Metode određivanja indometacina

Rajkovača, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:182:823814

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Katarina Rajkovača

Metode određivanja indometacina

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Katarina Rajkovača

Metode određivanja indometacina

Diplomski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Komentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

METODE ODREĐIVANJA INDOMETACINA

Katarina Rajkovača

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Komentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Sažetak:

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) su prvi izbor u liječenju reumatskih poremećaja te drugih degenerativnih upalnih bolesti. Postoje brojne vrste ovih lijekova, a u ovom radu je istaknut jedan od njih, indometacin. Sa svojim analgetskim, antipiretskim i protuupalnim svojstvima jedan je od najmoćnijih lijekova koji se koristi u različitim kliničkim ispitivanjima i terapijama vezanim za mehanizam blokiranja sinteze prostaglandina čime se smanjuju i uklanjaju brojna upalna stanja pacijenata. Da bi se osigurala učinkovitost i sigurnost ovoga lijeka u farmaceutskoj i kliničkoj primjeni, potrebna je određena kontrola kvalitete proizvoda. Kontrola se provodi rutinskim farmaceutskim analizama uz pomoć različitih kemijskih metoda kojima se indometacin identificira kao zasebna aktivna komponenta u višekomponentnom sustavu cjelovitog farmaceutskog oblika. Osim toga, određivanje indometacina važno je i u kliničkoj praksi, gdje se njegova koncentracija određuje iz različitih bioloških uzoraka čime se postiže kvalitetnije praćenje određene terapije. Najčešće metode za određivanje indometacina su: potenciometrija, voltametrija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), UV spektroskopija, kolorimetrija, fluorimetrija, kemiluminiscencija i imunokemijske metode (ELISA i radioimuno test). Svaka od metoda mora osigurati precizne validacijske parametre. Pri određivanju indometacina najčešće se kombiniraju dvije metode čime se postižu precizniji rezultati i sigurnija primjena u praksi.

Diplomski rad obuhvaća: 55 stranica, 27 slika, 1 tablicu, 74 literaturna navoda,

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nesteoridni protuupalni lijekovi, indometacin, farmaceutsko određivanje, kliničko određivanje

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. doc. dr. sc. Olivera Galović
4. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjenski član povjerenstva

Rad prihvaćen:

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Universitiy Study of Chemistry; Research study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

METHODS FOR INDOMETHACIN DETERMINATION

Katarina Rajkovača

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Mirela Samardžić, PhD, associate prof.

Cosupervisor: Aleksandar Sečenji, PhD, assistant prof.

Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the first choice in the treatment of rheumatic disorders and other degenerative inflammatory diseases. There are numerous types of these drugs, and one of them, indomethacin, is highlighted in this paper. With its analgetic, antipyretic and anti-inflammatory properties, it is one of the most powerful drugs used in various clinical trials and therapies related to the mechanism of blocking prostaglandin synthesis, thus reducing and eliminating many inflammatory conditions of patients. To ensure the efficacy and safety of this drug in pharmaceutical and clinical use, particular product quality control is required. Such control is performed with routine pharmaceutical analysis using various chemical methods by which indomethacin is identified as a separate active ingredient in a multicomponent system of a complete pharmaceutical form. In addition, the determination of indomethacin is important in clinical practice, where its concentration is determined in different biological samples, ensuring better monitoring of a particular therapy. The most commonly used methods for the determination of indomethacin are: potentiometry, voltammetry, high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), UV spectroscopy, colorimetry, fluorimetry, chemiluminescence and immunochemical methods (ELISA and radioimmunoassay). Each of these methods must provide precise validation parameters. For indomethacin determination, two methods are usually combined, this way more precise results and safer application in practice are achieved.

Thesis includes: 55 pages, 27 figures, 1 table, 74 references

Original in: Croatian

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, indomethacin, pharmaceutical determination, clinical determination

Reviewers:

1. Mirela Samardžić, PhD, associate prof.
2. Aleksandar Sečenji, PhD, assistant prof.
3. Olivera Galović, PhD, assistant prof.
4. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, assistant prof., alternate member of the committee

Thesis accepted:

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. INDOMETACIN 2

2.1. Farmakodinamika 3

2.2. Farmakokinetika 3

2.3. Mehanizam djelovanja 4

2.4. Indometacin na tržištu i njegova primjena 4

3. METODE I PRIMJERI ODREĐIVANJA INDOMETACINA 6

3.1. Potenciometrija 6

3.1.1. Primjeri određivanja indometacina potenciometrijom 15

3.2. Voltametrija 16

3.2.1. Primjeri određivanja indometacina voltametrijom 19

3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC 21

3.3.1. Primjeri određivanja indometacina HPLC metodom 23

3.4. Plinska kromatografija, GC 24

3.4.1. Primjeri određivanja indometacina plinskom kromatografijom 26

3.5. UV spektroskopija 27

3.5.1. Primjeri određivanja indometacina UV spektroskopijom 31

3.6. Kolorimetrija 32

3.6.1. Primjeri određivanja indometacina kolorimetrijom 35

3.7. Fluorimetrija 36

3.7.1. Primjeri određivanja indometacina fluorimetrijom 39

3.8. Kemiluminiscencija 40

3.8.1. Primjeri određivanja indometacina kemiluminiscencijom 43

3.9. Imunokemijske metode 44

3.9.1. Primjeri određivanja indometacina imunokemijskim metodama 47

3.10. Usporedba metoda određivanja indometacina 49

4. ZAKLJUČAK 50

5. LITERATURNA VRELA 51

1. UVOD

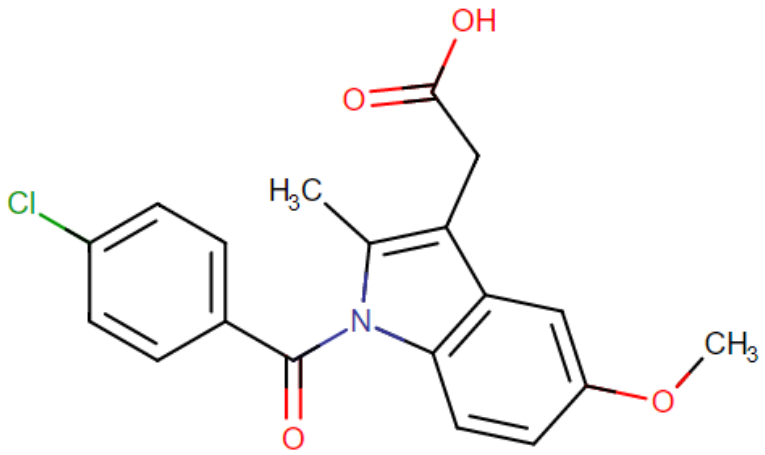
Nesteroidni protuupalni lijekovi (eng. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) su posebna skupina lijekova čiji članovi nemaju strukturnu povezanost, što znači da njihova međusobna sličnost nije određena reaktivnom skupinom [1]. Imaju analgetsko, antipiretsko i protuupalno djelovanje i prvi su izbor u terapijama reumatskih poremećaja te drugih degenerativnih upalnih bolesti. Prva zabilježena primjena tvari koja ima nesteroidni protuupalni učinak potječe iz 1500. godine prije Krista. Egipćani su prelijevali vruću vodu na osušene listove biljke mirte (*Myrtus communis L.*) te su primjenom toga pripravka uočili smanjenje reumatske boli. Uzrok tomu bila je salicilna kiselina koja tada nije bila poznata kao djelatna tvar. Sredinom 20. stoljeća dolazi do najznačajnijeg razvoja molekula s ovim svojstvima te se 1949. godine prvi puta upotrebljava naziv „non-steroidal anti-inflammatory drug“. Nesteroidni protuupalni lijekovi dijele se na derivate octene kiseline, derivate salicilne kiseline, zatim derivate propionske kiseline te fenaminske kiseline, na enolne derivate i koksibe. Mehanizam im je prvi puta opisan 1971. godine, kada je dokazano da ova vrsta lijekova inhibira biosintezu prostaglandina sprječavanjem vezanja supstrata, arahidonske kisline u aktivno mjesto enzima ciklooksigenaze [2]. Kako bi se nesteroidni protuupalni lijekovi sa sigurnošću koristili u farmaceutskoj industriji i brojnim kliničkim terapijama, potrebno je provesti njihovo određivanje u različitim vrstama uzoraka pomoću određenih kemijskih metoda [1].

Cilj rada je istaknuti načine i važnost kliničkog i farmaceutskog određivanja jednog od najjačih nesteroidnih protuupalnih lijekova, indometacina.

2. INDOMETACIN

Indometacin je nesteroidni protuupalni lijek (NSAID) s analgetskim, protuupalnim i antipiretskim svojstvima. Pripada skupini derivata indola octene kiseline, a kemijski naziv mu je 2-[1-(4-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1H-indol-3-il] octena kiselina. Molarna masa iznosi 357,788 g/mol, a molekulska formula je $C_{19}H_{16}ClNO_4$ [1]. Topljivost ovog lijeka u vodi je mala i iznosi 0,937 mg/L pri temperaturi od 25°C [3]. Struktura indometacina prikazana je na slici 1.

Lijek je prvi puta otkriven 1963. godine [4]. Nakon što je odobren, indometacin se krenuo opsežno proučavati u različitim kliničkim ispitivanjima kao jedan od najmoćnijih lijekova u blokiranju sinteze prostaglandina. Osim toga, bio je među prvim lijekovima koji su se koristili za liječenje migrene [1]. Danas se koristi u liječenju reumatoidnog artritisa, ankilozantnog spondilitisa, gihta, bolnim stanjima nakon zubarskih te kirurških zahvata, a koristi se i kod degenerativnih bolesti zglobova kao što je osteoartritis [5]. Također, u nekim kliničkim istraživanjima indometacin pokazuje pozitivan učinak na smanjenje upale oka [6].



Slika 1. Prikaz strukture indometacina [3].

2.1. Farmakodinamika

Farmakodinamika indometacina opisuje njegovo djelovanje na organizam na način da inhibira sintezu faktora koji utječu na stvaranje upale, temperature i boli. Indometacin prvenstveno djeluje na suzbijanje upale kod reumatoidnog artiritsa. Njegova učinkovitost dokazana je i kod smanjenja oteklina zglobova, čime se povećava pokretljivost, funkcionalna sposobnost i snaga kod pacijenata. Također, različita klinička ispitivanja pokazala su da indometacin liječi giht te bolna stanja nakon kirurških i zubarskih zahvata [7].

S druge strane, njegova primjena je povezana s kardiovaskularnim poremećajima koji uključuju infarkt te moždani udar. Može izazvati i negativne gastrointestinalne učinke poput krvarenja, ulceracija i slično. U usporedbi s drugim NSAID lijekovima, indometacin snažnije sužava krvne žile čime smanjuje protok krvi i inhibira reaktivnost ugljikova dioksida [7].

2.2. Farmakokinetika

Farmakokinetika ovog lijeka uključuje njegovu apsorpciju, raspodjelu, metabolizam te izlučivanje iz organizma.

Indometacin pokazuje linearnu farmakokinetiku, što znači da je koncentracija tvari u plazmi proporcionalna dozi. Brzo i lako se apsorbira u gastrointestinalnom traktu. Nakon oralne primjene, bioraspoloživost iznosi gotovo 100 %, a oko 90 % doze se apsorbira unutar četiri sata [1].

Volumen raspodjele kreće se u rasponu 0,34 - 1,57 L/kg nakon oralne, intravenske ili rektalne primjene [8]. Indometacin se veže za tkiva te prelazi krvno moždanu barijeru, a pri tome samo mali dio molekule prolazi u nevezanom, slobodnom obliku [6].

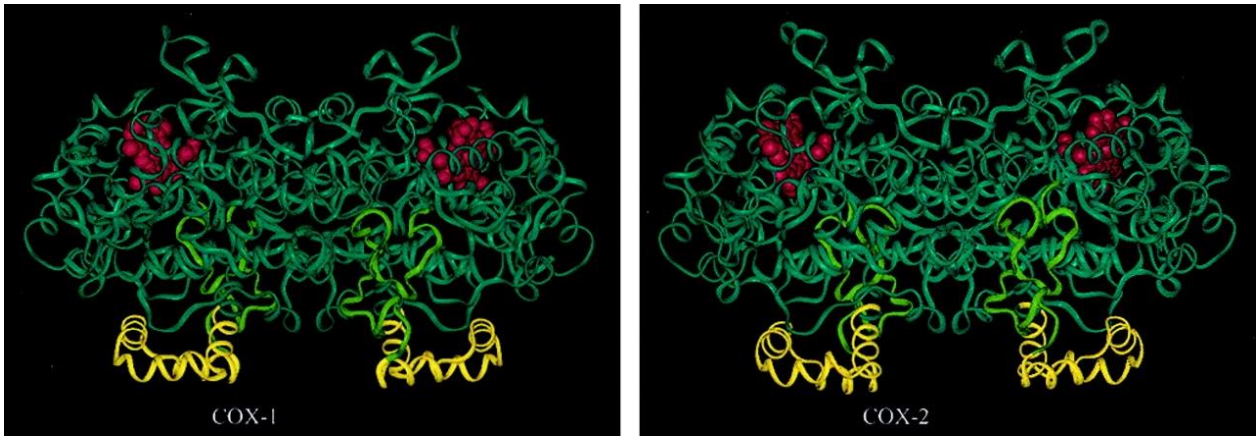
Metabolizam indometacina odvija se u jetri, konjugacijom sa glukoronskom kiselinom. Time nastaju O-dezmetil-N-dezklorobenzoil-indometacin i N-dezklorobenzoil-indometacin metaboliti te njihovi glukoronidi koji su neaktivni i nemaju nikakvo farmakološko djelovanje [5, 6].

Izlučivanje ovog lijeka odvija se putem urina, žuči ili fecesa. Urinom se izlučuje oko 60 % primijenjene doze, najčešće u glukorinidiranom obliku. Ostatak se izlučuje u nekonjugiranom obliku pomoću fecesa. Od toga iznosa, mali postotak se odnosi na izlučivanje u nepromijenjenom obliku [9].

2.3. Mehanizam djelovanja

Indometacin je reverzibilni inhibitor enzima ciklooksigenaze ili prostaglandin G/H sintaze [1]. Ciklooksigenaza je enzim koji katalizira prva dva koraka biosinteze prostaglandina preko arahidonske kiseline [10]. Prostaglandini su biološki faktori dobiveni iz arahidonske kiseline, a djeluju na mjestu nastanka, to jest lokalno i ne ulaze u krvotok. Imaju različite učinke od kojih su najvažniji: povišenje tjelesne temperature, poticanje upalne reakcije, posredovanje u osjetu boli, smanjenje ili povećanje protoka krvi, kočenje lučenja želučanog soka i tako dalje [11, 12].

U organizmu se nalaze dva izozima ciklooksigenaze (slika 2). Prvi od njih je COX-1 koji je uključen u sintezu tromboksana i prostaglandina, a prisutan je u većini tkiva u tijelu. Drugi izozim je COX-2 koji se izlučuje kao odgovor na upalu ili ozljedu. Nalazi se u maternici, bubrezima te u centralnom živčanom sustavu. Štiti bubrege, probavne sluznice i katalizira pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandin koji je zatim uključen u posredovanju temperature, upale i boli. Indometacin je inhibitor za oba izozima, ali jače djeluje na izozim COX-1 [1, 3].



Slika 2. Prikaz izozima (COX-1 i COX-2) ciklooksigenaze [13].

Glavni korak mehanizma je vezanje lijeka na aktivno mjesto ciklooksigenaze čime se sprječava interakcija enzima i molekule arahidonske kiseline [11, 12]. Također, postoje i brojna stanja gdje mehanizam indometacina nije u potpunosti razumljiv. Ova činjenica potiče brojne znanstvenike na nova otkrića koja će imati veliku primjenu u farmaciji te medicini [3].

2.4. Indometacin na tržištu i njegova primjena

Indometacin se na tržištu može pronaći i pod drugim imenima kao što su: „Indoxen“, „Indolar“, „Indocin“, „Indoflex“ te brojni drugi nazivi. Najčešći oblik ovog lijeka su kapsule

koje se primjenjuju oralno. Osim kapsula, dostupne su i otopine kapi za oftamološku primjenu, zatim krema, kožni sprej, prašak za injekcijsku otopinu te supozitoriji [3].

Primjena indometacina može biti: oralna, oftamološka, intravenozna, vanjska i lokalna (koža) te rektalna. Prilikom bilo koje od prethodno navedenih primjena, važno je znati u kojim slučajevima nije dozvoljen unos lijeka u organizam. Najčešće se radi o alergijama na nesteroidne upalne lijekove ili na određene sastojke ovog lijeka. Zato je prije svake uporabe potrebno pročitati uputu o lijeku te tome prilagoditi način liječenja i izbjeći moguće nuspojave. Neke od njih su: oticanje lica, osip, poremećaji stvaranja krvnih stanica, ubrzani srčani ritam, prestanak toka žuči, povišena koncentracija ureje i glukoze u krvi te brojne druge nuspojave [14].

Nadalje, pretjerana konzumacija indometacina dovodi do predoziranosti pacijenta te toksičnosti lijeka. Nuspojave uzrokovane predoziranjem su: povraćanje, glavobolja, mučnina, malaksalost, vrtoglavica, bolovi u trbuhu, zujanje u ušima, nesvjestica te krvarenje iz probavnog sustava [14]. U takvim slučajevima, pacijentu je potrebno isprazniti želudac ispiranjem ili izazvanim povraćanjem [3].

3. METODE I PRIMJERI ODREĐIVANJA INDOMETACINA

Kontrola lijekova je veliki izazov u cijelom svijetu. Da bi lijek bio siguran i učinkovit, mora se izvršiti određena kontrola kvalitete [15]. Glavni izazov pri kontroli lijekova je taj što su objekti analize višekomponentni sustavi. Upravo zbog toga, njihovo utvrđivanje uključuje odvajanje i identifikaciju aktivne komponente iz cjelovitog farmaceutskog oblika [16]. Osim u farmaceutskoj analizi, određivanje lijekova jednako je važno i u kliničkoj praksi gdje se aktivne tvari određuju iz različitih uzoraka kao što su krv, plazma, serum ili urin pacijenata. Na taj način se dobivaju određeni podaci o koncentracijama lijeka koji se dalje koriste kako bi se pravilno odredila ili pratila određena terapija. Najčešće metode u postupku određivanja lijekova su spektroskopske, kromatografske, potenciometrijske, voltametrijske i imunokemijske metode [15].

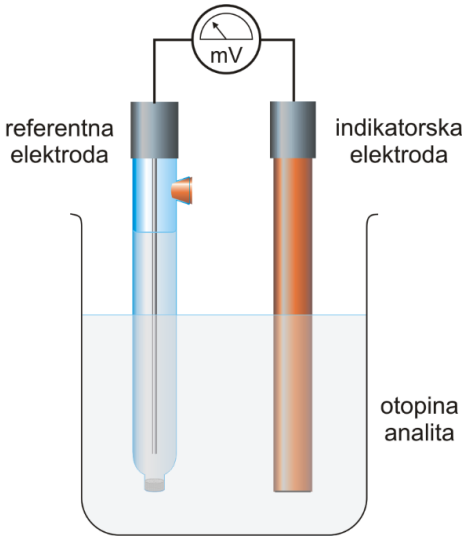
U ovom radu opisano je farmaceutsko i kliničko određivanje lijeka indometacina pomoću sljedećih metoda: potenciometrije, voltametrije, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC), plinske kromatografije (eng. *Gas chromatography*, GC), UV spektroskopije (eng. *Ultraviolet-visible spectroscopy)*, kolorimetrije, fluorimetrije, kemiluminiscencije i imunokemijskih metoda (test enzimski povezane imunosorpcije, ELISA i radioimuno test).

