Uvođenje metode za određivanje bakra u serumu primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Suša, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:299552

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivan Suša

Uvođenje metode za određivanje bakra u serumu primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

„Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Suzani Inić i doc. dr. sc. Jasni Jablan te svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na pruženoj pomoći u izradi ovog rada, a osobito na prijateljstvu, ukazanom povjerenju i prenesenom znanju.

Također zahvaljujem svojim roditeljima i sestri na podršci izabranog puta. Hvala svim prijateljima na fakultetu i izvan njega na beskrajnoj pomoći u studiranju i životu.“

Sadržaj

1. Uvod ... 1
1.1 Uloga bakra u organizmu ... 2
1.2. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) ... 4
1.3.1. Linijski izvor zračenja – žarulja sa šupljom katodom ... 6
1.3.2. Generator atomske pare – plameni atomizator laminarnog protoka ... 6
1.3.3. Spektrofotometar ... 7
1.4 Validacija analitičke metode ... 9
1.4.1. Specifičnost i selektivnost ... 9
1.4.2. Točnost ... 9
1.4.3. Preciznost ... 10
1.4.4. Linearnost i radno područje ... 10
1.4.5. Granica dokazivanja i granica određivanja ... 11
1.4.6. Izdržljivost ... 11
2. Obrazloženje teme ... 12
3. Materijali i metode ... 14
3.1. Materijali ... 15
3.1.1. Korištene kemikalije ... 15
3.1.2. Aparatura ... 15
3.1.3. Laboratorijski pribor ... 16
3.1.4. Uzorci ... 16
3.2. Metode ... 17
3.2.1. Princip metode ... 17
3.2.2. Priprema otopina ... 17
3.2.3. Postupak određivanja koncentracije bakra ... 18
4. Rezultati i rasprava ... 19
4.1. Validacija metode ... 20
4.1.1. Linearnost ... 20
4.1.2.Preciznost ... 21
4.1.3. Točnost ... 23
4.1.4. Granica dokazivanja i određivanja ... 24
4.2. Primjena optimizirane metode ... 25
5. Zaključci ... 26
6. Literatura ... 28

7. Sažetak/Summary..... 30
Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documetation card..... 32

1. Uvod

1.1 Uloga bakra u organizmu

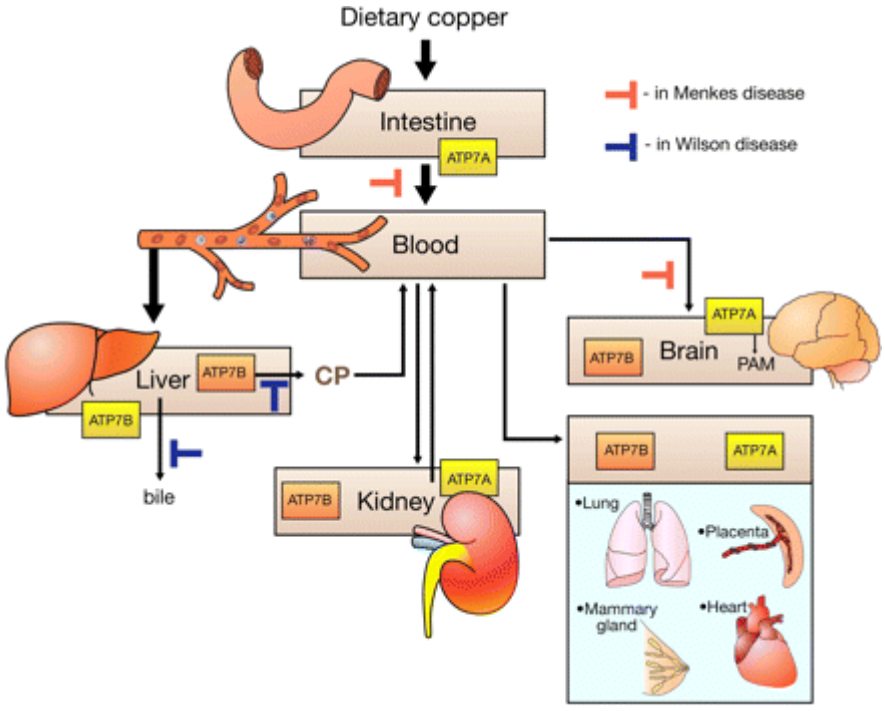
Bakar je jedan od esencijalnih elemenata u tragovima kojeg u ljudskom organizmu pronalazimo u količinama od 100 mg. Taj redoks aktivni metal je uključen u veliki broj bioloških procesa – antioksidativna zaštita, imunost, eritropoeza, sinteza neuropeptida te funkcioniranje mnogih redoks enzima među kojima se posebno ističe ceruloplazmin čija oksidativna aktivnost je ovisna o bakru kao kofaktoru. Stoga, svaka promjena koncentracije bakra u organizmu može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme (Yanet i sur., 2005).

Namirnice koje je potrebno konzumirati kako bi se održala navedena vrijednost bakra su: kruh, žitarice, povrće i mahunarke s time da vrijednost bakra u pojedinim namirnicama osobito ovisi o lokalnim uvjetima uzgoja. Dnevna potreba za unosom bakra različita je i ovisna o dobi i spolu. Prema studiji koja je provedena u Francuskoj, a čije vrijednosti su slične onima u drugim europskim zemljama, potreba za bakrom u mlađoj dobi je manja u oba spola te raste s godinama s time da kod odraslih puno je veća potreba za bakrom kod muškaraca nego kod žena (Bost i sur., 2016).

Deficijencija bakra tijekom trudnoće može uzrokovati: oslabljen razvoj kardiovaskularnog sustava, poremećaje u imunološkom i neurološkom sustavu te malformacije kostiju, dok u odraslih uzrokuje: poremećaj metabolizma glukoze i kolesterola, strukture i funkcije imunosnih i cirkulirajućih krvnih stanica, povećanje oksidativnog oštećenja. Određene deficijencije bakra u organizmu uzrokovane su X vezanim genetskim mutacijama u Cu – transporterima. Menkes bolest karakterizirana je promjenom Cu-transportera P tipa ATPaze (odgovoran za izlazak Cu iz stanice). Međutim, veliki unos bakra može uzrokovati Fenton - tip redoks reakcije koja uzrokuje stanično oštećenje i smrt. Akutna intoksikacija bakrom može rezultirati nizom patoloških promjena, a u najtežim stanjima i smrt dok kroničnu intoksikaciju obilježavaju bolesti jetre i teški neurološki poremećaj (Yanet i sur., 2005; Bost i sur., 2016).

