

Određivanje kalcija u rosuvastatinu primjenom plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Cipriš, Margareta

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:293000>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Margareta Cipriš

**Određivanje kalcija u rosuvastatinu primjenom
plamene atomske apsorpcijske
spektrofotometrije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020

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

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan na iznimnoj susretljivosti, razumijevanju, savjetima i pomoći tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala svim prijateljima, dečku i dragim ljudima što su mi cijelu ovu priču učinili ljepšom i lakšom.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima koji su mi pružili beskonačnu ljubav, strpljenje, razumijevanje i podršku i bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Kalcij.....	2
1.1.1. Uloga i metabolizam kalcija u organizmu.....	2
1.1.2. Deficit kalcija.....	3
1.1.3. Suficit kalcija.....	4
1.1.4. Izvori kalcija.....	4
1.2. Rosuvastatin.....	6
1.2.1. Farmakodinamika rosuvastatina.....	7
1.2.2. Farmakokinetika rosuvastatina.....	8
1.2.3. Terapija rosuvastatinom.....	9
1.3. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija.....	10
1.3.1. Uloga atomske apsorpcijske spektrofotometrije.....	10
1.3.2. Načelo atomske apsorpcijske spektrofotometrije.....	10
1.3.2. Dijelovi spektrofotometra.....	12
1.4. Validacija analitičke metode.....	14
1.4.1. Linearnost.....	14
1.4.2. Specifičnost i selektivnost.....	14
1.4.3. Preciznost.....	15
1.4.4. Točnost.....	15
1.4.5. Radno područje.....	16
1.4.6. Osjetljivost.....	16
1.4.7. Izdržljivost/otpornost.....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	18
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Materijali.....	21
3.1.1. Korištene kemikalije.....	21
3.1.2. Aparatura.....	21
3.1.3. Laboratorijski pribor i posuđe.....	21
3.1.4. Uzorci.....	22
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Princip metode.....	23
3.2.2. Priprema otopina.....	23
3.2.3. Priprema standardnih otopina kalcija.....	23

3.2.4. Priprema uzoraka za analizu	25
3.2.5. Postupak određivanja koncentracije kalcija	25
3.2.6. Statistička analiza	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Validacija analitičke metode	28
4.1.1. Linearnost	28
4.1.2. Preciznost.....	29
4.1.3. Točnost	32
4.1.4. Granica dokazivanja i granica određivanja	32
4.2. Primjena metode u određivanju kalcija u uzorcima	32
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA	36
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	41
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Kalcij

1.1.1. Uloga i metabolizam kalcija u organizmu

Kalcij je najzastupljeniji mineral u ljudskom organizmu i njegov sadržaj iznosi 1,5-2% tjelesne mase. Ovaj esencijalni makronutrijent vrlo je važan za zdravlje ljudskog organizma, rast i razvoj kostiju te održavanje njihove gustoće (Suchy i sur., 2010; Johns i sur., 2007).

U većinskom postotku, 99%, nalazi se u kostima i zubima u obliku fosfatne soli hidroksiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (Bronner, 1994; Otten i sur., 2006). Ostalih 1% ukupnog kalcija nalazi se u tkivima i tjelesnim tekućinama, gdje sudjeluje u prijenosu živčanih impulsa, kontrakciji i relaksaciji mišića te koagulaciji krvi aktivacijom pretvorbe protrombina u trombin. Bitan je u aktivaciji brojnih enzima (adenozin trifosfataza (ATPaza), sukcinil dehidrogenaza, lipaza), kao i za permeabilnost membrane i regulaciju krvnog tlaka.

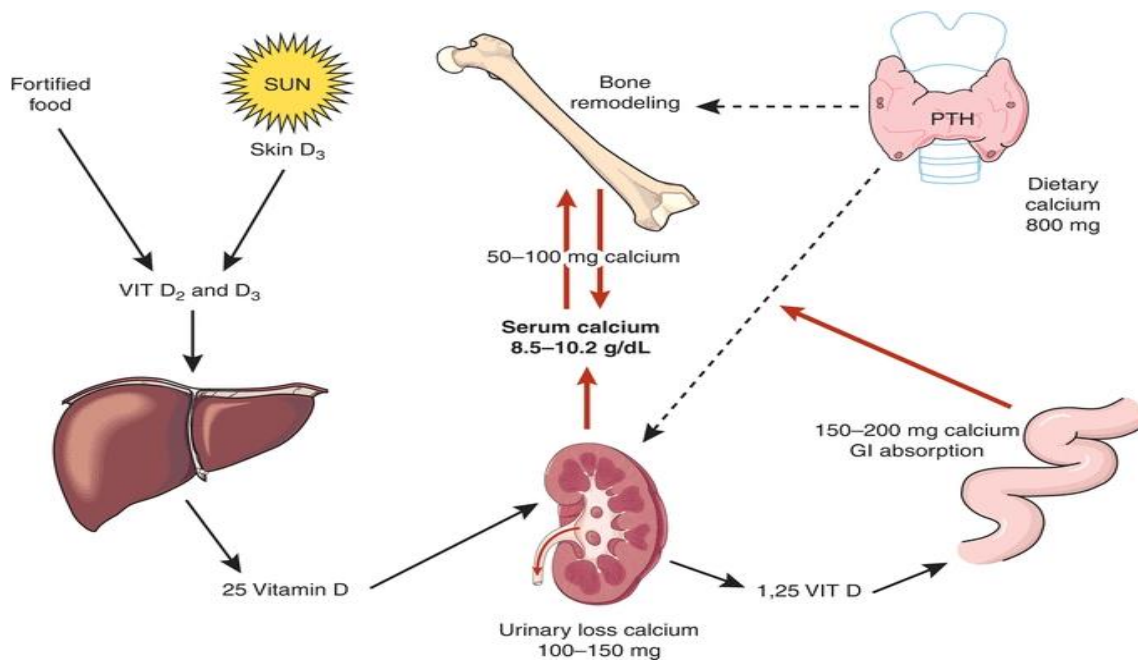
Normalna koncentracija u plazmi iznosi 2,2-2,6 mmol/L, gdje se nalazi u obliku iona Ca^{2+} i kompleksa s citratom i fosfatom (oko 60%) te vezan na plazmatske proteine, pretežno albumine (oko 40%).

Koncentracija u tijelu ovisi o unosu kalcija hranom, njegovoj apsorpciji iz probavnog trakta i izlučivanju putem bubrega. Kod uravnotežene prehrane dnevni unos je oko 1 g kalcija, 0,2 g gubi se putem žuči i ostalih probavnih sokova, a 0,2-0,4 g apsorbira se iz crijeva, ovisno o koncentraciji vitamina D, posebno 1,25-dihidroksikolekalciferola, tj. kalcitriola, koji je aktivni oblik vitamina D. Bubrezi izlučuju u prosjeku 0,2 g/dnevno i time održavaju ravnotežu kalcija.

Kalcij se iz probavnog sustava apsorbira vrlo slabo (oko 30%) jer su njegovi spojevi prilično netopljivi, a dodatan razlog je slaba apsorpcija Ca^{2+} kroz crijevnu sluznicu, pri čemu se $\frac{7}{8}$ neapsorbiranog kalcija izlučuje fecesom, dok preostala $\frac{1}{8}$ urinom (Guyton, 1995).

Apsorpcija je najveća u dvanaesniku zbog niskog pH, ali se događa u cijelom tankom crijevu. Dva su načina apsorpcije; jedan je aktivnim putem, a drugi pasivnom difuzijom, a kojim će se putem apsorbirati ovisi o koncentraciji Ca^{2+} u crijevima (Areco i sur., 2015).

Kod niske koncentracije u lumenu tankog crijeva apsorpcija se odvija aktivnim putem te je tada nužan 1,25-dihidroksikolekalciferol koji poboljšava apsorpciju i djeluje na više načina na crijevni epitel, od kojih je najvažnije poticanje stvaranja proteina koji veže kalcij (kalbindin) u epitelnim crijevnim stanicama. Taj način osobito je bitan kod povećanih potreba organizma za kalcijem te kod nedovoljnog unosa hrane (Guyton, 1995). Kod visoke koncentracije apsorpcija se odvija pasivnom difuzijom u tankom crijevu.



Slika 1. Prikaz metabolizma kalcija (preuzeto i prilagođeno s www.basicmedicalkey.com, pristupljeno 26. 8. 2020.)

1.1.2. Deficit kalcija

Kod poremećaja kojima je posljedica kronični gubitak kalcija iz mokraćne ili otežana resorpcija iz kostiju, najčešće dolazi do hipokalcijemije. Najveći dio kalcija u krvi nošen je bjelančevinom albuminom pa tako kod manjka albumina u krvi dolazi do niske koncentracije kalcija u krvi. No, kod simptoma hipokalcijemije važan je samo kalcij koji nije vezan za albumin, stoga je uzrok ove hipokalcijemije manje važan.

Do kroničnog nedostatka kalcija može doći zbog nedovoljnog unosa ili slabe apsorpcije u probavnom sustavu, pri čemu dolazi do njegove resorpcije iz kostiju, što može dovesti do smanjenja koštane mase, osteoporoze i čestih prijeloma kostiju. U Sjedinjenim Američkim Državama više od 1,5 milijuna prijeloma kostiju povezano je s osteoporozom (Otten i sur., 2006). Kalcij je iznimno važan već u fetalnoj dobi zbog mineralizacije kostura (Bailey i sur., 2010). Koštana masa povećava se oko sedam puta od rođenja do puberteta te još tri puta tijekom adolescencije (Peacock, 1991), a zatim se ne mijenja do otprilike 50. godine kod muškaraca i do menopauze kod žena (Nordin i sur., 1979).

