Kromatografija kao analitička metoda za određivanje bioloških uzoraka

Severović, Marta

Undergraduate thesis / Završni 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:182:436040

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Marta Severović

Kromatografija kao analitička metoda za određivanje bioloških uzoraka

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2020.

Sažetak

Kromatografija je jedna od fizikalno-kemijskih metoda koja se temelji na razdvajanju smjesa, pri čemu se sastojci smjesa razdjeljuju između dviju faza. Svaka od kromatografskih metoda sastoji se od dvije faze, a to su nepokretna (stacionarna) i pokretna (mobilna) faza. Rezultat kromatografske analize je kromatogram koji nam služi za identifikaciju sastojaka. Kromatografiju dijelimo na dvije velike skupine: plošna kromatografija i kromatografija na stupcu. Kromatografija koja je danas najzastupljenija u znanstvenim i medicinskim istraživanjima je tekućinska kromatogrfija visoke djelotvornosti ili HPLC (engl. *High Performance Liquid Cromatography*). Zbog visoke osjetljivosti i analize širokog spektra uzoraka, koristi se i za analizu nekih bioloških uzoraka. Krv i kosa, kao biološki uzorci, najčešće se korsite za detekciju droga. Krv kao najpouzdaniji uzorak, zatim kosa kao uzorak koji najduže zadržava drogu, ekstrakcijskim se metodama pripremaju za imunokemijsku analizu, nakon čega se rezultati potvrđuju kromatografskim metodama. Kromatografske metode koje se koriste u svrhu analize droga su: tankoslojna kromatografija (TLC), plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija s visokom djelotvornosti (HPLC) i plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC/MS).

Ključne riječi: kromatografija, HPLC, biološki uzorci, TLC, GC, GC/MS

Abstract

Cromatography is one of physico-chemical methods based on the separation of the mixture, where ingredients of the mixture are separated through two phases. Each chromatographic method undergoes two phases called stationary and mobile phase. Result of chromatographic analisys is chromatogram which is used to identify ingredients. Cromatography is divided in two major groups: planar chromatography and column chromatography. Technique which is most commonly used in scientific and medical researches is HPLC (High Performance Liquid Chromatography). This technique is also used for analyzing some biological samples due to its high sensitivity and broad-spectrum sample analysis. Blood and hair, as biological samples, are most often used for drug detection. Blood, as the most reliable sample, and hair, as the one which retains drugs the longest, are prepared for immunochemical analysis using extraction methods. Chromatographic methods used for analyzing drugs are: thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS).

Key words: chromatography, HPLC, biological samples, TLC, GC, GC/MS

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Povijest kromatografije 2

3. Kromatografija 2

3.1. Nepokretna faza 2

3.2. Pokretna faza 3

3.3. Kromatografska analiza 3

3.4. Kromatogram 3

4. Podjela kromatografskih metoda 4

4.1. Plošna kromatografija 5

4.1.1. Tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC) 5

4.1.2. Papirna kromatografija (engl. *Paper Cromatography*, PC) 6

4.2. Kromatografija na stupcu 6

4.2.1. Plinska kromtografija (engl. *Gas Cromatography*, GC) 6

4.2.1.1. Primjena plinske kromatografije 7

4.2.2. Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Cromatography*, LC) 8

4.2.2.1. Primjena tekućinske kromatografije 8

4.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Cromatography*, HPLC) 9

4.2.3.1. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti 10

4.2.4. Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (UPLC, engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography)* 11

5. Biološki uzorci 11

5.1. Krv 11

5.2. Kosa – biološki uzorak za analizu droga 12

6. Uzorkovanje 13

6.1. Uzorkovanje krvi kao biološkog uzorka 13

7. Priprema bioloških uzoraka za analizu 14

7.1. Metode ekstrakcije 14

7.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom 15

7.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće 16

8. Analitičke tehnike za analizu droga 16

8.1. Masena spektrometrija 17

8.1.1. Primjena plinske kromatografije/masene spektrometrije 17

9. Interpretacija rezultata analize droga u kosi 20

10. Zaključak 22

11. Literatura 23

1. Uvod

Kromatografija kao analitička metoda, temelji se na razdvajanju smjesa između faza kod kojih ne dolazi do međusobnog miješanja. U odnosu na početak kromatografije, dogodio se razvoj koji traje sve do danas. Različite kromatografske metode, danas služe za široki spektar analiza, od jednostavnih do kompleksnih tvari.

U ovom radu prikazane su kromatografske metode, od povijesti pa sve do danas. Prikazana je analiza bioloških uzoraka kromatografskim metodama. Kao biološki uzorci opisani su krv i kosa, koji ujedno služe za analizu droga u organizmu. Nakon pravilnog uzorkovanja, pripreme biološkog uzorka, analiza se sastoji od imunokemijskih metoda, nakon čega se potvrđuje kromatografskim metodama.

2. Povijest kromatografije

Kromatografija se u povijesti počela razvijati sredinom devetnaestog stoljeća. Ruski botaničar, Michail Semjonowitsch Tswett, izumio je kromatografiju početkom dvadesetog stoljeća. Kromatografsku tehniku primijenio je za separaciju otopine biljnih pigmenata, klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu usitnjenim kalcijevim karbonatom. Kao rezultat dobio je odjeljene sastojke na koloni, obojene vrpce prema kojima je ta tehnika dobila ime kromatografija (grč. *chroma* = boja i *graphein* = pisati) [1]. Britanski znanstvenici i dobitnici Nobelove nagrade za kemiju (1952. g.), Archer John Porter Martin i Richard Laurence Millington Synge, otkrili su particijsku kromatografiju te su pridonijeli značajnom razvitku kromatografije. Kod particijske kromatografije, raspodjela spojeva je između dvije tekuće faze. Kao dvije tekuće faze koristili su vodenu fazu i kloroformsku fazu kako bi odvojili aminokiseline u aparatu za ekstrakciju. Sporost ove metode, potaknulo je znanstvenike na daljnji razvoj i otkriće bržih kromatografskih metoda [2].

3. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije koja se zasniva na različitoj raspodjeli sastava uzorka unutar dvije faze od kojih je jedna nepokretna ili stacionarna, a druga pokretna ili mobilna i kreće se u određenom smjeru, te se međusobno ne miješaju. Prema fizikalnom stanju ovih dviju faza podijeljene su kromatografske tehnike. Kromatografske tehnike se primjenjuju u različitim područjima ljudskog djelovanja, a služe za separaciju, identifikaciju i kvantitativnu analizu sastojaka koji su prisutni u kompleksnim spojevima [1].

3.1. Nepokretna faza

Stacionarna ili nepokretna faza je čvrsta tvar ili kapljevina koja se može nanositi na površinu plohe ili ispunjavati cijev. Prema kemijskoj strukturi i polarnosti, sorbensi, koji tvore nepokretnu fazu, dijele se na:

- polarne anorganske (hidrofilne) sorbense (silikagel, aluminijev oksid i magnezijev silikat),
- nepolarne anorganske sorbense (aktivni ugljen, grafit),
- polarne vezane faze (amino propil, cijanopropil, diol),
- nepolarne vezane faze (alkani),
- polarne organske sorbense (celuloza, hitin i poliamid).

Izbor odgovarajućeg sorbensa povezan je s prirodom spoja koji se ispituje, ravnotežom kromatografskog procesa i vrstom nastale veze između spoja koji se ispituje i kromatografske podloge [3].

3.2. Pokretna faza

Pokretna faza može biti plin, tekućina ili fluid koji se kreće kroz ili uzduž nepokretne faze u odgovarajućem smjeru. Eluens je otapalo koje nosi sastojke smjese kroz stacionarnu fazu [1].

3.3. Kromatografska analiza

Kromatografska analiza se sastoji od nekoliko osnovnih koraka.

1. Unošenje ili injektiranje analita (unošenje uzorka u mobilnu fazu),
2. Odvajanje analita u koloni – komponente iz analita se odjeljuju na temelju različite raspodjele između dviju faza,
3. Eluiranje / ispiranje komponenti iz kolone – dodatkom novih količina otapala ispiru se sastojci koji prolaze kroz kolonu; ukoliko je nepokretna faza polarna, za pokretnu fazu uzima se nepolarna, a različite komponente izlaze iz kolone u različitim vremenima,
4. Identifikacija - mjerenjem neke od fizikalnih svojstava komponente analiziraju se eluirane komponente [4].

