

# Usporedba sadržaja cinka u različitim uzorcima inzulina plamenom atomskom apsorpcijskom spektroskopijom

---

Širac, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:582747>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Tea Širac

**Usporedba sadržaja cinka u različitim  
uzorcima inzulina plamenom atomskom  
apsorpcijskom spektroskopijom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan.

*Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Jasni Jablan i svim djelatnicima zavoda za Analitičku kemiju na pruženoj pomoći u izradi ovog rada, te na ukazanom povjerenju i stečenim znanjima.*

*Također zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci pruženoj tijekom studiranja.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1. Inzulin.....	2
1.1 Primjena inzulina u terapiji .....	3
2. Cink i inzulin.....	5
2.1. Transporteri .....	5
2.2. Uloga cinka i mjesta njegova djelovanja u signalnom putu inzulina .....	6
2.3. Suplementi.....	8
1.3. Spektroskopija.....	9
1.3.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija .....	12
1.4. Validacija.....	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	17
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1. Materijali .....	20
3.2. Metode.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. Linearnost.....	26
4.2. Preciznost .....	28
4.3. Točnost.....	31
4.4 Granica dokazivanja i određivanja .....	33
4.5. Određivanje koncentracije cinka u uzorcima inzulina .....	34
5. ZAKLJUČAK .....	36
6. LITERATURA .....	38
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	41
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIS DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

## 1. Inzulin

Gušterača je građena od acinusa i Langerhansovih otočića u kojima razlikujemo četiri vrste stanica  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i PP.  $\alpha$  stanice sintetiziraju i luče glukagon,  $\beta$  inzulin,  $\delta$  somatostatin, a PP stanice luče polipeptide gušterače. Inzulin je protein koji se sastoji od dva lanca međusobno povezana disulfidnim vezama. Usljed cijepanja disulfidnih veza, gubi funkciju. Njegova sinteza u  $\beta$  stanicama započinje translacijom inzulinske RNA u ribosomima te nastaje preproinzulin koji ima 24 hidrofobne aminokiseline koje se nalaze na N kraju B lanca i čine signalini slijed. Pomoću tog slijeda ulazi u hrapavi endoplazmatski retikulum, ta sekvenca se uklanja i nastaje proinzulin koji se zatim vezikulama prenosi u Golgijev aparat gdje se proinzulin pakira u sekretorne granule zajedno s  $\text{Ca}^{2+}$  ovisnim endopeptidazama, PC2 i PC3, koje ga prevode u inzulin. Tijekom transformacije proinzulina u inzulin, četiri amino kiseline i C peptid se uklanjaju proteolizom što dovodi do stvaranja A i B lanaca inzulina povezanih disulfidnim vezama. Heksamerna struktura inzulina nastaje pomoću dva iona  $\text{Zn}^{2+}$  te se kao takav inzulin pohranjuje u granulama  $\beta$  stanica (Goodman i Gilman, 2006; Guyton i Hall, 2006).

Povećanje plazmatske koncentracije glukoze dovodi do unosa glukoze u  $\beta$  stanice pomoću GLUT2 transportera. Glukoza se u stanici fosforilira pomoću glukokinaze u glukoza-6-fosfat koji se oksidira i povećava se razina ATP-a što dovodi do inhibicije ATP ovisnih  $\text{K}^+$  kanala. Stanična membrana se depolarizira i otvaraju se o naponu ovisni Ca kanali. Intracelularni  $\text{Ca}^{2+}$  potiče otpuštanje inzulina egzocitozom. Kada se hormon izluči i koncentracija glukoze se smanji na fiziološku razinu, disocira u monomere koji su aktivni oblik inzulina.

Nepromjenjivi ostatci A i B lanca čine površinu pomoću koje se inzulin veže na receptore. Receptor je veliki glikoprotein koji se sastoji od dvije  $\alpha$  i dvije  $\beta$  podjedinice. Podjedinice su međusobno povezane disulfidnim vezama i čine  $\beta\alpha\alpha\beta$  heterotetramer.  $\alpha$  podjedinica je ekstracelularna i na njoj se nalazi vezno mjesto za inzulin. Vežanjem inzulina za receptor dolazi do autofosforilacije transmembranske  $\beta$  podjedinice što dovodi do aktivacije tirozin kinaze koja zatim fosforilira brojne unutarstanične enzime uključujući inzulin receptor supstrat (IRS). Na taj način inzulin regulira unutarstanični metabolizam ugljikohidrata, masnih kiselina i proteina (Goodman i Gilman, 2006; Guyton i Hall, 2006; Wilcox, 2005).

Sekrecija inzulina je dobro reguliran proces koji osigurava odgovarajuću koncentraciju glukoze u krvi. Regulacija je postignuta interakcijom nutrijenata, gastrointestinalnih hormona, hormona gušterače i autonomnih neurotransmitera. Glukoza, aminokiseline, masne kiseline i ketonska tijela potiču sekreciju inzulina, dok ju somatostatatin i norepinefrin inhibiraju.

Langerhansovi otočići sadrže kolinergičke i adrenergične živce. Stimulacijom  $\alpha_2$  adrenergičnih receptora inhibira se sekrecija inzulina, a stimulacija  $\beta_2$  adrenergičnih receptora stimulira sekreciju inzulina. Bilo koje stanje koje stimulira simpatički sustav suprimira otpuštanje inzulina stimulacijom  $\alpha_2$  receptora.

Ciljna tkiva u kojima inzulin održava homeostazu glukoze su jetra, mišići, masno tkivo, ali on djeluje i na ostala tkiva. Inzulin je primarni hormon odgovoran za kontrolu unosa, potrošnje i skladištenja nutrijenata u stanicama. Stimulira unutarstaničnu uporabu i skladištenje glukoze, aminokiselina i masnih kiselina, također inhibira kataboličke procese kao što su razgradnja glikogena, masti i proteina. Stimulira transport supstrata i iona u stanice, potiče translokaciju proteina između stanica, aktivira i inaktivira specifične enzime, inhibira transkripciju fosfoenolpiruvat karboksikinaze te na taj način doprinosi inhibiciji glukoneogeneze (Goodman i Gilman, 2006; Guyton i Hall, 2006; Rorsman, 2005; Wilcox, 2005).

Razgradnja inzulina primarno se odvija u jetri, bubrezima i mišićima. Proteolitička razgradnja inzulina u jetri odvija se nakon internalizacije hormona i njegova receptora, a u manjoj mjeri odvija se i na površini stanice. Primarni put internalizacije je endocitoza povezana s receptorom. Receptor i inzulin internaliziraju se u endosomima unutar kojih se inzulin razgradi, a dio može biti razgrađen i u lizosomima. Najvažnija uloga endotelnih stanica je transcitoza inzulina s intravaskularnog u ekstracelularno područje. Ona ima važnu ulogu u dopremi inzulina do mjesta djelovanja (Goodman i Gilman, 2006; Guyton i Hall, 2006).

### 1.1. Primjena inzulina u terapiji

Inzulin se koristi za liječenje dijabetesa tip 1, a u nekim slučajevima i kod dijabetesa tip 2. Cilj liječenja je održati razinu glikemije što bližu normalnoj da bi se spriječio ili odgodio razvoj komplikacija dijabetesa. Da bi se postigla dobra regulacija glikemije i izbjegla hipoglikemija, farmakokinetička svojstva primjenjenog inzulina trebala bi omogućiti profil inzulinemije najbliži onoj kod zdravih osoba. Najčešće se primjenjuje subkutano. Inzulin primjenjen na taj način razlikuje se od fiziološkog jer nema brzog porasta i smanjenja koncentracije inzulina nakon unosa nutrijenata. Subkutano primijenjen inzulin raspodjeljuje se u perifernoj cirkulaciji, a ne u portalnoj te se tako eliminira utjecaj inzulina na hepatski metabolizam. Preparati inzulina dijele se prema duljini djelovanja na kratkodjelujući, srednjedugodjelujući i dugodjelujući te prema porijeklu na humani i svinjski. Svinjski se od humanog inzulina razlikuje po alaninu umjesto treonina na karboksi kraju B lanca. Posljedica

te razlike manja je topljivost u vodi. Pročišćeni humani i svinjski inzulinski pripravci nisu davali zadovoljavajuće rezultate te se stoga na različite načine nastoje promijeniti farmakokinetička svojstva humanog inzulina (Goodman i Gilman, 2006; Novak i Metelko, 2004).

Kratko i brzodjelujući inzulin nalazi se u otopini neutralnog pH u obliku heksamera. Injektira se 15-30 minuta prije jela. Može se dati intravenski ili intramuskularno. Nakon intravenske primjene dolazi do brzog pada koncentracije glukoze u krvi koja postiže željenu vrijednost 20-30 minuta nakon primjene. Intravenski se najčešće koristi za terapiju ketoacidoze. Kada je metabolizam stabilan, daje se subkutano u kombinaciji sa srednjedugo i dugodjelujućim inzulinom. Monomeri nativnog inzulina organizirani su u heksamere koji usporavaju apsorpciju i reduciraju postprandijalni pik subkutano injektiranog inzulina. Kratkodjelujući inzulini dostupni na tržištu su lispro, aspart i glulizin. Oni se apsorbiraju tri puta brže nego humani inzulin nakon subkutane primjene. Lispro je gotovo identičan humanom inzulinu, samo su zamijenjene aminokiseline na položaju B28 i B29 (prolin i lizin). Lispro postoji u obliku heksamera i disocira na monomere odmah nakon injektiranja. To rezultira bržim djelovanjem i višim vršnim vrijednostima u odnosu na humani inzulin. Inzulin aspart nastaje zamjenom prolina na B28 s aspartatom. Time se mijenja naboj molekule i rezultira bržom disocijacijom nakon aplikacije. Lispro i aspart inzulin imaju sličan utjecaj na kontrolu glukoze, regulaciju hipoglikemije i manju pojavnost noćne hipoglikemije u usporedbi s regularnim inzulinom. Treći brzodjelujući inzulin je glulizin u kojemu glutaminska kiselina zamjenjuje lizin na B29 i lizin zamjenjuje arginin na B3 (Goodman i Gilman, 2006; Novak i Metelko, 2004).

Inzulin srednjedugog djelovanja se otapa postupno nakon subkutane primjene pa je stoga njegovo djelovanje dulje. Najčešće korišteni su izofan i lente inzulin. Izofan inzulin je suspenzija inzulina u kompleksu s cinkom i protaminom u fosfatnom puferu. Lente inzulin je smjesa kristalnog i amornog inzulina u acetatnom puferu koji smanjuje topivost inzulina.

Inzulini dugog djelovanja trebaju zadovoljiti bazalne potrebe za inzulinom tijekom 24 sata, a posebno natašte i između obroka. Takvi inzulini su glargin i detemir. Inzulin glargin je dugodjelujući inzulin koji je nastao dvjema izmjenama na humanom inzulinu, dva argininska ostatka dodaju se na C kraju B lanca i na položaju A21 je glicin zamijenjen argininom. Otopina glargina je pH 4 što dovodi do stabilizacije heksamera i rezultira produljenom apsorpcijom nakon subkutane primjene koju je moguće predvidjeti. Njegova primjena rezultira manjom vjerojatnošću za hipoglikemiju i boljom 24 satnom pokrivenošću (Goodman i Gilman, 2006; Novak i Metelko, 2004).