Niska koncentracija kalcija u krvi ne mora uzrokovati simptome. S vremenom može doći do neuroloških simptoma; gubitka pamćenja, delirija, depresije, halucinacija i zbunjenosti, a simptomi nestaju ako se koncentracija kalcija vrati u normalne granice. Kod značajnog

manjka kalcija mogući su bolovi u mišićima, konvulzije i tetanija (Hays i Swenson, 1985; Malhotra, 1998; Murray i sur., 2000). Kod pada koncentracije kalcija za samo 35% od normalne, tj. s približno 2,4 mmol/L na 1,5 mmol/L, velika je vjerojatnost pojave tetanije. Periferna živčana vlakna postaju podražljiva i spontano šalju živčane impulse u periferne skeletne mišiće te izazivaju njihovu kontrakciju (Guyton, 1995). Također, deficit kalcija može uzrokovati različite poremećaje i bolesti kao što su osteoporoza, rahitis, a dolazi i do promjena u radu srca koje se mogu očitati na elektrokardiogramu (Szefer i Nriagu, 2007).

Letalna koncentracija je približno ispod 1 mmol/L. Hipofunkcija paratireoidnih žlijezda može dovesti do hipokalcijemije (Murray i sur., 2000).

1.1.3. Suficit kalcija

Hiperkalcijemija, s druge strane, uzrokuje depresiju živčanog sustava, refleksi su usporeni i dolazi do opstipacije i gubitka apetita. Do nje dolazi kada je razina kalcija u krvi iznad 3 mmol/L, a mogući uzroci su povećana apsorpcija iz želuca i crijeva (na što mogu utjecati prekomjerne doze vitamina D) ili povećan unos kalcija, pogotovo kod ljudi koji konzumiraju puno mlijeka i uzimaju antacide s kalcijem. Također se može pojaviti kod bolesti gdje su kosti razorene ili resorbirane (npr. Pagetova bolest) te kod nepokretnih ljudi.

I u ovom slučaju, hiperfunkcija paratireoidnih žlijezda dovodi do hiperkalcijemije. Hiperparatireoza je češća u žena nego u muškaraca (Guyton, 1995).

Prvi simptomi hiperkalcijemije su konstipacija, gubitak apetita, poliurija, povraćanje, bolovi u trbuhu te mučnina. Kod izrazite hiperkalcijemije često dolazi do slabosti, zbunjenosti, delirija i halucinacija, poremećenog rada srca te naposljetku smrti (Guyton, 1995).

1.1.4. Izvori kalcija

Glavni izvori kalcija kod ljudi su mlijeko i mliječni proizvodi, mahunarke, suhe smokve, mak, rogač, orašasti plodovi, sojino mlijeko, tofu, sardine (ukoliko ih konzumiramo s kostima), zeleno lisnato povrće, obogaćene žitarice, sokovi obogaćeni kalcijem te dodaci prehrani. Preporučeni dnevni unos kalcija je između 800-1300 mg/dnevno.

Apsorpcija kalcija može biti manja ako je hrana bogata oksalnom kiselinom (špinat, batat i grah) i fitičnom kiselinom (sjemenke, lješnjaci, soja, beskrvasni kruh) (Otten i sur., 2006).

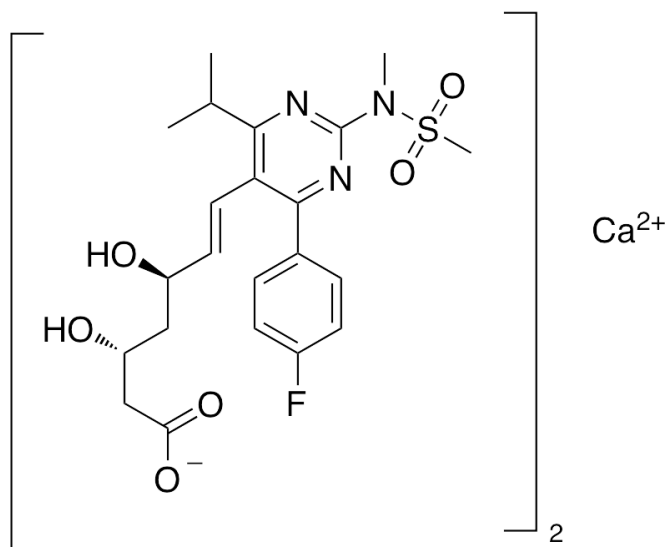
Razlog tome je što te organske kiseline s Ca^{2+} ionima tvore soli koje su teško topljive (Kerstetter i sur., 2005).

Uspješnost apsorpcije kalcija ovisi o dobi i veća je kod mlađih osoba, također ovisi i o spolu te je veća kod muškaraca nego žena iste dobi (Hope i sur., 1992; Bygrave i Benedetti, 1993).

1.2. Rosuvastatin

Rosuvastatin je sintetski lijek koji pripada novijoj generaciji statina, skupini lijekova koji snizuju kolesterol, a dolazi u obliku kalcijeve soli. Kemijsko ime rosuvastatinkalcija je bis[(E)-7-[4-(4-fluorofenil)-6-izopropil-2-[metil(metilsulfonil)amino]pirimidin-5-il](3R,5S)-3,5-dihidroksihept-6-enoična kiselina] kalcijeva sol.

Molekulska formula mu je $C_{44}H_{54}CaF_2N_6O_{12}S_2$, a molekulska masa iznosi 1001,14 g/mol. Rosuvastatinkalcij je bijeli amorfni prah topljiv u acetonitrilu, acetonu i dimetil sulfoksidu, a slabo topljiv u vodi i metanolu. Hidrofilan je spoj s koeficijentom raspodjele (oktanol / voda) od 0,13 pri pH 7,0.



Slika 2. Kemijska struktura kalcijeve soli rosuvastatina (preuzeto i prilagođeno s <https://lktlabs.com>, pristupljeno 29. 8. 2020.)

Kolesterol je sastavni dio staničnih membrana, steroida, žučnih kiselina i signalnih molekula, a glavna uloga triglicerida je skladištenje energije u adipocitima i mišićnim stanicama. Kako su lipidi hidrofobni i gotovo netopljivi u krvi, cirkuliraju krvotokom pomoću hidrofilnih okruglih čestica, lipoproteina. Lipoproteini su kompleksi lipida i apoproteina (posebna skupina proteina). Dije se po veličini i gustoći, tj. omjeru lipida i proteina na hilomikrone, lipoproteine vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoproteins*, VLDL), lipoproteine niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL), lipoproteine srednje gustoće (engl. *intermediate density lipoproteins*, IDL) i lipoproteine visoke gustoće (engl. *high density lipoproteins*, HDL). Visoke razine LDL-kolesterola i niske razine HDL-kolesterola glavni su čimbenici rizika ateroskleroze i bolesti srca. S druge strane, visoke razine HDL-kolesterola smanjuju kardiovaskularni rizik (Laumen i sur., 2008).

Statini su najvažnija skupina lijekova koja se koristi za snižavanje razine lipida u krvi i jedni su od najčešće propisivanih lijekova. Selektivni su i kompetitivni inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, enzima koji pretvara HMG-CoA u mevalonat, što je rani stupanj u sintezi kolesterola. Snizuju ukupni kolesterol, LDL-C (*low-density lipoprotein cholesterol*) i koncentraciju triglicerida, a povisuju koncentraciju HDL-C (*high-density lipoprotein cholesterol*). U ovu skupinu lijekova spadaju rosuvastatin, atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin i pravastatin (Francetić i sur., 2015).

Dugo su u upotrebi u terapiji hiperkolesterolemije, hiperlipoproteinemije i hipertrigliceridemije te se koriste u primarnoj i sekundarnoj prevenciji koronarnih bolesti (Range i sur., 2018; Bakhai i sur., 2018).

Prema podrijetlu dijele se na prirodne (lovastatin), polusintetske (simvastatin, pravastatin) i sintetske (rosuvastatin, atorvastatin, fluvastatin). Također, postoji podjela prema lipofilnosti na hidrofilne (rosuvastatin i pravastatin) i lipofilne (ostali statini) (Nigović i sur. 2007).

1.2.1. Farmakodinamika rosuvastatina

Rosuvastatin je selektivni i kompetitivni reverzibilni inhibitor enzima HMG-CoA reduktaze koja je ključna u sintezi kolesterola. Djelovanje rosuvastatina odvija se u jetri na hepatocitima. HMG-CoA reduktaza pretvara HMG-CoA u mevalonsku kiselinu koja dalje sudjeluje u sintezi kolesterola, a inhibicijom ovog enzima smanjuje se njegova sinteza. Statini inhibiraju enzim vezanjem na njegovo aktivno mjesto čime sterički sprječavaju vezanje supstrata za enzim. Smanjene količine unutarstaničnog kolesterola dovode do povećanja sinteze LDL-receptora i njihove ekspresije na membrani hepatocita kako bi se povećao ulazak LDL-kolesterola iz cirkulacije u jetrene stanice. Također, inhibira sintezu VLDL-a u jetri, smanjujući time ukupni broj čestica VLDL-a i LDL-a. Konačni rezultat je smanjenje koncentracije LDL-C u serumu i ukupnog kolesterola.

Prema istraživanjima, rosuvastatin ima 4 puta veći afinitet za aktivno mjesto enzima HMG-CoA reduktaze od endogenog HMG-CoA, a to je najveći afinitet među statinima dostupnima u Europi (Brown i sur., 2001).

Rosuvastatin također poboljšava funkciju endotela i ima protuupalni, antitrombotski i antioksidativni učinak (Grosser i sur., 2004). Antitrombotski učinak je rezultat inhibicije agregacije trombocita u leukocite koji inhibiraju stvaranje ugrušaka u ozlijeđenom endotelu. Rosuvastatin i ostali statini poboljšavaju funkcije endotela tako što povećavaju stvaranje

endotelnog dušikovog oksida i smanjuju stvaranje slobodnih radikala iz kisika te tako djeluju na aterosklerozu (Laumen i sur., 2008).

