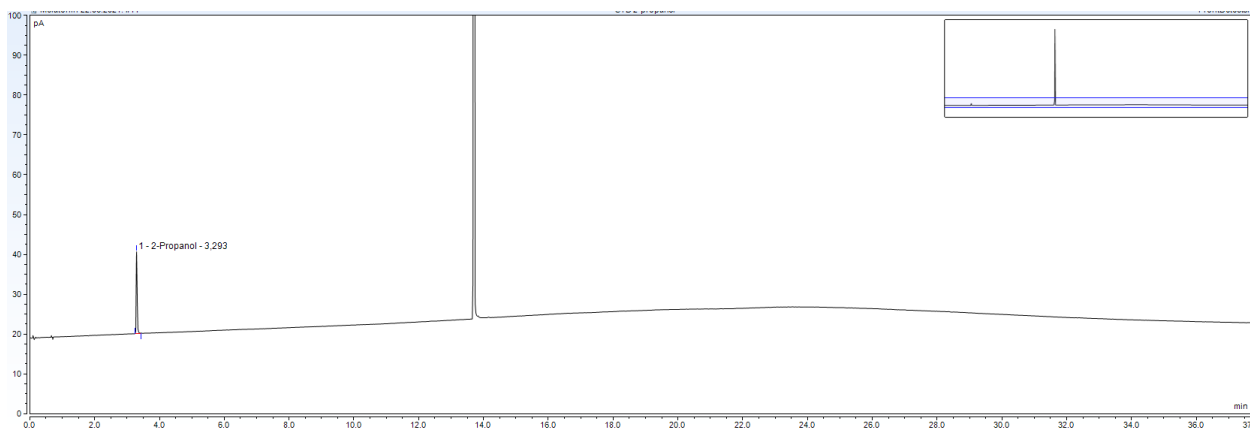
Slika 16. Kromatogram *Overlay* (*Blank* – crna boja, otopina uzorka – plava boja).

Za određivanje vremena zadržavanja komponente pripremljen je za svaku komponentu standard s viskom koncentracijom. Kromatogrami su prikazani na *Slikama 17.-20.*, a vrijeme zadržavanja ispitivanih spojeva prikazano je u *Tablici 6.*

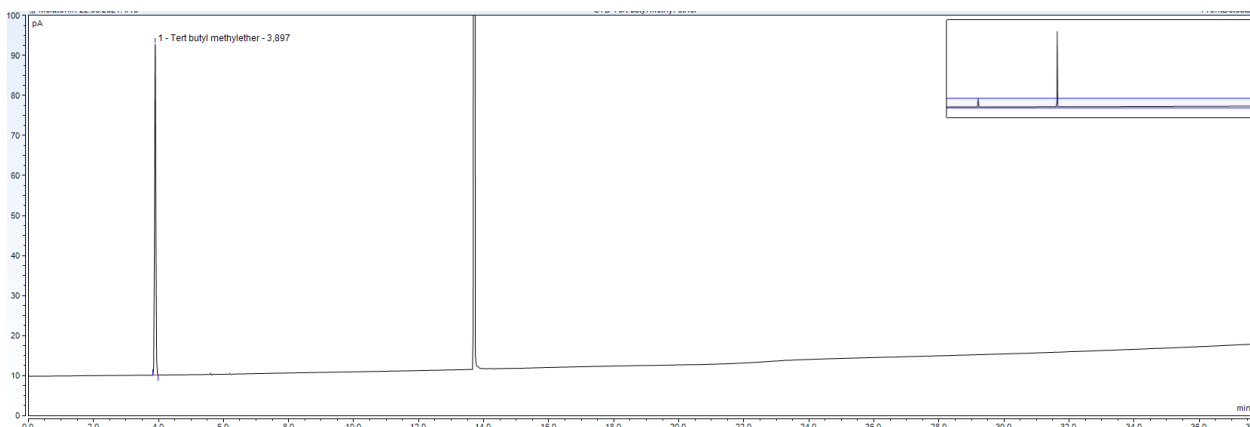




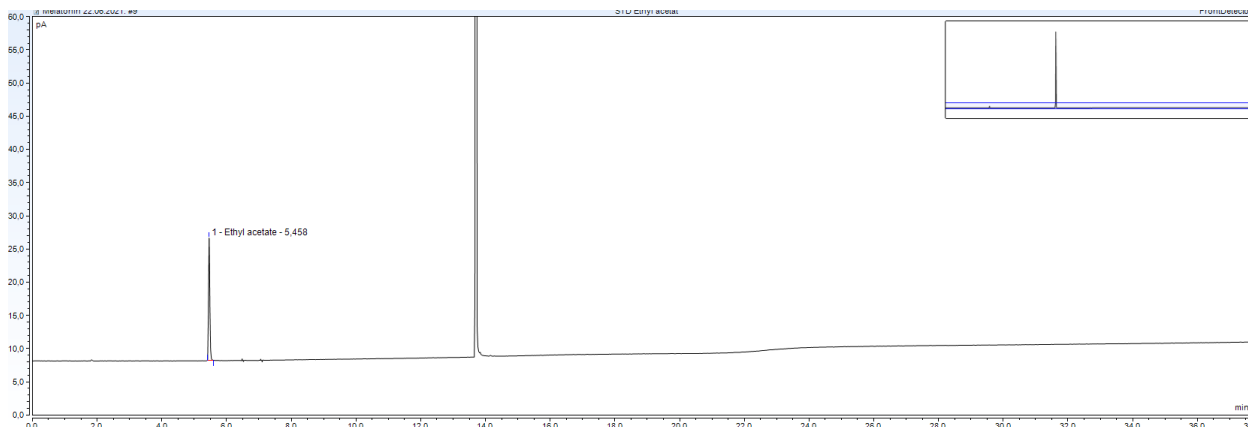
Slika 17. Kromatogram standard metanola.