## 2. Cink i inzulin

Prije 40 godina prvi put je dokazano kod glodavaca da prehranom uzrokovan deficit cinka smanjuje stimuliranu sekreciju inzulina. Dvije godine kasnije, istraživanje je pokazalo da je granulacija  $\beta$  stanica smanjena tijekom deficita cinka. Neka istraživanja govore da je kod dijabetičara smanjena koncentracija cinka u plazmi te povišeno izlučivanje i trošenje staničnog cinka u usporedbi sa zdravim pacijentima (Wijesekara i sur., 2009). 1980. godine dokazano je da cink može imitirati inzulin. Istraživanje je vršeno pomoću cinkova klorida koji je imitirao sposobnost inzulina da stimulira lipogenezu u adipocitima štakora. Cink utječe i na sintezu glikogena što je dokazano 1985. godine istraživanjem u kojem je jetra štakora izložena cinkovom acetatu tijekom 30 dana proizvela dvostruko više glikogena od jetre kontrolne skupine (Vardatsikos i sur., 2013). Količina cinka u tijelu je 2-3 grama. Plazmatska koncentracija je 10-20 mikromolarna, a slobodna koncentracija u krvi je nanomolarna (Rutter i sur., 2015). U tijelu je najviše koncentriran u Langerhansovim otočićima gušterače. Vanjski signali, kao što je povećana koncentracija glukoze, uzrokuju promjene unutarstanične razine slobodnog cinka. Izlučuje se zajedno s inzulinom u izvanstanični prostor Langerhansovih otočića tijekom egzocitoze inzulina. Heksameri tada disociraju na aktivne monomere inzulina i slobodne cinkove ione koji mogu djelovati parakrino na susjedne stanice ili mogu biti vraćeni u  $\beta$  stanice gdje imaju brojne funkcije (Wijesekara i sur., 2009).

### 2.1. Transporteri

Tijekom depolarizacije  $\beta$  stanica cink u njih ulazi pomoću L-tipa kalcijevih kanala ovisnih o naponu. Ovi kanali odgovorni su za regulaciju sekrecije inzulina kao odgovor na prisutnost glukoze. Kalcij ulazi kroz kanale i uzrokuje egzocitozu inzulina. Blokatori kalcijevih kanala mogu blokirati ulazak cinka što sugerira da postoje drugi načini transporta cinka u  $\beta$  stanicama, posebno tijekom niske koncentracije glukoze. U tom slučaju cink se unosi pomoću cinkovih transportera (ZnT) kao i različitih proteina (Zip). ZnT prenose cink iz citoplazme u unutarstanične organele te na taj način smanjuju koncentraciju u citoplazmi. Zip, djeluju suprotno u odnosu na ZnT, prenose cink iz izvanstaničnog prostora i unutarstaničnih organela u citoplazmu. U oba tipa transportera cink se veže na histidinom bogate regije transmembranske domene transporterske pumpe (Wijesekara i sur., 2009). Posebno značajan transporter iz ZnT porodice je ZnT8, uz njega su se značajnima pokazali ZnT3 i ZnT5. ZnT8 je gotovo isključivo eksprimiran u  $\beta$  stanicama gušterače gdje olakšava unos citosolnog cinka

u sekretorne granule. Kod osoba s dijabetes melitusom tip 1 pronađena su autoantitijela na ZnT8 koja služe kao prediktorni marker. Uklanjanje navedenog transportera utječe na sekreciju inzulina i razvoj glukozne tolerancije u  $\beta$  stanicama. Koncentracija cinka u Langerhansovim otočićima smanjena je kod životinja kojima je uklonjen ZnT8 receptor. Također je i razina cirkulirajućeg cinka smanjena kod miševa, kojima je uklonjen ZnT8 receptor, u odnosu na kontrolnu skupinu. Glukozom potaknuto otpuštanje inzulina bilo je nepromijenjeno ili blago povišeno kod miševa bez ZnT8 receptora. Povećana ekspresija ZnT8 značajno povećava toleranciju na glukozu u usporedbi s kontrolnom skupinom jer izlučeni cink inhibira sekreciju inzulina djelujući na autokrino/parakrinu petlju (Rutter i sur., 2015). ZnT5 je eksprimiran posvuda, a posebno u  $\beta$  stanicama gušterače gdje ima sposobnost dvosmjernog transporta te je eksprimiran i u Golgijevom aparatu i u sekretornim granulama. Važan je za sazrijevanje osteoblasta i normalnu funkciju srca (Wijesekara i sur., 2009). ZnT3 može biti važan za pravilnu funkciju  $\beta$  stanica, njegovo uklanjanje povećava intoleranciju na glukozu u streptozotocinom tretiranih životinja (Rungby i sur., 2010).

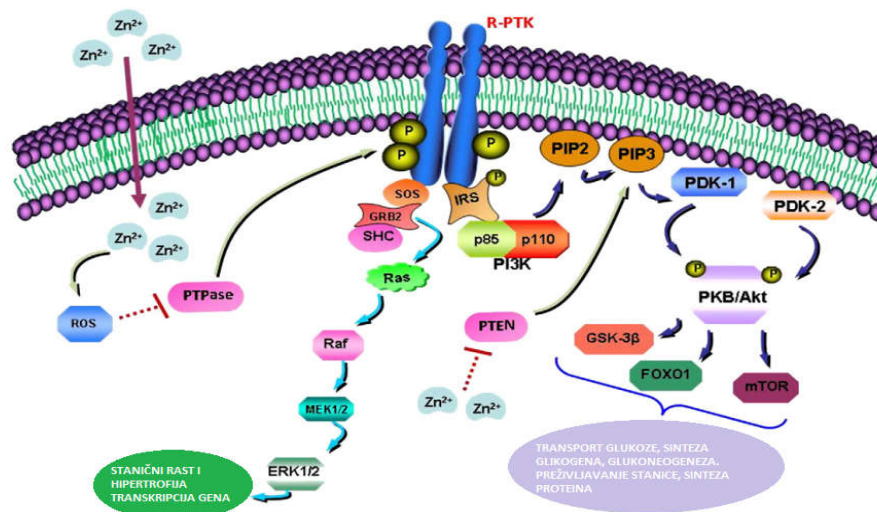
## 2.2. Uloga cinka i mjesta njegova djelovanja u signalnom putu inzulina

Cink ima katalitičku, strukturnu i regulatornu ulogu u proteinima. Strukturna uloga očituje se stabilizacijom strukture proteina ili organizacijom proteinskih domena koje stupaju u interakciju s drugim proteinima, nukleinskim kiselinama ili lipidima. Karakteristične flokulacije čine ga signalnim ionom. Regulatorna funkcija zahtjeva homeostatsku kontrolu koja je ključna za balans između zdravlja i bolesti. U održavanju homeostaze sudjeluju ZnT, Zip i citosolni transportni proteini kao što je metalotionein (Maret i sur., 2017). Fiziološki je supresor apoptoze, važan kofaktor antioksidativnih enzima kao što su katalaze, peroksidaze, Cu/Zn superoksid dismutaze. Također djeluje i na  $\alpha$  stanice gušterače gdje regulira sekreciju glukagona. Sekrecija cinka tijekom hiperglikemije signal je  $\alpha$  stanicama da suprimiraju otpuštanje glukagona (Wijesakara i sur., 2009). Cink ima sposobnost djelovanja na povećanje transporta glukoze, sintezu glikogena i lipogenezu, inhibira glukoneogenezu i lipolizu te modulira ključne elemente inzulinskog signalnog puta.

Inzulin se veže za  $\alpha$  podjedinicu inzulinskog receptora (IR) što uzrokuje konformacijsku promjenu koja dovodi do autofosforilacije  $\beta$  podjedinice receptora te posljedično aktivacije tirozin kinaze. Ona zatim fosforilira nekoliko strukturnih proteina uključujući inzulinski receptorski supstrat (IRS), Src homologan kolagen (Shc) i adaptorni protein s homologijom plekstrina PH i Src s homolog 2 (Sh2) domenom. Cink pojačava fosforilaciju  $\beta$  podjedinice

inzulinskog receptora inhibicijom protein tirozin fosfataze i na taj način oponaša signalni put inzulina

Vežanjem IRS-1 za aktiviranu  $\beta$ -podjedinicu IR dolazi do fosforilacije njegovih tirozinskih ostataka čime je omogućeno vezanje različitih staničnih proteina bogatih SH2 skupinama na IRS-1. Nakon toga slijedi aktivacija dvaju glavnih signalnih puteva, jednog vezanog uz aktivaciju fosfatidil-inozitol-3 kinaze (PI3-K) i drugog vezanog uz aktivaciju Sch/Grb2/MAP/ERK kinaza. Aktivacija MAP kinaznog sustava vezana je uz stanični rast i regulaciju sinteze proteina.



Slika 1. Inzulinski signalni put (preuzeto i prilagođeno prema: Vardatsikos i sur., 2013)

Regulatorna p85 podjedinica PI3-K veže se za fosforilirani IRS te dolazi do aktivacije p110 katalitičke podjedinice. Aktivirana PI3-K katalizira fosforilaciju fosfoinozitola na poziciji 3 inozitolnog prstena i dovodi do stvaranja fosfoinozitol-3 fosfata (PIP3). Protein kinaza B (PKB) se veže za PIP3 koji je fosforilira na Thr308. PKB ima važnu ulogu u posredovanju transporta glukoze, sintezi glikogena, glukoneogenezi, lipogenezi, sintezi proteina preko sljedećeg mehanizma: aktivirana PKB fosforilira GSK-3 $\beta$  na Ser9 i inhibira njezinu katalitičku aktivnost, na taj se način aktivira glikogen sintaza i potiče sintezu glikogena. PKB fosforilira i protein AS160 i tako inhibira njegovu gvanozin trifosfatnu (GTP) aktivnost omogućujući aktivaciju Rab-GTPaze i translokaciju GLUT4 na površinu membrane.

Dokazano je da cink aktivira PKB u BEAS-2B humanim bronhijalnim stanicama, HepG2 i 3T3-L1 fibroblastima i štakorskim adipocitima. GSK-3 $\beta$  i FOXO1 fosforiliraju se pod utjecajem ZnSO<sub>4</sub> u HepG2 stanicama. Fosforilacija inaktivira GSK-3 $\beta$  i uzrokuje povećanu sintezu glikogena. Fosforilacijom FOXO1 postaje inaktivan i dolazi do njegova uklanjanja iz

jezgre. Time dolazi do inhibicije hepatičke proizvodnje glukoze, inhibicije ekspresije gena glukoneogeničkih enzima fosfoenolpiruvat karboksilaze i glukoza-6-fosfataze. Stoga cink ovim mehanizmom dovodi do povećanja sinteze glikogena i smanjenja glukoneogeneze (Vardatsikos i sur., 2013; Osmanović Barilar, 2013).

