

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

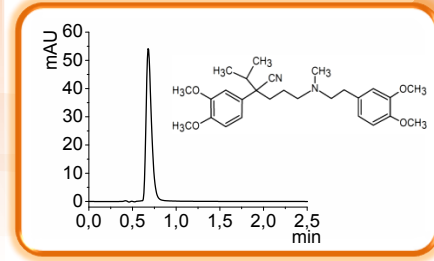
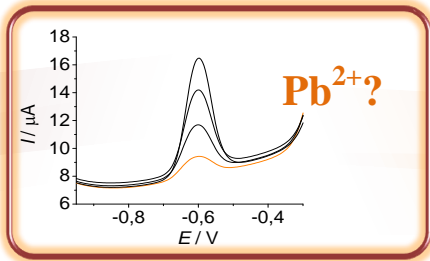
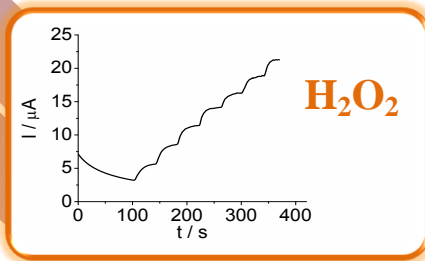
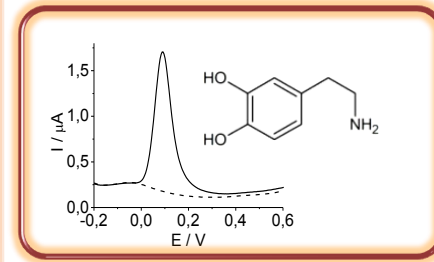
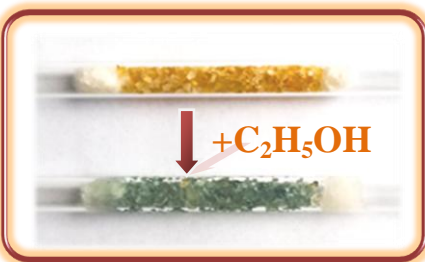
"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ХЕМИЈУ, БИОХЕМИЈУ И
ЗАШТИТУ ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ

Јасмина Анојчић
Сања Мутић

ПРАКТИКУМ ИЗ БИОАНАЛИТИЧКЕ ХЕМИЈЕ



Нови Сад, 2023.



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ХЕМИЈУ, БИОХЕМИЈУ И
ЗАШТИТУ ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ



Јасмина Анојчић
Сања Мутић

ПРАКТИКУМ ИЗ БИОАНАЛИТИЧКЕ ХЕМИЈЕ

Нови Сад, 2023.

Назив уџбеника: ПРАКТИКУМ ИЗ БИОАНАЛИТИЧКЕ ХЕМИЈЕ

Аутори: др Јасмина Анојчић, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

Мсц Сања Мутић
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

Рецензенти: др Слободан Гаџурић, редовни професор
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

др Далибор Станковић, доцент
Хемијски факултет
Универзитет у Београду

Издавач: Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

Главни и одговорни уредник: др Милица Павков Хрвојевић, редовни професор, декан
Природно-математичког факултета у Новом Саду

Практикум (електронско издање) је одобрен за употребу одлуком Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Новом Саду на 20. седници одржаној 18.05.2023. године (решење број 0602-07-209/23-8 од 30.05.2023. године).

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

543:577.1(075.8)(076)

АНОЈЧИЋ, Јасмина, 1987-

Практикум из биоаналитичке хемије [Електронски извор] / Јасмина Анојчић, Сања Мутић. - Нови Сад : Природно-математички факултет, 2023

Начин приступа (URL):

https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/anojcic_mutic_praktikum_iz_bioanaliticke_hemije.pdf - Опис заснован на стању на дан 1.6.2023. - Насл. са насловног екрана. - Библиографија.

ISBN 978-86-7031-627-0

1. Мутић, Сања, 1993-

а) Биоаналитичка хемија - Практикум

COBISS.SR-ID 117264905

Предговор

„Практикум из биоаналитичке хемије“ је првенствено намењен студентима Основних академских студија хемије и Основних академских студија биохемије на Природно-математичком факултету Универзитета у Новом Саду који похађају наставу из предмета „Биоаналитичка хемија“. Може послужити и студентима сличних студијских група на другим факултетима.

Биоаналалитичка хемија, као субдисциплина аналитичке хемије, се првенствено бави одвајањем, детекцијом и квантификацијом биомолекула у различитим срединама/узорцима. Циљ овог практикума је да се студенти упознају са аналитичким методама за анализу одабраних анализа од биолошког значаја и решавањем конкретних проблема помоћу класичних, али и савремених инструменталних мерних техника заснованих на теоријским принципима биоаналитичке хемије. У сврху повезивања теоријских и практичних аспеката, свака вежба се састоји од *Теоријског дела*, неопходног за савладавање теоријских основа за практични рад, као и *Експерименталног дела* у коме је дат детаљан преглед хемикалија, прибора/инструмената и поступака за практични рад у лабораторији. На крају сваке вежбе се налазе *Питања* за утврђивање градива и проверу знања. Овако конципиран практикум је написан са циљем да га студенти могу користити као додатну литературу за припрему испита из предмета „Биоаналитичка хемија“.

Посебну захвалност желимо да искажемо рецензентима, др Слободану Гацурићу, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду и др Далибору Станковићу, доценту Хемијског факултета Универзитета у Београду, на корисним сугестијама и коментарима који су значајно допринели квалитету овог практикума. Такође, захваљујемо се и Гордани Анушић, вишем стручно-техничком сараднику за рад у лабораторијама или центрима, за помоћ у току извођења и реализацији вежби.

Овај практикум посвећујемо успомени на професорку др Валерију Гужвањ која је осмислила садржај предмета „Биоаналитичка хемија“ и била дугогодишњи предметни наставник, а уједно нас инспирисала да заволимо биоаналитичку хемију и да напишемо овај практикум.

Нови Сад, 2023.

Аутори

Име и презиме студента:

Број индекса:

Редни бр.	Назив вежбе	Датум	Овера асистента
1	Утврђивање трудноће и присуства психоактивних супстанци имунохемијским тестовима		
2	Одређивање глукозе у крви		
3	Пулсна оксиметрија/мерење кисеоника пулсним оксиметром		
4	Алкотест - анализа етанола у даху		
5	Квалитативна анализа камена жучи / мокраћних путева		
6	Директна анодна волтаметријска анализа допамина		
7	Инверзна волтаметријска анализа олова		
8	Амперометријска анализа водоник-пероксида		
9	Течно-хроматографска анализа верапамила		

САДРЖАЈ

Вежба 1. Утврђивање трудноће и присуства психоактивних супстанци имунохемијским тестовима	1
Вежба 2. Одређивање глукозе у крви	11
Вежба 3. Пулсна оксиметрија/мерење кисеоника пулсним оксиметром....	18
Вежба 4. Алкотест - анализа етанола у даху.....	24
Вежба 5. Квалитативна анализа камена жучи / мокраћних путева	29
Вежба 6. Директна анодна волтаметријска анализа допамина.....	37
Вежба 7. Инверзна волтаметријска анализа олова.....	47
Вежба 8. Амперометријска анализа водоник-пероксида.....	54
Вежба 9. Течно-хроматографска анализа верапамила.....	62

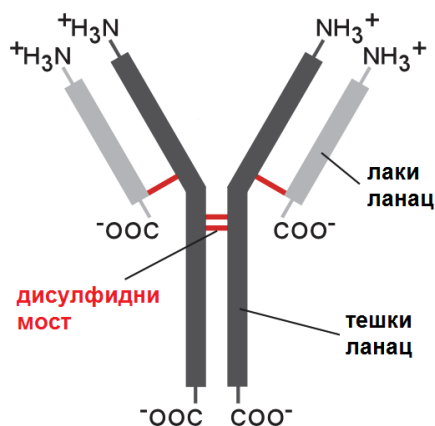
Вежба 1. Утврђивање трудноће и присуства психоактивних супстанци имунохемијским тестовима

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

Биолошки тестови (*енгл. Bioassays*), међу којима посебну важност имају имунохемијски тестови, заснивају се на високо-специфичној реакцији између антитела и антигена који представљају основне молекуле имуног система. За неке тестове се могу постићи веома ниске границе детекције. Биолошки тестови су једна од најчешћих метода у биоаналитичкој хемији, посебно за дијагностику и лечење болести. Значај и распрострањеност имунолошких метода у фармацеутској анализи приписује се њиховој специфичности и високој осетљивости за анализу широког спектра анализата у биолошким узорцима. Да би се схватио принцип рада имунохемијских тестова, неопходно је, пре свега, упознати се са појмовима антиген и антитело.

Антиген или имуноген је супстанца која изазива стварање антитела и може изазвати имуни одговор када доспе у организам. Антигене представљају све супстанце које могу бити препознате од стране адаптивног имуног система. Антигени су обично протеини или полисахариди и обухватају делове (омотаче, капсуле, ћелијски зид, флагеле, фимбрије и токсине) бактерија, вируса и др. микроорганизама. Липиди и нуклеинске киселине су антигени само када су комбиновани са протеинима и полисахаридима. Немикробни егзогени антигени могу бити полен, беланце и протеини (након трансплантације ткива и органа или на површини крвних ћелија након трансфузије).

Антитела или имуноглобулини (Ig) су гама глобулински протеини који се налазе у крви или другим телесним течностима кичмењака. Користи их имуни систем за идентификацију и неутрализацију страних објеката, као што су бактерије и вируси. Антитела производе беле крвне ћелије - Б лимфоцити. Антитело је молекул у облику слова Y, који се састоји од четири полипептидна ланца - два идентична тешка ланца и два идентична лака ланца повезана дисулфидним везама (слика 1.1).

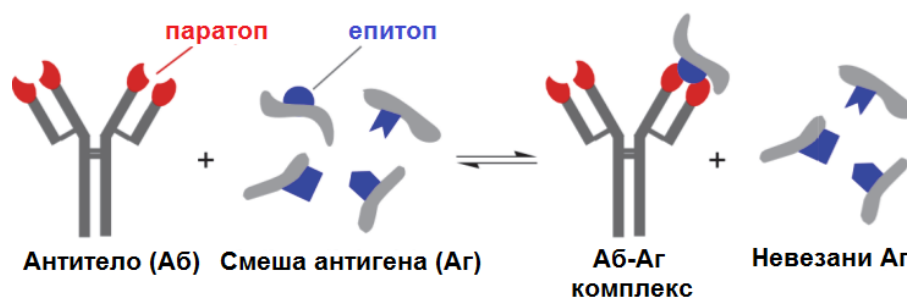


Слика 1.1. Имуноглобулин у облику слова Y који се састоји од два идентична тешка ланца и два идентична лака ланца повезаних дисулфидним везама

Постоји пет типова Ig тешких ланаца код сисара означених грчким словима α , δ , ϵ , γ и μ . Антитела су груписана у различите изотипове у зависности од тога који тешки ланац поседују. Тип тешког ланца одређује изотип (класу) антитела - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Код сисара постоји пет различитих типова антитела који имају различите улоге и помажу у усмеравању одговарајућег имуног одговора у зависности од типа страног објекта са којим се сусрећу. Тешки ланци се разликују по величини и саставу. α и γ тешки ланци садрже приближно 450 аминокиселина, а μ и ϵ приближно 550. Сваки тешки ланац има константни и варијабилни регион. Константни регион је идентичан у свим антителима истог изотипа (класе). Ова особина има значај при употреби секундарних антитела. Код сисара постоје два типа лакких ланаца означених грчким словима λ и κ . Свако антитело садржи два идентична лака ланца (λ или κ). Сваки лаки ланац састоји се од константног и варијабилног дела. Просечна дужина лаког ланца је од 211 до 217 аминокиселина.

Делови антитела имају специфичну функцију. Врх антитела садржи део који везује антиген и тако препознаје специфичан страни објекат. Овај регион антитела назива се *Fab* (енгл. *Fragment antigen binding*, фрагмент антиген везујући) регион. Састоји се од једног константног и једног варијабилног домена сваког тешког и лаког ланца. База антитела има улогу у модулацији активности хелија имуног система. Овај регион је *Fc* (енгл. *Fragment crystallizable*, фрагмент кристализујући) регион и састоји се од два тешка ланца. Везујући се за специфичне протеине *Fc* регион обезбеђује да свако антитело генерише адекватан имуни и физиолошки одговор за дати антиген активацијом осталих елемената имуног система.

Антитело (Аб) и антиген (Аг) имају одређена места за препознавање, која се називају паратоп и епитоп, редом. Ако се паратоп антитела поклапа са епитопом антигена, формира се Аб-Аг-комплекс (слика 1.2). Антитело реагује само са одговарајућим антигеном, док остали антигени присутни у смеши реагенаса остају невезани. У многим случајевима ова висока специфичност омогућава директну анализу сложених биолошких узорака као што су нетретирана крв или урин. Пошто је афинитет антитела према антигену веома висок, везивање се дешава чак и при веома ниским концентрацијама. Ово објашњава високу осетљивост и ниске границе детекције добијене биолошким тестовима.



Слика 1.2. Молекуларно препознавање антитела (Аб) и антигена (Аг) које резултира у настанку Аб-Аг-комплекса и невезаних Аг

Могу се разликовати две врсте антитела: поликлонална и моноклонална антитела. Поликлонална антитела су у суштини смеша антитела које производи домаћин након убризгавања антигена. Она се могу везати за неколико епитопа на антигену. Ова антитела настају имунизацијом одговарајућег сисара као што је миш, зец или коза. Већи сисари су погоднији због веће количине серума (тзв. антисерума) који се добија. Антиген се убризгава животињи, што стимулише Б лимфоците да продукују антитела специфична за дати антиген. С друге стране, моноклонална антитела настају из једне ћелијске линије. Она су идентична јер настају од једног типа имуних ћелија које су клонови настали од једне родитељске ћелије. Везују се само за један одређени епитоп на антигену и чешће се примењују у аналитичке сврхе.

Да би се детектовао производ настао у току извођења теста, обично је потребно користити неки маркер-молекул (обележивач), који је причвршћен или за антитело или за антиген. Овај молекул може бити ензим, флуоресцентна, луминисцентна, радиоактивна, или електрохемијски активна функционална група. Имунохемијске реакције се могу извести у раствору или на чврстој подлози, са дефинисаном количином или вишком реагенса.

Имуноанализе се широко примењују у многим важним областима фармацеутске анализе, као што су дијагностиковање болести, мониторинг лекова у току терапије, клиничке фармакокинетичке и биоеквивалентне студије у откривању нових лекова и фармацеутској индустрији. Антиген-антитело интеракција има примену код лабораторијских техника за серолошки тест компатибилности крви и разних патогених инфекција. Софистициранија примена укључује *ELISA* тест.

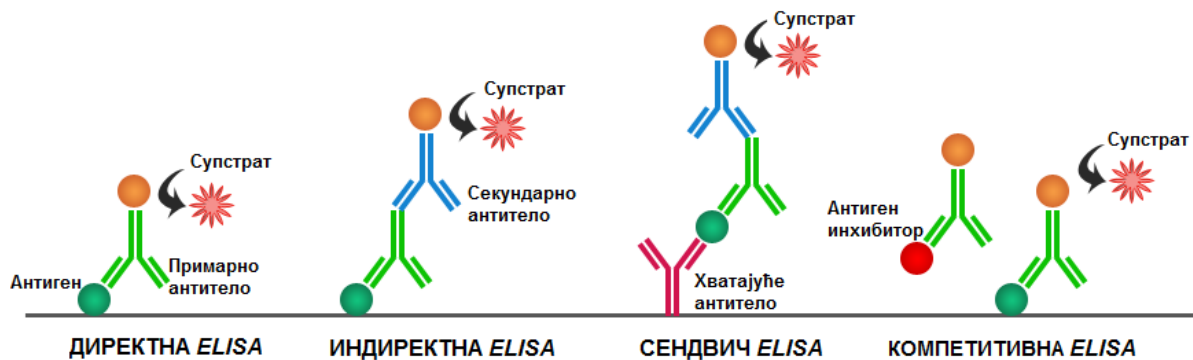
ELISA (енгл. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) је биохемијска техника која се користи првенствено у имунологији за детекцију присуства антитела или антигена у узорку. Користи се као дијагностичко средство у медицини, патологији биљака као и за контролу квалитета у разним индустријама.

ELISA тестови (слика 1.3) могу бити:

1. Индиректни
2. Директни
3. Сендвич
4. Компетитивни

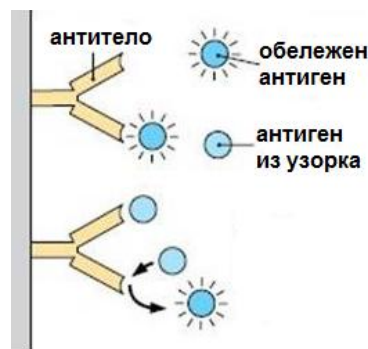
Имобилизација антигена од интереса, може се извести њиховом директном адсорпцијом на плочи за испитивање или индиректно преко хватајућег антитела које је причвршћено (имобилизовано) на плочу. Антиген се затим детектује директно (обележено је примарно антитело) или индиректно (обележено је секундарно антитело). Често примењивани облик *ELISA* теста је сендвич *ELISA* коју карактерише висока осетљивост и робусност. Ова врста теста се назива „сендвич“, јер је аналит који се мери везан између два примарна антитела – хватајућег антитела и антитела за детекцију. Компетитивна *ELISA* подразумева додавање конкурентских антитела или

протеина након додавања секундарних антитела. То има за последицу смањење интензитета сигнала који се генерише. Сматра се да овај тест даје добре, високо-специфичне резултате.



Слика 1.3. Основни типови *ELISA* тестова

Једна верзија конкуритивног *ELISA* теста користи ензимски обележен антиген за разлику од ензимски обележеног антитела (слика 1.4). Наиме, ензимски обележен антиген се такмичи са антигенима из узорка за везивање на примарно антитело. Што је више антигена у узорку, мање је ензимски обележених антигена везано за антитело и обојени сигнал је слабији.



Слика 1.4. Принцип конкуритивног имунохемијског теста

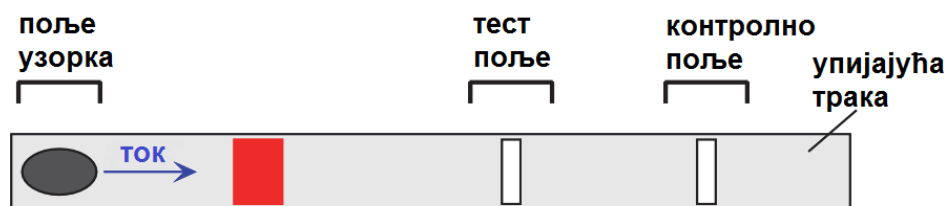
Неки од примера имунохемијских тестова су кућни тест за утврђивање трудноће и тест на психоактивне супстанце.

