

Uspostavljanje sustava tankoslojno kromatografske analize za alprazolam, diazepam, oksazepam i metadon

Tomašek, Ljubica; Žuntar, Irena; Đirlić, Jasenka; Mršić, Gordan

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2009, 65, 407 - 415**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:404463>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**



Repository / Repozitorij:

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



Uspostavljanje sustava tankoslojno kromatografske analize za alprazolam, diazepam, oksazepam i metadon

LJUBICA TOMAŠEK¹, IRENA ŽUNTAR², JASENKA ĐIRLIĆ², GORDAN MRŠIĆ¹

¹MUP RH, Ravnateljstvo policije, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja
»Ivan Vučetić«

²Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Defining a system of thin-layer chromatography analysis for alprazolam, diazepam, oxazepam and methadone

A b s t r a c t – Thin-layer chromatography is a quick, simple and economic analytical method for separating different analytes. Hence the purpose of this work was to validate thin-layer chromatography as an analytical procedure allowing simultaneous determination of the benzodiazepines alprazolam, diazepam, oxazepam and the opioid methadone.

Validation of testing quality was performed using two TLC systems: T_A system involving methanol and ammonium mixed in a 100:1.5 ratio and T_C system with dichloromethane and methanol mixed in a 9:1 ratio.

In the process of validating the testing quality, selectivity needs to be tested and limit of detection must be set for each analyte. For selectivity testing, standard analyte solutions and certain auxiliary substances were prepared (matrix), so we could monitor the influence of the matrix on analyte separation.

Limit of detection was established by preparing a set of dilutions of basic standard solutions; after chromatogram visualisation, the lowest concentration for detecting an analyte was set. Limits of detection are: alprazolam 0.80 µg/mL for T_A system and 0.53 µg/mL for T_C system; diazepam 3.14 µg/mL for T_A and T_C systems; oxazepam 3.53 µg/mL for T_A system and 5.30 µg/mL for T_C system, and methadone 6.09 µg/mL for T_A system and 9.14 µg/mL for T_C system.

Based on the validation results, we were able to confirm that TLC systems T_A and T_C are appropriate for identification of benzodiazepines like alprazolam, diazepam, oxazepam and of methadone and that auxiliary substances have no effect on the identification process.

(¹Forensic Science Centre »Ivan Vučetić«, 10000 Zagreb, Croatia, ²Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Tankoslojna kromatografija kao prihvatljiva metoda u širokoj je uporabi za odjeljivanje i identifikaciju lijekova. Primjenjiva je za lijekove u čistom stanju, spojeve ekstrahirane iz farmaceutskih formulacija kao i za ilegalno proizvedene tvari i biološke uzorke. Jedna je od najpovoljnijih, najbržih i vrlo djelotvornijih metoda separacije. Prikladnost kromatografskog sustava za određenu namjenu provodi se postupkom validacije pri čemu se validiraju uzorci, metodologija i podaci. Kao standardni analitički postupak može se prihvatiti samo onaj kojemu izvedbene značajke zadovoljavaju postavljene uvjete kvalitete (1–3). Za metode koje će se koristiti u više laboratorija, svaki laboratorij bi trebao potvrditi metodu te odrediti varijacije usporedbom podataka iz drugih laboratorija (1).

Alprazolam, diazepam i oksazepam su benzodiazepini koji se zbog svog umirujućeg djelovanja široko primjenjuju u kliničkoj praksi kao trankvilansi, anksiolitici, antikonvulzanti, hipnotici i sedativi. Metadon je sintetski opioid koji se koristi kao analgetik i sredstvo u liječenju morfinskih i heroinskih ovisnika (4–6). Pored svojeg medicinskog značaja i široke primjene u kliničkoj praksi često su i predmet zlorabe pa se ubrajaju među najčešće zloupotrebljavane lijekove.