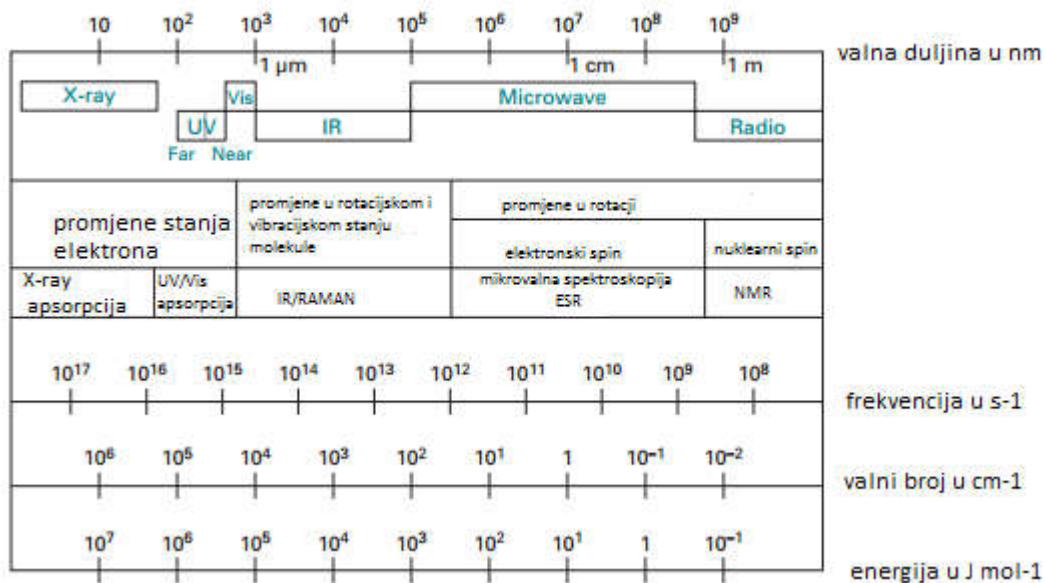
Povećanje i smanjenje stanične koncentracije cinka izaziva oksidacijski stres koji je važan u patofiziologiji  $\beta$  stanica i inzulinskoj rezistenciji ciljanih tkiva. Povišena koncentracija cinka dovodi do stvaranja slobodnih radikala inhibicijom antioksidativnih enzima i mitohondrijskog respiratornog lanca. Koncentracija u kojoj dolazi do prijelaza iz citoprotektivnog učinka u citotoksičan ovisi o odnosu slobodnog i vezanog cinka. Koncentracija slobodnih cinkovih iona je viša u dijabetičkim srčanim stanicama i tkivima, smanjuje se u hipoksiji i dvostruko se povećava kada su  $\beta$  stanice izložene visokim koncentracijama glukoze. Kada se koncentracija slobodnih iona cinka poveća, on se veže za makromolekule i proteine za koje se inače ne veže. To može dovesti do gubitka staničnog cinka što uzrokuje oksidativni stres, povećava vjerojatnost upale i kompromitira imunitet. Visoke koncentracije metalotioneina štite pankreas i ostala tkiva od kemijskog stresa i oštećenja tkiva kod dijabetesa (Maret, 2017).

### 2.3. Suplementi

Suplementi su sintetizirani organski spojevi cinka koji imaju inzulinomimetičko djelovanje i poboljšavaju djelovanje cinka u in vivo i in vitro ispitivanjima. Organski spojevi puno su potentniji od anorganskih te poboljšavaju komplikacije dijabetesa. Fiziološke doze od 20mg/dan cinka u periodu od 2 mjeseca pokazale su se djelotvorne kod dijabetičara. Istraživanja su pokazala da poboljšavaju glikemijski status dijabetičara, smanjuju razinu Hb1Ac, poboljšavaju lipidni profil, smanjuju lipidnu peroksidaciju, krvni tlak i poboljšavaju antioksidacijski profil dijabetičara (Vardatsikos i sur., 2017). Poznato je da je cink prisutan u pripravcima inzulina gdje ima višestruku ulogu. Cink s inzulinom stvara heksamernu strukturu te na taj način povećava njegovu stabilnost pri emulzifikaciji tijekom proizvodnog procesa. Nadalje, cink smanjuje topljivost inzulina u neutralnom otapalu kada je cinkov molarni udio veći od jedan u odnosu na inzulin. Nakon injektiranja kisele otopine inzulina u područje pH 7,4 dolazi do stvaranja amorfnih precipitata u prisutstvu iona cinka te se na taj način regulira apsorpcija inzulina nakon subkutane primjene i produljuje vrijeme djelovanja (Manoharan i sur., 2015; Wijesekara i sur., 2009; Gualandi Signorini, 2001; Hallas-Maller i sur., 1954).

### 1.3. Spektroskopija

Spektroskopske tehnike se temelje na korištenju elektromagnetskog zračenja u svrhu detekcije atoma, molekula, određivanja koncentracije specije u uzorku te za određivanje molekularne strukture. Elektromagnetsko zračenje je oblik energije čije se ponašanje može objasniti svojstvima vala i čestice. Sastoji se od električnog i okomitog magnetskog vektora, svaki od njih oscilira u ravnini pod pravim kutom u smjeru širenja. Elektromagnetski val je karakteriziran s nekoliko fundamentalnih veličina: brzinom, valnom duljinom, faznim kutem, amplitudom, smjerom širenja, polarizacijom, frekvencijom. Frekvencija i valna duljina elektromagnetskog zračenja imaju velik raspon veličina te se stoga elektromagnetsko zračenje prikazuje elektromagnetskim spektrom koji je podijeljen na nekoliko regija. On se temelji na tipu atomskog ili molekuskog prijelaza koji dovodi do apsorpcije ili emisije fotona (Harvey, 2016; Hofman i sur., 2010).



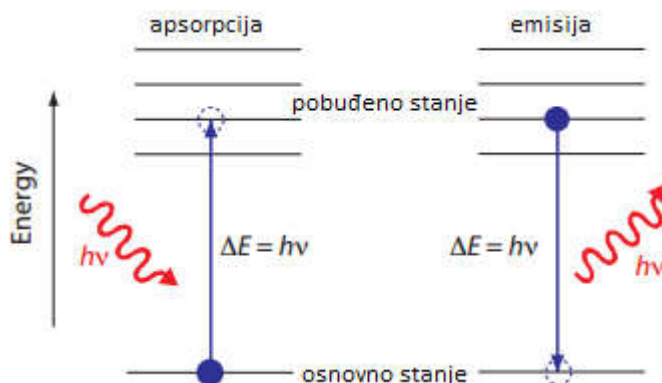
Slika 2. Elektromagnetski spektar i njegova upotreba u spektroskopskim tehnikama (preuzeto i prilagođeno prema: Hofman i sur., 2010)

Spektroskopija se može podijeliti na dvije skupine tehnika. U prvoj skupini dolazi do izmjene energije između fotona i uzorka (Harvey, 2016).

Tablica 1. Spektroskopske tehnike koje se temelje na izmjeni energije između fotona i uzorka

Tip prijenosa energije	Regija elektromagnetskog spektra	Tehnika
Apsorpcija	$\gamma$ zračenje	Mossbauerova spektroskopija
	X zračenje	X ray apsorpcijska spektroskopija
	UV/Vis	UV/Vis spektroskopija Atomska apsorpcijska spektroskopija
	IR	IR spektroskopija RAMAN spektroskopija
	Mikrovalno	Mikrovalna spektroskopija
	Radio zračenje	Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija
Emisija	UV/Vis	Atomska emisijska spektroskopija
Fotoluminiscencija	X zrake	X ray florescencija
	UV/Vis	Florescentna spektroskopija Fosforescentna spektroskopija Atomska fluorescentna spektroskopija
Kemiluminiscencija	UV/Vis	Kemiluminiscentna spektroskopija

Interakciju uzorka i elektromagnetskog zračenja najjednostavnije je razumjeti ako znamo da se elektromagnetsko zračenje sastoji od fotona, čestica čija energija ovisi o valnoj dužini, valnom broju i frekvenciji. U slučaju apsorpcijske spektroskopije atom ili molekula apsorbiraju foton i dolazi do prijelaza iz osnovnog u pobuđeno stanje. Tip prijelaza ovisi o energiji fotona. U slučaju fotona koji se nalazi unutar područja vidljive svjetlosti, doći će do prelaska atoma iz osnovnog u pobuđeno stanje. Ako se foton nalazi u IR području doći će do promjene vibracijske energije jedne od veza unutar molekule.



Slika 3. Prikaz apsorpcije i emisije fotona (preuzeto i prilagođeno prema: Harvey, 2016)

Do apsorpcije će doći samo ako energija fotona,  $h\nu$  odgovara razlici energija osnovnog i pobuđenog stanja. Kada uzorak apsorbira elektromagnetsko zračenje, broj fotona koji prolaze kroz njega se smanji te se na temelju tog pada broja fotona mjeri apsorpcija. Ona se prikazuje apsorpcijskim spektrom.

Emisija je proces u kojem atom prelazi iz pobuđenog u osnovno stanje i pri tome se otpušta energija u obliku fotona. Atom ili molekula u pobuđeno stanje mogu doći pomoću termalne energije, apsorpcije fotona ili kemijske reakcije. Emisija koja slijedi apsorpciju fotona je fotoluminiscencija, dok je emisija koja slijedi kemijsku reakciju kemiluminiscencija (Harvey, 2016; Hofman i sur., 2010).

U drugu skupinu spektroskopskih tehnika spadaju one kod kojih dolazi do promjene amplitude, faznog kuta, polarizacije i smjera širenja elektromagnetskog zračenja što dovodi do refrakcije, refleksije, raspršivanja, difrakcije i disperzije zračenja u uzorku (Harvey, 2016).