1.1. Тест за утврђивање трудноће

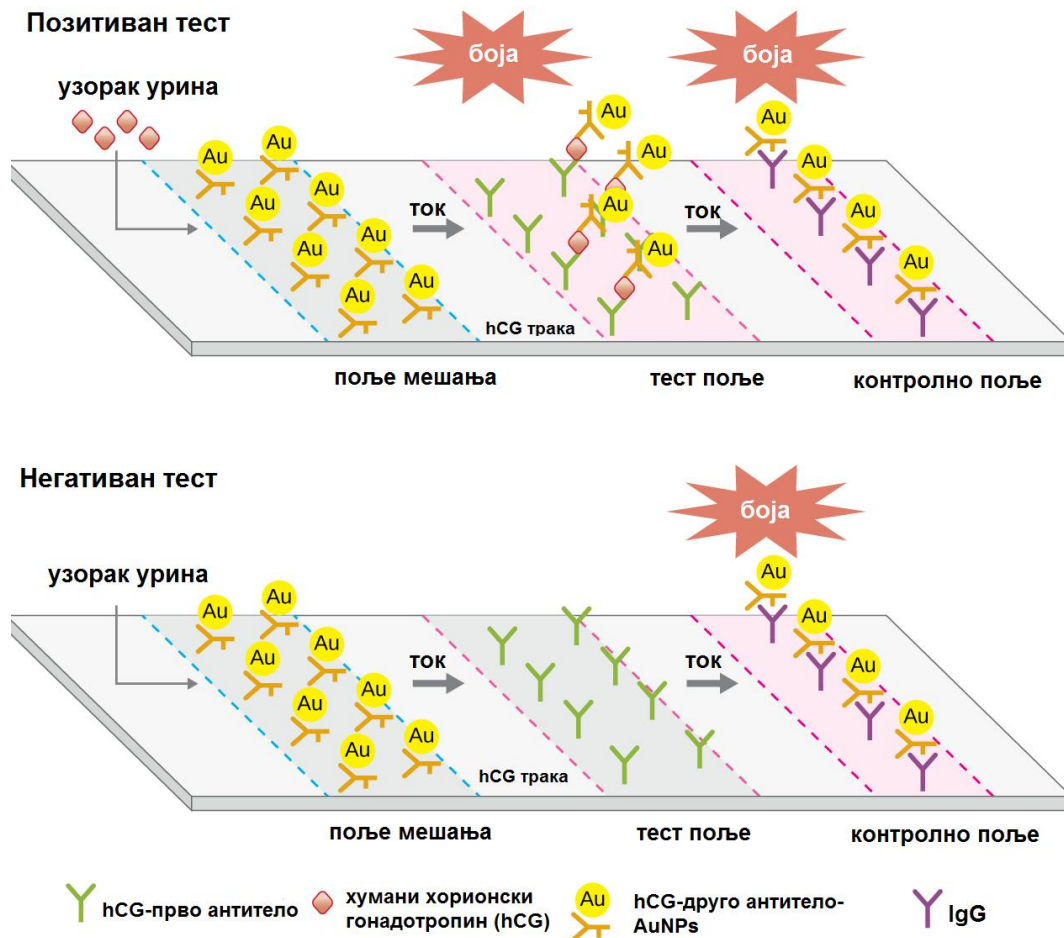
Неколико дана након зачећа, постељица лучи гликопротеински хормон - хумани хорионски гонадотропин (hCG) који се појављује у урину и његова концентрација се брзо повећава током првих недеља трудноће. Како hCG представља одличан маркер за утврђивање трудноће, развијени су бројни имунохемијски тестови за утврђивање присуства hCG у урину у кућним условима и они чине значајан део тржишта кућне дијагностике. Ови тестови се заснивају на *ELISA* или хроматографској техници.

Тест се изводи на тест траци и заснива се на „сендвич“ формату уз примену две врсте антитела која препознају различити епитоп hCG. Једно антитело (хватајуће антитело) је имобилизовано на површину тест траке, док је друго антитело импрегнисано на површини тест траке, али није трајно причвршћено, и обележено је најчешће неком бојом или ензимом. За обележавање антитела често се користе колоидне златне наночестице (AuNPs) које имају јединствене физичке и оптичке особине и приликом интеракције са светлошћу производе боју. Уколико је пак антитело обележено ензимом, потребно је да тест трака садржи имобилизован супстрат који ће у ензиматској реакцији дати обојени производ. Сама тест трака је израђена од упијајућег материјала, тако да када се нанесе узорак урина, течност се креће дуж траке под утицајем капиларних сила, при чему долази до одигравања одређених реакција.

На тест траци се разликују поље за наношење узорка, тест поље и контролно поље (слика 1.5). Кап урина се наноси на место предвиђено за наношење узорка и течност се прво креће преко зоне која садржи обележено антитело. Ако је hCG присутан у узорку, формираће комплекс са обележеним антителом. Овај комплекс даље прелази преко подручја са имобилисаним хватајућим антителом (тест поље) где долази до формирања „сендвич“ комплекса са hCG молекулом између два антитела. На овај начин обележено антитело постаје имобилизовано и количина формираних „сендвич“ комплекса је директно пропорционална количини hCG у узорку. Уколико концентрација hCG прелази праг осетљивости теста долази до настанка обојења. Вишак обележених антитела (који не учествују у формирању „сендвич“ комплекса са hCG молекулом) доспевају до контролног поља у коме су имобилизована контролна антитела и у интеракцији са њима дају обојење. Дакле у случају позитивног теста, тест и контролна линија су обојене, а у случају негативног теста само је контролна линија обојена. Уколико контролна линија није обојена, тест је неважећи. Принцип рада теста је детаљно приказан на слици 1.6.



Слика 1.5. Шематски приказ тест траке за утврђивање трудноће



Слика 1.6. Принцип рада имунохроматографског теста на трудноћу

Кућни тестови на трудноћу могу бити веома прецизни уколико се примењују на адекватан начин, а неки тестови према доступним подацима показују тачност > 99%. Такође, на тржишту постоји велики избор кућних тестова на трудноћу, који се могу наћи у различитим облицима – штапићи, траке, плочице, дигитални тест (слика 1.7). Од облика теста зависи и лакоћа са којом се употребљавају. Тестови у облику штапића су дизајнирани тако да се могу директно изложити млазу урина, док траке и плочице захтевају претходно сакупљање узорка у одговарајућу посуду за урин а затим ураћање теста у узорак или, у случају плочице, наносење узорка на сам тест помоћу пластичне пипете.



штапић - визуелни тест

штапић - дигитални тест

тест плочица

тест трака

Слика 1.7. Облици кућних тестова на трудноћу

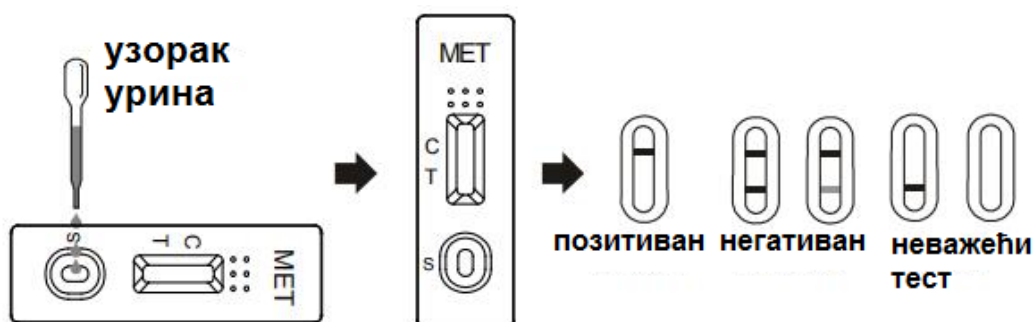
Тест на трудноћу даје позитиван резултат када је hCG присутан у урину. Међутим, ако жена уради тест прерано, може добити негативан резултат иако је трудна јер hCG или још увек није присутан или је његова концентрација сувише ниска да би се детектовала. Рано утврђивање трудноће има многе важне предности, а кућни тестови у данашње време су довољно осетљиви да дају резултате 5 или 6 дана пре изостанка очекиване менструације.

1.2. Тест на психоактивне супстанце

С обзиром на све већу конзумацију недозвољених супстанци, анализа урина на присуство психоактивних супстанци применом имунохроматографских тестова је нашла широку примену у многим областима као што су антидопинг контрола у спорту, злоупотреба дрога, праћење рехабилитације, родитељска контрола, форензички и клинички токсиколошки скрининг. Такође, ови тестови су посебно корисни на радном месту за проверу пре запошљавања или насумично тестирање на радном месту ради утврђивања злоупотребе дрога. Имунохемијски тестови на психоактивне супстанце су брзи, неинвазивни, јефтине, лаки за руковање и примењује се на лицу места од стране искусног лабораторијског особља, али су такође и комерцијално доступни и обично се продају у апотекама уз одговарајуће упутство произвођача.

Кућни тестови на психоактивне супстанце се заснивају на конкуренцији између лека и коњугата лек-боја за везивање на антитела имобилисана на нитроцелулозној мембрани (погледати слику 1.4). Ако узорак урина не садржи психоактивне супстанце, коњугат лек-боја и имобилизовано антитело стварају обојену линију која указује на негативан тест. Међутим, ако урин садржи лек у концентрацији изнад границе детекције теста, лек инхибира коњугат лек-боја да се веже за антитело, а резултат је позитиван (на

траци се не појављује боја у пределу тест линије). Контролна линија мора бити обојена и у случају позитивног и у случају негативног теста, у супротном тест је неважећи (слика 1.8).



Слика 1.8. Изглед и приказ резултата имунохемијског теста на метамфетамин

Тренутно комерцијално доступни имунохроматографски тестови могу да открију присуство у урину најчешће доступних психоактивних супстанци на црном тржишту, као и њихових метаболита. Неке од ових супстанци су: THC - марихуана, MOR - хероин, AMP - амфетамин, COC - кокаин, MDMA - екстази, BZO - бензодиазепин, MET - метамфетамин, BAR - барбитурати, OPI - опијати (хероин, морфин, кодеин), MTD - метадон... Тестови су доступни у облику тест трака, плочица или панела који омогућавају детекцију једне или више психоактивних супстанци истовремено (слика 1.9).



Слика 1.9. Облици кућних тестова на психоактивне супстанце

Недостатак имунохемијских тестова на психоактивне супстанце је релативно ниска специфичност због могућности интеракције антитела са молекулима сличне структуре, што доводи до лажно позитивних резултата или лажно негативних резултата када се у урин намерно додају одређене супстанце. Стога се ови тестови могу користити само за скрининг присуства психоактивних супстанци у урину. Сваки позитиван имунолошки тест сматра се „претпостављено позитивним“ све док се његова веродостојност не потврди специфичнијом техником попут гасне хроматографије у комбинацији са масеном спектрометријском детекцијом (GC/MS).

Задатак вежбе

Упознати се са принципом рада теста на трудноћу и теста на психоактивне супстанце, као и њиховом практичном примени.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Хемикалије и прибор

- Узорак урина,
- Тест на трудноћу,
- Тест на психоактивне супстанце.

Поступак

Извести тест на трудноћу и тест на психоактивне супстанце према упутству произвођача и забележити запажања.

Резултат и запажања

Питања

1. Присуство ког хормона, маркера трудноће, се утврђује у узорку урина применом кућних тестова на трудноћу?
2. По принципу које технике функционишу тестови на трудноћу и тестови на психоактивне супстанце?
3. Објаснити како се тумаче резултати теста на трудноћу и теста на психоактивне супстанце (позитиван, негативан и неважећи резултат).

Датум:	Овера асистента:
---------------	-------------------------

Вежба 2. Одређивање глукозе у крви

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

Прецизно мерење глукозе је кључно за дијагнозу и лечење пацијената са дијабетесом. У ту сврху, глукоза се може мерити у неколико телесних течности, односно у урину, крви и интерстицијској течности. У клиничкој пракси, контрола гликемије се најчешће утврђује мерењем глукозе у крви, које се може обавити или у узорку венске плазме (или серума) или капиларном узорку пуне крви. Хипергликемија се одражава концентрацијом глукозе у крви која је већа од нормалног опсега који износи 3,9–6,2 mmol/L (на празан стомак) или 3,9–7,8 mmol/L (2 h после јела). Мерење глукозе у крви је важно и за многе друге аспекте управљања дијабетесом, као што су утврђивање ефекта дијете и начина живота, процена ефикасности фармакотерапије и превенција хипогликемије.

Постоји низ различитих термина којима се објашњавају основни процеси угљенохидратног механизма. Гликогенеза се односи на конверзију глукозе у гликоген. Гликогенолиза подразумева разградњу гликогена у глукозу и друге интермедијерне продукте. Стварање глукозе из других неугљенохидратних прекурсора, као што су аминокиселине, глицерол и лактат, означава се као глуконеогенеза. Претварање глукозе и других хексоза у лактат или пируват представља гликолизу. Оксидација глукозе до CO_2 и воде обавља се такође и у хексозо-монофосфатном шанту. Укупан допринос свих фактора који утичу на наведене процесе одређује концентрацију глукозе у крви. Концентрација глукозе у крви нормално се одржава у узаном опсегу, упркос узимању или неузимању хране. То се постиже координисаним деловањем инсулина, који снижава ниво глукозе у крви с једне стране и више контрарегулаторних хормона (глукагон, кортизол, адреналин и хормон раста) који повећавају ниво глукозе са друге стране.

Постоје три основна приступа/методе за мерење глукозе у крви:

1. **Редукционе методе.** Заснивају се на редукционим својствима глукозе да промени јонизовано стање метала. Један од главних недостатака ових метода је неспецифичност на глукозу; присуство било ког јаког редукционог агенса може довести до лажно повишених резултата.
2. **Метода кондензације (Орто-толуидин метода).** Ова метода се заснива на принципу кондензације алдехидне групе глукозе са ароматичним једињењем. Алдехидна група глукозе подлеже кондензацији са орто-толуидином у киселој средини при чему настаје комплекс зелене боје који се може мерити колориметром. Интензитет боје је директно пропорционалан концентрацији глукозе. Основни недостаци методе су неспецифичност, јер маноза и галактоза могу такође учествовати у реакцији и дати обојени производ, а са друге стране реагенс орто-толуидин је корозиван, токсичан и канцероген.

3. **Ензимске методе.** Ово су најновије и најчешће коришћене методе за мерење глукозе у крви, како у лабораторији, тако и у кућним условима са посебно дизајнираним мерачима. Заснивају се на реакцији глукозе са ензимом, што доводи до стварања једињења, које се заузврат мери. Ензимске методе подразумевају примену једног од три ензима: хексокиназе, глукозо-оксидазе или глукозо-дехидрогеназе. Глукозо-оксидаза катализује оксидацију глукозе до глюконске киселине и водоник-пероксида (H_2O_2), тако да се методе у којима се примењује овај ензим углавном заснивају на електрохемијском мерењу потрошње кисеоника или на мерењу концентрације насталог H_2O_2 . Глукозо-дехидрогеназа катализује оксидацију глукозе у глуконолактон, при чему се количина насталог NADH одређује мерењем апсорбације на 340 nm и директно је пропорционална концентрацији глукозе у узорку.

Када се крв након узимања остави да коагулише, без центрифугирања на собној температури, просечно смањење садржаја глукозе у серуму је око 5-7% на сат. Ово смањење је последица гликолизе. У случају леукоцитозе или бактеријске контаминације, стопа гликолизе може бити још већа. Због тога је важно одвојити ћелије од плазме помоћу центрифугирања и анализирати узорак плазме што је могуће раније, најбоље у току првог сата од узорковања крви. Међутим, то је у већини случајева тешко и непрактично. Стога, да би се добила тачна мерења, примењују се различите мере за инхибицију гликолизе. Додавање натријум флуорида узорку крви стабилизује концентрацију глукозе до око три дана на собној температури. Такође, додавање антикоагуланаса попут EDTA или закишељавање узорка крви додатком цитратног пуфера доприносе инхибицији гликолизе. Концентрација глукозе у центрифугираном, нехемолизованом стерилном серуму је генерално стабилна 8 h на 25 °C и 72 h на 4 °C.

За свакидашњи мониторинг глукозе у крви постоје тест траке за брзо, једноставно и довољно поуздано мерење у једној капи пуне крви. Мала површина тест траке је импрегнисана комбинованим реагенсима, пре свега за селективну (биосензор) и бојену реакцију на глукозу. Развијена боја на тест траци може да се квантификује на скалама посебно дизајнираним за такве траке. Мерачи (калибрисани) могу да се користе за дигитално читавање траке са узорком. Уколико се мерење глукозе заснива на електрохемијском принципу, свака трака садржи одштапану радну и референтну электроду, с тим да је радна електрода обложена потребним реагенсима (тј. ензимом, медијатором, стабилизатором, површински активним супстанцама, итд.) и мембранама.

На нашем тржишту постоји велики број мерача/апарата за мерење глукозе у крви. Примера ради, *Accu-Chek Active* (слика 2.1) апарат за мерење глукозе ради на фотометријском принципу при чему је на тест траци импрегнисан ензим глукозо-дехидрогеназа, док је на тест траци *GlucoSure* апарата импрегнисан ензим глукозо-оксидаза. У контакту са узорком пуне крви, ензим подлеже ензиматској хемијској реакцији, при чему се добијени сигнал конвертује у детектабилну форму а резултат се

приказује на дисплеју апарата. *Accu-Chek Active* апарат омогућава мерење глукозе у концентрационом опсегу: 10 mg/dL – 600 mg/dL, односно 0,6 mmol/L – 33,3 mmol/L.