Slika 18. Kromatogram standard 2-propanola.



Slika 19. Kromatogram standard *tert*-butil-metil-etera.



Slika 20. Kromatogram standard etil acetata.

Tablica 6. Vrijeme zadržavanja metanola, 2-propanola, *tert*-butil-metil-etera i etil acetata.

<i>Spoj</i>	<i>Vrijeme zadržavanja (min)</i>
metanol	2,338
2-propanol	3,293
<i>tert</i> -butil-metil-eter	3,897
etil acetat	5,458

#### 4.1.2. Test prikladnost sustava (SST)

Test prikladnost sustava (engl. *System Suitability Testing*, SST) sastavni je dio svake serije mjerenja koji treba pokazati da je sustav cijelo vrijeme mjerenja prikladan za analizu koja se izvodi. Provodi se injektiranjem otopina poznate koncentracije i sastava čijim se injektiranjem potvrđuje prikladnost sustava za provedbu određene analize na temelju zadovoljavanja zahtjeva za prikladnost sustava propisanoga analitičkom metodom [17, 18]. Ispitivanje prikladnost sustava je provedeno pomoću standarda za test prikladnosti sustava, čija je priprema navedena u poglavlju 3.4. Otopina standarda se injektira 6 puta, a dobiveni rezultati za svako otapalo trebaju imati  $RSD \% \leq 10$  kako bi se potvrdilo da je sustav prikladan za analizu.

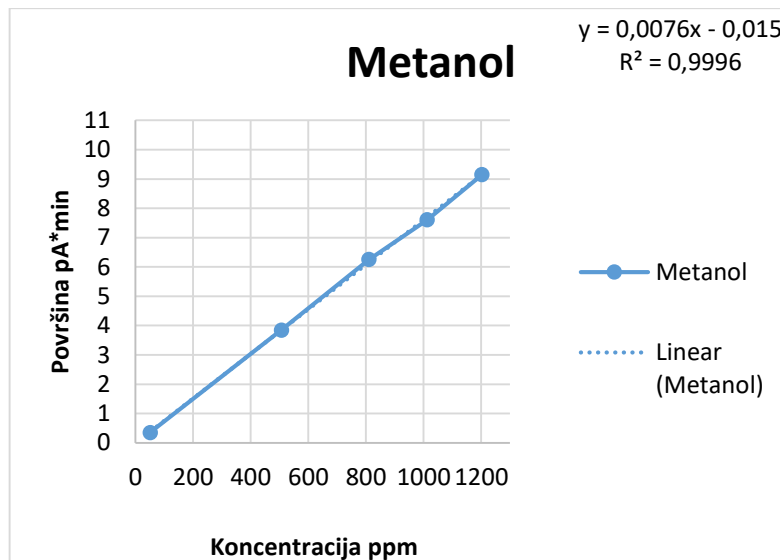
### 4.1.3. Linearnost metode

Linearnost (engl. *Linearity*) metode je njezina mogućnost da u zadanom području daje rezultate koji su direktno ili prema definiranoj matematičkoj transformaciji proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost mora biti provjerena na najmanje pet točaka u području koje je potrebno, ovisno o namjeni metode [17, 18].

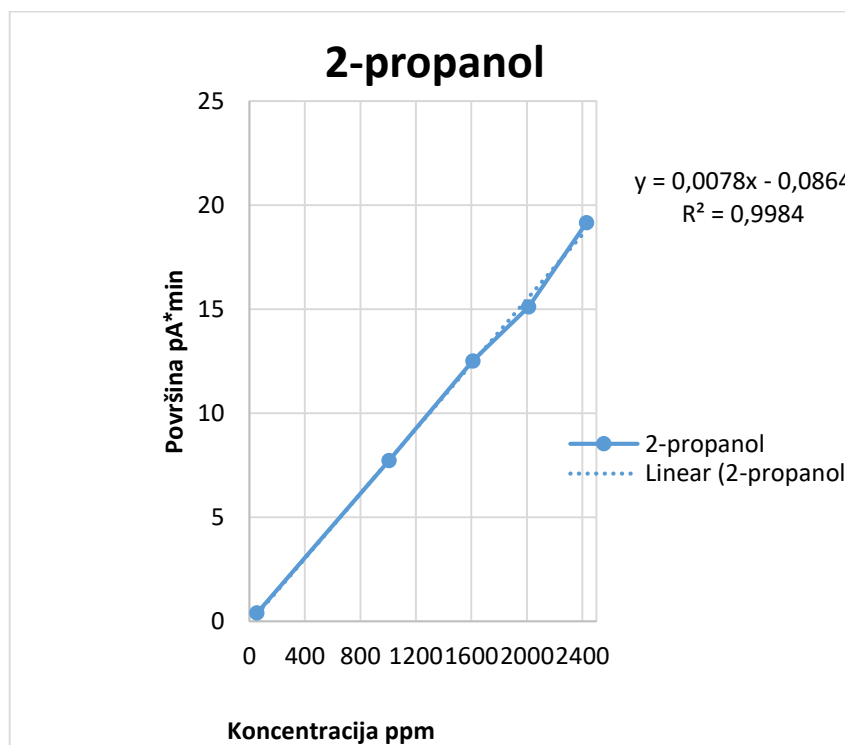
Ispitivanje linearnosti za metanol, *tert*-butil-metil-eter, 2-propanol i etil acetat provedeno je na pet koncentracijskih razina (5 %, 50 %, 80 %, 100 % i 120 %), a rezultati su prikazani u *Tablici 7.* i na *Slikama 21.-24.*

*Tablica 7.* Parametri linearnosti.

