

# Kvantitativno određivanje fenola iz uzoraka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode

---

**Perković, Andrea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:235952>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-31**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Andrea Perković**

**KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE FENOLA IZ UZORAKA KRVI I  
MOKRAĆE PRIMJENOM GC-MS METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2017./18.**

**Mentor:**

**prof.dr.sc. Davorka Sutlović**

**Split, rujan 2018. god.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Andrea Perković**

**KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE FENOLA IZ UZORAKA KRVI I  
MOKRAĆE PRIMJENOM GC-MS METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2017./18.**

**Mentor:**

**prof.dr.sc. Davorka Sutlović**

**Split, rujna 2018. god.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Nastavni predmet:** Farmaceutska toksikologija

**Tema rada** prihvaćena je na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** prof. dr.sc. Davorka Sutlović, dipl.ing.

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl.ing.

### KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE FENOLA IZ UZORAKA KRV I MOKRAĆE PRIMJENOM GC-MS METODE

Andrea Perković, broj indeksa: 104

#### Sažetak:

**Ciljevi istraživanja:** Razviti metodu određivanja fenola plinskom kromatografijom s masenim detektorom, ispitati optimalne uvjete rada GC-MS-a pri kojima je moguća kvantifikacija fenola te odrediti koncentraciju fenola u biološkom uzorku mokraće.

**Mjesto istraživanja:** Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC Split.

**Materijali i metode:** Pripremljena su četiri miksa standardnih otopina postupnim razrjeđivanjem fenola s kloroformom. Odabrane su tri skupine instrumentalnih parametara (metoda 1, 2 i 3) kako bi se utvrdilo kojom metodom se dobije najbolji odziv signala na kromatogramu. U tri biološka uzorka mokraće dodan je proizvoljno određen volumen MIX-a 2. Uzorci su za analizu obrađeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi, SPE, i analizirani na GC-MS-u.

**Rezultati:** Provedenom analizom jednake koncentracije standarda najbolji odziv signala na detektoru ostvaren je metodom 3 s parametrima analize: volumen injektiranja:1 µl, temperatura injektora:250 °C, protok plina nosioca:1,54 ml/min i ukupno trajanje temperaturnog programa:10 minuta (60 °C 1 minutu, 10 °C/min do 170 °C). Analizom uzoraka mokraće uspješno je detektiran i kvantificiran fenol u dva od tri uzorka. Dobivena koncentracija fenola u uzorku 1 bila je 593,74 ng/ml, a u uzorku 2 1080 ng/ml.

**Zaključak:** Odabranim instrumentalnim parametrima moguće je detektirati i kvantificirati fenol iz bioloških uzoraka mokraće. SPE je vrlo dobra tehnika predobrade uzorka, ali su potrebne dodatne analize da bi se utvrdila količina nečistoća koje mogu interferirati u analizi. Osim toga, potrebno je provesti dodatne analize kako bi se potvrdila primjenjivost same metode na realne biološke uzorke mokraće.

**Ključne riječi:** fenol, mokraća, GC-MS

**Rad sadrži:** 49 stranica, 17 slika, 5 tablica, 34 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav povjerenstva za obranu:

- |  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. Prof. dr. sc. Marija Definis-Gorjanović | predsjednica Povjerenstva |
| 2. Doc. dr. sc. Ivana Mudnić               | član                      |
| 3. Prof. dr. sc. Davorka Sutlović          | član-mentor               |

**Datum obrane:** 27.09.2018.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical sciences

**Scientific field:** Pharmacy

**Course title:** Pharmaceutical toxicology

**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, and Faculty Council of School of Medicine.

**Mentor:** Davorka Sutlović. PhD, full prof.

**Technical assistance:** Maja Veršić Bratinčević, PhD

### QUANTIFICATION OF PHENOL IN BLOOD AND URINE SAMPLES BY USING GC-MS METHOD

Andrea Perković, index number: 104

#### Summary:

**Objectives:** Objectives of this study were to develop a method for determination of phenol with gas chromatography-mass spectrometry, determine optimal parameters of the instrument and to quantify the phenol in three different biological samples of urine by using the selected method.

**Settings:** LABORATORY OF TOXICOLOGY, DEPARTMENT OF PATHOLOGY, MEDICINE AND CYTOLOGY, University Hospital of Split.

**Materials and methods:** Four mixes of standard solutions were prepared by gradually diluting phenol with chloroform. Three different groups of instrumental parameters were selected (method 1, 2 and 3) to determine which method gives the best signal on the chromatogram. A voluntary defined volume of MIX 2 was injected in three urine samples. The samples were prepared for the analysis by using solid phase extraction and analyzed with GC-MS method.

**Results:** By analysing three equal concentrations of standard solution using all three methods, it was noticed that method 3 gives the best signal on the detector. Parameters of analysis for method 3 were: injection volume: 1  $\mu$ l, injector temperature: 250 °C, carrier gas flow (helium): 1,54 ml/min, program time: 10 minutes (60 °C for 1 minute and 10 °C per minute til 170 °C). Two out of three urine samples were successfully detected and quantified with phenol. Sample 1 had the phenol concentration of 593,74 ng/ml and sample 2 1080 ng/ml.

**Conclusion:** It is possible to detect and quantify the phenol from the biological samples of urine by using selected method 3. SPE is a good technique of sample preparation, but additional analysis are necessary to establish the quantity of interferences that drop behind and can affect the analysis. It is also necessary to carry out additional analysis on real biological samples to be able to confirm these techniques of sample preparation and analysis.

**Key words:** phenol, urine, GC-MS

**Thesis contains:** 49 pages, 17 figures, 5 tables, 34 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Marija Definis-Gorjanović- PhD - full prof. | Chair person |
| 2. Ivana Mudnić – PhD – assistant prof.        | Member       |
| 3. Davorka Sutlović - PhD- full prof.          | Supervisor   |

**Defence date:** September 27<sup>th</sup> 2018

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## Sadržaj:

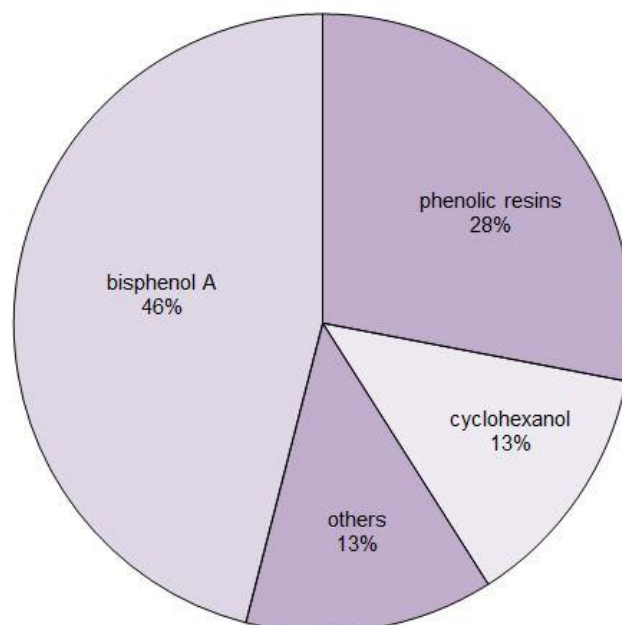
1. UVOD.....	1
1.1. Opće karakteristike fenola.....	2
1.1.1. Utjecaj fenola na ljudski organizam.....	3
1.2. Toksikologija fenola.....	3
1.3. Određivanje fenola u biološkim uzorcima.....	5
1.4. Metode određivanja.....	8
1.4.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi.....	8
1.4.2. Plinska kromatografija.....	10
1.4.3. Masena spektrometrija.....	11
1.4.4. Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom.....	11
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Uzorci.....	17
3.1.1. Priprema standardnih otopina fenola.....	17
3.1.2. Uzorci za kvantitativnu analizu fenola u mokraći.....	18
3.2. Kemikalije korištene u eksperimentalnom radu.....	19
3.3. Postupak pripreme uzorka za analizu ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE).....	19
3.4. Instrumentalna analiza GC-MS metodom.....	20
3.4.1. Radni uvjeti GC-MS-a za analizu.....	21
4. REZULTATI.....	23
7. RASPRAVA.....	33
8. ZAKLJUČCI.....	37
8. LITERATURA.....	39
8. SAŽETAK.....	43
9. SUMMARY.....	46
10. ŽIVOTOPIS.....	49

## **1. UVOD**

## 1.1. Opće karakteristike fenola

Fenol, poznat još i kao karbolna kiselina ili hidroksibenzen, je u svom čistom stanju u obliku bezbojne do bijele krutine, a u komercijalnom obliku se najčešće koristi kao tekućina karakterističnog, neugodnog, slatkastog mirisa koji podsjeća na katran (1). Zajedno sa svojim metabolitima je sastavni dio ljudskog organizma pa se tako fenol fiziološki u mokraći može pronaći u koncentracijama 5-10  $\mu\text{g/ml}$ , a jedan od metabolita, npr. p-krezol, u koncentraciji 20-200  $\mu\text{g/ml}$  (2). Fenol se može dobiti iz prirodnih izvora razgradnjom organskih materijala, ali najveća količina se ipak dobija kemijskom sintezom.

Primjena fenola nalazi svoje mjesto u industriji, medicini i kozmetici. U industriji se fenoli koriste za proizvodnju fenolnih smola koje se primjenjuju u građevini, proizvodnji uređaja, automobila i drvnih prerađevina. Nadalje, fenoli se koriste za proizvodnju bisfenola A, koji služi kao polazni spoj u sintezi plastike, i cikloheksanola, kaprolaktama i anilina koji se koriste u industriji najlona i boja. U medicini se u malim koncentracijama (do 2,5% u EU) koristi kao sastavni dio kapi za nos i uši, pastila za grlo, vodica za usta, ljekovitih masti i balzama te kao antiseptik i dezinficijens. Kozmetički proizvodi poput lakova za nokte, boja, odstranjivača laka i boje, šampona i sapuna prema propisima EU mogu sadržavati do 1% fenola u svom sastavu (3). Važno je naglasiti i da su fenoli prisutni u duhanskom dimu te u prehrambenim proizvodima napravljenim od dimljenog mesa i ribe (1).



**Slika 1.** Primjena fenola (4)



### 1.1.1. Utjecaj fenola na ljudski organizam

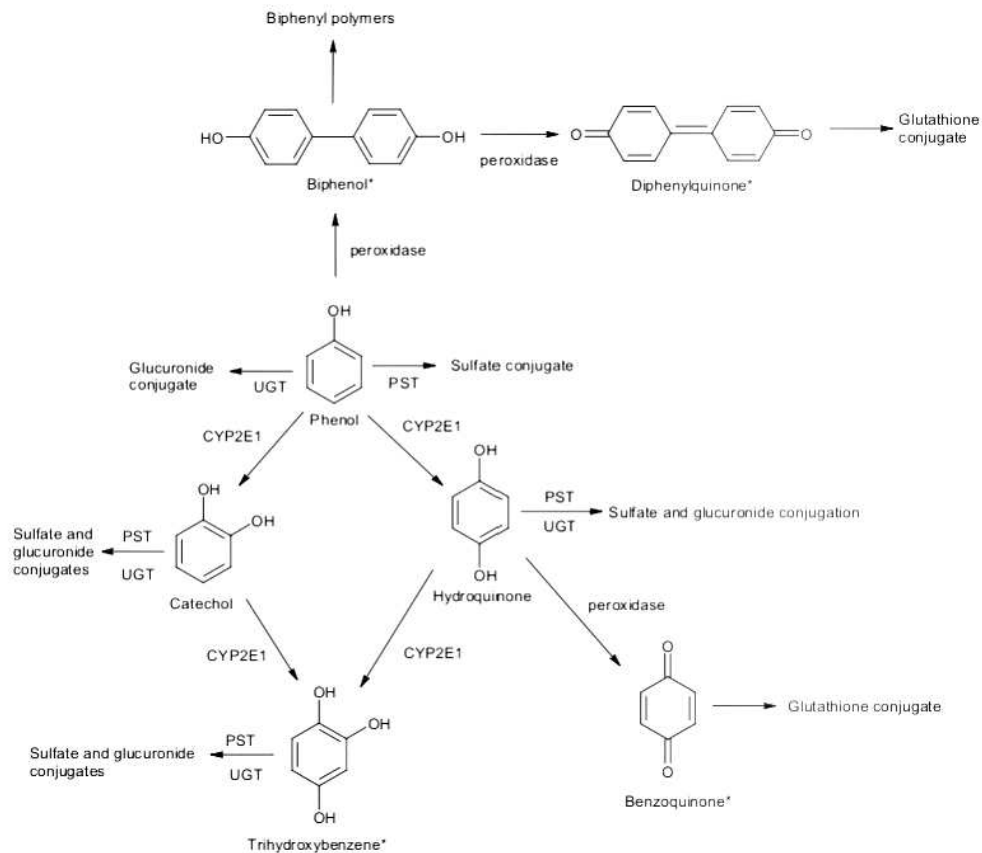
Fenol već u niskim koncentracijama može imati nepovoljan utjecaj na ljudski organizam, pa se tako radnici koji imaju poslove u industriji automobila, nafte, boja, najlona, plastike i herbicida nalaze u neposrednoj opasnosti od otrovanja fenolom bilo putem oralne primjene, preko kože, očiju ili inhalacijom. Kako bi se spriječilo moguće otrovanje, potrebno je postaviti limite koncentracije fenola kojoj radnici mogu biti izloženi u svojoj radnoj okolini, pa tako, prema Američkoj agenciji za zaštitu i prevenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control and Prevention, CDC*), granica dugotrajne izloženosti fenolu za radno vrijeme od 8 sati iznosi  $7,8 \text{ mg/m}^3$ , dok je granica kratkotrajne izloženosti postavljena na  $16 \text{ mg/m}^3$  za vremenski period od 15 minuta (5).