3.4. Kromatogram

Kromatogram je rezultat neke od funkcija koncentracije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu eluiranja. Kromatografski pik na osi označenoj vremenom služi za detekciju komponente, dok se ispod pika nalazi površina iz koje se može odrediti količina pojedinog sastojka (Slika 1) [5].

- Faktor zadržavanja ili retencijski faktor (k): pokazuje duljinu zadržavanja sastojka na koloni, pretpostavljajući da nema povezivanja sa stacionarnom fazom. Definiran je izrazom 1

$$k = \frac{(tR - tM)}{tM} \quad (1)$$

gdje je t_R vrijeme zadržavanja analita, a t_M vrijeme zadržavanja mobilne faze.

- Faktor razdvajanja ili faktor odjeljivanja je mjera za selektivnost kromatografskog sustava za dva različita sastavna dijela uzoraka, koji ovise o međudjelovanju spoja i stacionarne faze. Definiran je izrazom 2

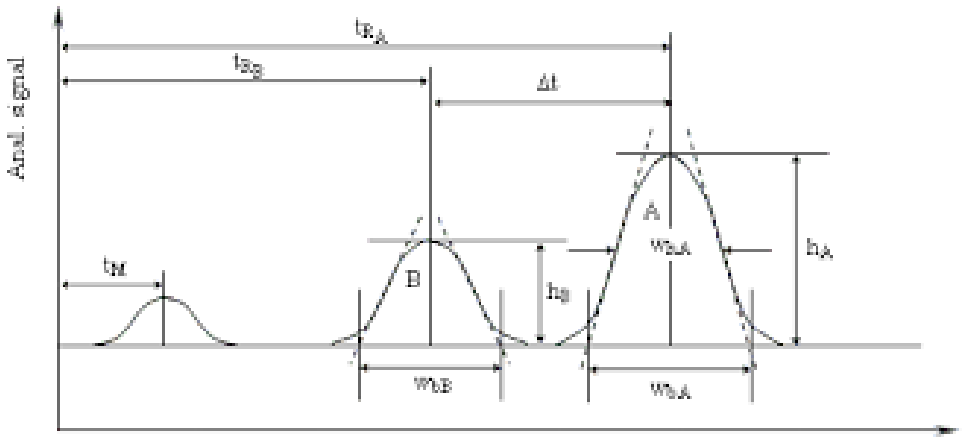
$$\alpha_{A/B} = \frac{k2}{k1} = \frac{tR2'}{tR1'}, \quad (2)$$

gdje je t_{R2}, vrijeme prilagođeno zadržavanju analita 2, a t_{R1}, je vrijeme prilagođeno zadržavanju analita 1.

- Broj teorijskih tavana predstavlja fazne prijelaze postignute na odgovarajućoj koloni, te je definiran izrazom 3

$$N = 16\,(\frac{tR}{wb})^2 \qquad (3)$$

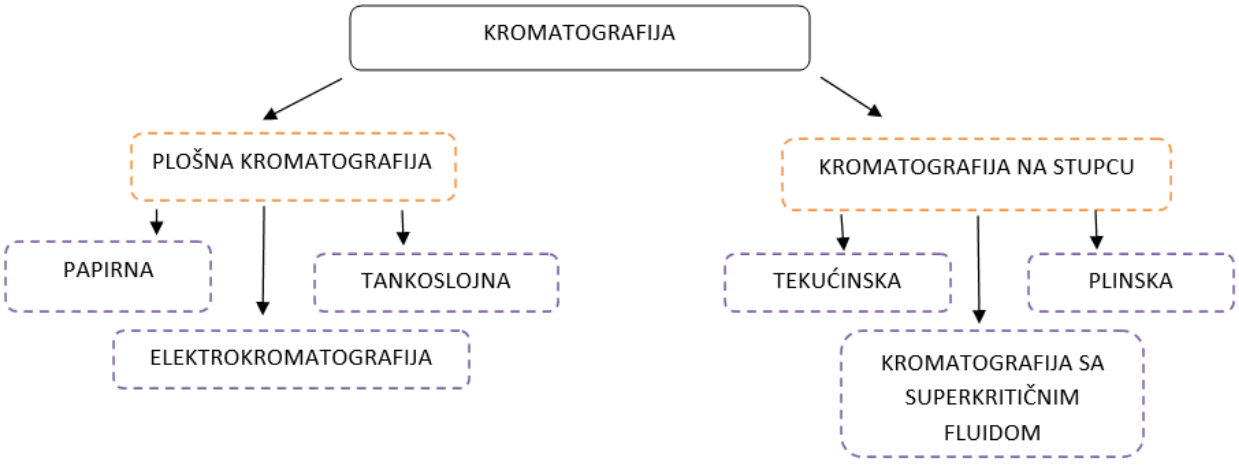
gdje je w_b širina pika u osnovici. Povećanjem broja teorijskih tavana, povećava se djelotvornost kromatografske kolone.



Slika 1: Prikaz kromtograma [6]

4. Podjela kromatografskih metoda

Za raspodjelu kromatografskih metoda postoje različiti kriteriji. Na slici 2 prikazana je podjela kromatografije prema obliku kromatografske podloge.



Slika 2: Podjela kromatografskih metoda

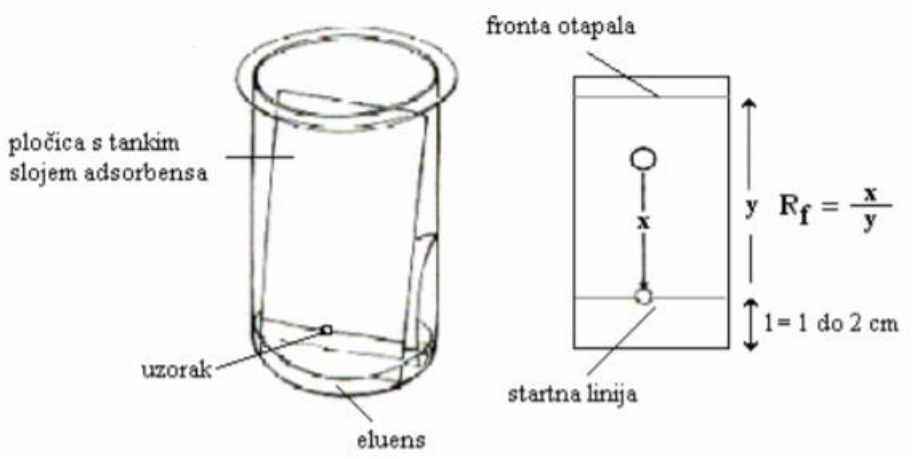
4.1. Plošna kromatografija

U plošnoj kromatografiji nepokretna faza nanosi se u tankom sloju na ravnu površinu plohe, dok se pokretna faza kreće kroz nepokretnu fazu utjecajem kapilarnih sila, gravitacije ili električnog potencijala [4].

4.1.1. Tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC)

Kod tankoslojne kromatografije, tvar koja adsorbira, nanosi se u tankom sloju na staklenu, plastičnu ili metalnu ploču. Uglavnom se koristi silika gel, aluminijev oksid, glinica, dok se kao tekuća mobilna faza koristi otapalo/smjesa otapala. Tankoslojna kromatografija se koristi za odvajanje komponenti iz smjese na temelju njihovog različitog polariteta. Uzorak se nanosi na startnu liniju na pločici, udaljenu 1 cm od ruba pločice. Pločica, na koju je nanesen adsorbens, stavlja se u posudu s otapalom i filter-papirom uronjenenim u otapalo. Filter-papir služi kako bi se posuda zasitila parama otapala, dok otapalo uz pomoć kapilarnih sila putuje prema vrhu pločice i različitim brzinama eluira komponente smjese; ova faza se naziva razvijanje kromatograma (Slika 3). Prije nego li fronta otapala dođe do ruba pločice, pločica se izvadi iz posude i označi se frontna linija. Ona označava mjesto do kojeg je stiglo otapalo. Nakon sušenja pločice, detektiraju se zone na kromatogramu. Kod obojenih tvari zone se vide pod dnevnim svjetlom, dok se bezbojne tvari detektiraju pod ultraljubičastim svjetlom ili se prskaju određenim reagensima kako bi postale vidljive (npr. sumporna kiselina) [1]. Na temelju izračuna pomoću *Rf* vrijednosti ili retencijskog faktora, može se odrediti pokretljivost spoja na tankom sloju, te se tako može indetificirati spoj. *Rf* vrijednost se definira kao omjer puta kojeg je tvar prešla *(x)* i puta koje je prešlo otapalo (*y*), prikazno izrazom 4 [7]:

$$\mathrm{Rf} = \frac{x}{y} \tag{4}$$



Slika 3: Razvijanje kromatograma [7]

4.1.2. Papirna kromatografija (engl. *Paper Cromatography*, PC)

Papirna kromatografija se koristi kod identifikacije supstancija te ispitivanja njihove čistoće. Kod papirne kromatografije, kao stacionarna faza, koristi se visokokvalitetni filter-papir, dok se kao mobilna faza koristi otopina razvijača. Prednost papirne kromatografije je relativna brzina metode i mala količina materijala koja je potrebna za izvedbu [1].