Слика 2.1. *Accu-Chek Active* апарат за мерење глукозе

Задатак вежбе

Упознати се са принципом рада апарата за мерење глукозе у крви, као и његовом практичном применом.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

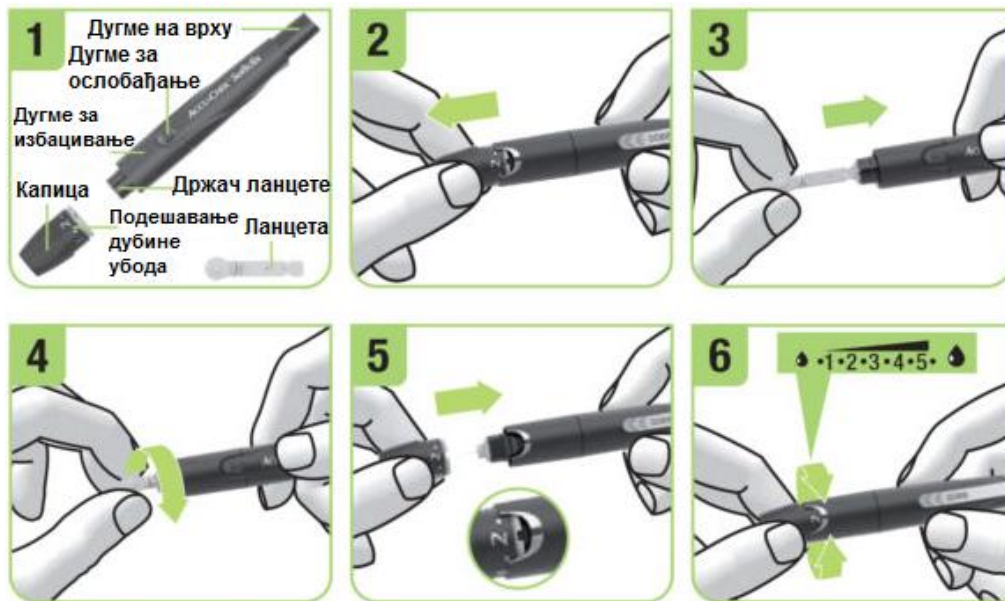
Прибор

- Апарат за мерење глукозе,
- Ланцетар,
- Ланцета,
- Тест трака.

Поступак

Применом кућног апарата и одговарајуће тест траке одредити концентрацију глукозе у крви из једне капи свеже узорковане крви према упутству произвођача. Пре узимања узорка крви помоћу ланцетара, потребно је адекватно припремити ланцетар. Кораци у припреми ланцетара приказани на слици 2.2. на примеру *Accu-Chek Active* апарата су следећи:

1. Упознати се са деловима ланцетара.
2. Скинути капицу са ланцетара.
3. Поставити нову ланцету у држач ланцета. Ланцета се мора чујно уклопити.
4. Скинути заштитну капицу са ланцете.
5. Вратити капицу на ланцетар. Капица се мора чујно уклопити.
6. Окретати капицу све док се не подеси жељена дубина убода. Започети са мањом дужином убода, нпр. 2.



Слика 2.2. Припрема ланцетара

Пре употребе апарата за мерење глукозе, проверити:

- *Рок употребе на кутији тест трака.* Не користити тест траке којима је истекао рок употребе.
- *Идентификациони код.* Након уметања тест траке у апарат, неопходно је да број кода на кутији за тест траке буде исти као број кода који се појављује на екрану апарата.

Поступак мерења глукозе у крви применом *Accu-Chek Active* апарата је приказан на слици 2.3 и чине га следећи кораци:

1. Опрати руке топлом водом и сапуном, и добро их осушити пре узимања узорка крви.
2. Извадити тест траку из кутије. Одмах добро затворити кутију са тест тракама.
3. Тест траку без савијања ставити у водич тест траке у смеру који показује стрелица. Проверити да ли кодни број на екрану одговара кодном броју који се налази на налепници кутије са тест тракама.
4. Дугме на врху ланцетара притиснути до краја. Ланцетар је спреман за коришћење када је средина дугмета за ослобађање ланцете жуте боје.
5. Прислонити ланцетар чврсто на жељено место убода са бочне стране јагодице прста. Притиснути дугме за ослобађање ланцете.
6. Када се на екрану појави трепћући симбол капи, нанети кап крви на средину зеленог поља на тест траци.
7. Трепћући симбол пешчаног сата показује да је мерење у току.
8. Након отприлике 5 секунди, на екрану се појављује резултат мерења и апарат се оглашава звучним сигналом.



Слика 2.3. Поступак мерења глукозе у крви помоћу *Accu-Chek Active* апарата

Провера добијених резултата мерења: од 30 до 60 с након наношења узорка крви на тест траку, поређењем боје на полеђини тест траке са скалом боја на посуди за *Accu-Chek Active* траке може се одредити приближна вредност глукозе у крви, као што је приказано на слици 2.4.



Слика 2.4. Поређење боје на тест траци са скалом боја на посуди за *Accu-Chek Active* траке

Резултат и запажања

Питања

1. Који је нормални опсег концентрације глукозе у крви?

2. Набројати три основна приступа за мерење глукозе у крви.

3. Која се три ензима најчешће примењују у случају ензимских метода за мерење глукозе у крви?

4. Које су основне компоненте тест траке за свакидашњи мониторинг глукозе у крви?

5. Пре употребе апарата за мерење глукозе о чему се посебно мора водити рачуна?

<i>Датум:</i>	<i>Овера асистента:</i>
---------------	-------------------------

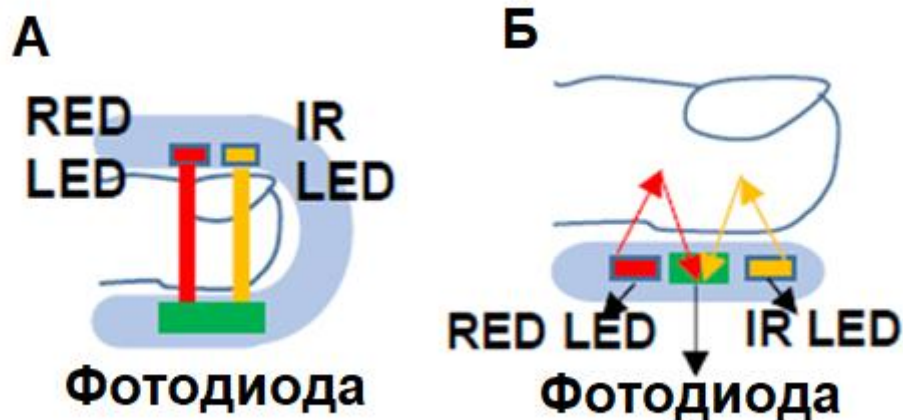
Вежба 3. Пулсна оксиметрија/мерење кисеоника пулсним оксиметром

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

Респираторни систем има улогу у размени кисеоника између амбијенталне околине и крви у организму. У циљу личне здравствене заштите, повећана је потреба за употребом различитих типова уређаја за праћење виталних знакова у организму, као што је засићеност крви кисеоником. Стога су развијени уређаји који се заснивају на погодним сензорима, међу којима је пулсни оксиметар. Све док пулсни оксиметар није развијен, једини начин мерења оксигенације артеријске крви пацијента био је *ex vivo* инвазином методом, што је захтевало време, стручност и скупу опрему. Развој сензорске технологије доноси бројне предности за биомедицинске примене. Пулсни оксиметар је сензор који детектује кисеоник и користи се у сврху брзог и једноставног неинвазивног мерења броја откуцаја срца и засићености кисеоником (S_pO_2). Измерени сигнал за број откуцаја срца се добија детекцијом промена у запремини крви, док се мерењем S_pO_2 детектује концентрација хемоглобина у црвеним крвним ћелијама. Сензорски део пулсног оксиметра се може поставити на прсте, руке, ноге, подручје носа или ушне шкољке.

Када је кисеоник везан за хем групу, хемоглобин се назива оксихемоглобин (O_2Hb), који транспортује кисеоник кроз артеријски крвоток до ткива. Деокихемоглобин (Hb) је хемоглобин без везаног кисеоника, са нетакнутим хем групама доступним за везивање кисеоника. Мерење пулсним оксиметром се заснива на принципу да O_2Hb и Hb различито апсорбују црвену и блиску инфрацрвену (IR) светлост. O_2Hb апсорбује већу количину IR светлости, а мање количине црвене светлости од Hb . У складу са тим, добро оксидована крв са вишим концентрацијама O_2Hb изгледа јарко црвено за око и распршује више црвену боју од Hb . Са друге стране, Hb апсорбује више црвене светлости и самим тим је визуелно мање црвене боје, односно тамније је боје у односу на O_2Hb . Имајући у виду ову разлику у апсорпцији црвене светлости између O_2Hb и Hb , диоде у пулсном оксиметру емитују светлост на две таласне дужине, црвену на 660 nm и блиску IR на 940 nm. С обзиром да боја крви са кисеоником и крви без кисеоника утиче на апсорпцију светлости, у циљу мерења процента S_pO_2 , пулсни оксиметар израчунава разлику између апсорбоване количине црвене и IR светлости.

Детаљније разматрање генерисања сигнала применом пулсног оксиметра укључује принцип фотоплетизмограма (PPG). Пулсни оксиметар мери однос интензитета блиске IR и црвене (RED) светлости да би одредио проценат S_pO_2 . У склопу комерцијално доступног пулсног оксиметра налазе се диоде које емитују RED и IR зрачење, а постоје два типа дизајна: рефлективни режим и трансмисиони режим, као што је приказано на слици 3.1, која илуструје разлике између ове две методе.



Слика 3.1. Добијање PPG сигнала код пулсног оксиметра: (А) трансмисиони режим; (Б) рефлективни режим

Код трансмисионог режима, извор светлости и детектор су постављени на супротним странама, као што је приказано на слици 3.1А. Приликом мерења, светлост са RED и IR LED диода пролази кроз прст, долази на фотодиоду са друге стране и мери се промена трансмитоване светлости. Рефлективни режим, који је илустрован на слици 3.1Б, користи рефлексију светлости уместо трансилуминације ткива. Извор светлости и детектор су постављени један поред другог, где фотодиодни детектор добија рефлектовану светлост са људске коже. Рефлективни режим има неколико предности у односу на трансмисиони, а може се применити на различите делове тела, не само на врховима прстију или танки део уха.

Приликом разматрања ограничења пулсне оксиметрије, треба имати на уму различите факторе који могу да дају нетачне резултате. С обзиром да калибрација инструмента није потребна, чак и у случају оптимизованих мерења може да дође до грешке у очитаној вредности SpO_2 . Као један од узрока привидно нормалног или повишеног SpO_2 може бити тровање угљен-моноксидом, док узроци очитане ниже вредности SpO_2 могу бити: венске пулсације, прекомерно кретање, наследни облици абнормалног хемоглобина, тешке анемије и стање хипотермије. Такође, лак за нокте на прсту може утицати на смањење вредности SpO_2 , посебно црна, плава и зелена боја, које могу да смање очитану вредност SpO_2 до 10%. Међутим, доказано је да применом новијих модела пулсних оксиметара лак за нокте има мали утицај, док су лакови за нокте црне и браон боје показали смањење очитаног SpO_2 у вредности до 2%. Пушачи често имају привидно више резултате очитавања након пушења цигарете, јер дим цигарете садржи угљен-моноксид. Кретање током мерења може ометати детекцију и тумачење резултата, јер доводи до појаве нестабилног сигнала.

Напредак у технологији емитовања светлости од стране диода и фотоелектричних сензора довели су до побољшања тачности и поузданости пулсне оксиметрије. Имајући у виду мале димензије, лако коришћење и економску приступачност, пулсни оксиметар има широку примену у многим областима медицине. Стога је важно знати како се

тумаче информације добијене оксиметром. У зависности од произвођача, постоје пулсни оксиметри различитог дизајна који приказују измерене вредности SpO_2 и броја откуцаја срца (енгл. *beats per minute*, bpm) (слика 3.2).



Слика 3.2. Пулсни оксиметар

Нормална вредност броја откуцаја срца у стању мировања организма је од 60 до 100 откуцаја/мин, док је SpO_2 од 95% до 99%. Стање хипоксије се дијагностикује када ниво SpO_2 пада испод 90%. Очитавања од 90% или мање указују да је пацијенту потребна терапија кисеоником, али се у овом случају саветује потврда стања хипоксије инвазивним методама, јер пулсни оксиметри мере zasiћеност хемоглобина кисеоником у артеријској крви, а не стварни садржај кисеоника у крви. Такође, треба имати на уму да измерене вредности SpO_2 испод 70% нису поуздане. Саветује се додатна опрезност при анализи добијених информација као што је нагла промена измерене вредности SpO_2 . На пример, нагли пад вредности измерене SpO_2 са 97% до 85% је физиолошки немогуће. Стога, потребно је пажљиво проценити добијене информације с обзиром на претходно наведена ограничења пулног оксиметра.

Последње, али не мање важна чињеница је да значајним технолошким напретком долази до појаве паметних мобилних телефона са одговарајућим апликацијама повезаних са пулсним оксиметром. Постоје два типа дизајна сензора за мерење, при чему се један заснива на екстерном повезивању пулног оксиметра на мобилни телефон, а други на директном мерењу броја откуцаја срца и SpO_2 постављањем прста на камеру мобилног телефона. Неке од студија су показале да је екстерни начин мерења SpO_2 поузданији од оног заснованог на примени камере мобилног телефона. У овом тренутку, технологија паметних мобилних телефона са посебно дизајнираним апликацијама за мерење пулсним оксиметром се не препоручују за примену у медицинске сврхе, јер је потребно побољшање тачности и поузданости мерења.

Задатак вежбе

Упознати се са принципом рада и практичном применом пулног оксиметра.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО**Хемикалије и прибор**

- Пулсни оксиметар;
- Алкохол за чишћење сензорског дела пулног оксиметра;
- Ацетон за скидање лака за нокте (по потреби).

Поступак

Приликом примене пулног оксиметра, потребно је следити следеће кораке:

- Одморити пар минута пре мерења и угрејати руке.
- Уколико су на прстима, потребно је уклонити накит или лак за нокте.
- Поставити сензор пулног оксиметра на одабрани прст, са препоруком на кажипрст, тако да сензорски део није у превеликој или премалој мери притиснуо прст.
- Укључити пулсни оксиметар притиском на одговарајуће дугме.
- Држати пулсни оксиметар на прсту док се на екрану не појави резултат мерења који је стабилан око 5 секунди.
- Након читавања резултата мерења, уклонити прст са сензорског дела и искључити пулсни оксиметар притиском на одговарајуће дугме.
- Поступак мерења поновити више пута ради сигурности и валидности читаних резултата.
- Ако је измерена вредност SpO_2 неочекивана или ниска (<90%), одмах обавестити лекара и покушати потврдити добијени резултат мерења.
- Сензорски део пулног оксиметра очистити између сваке следеће употребе препорученим средством према упутству произвођача, како не би дошло до оштећења сензора. Чишћење може бити спроведено благим сапуном и водом, док је код неких уређаја дозвољено чишћење изопропил алкохолом.

Резултат и запажања

Питања

1. Које параметре мери пулсни оксиметар?
2. Која два типа режима постоје приликом генерисања сигнала у пулсном оксиметру?
3. Које су нормалне вредности измерених параметара применом пулног оксиметра?

4. Навести факторе који могу да утичу на тачност резултата пулсне оксиметрије.

5. Да ли је поуздана примена пулног оксиметра повезаног са мобилним телефоном у медицинске сврхе и зашто?

<i>Датум:</i>	<i>Овера асистента:</i>
---------------	-------------------------

Вежба 4. Алкотест - анализа етанола у даху

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

У 19. веку откривено је да се конзумирани алкохол (етанол) елиминише из тела кроз издахнути ваздух (дах). Развијени су и верификовани различити поступци мерења концентрације алкохола у крви/даху за контролисање особа које управљају моторним возилима. Мерење концентрације алкохола у даху је једноставнији начин анализе у поређењу са одређивањем из узорка крви, јер је омогућено тестирање на лицу места и није неопходно рачунати стопу елиминације алкохола из крви од момента узимања до анализе узорка.

Први инструмент, *Drunkometer* (слика 4.1), развио је Харгер на Универзитету у Индијани 1938. године. Садржај алкохола је био мерен на основу реакције оксидације са калијум-перманганатом. Потом и уређај *Alcometer*, омогућавао је мерења алкохола у даху оксидацијом са јод-пентоксидом. Крајем 1960-их година уведени су анализатори даха засновани на гасно-хроматографској анализи. Почетком 1970-их година уведена је и мерна техника заснована на апсорпцији инфрацрвеног зрачења.



Слика 4.1. Изглед *Drunkometer*-а

Новији уређаји који се користе за доказивања присуства алкохола у даху примењују горивну или инфрацрвену ћелију. Приликом примене инфрацрвене ћелије, инфрацрвено зрачење се усмерава на узорак и детектује се интензитет пропуштеног зрачења. С обзиром да етанол апсорбује инфрацрвено зрачење, при вишим концентрацијама очекује се и апсорпција инфрацрвеног зрачења у већој мери.

У циљу омогућавања теренских испитивања присуства алкохола у даху, развијени су преносиви уређаји као што је *Dräger* преносиви систем (слика 4.2), који је заснован на горивној ћелији са два одвојена раствора повезана металним електродама. У присуству алкохола се мења концентрација ОН⁻ јона, а тиме и разлика потенцијала у горивној ћелији. Измерена разлика потенцијала је једнака концентрацији алкохола у даху.

Предност примене горивних ћелија за анализу алкохола су осетљивост, стабилне перформансе и смањена селективност на интерференције, као што су ацетон, бензен или угљен-моноксид. Међутим, постоји могућност да је сензор поред етанола, осетљив на метанол или изопропанол. У случају да интерференције не омогућавају поуздано одређивање етанола у даху, потребно је резултате потврдити тестом крви.



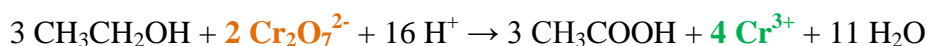
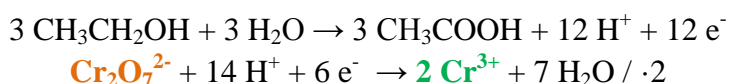
Слика 4.2. Dräger преносиви уређаји

Неки типови преносивих уређаја раде на следећем принципу: у присуству катализатора, кисеоник у узорку даха доводи до оксидације алкохола у сирћетну киселину, а потом у угљен-диоксид и воду. Након оксидације, горивне ћелије претварају ослобођену хемијску енергију у електрични потенцијал, при чему се генерише електрична струја, која се потом мери. Већа разлика потенцијала указује на већу концентрацију алкохола присутну у узорку.

Средња вредност елиминације алкохола из даха износи 0,082 mg/L по сату, док је елиминација алкохола из крви 0,169 mg/L по сату. Дозвољене границе законом прописане износе приближно 0,2 g/L (или промила) алкохола у крви. Могуће је извршити претварање измерене вредности алкохола у даху у алкохол у крви уз примену одговарајућег фактора конверзије.

Сходно важећем закону, није дозвољено управљање моторним возилима особама са присуством алкохола у крви ван прописане границе.