Tablica 2. Spektroskopske tehnike u kojima ne dolazi do izmjene energije između fotona i uzorka

<b>Područje elektromagnetskog spektra</b>	<b>Tip interakcije</b>	<b>Spektroskopska tehnika</b>
X- zrake	Difrakcija	Difrakcija X zraka
UV/Vis	Refrakcija	Refraktometrija
	Raspršenje	Neflerometrija Turbidimetrija
	Disperzija	Optička rotacijska disperzija

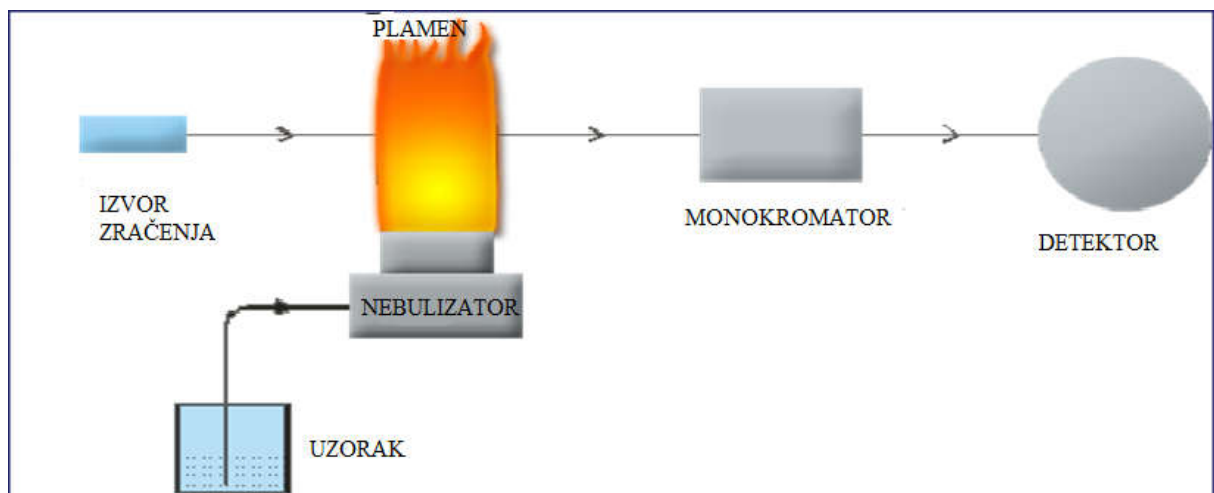
### 1.3.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska apsorpcijska spektroskopija je metoda u kojoj slobodni atomi u plinovitom stanju apsorbiraju zračenje određene valne duljine i stvaraju mjerljivi signal. Koristi se kod metala čija je razlika energije osnovnog i pobudnog stanja prevelika da bi se pobudili toplinskom energijom. Izmjereni intenzitet zračenja,  $I$ , ovisi o početnom intenzitetu zračenja određene valne duljine,  $I_0$ , duljini puta,  $L$ , koji zračenje prolazi. Ta veza slijedi Beer Lambertov zakon:

$$I=I_0e^{-koL}$$

Atomski apsorpcijski spektrofotometar se sastoji od (Fernández i sur., 2018):

1. izvora linijskog zračenja
2. atomizatora
3. monokromatora
4. detektora

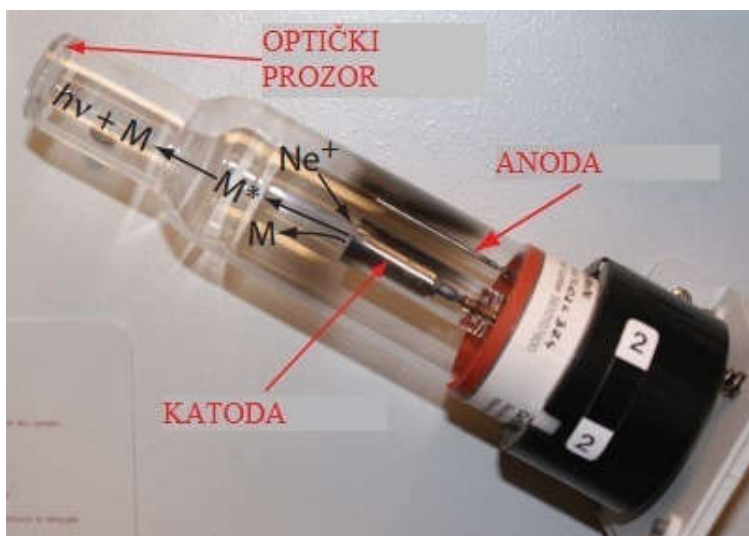


Slika 4. Atomski apsorpcijski spektrofotometar (preuzeto i prilagođeno prema: <http://lab-training.com/2013/05/08/introduction-to-aas-component-parts/>)



### 1.3.1.1. Izvor linijskog zračenja- lampa sa šupljom katodom

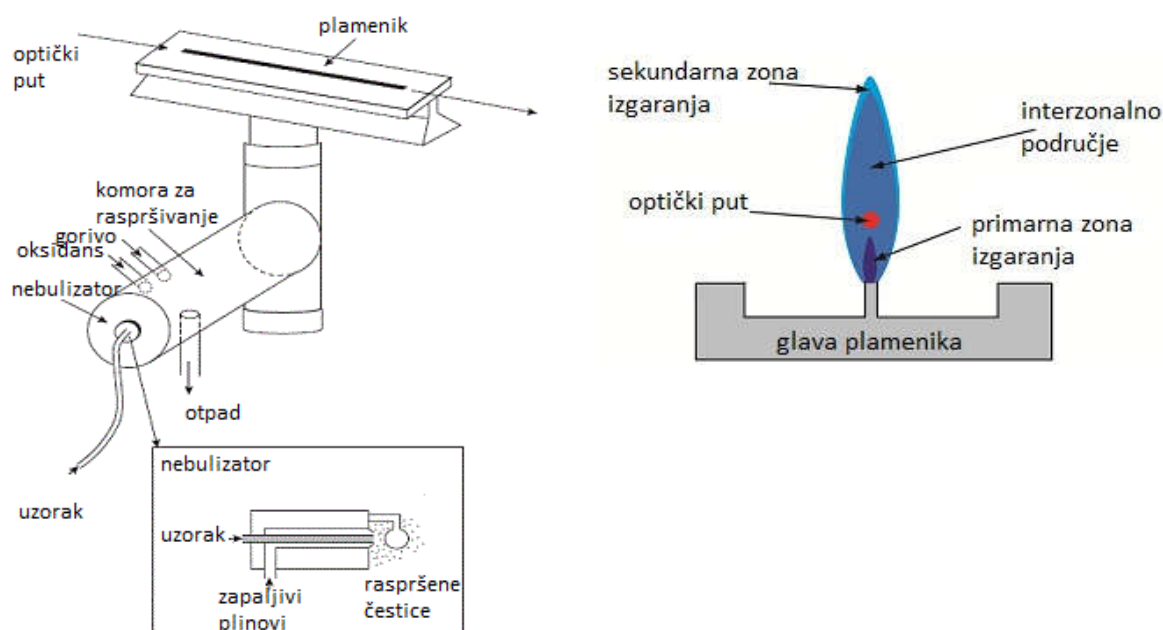
Izvor linijskog zračenja sastoji se od anode i katode smještene unutar staklene cijev koja je ispunjena inertnim plinom (neonom ili argonom) pod niskim tlakom. Primjenom razlike potencijala između anode i katode od 300 do 400 V dolazi do ionizacije inertnog plina. Pozitivno nabijeni ioni inertnog plina sudaraju se s negativno nabijenom površinom katode i dolazi do otpuštanja atoma metala s površine katode. Ti atomi su u pobuđenom stanju i prelaskom u osnovno stanje emitiraju zračenje valne duljine koja je karakteristična za taj metal. Nakon prelaska u osnovno stanje istalože se natrag na površinu katode ili na stijenku staklene cijevi. Stoga se uvijek bira katoda izgrađena od metala koji želimo analizirati (Fernandez i sur.,2018; Harvey, 2016).



Slika 5. Lampa sa šupljom katodom (preuzeto i prilagođeno prema: Harvey, 2016)

### 1.3.1.2. Atomizator

Atomizacija je proces tijekom kojeg se analit prevodi u plinovito agregatno stanje te u oblik slobodnih atoma. Proces se sastoji od uklanjanja otapala, isparavanja analita i rastavljanja analita na slobodne atome. Može biti plamena i elektrotermalna.



Slika 6. Plameni atomizator i zone plamena (preuzeto i prilagođeno prema: Harvey, 2016)

Kod plamene atomizacije uzorak se uvlači pod visokim tlakom tankom cjevčicom do nebulizatora koji ga rasprši na čestice veličine 1-50 $\mu$ m. Nebulizator raspršuje uzorak u komoru za raspršivanje kroz koju se prenosi pomoću smjese plinova do glave plamenika gdje se pomoću toplinske energije prevodi u suhi aerosol malih, čvrstih čestica koje zatim isparavaju stvarajući paru koja se sastoji od iona, atoma i molekula. Temperatura plamena ovisi o vrsti plinova od kojih se sastoji, najčešće su to zrak i acetilen ili dušikov oksid i acetilen. Plamen se sastoji od tri zone primarne koja je bogata plinom, interzonalnog područja u kojemu je najveća količina slobodnih atoma te je najpogodnije za mjerenje i sekundarne zone u kojoj je temperatura niža i formiraju se molekule. Količina slobodnih atoma ovisi o vremenu provedenom u plamenu te o udaljenosti od glave plamenika. Što je analit duže u plamenu, bolji je proces atomizacije, ali je i veća vjerojatnost da dođe do oksidacije. Atomi koji lako oksidiraju (Cr) imaju najveću koncentraciju pri dnu plamena, dok koncentracija atoma koji nisu skloni oksidaciji (Ag) raste linearno s povećanjem visine plamena.

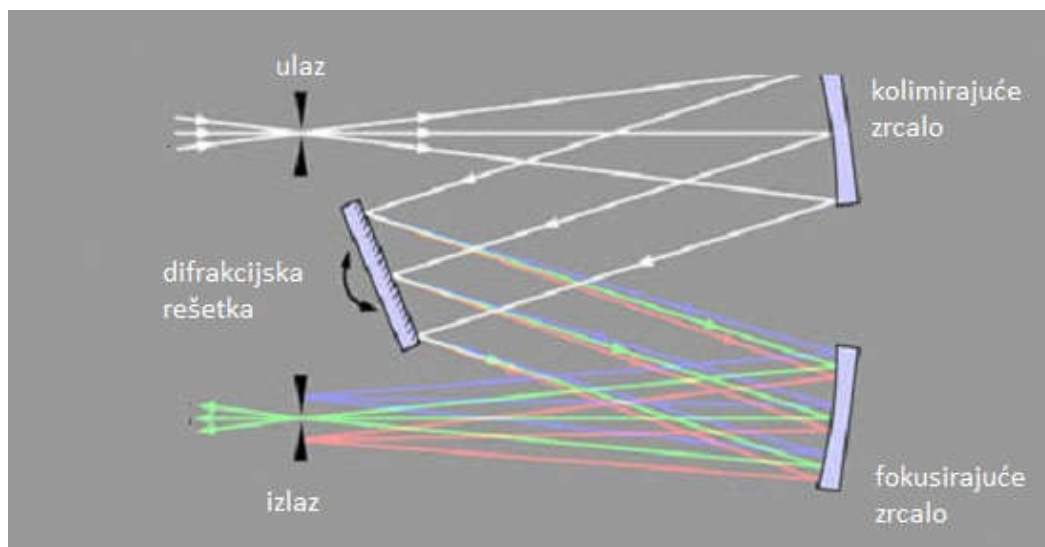
Osjetljivost metode povećava se odabirom plamenika s dugim optičkim putem i stabilnim plamenom. Prednost metode je njezina reproducibilnost, a mana slaba atomizacija. Do slabe atomizacije dolazi zato što su čestice nastale raspršivanjem prevelike da bi ih nosio plin, na taj način otpada 95% čestica. Drugi razlog je velika količina plinova koja razrijedi uzorak (Fernández i sur., 2018; Harvey, 2016).