Visoke vrijednosti bakra u organizmu mogu također biti uzrokovane Wilsonovom bolesti (hepatolentikularna degeneracija) do koje dolazi zbog genetske mutacije Cu – ATPase ATP7B na 13 kromosomu. Ona uzrokuje nakupljanja bakra u jetri, a onda i u ostalim organima, zbog nemogućnosti izbacivanja viška bakra koji unosimo redovitom prehranom. Zbog smanjene ugradnje bakra u ceruloplazmin, koncentracija ceruloplazmina u krvi je smanjena. Pojavnost bolesti je 1/30 000 ljudi bez obzira na njihovu rasu, nacionalnost ili zemlju u kojoj žive. Bolest dovodi do nagomilavanja bakra u jetri i mozgu što dovodi do hepatitisa te psihičkih i neuroloških poremećaja. U polovice oboljelih jetra je prvi i jedini

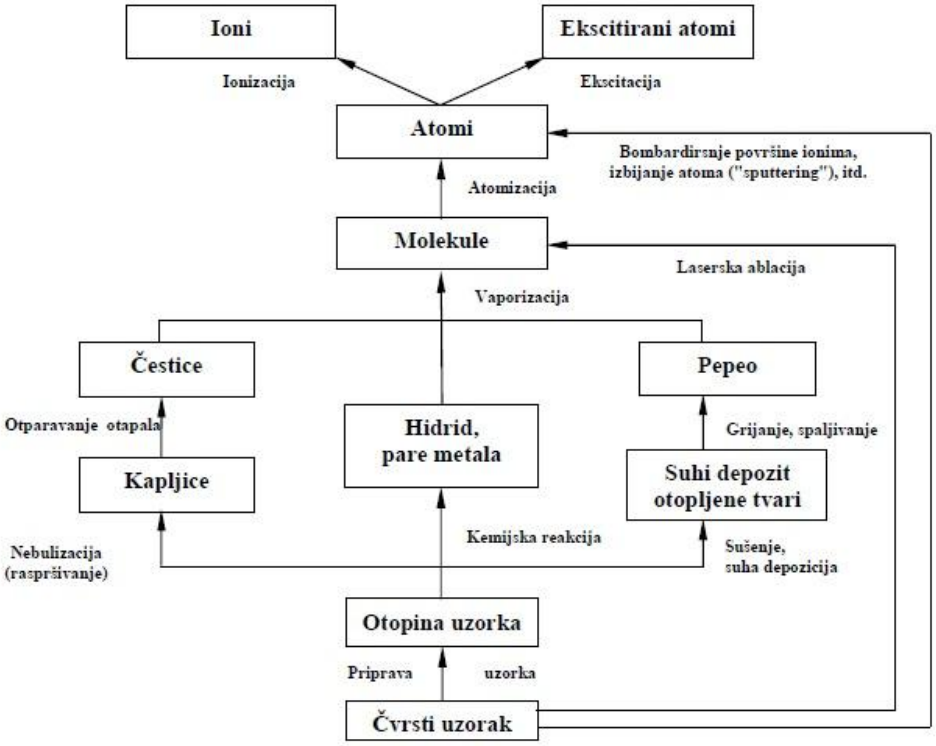
organ koji je oštećen. Nakupljanje započinje od rođenja, a prvi simptomi se uočavaju u adolescenciji: tremor, smetnje hoda, jetrena bolest te simptomi slični Parkinsonovoj bolesti. Vrlo je važno što prije dijagnosticirati bolest, što se danas jednostavnim tehnikama može i kod simptomatskih i asiptomatskih bolesnika, kako bi se spriječila teška oštećenja jetre koja su prisutna i prije pojava prvih simptoma, ali ih se može uočiti samo mikroskopski. Posebnim pretragama moguće je uočiti Wilsonovu bolest: bakar u 24-satnom urinu veći od 100 µg/24 h, sniženi ceruloplazmin u krvi ispod 20 mg, biopsija jetre u kojoj je utvrđeno više od 250 µg/g suhog tkiva jetre, miroskopske promjene na jetri i druge. U postavljanu dijagnoze važno je, uz biopsije jetre i oftalmološki pregled za Kayser-Flesicherov prsten, odrediti koncentraciju ceruloplazmina u krvi te bakra u krvi i urinu gdje je jedna od korištenih analitičkih tehnika atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) . Liječenje Wilsonove bolesti moguće je D-penicilaminom i trienom koji djeluju na vezanje bakra te povećavanju njegovo izlučivanje mokraćom (Yanet i sur., 2005; www.hubpp.mef.hr).



Slika 1. Patofiziologija Menkes i Wilsonove bolesti (preuzeto s http://physrev.physiology.org/content/87/3/1011)

1.2. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS)

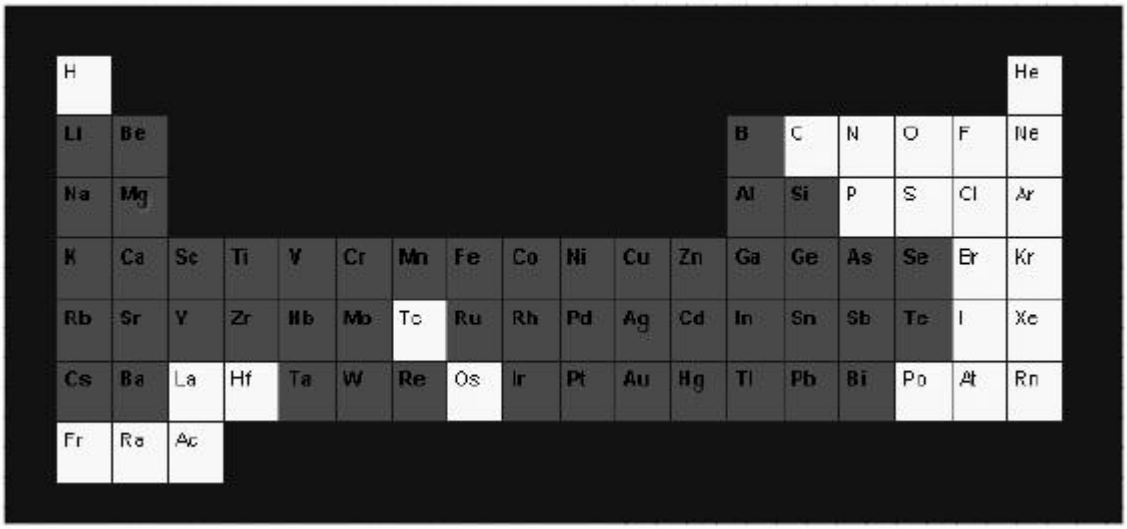
Atomska apsorpcijska spektrofotometrija ili AAS je spektrofotometrijska tehnika koja mjerenjem inteziteta apsorbiranog zračenja pri određenoj valnoj duljini definira koncentraciju elementa u ispitivanoj otopini. Glavno obilježje ove spektrofotometrijske tehnike jest atomizacija, tj. postupak u kojem se uzorak isparava i razgrađuje uz nastajanje atomske pare pri čemu pojam „atomski„ uključuje i elementarne ione K^+, Ba^+ i Al^+. Taj prvi i najkritičniji korak u atomskoj spektroskopiji može se ostvariti na 4 načina: atomizacijom u plamenu, elektrotermičkom atomizacijom, atomizacijom u induktivno spregnutoj plazmi i atomizacijom u plazmi istosmjerne struje što je prikazano na slici 2. (Luterotti i Bicanic, 2013; Skoog i sur., 1999; Watson 1999).