Саобраћајни полицајци су раније контролисали возаче помоћу „Алкотеста“, стаклене цевчице напуњене реагенсом, у коју је возач дувао док није напунио гумени балон. На основу промене наранцастоцрвене боје садржаја контролне цевчице у зелену боју, могао се одредити удео алкохола у крви. Тест се заснива на редокс-реакцији у којој се алкохол (етанол), оксидује калијум-дихроматом у јако киселој средини:



У овој реакцији се јони $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ редукују у јоне Cr^{3+} и како су ови јони зелене боје, у току реакције ће доћи до промене наранџастоцрвене боје дихромата у зелену боју. На овом принципу се заснивају неки алкотестови за једнократну употребу (слика 4.3).



Слика 4.3. Алкотест за једнократну употребу

Задатак вежбе

Упознати се са принципом рада алкотеста. Припремити цевчицу алкотеста и донети закључак о промени боје до које долази у присуству етанола.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Хемикалије и прибор

- Стаклена цевчица дужине око 10 cm и пречника око 6 mm,
- Гумена цевчица,
- Стаклена вуна,
- Силикагел,
- 2 капалице,
- Концентрирана сумпорна киселина,
- Етанол,
- Гумени балон (није обавезан).

Поступак

Око 1 до 2 g силикагела уситнити у авану до величине макових зрна. По могућности уклонити крупније комадиће и најситнију праšину просејавањем кроз одговарајућа сита. У 10 ml воде растворити 1 g калијум-дихромата и том раствору пажљиво додати, кап по кап, 10 ml концентроване сумпорне киселине. Добијеним раствором наквасити зрнца силикагела, и то онолико колико силикагел може упити раствора. У стаклену цевчицу, на око 3 cm од једног краја, ставити мекани чеп од мало стаклене вуне. Насути у цевчицу силикагел, навлажен раствором калијум-дихромата, док се не добије слој дужине око 3 cm. Направити још један мекани чеп од стаклене вуне и гурнути га

до слоја силикагела. На тај начин је припремљен „Алкотест“, који се мора одмах употребити. Ако се цевчице алкотеста намеравају дуже чувати, цевчицу треба зачепити са обе стране како сумпорна киселина не би апсорбовала веће количине влаге. Да бисмо проверили како ради „Алкотест“, треба узети гумену цевчицу дужине 30 до 40 cm, која се може навући на цевчицу алкотеста. У један крај гумене цевчице капнути кап етанола и тај крај навући на цевчицу алкотеста. На други крај цевчице алкотеста причврстити гумени балон. Замолити некога да надува балон кроз гумену цев и цевчицу алкотеста. Садржај цевчице ће позеленети, због доспећа етанола у цевчицу (слика 4.4).



Слика 4.4. Изглед „Алкотеста“ пре и након доспећа етанола у цевчицу

При изради цевчице алкотеста пазити да се не стављају чепови од сувише стаклене вуне, да силикагел не буде мокар и да садржај цевчице не буде сувише набијен, како не би био отежан пролаз ваздуха кроз цевчицу. Према томе, израда цевчице захтева пажљив рад и неколико претходних проба како би „Алкотест“ био поуздан.

Резултат и запажања

Питања

1. Које су основне предности мерења концентрације алкохола у даху?
2. Описати принцип рада *Dräger* преносивих уређаја.
3. Која је законом дозвољена граница алкохола у крви за особе које управљају моторним возилима?
4. На којој редокс реакцији се заснива „*Алкотест*“ припремљен у овој вежби?

Датум:	Овера асистента:
---------------	-------------------------

Вежба 5. Квалитативна анализа камена жучи / мокраћних путева**ТЕОРИЈСКИ ДЕО**

Средина као што је организам строго је контролисана у смислу температуре, рН вредности и концентрације материја растворених у течностима. Организам се за одржавање унутрашње равнотеже служи органима за излучивање. Све материје и продукти метаболизма се углавном избацују путем бубрега. Продукти метаболизма као што су карбамид (уреа), креатинин, мокраћна киселина (урати), могу изазвати поремећаје у организму, ако се њихова концентрација повећа.

Кристализације тј. литијаза може настати у органима где долази до задржавања течности у организму и није специфична само за човека. Стога локализација камена може бити различита: дуж мокраћног система, у гениталним органима, зглобовима, жучној кеси и пљувачним жлездама. Најчешће се камен налази у мокраћном систему. Фактори који утичу на стварање камена су сложени, многобројни а неки и недовољно разјашњени. Урађен је велик број студија, али ниједна са великом прецизношћу није могла да објасни утицај ових фактора. Према хемијском саставу, камење мокраћног система може се поделити на неорганско и органско. Познавајући детаљни састав камена могуће је начинити поделу у зависности од компоненте чији је садржај највећи у узорку. Врсте камена које се најчешће јављају у мокраћном систему су: оксалатни, уратни, фосфатни, цистински, карбонатни и ксантински.

У метаболизму хранљивих материја посебно место заузима промет масти због велике енергије која се ослобађа у току хемијских промена. Јетра као централни орган може се назвати лабораторијом организма. Функција јетре је слична функцији бубрега тј. има регулаторну и метаболичку улогу. У јетри се синтетизују протеини плазме, фактори коагулације, липопротеини и примарне жучне киселине. Свакодневно се ствара жучни секрет који има важну улогу у метаболизму масти. Жучни секрет се путем система каналића скупља у централну кесицу одакле се избацује у дигестивни систем, где показује своју праву функцију. Жучне киселине се у већој мери апсорбују у неким деловима дигестивног тракта и крвотоком поново доспевају у јетру. Јетра је прилагођена да врши реапсорпцију воде и електролита из жучног секрета при чему се добија десет пута концентрованија жуч. Жуч је сложен раствор састављен из воде и у њој растворених неорганских и органских материја. Неоргански састојци су углавном електролити (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-). Од органских једињења најчешће се могу наћи билирубин, жучне соли, фосфолипиди и холестерол. Како је холестерол нерастворљив у води, његово одржавање у раствору је постигнуто присуством жучних киселина, при чему се жучне киселине и холестерол налазе у приближном односу 10:1. Када се у јетри ствара више холестерола или се он мање конвертује у друга једињења (жучне киселине, хормоне), тада је могућа кристализација унутар жучне кесе. Жучни камен може да изазове озбиљне проблеме, ако дође до застоја или нерегулисаног истицања жучи у дигестивни тракт.

Постоје различите врсте жучног камена. Пигментно камење је углавном састављено из билирубина, жучних киселина и примеса калцијума. Холестеролско камење је знатно чешће из разлога веће концентрације у жучи. Камен има облик дудовог плода, бели су или благо жути, а на пресеку се уочава кристална структура. У пракси се најчешће среће камење мешовитог састава. Најчешће имају језгро од холестерола а омотач од других састојака жучи. Обично се среће по неколико у жучној кеси. На површини су тамно смеђи са благим неравнинама и облика су јајета. Имају тврду кору и мекано језгро. Изглед жучног камена је приказан на слици 5.1. Жучни камен се веома тешко може детектовати рендгеном, што је последица ниског садржаја калцијума. По томе се већина камења из жучне кесе разликује од камења из мокраћног система.



Слика 5.1. Спољашњи изглед и попречни пресек камена из жучи

Нативним прегледом камена мокраћног система и камена из жучи уочава се изглед, облик и боја, што у неким случајевима литијазе може бити довољно за одређивање пута истраживања и одређивање састава камена. Сваки узорак се фотографише, детаљно опише, назначи се број камена, као и начин добијања узорка. Ако постоји могућност, узорак се на погодан начин преполови и тако посматра. После нативног прегледа, све методе испитивања се могу поделити на класичне квалитативне и квантитативне хемијске и на погодне физичке методе.

Структура и хемијски састав камена показују живот камена од нуклеације па све до изласка на сунчеву светлост. Данас се тежи да се помоћу лекова и других начина терапије камен избаци из унутрашњости организма човека, без већих проблема по болесника, а то се најлакше постиже када се зна састав и структура камена. Тако су некад важни подаци о величини и тврдоћи камена данас допуњени са хемијским саставом и структуром, како би се терапијом добио максимум и спречио настанак новог камена.

Анализу камена отежавају најчешће две ствари. Као што је поменуто, камен је смеша тешко растворљивих материја. Растварањем камена, једињења се распадају на јоне и нестају разлике у молекулу нпр. калцијум-оксалат-монохидрата и калцијум-оксалат-дихидрата. Класичним хемијским методама је скоро немогуће одредити која

компонента припада ком једињењу. Данас се углавном траже методе које не разарају узорак тј. не или врло мало нарушавају нативну структуру камена. Из тог разлога данас извесну предност имају физичке методе, у првом реду дифракција X-зрака, микрорадиографија, поларизациона и електронска микроскопија и др.

Постоји више поступака хемијског испитивања камена. Ту се подразумевају поступци код којих се компоненте камена одређују дејством неког реагенса. При одабиру хемијских реакција за анализу камена, потребно је увек имати на уму специфичност датог реагенса на испитивану компоненту. Како се на анализу веома често добија мала количина камена, потребно је развити микроаналитичке технике у одређивању састава. Разумљиво, свакој квантитативној мора претходити квалитативна хемијска анализа.

Камен из жучи се испитује на присутност холестерола, билирубина и калцијумових соли. Већина поступака се заснива на екстракцији компоненти камена помоћу одговарајућег органског растварача најчешће етра. Из добијеног екстракта изводе се реакције доказивања присутности појединих једињења.

Микроскопска хемијска анализа камена почела се развијати управо када се у лечењу уролитијаза приступило на други неоперативни начин. Овај начин испитивања састоји се од растварања и поновне кристализације компоненти камена.

Задатак вежбе

Извршити квалитативну хемијску анализу камена жучи/мокраћних путева. Посматрати попречни пресек жучног камена помоћу оптичког микроскопа.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Хемикалије и прибор

- Узорак камена жучи / мокраћних путева,
- Концентрирана HNO_3 ,
- NH_4OH ,
- NaOH ,
- $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$,
- Разблажена HCl ,
- Разблажена CH_3COOH ,
- Разблажена H_2SO_4 ,
- KMnO_4 ,
- Титан-жуто,
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$,
- $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$,
- Црвена лакмус хартија,
- Лончић за жарење,
- Епрувете,
- Капалице,

- Решо,
- Водено купатило.

Поступак

За квалитативну хемијску анализу се узима неколико милиграма спрашеног узорка камена и у лончићу жари у пламену.

Уколико се узорак састоји из органских компоненти (мокраћна киселина, урати, ксантин и цистин), у посуди за жарење не остаје пепео. Узорци који садрже неорганске материје (CaC_2O_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ и CaCO_3), као и узорци који су комбинације неорганских и органских материја остављају знатан део пепела.

За доказивање органских компоненти у порцеланској посуди се мало узорка раствори са концентрованом HNO_3 и упари скоро до сува на малом пламену. Додатком NH_4OH се јавља црвена боја уколико је присутна мокраћна киселина и њене соли (слика 5.2).

Ксантин се за разлику од мокраћне киселине доказује додавањем NaOH , при чему се такође јавља црвена боја.

Доказна реакција за цистин заснива се на доказивању сумпора из аминокиселина, а поступак се изводи са алкалним раствором $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Појава раствора црне боје или црног талог узима се за позитивну реакцију за цистин (слика 5.2).

Код узорка који остављају остатак након сагоревања узима се нова проба камена и раствара у врућој, разблаженој HCl . Епрувета са узорком се неколико минута држи у топлом воденом купатилу, како би се сав камен растворио. Уколико има нераствореног камена, тада се смеша профилира и остави да се охлади. У хладан филтрат се додаје амонијак.

Уколико се при додатку NH_4OH јавља бео талог, који се не раствара у разблаженој CH_3COOH , доказ је за CaC_2O_4 у камену.

Раздвоји се талог центрифугирањем из чега се доказује Ca^{2+} , а за идентификацију оксалатног анјона изводи се реакција обезбојавања раствора KMnO_4 у киселој средини, која је заснована на редокс реакцији перманганата и оксалне киселине.

Остали састојци камена ("неоксалатни" калцијум, магнезијум, фосфат) се доказују из филтрата, после одвајања талог CaC_2O_4 , специфичним реагенсима. Тако се Mg^{2+} доказује у реакцији са титан-жутим у алкалној средини. Реакција је позитивна, ако се појави црвено обојење или црвенкаст талог. Доказивање "неоксалатног" Ca^{2+} се може урадити из филтрата таложењем са $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. Појава белог талог указује на настали CaC_2O_4 . Доказна реакција за PO_4^{3-} заснива се на настајању фосформолибденске киселине у киселој средини. Настали производ се уочава појавом жутог талог (слика

5.2). Реакција је високо осетљива, а ометају је хлоридни јони, који се могу одстранити додатком концентроване HNO_3 , а затим упаравањем.



Мокраћна киселина



Цистин



Mg^{2+}



Ca^{2+}



PO_4^{3-}

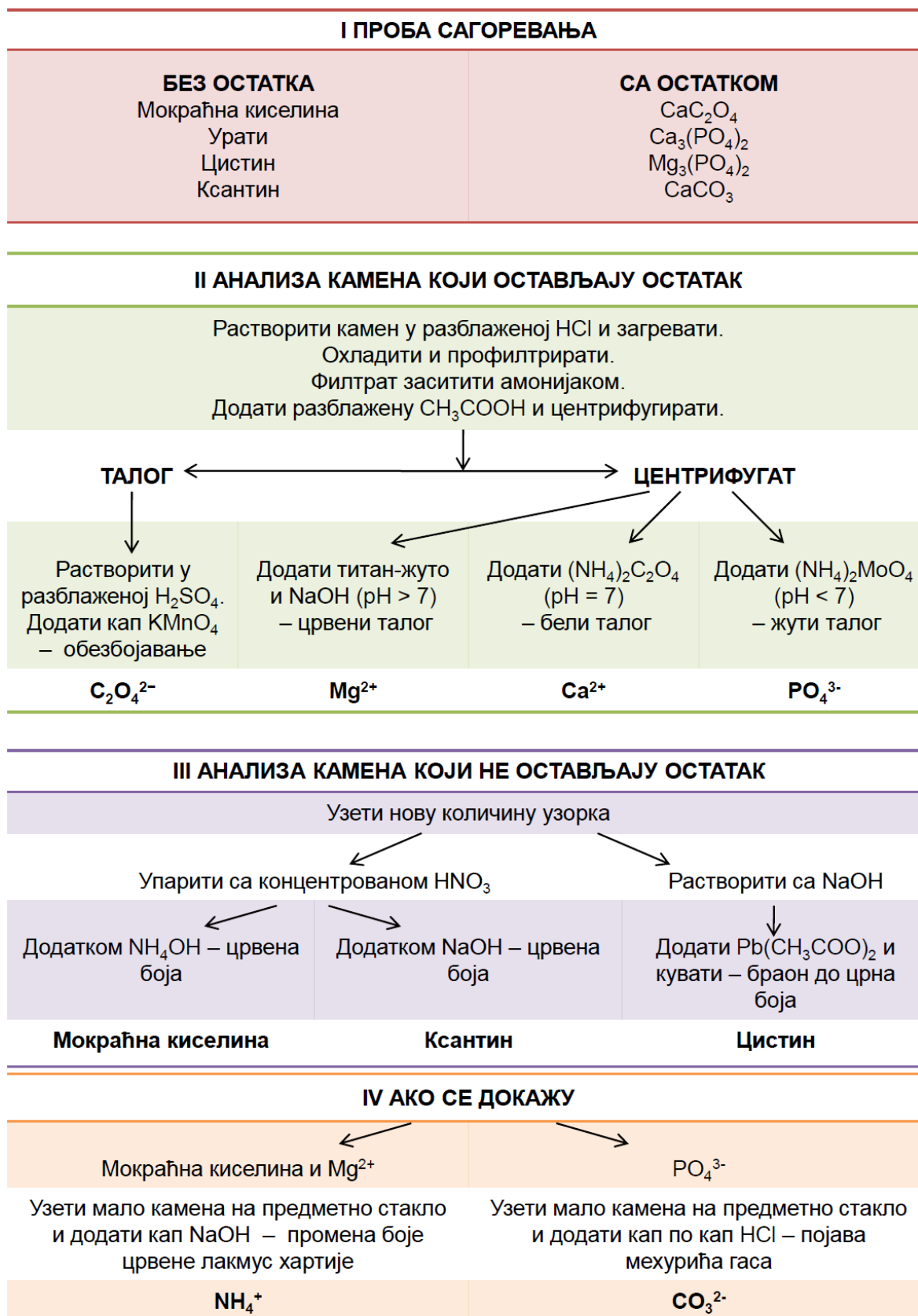
Слика 5.2. Обојења настала приликом доказивања мокраћне киселине, цистина, магнезијума, "неоксалатног" калцијума и фосфата

Анализа NH_4^+ јона се врши ако се докажу мокраћна киселина и магнезијум, и CO_3^{2-} ако се докажу PO_4^{3-} . Ако се над узорак у току додавања раствора базе постави навлажена црвена лакмус хартија, јавља се плава боја као доказ за постојање NH_4^+ , који се може наћи везан са мокраћном киселином (амонијум-урат) или у форми струвита.

CO_3^{2-} се могу доказати директно из узорка тако што се узме мало камена у чашу или епрувету и прелије са HCl . Појава мехурића доказ је за карбонате.

На слици 5.3 је приказан преглед поступака за квалитативну хемијску анализу мокраћног камена са означеним делом који се односи на анализу органских компоненти.

На крају потребно је напоменути да је хемијска квалитативна анализа камена брза и релативно једноставна. Слаба страна овог поступка је сазнање само о елементарном и јонском саставу камена из чега се тешко може донети закључак о једињењима - састојцима камена.



Слика 5.3. Преглед поступака за квалитативну хемијску анализу мокраћног камена

Резултат и запажања

Питања

1. Где се најчешће локализује камен у организму?

2. Који су могући узроци настанка камена у жучи?

3. Навести компоненте које најчешће улазе у састав камена.

4. Које су предности, а који недостаци хемијских метода анализе камена жучи/мокраћних путева?

Датум:

Овера асистента:

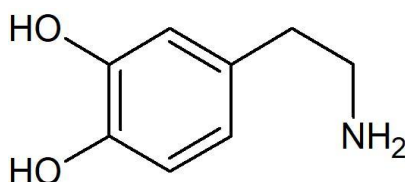
Вежба 6. Директна анодна волтаметријска анализа допамина

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

Мозак користи неуроне за пренос информација помоћу електричних импулса. Неуротрансмитери су важни хемијски преносиоци произведени од стране неурона у централном нервном систему који преносе сигнале у специфичну неуронску синапсу и имају важну улогу у многим функцијама мозга. Катехоламини су неуротрансмитери и/или хормони у централном и периферном нервном систему, који утичу на активност ћелија побуђивањем и инхибицијом. У ову групу спадају допамин, норадреналин (норепинефрин) и адреналин (епинефрин).