Elektrotermalni atomizator je grafitna peć koja se sastoji od grafitne cijevi smještene u zatvorenom sklopu koji na svakom kraju ima optički propustan prozor. Mala količina uzorka 5-10 $\mu$ L injektira se kroz otvor na vrhu peći te grijeje na temperaturi 100°C kako bi se prevela u kruti ostatak. Povećanjem temperature na 350-1200°C uzorak se pretvara u pepeo. Organski materijal se prevodi u CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, a anorganski isparava. Nastale plinove odnosi inertni plin koji struji atomizatorom. Zadnji korak je atomizacija koja se provodi daljnjim povećanjem temperature na 2000-3000°C. Rezultat ovog postupka apsorpcijski je pik čija visina ili površina odgovara apsolutnoj količini analita u uzorku. Prednost ovog načina atomizacije je povećana osjetljivost koja je posljedica zadržavanja plinovitog analita u malom volumenu unutar grafitne peći (Fernandez i sur.,2018; Harvey, 2016).

### 1.3.1.3. Monokromator

Monokromator prevodi polikromatsko u monokromatsko zračenje. Može biti fiksni ili skenirajući. U slučaju fiksnog monokromatora moguć je odabir jedne valne duljine pri kojoj se vrši mjerenje, dok skenirajući ima rotirajuću difrakcijsku rešetku koja omogućuje kontinuirano podešavanje različitih valnih duljina.

Zračenje koje ulazi u monokromator pada na kolimirajuće zrcalo koje reflektira paralelni snop zraka na difrakcijsku rešetku. Ona raspršuje zračenje prema drugom zrcalu koje ga zatim fokusira na ravnu površinu na kojoj se nalazi izlazni otvor kroz koji prolazi zračenje samo jedne valne duljine. Nakon izlaska zračenje odlazi na detektor (Fernandez i sur., 2018; Harvey, 2016).



Slika 7. Prikaz zrcala u monokromatoru (preuzeto i prilagođeno prema: <http://www.lab-training.com>)

#### 1.3.1.4. Detektor

Intenzitet selektiranog svjetla, koje dolazi do detektora, najčešće se mjeri pomoću fotomultiplikirajuće cijevi. Ona se često koristi jer može mjeriti veliki raspon valni duljina, ima veliku dinamičnost, veliku mogućnost pojačanja signala, malu razinu smetnji (Fernandez i sur., 2018; Watson i sur., 1999).

#### 1.4. Validacija

Validacija je postupak kojim se utvrđuje odgovara li djelotvornost neke metode zahtjevima za određenu analitičku primjenu. Provodi se pri uvođenju nove analitičke metode ili pri izmjeni bilo kojeg dijela validirane analitičke metode. Prema Američkoj, Japanskoj i Europskoj farmakopeji validacija je sastavni dio procesa registracije lijekovitih oblika ili farmakološki aktivnih tvari. Osnovni je element sustava osiguranja kvalitete i nužna je za distribuciju i terapijsku primjenu lijeka u Hrvatskoj i inozemstvu. Parametri koji se određuju tijekom validacije su točnost, preciznost, linearnost i područje mjerenja, granica detekcije, granica određivanja, selektivnost, stabilnost, reproducibilnost, robusnost. Koji parametri će se određivati, ovisi o namjeni metode. Nakon provedene validacije metode, po svim parametrima koje definiraju US FDA (od eng. United States Food and Drug Administration), EDQM (eng. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care), ICH (eng. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) dokazuje se da je postupak prikladan za točno određenu namjenu, te je kao takav spreman za redovno i sigurno provođenje analiza niza predviđenih uzoraka. Tekst analitičke metode mora sadržavati detaljan opis analitičkog postupka i primijenjene tehnike kako bi ga svaki analitičar mogao ponoviti. Opis uključuje pripremu uzorka, reagensa i poredbenih otopina, opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize te primjenu formula za izračunavanje rezultata analize (Nigović i sur., 2014; Medić Šarići i sur., 2006; Peters i sur., 2001).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Elementi u tragovima važni su za biološku, kemijsku i molekularnu funkciju stanice. Cink je jedan od esencijalnih elemenata u tragovima. Uočena je snižena serumska koncentracija cinka kod osoba s dijabetesom tip 2, inzulinskom rezistencijom, metaboličkim sindromom te kod pretilosti. Također, dokazana je povezanost s povećanim rizikom od koronarnih arterijskih bolesti i mortalitetom kod dijabetesa (Rutter i sur., 2015; Vardatsikos i sur., 2013). Cink ima važnu ulogu u svim stadijima metabolizma inzulina, od sinteze preko sekrecije do iskorištavanja i pohrane. Štiti  $\beta$  stanice od razaranja, a njegov nedostatak smanjuje sposobnost  $\beta$  stanica da proizvode i izlučuju dovoljno inzulina što dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi.

Danas se koncentracija cinka u serumu može odrediti kolorimetrijski, polarigrafijski, X-ray fluorescencijom, emisijskom spektroskopijom, fluorometrijski i atomskom apsorpcijskom spektroskopijom. Atomska apsorpcijska spektroskopija se preferira jer je osjetljiva, selektivna, jednostavna, brza i relativno jeftina (Sadia i sur., 2014).

Validaciju je potrebno provesti pri razvoju i uvođenju nove metode te u slučaju promjene bilo kojeg dijela već validirane metode. Može se koristiti za procjenu kvalitete, pouzdanosti i konzistentnosti rezultata analitičke metode što je sastavni dio dobre analitičke prakse. Stoga je cilj ovog rada provesti validaciju metode za određivanje cinka u inzulinu plamenom atomskom apsorpcijskom spektroskopijom te usporediti koncentracije cinka u dva različita komercijalno dostupna pripravka inzulina. Pritom su određivani sljedeći validacijski parametri: linearnost, preciznost (koja uključuje ponovljivost i srednju preciznost), točnost i osjetljivost.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Korištene kemikalije

- Zn standard za AAS 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma, Aldrich, Njemačka)
- $\text{HNO}_3$  65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- $\text{HNO}_3$  2%
- $\text{HNO}_3$  5%
- 6M HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 0,1M HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 $\mu\text{Scm}^{-1}$ )

Sve korištene kemikalije su pro analysi stupnja kakvoće.

#### 3.1.2. Aparatura

Mjerenja su provedena na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine prema parametrima:

- Žarulja sa šupljom katodom (15mA)
- Valna duljina (nm): 213,9 nm
- Gorivo/ oksidans: acetilen/ zrak
- Acetilen (tlak (Pa)/ protok ( $\text{dm}^3\text{min}^{-1}$ ) : 0,9x105/2
- Zrak tlak (Pa)/ protok ( $\text{dm}^3\text{min}^{-1}$ ) : 5,5x105/17
- Širina pukotine (nm): 0,7
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Fotodetektor
- Pisač, računalo: AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo, monitor, printer HP 5652



### 3.1.3. Laboratorijsko posuđe i pribor

- Odmjerna tikvica 1000 mL, 500 mL, 100 mL, 25 mL
- Automatska pipeta 50-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L
- Staklena pipeta 1 mL, 2 mL, 5 mL
- Plastične epruvete s čepom
- Čaša 100 mL
- Šprica 5 mL
- Propipeta

### 3.1.4. Uzorci

- Inzulin NovoRapid penfill- 1 uložak sadrži 3 mL, što odgovara 300 jedinica. 1 mL otopine sadrži 100 jedinica aspart inzulina (što odgovara 3,5 mg).  
Pomoćne tvari: glicerol, fenol, metakrezol, cink klorid, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, natrijev klorid, kloridna kiselina, natrijev hidroksid, voda za injekcije.
- Inzulin NovoMix 30 FlexPen 100 jedinica/mL suspenzija za injekciju u napunjenoj brizgalici- 1 mL suspenzije sadrži 100 jedinica otopine aspart inzulina /aspart inzulina kristaliziranog s protaminom u omjeru 30/70 (što odgovara 3,5 mg). 1 napunjena brizgalica sadrži 3 mL, što odgovara 300 jedinica.  
Pomoćne tvari: glicerol, fenol, metakrezol, cinkov klorid, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, natrijev klorid, protaminsulfat, kloridna kiselina, natrijev hidroksid, voda za injekcije.

Uzorci su čuvani pri propisanim uvjetima na temperaturi 8-12°C.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Princip metode

Količina cinka određena je mjerenjem apsorbancije uzorka raspršenog u smjesi acetilena i zraka te potom izgorenog u plamenu pri čemu dolazi do atomizacije. Nastali atomi izlažu se zračenju valne duljine 213,9 nm te se prati promjena intenziteta zračenja.

### 3.2.2. Priprema otopina

- Priprema 2% HNO<sub>3</sub>

2% otopina HNO<sub>3</sub> pripremljena je razrjeđivanjem 20 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> u odmjernoj tikvici od 1000mL. U tikvicu se stavi dio ultračiste vode, zatim se doda 20 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Ova otopina korištena je za ispiranje instrumenta.

- Priprema 5% HNO<sub>3</sub>

5% otopina HNO<sub>3</sub> dobivena je razrjeđivanjem 50 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 1000 mL. Pripremljena otopina korištena je za pranje laboratorijskog posuđa

- Priprema 0,01M HCl

0,01M HCl priprema se razrjeđivanjem 50 mL 0,1M HCl ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 500 mL. Pripremljena otopina korištena je za pripremu otopina standarda.

- Priprema matične standardne otopine cinka za AAS koncentracije 10 µg/mL

Matična standardna otopina cinka koncentracije 10 µg/mL priprema se iz komercijalno dostupne standardne otopine cinka čija je koncentracija 1000 µg/mL. 1 mL komercijalno dostupne otopine razrijedi se ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

Za određivanje kalibracijskog pravca pripremi se niz razrijeđenja matične otopine cinka u odmjernoj tikvici volumena 25 mL. Koncentracija i priprema standardnih otopina cinka navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Koncentracija i priprema standardnih otopina cinka

<b>Koncentracija standarda cinka (mg/L)</b>	<b>Priprema standarda</b>	<b>Ukupno razrijeđenje u odnosu na matičnu otopinu</b>
0,20 (ST1)	500 µL matične standardne otopine koncentracije 10 µg/mL nadopuni se sa 0,01M HCl do 25 mL	50x
0,40 (ST2)	1000 µL matične standardne otopine koncentracije 10 µg/mL nadopuni se sa 0,01M HCl do 25 mL	25x
0,60 (ST3)	1500 µL matične standardne otopine koncentracije 10 µg/mL nadopuni se sa 0,01M HCl do 25 mL	16,67x
0,80 (ST4)	2000 µL matične standardne otopine koncentracije 10 µg/mL nadopuni se sa 0,01M HCl do 25 mL	12,5x
1,00 (ST5)	2500 µL matične standardne otopine koncentracije 10 µg/mL nadopuni se sa 0,01M HCl do 25 mL	10x
1,20 (ST6)	3000 µL matične standardne otopine koncentracije 10 µg/mL nadopuni se sa 0,01M HCl do 25 mL	8,33x
Slijepa proba	Tikvicu od 25 mL nadopuniti 0,01M HCl	

- Priprema uzoraka inzulina

Inzulin iz Penfill-a i FlexPen-a volumena 3 mL prenese se u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se zatim nadopuni 0,01M HCl do oznake.