3.1. Potenciometrija

Potenciometrija je elektroanalitička metoda kod koje se podatak o određivanoj molekulskoj vrsti dobiva na temelju električnog potencijala. Mjeri se razlika potencijala između indikatorske i referentne elektrode koje zajedno čine galvanski članak prikazan na slici 3. Izmjereni potencijal je proporcionalan logaritmu aktiviteta analita u čiju je otopinu elektroda uronjena. Mjerenja se izvode u ravnotežnim uvjetima, što znači da kroz sustav mora teći toliko mala struja koja neće utjecati na stanje ravnoteže na elektrodama [17].

Kao što je prethodno spomento, sustav se sastoji od dvije elektrode. Referentna elektroda je elektroda koja ima stalan i poznat potencijal. Takav potencijal ne ovisi o koncentraciji analita ili drugih iona u otopini. Najpoznatija univerzalna referentna elektroda je standardna vodikova elektroda s potencijalom 0,0 V. Zbog praktičnosti, ona se zamjenjuje sa sekundarnim referentnim elektrodama (kalomelova i srebro/srebrov klorid elektroda). Potencijali sekundarnih elektroda određeni su u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu. Indikatorska elektroda je elektroda čiji se potencijal mijenja i ovisi o aktivitetu analita. Idealna indikatorska elektroda daje visoko selektivan odziv na ione analita, a nagla promjena

potencijala označava završnu točku titracije. U idealnim slučajevima odziv bi trebao biti brz i reproducibilan. Razlikuju se dvije vrste indikatorskih elektroda: metalne i membranske. Kod metalnih elektroda razlika potencijala je rezultat redoks reakcije, a kod membranskih je rezultat prijenosa naboja između otopine analita i izmjenjivačke tvari u membrani [17, 18].



Slika 3. Prikaz galvanskog članka s referentnom i indikatorskom elektrodom [19].

Elektromotorna sila galvanskog članka sastavljenog od standardne vodikove elektrode (anode) i druge mjerne elektrode (katode) naziva se elektrodnim potencijalom. On se određuje tako što se vrijednost elektrodnog potencijala katode (E_K) umanji za iznos elektrodnog potencijala anode (E_A) te uveća za iznos kontaktnog potencijala ($E_{kon.}$) prema jednadžbi 1:

$$E_{ćelije} = E_K - E_A + E_{kon.} \quad (1).$$

Kontaktni potencijal nastaje na granici između dva elektrolita, odnosno prilikom migracije iona iz područja veće u područje manje koncentracije [17, 20].

Nadalje, potrebno je razumjeti pojam aktiviteta iona. Aktivitet je djelotvorna koncentracija iona u sustavu koji nije idealan. Djelotvorna koncentracija je u većini slučajeva manja od stvarne koncentracije iona u otopini. Aktivitet (a) je povezan s molarnom koncentracijom (c) preko koeficijenta aktiviteta (f) prema jednadžbi 2:

$$a = c \cdot f \quad (2).$$

Koeficijent (*f*) predstavlja funkciju ukupne količine aktiviteta analita. U razrijeđenim otopinama njegova vrijednost teži prema 1, dok u idealnim uvjetima postiže tu vrijednost što znači da je aktivitet iona jednak njegovoj stvarnoj koncentraciji [17, 18].

Matematički izraz koji povezuje aktivitet iona i potencijal između indikatorske i referentne elektrode opisan je Nernstovim izrazom koji je prikazan jednadžbom 3 [20, 21]:

$$E = E^0 + \frac{2.303RT}{zF} loga \quad (3)$$

gdje je:

E – potencijal elektrode

E^0 – standardni elektrodni potencijal

R – plinska konstanta, 8.314 JK^{-1} mol^{-1}

T – apsolutna temperatura [K]

z – broj izmijenjenih elektrona

F – Faradayeva konstanta, 96 487 $Cmol^{-1}$

a – aktivitet iona.

Izraz u razlomku (jednadžba 4) koji se nalazi ispred logaritma u Nernstovoj jednadžbi, predstavlja teoretski nagib elektrode. Pri standardnoj temperaturi (T = 298 K) njegova vrijednost je 0,059 V.

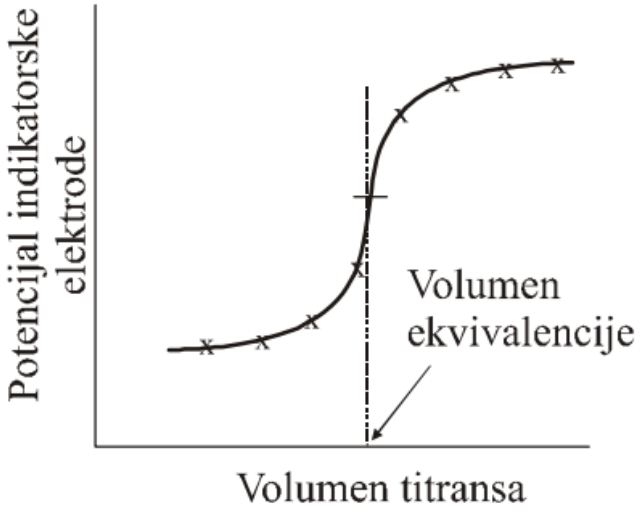
$$S = \frac{2.303RT}{zF} \quad (4).$$

Nernstova jednadžba direktno ovisi o temperaturi, zbog čega se taj podatak mora uzimati u izračune prilikom mjerenja. Također, važno je napomenuti da Nernstov izraz vrijedi pri idealnim uvjetima gdje elektroda ima odziv na samo jednu vrstu iona [18, 22].

Nadalje, potenciometrijska mjerenja dijele se na potenciometrijsku titraciju i direktnu potenciometriju.

Potenciometrijska titracija je volumetrijska metoda koja se temelji na mjerenju elektrodnog potencijala mjerne elektrode kao funkcije dodanog volumena standardne otopine, titranta [23]. Titrant sadrži molekulsku vrstu koja kemijski reagira s određivanom tvari u ćeliji. Rezultat takve kemijske reakcije je promjena aktiviteta određivane molekulske

vrste te potencijala indikatorske elektrode [20, 23]. Uređaj koji se koristi za automatsko izvođenje potenciometrijske titracije naziva se automatski titrator (titrigraf, potenciograf). Uređaj mjeri volumen titranta i zapisuje promjenu potencijala indikatorske elektrode u ovisnosti o volumenu dodanog titranta [21]. Zapisana promjena prikazuje se u obliku titracijske krivulje koja ima sigmoidalan oblik (slika 4). Dio diferencijalne krivulje ($\Delta E/\Delta V$) na kojem se vidi najveća promjena potencijala naziva se točka ekvivalencije. Visina skoka će ovisiti o koncetraciji aktivnih iona, što je manja koncentracija, to je manji skok potencijala. Ovakvo instrumentalno određivanje točke ekvivalencije je puno točnije i pouzdanije od indikatorskog određivanja [20, 21, 23].



Slika 4. Prikaz titracijske krivulje [21].

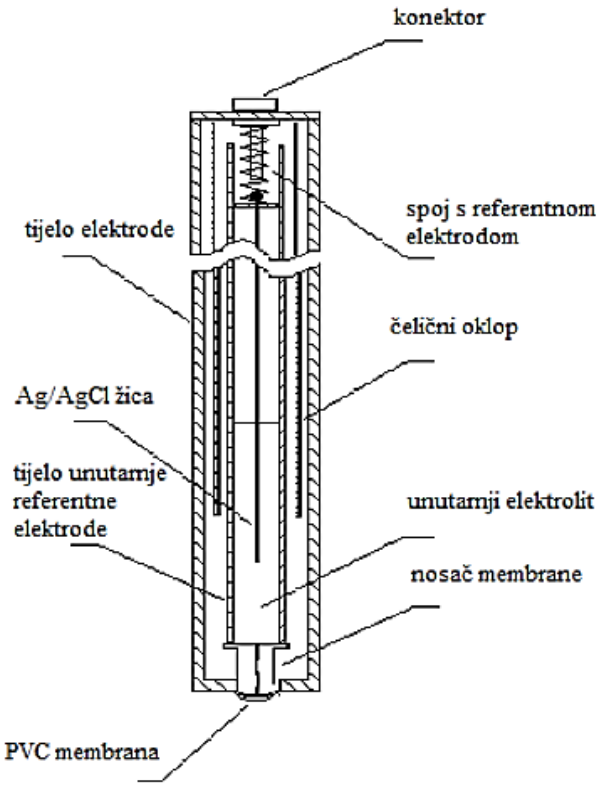
Direktna (izravna) potenciometrija se temelji na mjerenju potencijala indikatorske elektrode koja je uronjena u ispitivanu otopinu te otopinu koja sadrži poznatu koncentraciju analita [17]. Dakle, potencijal ćelije je ovisan samo o aktivitetu ionske vrste na koju je indikatorska elektroda osjetljiva. Prije svega, potrebno je pripremiti seriju otopina različitih koncentracija i izmjeriti potencijal tih otopina. Nadalje, konstruira se baždarni dijagram te se iz linearnog dijela krivulje određuje nepoznati aktivitet [21].

Aktiviteti brojnih ionskih vrsta određuju se pomoću ionsko-selektivne elektrode (ISE) koja predstavlja elektrokemijski senzor [24]. Ova vrsta elektroda ima selektivan odziv na određenu vrstu iona u ispitivanoj otopini analita [20]. Veliki značaj dobivaju šezdesetih godina dvadesetog stoljeća kada je otkrivena njihova primjena u analizi metala u tragovima u okolišu. Kao takve, postaju vrlo brzo prihvaćene u analitičkoj kemiji, a i u širim područjima [25]. ISE imaju sve karakteristike koje jedan kemijski senzor mora imati, a to su: pretvaranje

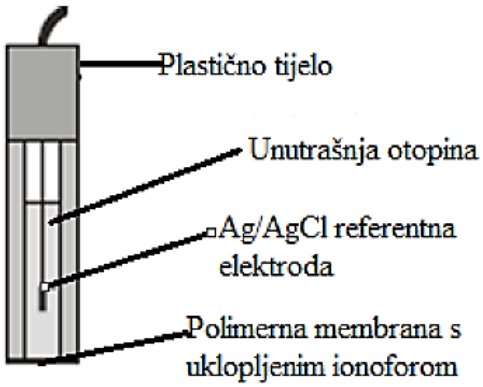
kemijske veličine u električni signal, brz odziv, rad kroz duži vremenski period, mala veličina i niska cijena [26]. Osim toga, imaju i brojne druge prednosti, a to su: jednostavna aparatura,brza i jednostavna mjerenja, ekonomičnost, široko koncentracijsko područje mjerenja, dobivanje informacija u realnom vremenu, moguće ih je minijaturizirati, niska granica detekcije i visoka osjetljivost, mala potrošnja kemikalija, veliki temperaturni interval (0 °C-80 °C), pogodne su za određivanje aniona i kationa, a do danas je moguće odrediti više od šezdeset različitih iona primjenom ove vrste elektrode [27]. S druge strane, ISE imaju i neke nedostatke. Jedna od njih je ta da interferencije drugih kemijskih vrsta mogu biti manje ili veće što se mora naglasiti u pratećoj dokumentaciji. Drugi nedostatak je da elektrode uglavnom ne mjere ukupnu koncentraciju nekog iona u svim njegovim oblicima u otopini [28].

Najvažniji dio ionsko-selektivne elektrode je membrana. Ona je osnova svakog potenciometrijskog senzora. Glavni zadatak svake membrane je određivanje karakteristika senzora i ponašanja prema određenim ionima koji se nalaze u otopini [25]. Prema sastavu membrane ISE se dijele u dvije skupine, a to su elektrode sa čvrstom membranom i elektrode s ionsko-izmjenjivačkom membranom. Prvoj skupini pripadaju elektrode čija je membrana sastavljena od jedne ili više kristaliničnih tvari u obliku monokristala. Kristalna tvar je ionski vodič struje, a potencijal takve vrste membrane ovisi o koncentraciji iona, prenosioca naboja uz njenu površinu. Drugoj skupini pripadaju elektrode čija membrana sadrži tvar koja ima sposobnost izmjene iona. Može biti izrađena od posebne vrste stakla (staklena elektroda) ili od organske tvari otopljene u pogodnom otapalu vezanom u plastičnu osnovu (poli(vinil-klorid), PVC). Potencijal ionsko-izmjenjivačkih membrana određen je izmjenom iona između iona iz otopine i iona vezanih na izmjenjivačku tvar u membrani [29]. Na slici 5 prikazana je ionsko-selektivna elektroda s ionsko-izmjenjivačkom membranom. U brojnim istraživanjima, najčešće se primjenjuje ISE s polimernom membranom, a prikazana je na slici 6. Svaka polimerna ionsko-selektivna membrana sastoji se od:

- ionofora (glavna komponenta koja omogućava reverzibilno i selektivno vezanje određenog iona čime se određuje selektivnost membrane, neutralni ili nabijeni spojevi),
- plastifikatora (osigurava mobilnost iona u membrani, ne smije otapati membranu, mora biti lipofilan te mora omogućiti konstantnu viskoznost membrane),
- lipofilnih iona (poboljšavaju selektivnost membrane),
- polimera (nalazi se u homogenim membranskim matricama) [20, 25, 27].



Slika 5. Prikaz ionsko-selektivne elektrode s ionsko-izmjenjivačkom membranom [29].

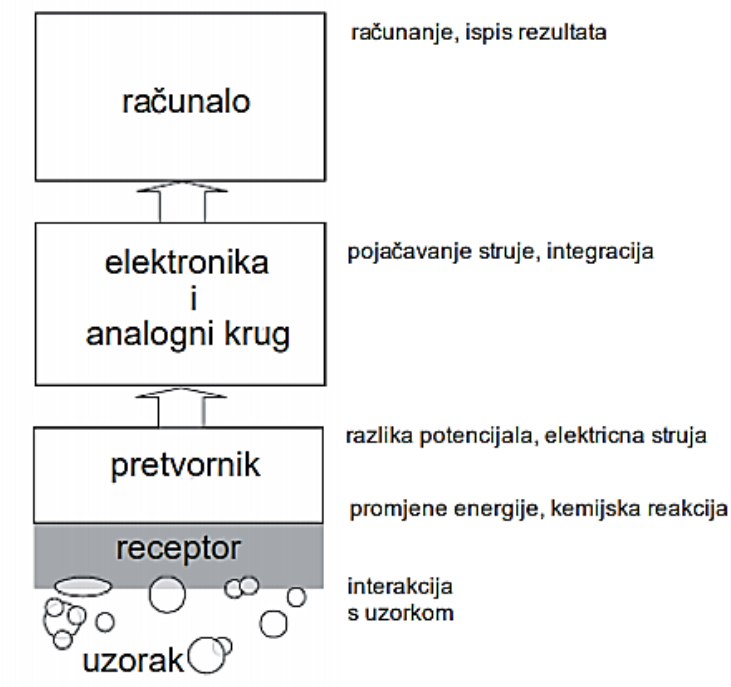


Slika 6. Prikaz ionsko-selektivne elektrode s polimernom membranom [21].

Potenciometrijski senzor je vrsta elektrokemijskog senzora kod kojeg je promjena elektrodnog potencijala u funkciji koncentracije analita [18]. Svaki potenciometrijski senzor sadrži aktivnu tvar (receptor ili element za prepoznavanje) koja je osjetljiva na određenu kemijsku vrstu. Prilikom interakcije analita i receptora dolazi do promjene elektrodnog

potencijala koju pretvornik pretvara u mjerljivi izlazni signal. Dobre osobine ove vrste senzora postižu se ispravnim odabirom pretvornika i receptora [18, 25]. Shema senzorskog sustava prikazana je na slici 7.

Potenciometrijski senzori imaju široku primjenu u poljoprivredi, kliničkoj analitici, industriji te u analitici zaštite okoliša. Vrlo su osjetljivi, jednostavni i relativno jeftini [18, 25].



Slika 7. Shema senzorkog sustava [25].

Osnovne osobine senzora su: mjerno (radno) područje, područje linearnosti, dinamičko područje, granica detekcije i kvantifikacije, selektivnost, vrijeme odziva, vrsta otopine (elektrolita) u kojoj se provodi mjerenje, točnost i preciznost, relaksacija senzora i radni vijek (vrijeme trajanja).

a) Mjerno (radno) područje

Mjerno područje je područje unutar kojeg je promjena signala senzora u ovisnosti o promatranom svojstvu ispitivanog analita (topljivost, koncentracija, površinska napetost i tako dalje) [18]. Ono predstavlja raspon između gornje i donje koncentracije analita unutar kojeg senzor ima prihvatljivu preciznost, točnost, linearnost te Nernstov nagib [30].

b) Područje linearnosti

Linearnost predstavlja mogućnost senzora da unutar određenog koncentracijskog područja daje odziv proporcionalan koncentraciji analita u uzorku. Mjerenja se provode na pet različitih koncentracija u željenom radnom području metode. Pri temperaturi od 298 K, nagib linearnog dijela kalibracijske krivulje za jednovalentne ione iznosi 59,16 mV, a za dvovalentne ione ta je vrijednost 29,58 mV. Pri pojavi vrlo malih ili velikih aktiviteta dolazi do odstupanja od linearnosti. To je područje u kojem elektroda gubi osjetljivost za primarni ion [30].

Linearnost se može odrediti matematički i grafički prema jednadžbi 5:

$$y = ax + b \tag{5}$$

gdje je:

y – mjereni parametar

a – nagib pravca

x – koncentracija

b – odsječak na ordinati.

c) Dinamičko područje

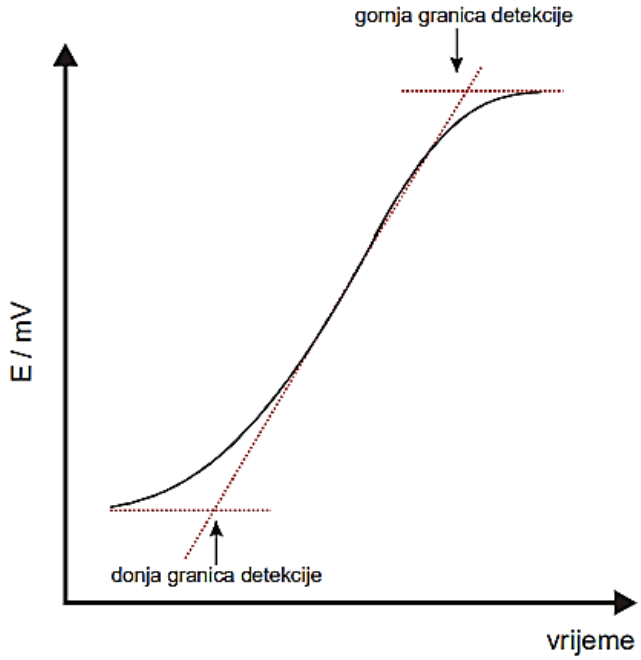
Dinamičko područje je jednako razlici maksimalnog i minimalnog aktiviteta zauzetih veznih mjesta (a_{RX_m}) u membrani. To je područje u kojem senzor daje odzivni signal [21].