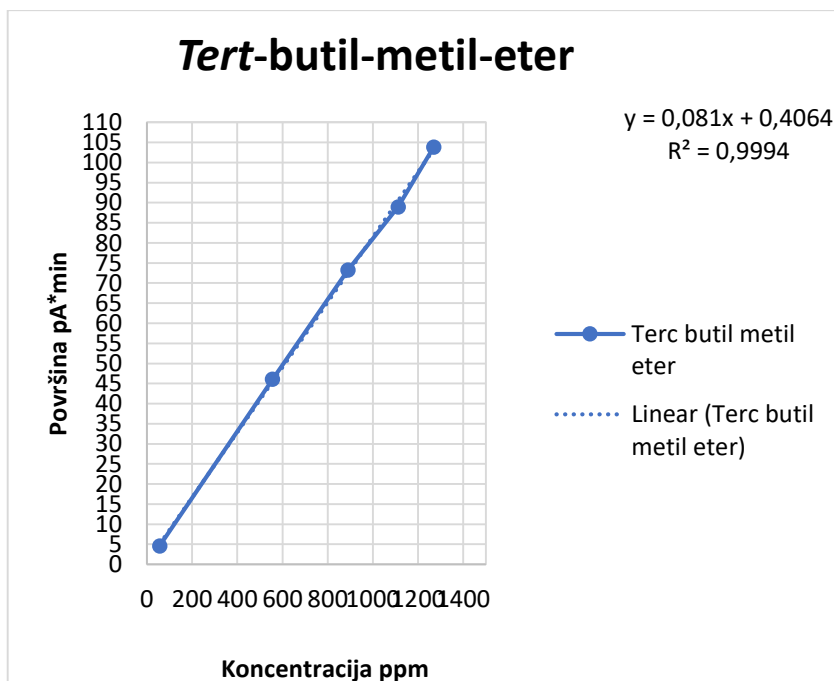
<i>Parametri</i>	<i>Otapalo</i>	<i>Rezultat</i>
za svako poznato otapalo, faktor korelacije > 0,990	metanol	0,9996
	2-propanol	0,9984
	<i>tert</i> -butil-metil-eter	0,9994
	etil acetat	0,9995
y-presjek	metanol	-0,0150
	2-propanol	-0,0864
	<i>tert</i> -butil-metil-eter	+0,4064
	etil acetat	+0,1068
nagib	metanol	0,0076
	2-propanol	0,0078
	<i>tert</i> -butil-metil-eter	0,0810
	etil acetat	0,0195



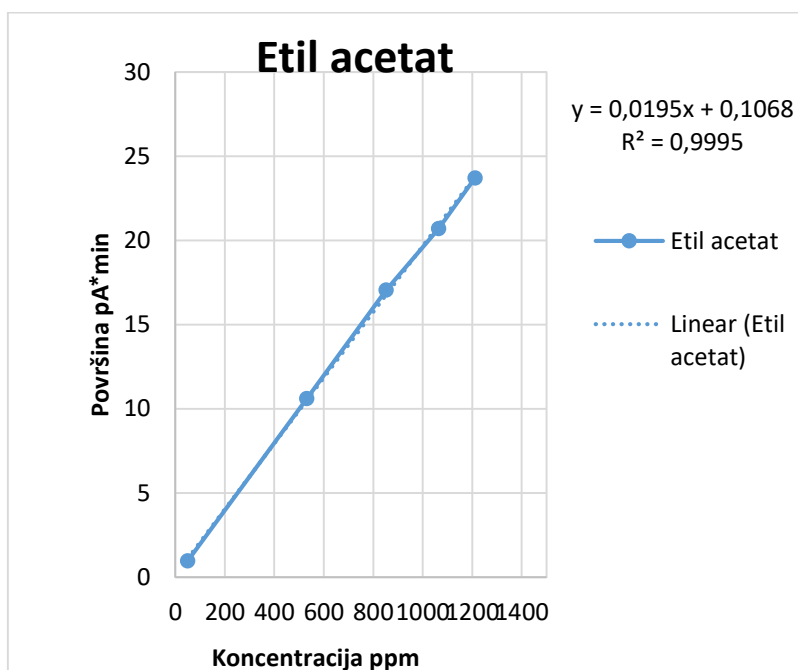
Slika 21. Metanol.



Slika 22. 2-Propanol.



Slika 23. Tert-butil-metil-eter.



Slika 24. Etil acetat.

Koeficijent korelacije veći je od 0,990 za sva otapalo, na temelju čega zaključujemo da je postignuta zadovoljavajuća linearnost metode.

#### 4.1.4. Limit kvantifikacije (LOQ)

Limit ili granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ) je definiran kao najniža koncentracija u validiranom području koja se može pouzdano kvantificirati. LOQ je utvrđen koristeći omjer signala i šuma (S/N), a ovaj način je primjenjiv jedino u slučaju kada se može odrediti šum bazne linije. Određivanje omjera signala i šuma se provodi na način da se uspoređuju mjereni signali uzoraka poznate niske koncentracije analita s onim od slijepe probe i uspostavom najmanje koncentracije kod koje analit može biti pouzdano kvantificiran. Tipičan omjer signala i šuma je 10 : 1 [17, 18].

Limit kvantifikacije je provjeren injektiranjem otopina standarda 5 % (oko 50 ppm) tijekom ispitivanja linearnosti. Otopina je injektirana 6 puta, a rezultati su prikazani u *Tablici 8*.