Slika 2. Shematski prikaz uobičajenih puteva atomizacije uzorka u atomskoj spektroskopiji (preuzeto iz Luterotti i Bicanic, 2013)

Plamena atomizacija temelji se na izgaranju vodene otopine uzorka koja se na početku raspršuje u oblik fine vodene prašine koja se miješa s plinovitim gorivom i oksidansom te uvodi u plamen gdje nastaje atomska para koja obasjana svjetlom točno određene valne duljine uzrokuje prijelaz atoma metala u pobuđeno stanje. Pritom je energija emitiranog zračenja pri vraćanju u osnovno stanje jednaka valnoj duljini apsorbiranog zračenja. Većina metala ima veliku energiju prijelaza iz osnovnog u pobuđeno stanje za termalno pobuđivanje. U plamenu se svi elementi ioniziraju do određenog stupnja što rezultira time da u plamenu osim atoma metala su prisutni i elektroni i ioni čiji spektar je potpuno različit od spektra pripadnog atoma. Omjer koncentracija atoma i iona ovisi o temperaturi plamena te ukupnoj koncentraciji atoma i elektrona drugih prisutnih elemenata pa je zbog toga vrlo važan nadzor temperature plamena i čistoća uzorka (Luterotti i Bicanic, 2013; Skoog i sur., 1999; Watson 1999).

Prednost ove analitičke tehnike je jednostavnost, relativno niska cijena, učinkovitost, veća osjetljivost od atomske emisijske spektrofotometrije i veća specifičnost u određivanju koncentracije više od 70 metalnih elemenata (slika 3.) što predstavlja ujedno i ograničenje jer je potrebna specifična žarulja sa šupljom katodom pri određivanju svakog elementa. Atomska apsorpcijska spektroskopija je osjetljivija od klasičnih metoda analize (gravimetrijskih i volumetrijskih) te od nekih elektrokemijskih što ju čini izrazito primjenjivom u analizi subultratragova analita (Luterotti i Bicanic, 2013; Skoog i sur., 1999; Watson 1999).

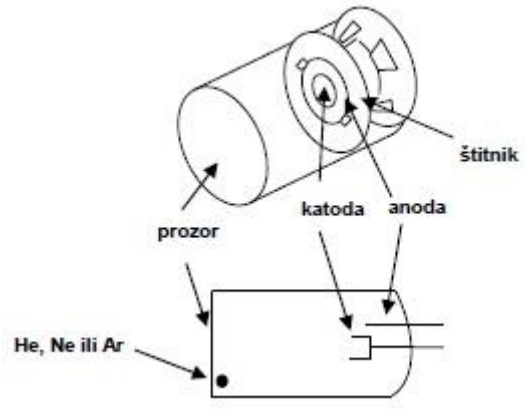


Slika 3. Elementi koji se mjere atomskom apsorpcijskom spektroskopijom - označeni sivo (preuzeto iz Luterotti i Bicanic, 2013)

3. Dijelovi AAS-a

1.3.1. Linijski izvor zračenja – žarulja sa šupljom katodom

Najčešći izvor zračenja u AAS-u je žarulja sa šupljom katodom (slika 4.) koja se sastoji od volframove anode i cilindrične katode (prevučene metalom koji se analizira) koje su zataljene u staklenu cijev punjenu inertnim plinom, najčešće argonom, pri tlaku od 100 – 600 kPA. Upotrebom potencijala od 300V na elektrodama dolazi do ionizacije argona čiji elektroni putuju prema anodi, a kationi prema katodi gdje, uz dovoljno visok potencijal, izbijaju metale s površine u atomski oblak gdje prelaze u pobuđeno stanje. Vraćanjem u osnovno stanje emitiraju zračenje uske vrpce točno određene valne duljine potrebne za pobuđivanje atoma metala u plamenu te prelaze natrag na površinu katode ili se istalože na stijenke žarulje. Za svaki analizirani metal potreba je specifična žarulja sa šupljom katodom prevučenom metalom koji se analizira (Luterotti i Bicanic, 2013; Skoog i sur., 1999; Watson 1999).



Slika 4. Lampa sa šupljom katodom (preuzeto iz Luterotti i Bicanic, 2013)

1.3.2. Generator atomske pare – plameni atomizator laminarnog protoka

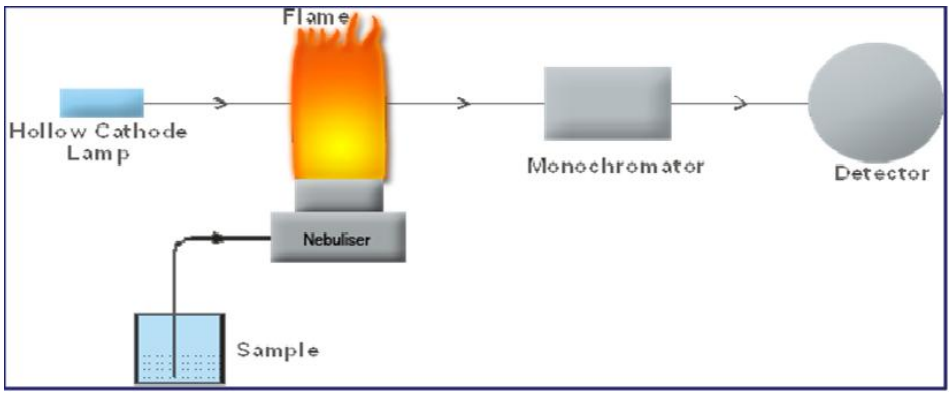
Plameni atomizator laminarnog protoka ili plamenik s prethodnim miješanjem najčešće je korišten tip plamenika u AAS-u koji je zamijenio plamenik turbulentog protoka koji je zbog bučnog plamena isključen iz uporabe. Karakteriziran je time da se uzorak raspršuje protokom oksidansa u aerosol koji se miješa s gorivom i potom nakon prolaska kroz

niz zapreka ulazi u plamenik s prorezom čiji plamen je najčešće dugačak 5 – 10 cm. Prednost ovog plamenika je relativno tih plamen uz puno veću duljinu puta što poveća osjetljivost i reproducibilnost mjerenja. Najčešće korišteno gorivo je smjesa zraka i acetilena s temperaturom plamena od 2200 do 2400 ^{0}C koja je prikladna za mnoge atomske apsorpcijske analize (Skoog i sur., 1999; Watson 1999).