4.2. Kromatografija na stupcu

Kromatografija na stupcu (u koloni) je metoda u kojoj je uska cijev ispunjena stacionarnom fazom, dok pokretna faza prolazi kroz tu cijev uslijed djelovanja tlaka ili gravitacije. Takva metoda najčešće služi za odjeljivanje uzorka, da bi se izlučila tražena supstanca iz smjese. Kromatografiju na stupcu dijelimo prema agregacijskom stanju tekuće faze, te tako imamo plinsku, tekućinsku i kromatografiju sa superkritičnim fluidom [4].

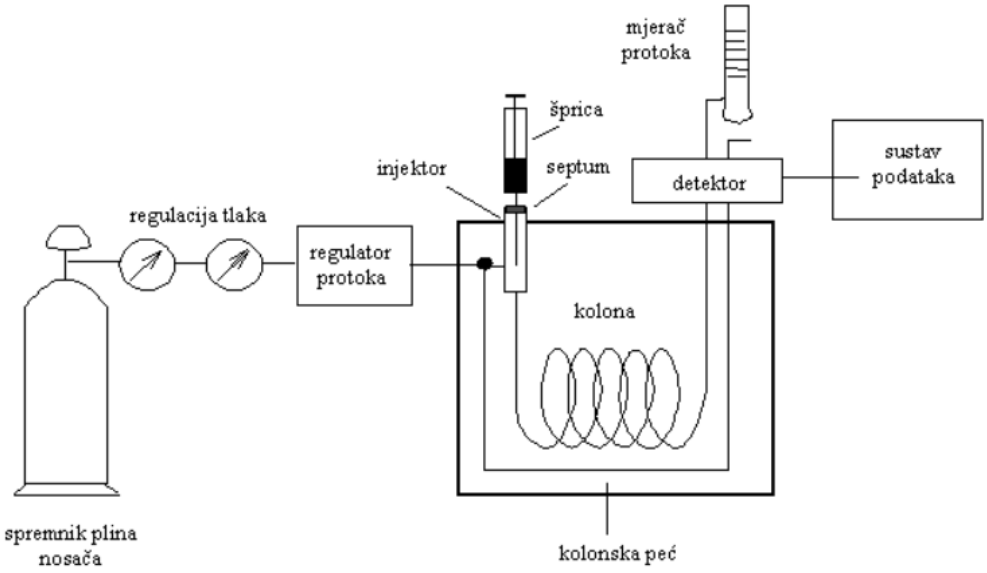
4.2.1. Plinska kromtografija (engl. *Gas Cromatography*, GC)

U plinskoj kromatografiji, mobilna faza je inertni plin (N_2, He, Ar, H_2), te se ona uvijek provodi u koloni. Stacionarna faza je čvrsta tvar koju možemo podijeliti na dvije skupine; stacionarna faza za separaciju supstance male molekulske mase (čvrsta tvar velike specifične površine) i stacionarna faza za separaciju supstance velike molekulske mase (na površini čvrstog nosača nanesena tekuća faza) [8].

Postoje četiri etape plinsko-kromatografske analize: (Slika 4)

- Unošenje ili injektiranje uzorka na vrh kolone,

- prijenos uzorka pokretnom fazom kroz kolonu,
- adsorpcija supstanci u pokretnoj fazi,
- identifikacija supstanci.



Slika 4: Detaljan prikaz plinskog kromatografa [8]

Injektorom se unosi uzorak, koji zatim isparava te struja plina nosača unosi uzorak unutar kolone. Adsorpcija analita na stacionarnu fazu događa se u koloni, zatim dolazi do ponovnog isparavanja supstanci u mobilnu fazu. Na temelju razlike u polarnosti i hlapljivosti, tvari će kroz kolonu putovati različitim brzinama. Nakon izlaska iz kolone, bit će detektirane i ispisane u obliku kromatograma.

Plinskom kromatografijom analiziraju se razne vrste toksičnih spojeva, kakvoća različitih proizvoda te analize za medicinska i znanstvena istraživanja. [9]

4.2.1.1. Primjena plinske kromatografije

Plinska kromatografija, kao analitička metoda, koristi se za određivanje alkohola u krvi. Metoda je jednostavna, specifična i pouzdana. Uzorci i referentni standardi pripremaju se stavljanjem 1 mL krvi u bočicu sa serumom koja sadrži 20 mg natrijevog fluorida i zatvara se gumenim čepom. Nakon postizanja ravnoteže u termostatski kontroliranoj vodenoj kupelji, malo iznad sobne temperature, 1 mL glavnog plina uklanja se i ubrizgava u plinski kromatograf pomoću dvostrukog detektora vodikovog plamena. Nisu potrebni interni standardi. Referentni standardi prikladno se pripremaju od svježe goveđe krvi konzervirane natrijevim fluoridom i stabilni su čak tri mjeseca [10].

U istraživanju određivanja ugljikovog monoksida (CO) u ljudskoj krvi, korištena je metoda plinske kromatografije. Ugljikov monoksid vezan za hemoglobin, oslobađa se hemolizom i reakcijom s $K_3Fe(CN)_6$ u zatvorenom sustavu. Oslobođeni plinovi zatim se prebacuju na molekularno sito od 5 A, gdje se CO odvaja od ostalih plinova krvi. Nakon katalitičke redukcije u metan, CO se detektira plamenom ionizacijom. Metoda je brza, specifična i dovoljno osjetljiva da omogući analizu od 0,1 mL uzorka normalne krvi. Točnost metode, izražena kao koeficijent varijacije (SD x 100 / srednja vrijednost), iznosi 1,8 % za normalnu ljudsku krv [11].

4.2.2. Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Cromatography*, LC)

Tekućinska kromatografija je vrsta kromatografije koja služi za odjeljivanje otopljenih tvari. Mobilna faza je tekućina i naziva se eluens. Na temelju razlika u adsorpciji, izmjeni iona, razdjeljenjima između faza, tvari iz otopina, imaju različito međudjelovanje s pokretnom i nepokretnom fazom [12].

4.2.2.1. Primjena tekućinske kromatografije

Opisana metoda tekućinske kromatografije, može se koristiti za analizu krvi, plazme i urina, a primjenjiva je za određivanje zearalenona i α-zearalenola na razinama od 0,5 ng / mL u plazmi i 5 ng / mL urina. Zearalenon pripada skupini fitoestrogena i metabolit je toksogenih plijesni roda *Fusarium*. Javlja se kao prirodni kontaminat koji se može naći u stočnoj hrani, žitu, soji itd. α-zearalenol je glavni produkt metabolizma zearalenona. Zearalenon ima toksične utjecaje zbog djelovanja s mitotoksinima. Može doći do oticanja spolnih organa, smanjenja uspješnostiparenja ili drugih poremaćaja u spolnom ponašanju. Uzorak se inkubira preko noći s β-glukuronidazom kako bi se analizirali i konjugirani i nekonjugirani oblici zearalenona. Drugi dan se uzorak zakiseli s H_3PO_4, ekstrahira s kloroformom te upari do suha. Ostatak se otopi u toluenu i stavi na uložak silika gela koji se ispere toluenom i eluira toluen-acetonom (88 : 12). Eluat ispari, a ostatak se otopi u kloroformu, ekstrahira s 0,18 M NaOH, neutralizira s H_3PO_4 i ponovno ekstrahira kloroformom. Ekstrakt kloroforma se upari, ponovo se otopi u pokretnoj fazi za tekućinsku kromatografiju i ubrizga u kolonu normalne faze pod slijedećim kromatografskim uvjetima: mobilna faza zasićena vodom diklormetana koji sadrži 2 % 1-propanola i detektor fluorescencije te valna duljina pobude od 236 nm. Ova metoda korištena je za analizu uzoraka krvi i urina svinje hranjene zearalenon. Zearalenon se brzo metabolizira u a-zearalenol, koji se pojavio u krvi samo 30 minuta nakon hranjenja [13].