*Tablica 8.* Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat.

<b>Kriterij prihvatljivost</b>	<b>Otapalo</b>	<b>Rezultat</b>			
za svako poznato otapalo, relativna standardna devijacija površine <i>peak</i> -a mora biti $\leq 10,0\%$	metanol	1,3			
	2-propanol	1,8			
	<i>tert</i> -butil - metil-eter	1,3			
	etil acetat	1,2			
<b>Kriterij prihvatljivost</b>	<b>Otapalo</b>	<b>Injektiranje</b>	<b>S/N</b>	<b>Prosjek S/N (n=6)</b>	<b>Koncentracija otopine (ppm) pri kojoj je S/N=10</b>
za svako poznato otapalo, omjer signal/šum (S/N) površine <i>peak</i> -a mora biti $> 10$	metanol	1	51,8	51,3	9,74
		2	52,8		
		3	55,3		
		4	48,9		
		5	44,1		
		6	54,7		
	2-propanol	1	56,4	56,8	8,80
		2	57,2		
		3	62,8		
		4	53,3		

		5	58,1		
		6	52,9		
	<i>tert</i> -butil- metil-eter	1	2457,5	2404,6	0,21
		2	2300,3		
		3	2383,9		
		4	2375,6		
		5	2510,6		
		6	2400,9		
	etil acetat	1	507,3	591,6	0,85
		2	696,1		
		3	700,8		
		4	509,0		
5		476,7			
6		659,8			

#### 4.1.5. Limit detekcije (LOD)

Limit ili granica detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) je definiran kao najniža koncentracija koja može biti pouzdano detektirana. Tipičan omjer signala i šuma je 3 : 1 [17, 18].

Limit detekcija je 1/3 kvantifikacijski limit LOQ. LOD za ostatna otapala u sirovini melatoninu su prikazani u *Tablici 9*.

*Tablica 9.* LOD za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat.

<b><i>Otapalo</i></b>	<b><i>LOD (ppm)</i></b>
metanol	3,25
2-propanol	2,93
<i>tert</i> -butil-metil-eter	0,07
etil acetat	0,28

#### 4.1.6. Točnost metode

Točnost (engl. *Accuracy*) analitičke metode predstavlja odstupanje rezultata mjerenja od prave vrijednosti. Točnost se mjeri na uzorcima (sirovina ili lijek) s dodatkom poznate količine nečistoća nekoliko točaka, pokrivajući cijelo područje primjene metode. Potrebno je napraviti ispitivanje točnosti na minimalno tri koncentracijska nivoa i pripremiti najmanje tri uzorka po nivou, odnosno potrebno je napraviti ukupno devet priprema [17, 18].

Točnost ove metode ispitana je na tri različite koncentracijske razine otopine standarda prema uputama opisanima u poglavlju 3.4.: niskoj (5 %, odnosno metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter, etil acetat – 50 ppm), srednjoj (100 %, odnosno metanol, *tert*-butil-metil-eter, etil acetat – 1000 ppm, 2-propanol – 2000 ppm) i visokoj (120 %, metanol, *tert*-butil-metil-eter, etil acetat – 1200 ppm, 2-propanol – 2400 ppm). Šest puta je pripremljena otopina uzorka (*unspike*) prema uputama opisanima u poglavlju 3.5., a rezultati su iskazani u ppm i prikazani su u *Tablici 10*.



Tablica 10. Rezultati ispitivanja sirovina melatonina (*unspike*) za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat.

<b>Otapalo</b>	<b>Broj priprema</b>	<b>Površina pA*min</b>	<b>Masa uzorka melatonina (μg)</b>	<b>Koncentracija (ppm)</b>	<b>Prosjek (n=6) (ppm)</b>
metanol	1	0,006	50010	18	22
	2	0,008	50030	23	
	3	0,007	49098	21	
	4	0,008	50040	23	
	5	0,008	49990	23	
	6	0,008	50040	23	
2-propanol	1	0,137	50010	379	353
	2	0,125	50030	346	
	3	0,135	49098	381	
	4	0,128	50040	354	
	5	0,113	49990	313	
	6	0,126	50040	348	
<i>tert</i> -butil-metil-eter	1	0,052	50010	13	12
	2	0,048	50030	12	
	3	0,048	49098	12	
	4	0,046	50040	12	
	5	0,043	49990	11	
	6	0,044	50040	11	
etil acetat	1	0,107	50010	114	108
	2	0,099	50030	106	
	3	0,103	49098	112	
	4	0,100	50040	107	
	5	0,093	49990	99	
	6	0,101	50040	108	

Za *unspike* uzorak, sadržaj otapala u uzorku melatonina se računa prema formuli (2):

$$ppm \text{ solvent} = \frac{A_{\text{sample}}}{C_{\text{sample}}} \times \langle RF \rangle \times 100 \times 10000 \quad (2)$$

gdje je  $A_{\text{sample}}$  površina pika za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat u otopini uzorka,  $C_{\text{sample}}$  je koncentracija otopine uzorka ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $RF$  je prosjek faktora odgovora (engl. *Response Factor*) za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat u otopini standarda za test prikladnost sustava, a 10000 je pretvorba iz postotka u ppm.

Na svakoj koncentracijskoj razini provedena su tri mjerenja, a rezultati su iskazani kao analitički prinos (engl. *Recovery*) i relativna standardna devijacija površine, kriteriji prihvatljivosti, *recovery* % (80,0-120,0 %) i  $RSD \leq 10$  %. Rezultati su prikazani u *Tablici 11*. *Recovery* % se računa prema formuli (3):

$$Recovery \% = \frac{\text{Rezultat spike (ppm)} - \text{Rezultat unspike (ppm)}}{\text{Dodana koncentracija (ppm)}} \quad (3)$$

*Tablica 11*. Rezultati ispitivanja točnosti (*spike*) za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat.