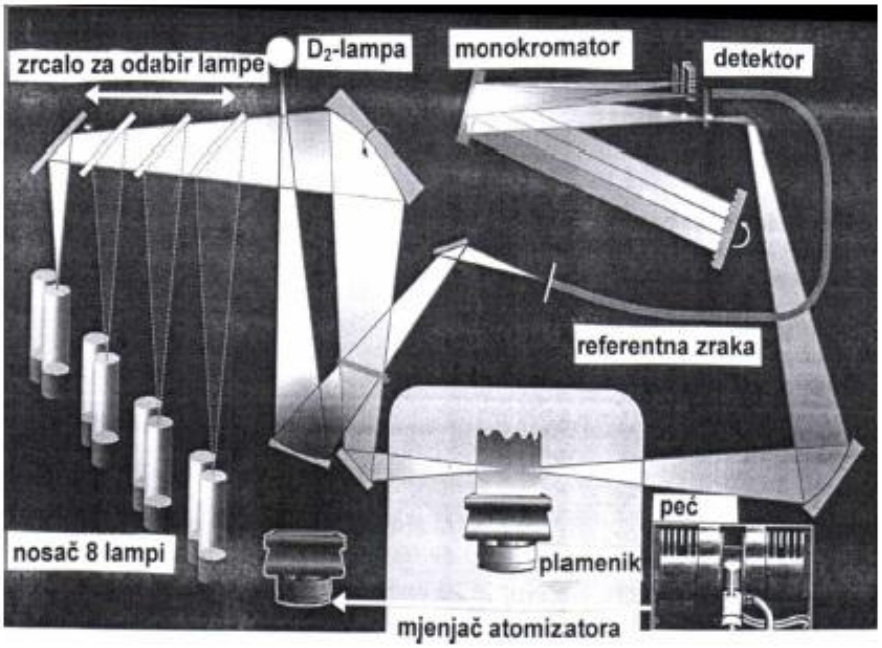
1.3.3. Spektrofotometar

Spektrofotometar se sastoji najčešće od monokromatora za ultraljubičasto i vidljivo područje i fotodetektora. Monokromator postavljen između plamena i detektora uklanja većinu interferencija. Detektor prima izmjenični signal žarulje i neprekidan, istosmjerni signal plamena te ih prevodi u odgovarajući tip električne struje. Pritom nemodulirane signale nastale plamenom uklanja, a do pojačala i sredstva za očitanje propušta izmjenični signal izvora.

Dijelovi AAS-a prikazani su na slici 5. i 6. (Luterotti i Bicanic, 2013; Skoog i sur., 1999; Watson 1999).



Slika 5. Dijelovi AAS-a: izvor zračenja (eng. *Hollow Cathode Lamp*) generator atomske pare (engl. *Nebuliser*), monokromator i detektor (preuzeto s http://lab-training.com/2013/05/08/introduction-to-aas-component-parts/)



Slika 6. Optički dijagram atomskog apsorpcijskog spektrofotometra (preuzeto iz Luterotti i Bicanic, 2013)

1.4 Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je postupak kojim se utvrđuje je li analitička metoda prikladna za primjenu u određenim mjerenjima. Time se jamči da će u propisanim uvjetima primjene, navedena metoda dati valjane rezultate. Potrebno ju je provesti pri razvoju nove metode i pri promjeni analitičke metode koja je prethodno validirana. U postupku validacije potrebno je odrediti: specifičnost, selektivnost, točnost, preciznost, linearnost i radno područje, granicu dokazivanja, granicu određivanja (Nigović i sur., 2014).

1.4.1. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost se definira kao sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje jedan analit od ostalih komponenti prisutnih u uzorku, a selektivnost je mogućnost metode da može točno odrediti željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka. Pritom se najvišim stupnjem selektivnosti smatra specifičnost. Metode se mogu opisati kao više ili manje selektivne, dok specifičnost govori o tome je li analit prisutan ili nije. Specifični postupci su oni kojima ne smeta prisustvo drugih komponenti u uzorku dok kod selektivnih postupaka nije moguće dokazati samo jedan analit (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

1.4.2. Točnost

Točnost pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih odnosno prihvaćenih referentnih vrijednosti. Točnost metode pokazuje sustavne pogreške te se treba stalno ispitivati i kontrolirati u laboratoriju s obzirom na veliki broj čimbenika koji mogu utjecati: pogreške instrumenta u radu, u radu analitičara, ispravnost i čistoća pribora, kvaliteta standarda korištenog u kalibraciji te drugi. Utvrđuje se kroz najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Ispituje se određivanjem analitičkog prinosa ili postotka postignutog rezulata (engl. *Recovery*) prema formuli:

$$R = \frac{\chi}{X} \times 100$$

gdje je χ srednja izmjerena vrijednost, a X je stvarna vrijednost analita u uzorku (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

1.4.3. Preciznost

Preciznost ili pouzdanost metode je sposobnost metode da pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja koja su dobivena višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Potrebno je izvršiti 5–6 određivanja za 2–3 koncentracije, a iskazuje se kao relativna standardna devijacija (RSD) definirana formulom:

$$RSD = \frac{SD}{\chi} \times 100$$

pri čemu je *SD* standardna devijacija, a χ srednja vrijednost dobivenih rezulata.

Razlikuju se tri načina iskazivanja preciznosti: ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost ili preciznost u seriji (engl. *repeatability*) govori o podudaranju rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka, istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument, reagens, jedan laboratorij u kratkom vremenskom periodu). Srednja preciznost ili preciznost iz dana u dan (engl. *intermediate precision*) predstavlja odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka, istom metodom pod različitim uvjetima (različiti analitičar, instrument, reagensi različitih dobavljača) u istom laboratoriju kroz duži vremenski period. Preciznost u seriji je obično veća od preciznosti iz dana u dan. Obnovljivost (engl. *reproducibility*) je definirana kao podudaranje rezultata uzastopnim mjerenjem istih uzoraka istom metodom, ali u različitim laboratorijima (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

1.4.4. Linearnost i radno područje

Linearnost je sposobnost analitičke metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Određuje se na način da se napravi serija uzoraka različitih koncentracija analita te se izvrši 3-6 određivanja za najmanje 5 koncentracija. Tako se dobiva kalibracijska krivulja ili graf ovisnosti izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita. Izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca koji treba iznositi R^2 >0,999.

Radno područje je raspon između gornje i donje koncetracije analita u kojem analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost. U kvantitativnoj analizi preporučeno je radno područje od 80 do 120 % (Nigović i sur., 2014).

1.4.5. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja je najniža koncentracija analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena, pri zadanim uvjetima metode, a granica određivanja je najniža koncentracija koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. Određuju se razrijeđenjem ispitivane otopine te se uspoređuju signali uzroka poznatih niskih koncentracija sa signalom slijepog uzorka. Granica dokazivanja (engl. *limit of detection,* LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantitation,* LOQ) definirane su formulom:

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{a} \times 100$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a} \times 100$$

gdje je σ standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, ostatno standardno odstupanje regresijkog pravca ili standardno odstupanje odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, dok je a nagib kralibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

1.4.6. Izdržljivost

Izdržljivost ili otpornost metode predstavlja mjeru njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Definira se variranjem jednog parametra dok ostali ostaju nepromijenjeni. Izbor parametra ovisi o metodi. Važan je indikator pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine noramlne primjene kada se uvjeti rada mogu realno promjeniti (Nigović i sur., 2014).