Računa se prema jednadžbi 6 [21]:

dinamičko područje = (a_{RX_m})maks.-(a_{RX_m})min (6).

d) Granice detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije predstavlja najmanju količinu analita koju je moguće odrediti. Ako je koncentracija ispitivanog iona niska, tada dolazi do pojave donje granice detekcije i odstupanja od Nernstovog nagiba pravca. Uzrok tome može biti prisustvo intereferirajućih iona ili ako tekuća membrana zahtjeva zamjenu. Gornja granica detekcije, odnosno povećanje nagiba pravca nastaje uslijed povećanja temperature [30]. Na slici 8 prikazane su donja i gornja granica detekcije.



Slika 8. Prikaz donje i gornje granice detekcije [25].

Granica kvantifikacije je najmanja količina analita koja se može kvantitativno odrediti. [30].

e) Selektivnost

Selektivnost predstavlja mogućnost određivanja analita u prisutnosti drugih smetajućih ionskih vrsta koji utječu na odzivni signal. Selektivnom metodom moguće je odrediti više komponenti istodobno, uz uvjet da komponente ne smetaju jedna drugoj [21].

f) Vrijeme odziva

Vrijeme odziva je vrijeme koje protekne od trenutka prvog kontakta indikatorske i referentne elektrode s otopinom ili od trenutka promjene koncentracije primarnog iona do trenutka u kojem je potencijal dosegao više od 90 % konačne vrijednosti ili se ne mijenja više od 1 mV. Vrijeme odziva ovisi o temperaturi, tipu elektrode, smetnjama te o veličini i smjeru promjena koncentracije [31].

g) Vrsta otopine (elektrolita) u kojoj se provodi mjerenje

Postoji niz različitih uvjeta koji utječu na vrstu otopine, a time i na sam rad senzora. Neki od najvažnijih uvjeta koji se prate u mjerenjima su temperatura, pH vrijednost i ionska jakost [18].

h) Točnost i preciznost

Točnost je mjera odstupanja eksperimentalnih rezultata od očekivanih vrijednosti, odnosno slaganje između točne prihvaćene referentne i izmjerene vrijednosti. Kod točnih mjerenja, podaci moraju biti unutar ± 5 % [18].

Preciznost se definira kao stupanj podudaranja više nezavisnih ispitnih rezultata izvedenih iz istog homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Ako nije prisutna sustavna pogreška, rasipanje rezultata posljedica je slučajne pogreške [18].

Pogreška se može izračunati prema jednadžbi 7 [18]:

$$pogreška(\%) = \frac{dobiveni\ rezultat - očekivani\ rezultat}{očekivani\ rezultat} \times 100 \quad (7).$$

i) Relaksacija senzora

Relaksacija senzora je vrijeme koje mora proteći da bi senzor bio spreman za novo mjerenje. To vrijeme ne smije biti duže od nekoliko minuta [18].

j) Radni vijek (vrijeme trajanja)

Radni vijek senzora određen je stabilnošću elementa za prepoznavanje. Za biološke materijale ovo vrijeme uglavnom traje samo nekoliko dana, ali često i nekoliko mjeseci ili duže [18].

3.1.1. Primjeri određivanja indometacina potenciometrijom

Znanstvenici J. Lenik i C. Wardak su svojim znanstvenim istraživanjem opisali određivanje indometacina potenciometrijskim senzorom. Glavni dio takvog senzora bila je ionsko-selektivna elektroda s ionsko-izmjenjivačkom polimernom membranom na bazi indometacina. U prvom koraku su pripremili ionski par, tetraoktilamonijev 1-(p-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-3-indolilacetat (INDO-TOA). Ionski par dobili su izmjenom iona, postupkom ekstrakcije indometacina (aniona) iz vodene u organsku fazu u kojoj je bio otopljen kation (tetraoktil amonijev klorid). Koncentracija indometacina u vodenoj fazi bila je $1 \cdot 10^{-2}$ mol/L. Nakon izolacije, malu količinu ionskog para su pomiješali s plastifikatorom (PVC) te izlili smjesu. Izrezali su membranu i postavili ju na tijelo elektrode. Kalibracijsku krivulju dobili su iz otopina glavnog iona i interferirajućih iona pri pH 8 u rasponu koncentracija od 10^{-2} do 10^{-6} mol/L. Mjerenja su uključivala određivanje osnovnih parametara senzora te određivanje indometacina u realnom sustavu (farmaceutski pripravak "Metindol Retard"-ICN Polfa Rzeszów SA, Poljska). Mjerenjem su dobili široki

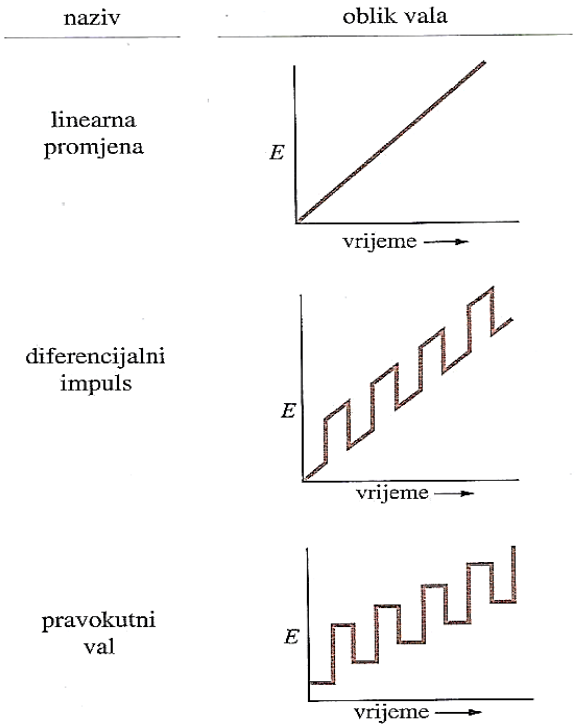
linearni raspon, $1 \cdot 10^{-5}$-$1 \cdot 10^{-2}$ mol/L s koeficijentom korelacije 0,9980. Granica detekcije iznosila je $3.16 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Nadalje, vrijeme odziva elektrode bilo je 12 sekundi u rasponu pH od 6 do 10. Nagib je iznosio -59,8 mV, a radni vijek senzora dva mjeseca. Najbolju selektivnost senzor je pokazivao prema kloridnim, sulfatnim, nitratnim i tartaratnim ionima. Pri određivanju indometacina u realnom sustavu, odstupanje je iznosilo 0,8-2,5 %, a preciznost 0,8 – 5,5 %. Prema prethodno navedenim podacima, može se vidjeti kako su ovi znanstvenici uspješno razvili senzor za određivanje indometacina [15].

Sličan primjer potenciometrijskog senzora s polimernom membranom napravila su trojica znanstvenika iz Ukrajine i Slovačke. U prvom koraku su pripremili ionski par tako da su pomiješali jednake količine indometacina ($1 \cdot 10^{-2}$ mol/L) i rodamina B ($1 \cdot 10^{-2}$ mol/L), otopinu su ostavili dva sata nakon čega se pojavio talog. Talog su zatim filtrirali i ostavili da se suši 24 sata pri sobnoj temperaturi. Zatim su pripremili membranu tako da su pomiješali određene količine ionskog para i PVC u cikloheksanonu. Smjesu su ostavili na sobnoj temperaturi, a nakon što je otapalo isparilo, izrezali su membranu i postavili na tijelo elektrode. Realni sustav sastojao se od farmaceutskih pripravaka na bazi indometacina (tablete, gel i čepići) . Pripremili su osnovnu otopinu indometacina ($5 \cdot 10^{-2}$ mol/L) u etanolu iz koje su razređenjem s vodom napravili standardne otopine ($5 \cdot 10^{-6}$-$5 \cdot 10^{-2}$ mol/L) te ispitali odzivne karakteristike senzora. Dobili su linearni raspon $1 \cdot 10^{-4}$ do $5 \cdot 10^{-2}$ mol/L, granica detekcija iznosila je $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L, a nagib 60 mV. Primjenjivost elektrode bila je u rasponu pH od 6 do 10. Elektroda je postigla ravnotežni odziv za 2 do 3 sata, a mogla se koristiti 16 do 20 tjedana za više od 100 mjerenja. Također, senzor je pokazao visok koeficijent selektivnosti prema različitim vrstama iona kao što su kloridni, bromidni, nitratni, tiocijantni i brojni drugi ioni. Dobiveni podaci pružaju dokaz da se razvijeni senzor može koristiti za precizno i učinkovito ispitivanje količine indometacina u farmaceutskim pripravcima [16].

3.2. Voltametrija

Voltametrija obuhvaća skupinu elektroanalitičkih metoda kod kojih se podaci o analitu dobivaju mjerenjem jakosti struje u ovisnosti o priključenom naponu pri uvjetima koji uzrokuju polarizaciju neke indikatorske ili radne elektrode. Razvila se iz polarografije, a koristi se u kemijskim, biološkim te fizikalnim istraživanjima. Pomoću voltametrije se proučavaju procesi oksidacije i redukcije, adsorpcijski procesi i procesi prijenosa elektrona [32].

Pobudni signal u voltametriji je promjenjivi potencijal koji se dovodi na elektrokemijski članak koji sadrži mikroelektrodu. Postoje dvije vrste pobudnog signala iz kojih se definiraju različite vrste voltametrije. Prvi je linearni pobudni signal kod kojeg se istosmjerni potencijal priključen na članak povećava linearno s vremenom. Jakost struje koja se pojavljuje u članku bilježi se u ovisnosti o vremenu. Druga vrsta signala je impulsni pobudni signal kod kojeg se struje mjere u različitim vremenima tijekom trajanja impulsa pri čemu nastaje diferencijalni impuls ili pravokutni val [32]. Na slici 9 prikazane su vrste pobudnog signala i oblik vala.

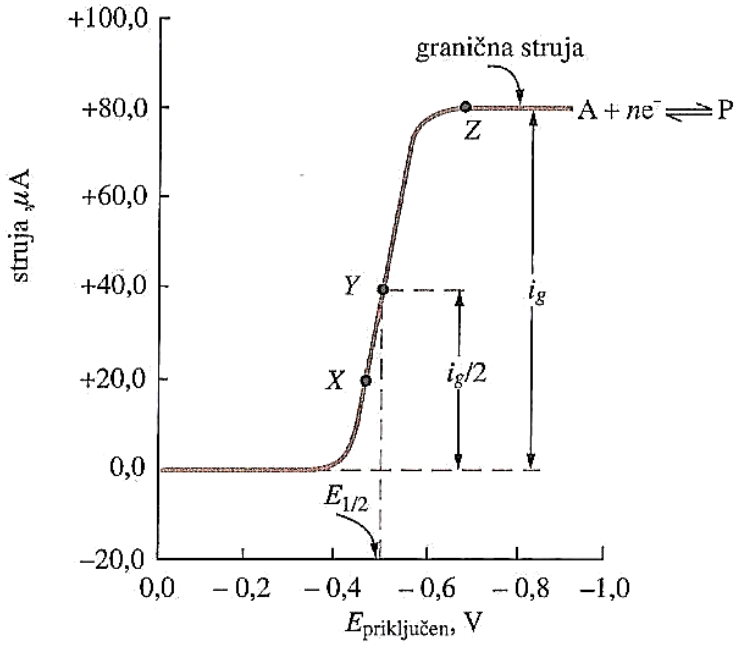


Slika 9. Pobudni signali u voltametriji [17].

Voltametrijski sustav se sastoji od tri elektrode koje su uronjene u otopinu analita i inertnog elektrolita koji ne reagira. Troelektrodni sustav uključuje radnu elektrodu (mikroelektroda) čiji se potencijal mijenja s vremenom, zatim referentnu elektrodu čiji je potencijal stalan (Ag/AgCl elektroda ili kalomelova elektroda) i protuelektrodu (najčešće platinska žica) koja omogućuje tok struje od izvora kroz otopinu pa sve do mikroelektrode. Važan je izbor mikroelektroda a to su radne elektrode s površinama manjim od nekoliko kvadratnih milimetara. Najčešće su u obliku pločastih diskova izrađenih od vodiča (inertna kovina) koji su utisnuti u štapić (najčešće od teflona). U voltametriji se najčešće primjenjuju živine

mikroelektrode zbog razmjerno velikog područja negativnog potencijala te brzog i jednostavnog nastanka svježe metalne površine [32].

Odzivni signal voltametrije se prikazuje pomoću voltamograma koji je prikazan na slici 10. On grafički prikazuje odnos struje i potencijala te daje informaciju o koncentraciji analizirane tvari. Najčešće ima oblik sigmoidalne krivulje (voltametrijski val). Na voltamogramu je važno istaknuti poluvalni potencijal ($E_{1/2}$) te graničnu struju (i_g). Poluvalni potencijal je potencijal u kojem je struja jednaka polovici vrijednosti granične struje i ponekad se koristi za dokazivanje sastojaka u otopini. Granična struja je stalna struja iza strmog rasta i razmjerna je koncentraciji reagensa. Nagib grafa potencijala (pobude) u odnosu na vrijeme naziva se brzina skeniranja [32].



Slika 10. Voltamogram s linearnom promjenom potencijala [17].

Voltametrijske metode se dijele na: voltametriju s linearnom promjenom potencijala, cikličku voltametriju, voltametriju s pravokutnim naponskim impulsom pobude i voltametriju uz prisilnu konvekciju [32].

Voltametrija s linearnom promjenom potencijala je najstarija i najjednostavnija voltametrijska metoda. Na početku procesa kroz ćeliju protječe samo osnovna struja pri potencijalu koji je znatno pozitivniji od formalnog elektrodnog potencijala redoks sustava elektroaktivne vrste. Negativiranjem potencijala elektrode, raste i brzina elektrodne reakcije redukcije. Kada brzina redukcije znatno poraste, tada počinje teći mjerljiva struja ćelije i

formira se uzlazni dio voltamograma. Uslijed redukcije oksidansa, opada njegova koncentracija uz površinu elektrode što rezultira difuzijom oksidansa iz otopine prema površini elektrode. Reducens koji je nastao redukcijom, difundira s površine u otopinu. Kada potencijal dostigne dovoljno negativnu vrijednost, dolazi do trenutne redukcije svih oksidansa pristiglih difuzijom i tada struja odziva ima maksimalnu vrijednost. Kako se oksidans sve više iscrpljuje, brzina difuzije opada i dolazi do smanjenja struje odziva nakon čega ona postiže stalnu vrijednost (granična struja) [32].

Ciklička voltametrija (CV) je često korištena elektroanalitička metoda zbog mogućnosti karakterizacije redoks sustava od makroskopskih razmjera pa do nanoelektroda. Slična je voltametriji s linearnom promjenom potencijala, ali se kod cikličke voltametrije potencijal mijenja od početnog do krajnjeg potencijala, a zatim se obrće od krajnjeg potencijala nazad do početnog. Potencijal elektrode se linearno povećava u odnosu na vrijeme u cikličkim fazama koje se mogu ponavljati onoliko puta koliko je potrebno. Signal pobude prvo linearno raste (oksidacija), nakon što dosegne izabranu vrijednost, promijeni se smjer promjene (posmik) potencijala pri čemu dolazi do redukcije produkta. Zatim se u signalu odziva formira anodni i katodni vrh (pik), a oblik signala odziva u povratnom posmiku potencijala ovisi o potencijalu pri kojem se obavlja promjena smjera [32].

Pulsna voltametrija je metoda kod koje se ne koriste linearne promjene potencijala s vremenom nego stupnjevite promjene potencijala (pulsevi) s vremenom. U svakom ciklusu mjere se dvije struje, prije (S_1) i na kraju pulsa (S_2). Razlika tih struja je razmjerna koncentraciji analita i unosi se u dijagram kako bi se dobio voltamogram. Potencijal maksimuma krivulje odgovara voltametrijskom poluvalnom potencijalu, a granice detekcije su od 10^{-7} mol/L do 10^{-8} mol/L. Dvije su vrste pulsne voltametrije, diferencijalna pulsna voltametrija i voltametrija s pravokutnim valom [32].

Voltametrija uz prisilnu konvekciju je voltametrijska metoda kod koje se prijenos elektroaktivnih čestica odvija difuzijom i konvekcijom. Difuzija se odvija u mirnom sloju otopine uz elektrodu, a konvekcija u dijelu otopine koji je udaljen od elektrode. Povećan tok elektroaktivnih čestica dovodi do veće struje, a time se povećava i osjetljivost mjerenja [32].

3.2.1. Primjeri određivanja indometacina voltametrijom

Jedno od najnovijih istraživanja je pokazalo kako se uz male troškove može razviti visoko osjetljiva i jednostavna voltametrijska metoda za određivanje indometacina iz plazme štakora. Prvi korak je bila priprema uzorka te otopina, pripremljena je osnovna otopina

indometacina (1000 μg/mL) iz koje su zatim pripremljene razrijeđene otopine koje su korištene za kalibracijski pravac. Uzorak su pripremili tako što su 200 μL plazme dodali u različite alikvote razrijeđene otopine indometacina te su lijek odvojili ekstrakcijom. Dobivene količine indometacina su premjestili u volumetrijske tikvice i nadopunili ih s Britton-Robinson (fosforna, octena i borna kiselina) puferom (pH 5). Pripremljene uzorke su zatim analizirali diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Za mjerenje su koristili živinu kapajuću elektrodu s maksimalnom veličinom kapi 9 mm^2, puls amplitude bio je 0,1 V, a optimalno vrijeme pulsa bilo je 0,01 s. Područje mjerenog potencijala na voltamogramu bilo je od 0 V do -1,6 V s brzinom skeniranja 59,5 mV/s. Katodni pik dobiven je pri potencijalu od -1,1 V. Za referentnu elektrodu su koristili Ag/AgCl elektrodu, a pomoćna je bila platinska žica. Nadalje, znanstvenici su proučavali utjecaj pH vrijednosti u rasponu 3-10 te su zaključili da se intenzitet struje smanjuje pri višim pH vrijednostima te da može doći do razgradnje lijeka. U slučaju indometacina, maksimalan odziv struje bio je pri pH 5 što je posljedica redukcije karbonilne skupine. Validacijom metode dobiveni su sljedeći rezultati: linearna kalibracijska krivulja u rasponu 0,2-1,2 μg/mL s koeficijentom korelacije većim od 0,9986, relativno standardno odstupanje bilo je niže od 4,87 %, iskorištenje je iznosilo 85-90 %, pronađena koncentracija indometacina iz uzorka plazme bila je 0,64 μg/mL u vremenu od 1 h (T_{max}), granica kvantifikacije bila je 0,2 μg/mL. Metoda je pokazala visoku selektivnost i osjetljivost i može se primijeniti i u analizama ljudske plazme [33].