1.2.2. Farmakokinetika rosuvastatina

Kod oralnog uzimanja rosuvastatina, njegova bioraspoloživost iznosi 20%, a svoju maksimalnu koncentraciju u plazmi postiže nakon 5 sati, dok ju ostali inhibitori HMG-CoA reduktaze postižu nakon 3 sata. Apsolutna bioraspoloživost mu je oko 20%, a brzina apsorpcije mu je smanjena za 20% ako ga se uzima s hranom, ali to ne utječe na opseg apsorpcije i njegov učinak na smanjenje kolesterola. Zato se rosuvastatin može uzimati neovisno o hrani i dobu dana (White, 2002; McTaggart i sur., 2001). Volumen distribucije rosuvastatina iznosi oko 134 L. 88% rosuvastatina veže se na proteine plazme, najviše na albumin. Vežanje je reverzibilno i neovisno o koncentraciji u plazmi. Manje je lipofilan od ostalih statina (osim pravastatina), što je bitno jer statini pasivnom difuzijom dolaze u ekstrahepatična tkiva ovisno o svojoj lipofilnosti, a to u konačnici utječe na vjerojatnost pojave rabdomiolize (Warwick i sur., 2000; Martin i sur., 2002).

Prema provedenim istraživanjima, 10% lijeka se metabolizira, dok se preostalih 90% izlučuje nepromijenjeno. Uglavnom se metabolizira preko enzima CYP2C9, sa zanemarivim metabolizmom preko CYP2C19, CYP3A4 i CYP2D6 (Martin i sur., 2003). Glavni metabolit je N-desmetil rosuvastatin koji nastaje uglavnom preko CYP2C9, a *in vitro* studije pokazale su da ima otprilike 50% manju inhibitornu aktivnost od rosuvastatina na HMG-CoA reduktazu. Ostali statini se uglavnom metaboliziraju preko CYP3A4, što rosuvastatin čini manje podložnim metaboličkim interakcijama s ostalim lijekovima. Koncentraciju u plazmi povećavaju inhibitori CYP3A4, kao što su inhibitori proteaza, itrakonazol i makrolidi (White, 2002; McTaggart i sur., 2001; Martin i sur., 2003).

Oko 90% rosuvastatina izlučuje se nepromijenjeno putem fecesa, a ostalih 10% izlučuje se putem bubrega, od čega je približno 5% nepromijenjeno. Poluvrijeme eliminacije u plazmi mu je oko 20 sati te se ne povećava pri višim dozama. Kod rosuvastatina, a tako i kod ostalih inhibitora HMG-CoA reduktaze, ulazak u jetrene stanice odvija se pomoću membranskog prijenosnika OATP-C, a važan je i u njegovoj eliminaciji iz jetre (Martin i sur., 2003).

1.2.3. Terapija rosuvastatinom

Koristi se u terapiji primarne hiperkolesterolemije (tipa IIa, uključujući heterozigotnu obiteljsku hiperkolesterolemiju) ili miješane dislipidemije (tipa IIb) te homozigotne obiteljske hiperkolesterolemije. Također, koristi se kao dodatak dijeti kada provođenje primjerene dijetne i drugih nefarmakoloških mjera ne daju zadovoljavajuće rezultate (Francetić i sur., 2015; Istvan, 2001).

Kontraindikacije za primjenu rosuvastatina su teško oštećenje bubrežne funkcije, aktivna bolest jetre, preosjetljivost na rosuvastatin, miopatija, istovremena primjena ciklosporina, trudnoća i dojenje. Ciklosporin mu povećava površinu ispod krivulje (AUC), a gemfibrozil vršnu koncentraciju i AUC. Kod primjene s varfarinom povećana je sklonost krvarenju.

Česte nuspojave su glavobolja, omaglica, konstipacija, mučnina, bol u abdomenu, mialgija, astenija, a rijetko reakcije preosjetljivosti (angioedem, pankreatitis, miopatija, osip, urtikarija).

Dolazi u dozama od 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg i 40 mg. Dostupan je i u kombinacijama s ezetimibom, amlodipinom, perindoprilom ili indapamidom (Francetić i sur., 2015).

1.3. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija

1.3.1. Uloga atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (engl. *Atomic Absorption Spectroscopy*, AAS) je analitička tehnika za određivanje koncentracije metala prisutnih u uzorcima. Ovom tehnikom moguće je isključivo kvantitativno odrediti približno sedamdeset elemenata, a razlozi česte primjene su njezina jednostavnost, prikladnost za rutinska mjerenja, osjetljivost, brzina provođenja analize, visoka selektivnost i umjerena cijena instrumenta. Ograničenje ove tehnike je što je potrebna posebna katoda za svaki metal koji se analizira. Ima široku primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji za određivanje metala, u biomedicini, toksikologiji, forenzici i ekologiji.

1.3.2. Načelo atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Tehnika se temelji na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja određene valne duljine, nakon čega dolazi do pobuđivanja elektrona, pri čemu oni prelaze iz stabilnog osnovnog u više razine pobuđenog stanja. Za pobuđivanje elektronskih prijelaza energijski su prikladne samo frekvencije ultraljubičastog, vidljivog i X-zračenja te se one koriste kod atomske spektrofotometrije.

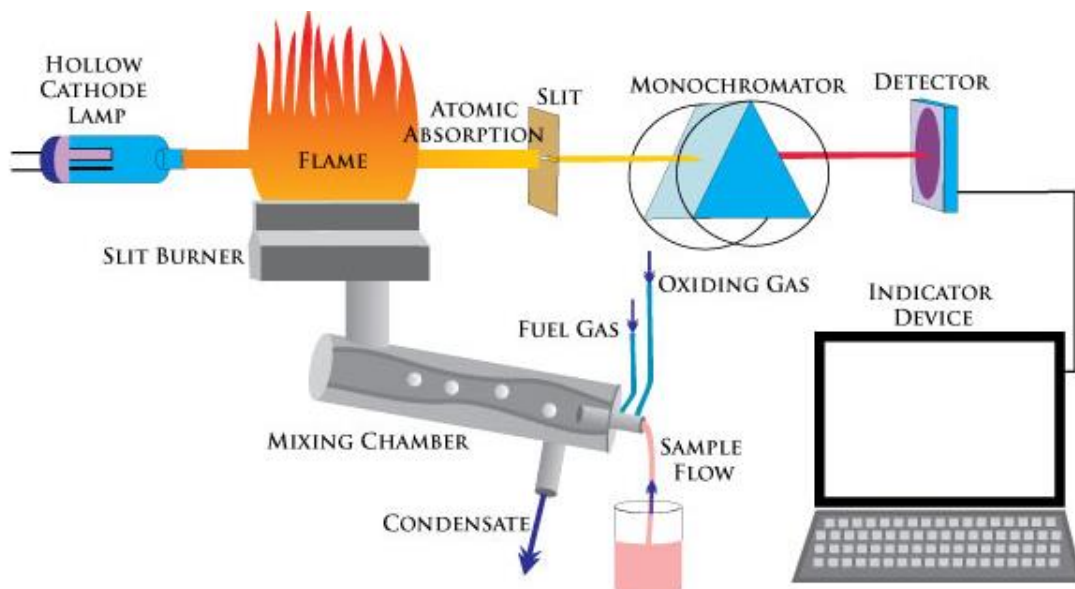
Do atomske apsorpcije dolazi kada plinoviti atom ili ion u osnovnom stanju apsorbira foton zračenja iz vanjskog izvora, pri čemu foton ima energiju potrebnu za prijelaz u neku od razina pobuđenog stanja. Bitno je znati da je kod istog elektronskog prijelaza energija emitiranog fotona jednaka onoj apsorbiranog fotona, što znači da je valna duljina emitiranog zračenja jednaka valnoj duljini apsorbiranog zračenja (Watson, 1999; Skoog i sur., 1999; García i sur., 2012).

Prvi i najbitniji korak svih atomskih spektrofotometrijskih postupaka je atomizacija, a to je proces isparavanja i razgradnje uzorka u plinovite atome, pri čemu nastaje atomska para. Spektrofotometrijske analize atoma ili elementnih iona mogu se odvijati samo u plinovitom mediju, gdje su pojedinačni ioni dovoljno odvojeni jedni od drugih.

Atomske spektrofotometrijske metode dijele se prema načinu atomiziranja uzorka na atomizacije u plamenu, elektrotermičke atomizacije, atomizacije u induktivno spregnutoj plazmi i atomizacije u plazmi istosmjernje struje. Kod ovog ispitivanja korišten je plameni atomizator.

Temelj plamene atomizacije je raspršivanje vodene otopine uzorka (nebulizacija) u oblik fine vodene prašine, potom miješanje s plinovitim gorivom i oksidansom koji ga unose u plamen. Za atomske apsorpcijske metode prikladne temperature plamena su u području 2200-2400 °C, a nastaju pomoću smjese zrak-acetilen. Smjesa dušikov oksid-acetilen (3000 °C) koristi se za soli elemenata kao što su kalcij i aluminij. Ostale smjese mogu biti zrak-vodik (2100 °C), kisik-vodik (2700 °C), itd.

Razlikujemo tri područja plamena: osnovno područje, unutrašnji stožac i vanjski stožac. Izgled i veličina tih područja ovise o omjeru goriva i oksidansa te vrsti plamenika. Osnovno područje je plave boje u plamenu ugljikovodika, što je posljedica emisije C_2 , CH i drugih radikala, a u njemu dolazi do isparavanja otapala. Nakon nastanka fino raspršenih čvrstih čestica u tom području, one su nošene u unutrašnji stožac koji se nalazi u sredini plamena i najtopliji je dio. On je najvažniji za spektrofotometriju i u njemu nastaju plinoviti atomi i elementarni ioni te dolazi do pobuđivanja atomskih emisijskih spektara. Slobodni atomi i ioni naposljetku su nošeni u vanjski stožac u kojem može doći do oksidacije prije raspršivanja atomizacijskih produkata u atmosferu. Smjesa gorivo-oksidans vrlo brzo prolazi kroz plamen pa je samo dio uzorka zahvaćen navedenim procesima (Watson, 1999; Skoog i sur., 1999; García i sur., 2012).