2. Obrazloženje teme

Bakar, kao jedan od esencijalnih elemenata u tragovima, iznimno je važan za razvoj ljudskog organizma. Svaka i najmanja promjena koncentracije bakra u organizmu može dovesti do teških patofizioloških poremećaja. Pokazao se iznimno važan u procesima antioksidativne zaštite, imunosti, eritropoeze, sinteze neuropeptida te u funkcioniranju mnogih redoks enzima među kojima se posebno ističe ceruloplazmin čija je oksidativna aktivnost ovisna o bakru kao kofaktoru. Ta se ovisnost osobito uočava kod Wilsonove bolesti kada zbog smanjene ugradnje bakra u ceruloplazmin dolazi do smanjenja koncentracije ceruloplazmina što je jedan od dijagnostičkih parametara ove bolesti (Bost i sur., 2016).

Wilsonova bolest, čija prevalencija je 1/30 000 ljudi bez obzira na nacionalnost, rasu ili zemlji u kojoj žive, utvrđuje se posebnim pretragama: bakar u 24-satnom urinu veći od 100 µg/24 h, sniženi ceruloplazmin u krvi ispod 20 mg, biopsija jetre u kojoj je utvrđeno više od 250 µg/g suhog tkiva jetre, miroskopske promjene na jetri i druge. Postavljanje dijagnoze ove bolesti zahtijeva i instrumentalnu analizu kojom se određuje: koncentracija ceruloplazmina u krvi te bakra u krvi i urinu. Prvi dijagnostički parametar, koji pokazuje dobru osjetljivost i prihvatljivu specifičnost, je koncentracija ceruloplazmina u krvi. No niska razina ceruloplazmina nije uvijek pokazatelj poremećaja u pohranjivanju bakra te se onda vrlo često određuje koncetracija barka u urinu i u krvi (Petrak, 2015; www.hubpp.mef.hr).

Svrha ovog diplomskog rada je korištenjem atomske apsorpcijske spektrofotometrije uvesti metodu za precizno i pouzdano određivanje bakra u biološkim uzorcima ljudskog seruma. Tako razvijena metoda omogućila bi brzo i jednostavno određivanje koncentracije bakra u serumu, a time i dijagnosticiranje Wilsonove bolesti.

Prvi je cilj ovoga rada validirati uvedenu metodu kroz analitičko ispitivanje njene linearnosti, točnosti, preciznosti, granice dokazivanja i granice određivanja.

Drugi je cilj ovog rada ispitati primjenu razvijene metode u određivanju bakra u ljudskom serumu.

Rezultati ovog rada trebali bi ponuditi metodu koja osigurava brzo, jednostavno i točno određivanje koncentracije bakra u ljudskom serumu.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene kemikalije

- Cu-standard za AAS (Sigma Aldrich, Njemačka)
- HNO_3 65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Butan-1-ol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm^{-1})

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

3.1.2. Aparatura

Analiza je provedena na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektom nespecifične površine prema parametrima:

- Žarulja: žarulja sa šupljom katodom (15mA)
- Valna duljina (nm): 324,8
- Gorivo / oksidans: acetilen / zrak
- Acetilen (tlak (Pa) /protok (dm3min-1): 0,9x105/2
- Zrak (tlak (Pa) /protok (dm3min-1): 5,5x105/17
- Širina pukotine (nm): 0,7
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Fotodetektor
- Pisač, računalo, printer: AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo+monitor+printer HP 5652

3.1.3. Laboratorijski pribor

- Odmjerne tikvice vl. 100 mL i 50 mL
- Staklene epruvete vl. 10 mL
- Staklene čaše vl. 50 mL
- Mikropipete vl. 5-50 μL, 50-200 μL, 200-1000 μL, 1000-10 000 μL

3.1.4. Uzorci

Uzorci seruma dobiveni su od dobrovoljnih zdravih darivatelja. Svi uzroci su držani na sobnoj temperaturi te su analizirani u kratkom vremenskom periodu od vremena sakupljanja.

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode

Koncentracija bakra određivala se mjerenjem apsorbancije uzroka raspršenog u smjesi zraka i oksidansa te izgorenog u plamenu pri čemu dolazi do atomizacije. Nastali atomi izlažu se zračenju valne duljine 324,8 nm te se prati promjena intenziteta zračenja.

3.2.2. Priprema otopina

2% HNO_3

2%-tna otopina HNO_3 dobivena je razrijeđivanjem 10,00 mL 100%-tne otopine HNO_3 u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 500,00 mL s ultračistom vodom. Dobivena otopina je korištena u ispiranju plamenog atomizatora.

6% n-butanol

6%-tna otopina n-butanola dobivena je razrijeđivanjem 6,00 mL 100%-tne otopine butanola u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 100,00 mL s ultračistom vodom. Dobivena otopina korištena je u pripremi otopina za analizu.

Standardne otopine bakra

Pripremljena je matična standardna otopina bakra koncentracije 100 mg/L iz komercijalno pribavljene otopine bakra koncentracije 1000 mg/L. Razrijeđivanjem 62.50 μL matične otopine bakra koncentracije 100 mg/L u odmjernoj tikvici od 50,00 mL dobivena je otopina ST1 koncentracije 0,125 mg/L. Ostale standardne otopine bakra za izradu kalibracijskog pravca pripremljene su razrijeđivanjem komercijalno pribavljenog standarda bakra u odmjernoj tikvici do volumena od 50,00 mL. Standardne otopine bakra pripremljene su kako je prikazano u tablici 1.:

Tablica 1. Koncentracije i priprema standardnih otopina bakra

Koncentracija standarda bakra (mg/L)	**Priprema standarda**	**Ukupno razrijeđenje u odnosu na matičnu otopinu**
0,125 (ST1)	62.50 µL matične otopine konc. 100 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL	800 X
0,25 (ST2)	12,50 µL komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL	4000 X
0,5 (ST3)	25,00 µL komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL	2000 X
1,0 (ST4)	50,00 µL komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL	1000 X
2,0 (ST5)	100,00 µL komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL	500 X
3,0 (ST6)	150,00 µL komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL	333 X

3.2.3. Postupak određivanja koncentracije bakra

U staklene epruvete se stavi 2,00 mL standardne otopine bakra te doda 8,00 mL butanola (6%) i promiješa. Za mjerenje uzorka uzme se u staklenu epruvetu 0,40 mL uzorka seruma i doda 1,60 mL butanola (6%) te promiješa. Također se pripremi i slijepa proba koja umjesto uzorka sadrži butanol (6%). Plameni atomizator je pročišćen uporabom 2% HNO_3. Tako pripremljene i homogenizirane otopine se mjere višestruko budući da uređaj omogućuje uzastopno mjerenje i analizu istog homogenog uzorka u kratkom vremenskom periodu. Koncentracija bakra praćena je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 324.8 nm. Koncentracije bakra u uzorcima seruma su izračunate pomoću kalibracijske krivulje i izražene u mg/L.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Validacija metode