4.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Cromatography*, HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili HPLC razdjelna je kromatografija gdje zbog korištenja visokih tlakova otapalo prolazi kroz zatvorenu kolonu ispunjenu finim punjenjem [12]. Mobilna faza kod HPLC je otapalo koje nosi uzorak kroz kolonu, dok stacionarnu fazu čine čestice manjeg promjera vrlo finih zrna.

Razdvajanje se temelji na međudjelovanju punjenja kolone i pokretne faze, te tako razlikujemo HPLC normalnih faza; gdje je mobilna faza nepolarna, a stacionarna faza polarna, dok je kod HPLC obrnutih faza mobilna faza polarna, a stacionarna faza nepolarna [1].

Prednosti HPLC u usporedbi s ostalim kromatografskim tehnikama su: relativno visoki radni tlak (do 400 bara); mali promjer čestica punila, mali promjer kolone, odjetljivi detektori za detekciju male količine analita, visoki stupanj separacije, brza analiza [14].

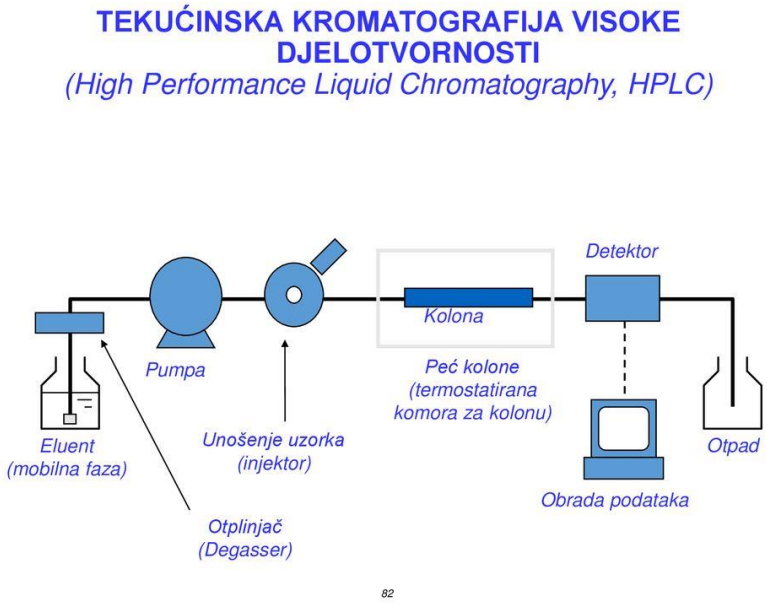
Razdvajanje može biti izokratno ili gradijentno. Kod gradijentnog razdvajanja koriste se 2 otapala uz pH koji je promijenjiv, dok se kod izokratnog odjeljivanja upotrebljava jedno otapalo ili ista mješavina otapala pri pH koji je nepromjenjiv [15]. Ključni dijelovi HPLC kromatografa su: spremnik otapala kao pokretne faze, otplinjač, pumpa, injektor, kolona, detektor te spremnik za otpad (Slika 5). Spremnik otapala sadrži mobilnu fazu i treba sprječavati ispravanje mobilne faze, najčešće je izrađen od plastike (poliarileterketon ili PEEK) ili stakla. Mobilna faza služi kao otapalo i prenosi uzorak kroz kolonu. Zbog interakcija sa mobilnom i stacionarnom fazom, dolazi do razdvajanja uzoraka. Spojevi koji su dobro topljivi u mobilnoj fazi, a imaju mali afinitet prema stacionarnoj fazi, brže se ispiru iz kolone, dok spojevi koji su dobro topljivi u stacionarnoj fazi, a slabo topljivi u mobilnoj fazi, puno sporije prolaze kroz kolonu. Prolaskom mobilne faze kroz kolonu, narušava se ravnoteža, te se nova ravnoteža uspostavlja između sastojaka koji se razdjeljuju među fazama. Sastojci unutar uzorka posjeduju i različite ravnotežne podjele između faza, pri čemu svaki sastojak ostvaruje različito retencijsko vrijeme odnosno vrijeme zadržavanja. Rezultat toga je stvaranje kromatografskih pikova koji su karakteristični i vidljivi na kromatogramu, a koje identificira detektor. Prema kromatogramu se određuju kvalitativna i kvantitativna svojstva uzoraka [14].

HPLC kromatografija se dijeli na:

- Razdjelnu kromatografiju,
- Adsorpcijsku kromatografiju,

- Ionsko-izmjenjivačku kromatografiju,
- Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica.

Zbog visoke osjetljivosti i prilagodljivosti, analize termički osjetljivih spojeva, te analize širokog spektra uzoraka, HPLC metoda se smatra jednom od najzastupljenijih metoda današnjice.



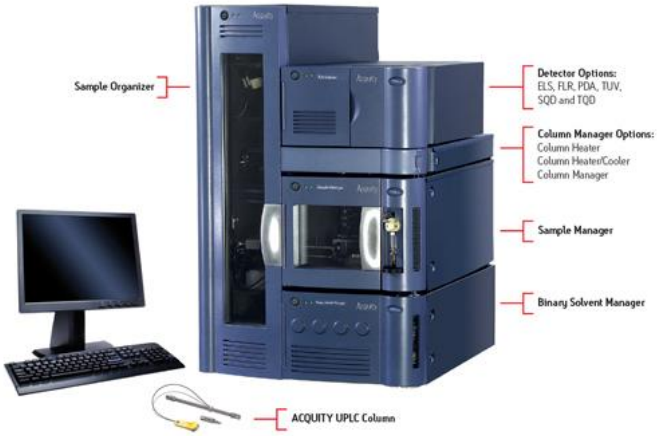
Slika 5. Shematski prikaz HPLC uređaja [16]

4.2.3.1. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Određivanje homocisteina u plazmi ili serumu, za procjenu kobalamina i folata, postaje važan dijagnostički postupak. Ova metoda je brza, točna i jeftina. Poboljšana HPLC metoda, postala je pogodna za kliničku primjenu. Važnije promjene su rezultat dodatka internog standarda, merkaptopropionilglicina i upotreba plazme odnosno seruma kao kalibracijskog materijala. Metoda se sastoji od sljedećih koraka: redukcija uzorka sa tri-n-butilfosfinom, taloženje proteina, derivatizacija amonij-7-fluorobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-sulfonatom i HPLC odvajanje praćeno flourescentnom detekcijom. Prema istraživanju, uzorci krvi moraju biti ohlađeni i centrifugirani odmah nakon vađenja (punkcije). Ova metoda je korisna za otkrivanje nedostatka kobalamina i folata, osobito kod pacijenata s normalnim ili smanjenim kobalaminom ili folatom u krvi. Iako kobalamin i folat djeluju nezavisno u stvaranju crvenih krvnih stanica, manjak istih može prouzročiti anemiju [17].

4.2.4. Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (UPLC, engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography)*

Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti, kromatografska je metoda vrlo slična HPLC. Iako su slične, princip rada je isti, ali postoje bitne razlike između njih. Jedna od najznačajnijih razlika je postizanje tlaka, gdje UPLC postiže do 1000 bara što je znatno veće od tlaka u HPLC. Zbog povećanog tlaka, ubrzano je i vrijeme analize, samim time poboljšava detekciju i razdvajanje. Vrijeme trajanja UPLC analize je 3-10 min, dok je kod HPLC potrebno 15-20 min. Iako UPLC ima prednosti nad HPLC-om, i dalje je zastupljenija HPLC metoda [15].



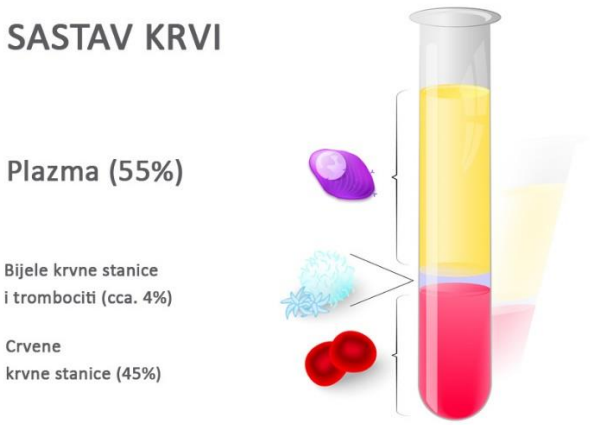
Slika 6: Uređaj za UPLC analizu [18]

5. Biološki uzorci

Biološki uzorci su uzorci isključivo biološkog podrijekla, tekućine ili tkiva, uzetih od ljudi ili životinja. Kod analiza živih bića, za analizu se najčešće koriste krv, mokraća i želučani sadržaj. Tkiva i druge tjelesne tekućine, kao što su npr.slina, kosa, nokti, mogu poslužiti kao uzorak u određenim okolnostima [19].