Slika 3. Atomski apsorpcijski spektrofotometar

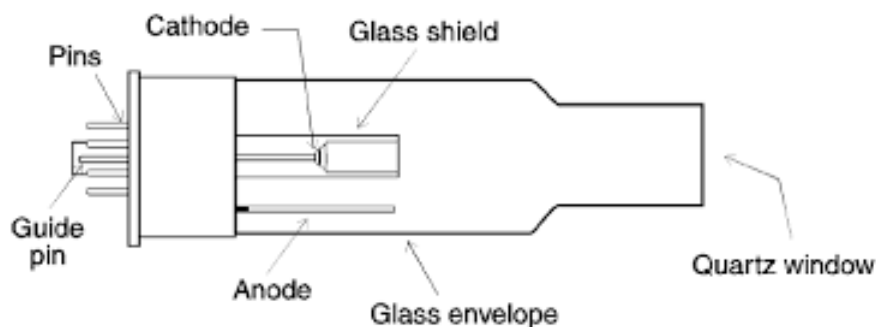
(preuzeto i prilagođeno s www.chemistry.stackexchange.com, pristupljeno 3. 9. 2020.)

1.3.2. Dijelovi spektrofotometra

Atomsko apsorpcijski spektrofotometar sastoji se od 5 najbitnijih dijelova: linijskog izvora zračenja, plamenog atomizatora laminarnog protoka, monokromatora, detektora i sustava za obradu podataka.

Linijski izvor zračenja

Kao linijski izvor zračenja najčešće se upotrebljava žarulja sa šupljom katodom. Katoda mora biti presvučena metalom koji se analizira ili se mora sastojati od njega, pri čemu emitira atomski spektar tog elementa. Anoda i katoda zataljene su u staklenoj cijevi koja je punjena inertnim plinom (argon ili neon). Kada je između anode i katode primijenjen potencijal od oko 300 V, atomi inertnog plina su ionizirani. Kod dovoljno velikog potencijala pozitivno nabijeni ioni inertnog plina ubrzavaju se kroz električno polje te se sudaraju s negativno nabijenom katodom, pri čemu izbijaju atome metala. Nastaje atomski oblik, a taj proces se naziva prštanje. Raspršeni atomi metala su u pobuđenom stanju i povratkom u osnovno stanje emitiraju određene valne duljine koje pobuđuju atome u ispitivanom uzorku (Skoog i sur., 1999; Beaty i Kerber, 1993).



Slika 4. Žarulja sa šupljom katodom (preuzeto i prilagođeno s www.agilent.com, pristupljeno 3. 9. 2020.)

Plameni atomizator laminarnog protoka

U plamenoj spektrofotometriji najčešći tip plamenika je plamenik laminarnog protoka, tj. plamenik s prethodnim miješanjem. Prije njega koristio se plamenik turbulentnog protoka, ali suvremeni atomski apsorpcijski instrumenti primjenjuju gotovo isključivo laminarno protočne plamenike.

Uzorak se raspršuje uz protok oksidansa pokraj kapilarnog vrška, nastaje aerosol koji se miješa s gorivom i prolazi kroz niz zapreka, pri čemu ostaju samo najsitnije kapljice. U plamenik s prorezom ulaze gorivo, aerosol i oksidans.

Prednosti ovih plamenika su rijetka pojava začepjenja, relativna tišina plamena i velika duljina puta koji pridonose većoj osjetljivosti i reproducibilnosti. S druge strane, nedostaci su sporije unošenje uzorka i moguće selektivno isparavanje miješanih otapala u komori, pri čemu može doći do analitičke pogreške (Skoog i sur., 1999).

Monokromator i detektor

Atomska apsorpcijska mjerenja najčešće su izvedena pomoću instrumenata koji posjeduju rešetku za ultraljubičasto i vidljivo područje kao monokromator. Monokromator se nalazi između plamena i detektora, a svrha mu je propuštanje zračenja željene valne duljine do detektora te uklanjanje zračenja raznih komponenti uzorka i plamena. Procesor signala odvaja izmjenični signal koji je nastao u odvojenom snopu od istosmjernog signala nastalog u plamenu. Dobiva se vrijednost apsorpcije koja je logaritam omjera referentne komponente i komponente uzorka izmjeničnog signala (Skoog i sur., 1999; White, 2002).

1.4. Validacija analitičke metode

Validacijom analitičke metode se obavlja postupak utvrđivanja i dokumentiranja prikladnosti ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. Validacijom metode se jamči da će se njenom primjenom u propisanim uvjetima dobiti valjani rezultati. Postupci validacije postali su obveza prema regulatornim zahtjevima *Dobre laboratorijske prakse (Good laboratory praxis, GLP)* i *Dobre proizvođačke prakse (Good manufacturing praxis, GMP)* i potrebno ju je provesti pri uvođenju i razvoju nove metode te kod promjene bilo kojeg dijela postojeće, već validirane analitičke metode. Određuju se: točnost, specifičnost/selektivnost, preciznost, linearnost, radno područje, izdržljivost (otpornost), osjetljivost (granica određivanja i granica dokazivanja). O namjeni analitičke metode ovisi koji će se parametri ispitivati u postupku validacije. Validacijski parametri moraju zadovoljiti zahtjeve predviđene određenim propisima, u protivnom se nastavljaju razvijati i validirati (Nigović i sur., 2019).

1.4.1. Linearnost

Linearnost analitičke metode je njezina sposobnost da unutar određenog intervala daje rezultate izravno proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Određuje se kroz tri do šest mjerenja, a primjenjuje se najmanje pet različitih koncentracija analita. Dobiva se kalibracijska krivulja koja grafički prikazuje ovisnost izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita. Kalibracijska krivulja predstavljena je jednadžbom pravca $y = ax + b$. Linearnost metode izražavamo koeficijentom korelacije regresijskog pravca (R) te on treba biti veći od 0,999 (Nigović i sur., 2019).

1.4.2. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost analitičke metode je sposobnost metode da razlikuje samo jednu komponentu od ostalih koje se nalaze u uzorku. Češće govorimo o selektivnosti jer je specifičnost rijetka u praksi.

Selektivnost predstavlja sposobnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka, kao što su razgradni produkti, onečišćenja, pomoćne tvari ili matrica uzorka. Ispitivanja selektivnosti analitičkih metoda kod ispitivanja čistoće ili određivanja sadržaja provode se tako da se dodaju onečišćenja ili pomoćne tvari čistoj ljekovitoj

tvori te se provede analiza. Ako onečišćenja nisu dostupna, uzorak lijeka je podvrgnut uvjetima koji potiču razgradnju te se utvrđuju interferencije (Nigović i sur., 2019).

1.4.3. Preciznost

Preciznost analitičke metode je slaganje između niza ponovljenih mjerenja koja su dobivena višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Ispituje se kroz pet do šest određivanja uz primjenu dvije do tri različite koncentracije. Iskazuje se kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost označava podudaranje rezultata koji su dobiveni istom metodom pri istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Srednja preciznost izražava odstupanje rezultata koji su dobiveni pri različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti analitičari, dani i instrumenti). Obnovljivost pokazuje odstupanje rezultata koji su dobiveni u različitim laboratorijima.

Izražava se standardnim odstupanjem (SD), relativnim standardnim odstupanjem (RSD, %) ili rasponom pouzdanosti oko srednje vrijednosti (Nigović i sur., 2019). Najčešće se izražava kao relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD, %), a izračunava se po formuli (1):

$$\text{RSD}\% = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

gdje je SD standardna devijacija, a \bar{x} srednja vrijednost dobivenih rezultata (Nigović i sur., 2019).

1.4.4. Točnost

Točnost analitičke metode izražava podudaranje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Kako bi se utvrdila točnost provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Određuje se nakon ispitivanja linearnosti, selektivnosti i preciznosti. Analitičkim prinosom (engl. *recovery*) se najčešće iskazuje odstupanje od stvarne vrijednosti (2):

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je \bar{x} srednja izmjerena vrijednost, a \hat{x} stvarna vrijednost analita u uzorku (Nigović i sur., 2019).

1.4.5. Radno područje

Radno područje pokazuje raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku, a uključuje i granične vrijednosti unutar kojih analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, linearnost i preciznost (Nigović i sur., 2019).

1.4.6. Osjetljivost

Osjetljivost se prikazuje granicom dokazivanja i granicom određivanja. Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) označava najnižu koncentraciju analita u uzorku koja se može dokazati, ali ne i odrediti pri propisanim uvjetima metode. Dobiva se prema jednadžbi (3):

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad (3)$$

gdje σ označava standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2019).

Granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) pokazuje najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću prema zadanim uvjetima metode. Izračunava se prema jednadžbi (4):

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \quad (4)$$

Razrjeđivanjem ispitivane otopine određuju se LOD i LOQ, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD = 3:1 ili 2:1; LOQ = 10:1). Također, možemo ih odrediti iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2019).