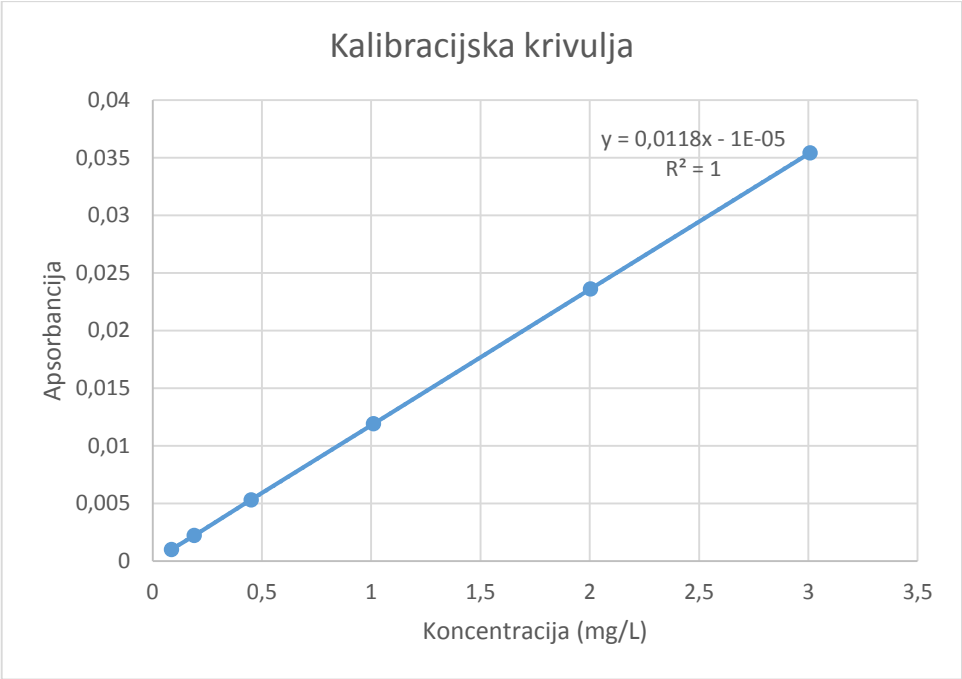
Validacija analitičke metode je postupak koji definira je li analitička metoda prikladna za određenu primjenu te jamči dobivanje valjanog rezultata kada se provodi u propisanim uvjetima.

Izrađeni standardi, uzorci i slijepa proba podvrgnuti su pripremi kako je opisano u materijalima i metodama te su korišteni u svrhu ispitivanja: linearnosti, preciznosti (ponovljivost i srednja preciznost), točnosti, granice dokazivanja i granice određivanja (Nigović i sur., 2014).

4.1.1. Linearnost

Linearnost analitičke metode je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Dobiva se tako da se napravi serija uzoraka različitih koncentracija analita te izvrši 3-6 određivanja na najmanje 5 koncentracija. Iz toga se dobiva graf ovisnosti izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita odnosno kalibracijska krivulja. Izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

Upotrebom pripremljenih standardnih otopina različitih koncentracija utvrđena je linearnost analitičke metode mjerenjem standarda u triplikatu. Time se dobije graf ovisnosti odaziva detekora o koncentaciji standarda prikazanog na slici 7. Dobivena je jednadžba pravca $y=0,0118x - 1x10^{-05}$ s koefcijentom korelacije $R^2= 1$. Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da je metoda linearna i primjenjiva za određivanje koncentracije bakra u nepoznatim uzorcima.



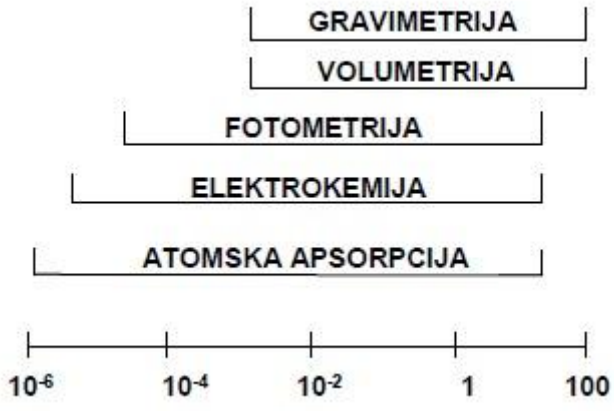
Slika 7. Kalibracijska krivulja

4.1.2.Preciznost

Preciznost metode je sposobnost analitičke metode da pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja koja su dobivena višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Pritom je potrebno, u svrhu analize, izvršiti 5–6 određivanja za 2–3 koncentracije, a iskazuje se kao relativna standardna devijacija (RSD) u postotku. Razlikuje se preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (srednja preciznost). Relativna standardna devijacija izračuna se prema formuli:

$$RSD = \frac{SD}{\chi} \times 100$$

gdje je *SD* standardna devijacija, a χ srednja vrijednost dobivenih rezultata. Analitički korisno koncentracijsko područje u AAS-u i drugim analitičkim tehnikama vidljivo je na slici 8. (Nigović i sur., 2014; Luterotti i Bicanic, 2013).



Slika 8. Analitički korisno koncentracijsko područje u AAS-u u odnosu na druge analitičke tehnike (preuzeto iz Luterotti i Bicanic, 2013)

Ponovljivost analitičke metode utvrđena je provođenjem šest mjerenja za tri standarda u kraćem vremenskom periodu. Dobivene vrijednosti su prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Izmjerene koncentracije 3 standarda bakra dobivene unutar istog dana

Broj mjerenja	**ST 1** (0,125 mg/L)	**ST 4** (1,0 mg/L)	**ST 5** (2,0 mg/L)
1.	0,135785	0,952465	1,98626
2.	0,114626	0,952465	2,003416
3.	0,130511	0,970891	1,995791
4.	0,126127	0,997578	2,025655
5.	0,138835	0,995672	2,004052
6.	0,1199	1,002026	2,003416
Srednja vrijednost (X)	0,127630667	0,978516167	2,003098333
Standardna devijacija (SD)	0,009289479	0,022916623	0,013014155
Relativna standardna devijacija RSD (%)	7,28	2,34	0,65

Dobivene vrijednosti za ST4 (1,0 mg/L) i ST5 (2,0 mg/L) su u granicama prihvatljivosti za RSD (do 2%) dok kod vrlo niskih koncentracija dolazi do odstupanja.