5.1. Krv

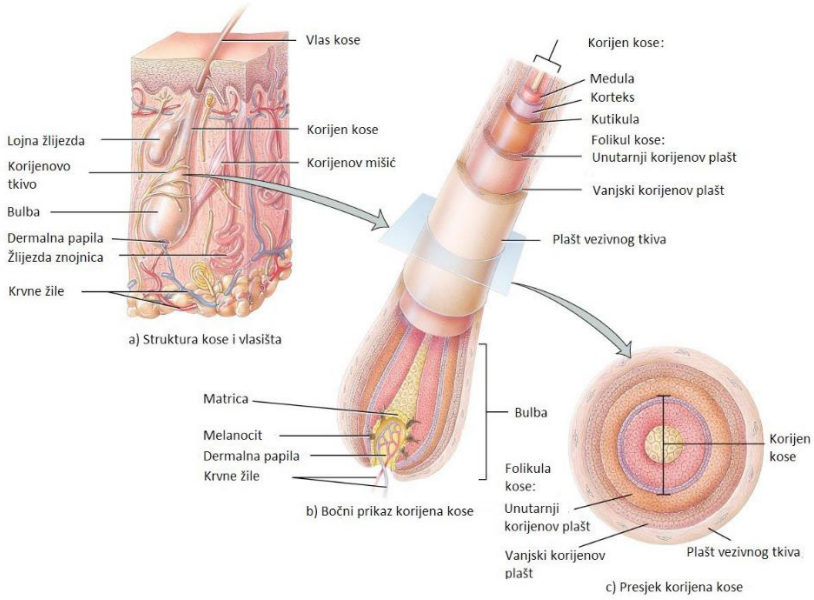
Krv je tjelesna tekućina ili vezivno tkivo koje cirkulira kroz krvne žile svakog čovjeka. U tijelu svakog čovjeka nalazi se oko 5 L krvi. Krv se sastoji od tekućeg dijela odnosno plazme i krvnih stanica (eritrociti, leukociti i trombociti), kao što je prikazano na slici 7. Najčešće se koristi za kvantitativnu analizu i detekciju koncentracije droga i lijekova [19].



Slika 7: Sastav biološkog uzorka krvi [20]

5.2. Kosa – biološki uzorak za analizu droga

Kosu čine dlake odnosno vlasi koje se nalaze na vlasištu. Dlaka se sastoji od dva dijela: korijena i stabljike (Slika 8). Kod analize droge u kosi, najčešće se postavlja pitanje kako droga dolazi u kosu, kako se zadržava i kada nestaje. Osim same fiziologije i strukture kose, postoji još nekoliko mogućih puteva unosa droge. S obzirom da se droge izlučuju znojem i lojem koji dolazi do vlasišta, tim putem droge mogu ući u kosu. Ionske sile mogu biti jedan od načina zadržavanja droge u kosi, tako što kosa sadržava negativno nabijene aminokiseline koje mogu vezati drogu kao ionski par. Metode za određivanje droga u kosi su različite, ali svaki postupak se sastoji od: uzimanja kose (sa stražnjeg dijela vlasišta, na sredini u ravnini vrha ušiju), pranja (uklanjanje masnoće, kozmetike, itd.), ekstrakcije (SPE), pročišćavanja, derivatizacije i kvantitativne analize. Najčešća tehnika za određivanje droga u kosi je plinska kromatografija /spektrometrija masa (GC/MS) [21].



Slika 8: Struktura kose i vlasišta [22]

6. Uzorkovanje

Uzorkovanje je ključan korak za uspješnu analizu uzoraka. To je postupak, točno propisan, kojim se uzima uzorak potreban za ispitivanje. Uzorak mora biti reprezentativan jer predstavlja cjelinu koja se analizira. Uzimanje uzoraka ovisi o:

- veličini odnosno kvantiteti materijala iz kojega se uzima uzorak,
- fizikalnom stanju uzorka,
- kemiji materijala koji se ispituje [1].

6.1. Uzorkovanje krvi kao biološkog uzorka

Uzimanje uzoraka krvi provode za to obučeni ljudi, kako ne bi došlo do ugrožavanja kvalitete ili količine uzorka. Bitno je pravilno označavanje uzorka (ime i prezime osobe, datum, mjesto, vrijeme) te pohrana istog [23]. Pogreške koje se mogu javiti kod uzimanja uzorka većinom su tehničke pogreške koje uključuju: dugo držanje podveze, neadekvatna veličina igle, nepravilna epruveta ili poredak punjenja istih, nepravilno miješanje epruveta, nedovoljna količina uzorka ili pogrešan odabir mjesta za uzorkovanje. Prema svakom uzetom uzorku treba se ponašati odgovorno, te ga u odgovarajućem položaju i u što kraćem vremenu dostaviti do mjesta obrade [24].

7. Priprema bioloških uzoraka za analizu

Kod pripreme bioloških uzoraka najčešće se koriste ekstrakcijske metode. Prije analize biološkog uzorka analitičkom metodom koja je za to predviđena, potrebna je izolacija spojeva koji se ispituju. Endogene komponente u kompleksnom spoju, kao što je biološki uzorak, mogu korelirati s dijelom uzorka koji se ispituje, stoga je potrebno prije analize ukloniti takve komponente. Kako bi tvari niže koncentracije bile detektirane u analizi, potrebno ih je dodatno koncentrirati [19].



Slika 9: Pravilno postupanje s biološkim uzorcima [23]

7.1. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je proces koji se temelji na razdvajanju jedne ili više tvari iz homogene smjese na osnovi topljivosti koja je različita u otapalima koja se međusobno ne miješaju [25].

Za pripremu bioloških uzoraka najčešće se koriste dvije metode ekstrakcije:

- Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE),
- Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE).

Ekstrakcija čvrste faze jedna je od najčešće korištenih tehnika pripreme bioloških uzoraka. Koristi se u pred-obradi uzoraka za kromatografsku analizu. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) se može koristiti na sličan način kao i ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE). Dok je LLE proces separacije odvajanja u jednoj fazi, SPE je postupak koja nalikuje HPLC i ima niz potencijalnih prednosti u odnosu na LLE kao što je npr. cjelovitija ekstrakcija analita, učinkovitija separacija od ostalih primjesa, povećana selektivnost odvajanja, smanjena potrošnja organskih otapala, uklanjanje čestica, itd. [26].

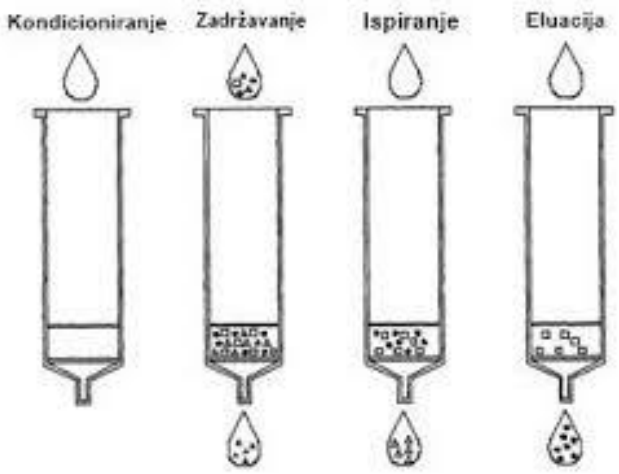
7.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom

Ekstrakcija čvrstom fazom koristi se kod:

- koncentriranja analita,
- uklanjanja interferirajućih supstanci,
- promjene matriksa analita.