Otapalo	Nivo	Broj priprema	Površina $pA \cdot \text{min}$	Pronađena koncentracija ( <i>spike</i> ) (ppm)	Masa uzoraka melatonina (mg)	Dodana koncentracija (ppm)	Recovery (%)	RSD površina/%	RSD Ponavljanje/%
metanol	5 %	1	0,363	1060,40	50,01	1017,40	102,1	1,0	4,5
		2	0,368	1074,57	50,03	1016,99	103,5		
		3	0,361	1055,19	49,98	1018,01	101,5		
	100 %	1	7,823	22843,45	50,03	20235,86	112,8	0,5	
		2	7,810	22796,38	50,05	20227,77	112,6		
		3	7,755	22586,20	50,16	20183,41	111,8		
	120 %	1	9,062	26434,96	50,08	23997,60	110,1	1,5	
		2	9,168	26738,83	50,09	23992,81	111,4		
		3	9,338	27283,67	50,00	24036,00	113,4		

2-propanol	5 %	1	0,536	1483,23	50,01	1084,46	104,2	0,6	2,7
		2	0,542	1499,23	50,03	1084,02	105,7		
		3	0,539	1492,42	49,98	1085,11	105,0		
	100 %	1	15,955	44133,26	50,03	40403,63	108,4	0,4	
		2	15,833	43778,30	50,05	40387,48	107,5		
		3	15,886	43828,51	50,16	40298,91	107,9		
	120 %	1	19,371	53528,79	50,08	48491,84	109,7	1,9	
		2	19,504	53885,56	50,09	48482,16	110,4		
		3	20,076	55565,72	50,00	48569,42	113,7		
tert-butil-metil-eter	5 %	1	4,621	1167,23	50,01	1113,58	103,8	0,3	1,2
		2	4,648	1173,58	50,03	1113,14	104,4		
		3	4,619	1167,43	49,98	1114,25	103,7		
	100 %	1	89,840	22683,87	50,03	22111,55	102,5	0,5	
		2	89,220	22518,32	50,05	22102,72	101,8		
		3	90,069	22682,75	50,16	22054,25	102,8		
	120 %	1	104,306	26310,12	50,08	25204,81	104,3	0,8	
		2	104,789	26426,68	50,09	25199,78	104,8		
		3	105,916	26758,97	50,00	25245,14	105,9		
etil acetat	5 %	1	1,068	1141,16	50,01	1001,28	103,2	0,2	1,9
		2	1,069	1141,77	50,03	1000,88	103,3		
		3	1,064	1137,57	49,98	1001,88	102,8		
	100 %	1	21,278	22726,55	50,03	21062,48	107,4	0,6	
		2	21,043	22466,57	50,05	21054,07	106,2		
		3	21,168	22550,46	50,16	21007,89	106,8		
	120 %	1	23,943	25547,44	50,08	23951,36	106,2	1,0	
		2	24,010	25613,82	50,09	23946,58	106,5		
		3	24,411	26088,48	50,00	23989,68	108,3		

Analitički prinos je na sve tri koncentracijske razine, izuzev manjih odstupanja, u intervalu od 101 do 113 %, što znači da je validirana metoda točna u širokom koncentracijskom rasponu. Na temelju dobivenih rezultata, utvrđeno je da sirovina

melatonin sadrži ostatna otapala u količinama manjima od onih koje je definirao proizvođač i ICH smjernice.

#### **4.1.7. Preciznost metode**

Preciznost (engl. *Precision*) analitičkog postupka pokazuje ponovljivost rezultata kroz seriju mjerenja napravljenih višestrukim uzorkovanjem i analiziranjem istog uzorka. Preciznost se može razmotriti na tri nivoa: ponovljivost (engl. *Repeatability*), intermedijaska preciznost (unutar laboratorija) (engl. *Intermediate Precision*) i reproducibilnost (između laboratorija) (engl. *Reproducibility*) [17, 18].

##### **4.1.7.1. Ponovljivost metode**

Ponovljivost analitičke metode određuje se uzastopnom analizom uzoraka uzetih iz istog uzorka slijedeći predloženu analitičku metodu točno kako je napisano. Potrebno je napraviti ispitivanje ponovljivost na minimalno tri koncentracijska nivoa i pripremiti najmanje tri uzorka po nivou, ukupno devet priprema, ili najmanje 6 priprema pri 100 % ispitivane koncentracije [17, 18].

Kao što je vidljivo iz *Tablice 11.*, rezultati za RSD % ponavljanje su manji od 10 % iz čega se može zaključiti da je razvijena metoda precizna.

##### **4.1.7.2. Intermedijaska preciznost metode**

Intermedijaska preciznost metode je mogućnost metode da postigne dosljedne i pouzdane rezultate tijekom vremena, uz različite uvjete testiranja, ali slijedeći predloženu analitičku metodu točno kako je napisano. Intermedijaska preciznost uključuje ponavljanje istog eksperimenta kao u eksperimentu ponovljivosti, gdje je potrebno je eksperiment ponoviti koristeći isti instrument na drugi dan [17, 18]. Drugi dan je 6 puta pripremljena otopina uzorka koja je *spikan*-a sa standardnom otopinom (100 %). Rezultati su prikazani u *Tablici 12.* Također, pripremljena je 3 puta otopina uzorka (*unspike*) prema uputama opisanima u poglavlju 5.5., a rezultati su prikazani u *Tablici 13.* *Tablica 14.* prikazuje usporedbu rezultata ponovljivosti, limit prvog i drugog dana.