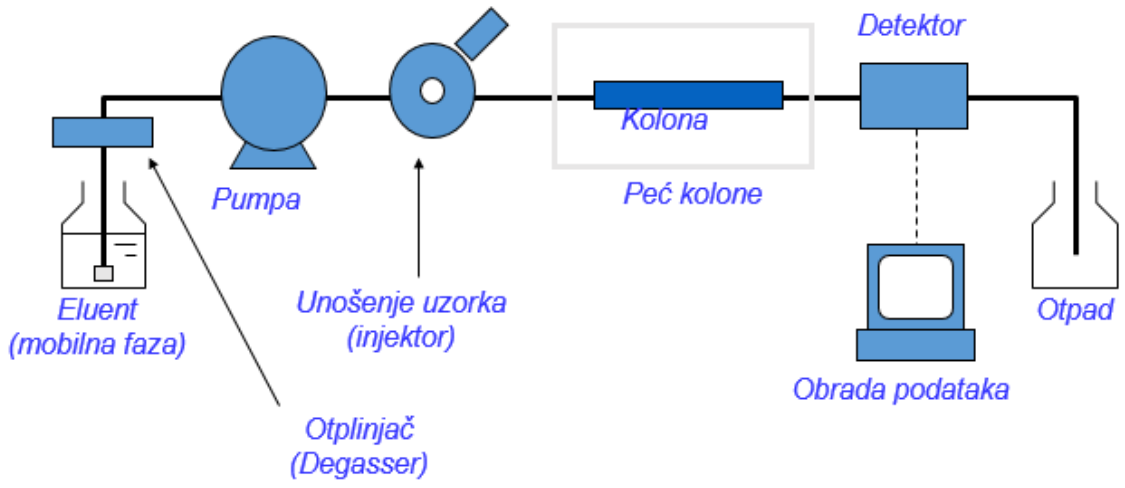
Sljedeći primjer prikazuje primjenu čak dvije vrste voltametrije u jednom istraživanju, cikličke i diferencijalne pulsne voltametrije za određivanje indometacina u krvnom serumu i urinu čovjeka. Za definiranje elektrokemijskog ponašanja indometacina i pronalazak pika, znanstvenici su primijenili cikličku voltametriju. Koristili su radnu elektrodu od staklastog ugljika (eng. *glassy carbon electrode,* GCE) modificiranu višestjenčanim ugljikovim nanocjevčicama (eng. *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT). Za referentnu elektrodu su koristili Ag/AgCl elektrodu, a pomoćna je bila platinska žica. Područje mjernog potencijala na voltamogramu bilo je od 0,2 V do 1,4 V s brzinom skeniranja 50 mV/s. Sva mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi od 25 °C. Izabrali su ovakvu vrstu radne elektrode da bi poboljšali oksidaciju indometacina u blago kiseloj otopini što je dovelo do pojačanog intenziteta struje i stvaranja dva anodna pika pri 0,720 V i 0,991 V i jednog katodnog pri 0,183 V. Proučavajući pH vrijednost, uočili su kako se pri pH 3 pojavio jedan anodni i jedan katodni pik, dok su se pri pH 5 pojavila dva anodna i jedan katodni pik. Maksimum pika uočen je pri pH 6 nakon čega se pik počeo smanjivati. Zatim su

diferencijalnom pulsnom voltametrijom odredili koncentraciju indometacina u biološkim uzorcima. Dobili su linearni kalibracijski pravac u rasponu koncentracija $0{,}2 \cdot 10^{-6}$-$6{,}0 \cdot 10^{-6}$ mol/L s koeficijentom korelacije 0,987. Granica detekcije je iznosila $13{,}2 \cdot 10^{-9}$ mol/L , a granica kvantifikacije $44{,}2 \cdot 10^{-9}$ mol/L. Relativno standardno odstupanje iznosilo je 0,24 % (n=5) [34].

3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je analitička metoda koja se koristi za kvantificiranje, prepoznavanje te odjeljivanje svake komponente u nekoj smjesi [35]. To je razdjelna tehnika koja može analizirati termolabilne i nehlapljive tvari, zatim anorganske ione u vidu onečišćenja, nestabilne prirodne produkte te makromolekule. Princip rada podrazumijeva prolazak analizirane tvari ili smjese kroz stupac pumpanjem tekućine koja predstavlja mobilnu fazu. Unosi se mali volumen uzorka u tok mobilne faze pri čemu dolazi do određenih fizikalnih i kemijskih reakcija što rezultira različitim zadržavanjem komponenti smjese u koloni. Vrijeme koje je potrebno da analit nakon unošenja uzorka stigne u detektor naziva se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme [36].

Osnovni dijelovi HPLC instrumenta su: spremnik za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, ako je moguće i predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor [37]. Na slici 11 prikazana je shema HPLC instrumenta.



Slika 11. Shematski prikaz HPLC sustava [17].

Mobilna faza je tekuća, može joj se mijenjati sastav, polarnost i pH vrijednost u cilju optimiranja separacije. Prije upotrebe, mobilna faza se mora profiltirati te osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica. Također, mora dobro otapati uzorak, mora biti

kompatibilna s detektorom te kemijski inertna. Ako se sastav mobilne faze ne mijenja tijekom analize, tada je riječ o izokratskom eluiranju. Ako se pak sastav mijenja prema utvrđenom programu gradijenta, tada je riječ o gradijentnom eluiranju [17, 37].

Pumpa potiskuje moblinu fazu kroz kolonu pod visokim tlakom (do 15 MPa) pri čemu brzina protoka iznosi 0,01-10 mL/min. Mora biti izrađena od materijala otpornog na komponente mobilne faze. Pritisak koji se koristi pri analizi ovisi o dimenzijama kolone, protoku, veličini čestica te viskozitetu mobilne faze [17, 37].

Unošenje uzorka (injektiranje) predstavlja dio sustava preko kojeg se uzorak unosi u kolonu. Može biti manulani ili automatski (eng. *autosampler*). Kod manualnog injektiranja, uzorak se unosi pomoću injekcije što zahtjeva stalnu prisutnot analitičara. S druge strane, kod automatskog sustava za injektiranje je moguće automatsko postavljanje injektiranja što ne zahtijeva prisustvo analitičara tijekom analize [17].

Kolona (stacionarna faza) je najvažniji dio HPLC sustava. To je cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, a unutrašnjost joj je ispunjena stacionarnom fazom. Dimenzije mogu biti različite, a izbor kolone ovisi o fizikalnim te kemijskim osobinama analita. Obzirom na interakciju između mobilne faze i punjenja kolone, razlikuje se: HPLC normalnih faza (stacionarna faza je polarna, a mobilna nepolarna) i HPLC obrnutih faza (stacionarna faza je nepolarna, a mobilna je polarna). Također, stacionarne faze se razlikuju po svojoj polarnosti: najpolarnije (silika), manje polarne (diol, amino, cijano) i nepolarne (C18, C8) [17].

Detektori su ključni dio HPLC, stalno se usavršavaju i ne postoji opće primjenjivi detektor. Mogu pratiti promjenu svojstava mobilne faze (indeks loma, dielektrična konstanta), a mogu i detektirati analit (UV, fluorescencija). Idealan detektor mora biti visoko osjetljiv, mora davati brz odgovor koji raste proporcionalno s koncentracijom analita, otopine ga ne mogu oštetiti, lak je, jednostavan za upotrebu te odgovara svim analitima u uzorku. Razlikuju se: detektori indeksa loma, električne vodljivosti, UV/VIS zračenja, elektrokemijski te fluorescencijski detektor [17].

HPLC se primjenjuje za određivanje i odjeljivanje polarnih i nepolarnih spojeva u biokemijskoj, forenzičkoj, farmaceutskoj, klinčkoj i industrijskoj praksi. Posebno je istaknuta primjena HPLC metode u ispitivanju zraka, hrane te otpadnih tekućina na prisustvo štetnih supstanci kao što su pesticidi, polikorirani bifenili i slično. Također, HPLC se primjenjuje i za separaciju lipida, steroida, šećera, lipofilnih vitamina i tako dalje [37]. Na slici 12 prikazan je HPLC uređaj.



Slika 12. Prikaz HPLC uređaja [38].

3.3.1. Primjeri određivanja indometacina HPLC metodom

Dva znanstvenika iz Grčke razvila su brzu i pouzdanu HPLC metodu koja će se koristiti za farmakokinetička ispitivanja i rutinsko praćenje indometacina u plazmi djece i novorođenčadi. Uzorci su uzimani od hospitalizirane djece, dva sata nakon oralne primjene lijeka nakon čega se uzorak venske krvi deproteinizirao s acetonitrilom te alikvot supernatanta uparío do suha, a zatim se ubrizgao (manualni injektor) u HPLC sustav. Kromatografsko razdvajanje izvedeno je na C_{18} koloni (250 x 4,6 mm) koristeći mobilnu fazu 10 mM fosfornu kiselinu i acetoniril u omjeru 40:60. Lijek su detektirali UV-VIS spektroskopijom pri 280 nm. Brzina protoka uzorka kroz kolonu bila je 0,9 mL/min, a retencijsko vrijeme 6,3 min. Kalibracijski grafovi bili su linerani u rasponu koncentracija od 0,1 do 10 μg/mL s koeficijentom korelacije od 0,999. Granica detekcije bila je 0,06 μg/mL. Koeficjent varijacije bio je manji od 5 %, a točnost je bila gotovo 100 %. Važno je napomenuti da nije bilo interferencija iz drugih komponenata plazme [39].

Osim što se može određivati u ljudskoj plazmi, znanstvenici iz Australije su razvili HPLC metodu kojom se indometacin može odrediti u životinjskoj plazmi. Određivali su ovaj lijek u svinjskoj plazmi te provjerom valjanosti metode zaključili kako se ista metoda može primjenjivati i kod određivanja indometacina u ljudskoj plazmi. Prvo su pripremili uzorke krvi u koje su dodali acetonitril kao otapalo za ekstrakciju te kako bi došlo do taloženja proteina. U dobiveni supernatant dodali su acetonitril te sve zajedno uveli u HPLC sustav ubrizgavajući u kolonu i koristeći autosampler. Kromatografsko odvajanje postignuto je na

koloni Res Elut (4,6 x 150 mm, C18, 5 μm, 90 Å). Mobilna faza se sastojala od 60 % acetonitrila u 0,02 mol/L natrijeva acetatnog pufera i podesili su pH na 3,6 koristeći ortofosfornu kiselinu. Brzina protoka uzorka kroz kolonu bila je 1 mL/min s tlakom od 120 atmosfera, a valna duljina UV detektora postavljena je na 320 nm. Retencijsko vrijeme bilo je 3,6 min. Sve analize su provedene pri sobnoj temperaturi. Dobivena je linearna kalibracijska krivulja u rasponu koncentracija od 50 - 3000 ng/mL s koeficijentom korelacije >0,98. Preciznost metode izražena je kao koeficijent varijacije (n=5) i iznosi <7 %. Granica kvantifikacije je 50 ng/mL, a granica detekcije iznosi 10 ng/mL. Osim što je vrlo precizna, ova metoda je vrlo brza jer je potrebno manje od 3 h za ekstrakciju i analizu 20 uzoraka [40].

HPLC metoda se sve više razvijala što je omogućilo određivanje indometacina u drugim medijima. Napredak metode posebno je primijenjen u farmaceutskim analizama gdje se koncentracija indometacina identificira u različitim farmaceutskim pripravcima. U ovom primjeru, znanstvenici su odredili količinu indometacina u dva komercijalna lijeka, Indocin 25 mg i Indobid 25 mg. Uzeli su pet kapsula od svakog proizvoda te izdvojili prah kojeg su otopili u etanolu (3 x 20 mL) pri 70 °C. Otopinu su zatim filtrirali te nadopunili volumen do 100 mL iz kojeg su zatim uzeli 5 μL i ubrizgali u HPLC sustav, Hitachi (Tokyo, Japan) s Rheodyne 7125 injektorom. Koristili su YMC-ODS (YMC, Japan) kolonu (150 mm x 4,6 mm), mobilna faza bila je metanol-voda-tetrahidrofuran (59:39:2) s brzinom protoka 2 mL/min. Indometacin je detektiran UV spektroskopijom (Hitachi 220 spektrofotometar) pri 328 nm. Dobivena je linearna kalibracijska krivulja u rasponu koncentracija 10,7-64,08 μg/mL s koeficijentom korelacije 0,9980. Granica detekcije bila je 21,4 ng/mL, koeficijent varijacije iznosio je 0,58 % za Indocin i 0,74 % za Indobid s odstupanjem manjim od 4,8 % [41].

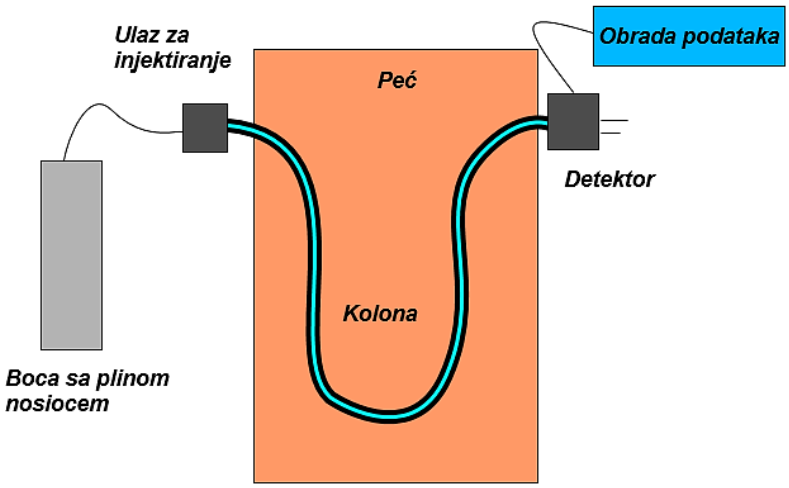
3.4. Plinska kromatografija, GC

Plinska kromatografija je analitička metoda koja se koristi za analizu i odvajanje spojeva koji mogu isparavati, a da pri tome ne dolazi do njihove razgradnje. Začetnici plinske kromatografije su Martin i James koji su 1952. dobili Nobelovu nagradu za postignuto otkriće. Plinsko-kromatografska analiza se sastoji od četiri faze: unošenje uzorka na vrh kolone, transport uzorka mobilnom fazom kroz kolonu, adsorpcija sastojaka u stacionarnoj fazi i detekcija sastojaka [36].

Mobilna faza je inertni plin koji eluira komponente smjese u koloni napunjenoj stacionarnom fazom. Za razliku od tekućinske kromatografije, u plinskoj kromatografiji

analit ne reagira s mobilnom fazom te zbog toga njegova brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi o kemijskoj strukturi mobilne faze. Nadalje, postoje dvije vrste stacionarne faze. Prva od njih je za odjeljivanje komponenti male molekulske mase gdje je stacionarna faza čvrsta tvar velike specifične površine na koju se adsorbiraju analizirane komponente. Druga je za odjeljivanje komponenti velike molekulske mase gdje je stacionarna faza tekuća i nanesena je na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Analit se ubrizgava kao tekućina koja zbog visoke temperature u kromatografu prelazi u plinovito stanje. Temperatura ulaza instrumenta postavlja se na 50 °C višu temperaturu od temperature vrelišta najslabije hlapljive komponente iz analizirane smjese [36].

Instrument namijenjen za plinsko-kromatografsku analizu naziva se plinski kromatograf čija je shema prikazana na slici 13. Sastoji se od boce s plinom nosiocem, ulaza za injektiranje, peći, kolone, detektora te sustava za obradu podataka [36].



Slika 13. Shema plinskog kromatografa [36].

Plin nosilac je kemijski inertan plin; dušik, helij, argon ili vodik. Važno je dobro definirati tlak (protok) [36].

Ulaz za injektiranje je dio sustava preko kojeg se uzorak (0.1-20 µL) unosi u kolonu. Uzorak se unosi preko septuma ili silikonske gume te isparava u staklenoj cijevi injektora. Zatim plin-nosilac struji kroz injektor i nosi isparene analite. Važno je da je temperatura injektora podešena tako da analiti mogu trenutno ispariti [36].

Kolona može biti kapilarna (od čelika ili stakla) ili punjena (od taljenog kvarca). Najčešće se koriste punjene (fino usitnjeni materijal 100-300 µm promjera), ali kapilarne su učinkovitije i omogućavaju brža razdvajanja. Razlikuju se i po dužini, punjene su do 2 m, a

kapilarne od 30 do 100 m. Temperatura kolone se može programirati u cilju što boljeg razdvajanja [36].

Peć je dio sustava koji okružuje kolonu te ima identičnu temperaturu kao ona. Takva temperatura treba biti stabilna i lako promjenjiva u cilju dobivanja reproducibilnijih rezultata [36].

Detektor kontrolira plin nosilac pri napuštanju kolone i generira signal koji odgovara promjenama njegovog sustava uzrokovanim eluiranjem komponenata. Mora imati brz i linearan odziv, visoku osjetljivost, dobru stabilnost i mora biti jednostavan za rukovanje. Razlikuju se četiri vrste detektora: detektor toplinske vodljivosti, plamenoionizacijski detektor, detektor apsorpcije elektrona i selektivni detektor [36].

Plinska kromatografija je vrlo djelotvorna metoda koja omogućuje široku primjenu. Potrebna je mala količina uzorka i lako je primjenjiva za kvantitativne analize. Osim toga, može se lako spojiti sa spektroskopijom masa pri čemu se dobivaju vrlo precizne i točne analize [36].

3.4.1. Primjeri određivanja indometacina plinskom kromatografijom

Znanstvenici iz Liverpoola su razvili plinsku kromatografiju za određivanje indometacina kod pacijenata s reumatoidnim artritisom uzimajuće njihove uzorke krvi i urina. U uzorke (1 mL) su dodali 50 μL internoga standarda, 5-fluoro-indometacina koncentracije 10 μg/mL, zatim su primijenili postupak ekstrakcije te odvojili vodenu i organsku fazu. Odbacili su vodenu fazu, a s organskom su dalje nastavili raditi kako bi dobili ispravan uzorak za analizu. Tako dobivene uzorke (0,5-1 μL) su injektirali u kolonu Pye 104 GC sustava. Koristili su punjenu kolonu (1.5 m x 4 mm) s 2 % Dexil 300 obloženim Chromosorbom, temperatura je bila postavljena na 360 °C 48 sati prije upotrebe. Nadalje, temperatura injektora bila je 360 °C, plin nosilac je bio dušik s brzinom protoka od 45 mL/min. Standardne otopine su pripremili tako što su otopinu indometacina u metanolu (0,1 mg/mL) dodali u uzorke krvi i urina bez indometacina, raspon koncentracija bio je 10-1000 ng/mL. Količina indometacina izračunata je uspoređujući visinu dva pika, pik indometacina te pik 5-fluoro-indometacina (unutarnji standard). Retencijsko vrijeme indometacina bilo je 4,2 min, a 5-fluoro-indometacina 2,4 min, a iskorištenje 85,1 ± 2,3 %. Pronađeno je 10 ng indometacina u 1 mL uzorka plazme ili urina. Obnovljivost metode provjerena je analizom uzoraka plazme koja je sadržavala indometacin u koncentracijama 100-600 ng/mL. Uzorci su prikupljeni od 20 pacijenata koji su se liječili s dozom od 25 mg indometacina tri puta dnevno, a uzimani su 4

sata nakon jutarnje doze. Pronađene su koncentracije indometacina u rasponu od 168 ng/mL do 596 ng/mL [42].