- Priprema uzoraka inzulina s dodatkom poznate količine matične standardne otopine cinka

Po 0,5 mL otopine inzulina prebaci se u svaku od tri odmjerne tikvice od 50 mL. Svakoj tikvici se doda različita količina (0,5 mL, 1 mL i 2 mL) matične standardne otopine cinka 10 µg/mL. Tikvice se nadopune s 0,01M HCl do oznake.

### 3.2.3. Postupak određivanja koncentracije cinka u inzulinu

Princip ove metode je mjerenjem apsorpcije uzorka odrediti koncentraciju cinka u inzulinu. Uzorak se pomoću plastične cjevčice unosi u instrument, u plamenu se cink atomizira te biva izložen linijskom zračenju valne duljine 213,9 nm. Promjena intenziteta zračenja detektira se fotodetektorom te se na temelju te promjene dobiva apsorpcija. Iz dobivene apsorpcije se izračuna stvarna koncentracija analita uz pomoć kalibracijskog pravca.

Prije određivanja cinka u uzorcima uređaj je potrebno kalibrirati prethodno pripremljenim nizom kalibracijskih otopina standarda. Prije uporabe uređaj se ispire 2% HNO<sub>3</sub> te ultračistom vodom, s kojom se ispire i nakon svakog mjerenja. Svaki standard i slijepa proba prije uporabe se promućka kako bi se homogenizirao. Uređaj omogućuje velik broj mjerenja u kratkom razdoblju te se stoga mjeri uzorke u triplikatu i računa srednja vrijednost dobivenih rezultata. Iz dobivenih vrijednosti crta se kalibracijska krivulja iz koje se zatim računa stvarna koncentracija cinka.

### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i GraphPad Prism (Graph pad Software, Inc., San Diego, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je Mann-Whitney test. Svi doneseni zaključci u radu provedeni su uz razinu značajnosti  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## Procjena linearnosti, preciznosti, točnosti i osjetljivosti

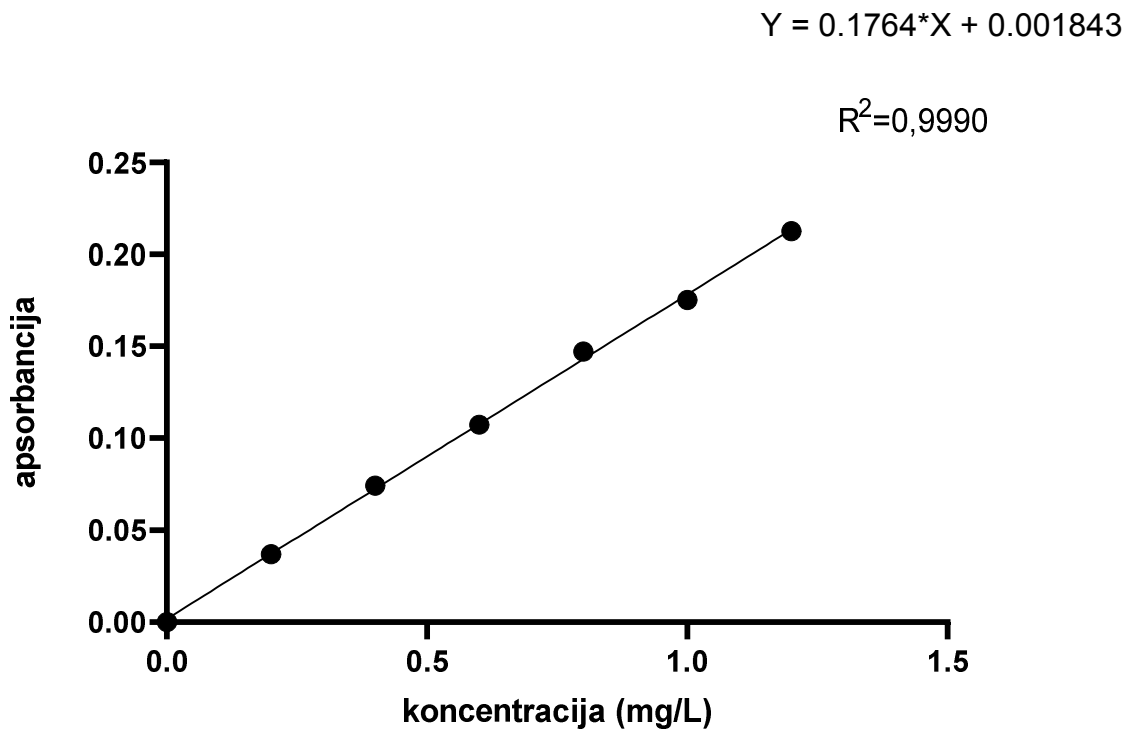
Rezultati su dobiveni korištenjem postupka analize određivanja cinka korištenjem atomske apsorpcijske spektroskopije koji su opisani u poglavlju Materijali i metode. Prikazani su tablično i grafički.

### 4.1. Linearnost

Linearnost analitičke metode je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Kako bi se utvrdilo da je metoda linearna potrebno je provesti 3 do 6 mjerenja na najmanje 5 različitih koncentracija. Izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca koji treba biti veći od 0,999. Koeficijent korelacija dobiva se iz grafičkog prikaza ovisnosti izmjenjenog analitičkog signala o koncentraciji analita u uzork koji se naziva kalibracijska krivulja (Nigović i sur., 2014; Medić-Šarić i sur., 2006).

Tablica 4. Prikaz izmjerenih apsorbancija otopina za izradu kalibracijske krivulje

<b>c (mg/L)</b>	<b>A</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Izmjerena c (mg/L)</b>
0	0	0,1	0
0,2	0,0369	1,1	0,199
0,4	0,0742	1,6	0,404
0,6	0,1074	0,5	0,591
0,8	0,1472	0,1	0,819
1,0	0,1753	0,3	0,982
1,2	0,2126	1,6	1,204



Slika 8. Graf ovisnosti koncentracije standardnih otopina cinka i apsorbancije

Za izradu kalibracijskog pravca i provjeru linearnosti pripremljen je niz otopina iz matične standardne otopine cinka u koncentracijskom rasponu od 0,2 do 1,2 mg/L. Svaka od njih mjerena je u triplikatu te je izračunata srednja vrijednost. Na temelju dobivenih rezultata regresijskom analizom dobivena je jednadžba kalibracijskog pravca  $y=0,1764x+0,001843$ , s koeficijentom korelacije od 0,999. Temeljem dobivenih rezultata koji su prikazani u tablici 4 i na slici 8 zaključuje se da je metoda linearna i prikladna za određivanje koncentracije cinka u uzorcima.

## 4.2. Preciznost

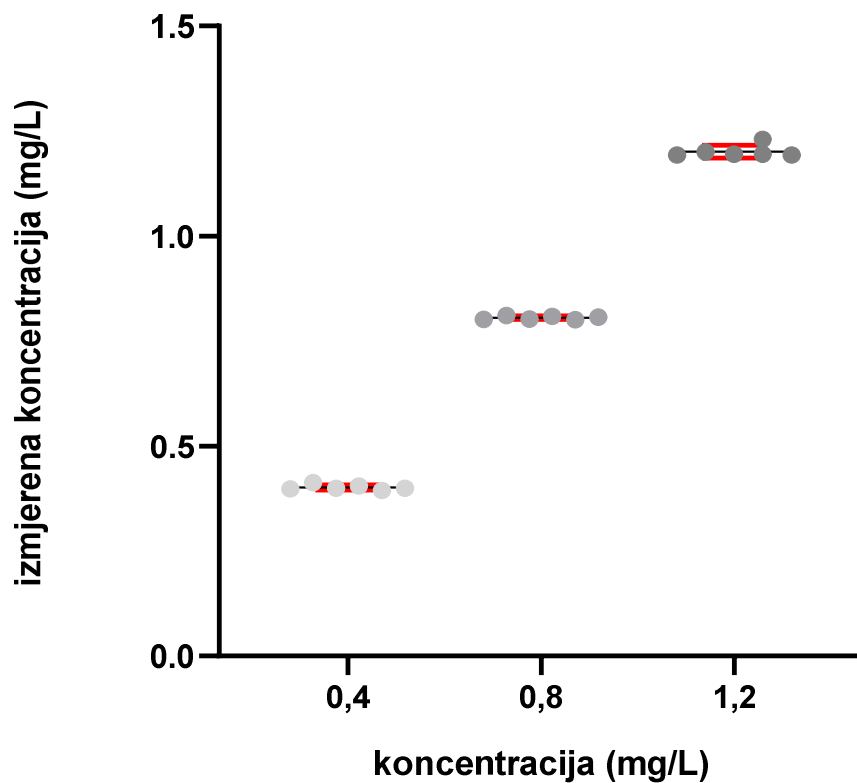
Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Uzorak treba biti homogen i autentičan, a ukoliko to nije moguće koriste se umjetno pripremljeni uzorci ili otopine uzoraka. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost se izražava kao podudaranje rezultata dobivenih istom metodom, pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu, dok srednja preciznost izražava odstupanje rezultata dobivenih pod različitim laboratorijskim uvjetima (različiti dan, analitičar, oprema). Obnovljivost izražava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Preciznost se iskazuje statističkim veličinama kao standardno odstupanje (SD), relativna standardna devijacija (RSD%) i kao raspon pouzdanosti oko srednje vrijednosti (Nigović i sur., 2014; Medić-Šarić i sur., 2006).

Ponovljivost smo ispitali provođenjem šest mjerenja na uzorcima koncentracije 0,4 mg/L, 0,8 mg/L i 1,2 mg/L unutar jednog dana. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5 i grafički. Na temelju rezultata i grafičkog prikaza zaključuje se da je metoda ponovljiva jer je RSD između 0,5% i 1,642% što zadovoljava zahtjev da bude do 2 %.