Tablica 12. Rezultati sirovine melatonin (*unspike*) za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat za drugi dan rada.

<i>Otapalo</i>	<i>Broj priprema</i>	<i>Porvršina pA* min</i>	<i>Masa uzorka melatonina (mg)</i>	<i>Koncentracija (ppm)</i>	<i>Prosjek (n=3) (ppm)</i>
metanol	1	0,008	49990,00	23	22
	2	0,007	50100,00	20	
	3	0,008	50130,00	23	
2-propanol	1	0,131	49990,00	350	341
	2	0,124	50100,00	331	
	3	0,128	50130,00	341	
<i>tert</i> -butil metil-eter	1	0,054	49990,00	13	12
	2	0,049	50100,00	12	
	3	0,049	50130,00	12	
etil acetat	1	0,109	49990,00	114	110
	2	0,103	50100,00	108	
	3	0,105	50130,00	110	

Tablica 13. Rezultati sirovine melatonin (*spike*) za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat za drugi dan rada.

Otapalo	Nivo	Broj priprema	Porvršina pA* min	Pronađena koncentracija (ppm)	Masa uzorka melatonina (mg)	Dodana konc. (ppm)	Recovery (%)	RSD (%)
metanol	100 %	1	7,569	21782,25	50,06	19828,21	109,7	1,1
		2	7,468	21487,30	50,07	19824,25	108,3	
		3	7,587	21838,41	50,05	19832,17	110,0	
		4	7,687	22113,00	50,08	19820,29	111,5	
		5	7,490	21563,52	50,04	19836,13	108,6	
		6	7,642	21979,16	50,09	19816,33	110,8	
2-propanol		1	15,637	41749,75	50,06	39648,51	104,4	1,2
		2	15,454	41252,91	50,07	39640,59	103,2	
		3	15,725	41993,09	50,05	39656,43	105,0	
		4	15,814	42205,46	50,08	39632,68	105,6	
		5	15,322	40925,07	50,04	39664,36	102,3	
		6	15,765	42066,29	50,09	39624,76	105,3	
<i>tert</i> -butil-metil-eter		1	81,424	19849,53	50,06	19653,54	100,9	1,1
		2	80,346	19582,83	50,07	19649,61	97,9	
		3	81,705	19922,02	50,05	19657,46	99,6	
		4	80,755	19678,58	50,08	19645,69	98,4	
		5	81,127	19785,04	50,04	19661,39	98,9	
		6	82,19	20023,78	50,09	19641,76	100,2	
etil acetat		1	21,154	22097,38	50,06	21010,31	104,6	1,1
		2	20,889	21816,21	50,07	21006,11	103,3	
		3	21,267	22219,86	50,05	21014,51	105,2	
		4	21,513	22463,42	50,08	21001,92	106,4	
		5	21,081	22029,93	50,04	21018,71	104,3	
		6	21,446	22388,99	50,09	20997,72	106,1	

Tablica 14. Usporedba rezultata ponovljivost na 100 % specifikaciji limit prvog i drugog dana (intermedijska preciznost metode).

<i>metanol</i>		
	Prvi dan	Drugi dan
Prosjeak pronadana koncentracija	22742,0	21793,9
Standardna devijacija, SD	136,9726	238,8906
<i>Pooled</i> SD	214,764508	
<i>Pooled</i> RSD %	1,0	

<i>2-propanol</i>		
	Prvi dan	Drugi dan
Prosjeak pronadana koncentracija	43913,4	41698,8
Standardna devijacija, SD	192,0910	505,6555
<i>Pooled</i> SD	439,5185	
<i>Pooled</i> RSD %	1,0	

<i>tert-butil-metil-eter</i>		
	Prvi dan	Drugi dan
Prosjeak pronadana koncentracija	22628,3	19807,0
Standardna devijacija, SD	95,2571	160,7848
<i>Pooled</i> SD	145,11407	
<i>Pooled</i> RSD %	0,7	

<i>etil acetat</i>		
	Prvi dan	Drugi dan
Prosjeak pronadana koncentracija	22581,2	22169,3
Standardna devijacija, SD	132,6860	239,4142
<i>Pooled</i> SD	214,4118	
<i>Pooled</i> RSD %	1,0	

Vrijednosti ponovljivosti i srednje preciznosti su unutar definiranih granica za sva otapala (*pooled* RSD  $\leq 10$  %). *Pooled* RSD se računa prema formuli (4) i (5):

$$SD \text{ pooled} = \sqrt{\frac{(n_1-1)SD_1^2 + (n_2-1)SD_2^2}{n_1+n_2-2}} \quad (4)$$

gdje je:

SD1 – standardna devijacija od 3 priprema ( $n_1$ ) na nivo 100 % prvi dan,

SD2 – standardna devijacija od 6 priprema ( $n_2$ ) na nivo 100 % drugi dan.

$$RSD \text{ pooled} = \frac{SD \text{ pooled}}{\text{Prosjeak pronađene koncentracije od prvog i drugog dana}} \quad (5)$$

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da je priprema uzoraka ponovljiva te da provođenje analize u drugom danu i korištenje novo pripremljenih otopina ne utječe značajno na dobivene rezultate. Potvrđeno je da su priprema uzorka i metode analize precizni.

#### 4.1.8. Raspon metode

Raspon analitičkog postupka je interval između gornje i donje koncentracije analita u uzorku (uključujući te koncentracije) za koji je dokazano da analitički postupak ima odgovarajuću razinu preciznosti, točnosti i linearnosti [17, 18].