Takav postupak ekstrakcije koristi se kod spojeva koji su otopljeni u tekućoj smjesi. Najčešće se koristi zbog svoje brzine, efikasnosti i selektivnosti. Sastoji se od 4 koraka: (Slika 10)

1. Kondicioniranje, tj.solvatacija sorbensa – propuštanje odgovarajućeg organskog otapala kroz kolonu,
2. Propuštanje uzoraka kroz čvrstu fazu – dolazi do povezanosti između sorbensa i uzorka,
3. Ispiranje sorbensa odgovarajućim otapalom – interferencije se ispiru, dok analit ostaje vezan za črvstu fazu,
4. Eluiranje određenim reagensom [27].

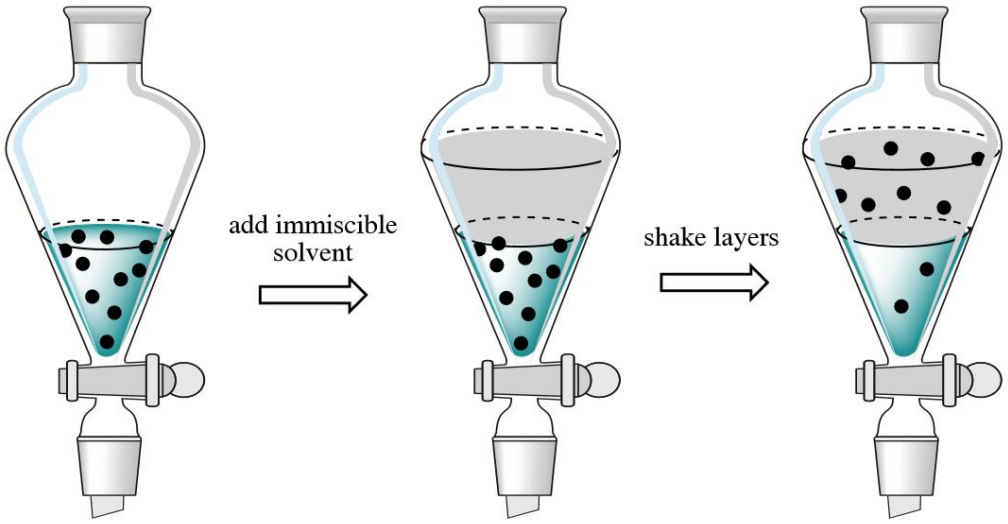


Slika 10:Shematski prikaz ekstrakcije čvrstom fazom [28]

7.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće je česta sepracijska tehnika koja uključuje veliki raspon analita. Za ekstrakciju se koriste lijevci za odjeljivanje, pri čemu dolazi do nedostataka kao što je nastanak emulzije, slabo vidljivo odjeljivanje faza, manjak automatizacije što uključuje veliki ljudski rad.

Ekstrakcija tekuće-tekuće izvodi se u par koraka, kao što je prikazano na slici 11: prvo se pripravi otopina uzorka u pogodnom otapalu, zatim se uspostavlja maksimalna razlika između faza, na temelju topljivosti, uz pomoć kemijske reakcije. Nakon uspostavljanja razlike, dodaje se drugo otapalo, te se uspostavi dvofazni sustav među otapalima koja se ne miješaju. Mućkaju se u lijevku za odjeljivanje do uspostavljanja ravnoteže nakon čega se faze odvoje [27].



Slika 11: Prikaz ekstrakcije tekuće-tekuće [29]

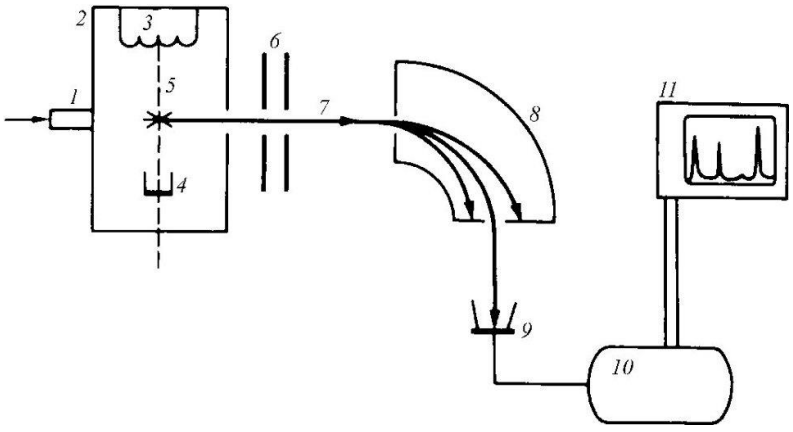
8. Analitičke tehnike za analizu droga

Izbor analitičke tehnike ovisi o: broju uzoraka, vremenu u kojem se mora dobiti rezultat, potrebi za osjetljivošću i pouzdanošću, raspoloživom kadru i intrumentima, te o troškovima. Za analizu droga u biološkim uzorcima, danas se u većini laboratorija rabe imunokemijske tehnike, poznatije kao metode probira (engl. *„screening"*), te za potvrđivanje pozitivnih rezultata koriste se kromatografske tehnike. Prednost imunokemijskih tehnika je u velikom broju analiziranih uzoraka u ograničenom vremenu, mogućnosti automatizacije, te u minimalnoj potrebi za stručnim osobljem i količinama uzorka. Najveći nedostaci imunokemijskih tehnika su nespecifičnost, što znači da antitijela reagiraju unakrsno, sa srodnim drogama, a specifične su za kemijski slične suspstance (ne za pojedinu drogu). Zbog toga je nužno rezultat potvrditi kromatografskim metodama. Kromatografske metode koje se koriste u svrhu analize droga su:

tankoslojna kromatografija (TLC, opisana pod 3.1.1.), plinska kromatografija (GC, opisana pod 3.2.1.), tekućinska kromatografija s visokom djelotvornosti (HPLC, opisana pod 3.2.3.) i plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC/MS) [30].

8.1. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je metoda u analitici koja se temelji na ioniziranju kemijskih spojeva te razvrstavanju iona na temelju njihovog omjera mase i naboja. Koristi se u različitim područjima istraživanja i primjenjuje se na čiste uzorke i složene smjese. Kod analize kompleksnih smjesa, dolazi do povezivanja masenog spektrometra direktno s plinskim ili tekućinskim kromatografom, pri čemu se sastojci smjese, razdvajaju prije analize. Maseni spektrometar, sastoji se od 4 temeljna dijela (Slika 12): sustav za injektiranje uzorka (broj 1 na slici 12), ionski izvor (broj 2 na slici 12), koji proizvodi imanentne ione ispitivanom uzorku i ubrzava ih u električnom polju, analizator (najčešće magnetsko polje) savija smjerove raznovrsnih iona te ih odvaja na temelju omjera njihove mase i naboja (broj 8 na slici 12), te detektor (skupljanje razdvojenih iona i karakterizacija (broj 9 na slici 12)). Registrirati se mogu ioni različitih masa, a maseni spektar nastaje promjenom jakosti magnetskog polja i karakterističan je za određeni kemijski spoj [31].



Slika 12: Maseni spektometar [31]

8.1.1. Primjena plinske kromatografije/masene spektrometrije

Metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije omogućuje visoko selektivno i osjetljivo otkrivanje nikotina u uzorcima kose izbjegavajući ometanje drugih kemikalija prisutnih u kosi. Nikotin se ekstrahira nakon alkalnog otapanja u 5 M NaOH. Postupak uzorkovanja uzima u obzir da se značajne količine nikotina u kosi vjerojatno adsorbiraju i talože iz atmosferskog zraka. Kao posljedica toga, uzorci kose moraju se uzeti s mjesta s dovoljnim kontaktom s okolnim zrakom, a izmjerena koncentracija nikotina mora biti povezana s duljinom segmenta

kose i njegovom udaljenostom od vlasišta. Istraživanje je pokazalo vrlo jasne razlike u koncentracijama nikotina u kosi kod pušača i nepušača, visoku ponovljivost mjerenja nikotina u kosi tijekom vremena te da je ova metoda dovoljno osjetljiva da može otkriti pojedinačne promjene, ne samo u pušačkim navikama, nego i izloženosti nikotinu u okolišu [24].Analizom kose mladih ispitanika (36 ispitanika) ispitana je sumnja na zlouporabu droga kao što su morfij, kodein, heroin, 6-acetilmorfin, kokain, metadon, amfetamin, metamfetamin, 3,4-metilendioksiamfetamin (MDA), 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA) i 3,4 - metilendioksietilamfetamin (MDEA). Analiza morfija, kodeina, heroina, 6-acetilmorfina, kokaina i metadona u kosi uključivala je inkubaciju u metanolu, ekstrakciju u čvrstoj fazi, derivatizaciju smjesom anhidrida propionske kiseline i piridina i plinsku kromatografiju/ masenu spektrometriju. Za analizu amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA i MDEA uzorci kose su inkubirani u 1 M natrijevom hidroksidu, ekstrahirani etil-acetatom, derivatizirani anhidridom heptafluoro-maslene kiseline (HFBA) i analizirani plinskom kromatografijom/masenom spektrometrijom. Metode su bile ponovljive, točne i osjetljive. Primijenjene metode potvrdile su konzumaciju heroina u 18 ispitanika na temelju pozitivnog 6-acetilmorfina. Među ovih 18 potrošača heroina metadon je pronađen u četiri, MDMA u dva i kokain u dva ispitanika. Kokain je bio prisutan samo u dva, metadon samo u dva, metamfetamin samo u dva i MDMA samo u sedam od 36 ispitanika. U dva od devet uzoraka obojene i izbijeljene kose nije pronađen nijedan lijek. Unatoč malom broju ispitanika, ovo je istraživanje ukazalo na trend zlouporabe droga među mladima u Hrvatskoj [32].