Допамин, главни доминантан катехоламин, као снажан неуромодулатор, утиче на перцепцију, распон пажње, покрете тела, мотивацију, циклус спавања и буђења, учење, когнитивне вештине, проток информација, и реакције на стрес. Велико одступање од нормалне концентрације допамина у људском телу може довести до различитих физиолошких поремећаја, као што су регулација сна, депресија, анксиозност, аутизам, опсесивно-компулзивни поремећај, Паркинсонова болест и шизофренија. Стога, од великог је значаја развити поуздане и тачне аналитичке методе за одређивање допамина у различитим узорцима за дијагностику ових болести.

Присуство електроактивних функционалних група у структури допамина ((3,4-дихидроксифенил)етиламин, слика 6.1) указује да је могуће извршити његово одређивање процесом оксидације или редукције применом волтаметрије као мерне технике са одговарајућим електрохемијским сензором.

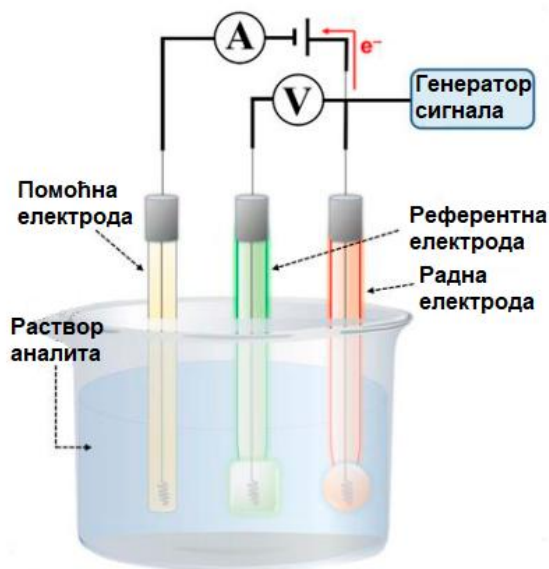


Слика 6.1. Хемијска структура допамина

Волтаметрија је електроаналитичка мерна техника код које се радној електроди задаје одговарајући потенцијал, а мери се струја као последица оксидо-редукционих процеса у волтаметријској ћелији. Као резултат анализе добија се волтамограм, који представља зависност струјног сигнала од примењеног потенцијала. Положај добијеног пика на волтамограму, односно потенцијал карактеристичан за испитивани аналит, обезбеђује квалитативне информације. Квантитативне информације о електроактивном аналиту се добијају мерењем висине односно интензитета струјног пика.

Волтаметријски систем се састоји од одговарајућих сензорских елемената, које чине радна, референтна и помоћна електрода (слика 6.2). Референтна електрода има

константан потенцијал, помоћна електрода спречава пролазак струје кроз референтну электроду, док се мери фарадејска струја која потиче од редокс реакције на радној електроди.



Слика 6.2. Шематски приказ електрохемијске ћелије за волтаметријска мерења

Пулсне волтаметријске технике су уведене ради снижавања границе детекције приликом анализе испитиваних електроактивних једињења. Волтаметрија са правоугаоним таласима је једна од најчешће примењиваних пулсних волтаметријских техника код које се однос сигнал/шум, односно фарадејска/нефарадејска струја побољшава посебним начином узорковања струје у току примене карактеристичних пулсева потенцијала. Волтаметрија са правоугаоним таласима омогућава одређивање анализата за веома кратко време трајања анализе дајући увид у електродни механизам испитиване хемијске реакције на главном сензорском елементу, а да при томе није неопходно уклањати кисеоник из система приликом мерења.

Радна електрода има најважнију улогу у волтаметријским мерењима и сходно томе је важно извршити правилан одабир, имајући у виду област потенцијала у којем може бити примењена у одговарајућим помоћном електролиту. Друге важне карактеристике радне електроде су електрична проводљивост, механичка стабилност, репродуктивност сензорске површине, цена и доступност. Велики број материјала се примењује у својству радне електроде у волтаметријским мерењима, од којих се најчешће користе угљеник, племенити метали, а раније и жива.

Најчешће коришћен електрохемијски сензор на бази угљеника је електрода од угљеничне пасте (енгл. *Carbon Paste Electrode*, CPE), првенствено због широког потенцијалског прозора, богате површинске хемије, ниске позадинске струје, хемијске инертности и ниске цене. Као хетерогени електродни материјал, CPE се састоји од чврсте електропроводне компоненте (нпр. графитни прах) и везивне течности (нпр.

парафинско уље) која не проводи струју. Основне предности ове електроде су брза и лака припрема, као и једноставно обнављање сензорске површине. Поред тога, СРЕ може бити модификована површински или запремински додатком различитих материјала као што су наноматеријали, јонске течности, електроактивни медијатори (метали, оксиди и комплекси метала, фероцени...), полимери, сурфактанти, ензими, при чему се постижу ниже границе детекције и побољшава се селективност ка циљном аналиту. Немодификоване и модификоване СРЕ су нашле примену за одређивање бројних неорганских, али и органских и биолошких једињења, као што је допамин.

Задатак вежбе

Испитати применљивост електроде од угљеничне пасте за волтаметријско одређивање допамина. Оптимизовати рН вредност помоћног електролита и дефинисати линеарну област рада електроде.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Хемикалије и раствори

- 0,1 mol L⁻¹ фосфатни пуфери рН вредности 5,80; 6,30; 7,0; 7,40; и 8,0 припремљени мешањем одговарајућих запремина 0,1 mol L⁻¹ КН₂РО₄ и 0,1 mol L⁻¹ Na₂НРО₄.
- Стандардни раствор допамина концентрације 50 µg mL⁻¹.

Инструменти и прибор

- Лабораторијски рН метар *inoLab*[®] *Multi 9620 IDS* (WTW, Немачка) и *SenTix*[®] *980 IDS* комбинована стаклена електрода (WTW, Немачка) (слика 6.3) за подешавање рН вредности пуфера.

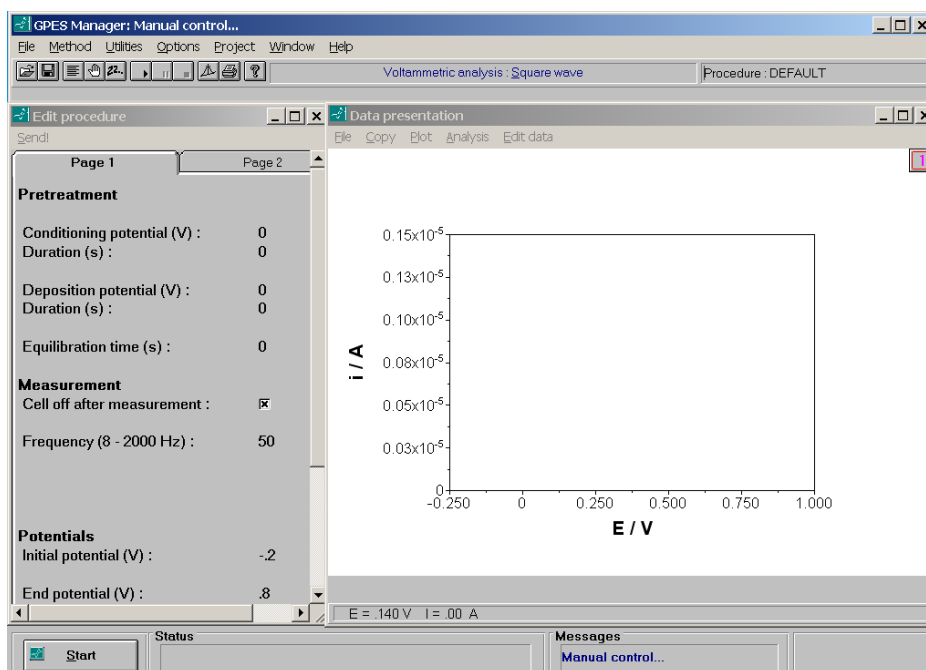


Слика 6.3. Лабораторијски рН метар са комбинованом стакленом електродом

- Волтаметријски уређај *AUTOLAB PGSTAT 12* (*Ecochemie*, Холандија) (слика 6.4) опремљен *GPES 4.9* софтвером (слика 6.5).
- Волтаметријска ћелија са троелектродним системом (слика 6.4):
 - Референтна електрода: zasiћена каломелова електрода,
 - Помоћна електрода: платинска електрода,
 - Радна електрода: немодификована СРЕ.
- Одмерни суд од 100,0 mL,
- Лабораторијске чаше,
- Пипета запремине 10,0 mL,
- Пропипета,
- Аутоматска микропипета запремине 100,0-1000,0 μL .



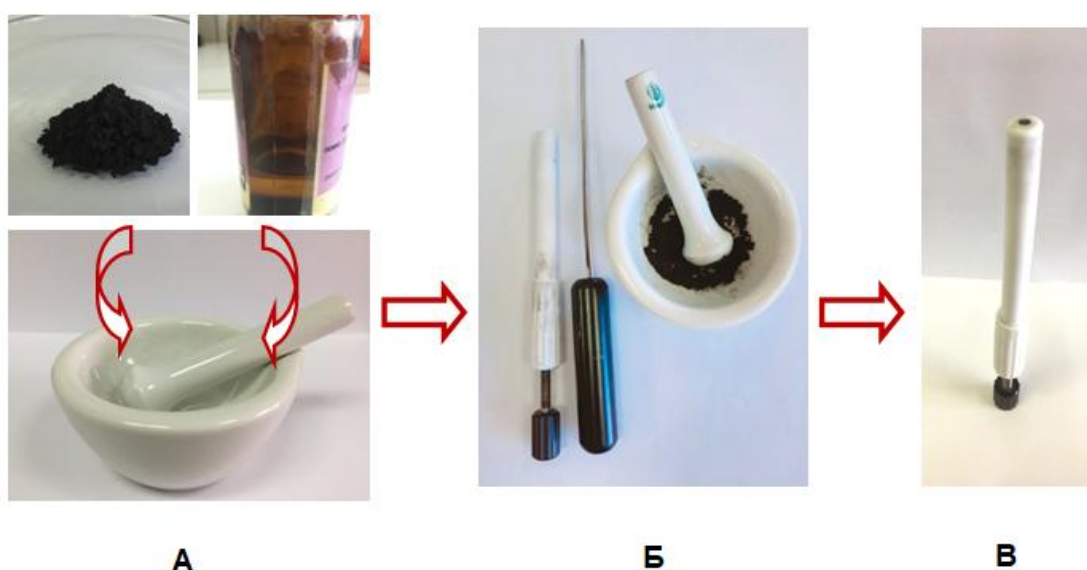
Слика 6.4. Волтаметријски уређај Autolab PGSTAT 12 са рачунаром и волтаметријском ћелијом



Слика 6.5. Изглед *GPES 4.9* софтвера

Поступак*Припрема радне електроде:*

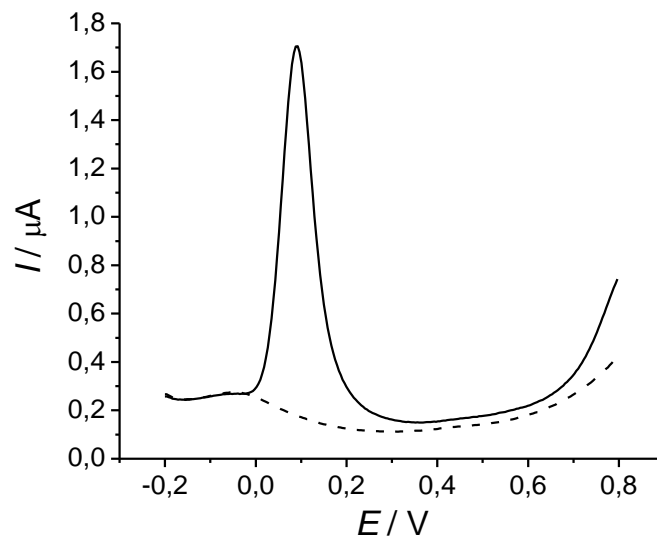
Припремити немодификовану СРЕ мешањем 0,5 g графитног праха (величина честица <math><20 \mu\text{m}</math>, *Sigma-Aldrich*) и 200,0 μL парафинског уља (*Kemika*, Хрватска) у авану помоћу тучка (слика 6.6) у току 30 min ради што боље хомогенизације компоненти. Припремљеном угљеничном пастом напунити тефлонски калуп и оставити електроду да одстоји на собној температури у току 24 h. У циљу припреме сензорске површине за мерење истиснути малу количину угљеничне пасте из тефлонског калупа, а потом обрисати површину електроде комадом чистог папира док се не добије глатка површина.



Слика 6.6. Материјали и прибор за припрему СРЕ (А, Б) и електрода спремна за употребу (В)

Волтаметријска мерења:

У волтаметријску ћелију одмерити 10,0 mL 0,1 mol L⁻¹ фосфатног пуфера одговарајуће рН вредности. Поставити волтаметријску ћелију на магнетну мешалицу и уронити троелектродни систем у пуфер. Укључити волтаметријски уређај, у *GPES 4.9* програму одабрати волтаметрију са правоугаоним таласима као мерну технику и подесити параметре мерења (опсег радног потенцијала од -0,2 до 0,8 V, фреквенција 50 Hz, потенцијалски корак 4 mV, амплитуда 25 mV). Пре сваког мерења промешати испитивани раствор у волтаметријској ћелији, потом искључити мешалицу и покренути мерење са унапред софтверски задатим параметрима. Снимити волтамограме при различитим рН вредностима пуфера у одсуству и у присуству допамина (2,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$). У меморију рачунара сачувати добијене волтамограме. Изглед волтамограма допамина при рН 8,0 је приказан на слици 6.7.



Слика 6.7. Волтамограм снимљен у одсуству допамина (испрекидана линија) и у присуству $2,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ допамина (пуна линија) при рН 8,0

Конструисати зависност интензитета оксидационог пика допамина (I_p) од рН вредности, као и зависност положаја пика (E_p) од рН вредности. На основу интензитета и облика добијених сигнала допамина, одабрати најпогоднију рН вредност. Испитати линеарну област аналитичких сигнала при оптималној рН вредности снимањем волтамограма при различитим концентрацијама допамина ($0; 0,50; 0,98; 1,46; 1,92$ и $2,38 \mu\text{g mL}^{-1}$) и конструисањем калибрационе криве (зависности интензитета оксидационог пика допамина од концентрације у волтаметријској ћелији).

Резултати

Питања

1. Која пулсна мерна техника је примењена за волтаметријско одређивање допамина применом немодификоване СРЕ?

2. Да ли је проучавана оксидација или редукција допамина као циљног анализата?

3. На основу којих параметара је одабрана и која је оптимална рН вредност за волтаметријско одређивање допамина применом СРЕ?

Датум:	Овера асистента:
---------------	-------------------------

Вежба 7. Инверзна волтаметријска анализа олова

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

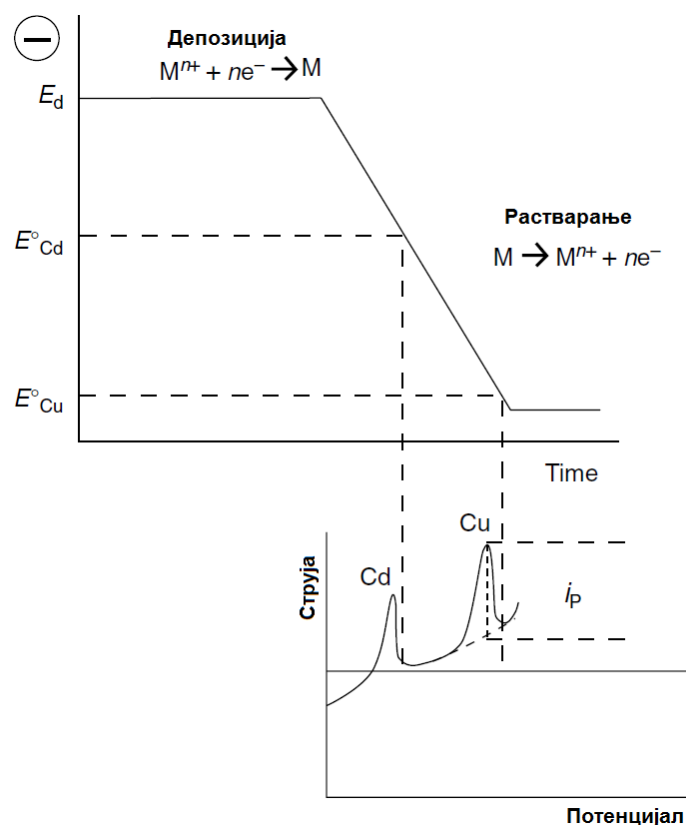
Олово спада међу најозбиљније металне отрове. Људи су изложени олову кроз различите свакодневне активности и услед употребе контаминиране хране и воде за пиће. Код одраслих особа, најчешћи узрок тровања је изложеност неорганским или органским једињењима олова при раду у индустрији. Неки од извора олова су оловни бензин, индустријски процеси као што су топљење олова и његово сагоревање, грнчарија, производња чамаца, фарбање/кречење бојама на бази олова, цеви које садрже олово, рециклажа батерија, пигменти, штампање књига и др. Увођење мера строге контроле у индустрији и образовање радника могу помоћи да се ова тровања сведу на минимум. Деца су нарочито подложна тровању оловом и нажалост, она су и даље изложена дејству боја и гипсу који садрже олово, посебно у оронумим и старим стамбеним зградама, упркос прописима, законским регулативама и покушајима просвећивања јавности. Оловна енцефалопатија, код деце која су доживела тешко тровање, има висок степен морталитета. Преживела деца често пате од трајних оштећења нервног система.

Тровање оловом се манифестује повећаном концентрацијом у крви. Олово је распрострањен елемент, а при нормалним условима постоји у трагу у биолошким течностима. Аналитички поступци морају бити изузетно осетљиви, прецизни и морају се изводити са великом предострожношћу како би се успешно направила разлика између нормалних и повећаних концентрација, или да би се открила промена настала у току лечења. Такви захтеви изискују да анализа олова буде у делокругу рада само оне лабораторије која има специјална искуства и која је опремљена за обављање анализа метала у траговима.

Најефикаснији начин за одређивање олова је атомска апсорпциона спектрометрија (AAS), индуковано куплована плазма са масеном (ICP/MS) или оптичком емисионом (ICP/OES) детекцијом, као и анодна “*stripping*” волтаметрија (енгл. *Anodic Stripping Voltammetry*, ASV). Инверзна волтаметрија или тзв. електрохемијска “*stripping*” анализа спада у електроаналитичке методе анализе трагова. Изводи се у два корака. Први корак подразумева депозицију (таложње) одређиване супстанце при константном потенцијалу у циљу њене преконцентрације на површини радне електроде, а други корак подразумева њено растварање (“*stripping*”) које се обично врши променом потенцијала радне електроде при чему се мери електрична величина, која је сразмерна концентрацији супстанце. У зависности од природе корака депозиције и мерења, разликујемо катодну, анодну и адсорптивну инверзну волтаметрију.