Raspon za metanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat je utvrđen od 50 ppm do 1200 ppm i za 2-propanol od 50 ppm do 2400 ppm, za nominalne koncentracije uzorka od 50 mg/mL.

#### 4.1.9. Stabilnost otopine standarda i uzorka

Stabilnost otopine standarda i uzorka u uobičajenim laboratorijskim uvjetima mora biti određena kako bi se uvjerali da su uzorci i standardi dovoljno stabilni u periodu u kojem se analiza treba izvršiti [18].

Ispitana je stabilnost za otopinu standarda za test prikladnosti sustava i za otopinu uzorka na sobnoj temperaturi i u hladnjaku (u hladnjaku prije nego što bi se uzorak trebao analizirati, a odmrzavanje uzorka je pri sobnoj temperaturi). Rezultati su prikazani u *Tablicama 15. i 16.*



Tablica 15. Rezultati ispitivanja stabilnosti otopine prikladnost sustava za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat.

<i>metanol</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	1,2	0,3
T= 48 h	1,2	4,3

<i>2-propanol</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	1,8	0,1
T= 48 h	0,2	4,1

<i>tert-butil-metil-eter</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	0,1	0,7
T= 48 h	0,6	4,6

<i>etil acetat</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	0	0,6
T= 48 h	0,1	3,5

Tablica 16. Rezultati ispitivanja stabilnosti otopina uzorka za metanol, 2-propanol, *tert*-butil-metil-eter i etil acetat.

<i>metanol</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	3,3	3,1
T= 48 h	9,2	8,9

<i>2-propanol</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	4,1	3,9
T= 48 h	8,1	7,8

<i>tert-butil-metil-eter</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	4,6	4,3
T= 48 h	9,1	8,7

<i>etil acetat</i>		
Vrijeme	Sobna temperatura	Hladnjak
	$\Delta$ %	$\Delta$ %
T= 0	-	-
T= 24 h	3,5	3,2
T= 48 h	7,2	7,1

Za starije otopine, za svako poznato otapalo,  $\Delta$  % treba biti  $\leq 10,0$  % što znači da su otopine stabilne 48 sati u hladnjaku i na sobnoj temperaturi.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu predložena je HSS-GC-FID metoda za istovremeno određivanje ostatnih organskih otapala (metanola, 2-propanola, *tert*-butil-metil-etera i etil acetata) u sirovini melatonina. Melatonin je farmaceutski značajna sirovina koja se može koristiti kao aktivna tvar u pripremi sirupa ili tableta, budući da regulira brojne tjelesne funkcije, od stanja budnosti i sna do funkcioniranja imunološkog sustava.

Optimizirani kromaografski uvjeti omogućili su dobru separaciju analita unutar 37 minuta te je razvijena pouzdana i jednostavna metoda.

Svi analiti pokazivali su dobar odgovor i uspješno u detektirani palmenonizacijskim detektorom.

Metoda je validirana prema ICH smjernicama i određene su kvantifikacijske granice metode koje iznose za metanol 1 %, 2-propanol 0,9 %, *tert*-butil-metil-eter 0,02 % i etil acetat 0,09 %, što znači da se svi veći postotci od tih mogu kvantitativno odrediti. Detekcijske granice također su određene i iznose za metanol 0,3 %, 2-propanol 0,3 %, *tert*-butil-metil-eter 0,007 % i etil acetat 0,03 %, što znači da navedena otapala neće biti detektirana u uzorku ukoliko su u uzorku prisutna u postotku manjem od tih. Time je pokazano da ova metoda ima veliku specifičnost. Potvrđena je linearnost metode u području 5-120 % prema specifikacijskom limitu proizvođača ( $k > 0,990$ ), točnost (analitički prinos u rasponu 101-113 %) te preciznost ( $RSD < 4,5$ ) u radom području.

Iz rezultata linearnosti i točnosti potvrđeno je područje rada metode od 50 do 1200 ppm za metanol, *tert*-butil metil-eter i etil acetat, a za 2-propanol od 50 do 2400 ppm.

Otopine standarda i uzorka stabilne su 2 dana na sobnoj temperaturi i u hladnjaku.

Iako su ostatna otapala bila detektirana kao onečišćenja, količine u kojima su bila prisutna nisu bile veće od količina propisanih ICH smjernicama i nisu bile veće od graničnih koncentracija koje su navdene u specifikaciji proizvođača.

Rezultati ispitivanja upućuju na mogućnost detekcije i određivanja lako hlapljivih organskih otapala korištenih u sintezi melatonina s ciljem ispitivanja sigurnosti i provjere kvalitete ove sirovine, a korištena HSS-GC-FID metoda se pokazala kao vrlo učinkovita i pouzdana u rješavanju navedenog analitičkog problema.