U ovom je radu izvršena razrada i validacija analitičkog postupka identifikacije alprazolama, diazepamama, oksazepamama i metadona brzom i jeftinom metodom tankoslojne kromatografije, u svrhu njezine široke i lako dostupne primjene u laboratoriju i u forenzičnoj praksi. U tu svrhu ispitivanje je provedeno u dva sustava otapala za razvijanje kromatograma. Da bi se utvrdila prihvatljivost odabranog načina identifikacije analiziranih spojeva provedena je kvalitativna validacija tankoslojne kromatografije koja uključuje ispitivanje selektivnosti i utjecaja matriksa te određivanje granice dokazivanja za odabrane vrste spojeva.

MATERIJALI I METODE

Za provedbu kromatografskog postupka (7) korišteni su: HF₂₅₄ kromatografske ploče 20x20 cm (MERCK) (uz dodatak fluorescentnog indikatora (254 nm)), komore za razvijanje kromatograma, prskalica za vizualizaciju kromatograma, graduirane mikropipete od 5 µL za nanošenje uzorka na kromatografsku podlogu, UV svjetiljka, sušilo i fotografska komora. Potrebni diklormetan p.a., metanol, amonijak p.a., sulfatna kiselina 95%, platina klorid i kalijev jodid p.a. pribavljeni su od Merck-a, dok je kloridna kiselina p.a. pribavljena od Kemike. Također su korišteni standardi diazepamama, alprazolama, oksazepamama i metadona (LIPOMED), pomoćne tvari saharoza (Merck), laktoza, kukuruzni škrob i mikrokristalična celuloza (KEMIG) te uzorci tableta Normabel 2 mg (BELUPO), Helex 0,25 mg (KRKA), Praxiten 15 mg (PLIVA) i Heptanon 5 mg (PLIVA). Za vizualizaciju su priređene 2M sulfatna kiselina i kiseli kalijev jodoplatinat. Kiseli kalijev jodoplatinat je pripremljen otapanjem 0,25 g platina klorida i 5 g kalijeva jodida u 100 mL d.i. vode te je tako dobivena otopina zakiseljena s 5 mL koncentrirane kloridne kiseline.

Razrada analitičkog postupka

Priprava mobilne faze

Ispitivanje je provedeno u dva sustava otapala, T_A i T_C . T_A sustav je priređen miješanjem 100 mL metanola i 1,5 mL 25%-tne otopine amonijaka, a T_C sustav miješanjem 90 mL diklormetana i 10 mL metanola (1). Za zasićivanje komora se koristila svježa smjesa otapala.

Priprava uzoraka

Početna ispitivanja pri određivanju uvjeta TLC analize sastojala su se u određivanju pogodne koncentracije uzorka ispitivanih spojeva za analizu upotrebom komercijalnih pripravaka odabranih spojeva. Tako je za diazepam utvrđena koncentracija otopine od 2 mg/mL, za alprazolam 0,25 mg/mL, oksazepam 7 mg/mL i metadon 2,5 mg/mL u metanolu.

Priprava osnovnih otopina uzoraka standarda

Osnovne otopine standarda diazepama, oksazepama i metadona su pripravljene otapanjem određene količine standarda u 5 mL metanola, a alprazolama otapanjem u diklormetanu (1). Koncentracije osnovnih otopina standarda iznosile su: alprazolam 0,80 mg/mL; diazepam 7,84 mg/mL; oksazepam 7,06 mg/mL i metadon 6,09 mg/mL.

Provedba kromatografskog postupka

Nakon razvijanja ploče se suše i vizualiziraju. Promatraju se pod UV svjetlom pri 254 nm. Prskaju 2M sulfatnom kiselinom, suše sušilom 5 min te ponovno promatraju pod UV svjetlom pri 366 nm. Potom se kromatogram obrađuje kiselim kalijevim jodoplati natom što rezultira pojavom tamnih mrlja na svijetloj podlozi (7).

Validacija analitičkog postupka

Nakon što su razradom metode definirani uvjeti izvođenja analitičkog postupka, izvršena je validacija metode za kvalitativno određivanje alprazolama, diazepama, oksazepama i metadona ispitivanjem selektivnosti i utjecaja matriksa te utvrđivanjem granice dokazivanja.