Zatim je ispitana srednja preciznost metode. Za tri standarda mjerena je koncentracija kroz tri dana te su dobivene sljedeće vrijednosti RSD prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Izmjerene vrijednosti koncentracija 3 standarda bakra dobivene kroz tri dana

Broj mjerenja	**ST 1** (0,125 mg/L)	**ST 4** (1,0 mg/L)	**ST 5** (2,0 mg/L)
1.	0,12695292	0,958819	2,011041
2.	0,09531	0,932132	1,964021
3.	0,11837502	0,996307	1,949407
Srednja vrijednost (X)	0,11354598	0,962419333	1,974823
Standardna devijacija (SD)	0,01636485	0,032238633	0,032205588
Relativna standardna devijacija RSD (%)	14,41	3,35	1,63

Iz dobivenih vrijednosti RSD za srednju preciznost, nakon mjerenja tri standarda tijekom tri dana, može se zaključiti da je metoda precizna za određivanje koncentracije bakra u nepoznatom uzorku s tim da kod vrlo niskih koncentracija dolazi do odstupanja od zadanih granica prihvatljivosti za RSD (do 3%).

4.1.3. Točnost

Točnost analitičke metode definira slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih odnosno prihvaćenih referentnih vrijednosti. Točnost metode pokazuje sustavne pogreške te se treba stalno ispitivati i kontrolirati u laboratoriju. Utvrđuje se kroz najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Definira se određivanjem analitičkog prinosa ili postotka postignutog rezulata prema formuli:

$$R = \frac{\chi}{X} \times 100$$

gdje je χ srednja izmjerena vrijednost, a X je stvarna vrijednost analita u uzorku (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

U svrhu utvrđivanja točnosti, izvršena su tri mjerenja za dva standarda (tablica 4.) i na temelju dobivenih vrijednosti možemo zaključiti da je analitička metoda točna u određivanju koncentracije bakra uz točnost od 97,44 do 99,33 %.

Tablica 4. Točnost (analitički prinos %) iskazana prema stvarnim vrijednostima koncentracije bakra

Broj mjerenja	**ST 4** (1,0 mg/L)	**ST 6** (3,0 mg/L)
1.	0,971	2,975
2.	0,998	2,958
3.	0,954	3,004
Srednja vrijednost	0,9743	2,979
Stvarna koncentracija	1	3
R(Točnost) %	97,43	99,30

4.1.4. Granica dokazivanja i određivanja

Granica dokazivanja predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena, pri zadanim uvjetima metode, a granica određivanja je najniža koncentracija koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. Određene su prema formuli:

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{a} \times 100$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a} \times 100$$

Gdje je σ standardna odstupanje y-odsječka regresijkog pravca, a a je nagib pravca (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

Standardna devijacija σ je iznosila $1{,}26281 \times 10^{-5}$, a nagib pravca a je 0,011783. Prema formuli, granica dokazivanja iznosila je LOD = 0,004 mg/L, a granica određivanja LOQ = 0,011 mg/L.

4.2. Primjena optimizirane metode

Optimiziranom i validiranom metodom određena je koncentracija bakra u serumu u četiri sakupljena uzorka od dobrovoljnih darivatelja. Rezultati analize su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Koncentracije bakra u uzorcima ljudskog seruma

Broj mjerenja	**uzorak 1** (mg/L)	**uzorak 2** (mg/L)	**uzorak 3** (mg/L)	**uzorak 4** (mg/L)
1.	1,393	1,633	0,782	0,747
2.	1,442	1,362	0,677	0,539
3.	1,448	1,64	0,703	0,689
Srednja vrijednost	1,428	1,545	0,721	0,658

Raspon koncentracije bakra u četiri uzorka ljudskog seruma je od 0,66 do 1,55 mg/L. Izmjerene koncentracije nalaze se u području koje pokriva kalibracijska krivulja pa se može zaključiti da je u njima pouzdano i precizno određena koncentracija bakra u serumu koja odgovara normalnim vrijednostima bakra u organizmu.

5. Zaključci

Bakar kao jedan od elemenata u tragovima važan je u ljudskom organizmu zbog sudjelovanja u brojnim biološkim procesima. Promjena koncentracije bakra u organizmu može dovesti do izraženih patofizioloških poremećaja pa mjerenje koncentracije bakra u biološkim uzorcima ima važno mjesto u dijagnosticiranju bolesti kao što je Wilsonova bolest koja dovodi do nakupljanja bakra u jetri i mozgu te drugim organima.

Uvedena je i validirana metoda koja se može upotrijebiti za određivanje koncentracije bakra u ljudskom serumu. Validacijski parametri koji su ispitivani su: linearnost, preciznost, točnost, granica dokazivanja i granica određivanja.

Dobiveni rezultati pokazuju da je validirana metoda dovoljno pouzdana, precizna i brza za rutinsko određivanje koncentracije bakra u serumu.

6. Literatura

- Bakar, 2014., http://www.msd-prirucnici.placebo.hr, pristupljeno 17.03.2017.
- Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Francois Huneau J, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*, 2016, 35, 107-110.
- Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases, 2007., http://www.physrev.physiology.org, pristupljeno 17.03.2017.
- Introduction to AAS component parts, 2017., http://www.lab-training.com, pristupljeno 23.03.2017.
- Luterotti S, Bicanic D. Odabrane teme iz bioanalitike, 4. izdanje. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 1-3, 7-17, 28-32, 35-37.
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135-137.
- Petrak I. Kriteriji za postavljanje dijagnoze Wilsonove bolesti u pedijatrijskih bolesnika. Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015, str. 5-7
- Skoog DA, Leary JJ. Principles of Instrumental Analysis, Sauder College Publishing, Philadelphia, 1992.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. Foundamentals of analitycal chemistry 6th edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti, Živković A. Atomska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivu zračenju. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 595-620.
- Uriu-Adams JY,. Copper, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med*, 2005, 26, 268- 272, 285-286.
- Watson DG. Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str 125-132.
- Wilsonova bolest, 2014., http://www.hubpp.mef.hr, pristupljeno 23.03.2017.

7. Sažetak/Summary

Uvođenje metode za određivanje bakra u serumu primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Jedan od esencijalnih mikroelemenata iznimno važnih za razvoj ljudskog organizma je bakar koji sudjeluje u procesima antioksidativne zaštite, imunosti, eritropoeze, sinteze neuropeptida, a ima i važnu ulogu u aktivnosti redoks enzima ceruloplazmina. Promjena koncentracije bakra u organizmu može dovesti do velikog broja patofizioloških poremećaja. Povećana koncentracija bakra u organizmu uzrokovana je razvojem Wilsonove bolesti koja dovodi do smanjene ugradnje bakra u ceruloplazmin i njegovog nakupljanja u organizmu, posebice u jetri i mozgu.