### 1.2. Toksikologija fenola

Prema ATSDR-u (engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) i NIOSH-u (engl. *National Institute for Occupational Safety and Health*) fenol se svrstava u vrlo toksične tvari koje imaju potencijal vrlo ozbiljno naštetiti ljudskom zdravlju. Čimbenici poput: doze fenola, trajanja izloženosti, načina unosa fenola u organizam, životnog stila, prehrane, dobi i spola mogu utjecati na očitovanje toksičnih posljedica na organizam, a prema literaturnim podacima, već količina od 1 do 15 g ( $14\text{-}214 \text{ mg/kg}$  tjelesne težine na dan) oralno unesenog fenola može imati letalni učinak na čovjeka pa se u literaturi može pronaći da je smrt nastupila čak 10 minuta nakon  $4,8 \text{ g}$  oralno unesenog fenola (6).

Zahvaljujući svom lipofilnom karakteru, fenol se, nakon inhalacije, ingestije ili kroz kožu, vrlo brzo apsorbira, metabolizira reakcijama konjugacije i oksidacije (Slika 2) te raspoređuje u organizmu, gdje ostvaruje svoje toksične učinke (7). Fenol podliježe opsežnoj biotransformaciji prvog prolaska, brzo se konjugira s glukuronskom kiselinom ili sulfatom (8). Preostali fenol može se dalje transformirati oksidativnim metabolizmom kojim nastaju hidrokinon i katehol. Metabolizam fenola je saturabilan i prema podacima iz eksperimentalnih studija na ljudima i životinjama, pri manjim dozama dominantni je put konjugacija sa sulfatom, dok se povećanjem doze povećava i udio konjugacije s glukuronskom kiselinom, a također i udio oksidativnog metabolizma (9).

Dovodi do denaturacije proteina, pucanja disulfidnih veza između stanica keratina u koži, stvaraju se reaktivni metaboliti koji se vežu na proteine u tkivima i plazmi i dovode do koagulacijske nekroze, a uzrokuje i depresiju središnjeg živčanog sustava koja je često posljedica akutne izloženosti u visokim koncentracijama. Organski sustavi koji su najviše pogođeni toksičnošću fenola su koža, pluća, kardiovaskularni sustav, bubrezi i središnji živčani sustav (6).



**Slika 2.** Biotransformacija fenola u organizmu (10)

Kratkotrajna izloženost visokim koncentracijama fenola može dovesti do ozbiljne iritacije i opekline na koži, očima, plućima, u ustima i grlu, što za posljedicu može imati oštećenje vida i organa gastrointestinalnog sustava, nedostatak daha, kašalj, oštećenje i nakupljanje vode u plućima. Simptomi po kojima se također može posumnjati na akutno otrovanje fenolom uključuju glavobolju, mučninu, povraćanje, vrtoglavicu, nesvjesticu, tamnu mokraću i plavu boju usana i dijelova kože, koja je posljedica smanjenog transporta kisika u krvi (3, 11).

Kronično trovanje fenolom se najčešće povezuje s profesionalnom izloženošću radnika u svojoj radnoj okolini, gdje su oni u neposrednom dodiru s manjim koncentracijama fenola, ali duži vremenski period (nekoliko mjeseci do nekoliko godina), te dolazi do akumulacije fenola u tijelu. Dugotrajno nakupljanje fenola u organizmu dovodi do postupnog smanjenja tjelesne težine, povećane proizvodnje sline, slabosti i boli u mišićima, upale, iritacije i žućkastog obojenja kože, povećanih vrijednosti jetrenih enzima, gastrointestinalnih problema poput proljeva i iritacije crijeva te do vrlo ozbiljnih kardiovaskularnih bolesti kao što su aritmija i ishemija srca (3).

### 1.3. Određivanje fenola u biološkim uzorcima

Ulaskom u organizam fenol se vrlo brzo metabolizira i raspodjeljuje u tjelesne tekućine poput krvi i mokraće iz kojih se mogu izuzeti uzorci za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenola u organizmu. Primarno mjesto eliminacije fenola je mokraća te se prema studiji iz 1983. godine (Tesarova i Packova) u izloženih osoba može odrediti u koncentracijama 20-200 mg/l (12). Iako poluvijek eliminacije fenola ovisi o samom organizmu, dozi i mjestu kontakta, procjenjuje se da je to vrijeme za fenol od 1 do 4,5 sata pa se unosom 0,01 mg/kg tjelesne težine u 24 h izluči 90% fenola. Manji dio fenola se izlučuje u fecesu i izdahnutom zraku (6). Biološke tekućine su složeni uzorci i u organizmu fenol može postojati kao metabolit drugih spojeva ili sastavni dio unesene hrane pa je često vrlo teško pronaći metodu koja će istovremeno biti osjetljiva, selektivna, jednostavna i brza za odrediti onu koncentraciju fenola nastalu vanjskim izlaganjem, bilo u radnoj okolini ili slučajnom unosom (13).