Uzorci urina ili sline mogu se koristiti za potvrdu nedavnog unosa nikotina analizom kotinina, glavnog metabolita nikotina. Kotinin u slini pokazuje samo izloženost nikotinu tijekom prethodnog tjedna. Kako bi provjerili podatke o upotrebi duhana, ispitani su uzorci kose za kvantificiranje nikotina i kotinina pomoću plinske kromatografije/masene spektrometrije. Kosa (oko 50-100 mg) inkubirana je u 1 M natrijevom hidroksidu na 100 °C tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, uzorci su ekstrahirani dietil eterom, koristeći ketamin kao unutarnji standard. Opojna sredstva su odvojena na 12-m BP-5 kapilarnom stupcu i otkriveni pomoću praćenja odabranim ionima (m/z 84, 98 i 180 za nikotin, kotinin i ketamin). Kosa nepušača i pušača sadržavala je nikotin i kotinin. Iako je teško odrediti apsolutnu graničnu koncentraciju, više od 2 ng nikotina na miligram kose može se koristiti za razlikovanje pušača od nepušača [33].

U istraživanju za kvantitativno određivanje tri metabolita: dialkil fosfata (DAP), dimetil fosfata (DMP), dimetil tiofosfata (DMTP) i dietil fosfata (DEP), koji pripradaju organofosfatnim pesticidima (OP), korišteni su uzorci kose. Predložena metodologija obuhvaća korak

dekontaminacije, ekstrakciju krutina-tekućina, nakon čega slijedi ekstrakcija tekućina-tekućina, derivatizacija pentafluorobenzil-bromida, čišćenje na koloni Florisil / PSA i analiza plinskom kromatografijom/masenom spektrometrijom. Ekstrakcijski oporavak, dobiven iz uzoraka kose od 50 mg, sa dva nivoa koncentracije, kretao se u rasponu od 56,1 do 107,9 %, a preciznost unutar dana bila je od 13,5 do 17,5 %. Granice detekcije kretale su se od 0,02 do 0,10 ng/mg. Rezultati dobiveni analizom uzoraka kose 30 poljoprivrednih radnika pokazuju prikladnost predložene metode za praćenje ljudi koji su profesionalno izloženi OP. Najčešće otkriveni spoj bio je DEP, a zatim DMP. Ovo istraživanje pokazuje sposobnost ispitivanja kose za procjenu kronične izloženosti OP [34].

8.1.2. Primjena tekućinske kromatografije/masene spektrometrije

Istraživanje kanabisa u krvi, danas se provodi brzom i točnom metodom tekućinske kromatografije/masene spektrometrije. Kanabis se smatra najraširenijom ilegalnom drogom u Europi. Slijedom toga, osjetljive i specifične analitičke metode potrebne su u forenzičke svrhe te za farmakokinetičke i farmakodinamičke studije kanabinoida. Predstavljena je jednostavna, vrlo osjetljiva i specifična metoda za ekstrakciju i kvantifikaciju Δ^9-tetrahidrokanabinol (THC), 11-hidroksi-Δ^9-tetrahidrokanabinol (11-OH-THC) i 11-nor-9-karboksi-Δ^9-tetrahidrokanabinol (THC-COOH) u krvi. Metoda je u potpunosti potvrđena u skladu s međunarodnim smjernicama i obuhvaća istodobnu ekstrakciju tekućina-tekućina (LLE) tri analita heksanom: etil-acetatom (90:10) u jedan eluens, nakon čega slijedi odvajanje i kvantifikacija tekućinskom kromatografijom/spektrometrija masa. Kromatografsko razdvajanje postignuto je pomoću XBridge C kolone eluirano izokratno s metanolom uz 0,1 % mravlje kiseline (80:20). Selektivnost metode postignuta je kombinacijom vremena zadržavanja i dva prijelaza iona prekursora i proizvoda. Pokazalo se da je uporaba LLE vrlo učinkovita i dovela je do značajnog smanjenja interferencija prisutnih u matriksu. Validacija metode izvedena je pomoću 250 μL krvi. Metoda je bila linearna u ispitivanom rasponu (0,5–40 μg / L za THC, 1–40 μg / L za 11-OH-THC i 2–160 μg / L za THC-COOH), a relativna standardna odstupanja (RSD) bila su <12% za THC i 11-OH-THC i <8 % za THC-COOH. Donja granica kvantifikacije utvrđena je na najnižem kalibratoru u pokusima linearnosti. Nakon ponovljenog zamrzavanja i odmrzavanja niti u obrađenim uzorcima nije primijećena nestabilnost. Metoda je naknadno primijenjena na 63 autentična uzorka krvi, dobivena iz toksikoloških slučajeva. Rezultati provjere valjanosti i stvarnih analiza uzoraka pokazuju da je ova metoda precizna, točna i vrlo pogodna za rutinsku analizu [35].

Ovo istraživanje opisuje potvrdnu metodu za kvantitativno određivanje najčešćih ilegalnih kortikosteroida u kosi sportaša koji koriste doping. Kortikosteroidi se ekstrahiraju iz 50 mg praškastih dlačica ekstrakcijom metanolom, a zatim ekstrakcijom u čvrstoj fazi na ulošku C_{18}. Nakon ekstrakcije, osušeni ostatak se obnavljas 50 μL acetonitrila i ubrizga u tekući kromatograf. Separacija tekućinskom kromatografijom vrši se na obrnutoj fazi C_{18} kolona s binarnim gradijentom pufera formiata pH 3-acetonitrila kao pokretne faze. Detekcija se izvodi pomoću elektropraznog ionizacijskog masenog spektrometra na načinu praćenja negativnih iona i odabranih iona. Ostvarene granice osjetljivosti su 0,1 ng / mg u kosi. Primjena na uzorak kose sakupljen tijekom antidoping kontrole i usporedba s rezultatima dobivenim u mokraći, prikupljenim istim sportašima u isto vrijeme, pokazuje komplementarnost [36].

Ergotamin, alkaloid koji u kombinaciji s lijekom sumatriptanom djeluje na protok krvi u mozak, koristi se u terapeutske svrhe od 1950-ih, obično za liječenje vaskularne glavobolje. Vrlo je toksičan i u velikim, ponovljenim dozama može proizvesti sve simptome trovanja rogozom. Razvijena je selektivna i osjetljiva metoda koja se temelji na tekućinskoj kromatografiji/masenoj spektrometriji za kvantificiranje ergotamina u biološkim tekućinama uz upotrebu brze i jednostavne pripreme uzoraka. Kao interni standard, u uzorak je dodan dietilamid lizergične kiseline. Iz ljudskog urina, krvi i kose ekstrahirani su ergotamin i interni standard, pomoću ekstrakcije tekuće-tekuće pri alkalnom pH. Za kromatografsko razdvajanje korištena je gradijentna elucija na cijanopropilnoj koloni. U masenom spektrometru provedena je pozitivna oonska elektrosprejna ionizacija i masena spektrometrija određivanjem disocijacije izazvane sudarom. Izmjerene koncentracije ergotamina bile su 320 pg/mL u krvi, 100 pg/mL u mokraći, 24 pg/mg u proksimalnoj kosi i 15 pg/mg u distalnoj kosi [37].