1.4.7. Izdržljivost/otpornost

Izdržljivost ili otpornost metode (engl. *robustness*) mjeri njezinu sposobnost da ostane nepromijenjena pri utjecajima malih, ali namjernih promjena parametara analitičke metode. Ona je pokazatelj pouzdanosti analitičke metode pri njezinoj normalnoj primjeni uz male promjene uvjeta koje možemo očekivati u stvarnim uvjetima. Dokazuje se promjenom jednog parametra, dok su ostali nepromijenjeni, a izbor tog parametra ovisi o metodi (Nigović i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kalcij je najzastupljeniji mineral u ljudskom organizmu i čini 1,5-2% tjelesne mase. Važan je za održavanje metabolizma i u najvećem postotku nalazi se u kostima i zubima. Sudjeluje u kontrakcijama mišića i prijenosu živčanih impulsa, regulira rad srca, krvni tlak i zgrušavanje krvi (Suchy i sur., 2010; Johns i sur., 2007). Nedostatak kalcija u organizmu uzrokuje neurološke simptome; gubitak pamćenja, delirij, depresiju, halucinacije i zbunjenost, a kod kroničnog nedostatka dolazi do njegove resorpcije iz kostiju, što može dovesti do smanjenja koštane mase, osteoporoze i čestih prijeloma kostiju (Hays i Swenson, 1985; Malhotra, 1998; Murray i sur., 2000). Kod suficita kalcija može doći do gubitka apetita, opstipacije, depresije živčanog sustava i usporavanja refleksa (Guyton, 1995). Glavni izvori kalcija kod ljudi su mlijeko i mliječni proizvodi, mahunarke, suhe smokve, mak, rogač, orašasti plodovi, sojino mlijeko, tofu, sardine (ukoliko ih konzumiramo s kostima), zeleno lisnato povrće, obogaćene žitarice, sokovi obogaćeni kalcijem te dodaci prehrani. Preporučeni dnevni unos kalcija je između 800-1300 mg/dnevno (Otten i sur., 2006).

Rosuvastatin je sintetski lijek koji se koristi u terapiji kod povišene razine lipida u krvi. Dolazi u obliku kalcijeve soli. Pripada statinima, skupini lijekova koji su selektivni i kompetitivni inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, enzima koji je ključan u sintezi kolesterola. Inhibira rani stupanj sinteze kolesterola u jetrenim stanicama. Indiciran je u terapiji primarne hiperkolesterolemije ili miješane dislipidemije te homozigotne obiteljske hiperkolesterolemije (Francetić i sur., 2015; Istvan, 2001).

Cilj ovog diplomskog rada je provesti analitičku validaciju metode za određivanje kalcija u tabletama rosuvastatina primjenom plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije.

Metoda je validirana ispitivanjem sljedećih parametara: linearnost, preciznost, granica dokazivanja, granica određivanja kao i točnost metode. Validirana metoda primjenjena je za određivanje kalcija u tabletama rosuvastatina od tri različita proizvođača.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene kemikalije

- Ca standard za AAS, koncentracije 1000,00 mg/L (SigmaAldrich, Njemačka)
- Rosuvastatin standard, koncentracije 120,00 mg/L (TCI, Japan)
- 65% HNO₃ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2% HNO₃
- 0,1 M HNO₃
- Lantanov (III) nitrat heksahidrat (Honeywell FlukaTM, Njemačka)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm-1)

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

3.1.2. Aparatura

Analiza je provedena na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru Analyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine s parametrima:

- Žarulja: žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
- Valna duljina (nm): 422,7
- Gorivo (oksidans): acetilen (zrak)
- Acetilen [tlak (Pa) : protok (L/min)]: 0,9 · 10⁵ : 2
- Zrak [tlak (Pa) : protok (L/min)]: 5,5 · 10⁵ : 17
- Širina pukotine (nm): 0,7
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Fotodetektor
- Računalo, pisac: AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo - zaslon - pisac HP 5652

3.1.3. Laboratorijski pribor i posuđe

- odmjerne tikvice veličine 10,00 mL, 25,00 mL, 50,00 mL i 100,00 mL

- staklene čaše volumena 50 mL, 100 ml i 250 mL
- automatske mikropipete veličine 50-200 μ L i 200-1000 μ L
- tarionik s pistilom
- plastična kartica (špatula)
- eksikator
- stakleni lijevak
- porculanske zdjelice za žarenje
- plastične epruvete s navojem
- Eppendorf epruvete
- filter veličine pora 0,45 μ m (Sartorius Minisart® Syringe Filters)
- šprice, 10,00 mL
- plastične kapaljke
- staklena graduirana pipeta
- ultrazvučna kupelj Transsonic 570 (Elma Ultrasonic, Singen, Njemačka)
- magnetski mješač
- žlica
- analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- plastični stalak za epruvete
- hladnjak za čuvanje uzoraka i standarda
- Mufolna peć

3.1.4. Uzorci

Korišteni uzorci su tablete koje sadrže 20 mg rosuvastatina u obliku rosuvastatinkalcija. Ispitivana su tri uzorka od tri različita proizvođača dostupna u ljekarni:

- Uzorak 1
- Uzorak 2
- Uzorak 3

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode

Koncentracija kalcija u ispitivanim uzorcima određena je mjerenjem apsorbcancije uzorka raspršenog u smjesi acetilena i zraka otparenog u plamenu, pri čemu dolazi do atomizacije. Atomi u plinovitom osnovnom stanju apsorbiraju zračenje valne duljine 422,7 nm te se mjeri promjena intenziteta zračenja (White, 2002).

3.2.2. Priprema otopina

2% dušična kiselina (HNO₃)

2% otopina HNO₃ pripremljena je razrjeđivanjem 10,00 mL 65% otopine HNO₃ ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 500,00 mL. Otopina je korištena za ispiranje instrumenta.

1% otopina lantanovog (III) nitrata heksahidrata (LaNO₃ · 6 H₂O)

1% otopina LaNO₃ · 6 H₂O pripremljena je otapanjem 1,00 g lantanovog nitrata ultračistom vodom u odmjernoj tikvici do 100,00 mL. Otopina se koristila za uklanjanje kemijskih interferencija.

3.2.3. Priprema standardnih otopina kalcija

Stock 1:

Standardna otopina kalcija koncentracije 100,00 mg/L (Stock 1) dobivena je razrjeđivanjem komercijalno dostupne standardne otopine kalcija koncentracije 1000,00 mg/L. 5,00 mL standardne otopine koncentracije 1000,00 mg/L i 5,00 mL 1% otopine LaNO₃ · 6 H₂O razrijeđeno je ultračistom vodom u odmjernoj tikvici do 50,00 mL. Uloga dodanog LaNO₃ · 6 H₂O je uklanjanje kemijskih interferencija.

Koncentracijski niz standardnih otopina za izradu kalibracijskog pravca pripremljen je razrjeđivanjem standardne otopine kalcija od 100,00 mg/L i 1% otopine La ultračistom vodom u odmjernim tikvicama do 25,00 mL (Tablica 1).

Tablica 1. Priprema standardnih otopina kalcija

Koncentracija standardne otopine kalcija (mg/L)	Priprema standarda	Ukupno razrjeđenje u odnosu na Stock 1
2,00 (ST 1)	0,50 mL standardne otopine koncentracije 100,00 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL	50 x
5,00 (ST 2)	1,25 mL standardne otopine koncentracije 100,00 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL	20 x
7,00 (ST 3)	1,75 mL standardne otopine koncentracije 100,00 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL	14,3 x
10,00 (ST 4)	2,50 mL standardne otopine koncentracije 100,00 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL	10 x
15,00 (ST 5)	3,75 mL standardne otopine koncentracije 100,00 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL	6,67 x
20,00 (ST 6)	5,00 mL standardne otopine koncentracije 100,00 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL	5 x

Standardna otopina rosuvastatinkalcija:

Standardna otopina rosuvastatinkalcija koncentracije 120,00 mg/L pripremljena je vaganjem 0,75 g primarnog standarda rosuvastatinkalcija u porculanskom lončiću te njegovim zagrijavanjem u Mufolnoj peći tri sata na 800°C. Uzorak se potom kvantitativno prenese u tikvicu od 25,00 mL te se otopi s malo 0,1 M otopine HNO₃, a naposljetku dopuni do oznake istom otopinom.

3.2.4. Priprema uzoraka za analizu

Uzorci tableta rosuvastatina od tri različita proizvođača, prikupljeni su u prosincu 2019. godine iz ljekarni te pohranjeni na sobnoj temperaturi.

Uzorci su pripremljeni na način da su po tri tablete od svakog proizvođača izvagane i usitnjene u fini prah u tarioniku s pistilom. Dobiveni prašci stavljeni su u porculanske zdjelice te zagrijani u Mufolnoj peći tri sata na 800°C. Potom su uzorci ohlađeni u eksikatoru na sobnu temperaturu. Od tako pripremljenih uzoraka izvagana je masa koja odgovara srednjoj vrijednosti mase jedne tablete. Uzorcima je dodana mala količina 0,1 M HNO₃ kako bi se otopili, a zatim su kvantitativno preneseni pomoću lijevka u tikvice od 100,00 mL. Slijedila je sonifikacija u trajanju od 15 minuta na ultrazvučnoj kupelji, nakon čega su tikvice nadopunjene s 0,1 M HNO₃ do 100,00 mL.

Priprema uzoraka s dodatkom standardne otopine kalcija

U tikvicu od 10,00 mL otpipetira se 1,00 mL alikvota uzorka (standard rosuvastatin kalcij) i 1,00 mL 1% otopine La te se doda 0,4 mL standardne otopina kalcija 100,00 mg/L odnosno 1,00 mL standardne otopina kalcija 100,00 mg/L. Tikvice se nadopune ultračistom vodom do 10,00 mL. Isti postupak primijenjen je za sve uzorke.

3.2.5. Postupak određivanja koncentracije kalcija

Koncentracija kalcija u uzorcima tableta rosuvastatina određuje se atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom mjerenjem apsorbanacije pri valnoj duljini od 422,7 nm.