Selektivnost

Za određivanje selektivnosti pripravljene su otopine standarda alprazolama, diazepama, oksazepama i metadona te otopine pomoćnih tvari (laktose, kukuruznog škroba, mikrokristalične celuloze i saharoze) radi ispitivanja njihovog utjecaja na identifikaciju analiziranih spojeva. Kako bi se ispitala selektivnost, odnosno utjecaj matriksa na identifikaciju alprazolama, diazepama, oksazepama i metadona na kromatografsku ploču se nanosi 5 μ L otopine ispitivanih tvari i priređenih pomoćnih tvari, ploče se razvijaju u T_A i T_C sustavu otapala, vizualiziraju 2M H_2SO_4 i kiselim kalijevim jodoplatinatom te se potom odredi utjecaj matriksa na identifikaciju analita.

Priprema otopina za određivanje selektivnosti:

1. Alprazolam

U tabletama alprazolama kao pomoćne tvari između ostalih nalaze se laktoza, mikrokristalična celuloza i kukuruzni škrob (8) te su stoga priređene sljedeće otopine standarda: alprazolama (0,80 mg/mL), laktoze (5 mg/mL), mikrokristalične celuloze (2,5 mg/mL), kukuruznog škroba (5 mg/mL), alprazolama i laktoze (0,5 mL 0,80 mg/mL i 10mg), alprazolama i mikrokristalične celuloze (0,5 mL 0,80 mg/mL i 5 mg), alprazolama i kukuruznog škroba (0,5 mL 0,80 mg/mL i 5 mg), alprazolama, laktoze, mikrokristalične celuloze i kukuruznog škroba (0,5 mL 0,80 mg/mL, 10 mg, 5 mg i 5 mg) i tablete alprazolama (0,25 mg/mL).

2. Diazepam

Kao najčešće pomoćne tvari u tabletama diazepamima nalaze se laktoza i kukuruzni škrob (9) te su priređene sljedeće otopine standarda: diazepam (7,84 mg/mL), laktoze (5 mg/mL), kukuruznog škroba (5 mg/mL), diazepam i laktoze (0,5 mL 7,84 mg/mL i 10 mg), diazepam i kukuruznog škroba (0,5 mL 7,84 mg/mL i 5 mg), diazepam, laktoze i kukuruznog škroba (0,5 mL 7,84 mg/mL, 5 mg i 5 mg) i tablete diazepam (2 mg/mL).

3. Oksazepam

Laktoza i kukuruzni škrob neke su od pomoćnih tvari koje se nalaze u komercijalnim tabletama oksazepam (10) te su stoga priređene sljedeće otopine standarda: oksazepam (7,06 mg/mL), laktoze (5 mg/mL), kukuruznog škroba (5 mg/mL), oksazepam i laktoze (0,5 mL 7,06 mg/mL i 10 mg), oksazepam i kukuruznog škroba (0,5 mL 7,06 mg/mL i 5 mg), oksazepam, laktoze i kukuruznog škroba (0,5 mL 7,06 mg/mL, 5 mg i 5 mg) i tablete oksazepam (7 mg/mL).

4. Metadon

Pripravak metadona između ostalih sadrži laktozu i saharozu kao pomoćne tvari (10) te su priređene sljedeće otopine standarda: metadon (6,09 mg/mL), laktoze (5 mg/mL), saharoze (5 mg/mL), metadon i laktoze (0,5 mL 6,09 mg/mL i 10 mg), metadon i saharoze (0,5 mL 6,09 mg/mL i 5 mg), metadon, laktoze i saharoze (0,5 mL 6,09 mg/mL, 5 mg i 5 mg) i tablete metadon (2,5 mg/mL).

Granica dokazivanja

Radi određivanja granice dokazivanja ispitane su priređene otopine pojedinog standarda i njihova određena razrjeđenja:

- alprazolam – 0,80 mg/mL i 0,266 mg/mL
- diazepam – 7,84 mg/mL, 2,35 mg/mL i 1,568 mg/mL
- oksazepam – 7,06 mg/mL i 1,765 mg/mL
- metadon – 6,09mg/mL i 3,045 mg/mL.