Za određivanje fenola u mokraći potrebno je odrediti vrstu analize i postaviti uvjete koji će omogućiti dobijanje najboljih rezultata. U Tablici 1 su, prema smjernicama ATSDR-a, sažete neke od metoda koje se koriste u svrhu određivanja koncentracije fenola u uzorcima mokraće (12). Uočeno je da je najčešće korištena metoda plinska kromatografija te da se od autora do autora razlikuje u pripremi uzorka i uvjetima analize. Za pripremu uzorka najčešće se u literaturi mogu pronaći različite metode ekstrakcije koje se kasnije kombiniraju s kromatografskim tehnikama. Tako se npr. može koristiti ekstrakcija tekuće-tekuće (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*) s toluenom, ekstrakcija na čvrstoj fazi (*Solid-Phase Extraction, SPE*) gdje postoji niz koraka pripreme uzorka, ili mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (*Solid-Phase Microextraction, SPME*) koja se temelji na ravnoteži analita između uzorka i čvrste faze na kvarcnim vlaknima. Prilikom analize važno je paziti koja se otapala koriste (npr. sulfatna, perklorna ili klorovodična kiselina) i pri kojoj se temperaturi radi. To je važno kako bi se osiguralo kvantitativno područje određivanja koncentracija te kako ne bi došlo do raspadanja drugih fenolnih ili fenolu sličnih supstancija koje bi mogle interferirati u analizi i onemogućiti kvantifikaciju fenola. Ti različiti parametri analize utječu na granicu detekcije, odnosno na onu najmanju koncentraciju fenola u nekom uzorku koju je moguće odrediti s određenom metodom. U Tablici 1 vide se podaci za isti instrument, npr. plinski kromatograf s plamenoionizacijskim detektorom (*engl. Gass Chromatography-Flame Ionization Detector, GC-FID*), ali za različite uvjete pripreme uzorka, gdje su i različite granice detekcije (raspon od 0,5 µg/ml do 0,1 mg/l). Osim GC-FID-a, za određivanje fenola u mokraći koristi se i plinska kromatografija s masenim detektorom (GC-MS), koja može biti udružena i s negativnom ionskom kemijskom ionizacijom (*engl. Negative Chemical Ionization-Gass Chromatography-Mass Spectrometry, NCI-GC-MS*), zatim spektrofotometrija koja nije povoljna za određivanje smjesa, nego samo jednokomponentnih uzoraka koji će imati absorbanciju na točno određenoj valnoj duljini, i na kraju visokoučinkovita tekućinska kromatografija (*engl. High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*), u Tablici 1 udružena s elektrokemijskim detektorom, koja bi mogla pružiti najbolju osjetljivost za kvantifikaciju fenola u biološkim uzorcima (limit detekcije 2 ng/injektiranju) (12, 13).

**Tablica 1.** Granice detekcije fenola iz uzorka mokraće obzirom na različite pripreme uzorka i različite instrumentalne tehnike (12)

UZORAK	ANALITIČKA METODA	PRIPREMA UZORKA	GRANICE DETEKCIJE	AUTORI
<b>MOKRAĆA</b>	1. GC-FID	1. Uzorak s dodanim unutarnjim standardom se ekstrahira s etil-acetatom i ekstrakt se analizira	0,1 mg/l	Handson i Hanrahan 1983.
	2. GC-FID	2. Uzorak se miješa s fosfornom kiselinom i zbog hidrolize konjugata pušta kroz pretkolonu na 165°C (slobodni i konjugirani fenol) i analizira	N	Baldwin i sur. 1981.
	3. GC-FID	3. Uzorak se hidrolizira na sobnoj temperaturi i ekstrahira s metil-terc-butil-eterom (ukupni fenol) i analizira	N	Rick i sur. 1982.
	4. GC-FID	4. Uzorak s dodanim unutarnjim standardom se hidrolizira s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> i ekstrahira s etil-acetatom (sl. i konj.) i analizira	N	Needham i sur. 1984.
	5. GC-FID	5. Uzorak s dodatkom unutarnjeg standarda se destilira s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> u posebnoj aparaturi i destilat se direktno ubacuje u GC (sl. i konj.)	0,1 mg/l	Van Roosmalen i sur. 1981.
	6. GC-FID	6. Dva uzorka MOKRAĆAa (prije i nakon izlaganja) se hidroliziraju s HCl ili perklornom kiselinom, ekstrahira s dietil-eterom i direktno injektira u GC	0,5 µg/ml	NIOSH 1994.
	7. Spektrofotometrija	7. Uzorak se zagrijava pod povratnim hladilom s HClO <sub>4</sub> , otapalo se ekstrahira, koncentrira i razdvaja TLC-om Razvijanje kromatograma s p-nitro-benzendiazonij fluoroboratom, uklanja se kvantitativno i otapalo ekstrahira i analizira	N	Bienick i Wilczok 1986.
	7. Spektrofotometrija	7. Zakiseljena struja uzorka se destilira, reagira s amonijakom, N-kloro-sukcinimidom i Na-nitroprusidom u baznom pH i	0,3 mg/l	Amlathe i sur. 1982.

		analizira		
	8. HPLC-elektrokemijski detektor	8. Uzorak se inkubira s glukuronidazom i sulfatazom na pH 5 i 3,7 °C, dodaje se H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> i destilira i analizira	2 ng/injekciji	Schaltenbrand i Coburn 1985.
	9. LLE-GC-MS	9. Uzorak se podvrgava hidrolizi s vrućom kiselinom i zatim ekstrahira s toluenom i stavlja na analizu u aparat	N	M.-R. Lee
	10. NCI-GC-MS	10. Konjugati fenola se hidroliziraju kiselinom do slobodnog fenola, ekstrahira se s toluenom i derivatizira do penta-fluorobenzol ester derivata	1 ng/ml	

Značenje kratica: GC-FID (Gas Chromatography-Flame Ionization Detector); HPLC (High Performance Liquid Chromatography); LLE-GC-MS (Liquid-Liquid Extraction-Gas Chromatography-Mass Detector); NCI-GC-MS (Negative Ion Chemical Ionization-GC-MS); N=nepoznato

ATSDR u svojim podacima, što se vidi iz Tablice 2, za određivanje fenola u krvi, navodi samo GC-FID tehniku, iako se iz literature može utvrditi da se koriste i već navedene tehnike u Tablici 1, ali uz drugačiji postupak pripreme uzorka. U pripremi uzorka krvi često se koriste enzimi β-glukuronidaza i sulfataza kako bi se odvojio konjugirani od slobodnog fenola i time olakšala analiza i tumačenje rezultata.

**Tablica 2.** Analiza fenola u uzorku krvi (12)

UZORAK	ANALITIČKA METODA	PRIPREMA UZORKA	GRANICE DETEKCIJE	AUTORI
KRV	1. GC-FID	1. Uzorak se ekstrahira s etil-acetatom, ekstrakt se koncentrira i analizira (sl.fenol) Stavlja se s krvnim stanicama koje su prethodno odvojene i inkubirane s β-glukuronidazom i sulfatazom na 37 °C, ekstrakt se koncentrira i analizira	<1 mg/ml	O'Grodnick i sur. 1983.
	2. GC-FID	2. Uzorak s dodanim unutarnjim standardom se ekstrahira s etil-acetatom te se ekstrakt koncentrira i analizira	0,1 mg/l	Handson i Hanrahan 1983.