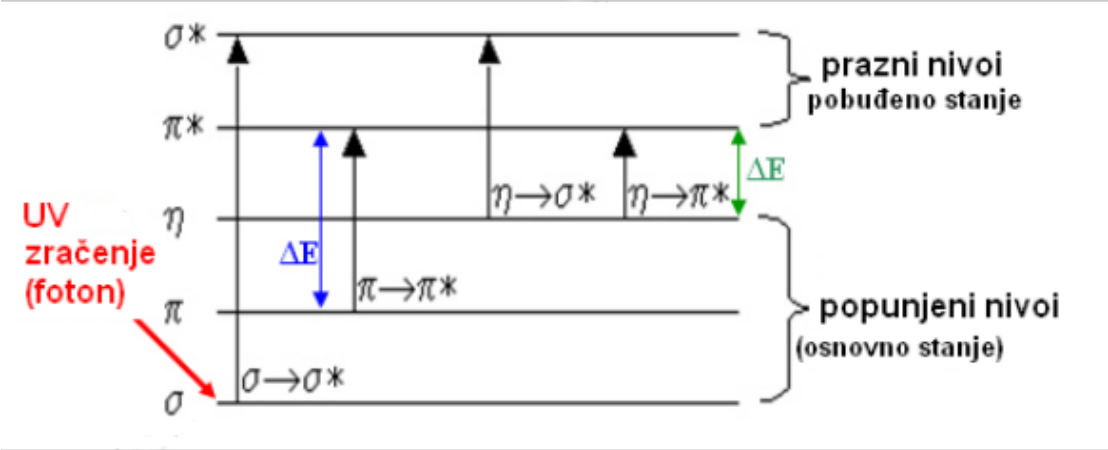
Kako je plinska kromatografija postajala sve popularnija u brojnim analizama lijekova, tako su znanstvenici nastojali unaprijediti ovu metodu kako bi dobili još preciznije rezultate. Izvrstan primjer napretka ove metode prikazali su znanstvenici iz Kine koji su određivali koncentraciju različitih farmaceutika iz uzoraka vode različitih rijeka tako što su kombinirali plinsku kromatografiju s metodom masene spektrometrije. Na taj način su istražili koje su rijeke zagađene otpadnim vodama, a koje od njih mogu poslužiti kao izvor pitke vode. Koristili su Agilent 6890N plinski kromatograf koji je bio spojen s Agilent 5975B MSD masenim spektrometrom. Razdvajanje komponenata provedeno je u DB35-MS kapilarnoj koloni (30 m x 0,25 mm), plin nosilac bio je helij s brzinom protoka 1 mL/min. Temperatura injektora bila je 260 °C, a volumen injektiranog uzorka 2 µL. Temperatura kolone bila je u rasponu 100-310 °C. Znanstvenici su očekivali da će pronaći određene koncentracije indometacina, no ovaj lijek nije bio prisutan u uzetim uzorcima. Bez obzira što nije identificiran, može se vidjeti kako se ovaj lijek može određivati kombinacijom ovih dviju metoda što može poslužiti u daljnjim istraživanjima i analizama drugih vrsta uzoraka [43].

3.5. UV spektroskopija

Ultraljubičasto zračenje (UV) je elektromagnetsko zračenje koje se prema svojoj valnoj duljini nalazi između rendgenskog i ljubičastog dijela vidljivog spektra. Obzirom na valnu duljinu, dijeli se na: UV-C (190-280 nm), UV-B (280-320 nm) i UV-A (320-400 nm) zračenje. Otkriveno je 1801. godine kada je Johann Wilhelm Ritter uočio tamnjenje kristala srebrovog klorida kada se izloži djelovanju zračenja u području spektra iza ljubičastog dijela. Napretkom istraživanja, ultraljubičasto zračenje proširilo je svoju primjenu u brojnim područjima, a posebno u fizikalno-kemijskim istraživanjima te u kemijskoj analizi, spektroskopiji [44, 45].

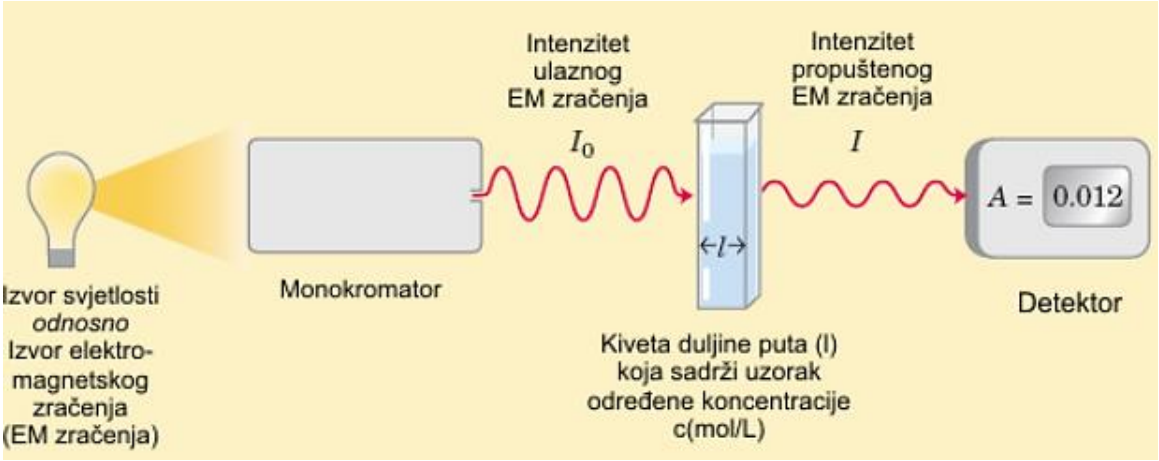
UV spektroskopija je metoda koja se koristi za kvantitativno određivanje organskih komponenti u otopini, za određivanje prijelaznih metala te za određivanje optičkih svojstava materijala. Temelji se na praćenju apsorpcije zračenja u ultraljubičastom dijelu spektra (200-400 nm), uzorak apsorbira određenu količinu svjetlosti iz koje se zatim određuje koncentracija uzorka. Količina energije koju uzorak apsorbira uzrokuje elektronski prijelaz iz popunjene orbitale koja ima manju energiju (osnovno stanje) u nepunjenu orbitalu više energije (pobuđeno stanje). Na slici 14 prikazano je pobuđivanje elektrona između

molekulskih orbitala. ΔE označava razliku energije između osnovnog i pobuđenog stanja. Ukupna apsorbirana energija ovisi o ΔE, što je razlika u energiji manja, to je valna duljina apsorpcije veća [46, 47].



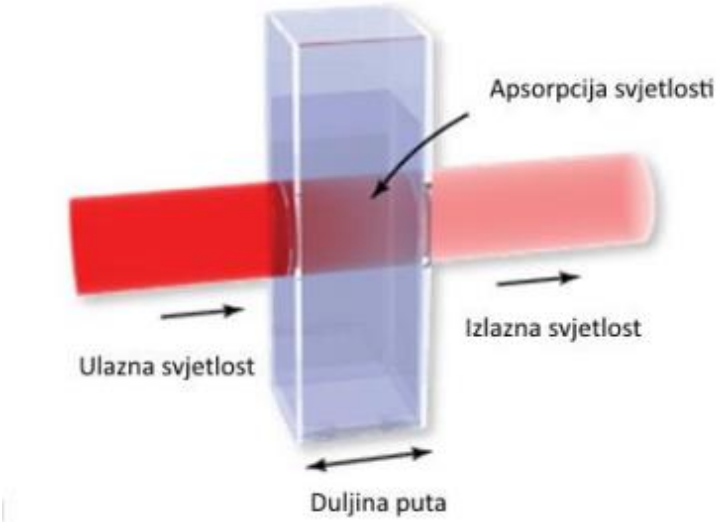
Slika 14. Prikaz pobuđivanje elektrona između molekulskih orbitala [47].

Bilježenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao nastaje UV spektar. On se analizira pomoću spektrofotometra čija je shema prikazana na slici 15. Deuterijeva žarulja predstavlja izvor svjetlosti koju monokromator razdvaja prema valnim duljinama. Svjetlost zatim prolazi kroz kvarcnu kivetu debljine 1 cm u kojoj se nalazi otopina uzorka. Intenzitet tog zračenja može se izmjeriti na dva načina, ovisno o tome da li je spektrofotometar jednosnopan ili dvosnopan. Kod jednosnopnog spektrofotometra prvo se mjeri intenzitet zračenja koji je prošao kroz referentni uzorak što je najčešće voda, a nakon toga se mjeri intenzitet zračenja koji je prošao kroz ostale uzorke. Kod dvosnopnog spektrofotometra se monokromatska zraka razdvaja na dva snopa od kojih jedan prolazi kroz uzorak, a drugi kroz referent te im se intenziteti mjere naizmjenično ili istodobno. Zrake dolaze do fotoćelije detektora koja daje električni signal propocionalan intenzitetu zračenja. Signal se zatim pojačava i preračunava u apsorbanciju koja se očitava na računalu koje je povezano sa spektrofotometrom [17, 48].



Slika 15. Shematski prikaz spektrofotometra (jednosnopni) [49].

Lambert-Beerov zakon je zakon apsorpcije koji kvantitativno pokazuje kako apsorbancija ovisi o koncentraciji. Kada UV zračenje prolazi kroz uzorak koji sadrži analit, intenzitet zračenja se smanjuje jer analit prelazi iz osnovnog stanja u pobuđeno [17]. Smanjenje intenziteta upadnog zračenja prikazano je na slici 16.



Slika 16. Prikaz smanjenja intenziteta upadnog zračenja prolaskom kroz uzorak [17].

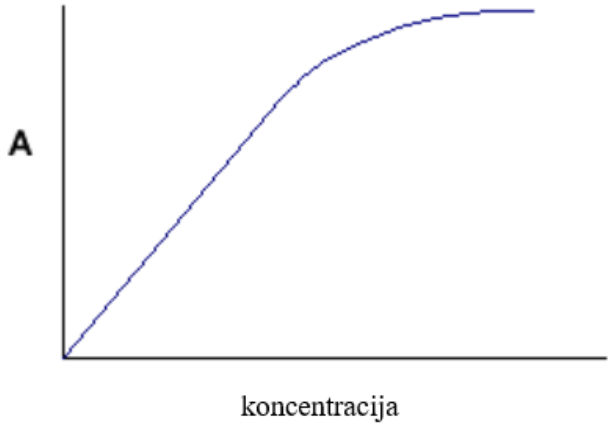
Kod UV spektroskopije mjeri se intenzitet upadnog zračenja I_0 i intenzitet propuštenog zračenja I. Omjer ovih intenziteta naziva se transmitancijom (T) prema jednadžbi 8:

$$T=I/I_o \quad (8).$$

Da bi se transmitancija prikazala kao linearna funkcija koncentracije, uvodi se pojam apsorbancije (A). Apsorbancija se definira kao logaritam recipročne vrijednosti transmitancije prema jednadžbi 9:

$$A=log(1/T)=log(I_0/I)= \varepsilon bc \quad (9),$$

gdje je ε molarni apsorpcijski koeficijent ($dm^3mol^{-1}\ cm^{-1}$), b je duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), a c je koncentracija otopljene tvari u otopini. Apsorbancija uzorka uglavnom se mjeri pri jednoj valnoj duljini, onoj kod koje je apsorbancija najveća za dani uzorak. Ako Lambert-Beerov zakon vrijedi, dobit će se linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji uzorka kao što je prikazano na slici 17 [17, 50].



Slika 17. Linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji [50].

Sva mjerenja trebaju se izvoditi pri sobnoj temperaturi, a posebno treba voditi računa o izboru otapala. Otapalo često može utjecati na spektar, stoga je važno izabrati ono koje ne apsorbira u UV području kao i uzorak. Negativan utjecaj otapala može dovesti do dvije posljedice; pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama (crveni pomak) i pomak apsorpcijskog maksimuma prema kraćim valnim duljinama (plavi pomak) [47].

UV spektroskopija svoju primjenu pronalazi u: kvantitativnim i kvalitativnim analizama, kemijskim analizama, kvantitativnim analizama farmaceutskih proizvoda, detekciji nečistoća, karakterizaciji strukture organskih spojeva, određivanju molekulskih masa, a može biti u ulozi HPLC detektora što je prikazano u primjerima određivanja indometacina HPLC metodom [48].

3.5.1. Primjeri određivanja indometacina UV spektroskopijom

Prvi primjer prikazuje kako se pomoću UV spektroskopije određuje indometacin u obliku kapsula. U prvom koraku znanstvenici su pripremili standardnu otopinu indometacina tako da su ga otopili u 0,1 M NaOH da bi se dobila koncentracija 1000 μg/mL. Iz toga su razrjeđivanjem s destiliranom vodom pripremili seriju standardnih otopina u rasponu koncentracija od 5 - 25 μg/mL i mjerili apsorbanciju u rasponu valnih duljina od 200 do 400 nm te uvidjeli maksimum apsorbancije indometacina pri 235 nm. Zatim su konstruirali baždarni dijagram (apsorbancija/koncentracija) i izmjerili apsorbanciju uzorka indometacina pri 235 nm. Uzorak indometacina su prethodno pripremili tako što su izvagali određenu količinu praha iz kapsula različitih proizvođača te ga otopili u 0,1 mol/L NaOH. Lineranost je zabilježena u koncentracijskom području od 5 - 25 μg/mL s koeficijentom korelacije 0,999. Relativno standardno odstupanje (RSD) iznosilo je 1,02 %, a standardna devijacija 1,01 μg/mL. Granica detekcije bila je 0,383 μg/mL, a granica kvantifikacije 1,16 μg/mL. Iz navedenih rezultata može se vidjeti kako je primijenjena metoda vrlo brza i precizna te se može primjenjivati u rutinskoj analizi lijekova [51].

Sličan primjer istražila je skupina znanstvenika u Iraku. Njihova metoda se temeljila na UV spektroskopskom određivanju indometacina u čistom obliku u odgovarajućim farmaceutskim pripravcima šest različitih tvrtki. Prvo su pripremili standardnu otopinu indometacina tako da su određenu količinu čistog indometacina otopili u 0,1 mol/L KOH da bi dobili koncentraciju 0,250 g/L. Zatim su iz te otopine pripremili šest standardnih otopina u rasponu koncentracija od 2,5 μg/mL do 6,375 μg/mL. Nakon toga su izmjerili apsorbancije pripremljenih otopina u rasponu valnih duljina od 200 nm do 650 nm te zaključili da je maksimum apsorbancije indometacina pri 228 nm. Otopinu uzorka su pripremili vaganjem određene količine farmaceutskih pripravaka na bazi indometacina te otapanjem istoga u 0,1 mol/L KOH. Apsorbanciju uzorka izmjerili su pri 228 nm te su iz baždarne krivulje izračunali koncentraciju indometacina iz šest različitih proizvoda. Dobivena je linearna kalibracijska krivulja u rasponu koncentracija od 1 mg/L do 10 mg/L s koeficijentom korelacije od 0,9947. Granice detekcije bile su 0,602-0,129 mg/L, a granice kvantifikacije 1,825-0,390 mg/L. Standardna devijacija i relativno standardno odstupanje za svih šest proizvoda pokazalo je zadovoljavajuće rezultate što potvrđuje točnost, preciznost i ponovljivost metode [52].

3.6. Kolorimetrija

Vizualni fenomen boje u ljudskom oku javlja se kao posljedica selektivne apsorpcije ili refleksije pojedinih valnih duljina zračenja u vidljivom dijelu spektra bijele svjetlosti (sunčeva svjetlost). Čvrsta tijela reflektiraju, a tekućine i plinovi propuštaju onu valnu duljinu (boju) upadne svjetlosti koja odgovara boji tog tijela te ju ljudsko oko vidi kao takvu. Na primjer, bijela površina je ona koja reflektira sva valna područja bijele svjetlosti, dok crna površina apsorbira svu svjetlosti, a siva samo djelomično. Ove tri boje nisu prave boje, već akromatske boje koje nemaju svoje karakteristično valno područje nego ovise o sposobnosti površine da jače ili slabije apsorbira valna područja bijele svjetlosti. Kada je tijelo obojeno pravom kromatskom bojom, njegova površina apsorbira bijelu svjetlost samo na određenom valnom području, tako će boja koju ta površina ima (reflektira) biti komplementarna apsorbiranoj boji. Na primjer, tijelo koje je obasjano bijelim svjetlom bit će crvene boje ako apsorbira modro-zeleni dio spektra, a reflektira zračenje koje odgovara crvenom dijelu spektra [53, 54].

Kolorimetrija je metoda apsorpcijske spektroskopije kojom se određuju koncentracije obojenih otopina koje apsorbiraju u vidljivom ili bliskom UV dijelu spektra. Boja koju ima (reflektira) otopina neke tvari komplementarna je boji koju ta tvar apsorbira. Na slici 18 prikazane su komplementarne boje, apsorbirane i reflektirane. Kolorimetrija se temelji na preciznom mjerenju apsorbirane svjetlosti, odnosno uspoređuje se intenzitet boje nepoznate otopine s jednim ili više standardnih otopina poznate koncentracije. Ako je ispitivana tvar u otopini bezbojna, dodaje se reagens koji zajedno s tom tvari daje obojenje. Važno je napomenuti da se u ovoj metodi uvijek radi s polikromatskim zračenjem što isključuje mogućnost kvalitativne analite. Kvantitativna kolorimetrijska analiza primjenjuje Lambert-Beer-ov zakon, mjeri apsorbanciju uz prethodno eksperimentalno definiranu funkcionalnu vezu apsorbancije i koncentracije koje su linerano ovisne [54].

APSORBIRANA BOJA	RASPON VALNIH DULJINA / nm	REFLEKTIRANA BOJA
	700-620	
	620-580	
	580-560	
	560-490	
	490-430	
	430-380	

Slika 18. Prikaz apsorbiranih i reflektiranih boja [55].

Da bi se neka tvar mogla odrediti kolorimetrijski, mora ispunjavati sljedeće uvjete:

- intenzitet boje mora biti stabilan u dužem vremenskom intervalu,
- boja mora biti intenzivna,
- apsorpcija zračenja se mora ponašati prema Lambert-Beerovom zakonu,
- male promjene temperature, pH i drugih faktora ne smiju značajno mijenjati intenzitet boje,
- ukoliko je intenzitet boje nedovoljan, dodaje se pogodni reagens koji daje spoj intenzivnije boje [54].

Nadalje, reagens u kolorimetriji mora imati sljedeće osobine:

- treba reagirati stehiometrijski s ispitivanom tvari i uvijek treba dodati dovoljnu i istu količinu reagensa u ispitivane otopine i standarde,
- ne smije apsorbirati u vidljivom dijelu spektra,
- mora biti selektivan u odnosu na ispitivanu tvar,
- boja nastalog produkta mora se brzo razvijati,
- reagens ili ispitivana tvar ne smiju stupati u reakcije s drugim sastojcima u otopini koji ih mogu prevesti u neaktivne oblike ili kompleksni spoj zbog čega bi izostalo razvijanje boje [54].