Prije početka mjerenja koncentracije kalcija, potrebno je izraditi kalibracijsku krivulju koja se dobiva mjerenjem koncentracije niza kalibracijskih otopina standarda kalcija i izražena je u mg/L. Nakon izrade kalibracijske krivulje moguće je mjeriti koncentraciju kalcija u

uzorcima tableta. Plameni atomizator se na početku i na kraju mjerenja ispire 2% otopinom HNO_3 , a ultračistom vodom prije i nakon svakog pojedinog mjerenja. Pripremljene otopine uzoraka se prije analize filtriraju kroz filter veličine pora $0,45 \mu\text{m}$ i homogeniziraju protresivanjem, nakon čega se otopine uzoraka plastičnom cjevčicom automatski usisavaju u instrument. Uređajem je moguće višestruko uzastopno mjeriti isti uzorak u kratkom vremenskom intervalu, što osigurava veću preciznost mjerenja.

3.2.6. Statistička analiza

Za statističku analizu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2016 programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i PrismGraphPad 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD, www.graphpad.com). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija šest mjerenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija analitičke metode

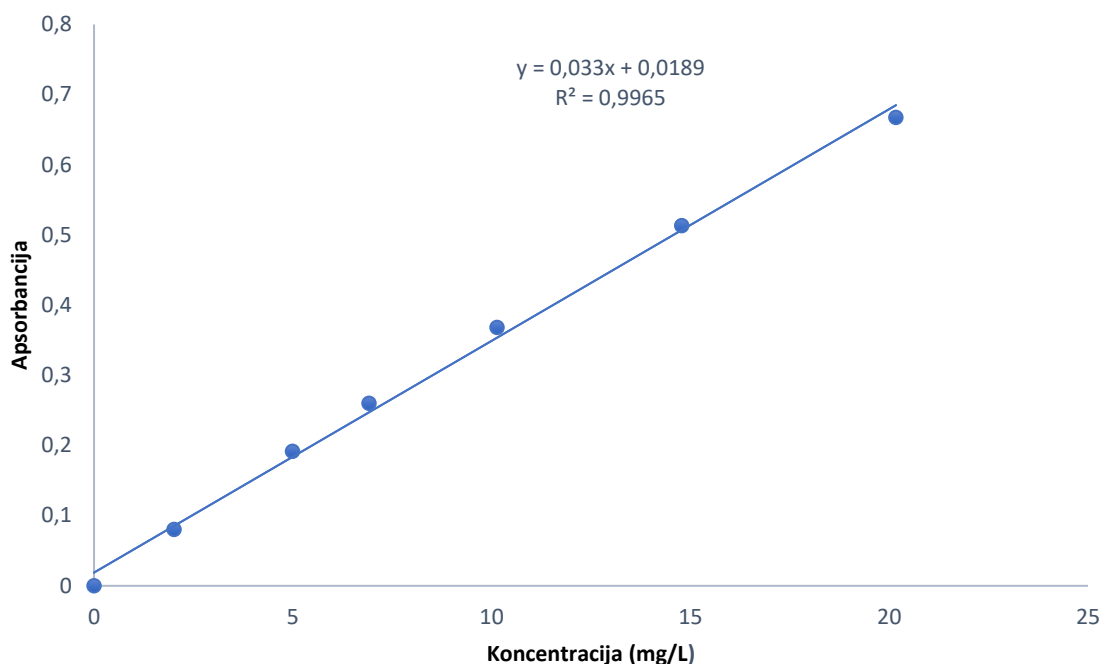
Određivanje kalcija u tri različita uzorka tableta provedeno je korištenjem postojeće metode plamene atomizacije na atomsko apsorpcijskom spektrofotometru Analyt 800 (PerkinElmer Instruments Norwalk, CT, SAD). Metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije: preciznost (ponovljivost unutar jednog dana i ponovljivost kroz tri dana), linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja i točnost.

4.1.1. Linearnost

Linearnost analitičke metode ispitana je pomoću prethodno pripremljenog koncentracijskog niza otopina standarda kalcija (ST1 do ST6) unutar raspona koncentracija od 2 do 20 mg/L. U tablici 2. prikazana je srednja vrijednost koncentracije za sve pripremljene standardne otopine. Time je dobivena kalibracijska krivulja, tj. graf ovisnosti analitičkog signala (apsorbancije) o koncentraciji standarda kalcija. Linearnost je definirana jednačinom pravca, $y = ax + b$ te koeficijentom korelacije regresijskog pravca R^2 .

Tablica 2. Linearnost

Koncentracija standarda (mg/L)	Srednja vrijednost izmjerene koncentracije standarda (mg/L)	Analitički signal (apsorbancija)
2	2,013	0,0802
5	4,990	0,1918
7	6,913	0,26
10	10,133	0,3682
15	14,785	0,5132
20	20,17	0,6673



Slika 5. Graf ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardnih otopina kalcija

Prema dobivenim rezultatima jednadžba kalibracijskog pravca je $y = 0,033x + 0,0189$, s koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9965$. Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da je metoda linearna te ju je moguće primijeniti za određivanje koncentracije kalcija u uzorcima tableta.

4.1.2. Preciznost

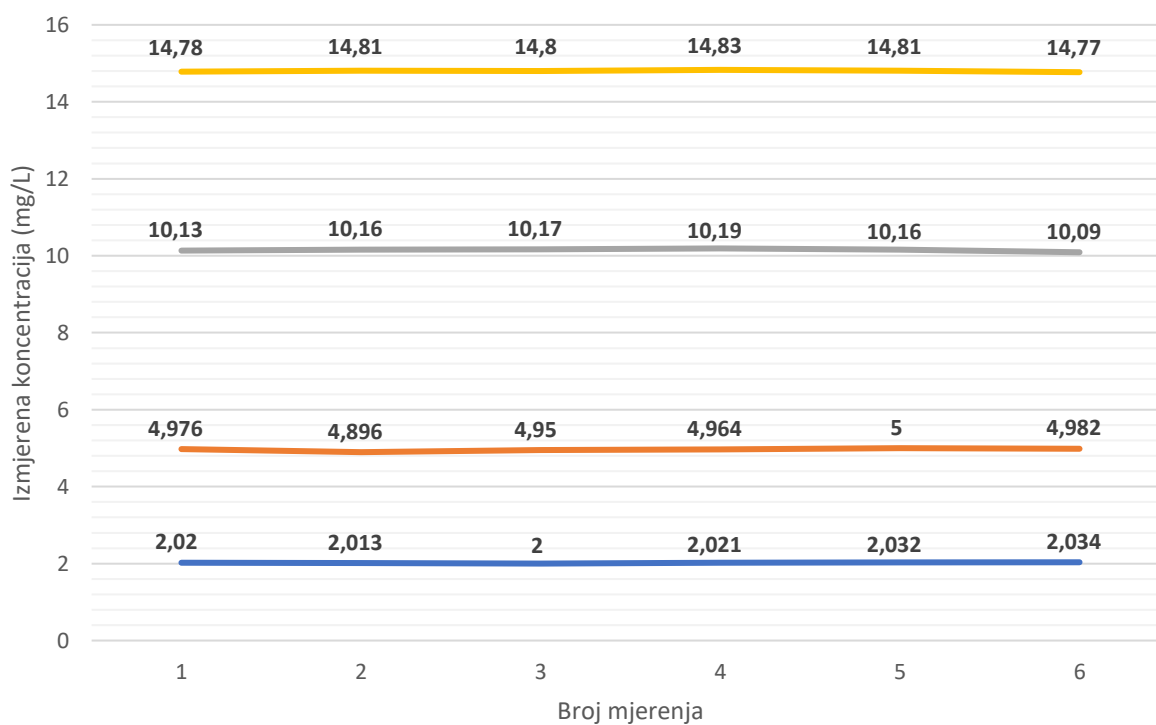
Preciznost se utvrđuje na temelju šest mjerenja za četiri različite koncentracije i izražava se vrijednostima kao što su standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD, %). Može se iskazati kao ponovljivost u danu, tj. mjerenje u kraćem vremenskom periodu tijekom jednog dana, i kao srednja preciznost, tj. ponovljivost iz dana u dan.

Tablica 3. Ponovljivost u danu

Koncentracija standarda (mg/L)	2	5	10	15
1. mjerenje	2,02	4,976	10,13	14,78
2. mjerenje	2,013	4,896	10,16	14,81
3. mjerenje	2	4,95	10,17	14,8

4. mjerenje	2,021	4,964	10,19	14,83
5. mjerenje	2,032	5	10,16	14,81
6. mjerenje	2,034	4,982	10,09	14,77
Srednja vrijednost	2,02	4,961	10,15	14,8
Standardna devijacija (SD)	0,014	0,036	0,035	0,022
Relativna standardna devijacija (RSD, %)	0,7	0,73	0,35	0,15

Prihvatljiva relativna standardna devijacija (RSD, %) za ponovljivost u danu je do 2%, što ukazuje da je metoda prikladna za određivanje kalcija u uzorcima.