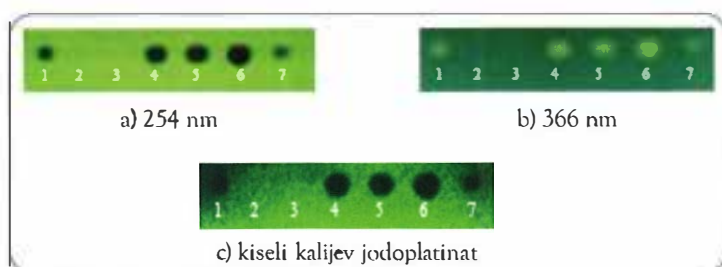
Navedena razrjeđenja otopina standarda pojedinog spoja se nanose na ploču u volumenu od 1–5 μ L kao i 2 μ L osnovne otopine standarda. Koncentracija kod koje je spoj vidljiv pod UV svjetlom i nakon vizualizacije sulfatnom kiselinom i kiselim kalijevim

jodoplatinatom predstavlja granicu dokazivanja. Razvijanje kromatograma za svaki analit se vrši tri puta kako bi se utvrdila ponovljivost i sa sigurnošću odredila granica dokazivanja.

REZULTATI I RASPRAVA

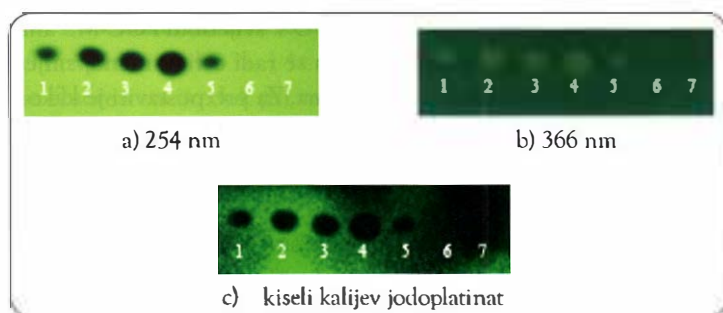
Selektivnost

Selektivnost alprazolama, diazepama, oksazepama i metadona ispitana je u T_A i T_C sustavu otapala nanošenjem osnovne otopine standarda navedenih spojeva, pojedinačno odabranih pomoćnih tvari, uzorka otopine standarda pojedinih analiziranih spojeva i pojedinih pomoćnih tvari, njihova skupnog uzorka te otopine pojedinih tvorničkih pripravaka analiziranih spojeva. Kromatogrami za diazepam (slika 1. i slika 2.) prikazani su kao primjer kromatograma analiziranih spojeva tijekom ispitivanja njihove selektivnosti.



Slika 1. Ispitivanje selektivnosti diazepama u T_A sustavu otapala pri valnoj duljini 254 nm, 366 nm i nakon vizualizacije kiselim kalijevim jodoplatinatom:

- 1 – diazepam (osnovna otopina standarda); 2 – laktoza; 3 – kukuruzni škrob;
- 4 – diazepam i laktoza; 5 – diazepam i kukuruzni škrob; 6 – diazepam, laktoza i kukuruzni škrob; 7 – tableta diazepama (2 mg/mL)



Slika 2. Ispitivanje selektivnosti diazepama u T_C sustavu otapala pri valnoj duljini 254 nm, 366 nm i nakon vizualizacije kiselim kalijevim jodoplatinatom:

- 1 – diazepam (osnovna otopina standarda); 2 – diazepam i laktoza; 3 – diazepam i kukuruzni škrob; 4 – diazepam, laktoza i kukuruzni škrob; 5 – tableta diazepama (2 mg/mL); 6 – laktoza; 7 – kukuruzni škrob