Instrumenti koji služe za mjerenja intenziteta boje su fotometri i kolorimetri. Fotometri su instrumenti koji se temelje na uspoređivanju neke površine od strane poznatog izvora

svjetlosti i osvjetljenosti koja dolazi od nepoznatog izvora. Razlikuju se vizualni i fotoelektrični fotometri. Vizualni fotometri su starija vrsta instrumenta koja mjeri zatamnjenje, udaljavanje ili primicanje izvora koje je potrebno da bi se izjednačila osvjetljenost dviju površina, odnosno mjerenja se izvode vizualnim uspoređivanjem. S druge strane, fotoelektrični fotometri se temelje na principu mjerenja jakosti fotoelektričnih struja koje nastaju osvjetljavanjem fotoćelije (fotoelektrične površine). Zbog pouzdanosti mjerenja, danas se primjenjuju samo fotoelektrični fotometri. Princip rada je identičan kao na spektrofotometru, ali su im konstrukcijske razlike velike. Za razliku od spektrofotometra, fotometri imaju optički filtar, mjere se veće promjene energije, moguće su samo kvantitativne analize (polikromatsko zračenje), optički dijelovi su leće, a detektor je fotonaponska ćelija [54, 56]. Na slici 19 prikazan je primjer suvremenog prijenosnog fotometra.



Slika 19. Prijenosni fotometar [54].

Kolorimetri su instrumenti koji omogućavaju vizualno uspoređivanje jakosti boja otopina poznate i nepoznate koncentracije. Također, mogu registrirati intenzitet svjetla fotoelektričnim putem [56]. Na slici 20 prikazan je prijenosni kolorimetar.



Slika 20. Prijenosni kolorimetar [57].

Kolorimetrija se primjenjuje u brojnim djelatnostima u kojima je boja mjerilo kvalitete proizvoda (industrija lakova i boja, polimernih materijala, grafička i tekstilna industrija).Važna je i u kemijskoj analizi kao instrumentalna kvantitativna tehnika kojom se određuju koncentracije nekih tvari u otopini usporedbom njezine obojenosti s obojenošću referentne otopine iste tvari i poznate koncentracije [58].

3.6.1. Primjeri određivanja indometacina kolorimetrijom

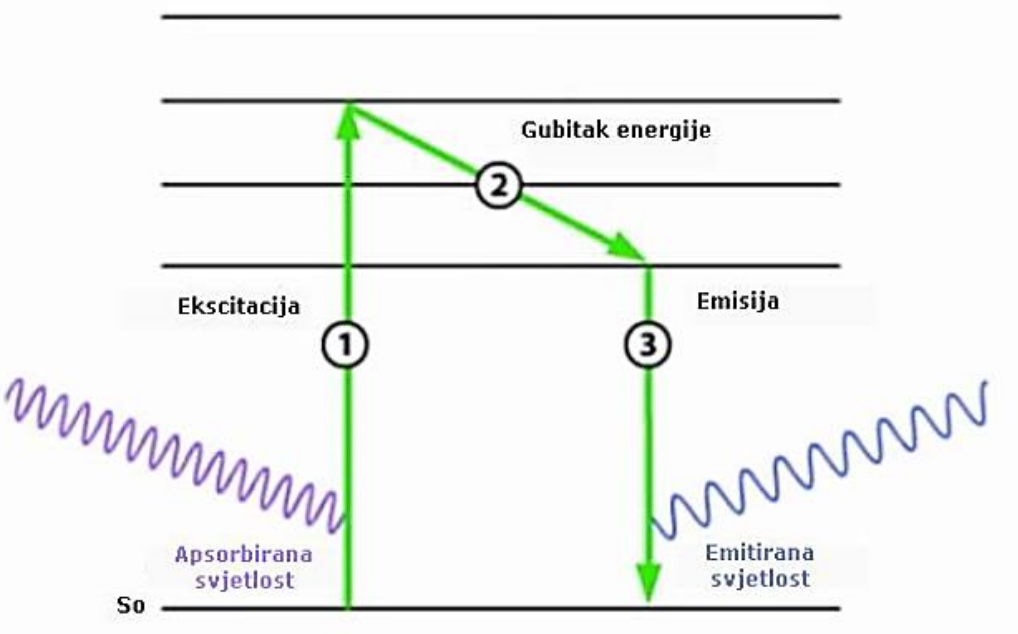
Na farmaceutskom fakultetu u Nigeriji, tri su znanstvenika razvila novu kolorimetrijsku metodu za određivanje čistog indometacina i indometacina u kapsulama. Metoda je vrlo izravna, osjetljiva i jednostavna, a temeljila se na reakciji diazo kopulacije između indometacina i vrlo reaktivnog diazonijevog iona, 4-karboksil-2,6-dinitrobenzena koji su zajedno dali azo obojen spoj. Reakcija se odvijala vrlo brzo dajući azo spoj narančaste boje u etil-acetatu. Važno je napomenuti da je azo spoj bio stabilan samo tri sata. Određivanje indometacina izvodilo se pri valnoj duljini od 470 nm. Lambert Beer-ov zakon vrijedio je u koncentracijskom području od 3,3 do 11 μg/mL. Optimalno vrijeme reakcije bilo je 20 minuta pri temperaturi od 30 °C, a optimalni omjer analita i reagensa 1:2. Dobili su vrlo nisku granicu detekcije, 0,90 μg/mL, a preciznost je iznosila 2,3 % što dokazuje uspješnost određivanja. Jednaka točnost rezultata postignuta je i pri određivanju indometacina u kapsulama [59].

Još jedan primjer određivanja indometacina kolorimetrijom istražen je na farmaceutskom fakultetu u gradu Aleksandriji, u Egiptu. Koristili su Indocid-R kapsule (Kahira Pharmaceuticals and Chemical Industries Co., Kairo), a metoda se temeljila na reakciji indometacina s 2-nitrofenilhidrazinom u prisutnosti dikloheksilkarbodiimida u etanolu pri

čemu se dobio spoj intenzivne ljubičaste boje s maksimumom apsorpcije na 550 nm. Reakcija se odvijala pri temperaturi od 25°C, a vrijeme zagrijavanja reakcijske smjese iznosilo je 120 min. Spoj je bio stabilan 90 minuta, a koncentracija indometacina određena je pomoću spektrofotometra na 552 nm. Područje linearnosti iznosilo je 0,4-2 μmol/10 mL. Koeficijent korelacije iznosio je 0,9998, a preciznost 0,94 %. Provedena metoda je još jedan dokaz jednostavnog i vrlo preciznog određivanja indometacina u rutinskoj analizi lijekova [60].

3.7. Fluorimetrija

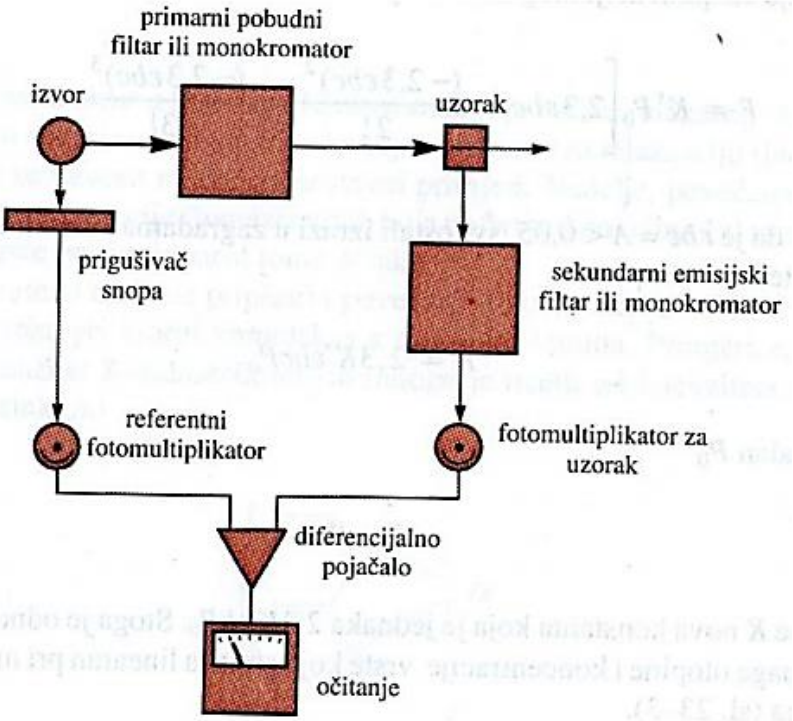
Fluorimetrija ili fluorescentna spektroskopija je kvantitativna metoda koja služi za određivanje tvari mjerenjem fluorescencije molekula koje imaju sposobnost fluoresciranja. Fluorescencija je oblik fotoluminiscencije u kojem se molekule ili atomi pobuđuju apsorpcijom snopa elektromagnetskog zračenja, najčešće ultraljubičastom svjetlošću. Kada molekula apsorbira energiju, ona prelazi iz osnovnog stanja u pobuđeno (ekscitacija). U pobuđenom stanju ostaje 10^{-6} sekundi do 10^{-9} sekundi pri čemu izvodi gibanja rotacije i translacije te troši dio primljene energije (vibracijska relaksacija). Trenutak fluorescencije dolazi kada se pobuđena molekula vraća u osnovno stanje i pri tome emitira višak energije u obliku fluorescentnog svjetla. Emitirano svjetlo ima manju energiju i veću valnu duljinu od upadnog svjetla (Stokes-ovo pravilo), stoga je je emitirana boja različita od apsorbirane [17]. Koraci koji dovode do fluorescencije prikazani su na slici 21.



Slika 21. Shematski prikaz nastanka fluorescencije [61].

Spojevi koji fluoresciraju imaju karakteristične strukture koje uvjetuju intenzitet fluorescencije. Najčešće primijenjivani spojevi u analizama su aromatski spojevi koji imaju najintenzivniju fluorescencijsku emisiju. Također, često se primjenjuju aciklički i alifatski kabonilni spojevi te spojevi s visoko konjugiranim dvostrukim vezama. Ukoliko molekula nema sposobnost fluoresciranja, moguće ju je označiti drugom fluorescirajućom molekulom. Fluorescirati mogu organske molekule, aminokiseline (triptofan, tirozin i fenilalanin), enzimi i koenzimi (flavinski i nikotinamidni), vitamini A, D, B i K skupine, lipidi (fosfolipidi i ceramidi), porfirini te neke anorganske tvari. Njihova kemijska struktura uvjetuje boju i intenzitet fluorescencije koji opada s porastom temperature i smanjenjem viskoznosti otapala, a pojačava se proporcionalno s koncentracijom [17, 61].

Intenzitet fluorescencije mjeri se pomoću fluorimetra ili spektrofluorimetra. Oba instrumenta su vrlo osjetljiva, ali ipak fluorimetri su puno osjetljiviji zbog veće apsorpcije zračenja. Osnovni dijelovi instrumenta su: izvor zračenja, kiveta s uzorkom, primarni pobudni filtar ili monokromator, prigušivač snopa, referentni fotomultiplikator, fotomultiplikator za uzorak, diferencijalno pojačalo i uređaj za očitavanje. Shema instrumenta prikazana je na slici 22. Kao izvor zračenja koristi se UV lampa s odgovarajućim filtrima. Za kvalitativnu analizu obično se koriste živine lampe na koje se stavlja optički stakleni filtar niklovog oksida što rezultira monokromatskim svjetlom, kao najpogodnijim za nastanak fluorescencije. Također, kao izvor zračenja može se koristiti ksenonska lampa koja daje stalan i intenzivan spektar u rasponu od 250 nm do 600 nm [17, 61].



Slika 22. Shematski prikaz fluorimetra i spektrofluorimetra [17].

Princip fluorescentnog mjerenja je sljedeći: snop svjetlosti izvora zračenja prolazi kroz primarni pobudni filtar ili monokromator i pogađa uzorak pri čemu se propušta zračenje koje uzrokuje fluorescenciju, a ograničava ili pak isključuje zračenje koje odgovara fluorescencijskim valnim duljinama. Fluorescencijsko zračenje (svjetlost) se zatim emitira te dio zračenja prolazi kroz sekundarni filtar ili monokromator i putuje dalje do fotoelektričnog detektora. Detektor je obično postavljen pod kutom od 90° u odnosu na zraku upadne svjetlosti kako bi se smanjio rizik izlaganja refelktiranoj ili propuštenoj upadnoj svjetlosti. Nakon toga, referentni snop prolazi prigušivačem koji smanjuje snagu snopa na vrijednost koju ima fluorescencijsko zračenje. Na kraju se signali referentnog fotodetektora i onoga za uzorak procesiraju diferencijalnim pojačalom čiji se izlazni signal očitava na uređaju za učitavanje. Intenzitet zračenja linerano je proporcionalan koncentraciji analiziranog uzorka, a ovisi o vrsti molekule, koncentraciji i o intenzitetu apsorbirane svjetlosti. Mjerenja su vrlo selektivna, a osjetljivost ovakvih metoda je 200-300 puta veća od apsorpcijskih. Uz brojne prednosti, postoje i neka ograničenja; relativno širok spektar bez jasnih vrpci zbog čega je otežana interpretacija, komponente uređaja ne smiju onečišćivati uzorak, a pobudno zračenje se mora u potpunosti eliminirati iz detekcije [17, 61].

Fluorimetrija se primjenjuje u analizi kliničkih uzoraka, organskih te biološki važnih spojeva poput enzima, bjelančevina, alkaloida, koenzima, steorida, vitamina, hormona i

slično. U medicini i biologiji je od velike važnosti fluorescentno bojilo koje se veže za etidijev bromid čije se molekule vežu s molekulom DNA čija područja tako postaju vidljiva. U dijagnostici se primjenjuje kod određivanja granica tumora, procjene prokrvljenosti, za vizualizaciju limfnih čvorova te za ranu dijagnostiku tumora. Fluorimetrija svoju primjenu nalazi i u analitici gdje se primjenjuje za detekciju spojeva koji mogu fluorescirati, također koristi se i za određivanje kationa i anorganskih vrsta. No ipak, najvažnija primjena ove metode je u analizi farmaceutskih i prehrambenih prizvoda te prirodnih produkata [17, 61].

3.7.1. Primjeri određivanja indometacina fluorimetrijom

Fluorimetrijsko određivanje indometacina uvijek se kombinira s nekom drugom metodom, najčešće je to tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Ovakvu kombinaciju metoda provela su tri znanstvenika iz Japana, a u središtu metode je fotokemijska reakcija unutar HPLC kolone i fluorimetrijska detekcija indometacina u ljudskom serumu. Mobilna faza kromatografskog sustava sastojala se od 0,07 mol/L fosfatnog pufera (pH 6,6) – acetonitrila (65:35) u koje su dodali vodikov peroksid. Uzorak seruma ubrizgan je u kolonu pri čemu je indometacin reagirao s vodikovim peroksidom i acetonitrilom te je takva kemijska reakcija dovela do fluorescencije. Kromatografija je izvedena pri sobnoj temperaturi pri brzini protoka od 1 mL/min, a vrijeme zadržavanja uzorka u koloni bilo je 11 min. Zatim su proveli fluorimetrijsku detekciju gdje su mjerili intenzitet nastale fluorescencije pri 358 nm (ekscitacija) i 462 nm (emisija). Dobili su linearnu kalibracijsku krivulju u rasponu koncentracija od 0,05 μg/mL do 30 μg/mL s koeficijentom korelacije 0,9998 i nagibom 11,56. Relativno standaradno odstupanje iznosilo je 3,2 % (0,5 μg/mL) i 2,1 % (5,1 μg/mL). Granica detekcije (signal/šum = 5) bila je 10 ng/mL. Iskorištenje uzorka seruma iznosio je 94,3 %. Zaključeno je da je primjenjena metoda osjetljiva i dovoljno specifična za određivanje indometacina u ljudskom serumu [62].

Sličan primjer metode razvijen je u Japanu gdje su trojica znanstvenika također odredila indometacin iz ljudskog seruma. Kao i u prethodnom primjeru, kombinirana je fluorimetrija i HPLC metoda. Na kopolimer HPLC kolone su vezali vilni alkohol, a mobilna faza se sastojala od 35 % acetonitrila u fosafatnom puferu. Pripremljene uzorke seruma su unijeli u kolonu gdje je došlo do fluorescentne reakcije. Brzina protoka uzorka kroz kolonu bila je 1 mL/min. Intenzitet fluorescencije su mjerili pri 298 nm (ekscitacija) i 375 nm (emisija). Dobivena je linearna kalibracijska krivulja u rasponu koncentracija od 0,1 μg/mL do 10 μg/mL s koeficijentom korelacije 0,999. Relativno standardno odstupanje bilo je manje od 2,40 %, a nakon nekoliko uzastopnih dana, manje od 2,70 %. Granica detekcije (signal/šum

= 3) bila je 10 ng/mL. Proučavan je i utjecaj pH vrijednosti i temperature na intenzitet fluorescencije. Zaključeno je da je pri pH 10 i temperaturi od 140 °C najjači intenzitet. Metoda je dovoljno specifična za procjenu indometacina u serumu, a može se primjenjivati i u rutinskim terapijama [63].

Nakon uspješnog povezivanja fluorimetrije s HPLC metodom, znanstvenici su krenuli istraživati koja kombinacija metoda bi bila još uspješnija. Tako su istražili spoj fluorimetrije i sekvencijske injekcijske analize (eng. *sequential injection analysis*, SIA). U SIA sustavu se u protok nosača injektiraju uzorak i reagens jedan pored drugoga, zatim slijedi obrat protoka pri čemu dolazi do međusobne disperzije uzorka i reagensa što dovodi do nastanka produkta reakcije. U ovom primjeru, znanstvenici su identificirali koncentraciju indometacina iz farmaceutskih pripravaka (Dolovin, tablete 25 mg i Indocid, kapsule 25 mg). Indometacin ne pokazuje prirodnu fluorescenciju i stabilan je pri neutralnoj pH vrijednosti. U alkalnom mediju dolazi do njegove hidrolize, stoga su znanstvenici proveli postupak alkalne hidrolize dodatkom reagensa NaOH. To je omogućilo učinkovito provođenje fluorescentne reakcije s heksadeciltrimetilamonijevim bromidom (20 mmol/L). Otopinu uzorka su pripremili tako što su prah farmaceutskog pripravka indometacina otopili u 20 mmol/L otopini haksadeciltrimetilamonijeva bromida. Nakon injektiranja otopine pripremljenog uzorka i reagensa (0,1 mol/L NaOH) te SIA analize, uslijedila je fluorimetrijska detekcija (LabAlliance fluorescentni detektor LC 305) nastalog fluorescentnog intenziteta koju su izmjerili pri 278 nm (ekscitacija) i 358 nm (emisija). Dobivena je linearna kalibracijska krivulja do 10^{-5} mol/L. Granica detekcija iznosila je $1{,}6 \cdot 10^{-8}$ mol/L, relativno standardno odstupanje bilo je manje od 1,2% (n=15) [64].

3.8. Kemiluminiscencija

Luminiscencija je zajednički naziv za sve pojave ekscitacije (pobuđivanja) molekula u viša energetska stanja apsorpcijom energije koja je vrlo brza (10^{-15} s) i može se odvijati na više razina ekscitiranih elektronskih stanja. Apsorbirana energija emitira se u obliku svjetlosti i vidljiva je kao luminiscencija ili hladno svjetlucanje. Obzirom na uzrok emisije, luminiscentne metode se dijele na:

- fotoluminiscenciju (izazvana svjetlosnom energijom, fluorescencije i fosforescencija),
- kemiluminiscenciju (energija oslobođena tijekom kemijske reakcije),
- elektroluminiscenciju (izazvana električnom energijom),

- triboluminiscenciju (izazvana energijom trenja) [61].