## 1.4. Metode određivanja

Priprema uzorka je vrlo važan korak u cjelokupnoj analizi kako bi se iz kompleksnog biološkog uzorka poput mokraće omogućilo dobijanje najboljih, odnosno napreciznijih rezultata. U svakom biološkom materijalu postoje endogene komponente koje mogu interferirati s analitom te tako utjecati na rezultate analize. Kako bi se izbjegao taj utjecaj i kako bi rezultati bili što vjerodostojniji, prije analize je potrebno ukloniti interferencije i koncentrirati analit jer su koncentracije u uzorcima za analizu često vrlo niske (14).

U ovom radu se za pripremu uzoraka za analizu koristila tehnika ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE), a sama instrumentalna analiza se odvijala metodom plinske kromatografije s masenim detektorom (GC-MS).

### 1.4.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija je proces u kojem dolazi do odvajanja određenih komponenti smjese na temelju njihove različite razdiobe između dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Proces ekstrakcije koristan je alat toksikoloških analiza jer omogućava odvajanje analita od interesa iz različitih složenih uzoraka, što naposljetku dovodi do koncentriranja analita i točnijih rezultata analize. Jedna od najčešćih metoda ekstrakcije za pripremu uzorka za analizu je ekstrakcija na čvrstoj fazi.

Ekstrakcijom na čvrstoj fazi najčešće se odjeljuju organski spojevi iz biološkog materijala na temelju njihovih različitih afiniteta za nosače koji se nalaze u komercijalnim kolonama. Kod SPE analit se razdjeljuje između tekuće i čvrste faze koja ima jači afinitet za analit, nego otapalo u kojem je on otopljen (14). Čvrsta faza zadržava analit, a ostale komponente se ispiru i ne zadržavaju se na nosaču, nego samo prolaze (15). Prema stacionarnoj fazi, ekstrakcija na čvrstoj fazi može biti obrnutih faza gdje se nepolarni analit zadržava na nepolarnoj stacionarnoj fazi, a mobilna faza kojom se ispiru je obično polarna (najčešće vodena), zatim normalnih faza gdje su i analit i stacionarna faza polarni, a mobilna faza je nepolarna (npr. aceton, heksan-organska otapala) i naposljetku ion-izmjenjivačka stacionarna faza koja zadržava analit na temelju suprotnih elektrostatskih privlačenja između naboja analita i naboja određenih funkcionalnih skupina koje su vezane za čvrstu fazu, odnosno negativno nabijeni analiti se vežu na pozitivno nabijenu čvrstu fazu i obrnuto (16). U početku razvoja ekstrakcije na čvrstoj fazi nosači su najčešće bili od prirodnih materijala poput silikagela, dok su se s unaprjeđivanjem tehnike pojavili i novi trendovi u razvoju samih nosača koji su komercijalno dostupni ovisno o uzorku za analizu. Tako postoje neki materijali koji imaju nisku specifičnost za analit poput kemijski vezanih silikata, poroznih polimera, nosača na bazi ugljika, ali postoje i visoko specifični nosači koji vežu određeni kemijski spoj ili funkcionalnu skupinu i to su npr. ionski izmjenjivači, nosači ograničenoga pristupa, makrociklički nosači, imunoafinitetni nosači, molekulski tiskani polimeri, nanostrukturirani nosači (17, 18).

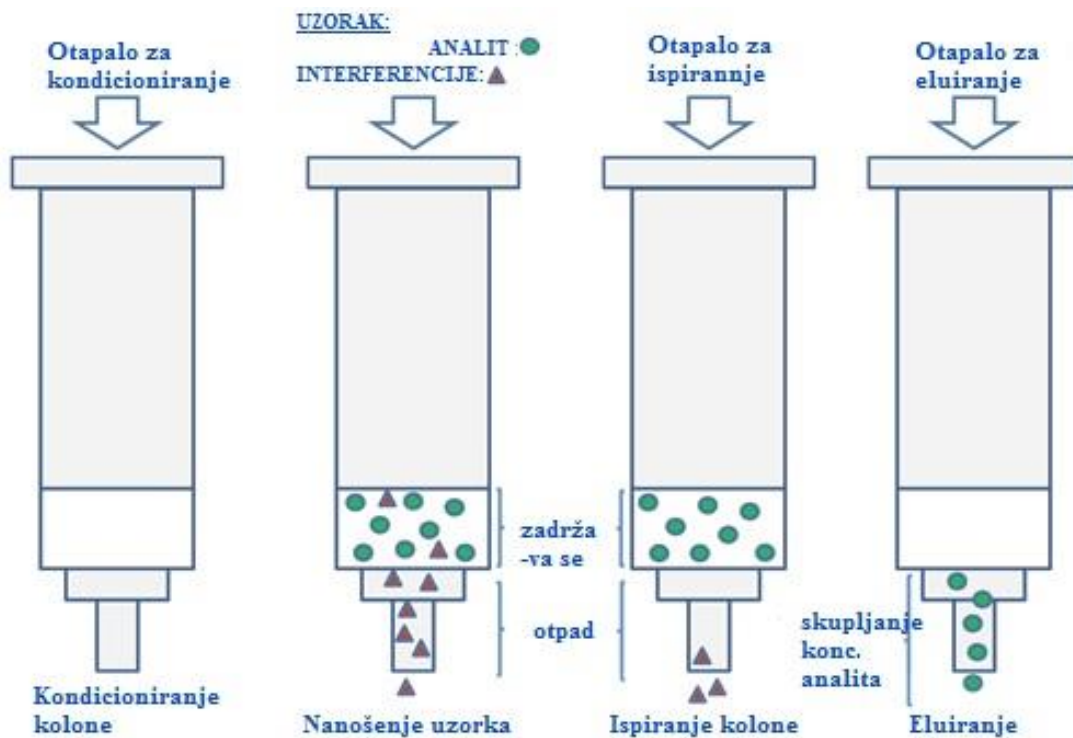
Proces ekstrakcije na čvrstoj fazi sastoji se od nekoliko koraka (Slika 3):

1. Kondicioniranje kolone podrazumijeva dodavanje male količine organskog otapala (npr. metanol) kako bi se namočila stacionarna faza te kako bi došlo do oslobađanja vezanih funkcijskih skupina, a zatim se dodaje voda kako bi se kolona pripremila za vodene uzorke.