Код анодне “*stripping*” волтаметрије (слика 7.1), први корак јесте преконцентрација анализата – катодна депозиција (редукција) јона метала из раствора на површину радне електроде при константном потенцијалу (E_d) у току одређеног времена уз мешање

раствора. Након истека времена депозиције, мешање се зауставља и време мировања служи да се раствор умири и да се успостави равнотежа на површини електроде. Затим се потенцијал мења у анодном смеру како би се обезбедило растварање издвојене супстанце електрохемијском оксидацијом. Паралелно са растварањем се истовремено прати интензитет струје, који је пропорционалан концентрацији анализата. Време депозиције зависи од концентрације одређиваног јона метала у раствору. Електрични сигнал којим се изазива анодно растварање издвојеног деполаризатора може бити различит.



Слика 7.1. Принцип анодне “stripping” волтаметрије

Од открића поларографије, жива се у великој мери користила као електродни материјал за електрохемијску “stripping” анализу. Имајући у виду токсичност живе и водећи се принципима зелене хемије, било је неопходно пронаћи алтернативне електродне материјале. Стога је велики број материјала (бизмут, злато, сребро, антимон, угљеник, бором доповани дијамант...) тестиран како би се утврдила њихова могућност да замене живу. Поред тога, различити органски или неоргански филмови су испитани у циљу њихове потенцијалне примене за одређивање олова “stripping” анализом.

Како би одређивање олова било поуздано првенствено треба имати на уму да не сме доћи до контаминације узорка. До контаминације може доћи током прикупљања узорака, његовог складиштења и транспорта, као и током манипулације узорком. Стога је потребно користити опрему и хемикалије високе чистоће. У практичним

експериментима препоручује се избегавање примене лабораторијског стакленог посуђа и уместо тога треба користити посуђе од инертног материјала попут пластике нпр. од полипропилена или политетрафлуороетилена. Такође, посуђе треба испрати одговарајућом киселином (нпр. азотном) како би се смањио ризик од контаминације.

Концентрација олова у крви се може мерити у узорцима венске или капиларне крви. У односу на узимање узорка крви из вене, узимање капиларне крви (убод у прст или у пету у случају беба) је релативно лако, брзо и мање је инвазивно, али већа је могућност контаминације. Стога се капиларна крв углавном користи за скрининг повећане концентрације олова. Центар за контролу болести и превенцију (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*, САД) је дефинисао следеће референтне вредности за концентрацију олова у пуној крви: 10 $\mu\text{g/dL}$ за одрасле особе и 3,5 $\mu\text{g/dL}$ за децу. Нормални нивои олова у урину су $< 0,08 \text{ mg/L}$. Нивое у урину треба приказивати у mg/L заједно са укупним волуменом 24-часовног узорка како би се могла успоставити корелација између екскреције олова у току 24 часа и клиничких фактора који се могу доводити у везу са изузетно великом или малом производњом урина.

Задатак вежбе

Испитати применљивост бизмут-филм електроде за одређивање олова у урину применом анодне инверзне волтаметрије и методе стандардног додатка.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Хемикалије и раствори

- Ацетатни пуфер (0,1 mol/L, pH = 4,5), као помоћни електролит,
- Стандардни раствор Bi(III) концентрације 1000,0 $\mu\text{g/mL}$,
- Стандардни раствор Pb(II) концентрације 10,0 $\mu\text{g/mL}$,
- Узорак урина.

Инструменти и прибор

- Волтаметријском уређај *AUTOLAB PGSTAT 12* (*Ecochemie*, Холандија) опремљен *GPES 4.9* софтвером.
- Волтаметријска ћелија са троелектродним системом (слика 7.2):
 - Референтна електрода: zasiћена каломелова електрода (ZKE),
 - Помоћна електрода: платинска електрода,
 - Радна електрода: електрода од стакластог угљеника - *GCE* (*Amel*, Италија).
- Одмерни суд од 10,0 mL,
- Лабораторијске чаше,
- Пипета запремине 10,0 mL,
- Пропипета,
- Аутоматске микропипете запремине 2,0-20,0 μL и 100,0-1000,0 μL .



Слика 7.2. Волтаметријска ћелија са троелектродним системом

Поступак

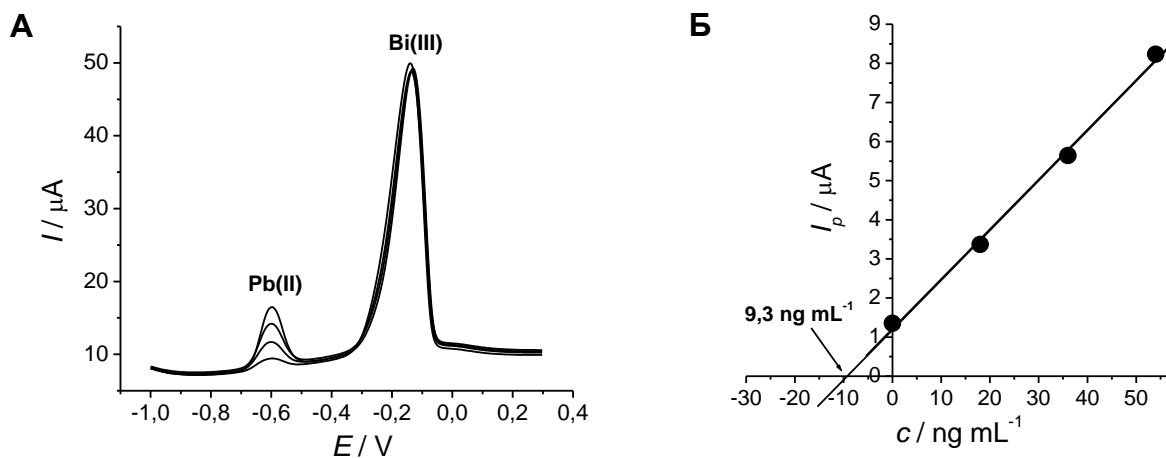
Лабораторијско посуђе пажљиво опрати бидестилованом водом. Радну електроду (GCE) исполирати воденом суспензијом алуминијум(III)-оксида и површину електроде испрати бидестилованом водом.

У *GPES 4.9* софтверу подесити одговарајуће параметре за одређивање олова у узорку. Следећи параметри анодне стрипинг волтаметрије са правоугаоним таласима (SWASV) се примењују: $E_{start} = -1,0 \text{ V vs. ZKE}$; $E_{end} = 0,30 \text{ V}$; $E_{dep} = -1,0 \text{ V}$; $t_{dep} = 60 \text{ s}$; $t_{eq} = 15 \text{ s}$; фреквенција = 25 Hz; потенцијалски корак = 4 mV; амплитуда = 50 mV; $E_{cond} = 0,50 \text{ V}$; $t_{cond} = 30 \text{ s}$. Постављањем одговарајућих експерименталних параметара, пре сваког мерења, потенцијал електроде се држи на $E_{cond} = 0,50 \text{ V}$ у трајању од 30 s уз мешање уз помоћ магнетне мешалице и на тај начин се са површине GCE оксидују евентуално присутне нечистоће. Приликом депозиције Pb на површини GCE ($E_{dep} = -1,0 \text{ V}$) раствор се контролисано меша уз помоћ магнетне мешалице у току 60 s. Након тога, раствор мирује 15 s, а потом почиње снимање SWASV сигнала.

Узорак урина (1,0 mL) пренети у одмерни суд од 10,0 mL, допунити бидестилованом водом до ознаке и хомогенизовати. У циљу уклањања утицаја матрикса на волтаметријски сигнал олова, одређивање олова у узорку се врши методом стандардног додатка (3 додатка). У волтаметријску ћелију одмерити 10,0 mL ацетатног пуфера pH 4,5 и 10,0 μL раствора Bi(III) који је потребан за формирање *in situ* бизмут филма. То је хемијска модификација електроде, која повећава осетљивост мерења у односу на немодификовану GCE. Потом додати 1,0 mL припремљеног узорка и снимити волтамограм узорка.¹ Након тога додати први стандардни додаток (20,0 μL стандардног раствора Pb(II)). Након снимања волтамограма за I стандардни додаток, у

¹ Уколико је концентрација олова у узорку испод границе детекције методе, узорак спајковати (обогатити) познатом концентрацијом олова.

волтаметријску ћелију додати II, а потом и III стандардни додаток и снимити волтамограме на исти начин. Мерење сваке пробе поновити неколико пута. Волтаметријска мерења се изводе при непознатој концентрацији олова у узорку, а потом и након додатка познате количине стандардног раствора олова. Добијени резултати се затим графички представљају као зависност добијеног интензитета сигнала од концентрације олова. Концентрација олова у узорку се читава екстраполацијом аналитичке праве, пресеком x -осе (слика 7.3).



Слика 7.3. Волтамограми одређивања Pb(II) у спајкованом узорку урина и три стандардна додатка олова (A). Аналитичка права за волтаметријско одређивање Pb(II) у узорку методом стандардног додатка (B)

Резултати

Питања

1. Која електроаналитичка мерна техника омогућава одређивање трагова олова у различитим узорцима?

2. Који раствор је потребно додати пре мерења како би се извршила хемијска модификација електроде од стакластог угљеника?

3. Колика је вредност концентрације олова пронађена у испитиваном узорку применом SWASV методе у овој вежби?

<i>Датум:</i>	<i>Овера асистента:</i>
---------------	-------------------------

Вежба 8. Амперометријска анализа водоник-пероксида

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

Иако веома једноставан молекул по природи, водоник-пероксид (H_2O_2) је од великог значаја и широко се примењује у многим областима укључујући хемијску, фармацеутску, текстилну, прехранбену индустрију, заштиту животне средине, медицину, итд.

Повишена концентрација H_2O_2 у организму може да доведе до оксидативног стреса и оштећења ћелија, а у неким случајевима чак и до потпуног уништења ћелија. Са друге стране, H_2O_2 има улогу сигналног молекула у регулацији различитих ћелијских процеса код биљака и сисара. Стога, H_2O_2 има како позитивне тако и негативне ефекте у зависности од концентрације и типа ћелије. У људском организму, H_2O_2 је широко познат као цитотоксични агенс чија концентрација мора бити минимизована дејством ензима антиоксидативног одбрамбеног система. У принципу, H_2O_2 је слабо реактиван у одсуству јона прелазних метала. Излагање одређених људских ткива овом молекулу може бити веће него што се може претпоставити. Наиме, знатне количине H_2O_2 могу бити присутне у пићима (зелени и црни чај, инстант кафе) и њиховим конзумирањем H_2O_2 брзо дифундује у ћелије усне дупље и горњег дела гастроинтестиналног тракта. Затим H_2O_2 се може наћи у свезим узорцима људског урина и у издахнутом ваздуху. Ниво H_2O_2 у људском телу се може држати под контролом не само катаболизмом, већ и излучивањем, а H_2O_2 може имати улогу у регулацији функције бубрега и као антибактеријски агенс у урину. Уринарне концентрације су последица исхране, али под одређеним условима могу бити биомаркер тзв. оксидативног стреса.

H_2O_2 је такође споредни продукт класичних биохемијских реакција катализованих ензимима из групе оксидаза као што су глукоза оксидаза, алкохол оксидаза, лактат оксидаза, холестерол оксидаза, глутамат оксидаза, лизин оксидаза, оксалат оксидаза, итд.

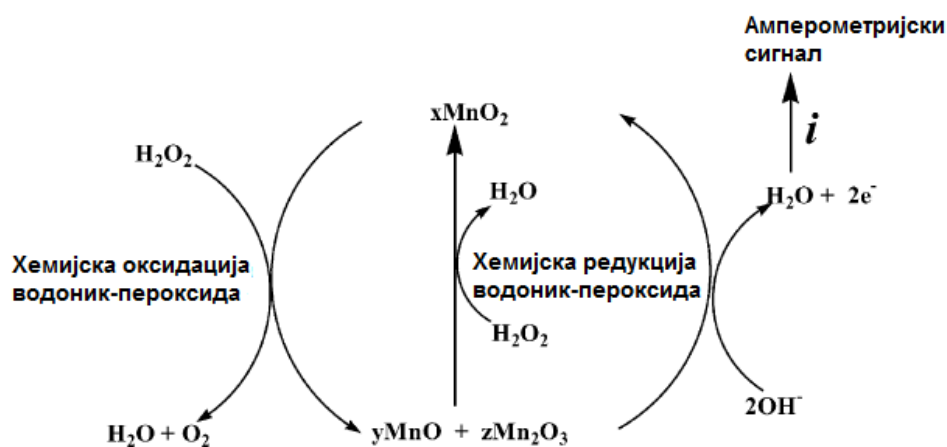
Имајући у виду широку примену H_2O_2 , његово одређивање поузданом, брзом и економичном методом је од великог значаја за многе процесе. С обзиром да је H_2O_2 електроактиван молекул, електроаналитичке методе, првенствено волтаметријске и амперометријске, су се показале веома погодним за његово одређивање. У поређењу са другим методама, оне су једноставне, брзе, осетљиве, исплативе и омогућавају постизање ниских граница детекције. У волтаметрији се потенцијал мења у току времена, док је у амперометрији он константан и обично је подешен на ону вредност при којој је постигнута гранична дифузиона струја бар једне компоненте тј. циљног анализита у испитиваном раствору.

Одабир погодне радне електроде је у волтаметрији/амперометрији један од кључних корака. Угљеничне електроде, настале као алтернатива живиним електродама, могу представљати прави избор када је у питању одређивање H_2O_2 . Електроде од угљеничне пасте (*енгл. Carbon Paste Electrode, CPE*) и штампане угљеничне електроде (*енгл.*

Screen Printed Carbon Electrode, SPCE) су добиле велику популарност због једноставне припреме и модификације, лаке регенерације површине и репродуктивности у случају SPE и могућности масовне производње и минијатуризације у случају SPCE. SPCE се производе „screen printing“ технологијом, која је позната по својим предностима као што су јефтина и брза производња сензора и биосензора. Основни корак у овом процесу је наношење одговарајућег мастила на равну подлогу, најчешће керамичку, вршењем притиска на калуп што је праћено сушењем при одређеној температури.

Један од анализата који се одређује применом угљеничних електрода је H_2O_2 . Међутим, његова директна оксидација или редукција на немодификованим електродама захтева висок напон да би дошло до реакције. Овај проблем се може решити уколико се електроде модификују одговарајућим супстанцама. Модификоване електроде су погодне јер смањују напон H_2O_2 и тиме смањују могућност одигравања споредних реакција тако што поспешују реакцију трансфера електрона. Тиме се повећава селективност, специфичност, репродуктивност површине електроде и смањује граница детекције. Стога су истраживања у данашње време фокусирана на модификацији електрода, а као модификатори показале су се погодним супстанцама које имају каталитичку активност тј. понашају се као медијатори. Међу њима се посебно издвајају прелазни метали, њихови оксиди и комплекси, а у данашње време све више се примењују наноматеријали.

Један од популарнијих модификатора на овом пољу је манган(IV)-оксид (MnO_2). Електроде модификоване са MnO_2 се користе за одређивање H_2O_2 , аскорбинске киселине и мокраћне киселине. MnO_2 има улогу медијатора тј. посредника у реакцији H_2O_2 на начин који је приказан на слици 8.1. У одсуству H_2O_2 почевши од потенцијала -0,2 V до -0,8 V долази до редукције MnO_2 на нижа оксидациона стања Mn^{2+} и Mn^{3+} . У присуству H_2O_2 долази до преклапања његовог сигнала са сигналом од MnO_2 и карбоксилних група насталих на угљеничном материјалу. Даље, приликом оксидације H_2O_2 у присуству MnO_2 на потенцијалима од око 0,5 V долази до значајног повећања сигнала у односу на случај када ти чиниоци не учествују заједно у електродној реакцији.



Слика 8.1. Каталитички редокс циклус MnO_2 и хемијска оксидација H_2O_2

Задатак вежбе

Испитати применљивост штапане угљеничне електроде модификоване са MnO_2 за амперометријско одређивање H_2O_2 при радном потенцијалу 0,3; 0,4 и 0,5 V. Конструисати одговарајуће калибрационе криве, приказати табеларно основне аналитичке параметре методе и донети закључак о најпогоднијем радном потенцијалу за одређивање H_2O_2 .

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО**Хемикалије и раствори**

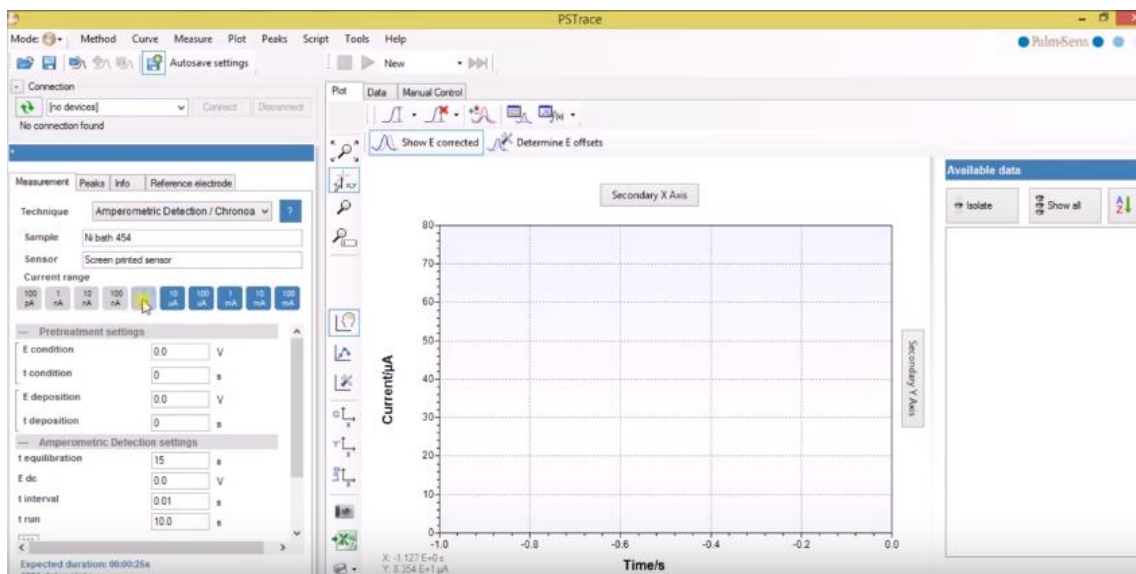
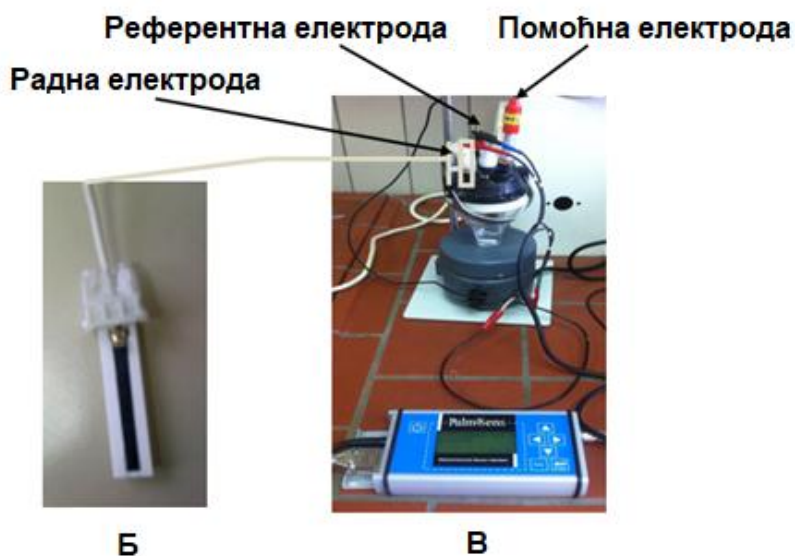
- 0,1 mol L⁻¹ фосфатни пуфер рН 7,5,
- 0,4% раствор H_2O_2 .