Analizom nanesenih uzoraka za alprazolam pri valnoj duljini od 254 nm i nakon vizualizacije može se zaključiti da odabrane pomoćne tvari laktoza, mikrokristalična celuloza i kukuruzni škrob ne utječu na identifikaciju alprazolama obzirom da su R_F vrijednosti uzoraka koji sadrže alprazolam jednake, dok za laktozu, mikrokristaličnu celulozu i kukuruzni škrob vrijednosti su nula obzirom da komponente zaostaju na startnoj crti. Dobivena R_F vrijednost alprazolama u T_A sustavu otapala iznosi 77–79, dok u T_C sustavu iznosi 48–56. Također, analizom uzoraka za diazepam (slika 1. i slika 2.) razvidno je da laktoza i kukuruzni škrob nemaju utjecaja na njegovu identifikaciju budući su R_F vrijednosti otopina koje sadrže diazepam iste dok su za laktozu i kukuruzni škrob nula, odnosno pomoćne tvari ostaju na startu. Izračunata R_F vrijednost diazepamima u T_A sustavu otapala iznosi 85–88, dok u T_C sustavu otapala iznosi 85–92.

Ispitivanjem selektivnosti u odabranim TLC sustavima otapala za oksazepam dobiveni su isti rezultati, odnosno ispitane pomoćne tvari nemaju utjecaj na njegovu identifikaciju. Utvrđena R_F vrijednost oksazepamima u T_A sustavu otapala iznosi 82–85, a u T_C sustavu iznosi 48–58. Na kromatogramu razvijenom u T_C sustavu otapala pod UV svjetlom pri 254 nm i 366 nm uočeno je razlaganje oksazepamima dok se nakon vizualizacije s kiselim kalijevim jodoplatinatom uočava samo jedna, donja mrlja (komponenta) čija je R_F vrijednost i navedena. Zasebno su izolirane obje identificirane mrlje, ekstrahirane diklormetanom i analizirane plinskom kromatografijom s masenim spektrometrom (GC-MS) čime je utvrđeno da obje mrlje (komponente) po svom sastavu odgovaraju oksazepamu.

Oksazepam je kiralni 3-hidroksibenzodiazepin koji se na tržištu pojavljuje u obliku racemata. Ima hidroksilnu skupinu u asimetričnom C3 položaju i posjeduje dva enantiomera. Farmakološki aktivni S(+) enantiomer pokazuje 100–200 puta veći afinitet vezivanja na receptore od njegova R(-) oblika (11). Enantiomeri 3-hidroksibenzodiazepina podložni su spontanoj kiralnoj inverziji u polarnom otapalu kako je to slučaj u T_C sustavu otapala, odnosno priroda organskog otapala je parametar koji može značajno interferirati s kiralnom inverzijom. Za pretpostaviti je kako je mehanizam racemiziranja posljedica brze tautomerijske ravnoteže između prstena i akiralnih iminoaldehidnih oblika (12,13). Iz toga proizlazi da dvije mrlje identificirane pod UV svjetlom i GC-MS analizom odgovaraju enantiomerima oksazepamima, odnosno da se radi o racemičnoj smjesi koja se ne može eksplicite odrediti primijenjenim tehnikama. Za pretpostaviti je kako je udjel S(+) enantiomera zbog njegova farmakološkog djelovanja znatno veći na što nas upućuje i veličina, odnosno koncentracija identificiranih mrlja koja je znatno veća pri R_F vrijednosti koja je ujedno i detektirana nakon vizualizacije kiselim kalijevim jodoplatinatom.

Nakon ispitivanja selektivnosti uzoraka metadona proizlazi da odabrane pomoćne tvari, saharoza i laktoza također ne pokazuju utjecaj na identifikaciju metadona kako je to potvrđeno i za odabrane benzodiazepine obzirom da su R_F vrijednosti uzoraka koji sadrže metadon identične, dok su za saharozu i laktozu jednake nuli. Dobivena R_F vrijednost metadona u T_A sustavu otapala iznosi 38–49, a u T_C sustavu 14–18.