Kemiluminiscencija (kemijska luminiscencija) je luminiscentna metoda kod koje pobuda određene molekule i emisija svjetla nastaju kao rezultat neke kemijske reakcije, najčešće su to reakcije oksidacije. Događa se kada egzotermna kemijska reakcija oslobađa energiju pri čemu nastaje elektromagnetsko zračenje – svjetlo. Postoje tri tipa reakcija kemiluminiscencije:

- reakcije sa sintetskim spojevima,
- reakcije bioluminiscencije – kemijske reakcije u živim organizmima,
- elektrokemiluminiscencijske reakcije – primjena električne struje [61].

U kemijskim reakcijama, reaktanti stvaraju prijelazna stanja i produkte u ekscitiranom elektronskom stanju koji zatim u ovisnosti o spinu elektrona prelaze u osnovno stanje preko fluorescencije ili fosforescencije. Ako u osnovno stanje prelaze preko fluorescencije, tada će objekt emitirati svjetlo samo dok je izložen izvoru energije. Ako pak prelazi preko fosforescencije, tvar će nastaviti luminiscirati i neko vrijeme nakon što se izvor energije ukloni. U reakciji najčešće sudjeluju dva reagensa, to su obično supstrat i oksidans, a moguća je prisutnost i nekih kofaktora ili katalizatora [61, 65].

Da bi došlo do emisije svjetlosti u kemiluminiscenciji, potrebno je ispuniti nekoliko zahtjeva. Prvi od njih je da raspoloživa energija za stvaranje pobuđenog stanja mora biti jednaka razlici između energije aktivacije (ΔH_A) i reakcijske energije (ΔH_E) prema jednadžbi 10. Ako je ta razlika jednaka ili veća od energije potrebne za stvaranje pobuđenog stanja (ΔE_{EX}), tada će proces luminiscencije biti uspješan [65].

$$raspoloživa\ enerija = \Delta H_A - \Delta H_E \geq \Delta E_{\mathrm{EX}} \quad (10).$$

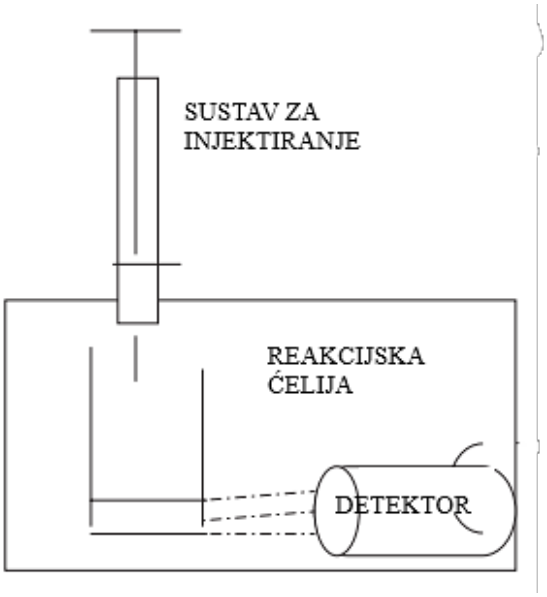
Nadalje, u reakcijskom putu ne smije doći do gubitka kemijske energije u obliku topline jer u tom slučaju reakcija neće biti kemiluminiscentna. Na reakciju može utjecati kemijska struktura molekula, a najpovoljnije su molekule koje sadrže amino i hidroksilne skupine. Važan je i utjecaj otapala, polarno otapalo bolje stabilizira pobuđeno stanje te rezultira većim valnim duljinama u odnosu na nepolarno otapalo. Također, intenzitet je jači kod otapala s većom molekulskom masom [65].

Instrumentacija koja se koristi za mjerenje kemiluminiscencije sastoji se od sustava za ubrizgavanje te reakcijske ćelije u kojoj se nalazi sustav za miješanje reagensa i detekcijski sustav. Shema instrumentacije prikazana je na slici 23. Princip je vrlo jednostavan, a temelji

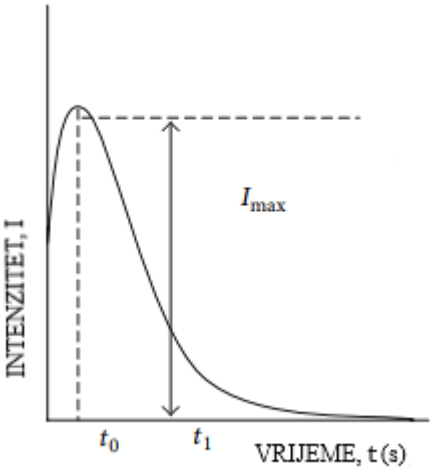
se na ubrizgavanju kemiluminiscentnog reagensa u kivetu s analitom pri čemu dolazi do kemijske reakcije u sustavu za miješanje te se emitira svjetlost koja se mjeri pomoću detektora. Dobije se krivulja koja prikazuje intenzitet kemiluminiscencije kao funkciju vremena reakcije, a prikazana je na slici 24. Brzina reakcije je funkcija kemijske koncentracije, stoga je ova metoda pogodna za kvantitativne analize [65]. Važno je napomenuti kako je detektor najvažniji dio instrumentacije i kao takav mora ispunjavati nekoliko zahtjeva:

- mora biti osjetljiv u spektralnom rasponu od 400 - 600 nm,
- izlazni signal mora biti direktno i linearno povezan s intenzitetom svjetlosti,
- signal koji daje detektor treba biti takav da se može lako prikazati i zabilježiti,
- brzina odziva detektora mora biti veća od brzine kemiluminiscentne reakcije [65].

Ova metoda pruža široki dinamički raspon i puno je osjetljivija u usporedbi s drugim spektrometrijskim tehnikama. Za razliku od fotoluminiscencije, ovdje nije potreban izvor svjetlosti zbog čega ne dolazi do raspršenja ili drugih interferencija koje su vezane uz nestabilnost svjetlosnog izvora. Također, kemiluminiscencija može biti kombinirana s drugim metodama kao što su kromatografija i kapilarna elektroforeza [65].



Slika 23. Shema instrumentacije za mjerenje kemiluminiscencije [65].



Slika 24. Ovisnost intenziteta kemiluminiscencije o vremenu reakcije [65].

Kemiluminiscencija se primjenjuje u analizama farmaceutskih proizvoda, za detekciju mikroorganizama u biologiji, u onkologiji za označavanje tumorskih markera, za analizu i određivanje plinova, u imunologiji za obilježavanje antigena i antitijela, zatim za analizu anorganskih i organskih spojeva te za DNA sekvencioniranje i brojne druge primjene u kliničkoj praksi [61].

3.8.1. Primjeri određivanja indometacina kemiluminiscencijom

Znanstvenici iz Kine su uspješno razvili kemiluminiscentni sustav za određivanje indometacina u urinu. Uzorke urina prikupili su od ispitanika volontera koji su prethodno unijeli lijek na bazi indometacina. Utvrdili su da indometacin iz uzorka u reakciji s topivim manganom (IV) stvara kemiluminiscenciju, a formaldehid poboljšava takvu reakciju. Da bi stvorili precizan kemiluminiscentni sustav, morali su načiniti MIP (eng. *molecular imprinted polymer*) kolonu kao element za prepoznavanje indometacina kojeg su spojili s prethodno opisanom kemilunimiscentnom reakcijom. Kolona se temeljila na molekularno otisnutom polimeru (MIP) indometacina kao sintetičkom materijalu koji ima sposobnost apsorbiranja ciljne molekule te odvajanje iste od interferirajućih tvari. MIP indometacina pripravili su korištenjem metakrilne kiseline i etilen glikol dimetakrilata uz prisutnost molekule indometacina. Novonastali polimer stavili su u staklenu cijev kako bi dobili MIP kolonu. Kroz nju su propustili otopinu mangana (IV) i formaldehida koji su zatim reagirali s indometacinom adsorbiranim na MIP koloni, a rezultat reakcije bila je kemiluminiscencija iz koje se detektirao lijek. Kombinaciju ovog sustava za prepoznavanje i detekcijskog sustava saželi su u četiri osnovna koraka: adsorpcija indometacina, uklanjanje interferenata,

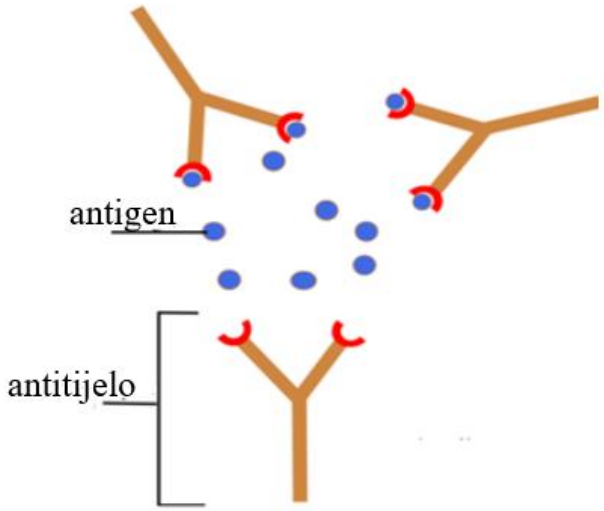
detekcija kemiluminiscencije i čišćenje MIP kolone. Intenzitet kemiluminiscencije bio je linearan u odnosu na koncentraciju indometacina u rasponu od $1 \cdot 10^{-7}$ do $1 \cdot 10^{-5}$ g/mL, koeficijent linearne korelacije iznosio je 0,994. Granica detekcije bila je $4 \cdot 10^{-8}$ g/mL, a relativno standardno odstupanje za $5 \cdot 10^{-7}$ g/mL otopine indometacina bilo je 3,1 % (n = 7). Vrijeme reakcije bilo je 40 sekundi, vrijeme adsorpcije indometacina 50 sekundi, a vrijeme koje je bilo potrebno da bi se očistila i isprala kolona iznosilo je 40 sekundi. Može se vidjeti kako je ova metoda pokazala izvrsne rezultate u određivanju indometacina u urinu te se kao takva može primjenjivati u različite svrhe [66].

Sljedeći primjer prikazuje kako se kemiluminiscencija može kombinirati s HPLC metodom i elektrolitičkim metodama. Šest znanstvenika iz Kine su istražili kako se spoj ovih metoda može primijeniti u analizi farmaceutskih, ali i bioloških uzoraka kao što je urin. Metoda se temeljila na izravnoj reakciji indometacina (Kineski farmaceutski i biološki institut za testiranje, Bingjing, Kina) i mangana (III). Prvo su izvagali određenu količinu indometacina u prahu (tablete) te su nakon otapanja, filtiranja i razrjeđivanja, dobiveni uzorak ubrizgali u HPLC kolonu s mobilnom fazom. Zatim su obradili uzorak ljudskog urina te također ubrizgali u kolonu. Presudan reagens za nastajanje kemiluminiscencije je manganov sulfat bez kojeg ne bi došlo do emisije zračenja, stoga su njega također ubrizgali u mobilnu fazu. Kromatografsko odvajanje izvedeno je na Nucleosil RP-C_{18} koloni (250 x 4,6 mm) pri temperaturi od 20 °C. Mobilna faza sastojala se od metanola, vode i octene kiseline u omjeru 67:33:0,1. Brzina protoka uzorka kroz kolonu bila je 1 mL/min, a ukupno vrijeme 10 min. S kolonom su povezali protočnu elektrolitičku ćeliju u kojoj se nalazio oksidans Mn (III). On je oksidirao indometacin iz HPLC kolone, što je rezultiralo emisijom zračenja koja je proporcionalna koncentraciji određivanog indometacina. Proučavano je nekoliko parametara na temelju HPLC rezolucije i kemiluminiscentne emisije. Linearni raspon bio je od 0,01 do 10 μg/mL s koeficijentom korelacije 0,9991. Granica detekcije iznosila je 8 ng/mL. Relativno standardno odstupanje za 0,1 μg/mL indometacina unutar jednog dana bilo je 2,2 %, a nakon šest uzastopnih dana 3 %. Iskorištenje indometacina iz uzoraka urina iznosio je više od 92 %. Preciznost rezultata ukazuje kako se ova metoda može primijeniti za kliničko praćanje i farmakokinetičko ispitivanje indometacina [67].

3.9. Imunokemijske metode

Imunokemijske metode su jednostavne, brze i osjetljive metode koje se svakodnevno koriste u rutinskim analizama kliničkih laboratorija za razlikovanje, otkrivanje i mjerenje koncentracije različitih antigena i antitijela. Jednostavnije su od ostalih metoda jer ne

zahtijevaju opsežnu pripremu uzoraka ili skupu instrumentaciju. Ove vrste metoda su brzo zamijenile dugotrajne kromatografske tehnike u kliničkoj dijagnostici te tako omogućile puno brže otkrivanje brojnih bolesti. Temelje se na specifičnoj reakciji antitijelo-antigen koja je prikazana na slici 25, specifičnost antitijela za antigene čini antitijela reagensima za detekciju antigena i obrnuto. Imunokemijske metode započinju proizvodnjom antitijela koja može biti uzrokovana različim kemijskim tvarima kao što su aminokiseline, lipidi, nukleinske kiseline, bjelančevine, steroidi i slične molekule. Antitijelo (imunoglobulin) je protein koji je nositelj imunosti organizma, a stvara se u imunološkom sustavu bilo kojeg kralježnjaka ili čovjeka kao odgovor na prisutnost strane tvari koja se naziva antigen. Antigeni ili imunogeni mogu biti proteini, nukleinske kiseline, ugljikohidrati i male organske molekule vezane na proteinske nosače. Na svakom antigenu nalazi se specifično mjesto gdje se veže antitijelo, takvo mjesto naziva se epitop. Nadalje, svako antitijelo ima specifičan i visok afinitet za antigene koji su izazvali njihovu sintezu, a njihovim vezanjem nastaje imunosni odgovor koji štiti organizam od infekcija [68, 69].



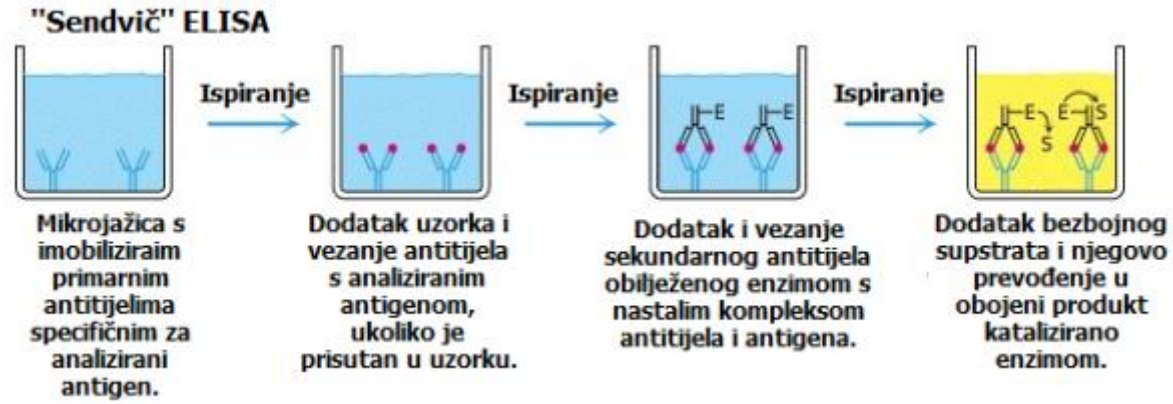
Slika 25. Prikaz reakcije antitijelo-antigen [68].

Za određivanje lijekova najčešće se koriste dvije vrste imunokemijskih metoda, a to su test enzimski povezane imunosorpcije (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) i radioimuno test (eng. *radioimmunoassay*, RIA) metoda [68, 69].

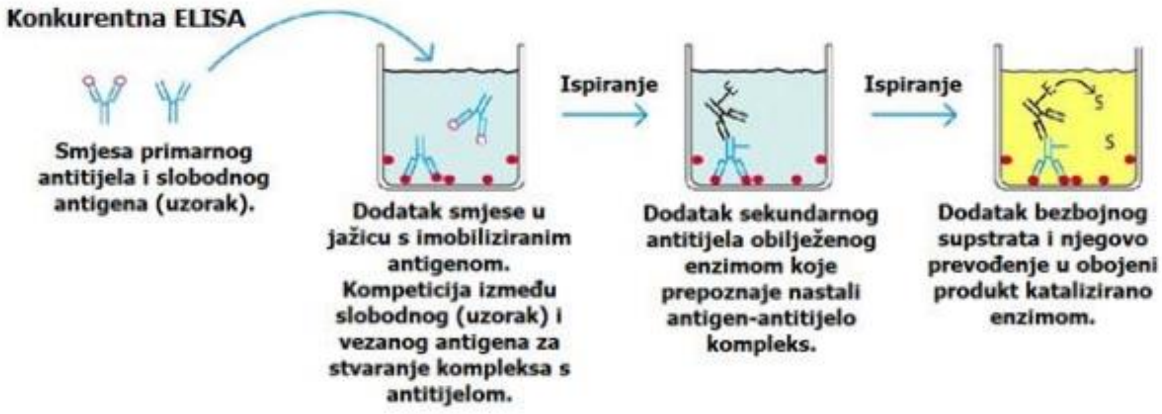
Test enzimski povezane imunosorpcije (ELISA) je imunokemijska metoda koja se zasniva na kemijskoj reakciji enzima (najčešće peroksidaza) s bezbojnim supstratom, pri čemu nastaje obojeni produkt. Enzim se kovalentno povezuje sa specifičnim antitijelom koje prepoznaje ciljni antigen. Ako je antigen prisutan, na njega će se vezati kompleks antitijelo-

enzim. Dodatkom supstrata, enzim će katalizirati reakciju u kojoj će nastati obojeni produkt čija pojava označava prisutnost antigena. Reakcija se određuje i očitava na temelju boje nastalog produkta, a mjerenje apsorbancije provodi se spektrofotometrijski. Reakcija se provodi na mikrotitracijskim pločama koje sadrže oko 96 jažica. Nadalje, u ELISA metodi se mogu koristiti dvije vrste antitijela, poliklonska i monoklonska. Poliklonska antitijela su heterogene smjese antitijela od kojih je svako specifično za različit epitop na antigenu, dok su monoklonska antitijela sva identična. Upotreba monoklonskih antitijela daje pouzdanije rezultate mjerenja. Ovim brzim testom može se detektirati vrlo mala količina proteina (10^{-9} g) kao i prisutnost infektivnih bolesti, droga, lijekova i alergena [68, 70].

Postoje dvije vrste ELISA-testa, "sendvič" ELISA i konkuretna (kompetitivna) ELISA čiji su koraci pojašnjeni na shemama prikazanim na slikama 26 i 27.



Slika 26. Shematski prikaz "sendvič" ELISA testa [71].



Slika 27. Shematski prikaz konkuretnog ELISA testa [71].