Инструменти и прибор

- Преносиви волтаметријски уређај *PalmSens* (слика 8.2) подржан софтвером *PSTrace* (слика 8.3).
- Волтаметријска ћелија са троелектродним системом (слика 8.4):
 - Референтна електрода: zasiћена каломелова електрода,
 - Помоћна електрода: платинска електрода,
 - Радна електрода: немодификована штапана угљенична електрода (SPCE) или штапана угљенична електрода запремински модификована са манган(IV)-оксидом (MnO_2 -SPCE) (слика 8.4).
- Одмерни суд од 25,0 mL,
- Лабораторијске чаше,
- Пипета запремине 10,0 mL,
- Пропипета,
- Аутоматска микропипета запремине 20,0-200,0 μL .



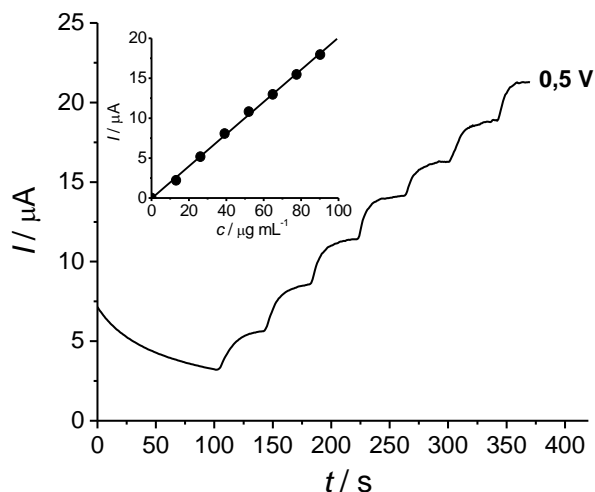
Слика 8.2. Преносиви волтаметријски уређај *PalmSens*

Слика 8.3. Изглед *PStTrace* софтвераСлика 8.4. SPCE (А), SPCE спремна за повезивање у троелектродном систему (Б), *PalmSens* повезан са троелектродним системом (В)

Поступак

Амперометријска мерења H_2O_2 вршити применом SPCE, као и применом MnO_2 -SPCE. У волтаметријску ћелију одмерити 10,0 mL фосфатног пуфера pH 7,5 као основног електролита. Поставити волтаметријску ћелију на магнетну мешалицу и у пуфер уронити троелектродни систем. Укључити волтаметријски уређај *PalmSens* и у *PStTrace* програму одговарајућом командом повезати уређај са софтвером. У програму

затим одабрати амперометријску мерну технику и подесити параметре мерења (амперограме снимити при позитивним радним потенцијалима: 0,3 V; 0,4 V и 0,5 V). Укључити мешање испитиваног раствора у волтаметријској ћелији и покренути мерење са унапред софтверски задатим параметрима. Код свих мерења базну линију снимати у току 100 s. Први аликуот 0,4% H₂O₂ додати на 100 s, а затим на сваких 40 s до коначних 380 s. Запремина 0,4% H₂O₂ је 30,0 μL у сваком додатом аликуоту. Додатком H₂O₂ се очекује скок струје, односно појава степеничаних сигнала H₂O₂. Пример амперограма добијеног на радном потенцијалу 0,5 V је дат на слици 8.5.



Слика 8.5. Амперометријски сигнали H₂O₂ добијени применом MnO₂-SPCE у фосфатном пуферу pH 7,5 на радном потенцијалу 0,5 V и припадајућа калибрациона крива у опсегу концентрација H₂O₂ 13,12-90,21 $\mu\text{g mL}^{-1}$

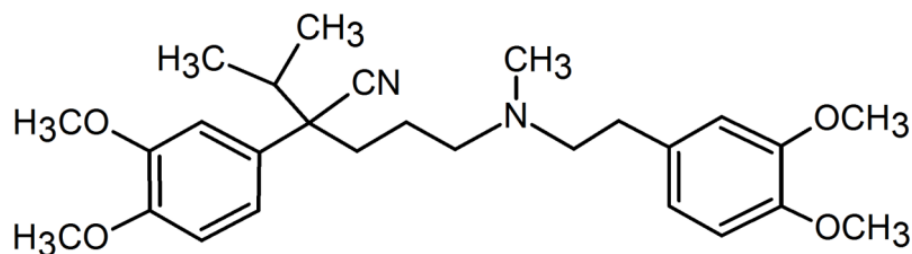
Након 380 s прекинути мерење и сачувати добијен амперограм, а потом искључити мешање. На основу измерених интензитета струјних сигнала конструисати одговарајуће калибрационе криве за сваки примењени радни потенцијал.

Резултати

Вежба 9. Течно-хроматографска анализа верапамила

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

Фенилалкиламинско једињење, верапамил (VER), је блокатор калцијумових канала и најчешће се користи за лечење повишеног крвног притиска, срчане аритмије и мигренске главобоље. Уколико је VER у форми хидрохлорида (VER · HCl), растворљивост у води је у великој мери побољшана. Према томе, VER · HCl се користи као активна компонента таблета примењених у медицинској пракси и самим тим постоји потреба за контролом квалитета лекова заснованих на VER. На основу структуре VER (слика 9.1) и његових физичко-хемијских карактеристика, утврђено је да је погодно његово одређивање применом различитих аналитичких мерних техника као што су течна хроматографија, гасна хроматографија, спектрофотометрија, масена спектрометрија, капиларна електрофореза и волтаметрија.



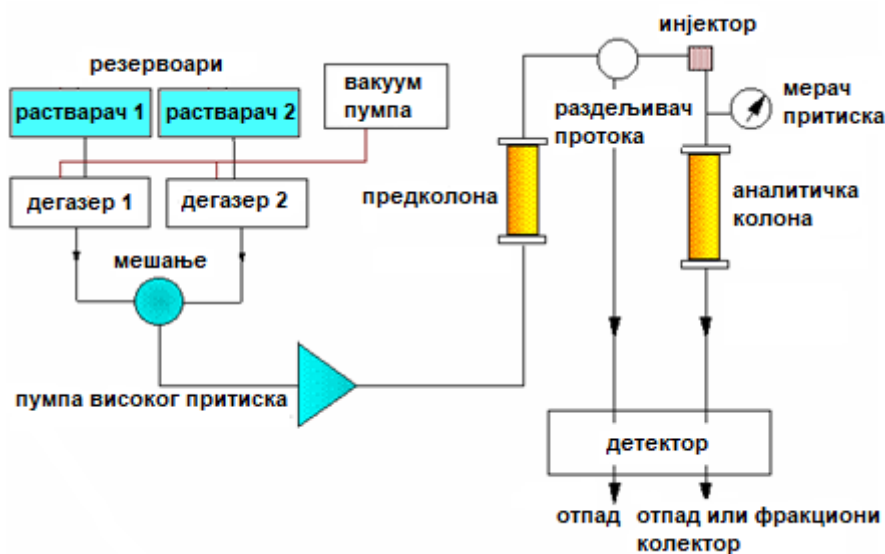
Слика 9.1. Молекулска структура верапамила

Развијене су различите хроматографске методе са детекцијом у ултраљубичастој (UV) области рада за одређивање хидрофобног молекула VER (вредност коефицијента расподеле октанол/вода, $\log K_{ow}$, је 3,8), при чему се може закључити да би течна хроматографија као аналитичка мерна техника уз примену реверзно-фазне колоне могла бити погодна за одређивање овог анализата у реалним узорцима. Према литературним подацима, на UV спектру VER се уочавају два апсорпциона максимума, први на 230 nm и други на 278 nm, што омогућава детекцију VER применом детектора на бази низа диода (*енгл. Diode Array Detector, DAD*).

Хроматографске технике пружају могућност за добијање квалитативних и квантитативних информација приликом анализе циљних једињења у једноставнијим или сложенијим узорцима, појединачно или у њиховим вишекомпонентним смешама. Применом хроматографије, компоненте узорка се расподељују између две фазе, од којих је једна стационарна (чврста или течна), а друга мобилна (течност, гас или суперкритичан флуид). Континуалним протицањем мобилне фазе се обезбеђује пролазак компоненти узорка кроз аналитичку колону, а испитивани аналит показује афинитет за сваку од фаза у зависности од структуре молекула и интермолекулских сила.

Течна хроматографија високе ефикасности (енгл. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) или течна хроматографија под високим притиском (енгл. *High Pressure Liquid Chromatography*) је једна од водећих аналитичких техника за раздвајање и одређивање анализата применом одговарајућих комбинација мобилне и стационарне фазе. На основу поларности пуњења колоне и различитих механизма ретенције анализата у аналитичкој колони, може се поделити на нормално-фазну и реверзно-фазну хроматографију. Раздвајање на нормалним фазама подразумева да је стационарна фаза поларна (нпр. силикатна), а мобилна фаза неполарна (нпр. хексан), и поларна једињења се дуже задржавају на колони односно на већем ретенционом времену. Код раздвајања на обрнутим (реверзним) фазама стационарна фаза је неполарна (нпр. C-18 угљоводоник), а мобилна фаза поларна (нпр. вода и метанол) и неполарна једињења се дуже задржавају на колони.

Саставни делови HPLC уређаја су приказани на слици 9.2.



Слика 9.2. Блок схема течног хроматографа високе ефикасности

Главне делове HPLC система чине резервоари са одговарајућим растварачима односно мобилном фазом, систем за покретање растварача са пумпом, уређај за уношење узорка (ручни или аутоматски инјектор са петљом), аналитичка колоне, детектор, систем за прикупљање отпада и на самом крају рачунар за обраду и чување добијених података.

Током анализе применом HPLC уређаја, режим рада може бити изократски, са константним саставом мобилне фазе, као и градијентни, при чему се однос растварача мења током елуирања анализата са колоне према унапред задатом начину.

Детекција применом HPLC је заснована на повезаности физичко-хемијских особина испитиваних анализата и добијеног сигнала, при чему интензитет електричног сигнала односно површина добијеног хроматографског пика даје квантитативне, а положај пика или ретенционо време квалитативне информације. Најчешће се користи детектор за таласне дужине у ултраљубичастом и видљивом делу спектра (UV/Vis детектор), а

такође постоје и фотодиодни (DAD), флуоресцентни, електрохемијски, масени и други детектори. Примена UV/Vis детектора сеже у област таласних дужина у опсегу од 190 до 900 nm, при чему се омогућава детекција и одређивање анализата са хромофором која апсорбује светлост у овој области спектра. Све чешће се користи DAD због побољшане селективности одређивања, поготово код одређивања једињења са приближним апсорпционим максимумом, што доводи до преклапања трака у случају примене UV/Vis детектора. DAD врши истовремено мерење апсорбанције у функцији времена анализе у изабраном опсегу таласних дужина, што представља хроматограм као резултат анализе, а такође се добија UV спектар са карактеристичним пиком за сваки елуирани аналит.

Широка применљивост HPLC мерне технике се огледа кроз бројне предности од којих су карактеристичне висока осетљивост, селективност, одређивање веома мале количине узорка и истовремена анализа великог броја узорака. Важни фактори који утичу на ретенционе карактеристике анализата на хроматографској колони су константа дисоцијације (pKa) молекула и pH вредност мобилне фазе. Вредност pKa молекула анализата утиче на његово везивање за остале молекуле присутне у хроматографској колони, те је важно проучавати кисело-базно понашање супстанци у мобилној фази током течно-хроматографске анализе, нарочито ради предвиђања утицаја pH вредности средине на селективност и ретенцију анализата. Према литературним подацима, вредност pKa VER · HCl износи 8,9, а задржавање молекула VER · HCl на реверзно-фазној аналитичкој колони уз примену поларне мобилне фазе се повећава са повећањем pH вредности средине. Са гледишта реверзно-фазне HPLC и у циљу добијања оптималног облика пика VER · HCl, резолуције пика и осетљивости методе, потребно је мобилну фазу подесити на одговарајућу pH вредност.

Задатак вежбе

Припремити серију стандарних раствора VER, снимити хроматограме и конструисати калибрациону криву. Одредити количину активне компоненте VER · HCl у комерцијалној формулацији *Verapamil*[®].

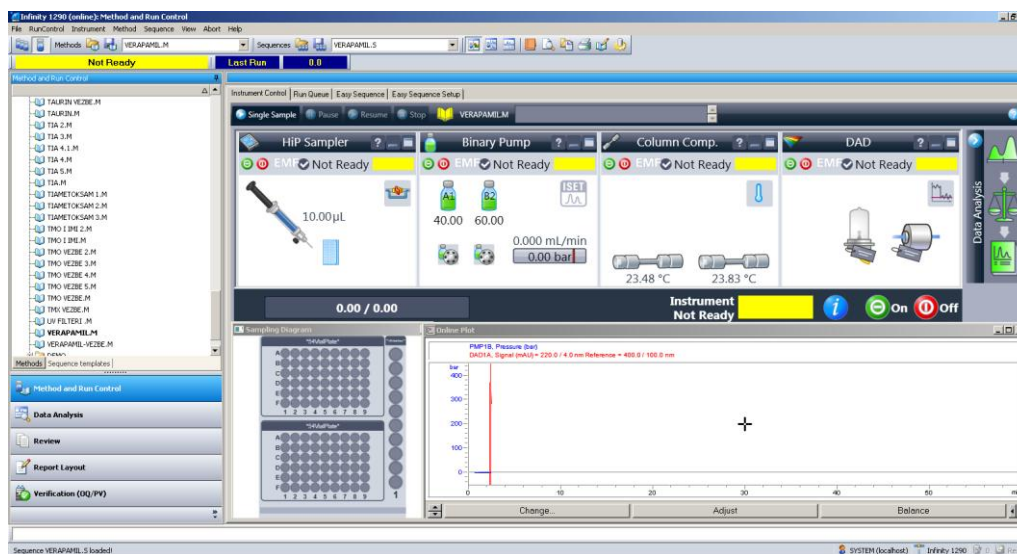
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Хемикалије и раствори

- Стандардни раствор VER концентрације 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$,
- Раствор комерцијалне формулације верапамила, *Verapamil*[®] таблете (по декларацији произвођача, једна таблета садржи 40,0 mg VER · HCl, Хемофарм, Вршац, Србија) припремити растварањем одговарајуће количине садржаја три таблете претходно спрашене у авану са тучком у бидестилованој води у одмерном суду од 100,0 mL.
- Метанол (чистоће 99,9%, *CHROMOSOLV@* за HPLC, *Sigma-Aldrich*),
- Вода закишељена додатком концентроване фосфорне киселине до pH 2,80.

Инструменти и прибор

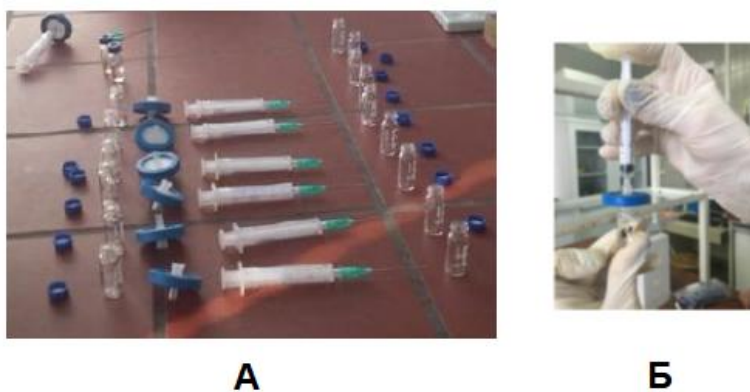
- рН метар, *inoLab*[®] *Multi 9620 IDS* и комбинована стаклена електрода - *SenTix*[®] *980 IDS* електрода са $3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (WTW, Немачка) за подешавање рН вредности закишељене воде (рН 2,80),
- *Agilent 1290 Infinity* течни хроматограф (*Agilent Technologies Inc.*, САД) (слика 9.3) опремљен софтвером *ChemStation* (слика 9.4), *ZORBAX Eclipse Plus C18* (50 x 2,1 mm; 1,8 μm) хроматографском колоном (*Agilent Technologies Inc.*, САД) и детектором на бази низа диода (DAD)(*Agilent 1290*),
- Одмерни судови од 10,0 mL и 100,0 mL,
- Мембрански филтри: регенерисана целулоза, величине пора 0,22 μm , пречника 25 mm,
- Пластични шприцеви и игле,
- Хроматографске вијале запремине 2,0 mL,
- Аутоматска микропипета запремине 100,0-1000,0 μL .

Слика 9.3. *Agilent 1290 Infinity* течни хроматографСлика 9.4. Изглед *ChemStation* софтвера

Поступак

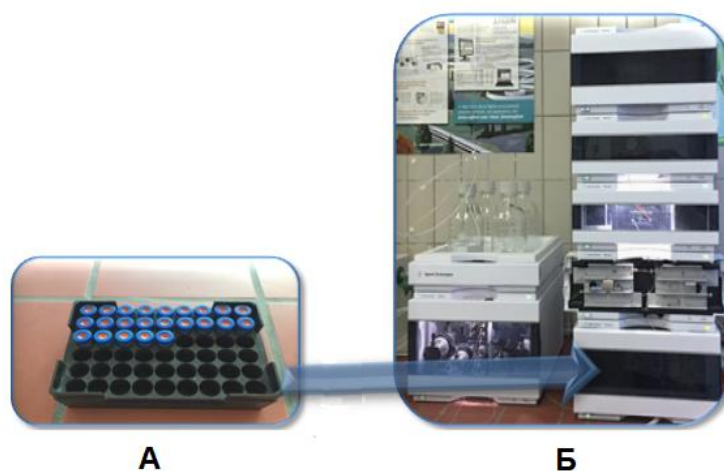
Разблажењем одговарајуће запремине основног раствора VER (концентрација $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), припремити серију стандардних раствора VER чије су концентрације следеће: 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. За припрему узорка за хроматографска мерења, 2,5 mL претходно припремљеног раствора комерцијалне формулације *Verapamil*[®] разблажити бидестилованом водом у одмерном суду од 10,0 mL.