2. Nanošenje uzorka na kondicioniranu kolonu pod laganim vakuumom gdje dolazi do vezanja analita na nosač u koloni.

3. Ispiranje kolone je korak u kojem se pokušava isprati što više nečistoća vezanih za nosač, a da se pri tome ne ispere analit. Pri tome je od iznimne važnosti odabir otapala koji će omogućiti što čistiji uzorak s minimalnim gubitkom analita od interesa.

4. Eluiranjem se pomoću snažnog otapala koje ima veći afinitet za analit nego za nosač u koloni, analit ispere s nosača i skuplja za analizu.



**Slika 3.** Proces ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE)

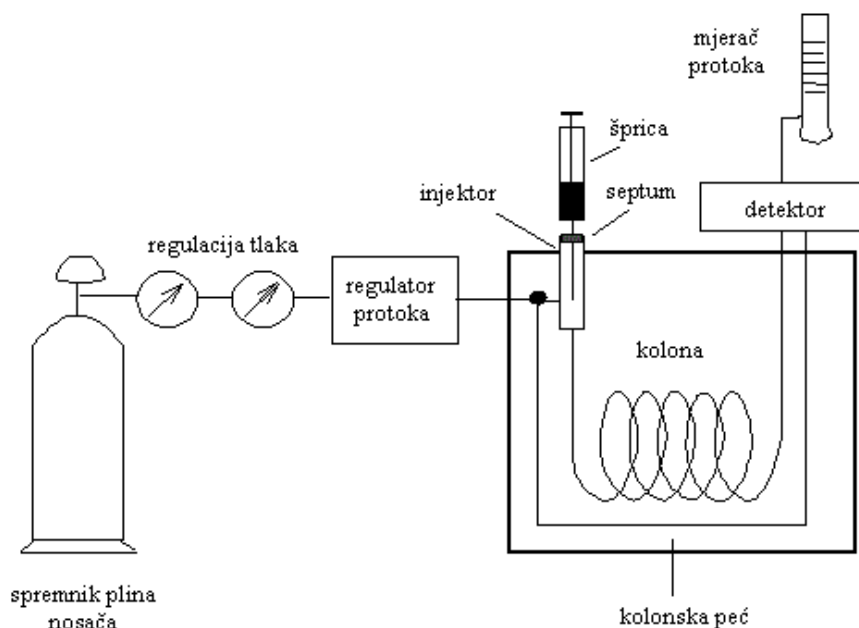
Ekstrakcija na čvrstoj fazi kao i svaka druga metoda ima svoje prednosti, ali i neke nedostatke. Obzirom na veliki izbor nosača i otapala koja se mogu koristiti za različite uzorke karakterizira je visoka selektivnost koja dovodi do čistih ekstrakata koji su dovoljno koncentrirani za daljnu analizu, a samim time i do reproducibilnijih rezultata. Zatim, sam proces ekstrakcije je prilično jednostavan, a vrlo lako može postati i automatiziran. Mali volumeni kolona i uzoraka ne zahtijevaju veliki utrošak organskih otapala što je iznimno

važno za smanjenje troškova, ali i očuvanje ekosustava (19). Nedostatci ove metode su mogućnost začepjenja pora nosača pa se prije nanošenja uzorka preporuča njegovo filtriranje i centrifugiranje i nestabilnost silika gela u alkalnoj sredini (20)

### 1.4.2. Plinska kromatografija

Najčešće instrumentalne tehnike za analizu uzoraka u laboratorijima su kromatografske metode koje omogućuju odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje određenih kemijskih sastojaka u nekom uzorku. Karakterizira ih postojanje stacionarne i mobilne faze, koja se razlikuje ovisno o vrsti kromatografske tehnike (21). Uzorak se kroz kolonu raznosi mobilnom fazom, prolazi kroz stacionarnu fazu i ovisno o afinitetu pojedinih komponenti iz uzorka za stacionarnu fazu, one se razdjeljuju i u različitim vremenskim razmacima dolaze na detektor koji ih identificira.

Na Slici 4 je prikazana shema plinskoga kromatografa s najvažnijim djelovima: injektor, kromatografska kolona i detektor.



**Slika 4.** Shematski prikaz plinskoga kromatografa (22)

Plinska kromatografija (GC) je zbog svoje brzine, preciznosti i točnosti najčešće korištena kromatografska tehnika u analitičkoj kemiji. U plinskom kromatografu stacionarna faza je tekućina ili krutina smještena na inertnom nosaču stijenke kapilarne kolone, a mobilna faza je kemijski inertan plin (helij, dušik, argon, ugljični dioksid) koji raznosi uzorak po aparatu. Da bi se neki uzorak mogao uopće analizirati plinskom kromatografijom on se mora moći dovesti u plinovito stanje pri radoj temperaturi aparata (do 400 °C), a da pri tome ne



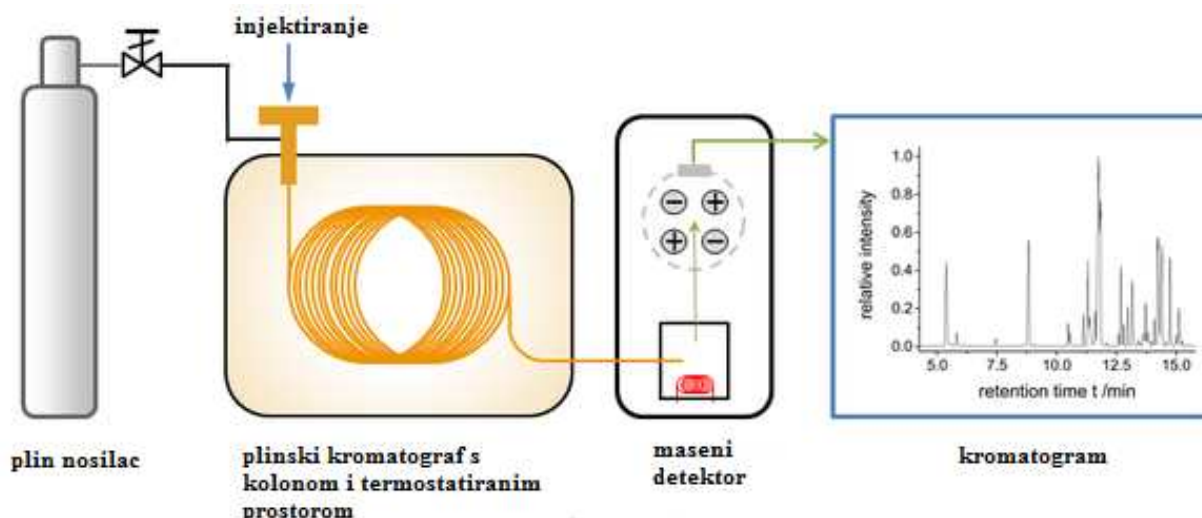
dode do njegove razgradnje. Nakon uparavanja, uzorak se injektira na početku kolone, raznosi se mobilnom fazom do stacionarne faze, gdje dolazi do odvajanja komponenti uzorka na temelju različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Nakon odvajanja komponente uzorka u različitim vremenima dolaze na detektor (23).