Radioimuno test (RIA) podrazumijeva *in vitro* ispitivanja kojima se mjeri prisutnost antigena s vrlo velikom osjetljivošću, a temelji se na načelu kompetitivnog vezanja antigen-

antitijelo. Prvi korak u ovom radioimunološkom mjerenju uključuje označavanje poznate količine antigena pomoću radioaktivnih izotopa (^{125}I, ^{131}I, ^{14}C ili ^{3}H). Nakon što se ciljani antigen obilježi radioizotopom, dodaje mu se poznata količina specifičnog antitijela da bi se dobila smjesa. U tu smjesu se zatim dodaje uzorak (na primjer krvni serum) da bi započela kompetitivna reakcija obilježenih antigena iz smjese i neobilježenih iz uzorka. Reakcija će osloboditi određenu količinu obilježenog antigena, a ta količina će biti proporcionalna omjeru obilježenog i neobilježenog antigena. Koncentracija neobilježenog antigena se povećava jer se veže na antitijelo i istiskuje obilježene antigene, odnosno povezani antigeni se odvajaju od nevezanih i mjeri se radioaktivnost slobodnih, obilježenih antigena. Zatim se konstruira standardna krivulja (postotak radioaktivno obilježenog antigena vezanog za antitijelo poznate koncentracije standardiziranog neoznačenog antigena) iz koje se računa nepoznata koncentracija antigena u uzorku pacijenta. Osim određivanja antigena i antitijela u serumu, ova metoda nalazi primjenu i u određivanju količine hormona i lijekova u vrlo malim koncentracijama [72].

3.9.1. Primjeri određivanja indometacina imunokemijskim metodama

Radioimuno test je starija metoda koja u današnjim kliničkim analizama nije toliko popularna, a sljedeći primjer pokazuje kako se ova metoda primjenjuje u određivanju lijekova. Tri znanstvenika su razvila radioimunološki test za određivanje indometacina u biološkim tekućinama kao što su krvna plazma i urin. U prvom koraku su posebnim postupcima pripremili konjugat (molekula nastala reakcijom izvornoga lijeka s određenim endogenim reaktantom) indometacina te su ga intramuskularno ubrizgali u bijele kuniće i nakon dva tjedna uzeli uzorke krvi (antiserum) iz arterije srednjeg uha. Količinu antitijela odredili su vezanjem radioaktivno obilježenog indometacina (2-^{14}C-indometacin) i antiseruma. Nadalje, razrijeđeni antiserum su dodali u uzorak krvne plazme ispitanika liječenih indometacinom (neobilježeni indometacin). Nakon toga su izmjerili radioaktivnost pomoću scintilacijskog brojača i konstruirali standardnu krivulju. Standardna krivulja bila je linearna u rasponu koncentracija 50-3000 ng/mL krvne plazme s koeficijentom korelacije 0,98. Raspon dobivenih koncentracija bio je 9,5-98 ng/mL, a iskorištenje 98-135 %. Kako bi odredili indometacin u ljudskom urinu, intravenski su ubrizgali 2-^{14}C-indometacin te nakon 2 sata prikupili urin. Važno je napomenuti da je specifična aktivnost ubrizganog indometacina bila manje od 2 % od onog koji je korišten za radioimunološko ispitivanje. U urinu se određivao nekonjugirani, ukupni i indometacin glukoronid. Za nekonjugirani indometacin su primijenili radioimuno test kao i kod određivanja u krvnoj plazmi, a kod

određivanja ukupnog indometacina su prethodno dodali beta-glukoronidazu (enzim koji katalizira razgradnju složenih ugljikohidrata). Koncentraciju indometacin glukoronida su dobili iz razlike ukupnog i nekonjugiranog. Koncentracije su dobivene na isti način kao i kod određivanja krvne plazme, ukupni indometacin 8,54 μg/mL, nekonjugirani 4,63 μg/mL i indometacin glukoronid 3,91 μg/mL. Koeficijent korelacije iznosio je 0,995 [73].

Prethodno opisanu metodu najčešće zamjenjuje suvremenija i preciznija metoda, a to je test enzimski povezane imunosorpcije (ELISA). Znanstvenici iz Kine su primijenili osjetljivu i specifičnu konkurentnu ELISA metodu kako bi odredili koncentraciju farmaceutskog indometacina u različitim uzorcima vode. U prvom koraku su pripremili imunogen (antigen za proizvodnju antitijela) i antigen za uspostavu ELISA metode koji se nanosi na dno jažice. To su pripravili metodom anhidridnog estera gdje su kovalentno vezali indometacin na proteinske nosače albumina (BSA) i ovalbumina (OVA) goveđeg seruma. Zatim su imunizirali dva zeca tako što su 1 mg otopljenog imunogena ubrizgali u zečja leđa. Nakon određenog vremena, proizvedena su potrebna antitijela, a zečevima je uzeta krv (antiserum) te pohranjena na nisku temperaturu. Postupak ELISA metode započeli su dodatkom antigena u jažice nakon čega su dodali uzorke te razrijeđeni antiserum. Nakon inkubacije dodali su supstrat kako bi se razvila boja te sumpornu kiselinu kako bi se zaustavila enzimska reakcija. Mjerenja su izvršili spektrofotometrijski na valnoj duljini 450 nm. Koncentracije indometacina u uzorcima bile su: 0,024 ng/mL (Jinjiang rijeka), 0,109 ng/mL (Funan rijeka), 0,857 ng/mL (bazeni) i 2,574 ng/mL (bolnica). Relativno standardno odstupanje bilo je 3,5-10,6 %. Iskorištenja su bila unutar 98-123 %. Kako bi se ispitala stabilnost i osjetljivost razvijene metode, konstruirali su kalibracijske krivulje iz antiseruma u rasponu koncentracija 0,01-10 ng/mL te izmjerili polovinu maksimalne inhibitorne koncentracije, IC_{50} vrijednost (kvantitativna mjera koja pokazuje koliko je inhibicijske tvari potrebno za inhibiciju biološke komponente ili procesa za 50 %). Dobivena je koncentracije u rasponu 0,01-10 ng/mL, a granica detekcije iznosila je oko 0,01 ng/mL. Da bi se razvijena ELISA metoda validirala, proveli su HPLC analizu istih uzoraka vode. Konstruirali su kalibracijsku krivulju u rasponu koncentracija 10-2000 ng/mL s linearnim koeficijentom korelacije 0,9991. Granica detekcije iznosila je 5 ng/mL, a relativno standardno odstupanje za šest ponovljenih mjerenja bilo je u rasponu 3,3-9,4 %. Zatim su usporedili dobivene rezultate ELISA i HPLC metoda te izračunali koeficijent korelacije koji je iznosio 0,988, što pokazuje dobru povezanost rezultata ovih dviju metoda [74].

3.10. Usporedba metoda određivanja indometacina

U tablici 1 prikazana je usporedba prethodno opisanih metoda za određivanje indometacina. S obzirom na specifičnosti samih metoda, najniža granica detekcije pri određivanju indometacina dobivena je koristeći ELISA test.

Tablica 1. Prikaz metoda korištenih za određivanje indometacina, korištenih uzoraka, mjernog područja metode, dobivenog koeficijenta korelacije te granice detekcije navedenih metoda.

METODA	**UZORAK**	**MJERNO PODRUČJE / [µg/mL]**	**KOEFICIJENT KORELACIJE**	**GRANICA DETEKCIJE / [µg/mL]**	**IZVOR**
Potenciometrija	Farmaceutski pripravak	3,58 - 3577,88	0,9980	1,13	[15]
	Farmaceutski pripravak	35,78 - 17889,4	-	10,73	[16]
Voltametrija	Plazma štakora	0,2 - 1,2	0,9986	-	[33]
	Krvni serum i urin čovjeka	0,07 - 2,15	0,987	$4{,}72 \cdot 10^{-3}$	[34]
HPLC	Plazma djece	0,1 - 10	0,999	0,06	[39]
	Svinjska plazma	0,05 - 3	>0,98	0,01	[40]
	Farmaceutski pripravak	10,7 - 64,08	0,9980	0,02	[41]
GC	Krv i urin čovjeka	0,01 - 1	-	-	[42]
UV spektroskopija	Farmaceutski pripravak	5 - 25	0,999	0,383	[51]
	Farmaceutski pripravak	1 - 10	0,9947	0,602 - 0,129	[52]
Kolorimetrija	Farmaceutski pripravak	3,3 - 11	-	0,90	[59]
	Farmaceutski pripravak	14,31 – 71,56	0,9998	-	[60]
Fluorimetrija	Ljudski serum	0,05 - 30	0,9998	0,01	[62]
	Ljudski serum	0,1 - 10	0,999	0,01	[63]
Kemiluminiscencija	Urin	0,1 - 10	0,994	0,04	[66]
	Urin	0,01 - 10	0,9991	$8 \cdot 10^{-3}$	[67]
Radioimuno test	Farmaceutski pripravak	0,05 - 3	0,995	-	[73]
ELISA	Voda	$1 \cdot 10^{-5}$ - 0,01	-	$1 \cdot 10^{-5}$	[74]

4. ZAKLJUČAK

Indometacin je nesteroidni protuupalni lijek koji se pokazao kao jedan od najučinkovitijih lijekova u terapijama reumatskih poremećaja i sličnih stanja kod pacijenata. Mehanizam djelovanja mu se temelji na blokiranju sinteze prostaglandina čime se postiže protuupalni, analgetski i antipiretski učinak. Prije same primjene, potrebno je osigurati kontrolu kvalitete te odrediti koncentraciju indometacina iz cjelovitog farmaceutskog oblika. Osim toga, određivanje ovog lijeka ima veliki značaj u kliničkoj praksi gdje se njegovom identifikacijom mogu pratiti različite terapije pacijenata. Određivanje indometacina se postiže primjenom sljedećih metoda: potenciometrija, voltametrija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), UV spektroskopija, kolorimetrija, fluorimetrija, kemiluminiscencija i imunokemijske metode (ELISA i radioimuno test). Bolja preciznost mjerenja postiže se kombinacijom prethodno navedenih metoda. U radu su navedeni primjeri određivanja indometacina za svaku od metoda. Kako bi se osigurala pouzdanost mjerenja, znanstvenici su ispitivali osnovne validacijske značajke; linearnost, točnost, preciznost, selektivnost, koeficijent korelacije, relativno standardno odstupanje, granicu detekcije te granicu kvantifikacije. Iz svih mjerenja, zaključeno je da je svaka od metoda pogodna za određivanje indometacina. Postignuta je izvanredna linearnost metoda, zatim niske granice detekcije i kvantifikacije što upućuje na to da su metode osjetljive i stoga prikladne za analizu niskih koncentracija indometacina u uzorcima. Nadalje, niske RSD vrijednosti upućuju na ponovljivost metoda, a ostali validacijski parametri pokazuju izuzetnu točnost i preciznost. Zaključeno je da su kemiluminiscencija (urin), fluorimetrija (serum), voltametrija (životinjska plazma, krvni serum i urin čovjeka), GC (ljudska krv i urin) i HPLC metoda (ljudska i životinjska plazma) više primjenjive u kliničkom određivanju indometacina. S druge strane, UV spektroskopija, kolorimetrija, radioimuno test i potenciometrija su se pak najviše koristile za farmaceutsko određivanje indometacina iz konkretnih farmaceutskih pripravaka. Osim toga, indometacin se određivao i u uzorcima vode za što se najupješnijom pokazala ELISA metoda koja je ujedno dala i najnižu granicu detekcije pri određivanju indometacina. Potrebno je i dalje raditi na ovim metodama kako bi se postigla nova saznanja i uspješno primijenila u farmaceutskoj i kliničkoj praksi.

5. LITERATURNA VRELA

[1] S. Lucas, Headache 56 (2016), 436-446.

[2] J. R. Vane, R. M. Botting, Am. J. Med. 104 (1998), 2S-8S.

[3] https://www.drugbank.ca/drugs/DB00328 (17.3.2020.)

[4] F. D. Hart, P. L. Boardman, Br Med J. 2 (1963), 965-970.

[5]https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/018878s027lbl.pdf (19.3.2020)

[6] M. Weber, L. Kodjikian, F. E. Kruse, Z. Zagorski, C. M. Allaire, Acta Ophtalmol. 91 (2012), 15-21.

[7]https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/018829s022lbl.pdf (20.3.2020)

[8] G. Alvan, M. Orme, L. Bertilsson, R. Ekstrand, L. Palmer, Clin Pharmacol Ther. 18 (1975), 364-373.

[9] L. Hellberg, Clin Pharmacokinetics 6 (1981), 245-258.

[10] C. A. Rouzer, L. J. Marnett, J Lipid Res. 50 (2009), 29-34.

[11] E. Ricciotti, G. A. Fitz Gerald, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31 (2011), 986-1000.

[12] https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=50707 (20.3.2020.)

[13] http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/3/387/F5 (16.4.2020.)

[14] https://www.belupo.hr/media/products/Indometacin_kapsule-U.pdf (16.4.2020)

[15] J. Lenik, C. Wardak, Procedia Engineering 47 (2012), 144-147.

[16] Z. Kormosh, I. Hunka, Y. Bazel, Materials Science and Engineering C 29 (2009), 1018-1022.

[17] D. A. Skoog, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga , Zagreb, 1999.

[18] N. Sakač, *Novi potenciometrijski amilazni senzor*, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.

[19] https://www.periodni.com/enig/potenciometrijski_senzori.html (17.4.2020.)

[20] M. Hajduković, *Određivanje anionskih tenzida u realnim sustavima metodom injektiranja u protok*, Specijalistički rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Institut Ruđer Bošković Zagreb, Poslijediplomski specijalistički interdisciplinarni studij Zaštita prirode i okoliša, Osijek, 2016.

[21] I. Piljac, Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, Media Print, Zagreb, 2010.

[22] V. Rumenjak, I. Kruhak, S. Milardović, B. Borovnjak-Zlatarić, D. Iveković, Biochemica Medica 6 (1996), 223-237.

[23] M. Medvidović-Kosanović, Praktikum fizikalne kemije, Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, 2012.

[24] A. Radu, T. Radu, C. McGraw, P. W. Dillingham, S. Anastazova-Ivanova, D. Diamon, J. Srb. Chem. Soc. 78 (2013), 1729-1761.

[25] M. Buzuk, *Razvoj senzora za određivanje ionskih vrsta u vodenom mediju*, doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.

[26] O. Galović, *Razvoj i konstrukcija potenciometrijskog mikrosenzora za tenzide*, doktorski rad, Zagreb, 2014.

[27] I. Šramkova, *Potentiometric determination of ibuprofen*, doktorska disertacija, Hradec Králové, 2010.

[28] B. G. Lipták: Process measurement and analysis, Butterworth-Heinemann Limited, Oxford, 1995.

[29] I. Kereković, S. Milardović, Vježbe iz kemije okoliša, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2008.

[30] M. Hajduković, *Fizikalno-kemijska i analitička karakterizacija funkcionaliziranih nanomaterijala kao potencijalnih tenzidnih senzora*, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.

[31] S. Luterotti, D. Bicanic, Odabrane teme iz bioanalitike, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.

[32] F. Scholz, Electroanalytical Methods, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

[33] M. A. A. Ragab, M. A. Korany, S. M. Galal, A. R. Ahmed, Bioanalysis 11 (2018), 73-84.

[34] S. R. Sataraddi, S. M. Patil, A. M. Bagoji, V. P. Pattar, S. T. Nandibewoor, International Scholarly Research Notices 2014 (2014), 1-9.

[35] F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spoendlin, Journal of Chromatography A. 1036 (2004), 127-133.

[36] F. A. Settle, Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1997.

[37] S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2002.

[38]https://galusaustralis.com/2020/03/545979/global-high-performance-liquid-chromatography-hplcdevice-market-demand-2020-by-companies-waters-corporation-agilent-technologies-shimadzu-corporation-thermo-fisher-scientific/ (13.6.2020.)

[39] I. Niopas, K. Mamzoridi, J Chromatogr B Biomed Appl. 656 (1994), 447-450.

[40] V. Boon, B. Glass, A. Nimmo, *Journal of Chromatographic Science* 44 (2006), 41–44.

[41] M. Y. Khuhawar, F. M. A. Rind, A. D. Rajper, Acta Chromatographica 15 (2005), 269-275.

[42] R. G. Sibeon, J. D. Baty, N. Baber, K. Chan, M. L. E. Orme, Journal of Chromatography A 153 (1978), 189-194.

[43] J.- L. Zhao, G.- G. Ying, L. Wang, J.- F. Yang, X.- B. Yang, L.- H. Yang, X. Li, Science of total environment 407 (2009), 962-974.

[44] I. Pepić, Farm. Glas 59 (2003), 235-247.

[45] https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=63114 (19.6.2020.)

[46] D. C. Harris, Quantitative chemical analysis, 8th ed., W. H. Freeman, New York, 2010.

[47] T. Gazivoda Kraljević, Određivanje struktura organskih spojeva – nastavni tekst, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za organsku kemiju, Zagreb, 2016.

[48] G. Verma, M. Mishra, World Journal of Pharmaceutical Research 7 (2018), 1170-1180.

[49] I. Strelec, Praktikum iz biokemije, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

[50] https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/beers1.htm (20.6.2020.)

[51] S. B. Rathod, P. A. Salunke, V. C. Kulkarni, B. R. Chavhan, S.D. Barhate, Journal of Pharmaceutical Research 11 (2017), 124-127.

[52] K. Fadhil Ali, A. R. M. Albakaa, Z. Hussein Ali, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 7 (2015), 1591-1596.

[53] https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=8458 (29.6.2020.)

[54] N. Ohta, A. Robertson, Colorimetry: Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, Ltd, England, 2005.

[55]http://home.iitk.ac.in/~madhavr/CHM102/Notes_on_Color_of_Inorganic_Complexes.pdf (29.6.2020.)

[56] M. Tomljanović, Instrumentalne kemijske metode I dio, U. G. Hijatus, Zenica, 2000.

[57] https://ru-ve.hr/proizvod/prijenosni-kolorimetri-90-203 (29.6.2020.)

[58] https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=32480 (29.6.2020.)

[59] O. A. Adegoke, O. S. Idowu, A. A.Olaniyi, Acta Pharmaceutica 56 (2006), 189-202.

[60] M. H. Abdel-hay, M. A. Korany, M. M.Bedair, A. A. Gazy, Analytical Letters 23 (1990), 281-294.

[61] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd edition, Springer, Baltimore, 2006.

[62] K. Mawatari, F. Linuma, M. Watanabe, J Chromatogr. 491 (1989), 389-396.

[63] H. Kubo, Y. Umiguchi, T. Kinoshita, Chromatographia 33 (1992), 321-324.

[64] P. C. A. G. Pinto, M. L. M. F. S. Saraiva, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, Analytica Chimica Acta 539 (2005), 173-179.

[65] T. H. Fereja, A. Hymete, T. Gunasekaran, Hindawi Publishing Corporation 2013 (2013), 1-12.

[66] F. Nie, J. Lu, Y. He, J. Du, Talanta 66 (2005), 728-733.

[67] Y. Zhang, Z. Zhang, G. Qi, Y. Sun, Y. Wei, H. Ma, Anal Chim Acta 582 (2007), 229-34.

[68] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Strayer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[69] M. E. Koivunen, R. L. Krogsrud, Labmedicine 37 (2006), 490-497.

[70] S. D. Gan, K. R. Patel, Journal of Investigative Dermatology 133 (2013), 1-3.

[71] https://microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications/ (2.8.2020)

[72]https://microbenotes.com/radioimmunoassay-principle-uses-and-limitations/ (2.8.2020)

[73] L. E. Hare, C. A. Ditzler, D. E. Duggan, Pharmaceutical Science 66 (1977), 486-489.

[74] S.- M. Huo, H. Yang, A.- P. Deng, Talanta 73 (2007), 380-386.