9. Interpretacija rezultata analize droga u kosi

Na koncentraciju droga u kosi djeluje više čimbenika, kao što je boja kose, odnosno sadržaj melanina u kosi, stupanj znojenja i količina lojnih žlijezda, fizikalno-kemijska svojstva droga, rast kose, vanjska kontaminacija, kozmetičko tretiranje kose, itd. Tamnija kosa, odnosno crna kosa zbog veće količine melanina će vezati više droge od plave, odnosno svjetlije kose. Vanjska kontaminacija može uzrokovati lažno pozitivan nalaz, zbog toga je važno dobro pranje kose prije analize. Koncentracija droge u kosi se smanjuje ukoliko je kosa obojena ili izbjeljivana. Nalaz droge u kosi ispitanika se može protumačiti samo kao dokaz da je osoba ponavljano uzimala drogu, no ne može se govoriti niti ustanoviti količina i vrijeme uzimanja. Zbog ranije navedenih čimbenika koji utječu na koncentraciju droga u kosi, ne može se odrediti količina i vrijeme uzimanja droga kod ispitanika. Tu su potrebna ispitivanja u kontroliranim uvjetima,

uzimanje kose u određenim vremenskim razmacima te istraživanja poznate doze i čistoće droge kao uzorka. [21]

10. Zaključak

Proučavajući stručnu literaturu dolazimo do zaključka kako su kromatografske metode među najvažnijima u analitičkoj kemiji. Kromatografija omogućuje odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje složenih smjesa. Kod svih kromatografskih metoda zajedničko je postojanje nepokretne i pokretne faze. U današnje vrijeme, kromatografija se koristi u različitim aspektima ljudskog života. Veliku primjenu ima u farmaciji, medicini, industriji, itd. Analiza bioloških uzoraka, provedena jednom od kromatografskih metoda, može dati pouzdane rezultate ukoliko je pravilno odrađena.

11. Literatura

1. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999
2. R.L.M.Synge, *Biochem J.* Vol. 33 (1939); 1913–1917
3. F. Ziberi, I. Rezić,*TEDI,* Vol. 5 (2015); 21
4. A.Douglas, F.Skoog, J.Holler, S.R.Crouch, *Principles of Instrumental Chemistry*, Seventh Edition, Cengage Learning, 2018.,2007
5. M.Cindrić,A.Marković, A.Horvatić, *Medicina*, Vol. 45 (2009), 218-232
6. https://www.google.com/search?q=kromatogram&rlz=1C1GCEA_enHR878HR878&sxsrf=ALeKk00Lt23nOdIxkR_5mQWwhUmjtht3OA:1597858656662&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjgrYat56frAhWjmIsKHVmyD-MQ_AUoAXoECBEQAw&biw=1536&bih=754#imgrc=ngDKtjMZAMhmZM (preuzeto 10.8.2020.)
7. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09132.htm
8. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm
9. L.Vranković, , I. Delaš, Z. Stojević, J. Aladrović, *Hrvatski Veterinarski Vjesnik*, Vol.26 (2018), 3-4
10. American Academy of Forensic Sciences, *Journal of forensic sciences: The official publication of the American Academy of Forensic Sciences*. West Conshohocken (1956)
11. H. A. Collison, F. L. Rodkey, J. D O'Neal, *Clinical Chemistry*, Vol. 14 (1968), 162–171
12. M. Cindrić, A. Marković i A. Horvatić, *Medicina Fluminensis*, Vol.45 (2009), 218-232
13. M. E. Olsen, H. I. Pettersson, K. A. Sandholm, K.-H. C Kiessling, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Vol. 68 (1985), 632–635
14. https://www.pharmaguideline.com/2018/04/differences-between-hplc-and-uplc.html
15. D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 2007
16. https://www.google.com/search?q=hplc+kromatografija&tbm=isch&chips=q:hplc+kromatografija,online_chips:teku%C4%87inska+kromatografija+visoke+djelotvornosti&rlz=1C1GCEA_enHR878HR878&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwi1woLV7KT

rAhUEPewKHUnaDhMQ4lYoAXoECAEQFg&biw=1519&bih=706#imgrc=_bXaDX2bK_Bw0M (preuzeto 12.8.2020.)

17. B.Vester, K.Rasmussen: *Method for determination of homocysteine in plasma and serum,* Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Walter de Gruyter and Co. , Berlin, 1991, 549-554
18. https://www.google.com/search?q=UPLC&rlz=1C1GCEA_enHR878HR878&sxsrf=ALeKk00X2l0CjyRmUSLuL8H3_VOg7L_INQ:1597851244792&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwid3eXey6frAhUH_KQKHWaUCpkQ_AUoAXoECAwQAw&biw=1536&bih=754&dpr=1.25#imgrc=G9xmiBZigpzoqM (preuzeto 12.8.)
19. D. Sutlović i suradnici, *Osnove Forenzične toksikologije*, Redak, Split, 2011.
20. https://www.google.com/search?q=sastav+krvi&rlz=1C1GCEA_enHR878HR878&sxsrf=ALeKk03w5YBZpiMq7FN-5kCIxk2-rsENcQ:1597765245377&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=aZqpDbJunH_vhM%252CeUmrMLqQNttfMM%252C_&vet=1&usg=AI4_-kSUfsW61yeLHqLZke-d5yyIqvdo3w&sa=X&ved=2ahUKEwjngoqvi6XrAhXP-yoKHeN3BvkQ9QEwBnoECAoQBA&biw=1536&bih=754&dpr=1.25#imgrc=reisVicYZeNCRM (preuzeto 13.8.2020.)
21. Lj. Skender, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju,* Vol.51 (2000), 409-420
22. cCegQIABAA&oq=vlas+kose&gs_lcp=CgNpbWcQAzIECCMQJzIECAAQGDoECAAQHjoGCAAQCBAeUIoKWOUNYL8OaABwAHgAgAGMAYgB1AOSAQMwLjSYAQCgAQGqAQtnd3Mtd2l6LWltZ8ABAQ&sclient=img&ei=PYU-X-eTPMvvkgWa85-YDA&bih=754&biw=1536&rlz=1C1GCEA_enHR878HR878&hl=hr#imgrc=Fppv-C3OaVA8_M (preuzeto 16.8.2020.)
23. V.J.B, Henderson MK., *Biological sample collection, processing, storage and information management.* IARC Sci Publ. 2011, 26
24. L. Honović, *Glas.pul.bolnice*, Vol. 10 (2013); 21-25
25. https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=ekstrakcija
26. S.C. Moldoveanu, V. David, *Sample Preparation in Cromatography*, Elsevier Science, Amsterdam, 2002.
27. J. R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, WILEY, 2009, 49-53
28. https://www.google.com/search?q=ekstrakcija+%C4%8Dvrstom+fazom&rlz=1C1GCEA_enHR878HR878&sxsrf=ALeKk01mtjb8Wp03A_jPip8ERfkkUPBzxg:159

7852203213&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwi_ieenz6frAhVhk4sKHR2YArIQ_AUoAXoECAsQAw&biw=1536&bih=706#imgrc=Z_L2fumO20OiQM (preuzeto 16.8.)

29. https://www.google.com/search?q=liquid+liquid+extraction&rlz=1C1GCEA_enHR878HR878&sxsrf=ALeKk03dPM0oK3_OOLX3cQiCo4hkD8J6MA:1597854214070&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiWhNTm1qfrAhWwpYsKHS1JCKcQ_AUoAXoECBAQAw&biw=1536&bih=706&dpr=1.25#imgrc=jh-0nQrWZBRVQM (preuzeto 16.8.)
30. Lj. Skender*, Arhiv za higijenu rada i toksikologju*, Vol. 48 (1997); 403-411
31. http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=39268 (Pristupljeno 19. 8. 2020.)
32. L Skender, V Karačić, I Brčić, A Bagarić, *Forensic Science International*,Vol. 125 (2002), 120-126
33. P. Kintz, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*,Vol. 580 (1992), 347-353
34. M.G.Margariti, A.M.Tsatsakis, *Biomarkers*,Vol. 14 (2009), 137-147
35. M.del M. R. Fernandez, G.De Boeck, M. Wood, M. Lopez-Rivadulla, N.Samyn, *Journal of Chromatography B*, Vol. 875 (2008), 465-470
36. F. Bévalot, Y. Gaillard, M. A Lhermitte, G. Pépin, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,* Vol. 740 (2000), 227-236
37. D.Favretto, G. Frison, S.Vogliardi, SD Ferrara, *Highly specific quantification of ergotamine in urine, blood, and hair samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Ther Drug Monit. 2007; 325-332