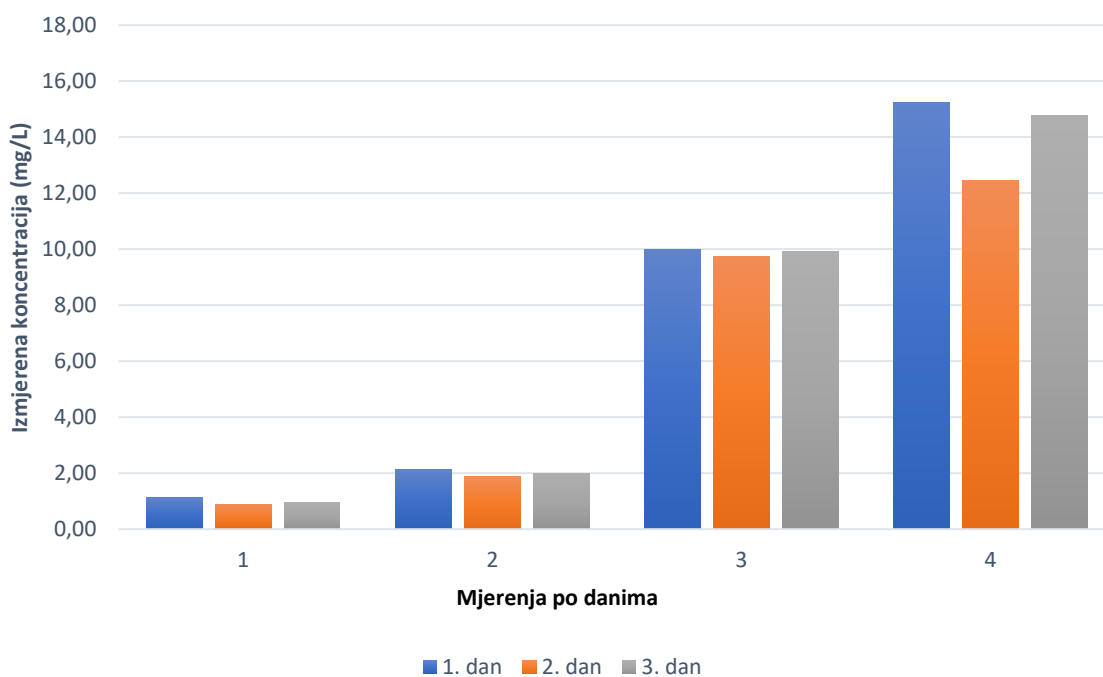


Slika 6. Grafčki prikaz ponovljivosti uzastopnih mjerenja tijekom jednog dana (n=6)

Tablica 4. Ponovljivost kroz tri dana

Koncentracija standarda (mg/L)	1	2	10	15
1. dan (n = 6)	1,119	2,14	9,977	15,25
2. dan (n = 6)	0,89	1,89	9,722	12,44
3. dan (n = 6)	0,97	2	9,916	14,76
Srednja vrijednost	0,993	2,011	9,872	14,15
Standardna devijacija (SD)	0,116	0,125	0,133	1,501
Relativna standardna devijacija (RSD %)	11,668	6,215	1,351	10,609

Na temelju dobivenih rezultata za ponovljivost kroz tri dana za četiri standardne otopine može se zaključiti da metoda ima prihvatljivu preciznost i da je prikladna za određivanje kalcija u uzorcima tableta. Visoke vrijednosti RSD dobivene za standardne otopine najniže i najviše koncentracije mogu biti posljedica nestabilnosti standardnih otopina tijekom stajanja.



Slika 7. Grafički prikaz ponovljivosti kroz 3 dana

4.1.3. Točnost

Točnost pokazuje podudaranje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Odstupanje od stvarne vrijednosti iskazuje se kao analitički prinos (Recovery). Točnost je određena metodom standardnog dodatka i to prvo mjerenjem apsorbancije kalcija u prethodno pripremljenim uzorcima standarda rosuvastatina kalcija. U pripremljene uzorke dodano je 0,4 odnosno 1,00 mL standardne otopine kalcija 100,00 mg/L te je zatim ponovno mjerena apsorbancija. Iz dobivene apsorbancije izračunata je koncentracija kalcija, kao i analitički prinos. Dopuštena vrijednost analitičkog prinosa je između 95% i 115%. Dobivene vrijednosti su 100,63% i 100,99% pa se može zaključiti da je metoda prihvatljive točnosti.

Tablica 5. Analitički prinos uzorka koncentracije kalcija 9,04 mg/L

c (mg/L) kalcija + c (mg/L) dodanog standarda	Ukupna koncentracija kalcija (mg/L)	Izmjerena koncentracija kalcija (mg/L)	Koncentracija dodatka (mg/L)	Analitički prinos (%)
9,04 + 4	13,04	13,17	4,04	100,997
9,04 + 10	19,04	19,16	10,063	100,63

4.1.4. Granica dokazivanja i granica određivanja

Nagib regresijskog pravca a iznosio je 0,033, a standardna devijacija SD 0,015. Za izračun granice dokazivanja (LOD) i granice određivanja (LOQ) korištene su formule (3) i (4) i dobivene su sljedeće vrijednosti:

$$\text{LOD} = 1,534 \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 4,648 \text{ mg/L.}$$

4.2. Primjena metode u određivanju kalcija u uzorcima

Nakon validacije metode, određena je koncentracija kalcija u uzorcima tableta rosuvastatina od tri različita proizvođača. Uzorci su pripremljeni u duplikatu, prema opisu u poglavlju 3. Materijali i metode, a svaki uzorak je mjeran šest puta. Izmjerene vrijednosti prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Izmjerene koncentracije kalcija u uzorcima tableta

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
Srednja vrijednost (mg/L)	5,551	4,427	5,236
Standardna devijacija (SD)	0,036	0,131	0,023
Relativna standardna devijacija (RSD, %)	0,654	2,959	0,43

5. ZAKLJUČAK

Svrha ovog diplomskog rada bila je ispitivanje prikladnosti plamene atomske apsorpcijske spektroskopije pri određivanju koncentracije kalcija u tabletama rosuvastatina. Pri tome su korištene tablete rosuvastatina od tri različita proizvođača.

Temeljem provedenog ispitivanja i dobivenih rezultata, doneseni su sljedeći zaključci:

1. U ovom radu uspješno je validirana metoda prema važećim smjernicama za kvantitativno određivanje kalcija u tabletama rosuvastatina
2. Dobiveni rezultati potvrđuju da je metoda linearna u području koncentracije od 2 do 20 mg/L uz jednadžbu pravca $y = 0,033x + 0,0189$ te koeficijent korelacije 0,9965, ponovljiva i točna uz analitički prinos od 100,63% i 100,99%. LOD metode iznosio je 1,534 mg/l, a LOQ 4,648.
3. Ispitivana metoda je jednostavna, brza, pouzdana i relativno jeftina analitička metoda za određivanje kalcija u uzorcima te može imati široku primjenu u farmaceutskoj industriji.
4. Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija je prikladna metoda za određivanje kalcija u uzorcima tableta rosuvastatina.

6. LITERATURA

Areco V, Rivoira M, Rodriguez V, Marchionatti A, Carpentieri A, Tolosa de Talamoni N. Dietary and pharmacological compounds altering intestinal calcium absorption in humans and animals. *Nutrition Research Reviews*, 2015, 28 (2), 83-99.

Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. Perkin-Elmer: Norwalk, CT, 1973.

Bailey RK, Fileti CP, Keith J, Tropez-Sims S, Price W, Allison-Otley SD. Lactose intolerance and health disparities among African Americans and Hispanic Americans: an updated consensus statement. *J Natl Med Assoc*, 2013, 105, 112-127.

Bailey RL, Dodd KW, Goldman JA, Gahche JJ, Dwyer JT, Moshfegh AJ, Sempos CT, Picciano MF. Estimation of total usual calcium and vitamin D intakes in the United States. *J Nutr*, 2010, 140 (4), 817-822.

Bakhai S, Bhardwaj A, Sandhu P, Reynolds JL. Optimisation of lipids for prevention of cardiovascular disease in a primary care. *BMJ Open Qual*, 2018, 7 (3), 71.

Bronner, F. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *The Scientific World*, 2001, 1, 919–925.

Bronner F. Calcium and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*, 1994, 60, 831–836.

Brown CDA, Windass A, Bleasby K, Lauffart B. Rosuvastatin is a high affinity substrate of hepatic organic anion transporter OATP-C (abstract). *Atheroscler Suppl*, 2001, 2, 90.

Calcium, 2014., <https://www.nrv.gov.au/nutrients/calcium>, pristupljeno 27. 8. 2020.

CRESTOR® (rosuvastatin calcium) Prescribing Information, 2020., <https://medicalinformation.astrazeneca-us.com>, pristupljeno 4. 9. 2020.

Francetić I. i suradnici. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 274-278.

García R i Báez A. Atomic Absorption Spectrometry (AAS). Mexico City, Mexico: National Autonomous University of Mexico, 2012, str. 1-10.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2011, str. 955-965.

Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G, Schröder H. Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325 (3), 871-876.

Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 2001, 292 (5519), 1160-1164.

Izvor kalcija i vitamina D u hrani, 2017., <https://www.kbc-zagreb.hr>, pristupljeno 27. 8. 2020.

Laumen H, Skurk T, Hauner H. The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin inhibits plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in human adipocytes. *Atherosclerosis*, 2008, 196 (2), 565-573.

Martin PD, Mitchell PD, Schneck DW. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of a new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, after morning or evening administration in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 2002, 54, 472-477.

Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Hill SJ, Giles PB, Phillips PJ, Lenz E. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers. *Clin Ther*, 2003, 25 (11), 2822-2835.

McTaggart F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atheroscler Suppl*, 2003, 4 (1), 9-14.

McTaggart F, Buckett L, Davidson R, Holdgate G, McCormick A, Schneck D, Smith G, Warwick M. Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, *Am J Cardiol*. 2001, 87 (5A), 28B-32B.

Nigović B, Fabijanić P, Bačić-Vrca V. Statini. *Farm. Glas*, 2007, 63, 315-331

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – Praktikum: Validacija analitičkog postupka. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135-137.

Niske razine kalcija, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>, pristupljeno 27. 8. 2020.

Nordin BE, Horsman A, Marshall DH, Simpson M, Waterhouse GM. Calcium requirement and calcium therapy. *Clin Orthop Relat Res*, 1979, 140, 216-39.

Peacock M. Calcium absorption efficiency and calcium requirements in children and adolescents. *Am J Clin Nutr*, 1991, 54 (1 Suppl), 261S-265S.