Jedna od metoda koja se koristi u dijagnosticiranju Wilsonove bolesti jest mjerenje koncentracije bakra u biološkim uzorcima atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom. U ovom radu razvijena je i validirana metoda za određivanje bakra u serumu. Ispitivanja su provedena na AAS-u Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektom nespecifične površine na valnoj duljini od 324,8 nm. Analitička metoda je validirana uporabom standarda bakra koncentracija u rasponu od 0,125 do 3,0 mg/L, dobivenih razrijeđivanjem komercijalnog standarda bakra koncentracije 1000 mg/L. Dobivena je kalibracijska krivulja s jednadžbom pravca $y= 0,0118x – 1x10^{-5}$ i koefcijentom korelacije $R^2= 1$. Vrijednost relativne standardne devijacije (RSD) kojom je iskazana ponovljivost iznosi za ST1(0,1mg/L) 7,28 %, za ST4 (1,0 mg/L) 2,34 % i za ST5 (2,0 mg/L) 0,65%. Vrijednost RSD za iskazivanje srednje preciznosti za ST1 (0,1 mg/L) iznosi 14,41 %, za ST4 (1,0 mg/L) 3,35 % i za ST5 (2,0 mg/L) 1,63%. Dobivene vrijednosti pokazuju da su ponovljivost i srednja preciznost metode u granicama prihvatljivosti za RSD izuzev kod vrlo velikih razrijeđenja gdje dolazi do odstupanja. Točnost (R) za ST4 (1,0 mg/L) i ST6 (3,0 mg/L) iznosi 97,43 % i 99,30%. Granica dokazivanja (LOD) iznosi 0,004 mg/L, dok je granica određivanja (LOQ) 0,011 mg/L. Raspon koncentracije bakra mjerenih u četiri uzorka ljudskog seruma je od 0,66 do 1,55 mg/L. Uvedena i validirana analitička metoda se pokazala prikladnom za točno, precizno i brzo određivanje koncentracije bakra u ljudskom serumu.

Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Uvođenje metode za određivanje bakra u serumu primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Ivan Suša

SAŽETAK

Jedan od esencijalnih mikroelemenata iznimno važnih za razvoj ljudskog organizma je bakar koji sudjeluje u procesima antioksidativne zaštite, imunosti, eritropoeze, sinteze neuropeptida, a ima i važnu ulogu u aktivnosti redoks enzima ceruloplazmina. Promjena koncentracije bakra u organizmu može dovesti do velikog broja patofizioloških poremećaja. Povećana koncentracija bakra u organizmu uzrokovana je razvojem Wilsonove bolesti koja dovodi do smanjene ugradnje bakra u ceruloplazmin i njegovog nakupljanja u organizmu, posebice u jetri i mozgu.

Jedna od metoda koja se koristi u dijagnosticiranju Wilsonove bolesti jest mjerenje koncentracije bakra u biološkim uzorcima atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom. U ovom radu razvijena je i validirana metoda za određivanje bakra u serumu. Ispitivanja su provedena na AAS-u Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektom nespecifične površine na valnoj duljini od 324,8 nm. Analitička metoda je validirana uporabom standarda bakra koncentracija u rasponu od 0,125 do 3,0 mg/L, dobivenih razrjeđivanjem komercijalnog standarda bakra koncentracije 1000 mg/L. Dobivena je kalibracijska krivulja s jednadžbom pravca $y= 0,0118x - 1x10^{-5}$ i koefcijentom korelacije $R^2= 1$. Vrijednost relativne standardne devijacije (RSD) kojom je iskazana ponovljivost iznosi za ST1(0,1mg/L) 7,28 %, za ST4 (1,0 mg/L) 2,34 % i za ST5 (2,0 mg/L) 0,65%. Vrijednost RSD za iskazivanje srednje preciznosti za ST1 (0,1 mg/L) iznosi 14,41 %, za ST4 (1,0 mg/L) 3,35 % i za ST5 (2,0 mg/L) 1,63%. Dobivene vrijednosti pokazuju da su ponovljivost i srednja preciznost metode u granicama prihvatljivosti za RSD izuzev kod vrlo velikih razrjeđenja gdje dolazi do odstupanja. Točnost (R) za ST4 (1,0 mg/L) i ST6 (3,0 mg/L) iznosi 97,43 % i 99,30%. Granica dokazivanja (LOD) iznosi 0,004 mg/L, dok je granica određivanja (LOQ) 0,011 mg/L. Raspon koncentracije bakra mjerenih u četiri uzorka ljudskog seruma je od 0,66 do 1,55 mg/L. Uvedena i validirana analitička metoda se pokazala prikladnom za točno, precizno i brzo određivanje koncentracije bakra u ljudskom serumu.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 1 grafički prikaz, 5 tablica i 12 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Bakar, atomska apsorpcijska spektrofotometrija, validacija analitičke metode

Mentor: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

Dr. sc. Jasna Jablan, *docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, *izvanredni profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Introduction of the method for determination of copper in serum using atomic absorption spectrophotometry

Ivan Suša

SUMMARY

One of the essential microelements which is of upmost importance for the development of the human organism is copper which participates in the processes of antioxidant protection, immunity, erythropoiesis, the synthesis of neuropeptides, it also has an important role in the activity of the redox enzyme ceruloplasmin. A change in the concentration of copper in the organism can lead to a great number of pathophysiological disturbances. A higher concentration of copper in the organism is caused by the development of Wilson's disease which can hinder the incorporation of copper into ceruloplasmin and lead to its accumulation in the organism, specifically in the liver and the brain.

One of the methods used in diagnosing Wilson's disease is to measure the concentration of copper in biological samples by using the atomic absorption spectrophotometry. This paper demonstrates the development of a validated method for determining the concentration of copper in the serum. The tests were conducted on an AAS-Analyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, USA) with a deuterium correction of a nonspecific surface at a wavelength of 324.8 nm. The analytic method was validated using a copper standard with a concentration ranging from 0.125 to 3.0 mg/L, which was created by diluting the commercial standard of copper with a concentration of 1000 mg/L. A calibration curve was generated with the linear equation of y= 0,0118x – 1x10-5 and a coefficient of correlation of R2=1. The value of the relative standard deviation (RSD) for the repeatability of the value of ST1 (0.1 mg/L) is 7.28 %, ST4 (1.0 mg/L) is 2.34 % and ST5 (2.0 mg/L) is 0.65 %. The value of RSD for measuring the intermediate precision for ST1 (0.1 mg/L) is 14.41 % for ST4 (1.0 mg/L) is 3.35 % and for ST5 (2.5 mg/L) is 1.63 %. The obtained values show that the repeatability and the intermediate precision of the method are within the boundaries acceptable for RSD with the exception of deviations in the cases of extremely large dilutions. The accuracy (R) for ST4 (1.0 mg/L) and ST6 (3.0 mg/L) is 97.43 % and 99.30 %. The limit of detection (LOD) is 0.004 mg/L, while the limit of quantification (LOQ) is 0.011 mg/L. The range of the concentration of copper measured in the four samples of human serum varies from 0.66 mg/L to 1.55 mg/L. The implemented and validated analytical method proved suitable for an accurate, precise and quick determination of the concentration of copper in the human serum.

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

Thesis includes: 31 pages, 1 figure, 5 tables and 12 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Copper, atomic absorption spectrophotometry, validation of analytical method

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

Reviewers: **Suzana Inić**, **Ph.D.** *Assistant Professor* Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Jasna Jablan, **Ph.D.** *Assistant Professor* Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Ana-Marija Domjan, **Ph.D.** *Associate Professor* Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

The thesis was aceepted: May 2017.