Granica dokazivanja

Određivanje granice dokazivanja alprazolama, diazepama, oksazepama i metadona provedeno je u dva sustava otapala, T_A i T_C , pripremanjem razrjeđenja osnovnih otopina standarada. Granica dokazivanja određena je utvrđivanjem koncentracije analita na kromatografskoj ploči koja je vidljiva i pod UV svjetlom i nakon vizualizacije, a prema poznatoj koncentraciji razrjeđene osnovne otopine standarda. Određene granice dokazivanja u oba sustava otapala za pojedine ispitane spojeve prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Granice dokazivanja u sustavu otapala T_A i T_C za alprazolam, diazepam, oksazepam i metadon.

	Granica dokazivanja ($\mu\text{g/mL}$)	
	Sustav otapala T_A	Sustav otapala T_C
Alprazolam	0,80	0,53
Diazepam	3,14	3,14
Oksazepam	3,53	5,30
Metadon	6,09	9,14

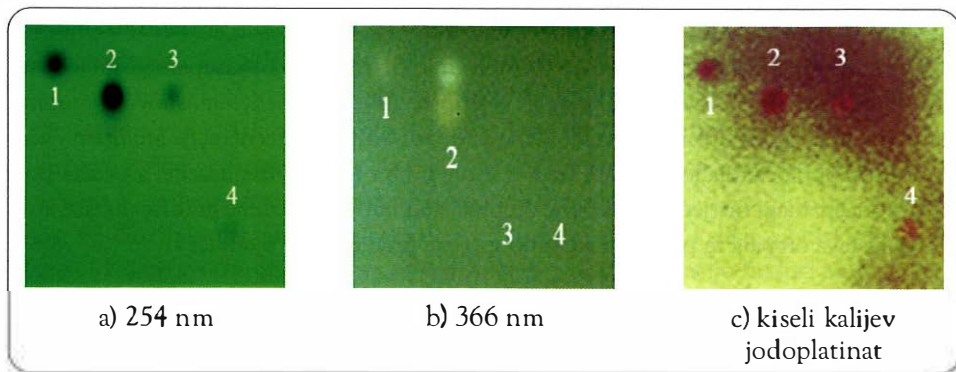
Razvidno je kako se tankoslojnom kromatografijom uz primjenu T_A i T_C sustava otapala mogu identificirati vrlo niske koncentracije ispitanih spojeva.

Ispitivanje prikladnosti T_A i T_C sustava otapala

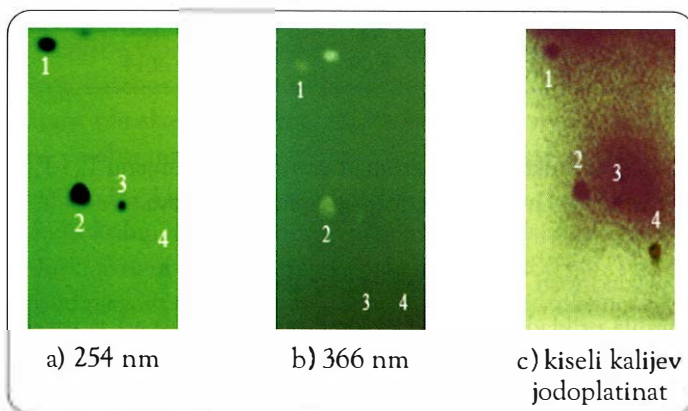
Da bi se utvrdila prikladnost T_A i T_C kromatografskog sustava za istodobnu identifikaciju alprazolama, diazepama, oksazepama i metadona na kromatografsku ploču se nanosi otopina komercijalnih tableta navedenih analita. Kromatografske ploče se razvijaju, analiziraju pod UV svjetlom pri 254 nm i 366 nm te vizualiziraju sulfatnom kiselinom i kiselim kalijevim jodoplatinatom (slike 3. i 4.).

Kako je to razvidno iz slika 3a. i 4a. pri 254 nm alprazolam, diazepam, oksazepam i metadon gase fluorescenciju dok pri valnoj duljini od 366 nm, slike 3b. i 4b. samo diazepam i oksazepam pokazuju svojstvo fluorescencije, dok alprazolam i metadon ne pokazuju svojstvo fluorescencije pri toj valnoj duljini. Konačno, kromatogram se obrađuje odabranim reagensom za vizualizaciju što rezultira pojavom tamnih mrlja na svijetloj podlozi, kako je to prikazano na slikama 3c. i 4c.