Уз помоћ игала и шприцева (слика 9.5, А), припремљене растворе познатих концентрација VER и аликвот комерцијалне формулације *Verapamil*[®] профилирати кроз мембранске филтре директно у хроматографске вијале запремине 2,0 mL (слика 9.5, Б). Потом сваку припремљену вијалу означити одговарајућим ознакама.



Слика 9.5. Прибор за припрему испитиваних раствора за хроматографска мерења: игле, шприцеви, мембрански филтри, вијале (А, Б)

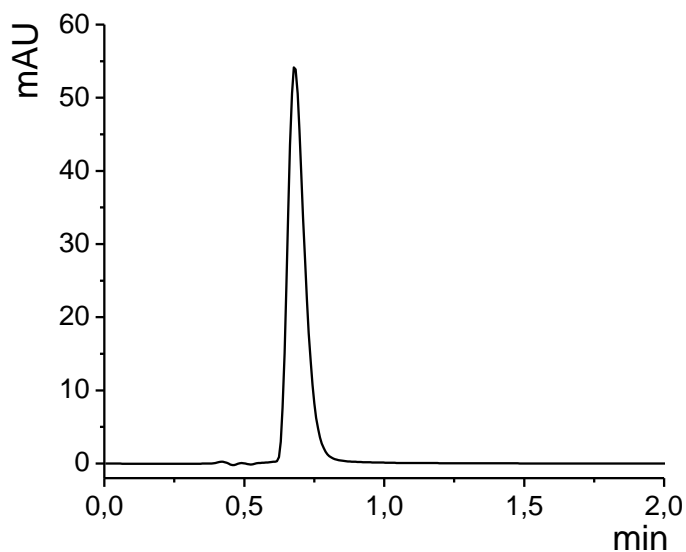
Означене хроматографске вијале са испитиваним растворима поставити у држач за вијале (слика 9.6, А), који се потом поставља у *Agilent 1290 Infinity* течни хроматограф (слика 9.6, Б).



Слика 9.6. Вијале са узорцима постављене у држач за вијале (А) и стрелицом означено место постављања држача у *Agilent 1290 Infinity* течни хроматограф (Б)

Елуирање VER извести изократским режимом рада HPLC уређаја. Реверзно-фазна хроматографска мерења VER се врше при следећим експерименталним условима: мобилна фаза је смеша закишељене воде рН 2,80 (40%) и метанола² (60%) (V/V), брзина протока 0,3 mL min⁻¹, ињектована запремина узорка 10,0 µL, температура колоне 25 °C и радна таласна дужина DA-детектора 278 nm.

Снимити хроматограме стандардног раствора VER у области концентрација од 1,0 до 15,0 µg mL⁻¹. У циљу одређивања садржаја активне компоненте, VER · HCl, у комерцијалној формулацији *Verapamil*[®], снимити хроматограм припремљеног аликвота узорка. Изглед хроматограма стандардног раствора VER је приказан на слици 9.7.



Слика 9.7. Хроматограм стандардног раствора VER концентрације 10,0 µg mL⁻¹

Након снимања хроматограма, извршити интеграљење добијених пикова, односно софтверски очитати њихову површину. Конструисати одговарајућу калибрациону криву, а потом очитати концентрацију VER у аликвоту узорка на основу измерене површине пика. Пронађену концентрацију VER у аликвоту прерачунати на масу у аликвоту, а потом и на масу VER · HCl у целој таблети *Verapamil*[®].

² Уместо метанола може се користити и ацетонитрил као компонента мобилне фазе.

Резултати

Литература

Ali A.H., High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review, *Annals of Advances in Chemistry* 6 (2022) 10–20.

Alhabbab R.Y., Pregnancy Test. In: *Basic Serological Testing. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*, Ed: Kalyuzhny A.E., 2018, 97–103.

Anođić J., Voltametrijske metode zasnovane na primeni jednostavnih i savremenih elektroda/senzora na bazi ugljeničnih materijala za određivanje vodonik-peroksida u odabranim uzorcima, *Doktorska disertacija, PMF, Univerzitet u Novom Sadu*, 2018.

Arduini F., Calvo J.Q., Amine A., Palleschi G., Moscone D., Bismuth-modified electrodes for lead detection, *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 1295–1304.

Aronoff S.L., Berkowitz K., Shreiner B., Want L., Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon, *Diabetes Spectrum* 17 (2004) 183–190.

Ayres D.A., Pulse oximetry and CO-oximetry, In: *Advanced monitoring and procedures for small animal emergency and critical care*, Eds: Burkitt Creedon J.M., Davis H., John Wiley & Sons, Inc., 2012, 274–285.

Azhari A., Yoshimoto S., Nezu T., Iida H., Ota H., Noda Y., Araki T., Uemura T., Sekitani T., A patch-type wireless forehead pulse oximeter for SpO₂ measurement, *2017 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)* (2017) 1–4.

Berger A., How does it work? Alcohol breath testing, *BMJ* 325 (2002) 1403.

Beyene N.W., Kotzian P., Schachl K., Alemu H., Turkušić E., Chopra A., Moderegger H., Švancara I., Vytřas K., Kalcher K., (Bio)Sensors based on manganese dioxide-modified carbon substrates: retrospections, further improvements and applications, *Talanta* 64 (2004) 1151–1159.

Boyd J.M., Hossein Sadrzadeh S.M., Limitations of immunoassays for screening of drugs of abuse in urine: issues of false positive and false negative results. In: *Accurate results in the clinical laboratory (Second edition), A guide to error detection and correction*, Eds: Dasgupta A. and Sepulveda J. L., 2019, 233–242.

Britton D., Roeske A., Ennis S.K., Benditt J.O., Quinn C., Graville D., Utility of pulse oximetry to detect aspiration: an evidence-based systematic review, *Dysphagia* 33 (2018) 282–292.

Bülbül A.İ., Küçük S., Pulse oximeter manufacturing & wireless telemetry for ventilation oxygen support, *International Journal of Applied Mathematics, Electronics and Computers* 4 (Special Issue) (2016) 211–215.

Caetano F.R., Gevaerd A., Bergamini M.F., Marcolino-Junior L.H., A fast and simple conductometric method for verapamil hydrochloride determination in pharmaceutical formulations, *Current Pharmaceutical Analysis* 7 (2011) 275–279.

Chan E.D., Chan M.M., Chan M.M., Pulse oximetry: Understanding its basic principles facilitates appreciation of its limitations, *Respiratory Medicine* 107 (2013) 789–799.

Chen A., Shah B., Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry, *Analytical Methods* 5 (2013) 2158–2173.

Chen C., Xie Q., Yang D., Xiao H., Fu Y., Tan Y., Yao S., Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review, *RSC Advances* 3 (2013) 4473–4491.

Chen W., Cai S., Ren Q.-Q., Wen W., Zhao Y.-D., Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review, *Analyst* 137 (2012) 49–58.

Curulli A., Electrochemical biosensors in food safety: challenges and perspectives, *Molecules* 26 (2021) 2940.

Četojević-Simin D., vežba: Kvantitativno određivanje humanih imunoglobulina IgG klase na *Chlamydia trachomatis* indirektnim ELISA testom, Institut za onkologiju Vojvodine, Zavod za eksperimentalnu onkologiju, 2008.

Darwish I.A., Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances, *International journal of Biomedical science* 2 (2006) 217–235.

Dasgupta A., Limitations of drugs of abuse testing. In: *Accurate results in the clinical laboratory, a guide to error detection and correction*, Eds: Dasgupta A. and Sepulveda J. L., 2013, 213–232.

Debnath B., Somraj Singh W., Manna K., Sources and toxicological effects of lead on human health, *Indian Journal of Medical Specialities* 10 (2019) 66–71.

DeMeulenaere S., Pulse oximetry: uses and limitations, *The Journal for Nurse Practitioners* 3 (2007) 312–317.

Elsamnah F., Bilgaiyan A., Affiq M., Shim C.-H., Ishidai H., Hattori R., Comparative design study for power reduction in organic optoelectronic pulse meter sensor, *Biosensors* 9 (2019) 48.

Fessler C.C., Tulleners F.A., Howitt D.G., Richards J.R., Determination of mouth alcohol using the Dräger evidential portable alcohol system, *Science and Justice* 48 (2008) 16–23.

Gough D.R., Cotter T.G., Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule, *Cell Death and Disease* 2 (2011) 1–8.

Gumustas M., Sanli S., Sanli N., Ozkan S.A., Development and validation of a liquid chromatographic method for concurrent assay of weakly basic drug verapamil and

amphoteric drug trandolapril in pharmaceutical formulations, *Journal of Food and Drug Analysis* 20 (2012) 588–596.

Halliwell B., Clement M.V., Long L.H., Hydrogen peroxide in the human body, *FEBS Letters* 486 (2000) 10–13.

Hasanzadeh M., Shadjou N., de la Guardia M., Current advancement in electrochemical analysis of neurotransmitters in biological fluids, *Trends in Analytical Chemistry* 86 (2017) 107–121.

Hopl N.V., Hoang H.V., Khanh D.V., Tin H.T., Nghi T.V., Yasaka Y., Annual Report of FY 2007, The Core University Program between Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and Vietnamese Academy of Science and Technology (VAST) 20–27.

<https://www.cdc.gov/nceh/lead/data/blood-lead-reference-value.htm> (online 15.12.2022)

Ibrahim A.E., Elhenawee M., Saleh H., Sebaiy M.M., Overview on liquid chromatography and its greener chemistry application, *Annals of Advances in Chemistry* 5 (2021) 4–12.

Johnson S., The home pregnancy test. In: 100 years of Human Chorionic Gonadotropin: Reviews and New Perspectives, Eds: Cole L.A. and Butler S.A., 2020, 107–121.

Jordan T.B., Meyers C.L., Schrading W.A., Donnelly J.P., The utility of iPhone oximetry apps: A comparison with standard pulse oximetry measurement in the emergency department, *American Journal of Emergency Medicine* 38 (2019) 925–928.

Karimi-Maleh H., Karimi F., Rezapour M., Bijad M., Farsi M., Beheshti A., Shahidi S.-A., Carbon paste modified electrode as powerful sensor approach determination of food contaminants, drug ingredients, and environmental pollutants: a review, *Current Analytical Chemistry* 15 (2019) 410–422.

Kazakevich Y., Lobrutto R., HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.

Kubihal S., Goyal A., Gupta Y., Khadgawat R., Glucose measurement in body fluids: A ready reckoner for clinicians, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 15 (2021) 45–53.

Lakshmanakumar M., Nesakumar N., Kulandaisamy A.J., Rayappan J.B.B., Principles and recent developments in optical and electrochemical sensing of dopamine: A comprehensive review, *Measurement* 183 (2021) 109873.

Manz A., Dittrich P.S., Pamme N., Iossifidis D., Bioanalytical chemistry, Second edition, Imperial College Press, London, 2015.

Mikkelsen S.R., Corton E., Second edition, Bioanalytical chemistry, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2016.

Mirceski V., Gulaboski R., Lovric M., Bogeski I., Kappl R., Hoth M., Square-wave voltammetry: a review on the recent progress, *Electroanalysis* 25 (2013) 2411–2422.

Modi A.M, Kiourkas R.D., Li J., Scott J.B., Reliability of smartphone pulse oximetry in subjects at risk for hypoxemia, *Respiratory Care* 66 (2021) 384–390.

Pavlic M., Grubwieser P., Libiseller K., Rabl W., Elimination rates of breath alcohol, *Forensic Science International* 171 (2007) 16–21.

Petković M.Đ., Upoređivanje rezultata analiza bubrežnih i žučnih kamena dobivenih različitim metodama, *Diplomski rad, PMF, Univerzitet u Novom Sadu*, 1997.

Pourkarim F., Rahimpour E., Jouyban A., Analytical techniques for the determination of verapamil in biological samples and dosage forms: An overview, *Bioanalysis* 11 (2019) 2189–2206.

Qaid M.M., Abdelrahman M.M., Role of insulin and other related hormones in energy metabolism—A review, *Cogent Food & Agriculture* 2 (2016) 1267691.

Rajšić I., Javorac D., Tatović S., Repić A., Đukić-Ćosić D., Đorđević S., Lukić V., Bulat Z., Effect of urine adulterants on commercial drug abuse screening test strip results, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 71 (2020) 87–93.

Ribeiro J.A., Fernandes P.M.V., Pereira C.M., Silva F., Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters: A review, *Talanta* 160 (2016) 653–679.

Sameh R., Genedy M., Abdeldayem A., Abdel azeem M.H., Design and implementation of an SpO₂ based sensor for heart monitoring using an Android application, *Journal of Physics: Conference Series* 1447 (2020) 012004.

Schachl K., Alemu H., Kalcher K., Ježkova J., Švancara I., Vytřas K., Amperometric determination of hydrogen peroxide with a manganese dioxide-modified carbon paste electrode using flow injection analysis, *Analyst* 122 (1997) 985–989.

Sneha Lakshmi R.P., A Review on Chromatography with high performance liquid chromatography (HPLC) and its functions, research & reviews, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 4 (2015) 1–15.

Sultana N., Saeed Arayne M., Waheed A., In vitro interaction studies of verapamil with quinolones using first order derivative UV spectrophotometry and RP-HPLC technique, *Journal of the Chilean Chemical Society* 56 (2011) 848–855.

Švancara I., Vytřas K., Kalcher K., Walcarius A., Wang J., Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis, *Electroanalysis* 21 (2009) 7–28.

Tajik S., Beitollahi H., Garkani Nejad F., Safaei M., Zhang K., Van Le Q., Varma R.S., Jang H.W., Shokouhimehr M., Developments and applications of nanomaterial-based carbon paste electrodes, *RSC Advances* 10 (2020) 21561–21581.

Tiwari P., Singh B.K., HPLC: A modern approach of development and validation, *World Journal of Pharmaceutical Research* 5 (2016) 1616–1631.

Uslu B., Ozkan S.A., Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals, *Analytical Letters* 40 (2007) 817–853.

Veal E.A., Day AM., Morgan B.A., Hydrogen peroxide sensing and signaling, *Molecular Cell* 26 (2007) 1–14.

Wani A.L., Ara A., Usmani J.A., Lead toxicity: a review, *Interdisciplinary Toxicology* 8 (2015) 55–64.

Wang J., *Analytical Electrochemistry*, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.

Wang J., Lu J., Hocevar S.B., Farias P.A.M., Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 3218–3222.

World Health Organization (2020). Brief guide to analytical methods for measuring lead in blood, 2nd ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/333914>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

Yoshida M.I., Gomes E.C.L., Soares C.D.V., Cunha A.F., Oliveira M.A., Thermal analysis applied to verapamil hydrochloride characterization in pharmaceutical formulations, *Molecules* 15 (2010) 2439–2452.

Zuba D., Accuracy and reliability of breath alcohol testing by handheld electrochemical analysers, *Forensic Science International* 178 (2008) e29–e33.

Извори слика:

Слика 1.1. Manz A., Dittrich P.S., Pamme N., Iossifidis D., *Bioanalytical chemistry*, Second edition, Imperial College Press, London, 2015, str. 145.

Слика 1.2. Manz A., Dittrich P.S., Pamme N., Iossifidis D., *Bioanalytical chemistry*, Second edition, Imperial College Press, London, 2015, str. 144.

Слика 1.3. <https://www.bosterbio.com/newsletter-archive/20170728-which-elisa> (online 15.09.2022)

Слика 1.4. <https://doctorlib.info/immunology/immunology-illustrated-outline/6.html> (online 15.09.2022)

Слика 1.5. A Manz A., Dittrich P.S., Pamme N., Iossifidis D., Bioanalytical chemistry, Second edition, Imperial College Press, London, 2015, str. 154.

Слика 1.6. <https://www.jobilize.com/microbiology/test/fill-in-the-blank-eias-and-elisas-by-openstax> (online 16.09.2022)

Слика 1.7. Johnson S., The home pregnancy test. In: 100 years of human chorionic gonadotropin: Reviews and New Perspectives, Eds: Cole L.A. and Butler S.A., 2020, 107–121.

Слика 1.8. https://m.setiascientific.com/index.php?ws=showproducts&products_id=2841960 (online 20.09.2022)

Слика 1.9. https://www.coretests.com/product/show_111.html (online 20.09.2022)

Слика 2.2. <https://www.adoc-pharma.com/sr/accu-chek-softclix-lancetar/> (online 05.10.2022)

Слика 2.3. <https://www.adoc-pharma.com/sr/accu-chek-active-aparat/> (online 05.10.2022)

Слика 2.4. <https://www.healthklin.com/accu-chek-active-strips-50> (online 06.10.2022)

Слика 3.1. Azhari A., Yoshimoto S., Nezu T., Iida H., Ota H., Noda Y., Araki T., Uemura T. and Sekitani T., A patch-type wireless forehead pulse oximeter for SpO₂ measurement, 2017 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS) (2017) 1–4.

Слика 4.1. <https://www.syracuse.com/living/2020/01/1949-3-syracuse-journalists-test-the-first-breathalyzer-the-drunkometer.html> (online 10.10.2022)

Слика 4.2. <https://www.frontline-safety.co.uk/blog/drager-alcotest-breathalyser-range-what-are-the-differences/> (online 10.10.2022)

Слика 4.3. <https://alcoprevention.com/en/product/redline/> (online 11.10.2022)

Слика 6.2. Curulli A., Electrochemical biosensors in food Safety: challenges and perspectives, Molecules 26 (2021) 2940.

Слика 7.1. Wang J., Analytical Electrochemistry, Third Edition, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2006, str. 87.

Слика 8.1. Beyene N.W., Kotzian P., Schachl K., Alemu H., Turkušić E., Chopra A., Moderegger H., Švancara I., Vytrás K., Kalcher K., (Bio)Sensors based on manganese dioxide-modified carbon substrates: retrospections, further improvements and applications, Talanta 64 (2004) 1151–1159.

Слика 9.2. Sneha Lakshmi R.P., A Review on chromatography with high performance liquid chromatography (HPLC) and its functions, research & reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis 4 (2015) 1–15.