### 1.4.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je tehnika kojom se analiziraju i identificiraju molekule na temelju njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Prvi korak u analizi je ionizacija molekula u ionizatoru pri čemu nastaju molekulski ioni i nabijeni fragmenti koji se dalje provode u analizator koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu. On može biti kvadrupolni, ionska zamka, magnetski sektor, „time of flight“ i o njemu ovisi brzina skeniranja uzoraka. Iz analizatora, ioni idu na detektor gdje proizvode električni signal koji se može registrirati na pisaču, računalu ili nekom drugom uređaju (24). Maseni detektor može raditi u scan načinu, koji analizira sve  $m/z$  koji se nalaze u uzorku, i u SIM načinu (engl. *Selected Ion Monitoring*), koji analizira samo određene setove  $m/z$ , što omogućava veći signal u jedinici vremena, odnosno osjetljivost metode je puno veća (25)

### 1.4.4. Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS)

Potreba za jasnom identifikacijom komponenata u složenim biološkim i nebiološkim uzorcima dovela je do razvoja vezanih instrumentalnih tehnika, a jedna od takvih je široko i uspješno korištena plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*) (26). Ona je postala „zlatni standard“ za uspješno kvalitativno i kvantitativno analiziranje bioloških uzoraka, sredstava ovisnosti, otrova, medicinskih pripravaka, kako u forenzičkoj, tako i u kliničkoj analizi. GC-MS je analitička metoda koja objedinjuje plinsko-tekućinsku kromatografiju (odjeljuje pojedine komponente uzorka i kvantificira ih) i spektrometriju masa (identificira svaku od komponenata pojedinačno). Veza tih dviju tehnika međusobno povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost čime se omogućuje analitičkom kemičaru da istodobno može kvantitativno i kvalitativno učinkovito odrediti otopinu koja sadrži veliki broj hlapljivih i poluhlapljivih komponenata (27).



**Slika 5.** Shematski prikaz plinskoga kromatografa s masenim spektrometrom (GC-MS) (28)

Uzorak se injektira u plinski kromatograf, gdje se prvo prevodi u plinovito stanje, a zatim nošen strujom mobilne faze putuje do stacionarne faze u koloni i dolazi do međusobne interakcije stacionarne faze i uzorka. Svaka komponenta uzorka se različitom brzinom (afinitetom) vezuje za stacionarnu fazu pa će one koje najbrže stupaju u interakciju sa stacionarnom fazi izaći iz kolone prve (eluirat će se najbrže), i obrnuto. Osim vrste stacionarne faze, utjecaj na brzinu analize ima i temperatura pa će se povišenjem temperature one komponente koje imaju niže točke vrenja eluirati brže s kolone. Nakon elucije, razdvojene komponente putuju prema detektoru koji u njihovoj prisutnosti stvara elektronski signal, koji je veći, što je koncentracija komponente veća. Taj signal se zatim prikazuje u kompjuterskom programu i dobijamo kromatogram na kojem vidimo karakteristične pikove, koji predstavljaju signal koji se stvara kad se komponenta eluira s kolone i uđe u detektor. Na x-osi se nalazi retencijsko vrijeme, RT (vrijeme koje prođe od trenutka injektiranja uzorka do trenutka eluiranja, odnosno detekcije), a na y-osi je intenzitet signala koji je proporcionalan koncentraciji određene tvari (29).

Spektrometar masa prilikom svakog skeniranja stvara grafički prikaz. X-os predstavlja omjer mase i naboja ( $m/z$ ) karakterističan za određenu kemijsku skupinu, a y-os prikazuje intenzitet signala za svaku od komponenata koja je detektirana tijekom analize. Dobiveni maseni spektar je za određenu kemijsku tvar svaki put jednak pa se može kazati da je maseni spektar poput „otiska prsta“ pojedine molekule koji služi za identifikaciju. Kompjuterski programi su obično povezani s bibliotekama spektara koje služe kako bi se spektar iz baze usporedio s analiziranim uzorkom te daje listu mogućih identifikacija sa statističkim postotkom vjerojatnosti (30).

Dostupnost bogatih biblioteka spektara koje se stalno nadopunjuju i olakšavaju identifikaciju nepoznatog analita je jedna od glavnih prednosti GC-MS-a (29). Osim toga, visoka osjetljivost, preciznost, pouzdanost, selektivnost i male količine uzoraka potrebnih za analizu čine ovu tehnikom jednom od najkorištenijih u analitičkim laboratorijima.

Jedan od glavnih nedostataka ove metode je nešto složenija priprema samog uzorka za analizu, za razliku od npr. tekućinske kromatografije s masenim spektrometrom (*engl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS*) i visoke temperature u instrumentu koje onemogućavaju analizu termički labilnih spojeva koji se raspadaju pri visokim temperaturama. Nemogućnost ispitivanja nehljapljivih spojeva je također jedan od nedostataka ove metode (31).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

**Ciljevi ovoga rada bili su:**

1. Razviti metodu određivanja fenola plinskom kromatografijom s masenim detektorom.
2. Ispitati optimalne uvjete rada plinskoga kromatografa s masenim spektrometrom pri kojima je moguća kvantifikacija fenola u uzorku mokraće.
3. Odrediti razinu fenola (kvantifikacija) u biološkom uzorku mokraće.

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

### 3.1. Uzorci

Zbog jednostavnosti rukovanja biološkim uzorcima u ovom diplomskom radu obrađen je samo uzorak mokraće.

Za razvoj metode kojom se određivala količina fenola u mokraći pripremljena su četiri standarda otopine fenola s kloroformom, a za uzorak je uzet dobrovoljni uzorak mokraće studenta.