Na ovaj je način provedenim ispitivanjima utvrđeno kako se alprazolam, diazepam, oksazepam i metadon vrlo uspješno mogu identificirati istovremenom primjenom T_A i T_C sustava otapala obzirom na njihov različiti afinitet prema stacionarnoj i mobilnoj fazi, odnosno obzirom na različite R_F vrijednosti ispitanih analita.



Slika 3. Ispitivanje prikladnosti T_A sustava otapala za identifikaciju diazepama, oksazepama, alprazolama i metadona pri 254 nm, 366 nm i nakon vizualizacije kiselim kalijevim jodoplatinatom: 1 – diazepam; 2 – oksazepam; 3 – alprazolam; 4 – metadon



Slika 4. Ispitivanje prikladnosti T_C sustava otapala za identifikaciju diazepama, oksazepama, alprazolama i metadona pri 254 nm, 366 nm i nakon vizualizacije kiselim kalijevim jodoplatinatom: 1 – diazepam; 2 – oksazepam; 3 – alprazolam; 4 – metadon

ZAKLJUČAK

Razrađen je i validiran analitički postupak identifikacije alprazolama, diazepama, oksazepama i metadona metodom tankoslojne kromatografije. Validacija je provedena u dva odabrana sustava otapala, T_A i T_C . Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je da su T_A i T_C sustavi otapala prikladni za njihovu identifikaciju. Određene su R_F vrijednosti ispitanih analita u T_A i T_C sustavu. Potvrđeno je da ne postoji utjecaj matriksa na identifikaciju ispitanih analita, odnosno da su odabrani sustavi otapala selektivni. Na ovaj se način mogu analizirati vrlo niske koncentracije ispitanih analita na što ukazuju utvrđene

granice dokazivanja. Obzirom da je tankoslojna kromatografija dokazana kao vrlo pogodan, jednostavan, brz i ekonomičan analitički postupak, može se reći da je prikladna metoda za rutinska kvalitativna ispitivanja klinički važnih odabranih benzodiazepina i opioida kako u laboratorijskoj tako i forenzičnoj praksi.

Literatura – References

1. A. C. Moffat, M. D. Osselson, B. Widdop, Clarke's analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, United States of America 2004, 163-164, 392-406, 605-606, 897-898, 1231-1233, 1375-1376.
2. M. Kaštelan-Macan, M. Šarić-Medić, S. Turina, Plošna kromatografija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 2006, 61-131, 251-255.
3. P. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M. C. Laparra, M. Laurentie, J. C. Nivet, *Anal Chim Acta* **391** (1999) 135.
4. S. B. Karch, *Drug Abuse Handbook*, CRS Press, London 2007, 35, 76, 222-225.
5. Z. Duraković i suradnici, *Klinička toksikologija*, Grafos, Zagreb 2000, 345-359, 378.
6. O. H. Drummer, *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, Arnold, London 2001, 221-245.
7. Division of Narcotic Drugs, *Recommended methods for testing benzodiazepine derivatives under international control*, United Nations, New York 1988, 30
8. <http://www.krka.biz>, pristupljeno 6.10.2008.
9. <http://www.belupo.com>, pristupljeno 1.10.2008.
10. <http://www.plivazdravlje.hr>, pristupljeno 1.10.2008
11. M. Patel, B. K. Tang, W. Kalow, *Pharmacogenetics*. **5** (1995) 43.
12. S. K. Yang, Z. Bao, *Chirality*. **6**(1994) 321.
13. C. PhamHuy, G. Villain-Pautet, H. Hua, N. Chikhi-Chorfi, H. Galons, M. Thevenin, J. R. Claude, J. M. Warnet, *J Biochem. Biophys. Methods* **54** (2002) 287.

Prilježeno 22. svibnja 2009.