Tablica 5. Ponovljivost unutar dana

<b>c (mg/L)</b>	0,4	0,8	1,2
<b>Izmjerena koncentracija (mg/L)</b>	0,413	0,802	1,231
	0,405	0,809	1,195
	0,394	0,807	1,2
	0,398	0,803	1,195
	0,4	0,811	1,193
	0,4	0,801	1,193
$\bar{c}$ (mg/L)	0,40166667	0,8055	1,20116667
<b>SD</b>	0,00659293	0,00408656	0,01483801
<b>RSD (%)</b>	1,64139224	0,50733251	1,2353002





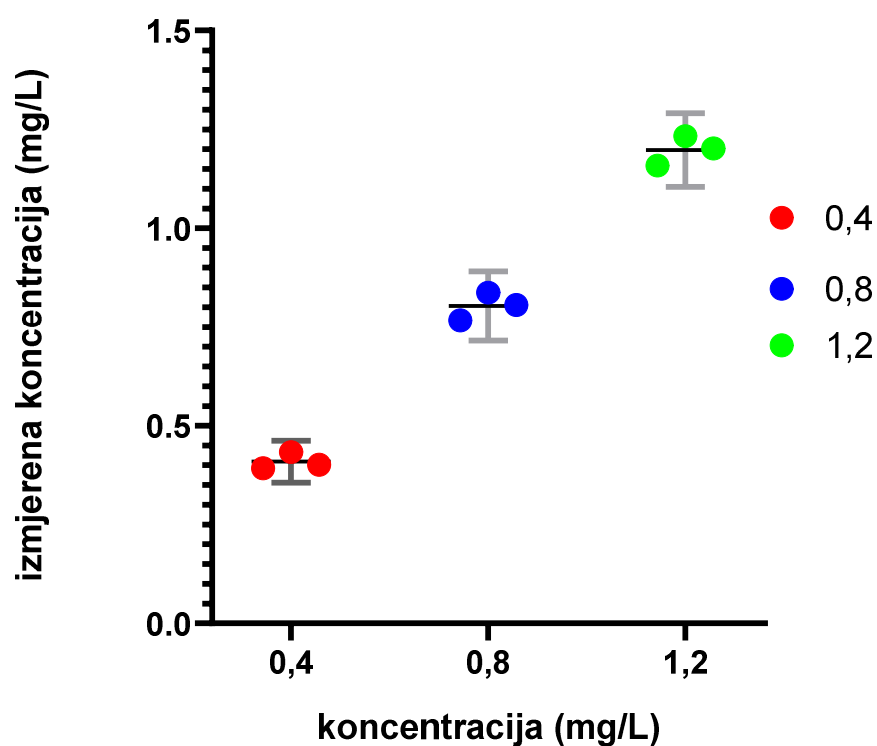
Slika 9. Graf ponovljivosti uzastopnih mjerenja unutar dana

#### 4.2.1. Srednja preciznost

Srednja preciznost dobivena je mjerenjem apsorbancije standarda koncentracije 0,4 mg/L, 0,8 mg/L i 1,2 mg/L unutar tri dana. Na temelju dobivene apsorbancije i jednadžbe kalibracijskog pravca izračunata je stvarna koncentracija cinka u standardima. Rezultati su izraženi srednjom vrijednošću, standardnom devijacijom i relativnom standardnom devijacijom. RSD za cink treba biti do 3% . Najveće odstupanje je za uzorak najmanje koncentracije što se može objasniti nestabilnošću standarda pri nižim koncentracijama. Manje značajna odstupanja uočena su i kod druga dva standarda te je moguće da su posljedica nestabilnosti standarda kroz dulji vremenski period.

Tablica 6. Srednja preciznost metode kroz 3 dana

c (mg/L)	0,4	0,8	1,2
1. radni dan	0,40166667	0,8055	1,20116667
2. radni dan	0,39283333	0,7665	1,233
3. radni dan	0,43333333	0,83666667	1,1585
$\bar{c}$ (mg/L)	0,40927778	0,80288889	1,19755556
SD	0,02129576	0,03515613	0,03738105
RSD (%)	5,20325265	4,37870466	3,12144566



Slika 10. Graf ovisnosti srednje vrijednosti izmjerene koncentracije o očekivanoj koncentraciji dobiven usporedbom rezultata kroz tri dana

### 4.3. Točnost

Točnost analitičke metode je slaganje između srednjih vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Za određivanje točnosti potrebno je napraviti tri ponovljena mjerenja svake od pet odabranih koncentracija, Odstupanje od stvarne vrijednosti iskazuje se kao analitički prinos (Recovery). Određuje se u radnom području metode nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti (Nigović i sur., 2014; Medić-Šarić i sur., 2006).

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \cdot 100$$

$\bar{x}$  - srednja izmjerena vrijednost,  $\hat{x}$  - stvarna vrijednost analita u uzorku

Točnost je određena mjerenjem apsorbancije cinka u prethodno pripremljenim uzorcima inzulina. U takve uzorke dodano je 0,5, 1,0 i 2,0 mL matične standardne otopine cinka te je zatim ponovno mjerena apsorbancija. Iz dobivene apsorbancije izračunata je koncentracija cinka. Dopuštena vrijednost analitičkog prinosa je između 95% i 115%. Dobivene vrijednosti su između 95,51% i 100,136% iz navedenog se može zaključiti da je metoda prihvatljive točnosti. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 7 i 8.

Tablica 7. Analitički prinos cinka u uzorcima NovoMix 30 FlexPenn u kojima je dodano 0,5, 1,0, 2,0 mL matične standardne otopine cinka (10 $\mu$ g/mL)

$\bar{c}$ ( mg/L) cinka u uzorku + c(mg/L) dodanog standarda	Ukupna c (mg/L)	Izmjerena c (mg/L)	c dodatka (mg/L)	Analitički prinos (%)	RSD (%)
0.1573 + 0.1	0,2573	0,250166667	0,09722762	97,2276202	1,722
0.1573 + 0.2	0,3573	0,352	0,197033305	98,5166527	1,308
0.1573 + 0.4	0,5573	0,532666667	0,382319517	95,5798792	1,342

Tablica 8. Analitički prinos cinka u uzorcima Inzulin NovoRapid penfill u koje je dodano 0,5, 1,0, 2,0 mL matične standardne otopine cinka (10  $\mu$ g/mL)

$\bar{c}$ ( mg/L) cinka u uzorku + c(mg/L) dodanog standarda	Ukupna c (mg/L)	Izmjerena c (mg/L)	c dodatka (mg/L)	Analitički prinos (%)	RSD (%)
0.1847 + 0.1	0,2847	0,283333333	0,099519963	99,5199625	1,406
0.1847 + 0.2	0,3847	0,384666667	0,19998267	99,9913352	1,111
0.1847 + 0.4	0,5847	0,5855	0,400547289	100,136822	0,946

#### 4.4. Granica dokazivanja i određivanja

Granica dokazivanja (LOD) je najniža koncentracija analita koju je moguće sa sigurnošću dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (LOQ) je najniža koncentracija analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. LOD i LOQ se određuju razrijeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD=3:1 ili 2:1, LOQ=10:1) ili se mogu izračunati pomoću formula:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{a}$$

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

$\sigma$  može biti standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca ili standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca.

a - nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014; Medić-Šarić i sur., 2006)

Iz dobivenih podataka izračunate su sljedeće vrijednosti LOD i LOQ:

$$LOD=0,025 \text{ mg/L}$$

$$LOQ=0,076 \text{ mg/L}$$

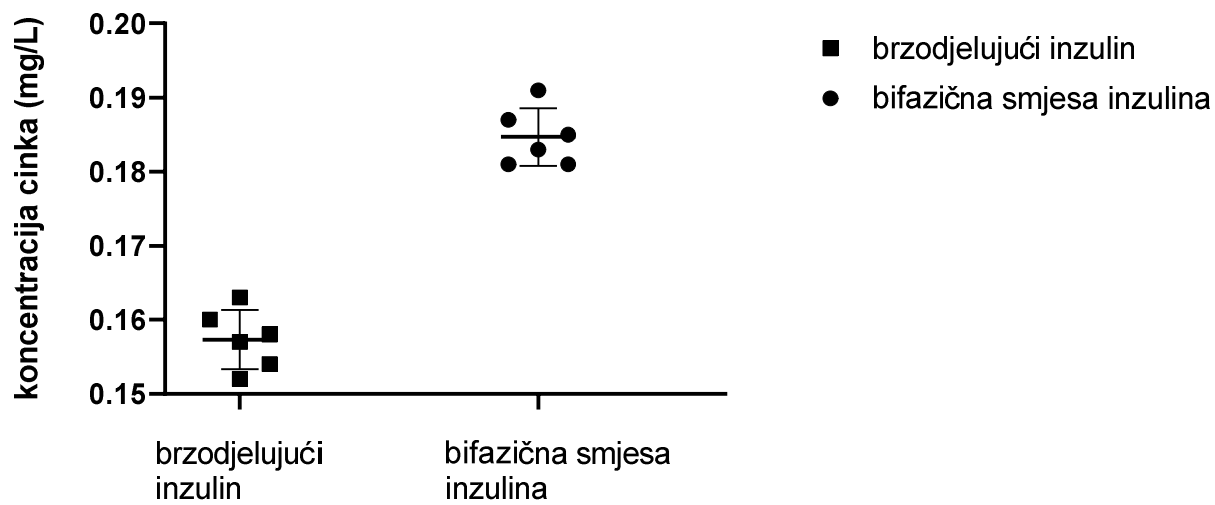
#### 4.5. Određivanje koncentracije cinka u uzorcima inzulina

Nakon optimizacije i validacije metode provedeno je ispitivanje sadržaja cinka u uzorcima brzodjelujućeg inzulina i bifazičnog inzulina (smjesa 30% brzodjelujućeg i 70% srednjedugodjelujućeg inzulina). Prethodno opisanim postupkom pripremljeni su uzorci inzulina te je svaki od njih mjereno 6 puta. Naknadnom obradom dobivenih podataka dobivene su koncentracije cinka u navedenim pripravcima inzulina. Prema dobivenim podacima koncentracija cinka veća je u bifazičnoj smjesi inzulina nego u brzodjelujućem inzulinu. Takvi rezultati u skladu su s očekivanjima jer je bifazični cink smjesa brzodjelujućeg i srednjedugodjelujućeg inzulina za čije je produljeno djelovanje zaslužan kompleks koji čini sa cinkom.

Na razini obične statističke usporedbe korištenjem Mann-Whitney testa dobiva se statistički značajna razlika, od  $P=0,0022$ , što govori u prilog izraženim statistički značajnim razlikama među pripravci na osnovu određenog sadržaja cinka.

Tablica 9. Izmjerena koncentracija cinka u pripravcima inzulina

	<b>Brzodjelujući inzulin</b>	<b>Bifazična smjesa</b>
<b>Izmjerena koncentracija (mg/L)</b>	0,157	0,187
	0,163	0,191
	0,152	0,181
	0,154	0,181
	0,158	0,183
	0,16	0,185
<b>Srednja vrijednost (mg/L)</b>	0,15733333	0,18466667
<b>SD</b>	0,00363624	0,00388158
<b>RSD (%)</b>	2,31116782	2,10193886



Slika 11. Usporedba sadržaja cinka u pripravcima inzulina

## 5. ZAKLJUČAK



- Cink je element važan za strukturu, funkciju i sekreciju inzulina. Njegov nedostatak povezan je s dijabetes melitusom tip 2 i inzulinskom rezistencijom. U ovom radu validirana je metoda za određivanje cinka u pripravcima inzulina AAS-om te je uspoređena koncentracija u dva komercijalno dostupna pripravka inzulina.
- Atomska apsorpcijska spektroskopija brza je, jeftina i pouzdana metoda za određivanje metala u uzorcima. Na temelju dobivenih podataka zaključeno je da je metoda linearna, precizna i točna te se kao takva može koristiti za određivanje cinka u pripravcima inzulina.
- Uspoređena je koncentracija cinka u komercijalno dostupnom inzulinu brzog djelovanja i bazičnoj smjesi inzulina brzog djelovanja i srednjedugog djelovanja. Koncentracija cinka veća je u bifazičnoj smjesi inzulina što je u skladu s očekivanjima.