## 6. LITERATurna VRELA

- [1] <https://go.drugbank.com/drugs/DB01065>, (25. 6. 2021.)
- [2] B. Albertini, M. di Sabatino, C. Melegari, N. Passerini, *Int. J. Pharmaceut.* 469 (2014), 67-79.
- [3] K. Pavić, B. Zorc, *Farm. glas.* 4 (2013), 249-265.
- [4] O.F. Tekbas, R. Ogur, A. Korkmaz, A. Kilic, R. Reiter, *J. Pineal. Res.* 44 (2008), 222-226.
- [5] A. Carrillo-Vico, J.M. Guerrero, P.J. Lardone, R.J. Reiter, *Endocrine* 27 (2005), 189-200.
- [6] F. Auld, E.L. Maschauer, I. Morrison, D.J. Skene, R.L. Riha, *Sleep Med. Rev.* (34) 2017, 10-22.
- [7] E. Matheson, B.L. Hainer, *Am. Fam. Physician.* 96 (2017), 29-35.
- [8] A. Altun, B. Ugur-Altun, *Int. J. Clin. Pract.* 61 (2007), 835-845.
- [9] C.F. Poole (ur.), *Gas Chromatography*, 1. izdanje, Academic Press, Elsevier, 2012.
- [10] Z.E. Penton, F.G. Kitson (ur.), *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*, 2. izdanje, Academic Press, Elsevier, 2011.
- [11] [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/0912.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm), (9. 7. 2021.)
- [12] Thermo Fisher Scientific S.p.A., *Thermo Scientific TRACE 1300 and TRACE 1310, Gas Chromatographs, User Guide*, 6. izdanje, Thermo Fisher Scientific Inc., Rodano-Milan, 2016.
- [13] D.G. Watson, *Pharmaceutical analysis*. Elsevier Limited, Edingburgh, 2012.
- [14] <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals/columns.html>, (25. 6. 2021.)
- [15] ICH, *Impurities in new drug substances Q3A(R2), Current Step 4, ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 2006.
- [16] ICH, *Impurities: guideline for residual solvents Q3C(R6), ICH Harmonised Guideline*, 2016.
- [17] ICH, *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)), Current Step 4, ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 2005.
- [18] G. Geetha, Karanam Naga Ganika Raju, B. Vignesh Kumar, M. Gnana Raja, *IJAPBC* 1 (2012), 64-71.

## 7. PRILOZI

### 7.1. Popis kratica

ADI	„prihvatljivi dnevni unos“ (engl. <i>Acceptable Daily Intake</i> )
ASD	oboljenja karakteristična za spektar autističnih poremećaja (engl. <i>Autism Spectrum disorders</i> )
ASMT	gen koji kodira posljednji enzim sinteze melatonina
BP	Britanska farmakopeja
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>Central Nervous System</i> )
CYP1A2	enzim iz skupine citokroma P450
ECD	detektor apsorpcije elektrona (engl. <i>Electron Capture Detector</i> )
FID	plameno-ionizacijski detektor (engl. <i>Flame Ionization Detector</i> )
FDA	Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
GC	plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i> )
GMP	dobra proizvodna praksa (engl. <i>good manufacturing practice</i> )
GPCRs	receptori spregnuti s G proteinom (engl. <i>G Protein-Coupled receptors</i> .)
HSS	plinska kromatografija s <i>headspace</i> injektiranjem, engl. <i>Head Space Sampling</i> )
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (engl. <i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> )
IPCS	Međunarodni program za kemijsku sigurnost (engl. <i>International Program on Chemical Safety</i> )
LOD	Limit ili granica detekcije (engl. <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	Limit ili granica kvantifikacije (engl. <i>Limit of Quantitation</i> )
MT1	melatoninski receptor 1
MT2	melatoninski receptor 2
NPD	dušik–fosforni detektor (engl. <i>Nitrogen Phosphorous Detector</i> )

P-CREB	CREB-vezujući protein (engl. <i>cAMP Responsive Element-Binding Protein</i> )
PDE	„dopuštena dnevna izloženost“ (engl. <i>Permitted Daily Exposure</i> )
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
PLC	fosfolipaza C
PLOT	čestica čiji su unutarnji zidovi impregnirani čvrstom fazom (engl. <i>Porous-Layer Open-Tubular Columns</i> )
RF	faktor odgovora (engl. <i>Response Factor</i> )
SD1	standardna devijacija od 3 priprema ( <i>n</i> 1) na nivo 100 % prvi dan
SD2	standardna devijacija od 6 priprema ( <i>n</i> 2) na nivo 100 % drugi dan
S/N	omjer signala i šuma
SST	test prikladnost sustava (engl. <i>System Suitability Testing</i> )
TCD	detektor termičke vodljivosti (engl. <i>Thermal Conductivity Detector</i> )
TDI	„tolerirani dnevni unos“ (engl. <i>Tolerable Daily Intake</i> )
TSD	termionski specifični detektor (engl. <i>Thermionic Specific Detector</i> )
WCOT	čestica čiji su unutarnji zidovi obloženi tankim slojem tekuće faze (engl. <i>Wall-Coated Open Tubular</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i> )

## 7.2. Životopis

### Osobni podaci

Ime i prezime	<b>Joud Kassab</b>
Datum i mjesto rođenja	12. 1. 1995. Alep, Sirija
Adresa	Vijenac Kneza Branimira 13/12, Vukovar
e-mail	joudkassab5@gmail.com
<b>Obrazovanje</b>	
2019.-2021.	<b>Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer</b> Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju Republika Hrvatska
2012.-2016.	<b>Preddiplomski sveučilišni studij kemije, smjer biokemija</b> Sveučilište Alep, Prirodoslovni fakultet Sirijska Arapska Republika
2010.-2012.	<b>Gimnazija Nablous</b> Alep Sirijska Arapska Republika
2007.-2009.	<b>Srednja škola Olaja Bent Almahdi</b> Alep Sirijska Arapska Republika
2000.-2006.	<b>Osnovna škola Ibn Zaidoun</b> Alep Sirijska Arapska Republika
<b>Aktivnosti i sudjelovanja</b>	
2021.	Tečaj za stjecanje znanja o zaštiti od opasnih kemikalija, Hrvatski zavod za javno zdrastvo, služba

	za toksikologiju
<b>Osobne vještine</b>	
Materinski jezik	Arapski jezik
Strani jezici	Engleski jezik – aktivno u govoru i pismu Hrvatski jezik – aktivno u govoru i pismu B2
Računalne vještine	MS Office sustav