Poremećaji prometa kalcija, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>, pristupljeno 25. 8. 2020.

Poremećaji lipida, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>, pristupljeno 4. 9. 2020.

Range JT, LaFontaine PR, Ryder PT, Polston M. Factors Associated With Adherence to Statin Medications of Patients Enrolled in a Self-insured University Health Plan. *Clin Ther*, 2018, 40 (10), 1692-1700.

Richard D. Beaty, Jack D. Kerber. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, CT, U.S.A, 1993, str. 21-40.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Atomska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivu zračenju. U: *Foundamentals of analytical chemistry*, 6th edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti, Živković A. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 595-620.

Suchy FJ, Brannon PM, Carpenter TO, Fernandez JR, Gilsanz V, Gould JB, Hall K, Hui SL, Lupton J, Mennella J, Miller NJ, Osganian SK, Sellmeyer DE, Wolf MA. NIH consensus development conference statement: Lactose intolerance and health. *NIH Consens State Sci Statements*. 2010, 27 (2), 1-27.

Warwick MJ, Dane AL, Raza A, Schneck DW. Single- and multiple-dose pharmacokinetics and safety of the new HMG-CoA reductase inhibitor ZD4522. *Atherosclerosis*. 2000, 151, 39.

Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: Atomic spectrophotometry*. Edinburgh; Churchill Livingston, 1999, str. 125-132.

White CM. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *J Clin Pharmacol*, 2002, 42 (9), 963-970.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Kalcij je esencijalni makronutrijent i najzastupljeniji mineral u ljudskom organizmu. Vrlo je bitan za zdravlje ljudskog organizma, rast i razvoj kostiju te održavanje njihove gustoće. Sudjeluje u prijenosu živčanih impulsa, kontrakciji i relaksaciji mišića te koagulaciji krvi aktivacijom pretvorbe protrombina u trombin. Bitan je u aktivaciji brojnih enzima te je važan za permeabilnost membrane i regulaciju krvnog tlaka. Kod nedostatka kalcija može doći do gubitka pamćenja, delirija, depresije, halucinacija i zbunjenosti, a pri značajnom manjku kalcija mogući su bolovi u mišićima, konvulzije i tetanija. Hiperkalcijemija uzrokuje depresiju živčanog sustava, refleksi su usporeni i dolazi do opstipacije i gubitka apetita.

Rosuvastatin je sintetski lijek koji pripada novijoj generaciji statina, skupini lijekova za snižavanje kolesterola, a dolazi u obliku kalcijeve soli. Statini su najvažnija skupina lijekova koja se koristi za snižavanje razine lipida u krvi i jedni su od najčešće propisivanih lijekova. Selektivni su i kompetitivni inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, enzima koji pretvara HMG-CoA u mevalonat, preteći kolesterola. Koristi se u terapiji primarne hiperkolesterolemije (tipa IIa, uključujući heterozigotnu obiteljsku hiperkolesterolemiju) ili miješane dislipidemije (tipa IIb) te homozigotne obiteljske hiperkolesterolemije.

Cilj ovog rada bio je optimizirati metodu za određivanje kalcija u obliku tableta rosuvastatina pomoću plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije. Prije samog ispitivanja uzoraka, metoda je validirana ispitivanjem parametara kao što su linearnost, preciznost, točnost te granica dokazivanja i određivanja. U ispitivanju se koristio atomski apsorpcijski spektrofotometar Analyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine na valnoj duljini od 422,7 nm. Metoda je prikladna za određivanje kalcija u tabletama rosuvastatina te je brza, pouzdana i relativno jeftina.

Calcium is an essential macronutrient and the most abundant mineral in the human body. It is necessary for the health of the human body, growth and development of bones, and maintenance bone maintenance density. It participates in the transmission of nerve impulses, muscle contraction, and relaxation, and it enables blood clotting by activating the conversion of prothrombin to thrombin. It activates many enzymes, enhances membrane permeability, and it regulates blood pressure. Calcium deficiency can lead to memory loss, delirium, depression, hallucinations, and confusion. Significant calcium deficiency can lead to muscle aches, convulsions, and tetany. Hypercalcemia causes depression of the nervous system, slowed reflexes, obstipation, and loss of appetite.

Rosuvastatin is a synthetic drug that belongs to a newer generation of statins, a group of cholesterol-lowering drugs, and comes in the form of calcium salt. Statins are the most dominant group of drugs used to lower blood lipid levels, and they are one of the most commonly prescribed drugs. They are competitive and selective inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, an enzyme that converts HMG-CoA to mevalonate, a precursor to cholesterol. Rosuvastatin is used to treat primary hypercholesterolaemia (type IIa, including heterozygous familial hypercholesterolaemia) or mixed dyslipidemia (type IIb) and homozygous familial hypercholesterolaemia.

The aim of this study was to optimize the method for the determination of calcium quantity in the form of rosuvastatin calcium tablets, using flame atomic absorption spectroscopy. Before sample testing, the method was validated by determining linearity, precision, accuracy and detection limits and quantitation. An atomic absorption spectrophotometer Analytical 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, USA) with a deuterium corrector of a non-specific surface at a 422,7 nm wavelength was used in the study. This method is suitable for determining calcium in rosuvastatin tablets and is fast, reliable, and inexpensive.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC
DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ODREĐIVANJE KALCIJA U ROSUVASTATINU PRIMJENOM PLAMENE ATOMSKE APSORPCIJSKE SPEKTROFOTOMETRIJE

Margareta Cipriš

SAŽETAK

Kalcij je esencijalni makronutrijent i najzastupljeniji mineral u ljudskom organizmu. Vrlo je bitan za zdravlje ljudskog organizma, rast i razvoj kostiju te održavanje njihove gustoće. Sudjeluje u prijenosu živčanih impulsa, kontrakciji i relaksaciji mišića te koagulaciji krvi aktivacijom pretvorbe protrombina u trombin. Bitan je u aktivaciji brojnih enzima te je važan za permeabilnost membrane i regulaciju krvnog tlaka. Kod nedostatka kalcija može doći do gubitka pamćenja, delirija, depresije, halucinacija i zbunjenosti, a pri značajnom manjku kalcija mogući su bolovi u mišićima, konvulzije i tetanija. Hiperkalcijemija uzrokuje depresiju živčanog sustava, refleksi su usporeni i dolazi do opstipacije i gubitka apetita.

Rosuvastatin je sintetski lijek koji pripada novijoj generaciji statina, skupini lijekova za snižavanje kolesterola, a dolazi u obliku kalcijeve soli. Statini su najvažnija skupina lijekova koja se koristi za snižavanje razine lipida u krvi i jedni su od najčešće propisanih lijekova. Selektivni su i kompetitivni inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, enzima koji pretvara HMG-CoA u mevalonat, preteći kolesterola. Koristi se u terapiji primarne hiperkolesterolemije (tipa IIa, uključujući heterozigotnu obiteljsku hiperkolesterolemiju) ili miješane dislipidemije (tipa IIb) te homozigotne obiteljske hiperkolesterolemije.

Cilj ovog rada bio je optimizirati metodu za određivanje kalcija u obliku tableta rosuvastatina pomoću plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije. Prije samog ispitivanja uzoraka, metoda je validirana ispitivanjem parametara kao što su linearnost, preciznost, točnost te granica dokazivanja i određivanja. U ispitivanju se koristio atomski apsorpcijski spektrofotometar Analyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine na valnoj duljini od 422,7 nm. Metoda je prikladna za određivanje kalcija u tabletama rosuvastatina te je brza, pouzdana i relativno jeftina.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 7 grafičkih prikaza, 6 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Atomska apsorpcijska spektrofotometrija, kalcij, rosuvastatin

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

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

Dr. sc. Marijana Zovko Končić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Bival Štefan, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

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

DETERMINATION OF CALCIUM IN ROSUVASTATIN BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Margareta Cipriš

SUMMARY

Calcium is an essential macronutrient and the most abundant mineral in the human body. It is necessary for the health of the human body, growth and development of bones, and maintenance bone maintenance density. It participates in the transmission of nerve impulses, muscle contraction, and relaxation, and it enables blood clotting by activating the conversion of prothrombin to thrombin. It activates many enzymes, enhances membrane permeability, and it regulates blood pressure. Calcium deficiency can lead to memory loss, delirium, depression, hallucinations, and confusion. Significant calcium deficiency can lead to muscle aches, convulsions, and tetany. Hypercalcemia causes depression of the nervous system, slowed reflexes, obstipation, and loss of appetite.

Rosuvastatin is a synthetic drug that belongs to a newer generation of statins, a group of cholesterol-lowering drugs, and comes in the form of calcium salt. Statins are the most dominant group of drugs used to lower blood lipid levels, and they are one of the most commonly prescribed drugs. They are competitive and selective inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, an enzyme that converts HMG-CoA to mevalonate, a precursor to cholesterol. Rosuvastatin is used to treat primary hypercholesterolaemia (type IIa, including heterozygous familial hypercholesterolaemia) or mixed dyslipidemia (type IIb) and homozygous familial hypercholesterolaemia.

The aim of this study was to optimize the method for the determination of calcium quantity in the form of rosuvastatin calcium tablets, using flame atomic absorption spectroscopy. Before sample testing, the method was validated by determining linearity, precision, accuracy and detection limits and quantitation. An atomic absorption spectrophotometer Analytical 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, USA) with a deuterium corrector of a non-specific surface at a 422,7 nm wavelength was used in the study. This method is suitable for determining calcium in rosuvastatin tablets and is fast, reliable, and inexpensive.

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

Thesis includes: 43 pages, 7 figures, 6 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Atomic absorption spectroscopy, calcium, rosuvastatin

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
Marijana Zovko Končić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.