## 6. LITERATURA

Ata S, Hamid Wattoo F, Mahmood A, Hamid Sarwar Wattoo M, Tirmizi SA, Wadood A. A method optimization study for atomic absorption spectrophotometric determination of total zinc in insulin using direct aspiration technique. *Alexandria Journal of Medicine*, 2015, 51, 19-23.

Fernández B, Lobo L, Pereiro R. Atomic Absorption Spectrometry: Fundamentals, Instrumentations and capabilities. London, 2018, str. 1-7.

Goodman L, Gilman A, Brunton L, Hilal-Dandan R and Knollmann B. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw Hill Education, 2006, 11, str. 1613-1621.

Gualdini- Signorini AM, Giorgi G. Insulin formulations- a review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2001, 5, 73-83.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2006, 11, str. 961-969.

Hallass-Moller K, Petersen K, Schlichtkrull J. Zinc Insulin preparation for single daily injection. *Journal of the American Medical Association*, 1952, 150, 1667.

Harvey D. Analytical chemistry 2.0. U: Spectroscopic methods. 2016,2, str. 544-550, 599-605.

Hofmann A, Clokie S, Wilson K, Walker J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. U: Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques, 2010, str. 477-482.

Introduction to AAS components, 2013., <http://lab-training.com/2013/05/08/introduction-to-aas-component-parts/>, pristupljeno 15.2.2019.

Manoharana C, Singh J. Addition of Zinc Improves the Physical Stability of Insulin in the Primary Emulsification Steps of the Poly(lactide - co - glycolide) Microsphere Preparation Process. *Polymers*, 2015, 7, 836-850.

Maret W. Zinc in Pancreatic Islet Biology, Insulin Sensitivity, and Diabetes. *Preventive Nutrition and food science*, 2017, 22, 1-8.

Medić-Šarić M, Jasprica I, Debeljak Ž. Uvod u validaciju metoda analize lijekova. *Farmaceutski glasnik*, 2006, 62.

Nigović B, Jurišić-Grubešić R, Vuković J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 135-138.

Novak B, Metelko Ž. Nove mogućnosti liječenja inzulinom. *Liječnički vijesnik*, 2004, 126, 141-146.

Osmanović Barilar J. Inzulinski sustav mozga u eksperimentalnom štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti. *Doktorska disertacija*, 2013.

Peter FT, Mauers HH. Review: Bioanalytical method validation- how, how much and why?. *Accreditation and Quality Assurance*, 2002, 11, 441-449.

Qadir MA, Mahmood A, Iftikhar-ul-Haq, Saghir A. Improved limit of detection and quantitation development and validation procedure for quantification of zinc in Insulin by atomic absorption spectrometry. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 2015, 28, 875-879.

Rorsman, P. Review: Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 2005, 5, 187-191.

Rungby J. Zinc, zinc transporters and diabetes. *Diabetologia*, 2010, 53, 1549-1551.

Rutter GA, Chabosseau P, Bellomo EA, Maret W, Mitchell RK, Hodson DJ, Solomou A, Hu M. Intracellular zinc in insulin secretion and action: a determinant of diabetes risk?. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2015, 75, 61-72.

Tănase IG, Popescu IL, Pană A. An analytical method validation for atomic absorption

spectometry analysis of total zinc from insulin. *Analele Universității din București – Chimie*, 2006, 45-50.

Vardatsikos G, Pandey NR, Srivastava AK. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of zinc. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2013, 120, 8-17.

Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist*. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 119-123.

Wijesekara N, Chimienti F, Wheeler MB. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis Diabetes. *Obesity and Metabolism*, 2009, 11, 202-214.

Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2005, 26, 19-39.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Cink ima važnu ulogu u svim fazama metabolizma inzulina, od proizvodnje preko lučenja i iskorištavanja do skladištenja. Interakcija cinka i inzulina može dovesti do konformacijskih promjena i pojačati afinitet vezanja za receptore. Cink ima inzulinomimetičku aktivnost koja je najvjerojatnije posljedica inhibicije proteinskih tirozin fosfataza. On je i kofaktor enzima ključnih za metabolizam glukoze. Cilj ovog rada bio je validirati metodu određivanja cinka u inzulinu AAS-om i usporediti koncentraciju cinka u dva komercijalno dostupna pripravka inzulina u Republici Hrvatskoj. Sadržaj cinka u uzorcima određen je pomoću plamene atomske apsorpcijske spektroskopije.

Parametri validacije pokazali su zadovoljavajuću linearnost u ispitivanom području ( $R^2=0,999$ ). Ponovljivost metode, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je između 0,5 % – 1,64 %, reproducibilnost metode između 3,1 % - 5,2 %, a dobivena točnost u rasponu između 95,6 % i 100,1 %. Granica dokazivanja bila je 0,025 mg/L, a granica određivanja 0,076 mg/L što pokazuje da je metoda pouzdana i osjetljiva za određivanje koncentracije cinka u uzorcima inzulina. Koncentracija cinka u komercijalno pribavljenim uzorcima inzulina bila je u rasponu od 0,152 mg/L do 0191 mg/L. Veći sadržaj cinka dobiven je u brzodjelujućem analogu inzulina za razliku od sadržaja cinka kod bifazične suspenzije (30% brzodjelujući inzulin i 70% srednjedugo djelujućeg humanog inzulina) gdje je bio nešto niži.

Zinc plays a significant role in all phases of insulin metabolism, from production through digestion and exploitation to storage. The interaction of zinc and insulin can lead to conformational changes and enhance binding affinity for receptors. Zinc possesses an insulin-mimetic activity that is most likely due to inhibition of protein tyrosine phosphatase. It is a cofactor of crucial enzymes for glucose metabolism. The aim of this research work was to validate the AAS method for determining zinc in insulin samples and to compare a concentration of zinc in two commercially available insulins in Croatia. The concentration of zinc in insulin samples was determined by flame atomic absorption spectroscopy. Validation parameters showed satisfactory linearity in the examined area ( $R^2 = 0.999$ ). The repeatability of the method expressed as the relative standard deviation (RSD) was between 0.5% - 1.64%, the reproducibility of the method was between 3.1% - 5.2%, the accuracy ranging between 95.6% and 100.1 %. The detection limit was 0.025 mg / L, and the determination limit was 0.076 mg / L. That shows the method is reliable and sensitive to determining the concentration of zinc in insulin samples. The concentration of zinc in commercially available insulin samples ranged from 0.152mg / L to 0191mg / L. The higher zinc content was obtained in the fast-acting insulin analog as opposed to the zinc content of the biphasic suspension (30% fast-acting insulin and 70% of the intermediate-acting human insulin) where it was little lower.



## **8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIS DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### USPOREDBA SADRŽAJA CINKA U RAZLIČITIM UZORCIMA INZULINA PLAMENOM ATOMSKOM APSORPCIJSKOM SPEKTROSKOPIJOM

TEA ŠIRAC

SAŽETAK

Cink ima važnu ulogu u svim fazama metabolizma inzulina, od proizvodnje preko lučenja i iskorištavanja do skladištenja. Interakcija cinka i inzulina može dovesti do konformacijskih promjena i pojačati afinitet vezanja za receptore. Cink ima inzulino-mimetičku aktivnost koja je najvjerojatnije posljedica inhibicije proteinskih tirozin fosfataza. On je i kofaktor enzima ključnih za metabolizam glukoze. Cilj ovog rada bio je validirati metodu određivanja cinka u inzulinu AAS-om i usporediti koncentraciju cinka u dva komercijalno dostupna pripravka inzulina u Republici Hrvatskoj. Sadržaj cinka u uzorcima određen je pomoću plamene apsorpcijske spektroskopije.

Parametri validacije pokazali su zadovoljavajuću linearnost u ispitivanom području ( $R^2=0,999$ ). Ponovljivost metode, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je između 0,5 % – 1,64 %, reproducibilnost metode između 3,1 % - 5,2 %, a dobivena točnost u rasponu između 95,6 % i 100,1 %. Granica dokazivanja bila je 0,025 mg/L, a granica određivanja 0,076 mg/L što pokazuje da je metoda pouzdana i osjetljiva za određivanje koncentracije cinka u uzorcima inzulina. Koncentracija cinka u komercijalno pribavljenim uzorcima inzulina bila je u rasponu od 0,152mg/L do 0191mg/L. Veći sadržaj cinka dobiven je u brzodjelujućem analogu inzulina za razliku od sadržaja cinka kod bifazične suspenzije (30% brzodjelujući inzulin i 70% srednjedugo djelujućeg humanog inzulina) gdje je bio nešto niži. Dobiveni rezultati potvrđuju činjenicu da je cink jedan od parametara koji pospješuje brže vezanje inzulina na receptor te određuje duljinu djelovanja inzulina.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 11 grafičkih prikaza, 9 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: cink, inzulin, atomska apsorpcijska spektrofotometrija, validacija analitičke metode

Mentor: **Doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Doc. dr. sc. Suzana Inić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Prof. dr. sc. Živka Juričić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

# COMPARISON OF ZINC CONTENT IN VARIOUS SAMPLES OF INSULIN BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

TEA ŠIRAC

## SUMMARY

Zinc plays a significant role in all phases of insulin metabolism, from production through digestion and exploitation to storage. The interaction of zinc and insulin can lead to conformational changes and enhance binding affinity for receptors. Zinc possesses an insulin-mimetic activity that is most likely due to inhibition of protein tyrosine phosphatase. It is a cofactor of crucial enzymes for glucose metabolism. The aim of this research work was to validate the AAS method for determining zinc in insulin samples and to compare a concentration of zinc in two commercially available insulins in Croatia. The concentration of zinc in insulin samples was determined by flame atomic absorption spectroscopy. Validation parameters showed satisfactory linearity in the examined area ( $R^2 = 0.999$ ). The repeatability of the method expressed as the relative standard deviation (RSD) was between 0.5% - 1.64%, the reproducibility of the method was between 3.1% - 5.2%, the accuracy ranging between 95.6% and 100.1%. The detection limit was 0.025 mg / L, and the determination limit was 0.076 mg / L. That shows the method is reliable and sensitive to determining the concentration of zinc in insulin samples. The concentration of zinc in commercially available insulin samples ranged from 0.152mg / L to 0191mg / L. The higher zinc content was obtained in the fast-acting insulin analog as opposed to the zinc content of the biphasic suspension (30% fast-acting insulin and 70% of the intermediate-acting human insulin) where it was little lower

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

Thesis includes: 44 pages, 11 figures, 9 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: zinc, insulin, atomic absorption spectroscopy, validation

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

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Suzana Inić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Živka Juričić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2019.