#### 3.1.1. Priprema standardnih otopina fenola

Standardne otopine fenola pripremljene su razrjeđivanjem otopine fenola s kloroformom na način prikazan u tablici 3. MIX 1, MIX 2 i MIX 3 prvo su injektirani u instrument u volumenima 0,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l i 2  $\mu$ l kako bi se vidjelo koja od tri postavljene metode daje najbolji odziv signala, odnosno koja je od tri metode najprikladnija za daljni eksperimentalni rad i određivanje koncentracije fenola u uzorku. Osim toga, iz MIX-a 3 injektirani su volumeni: 0,2  $\mu$ l, 0,3  $\mu$ l, 0,4  $\mu$ l, 0,6  $\mu$ l i 0,8  $\mu$ l kako bi se potvrdila najbolja metoda i odredile granice detekcije i kvantifikacije.

**Tablica 3.** Uzorci standarda za razvoj metode

Naziv uzorka	Sastav uzorka
1. MIX 1	995 $\mu$ l kloroform + 5 $\mu$ l fenol
2. MIX 2	900 $\mu$ l kloroform + 100 $\mu$ l MIX 1
3. MIX 3	900 $\mu$ l kloroform + 100 $\mu$ l MIX2
4. MIX 4	900 $\mu$ l kloroform + 100 $\mu$ l MIX3

Za određivanje koncentracije fenola koja se injektirala, pripremljena je smjesa otapala: fenol:kloroform:izoamil = 25:24:1. Koristeći gustoću fenola 1,07 g/cm<sup>3</sup> i poznati volumen fenola u MIX-u 1 od 5 µl izračunata koncentracija fenola u pojedinom MIX-u iznosila je:

- MIX 1: 2 675 000 ng/ml

- MIX 2: 267 500 ng/ml

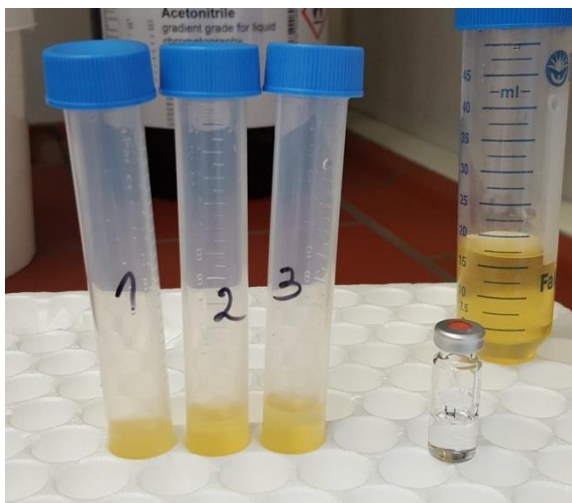
- MIX 3: 26 750 ng/ml

- MIX 4: 2 675 ng/ml

Iz MIX-a 3 i MIX-a 4 određene su baždarne krivulje. Iz MIX-a 3 pripremljene su koncentracije 2675 ng/ml, 5350 ng/ml, 10700 ng/ml, 16050 ng/ml, 21400 ng/ml, a iz MIX-a 4 267,5 ng/ml, 535 ng/ml, 1070 ng/ml, 1605 ng/ml i 2140 ng/ml.

### 3.1.2. Uzorci za kvantitativnu analizu fenola u mokraći

Kako prikazuje Slika 6, za kvantitativnu analizu fenola u mokraći uzeta su tri različita volumena mokraće u koje su dodani proizvoljno određeni volumen MIX-a 2 (prikaz u Tablici 4). Uzorci 1, 2 i 3 su pripremljeni metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi i kasnije analizirani plinskom kromatografijom s masenim detektorom. (MIX 2 je nasumično odabran za analizu).



**Slika 6.** Uzorci mokraće za kvantitativnu analizu fenola

**Tablica 4.** Uzorci za kvantifikaciju fenola

Uzorak	Volumen MIX-a 2
1. Uzorak 1	30 µl
2. Uzorak 2	10 µl
3. Uzorak 3	100 µl



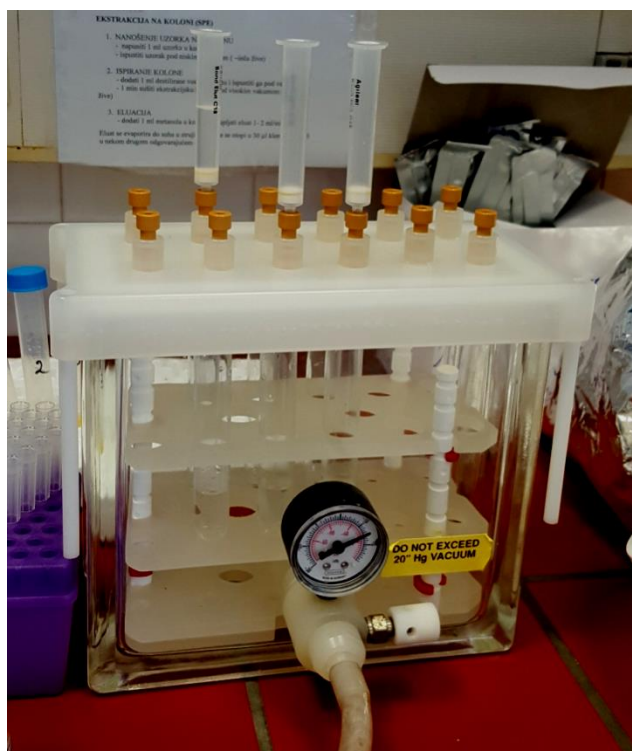
### **3.2. Kemikalije korištene u eksperimentalnom radu**

Popis kemikalija koje su korištene u eksperimentalnom radu:

- Fenol
- Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka
- Metanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka
- Diklormetan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka
- Fosfatni pufer (pH=6.90), Merck, Darmstadt, Njemačka
- Izoamil, Merck, Darmstadt, Njemačka

### **3.3. Postupak pripreme uzorka za analizu ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE)**

Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi proveden je preko Visiprep vakuum kade za ekstrakciju (Slika 7) uz pomoć komercijalnih kolona za SPE, C18 Bond Elut Certify tvrtke Agilent Technologies, SAD Supelco. Kolona za ekstrakciju se aktivirala i kondicionirala s 1 ml metanola i 1 ml fosfatnog pufera (pH=6,90), pazeći pritom da ne dođe do potpunog sušenja kolone prije nanošenja uzorka. Uzorak je zatim pod niskim tlakom (5 mm Hg) lagano propušten kroz kolonu. Nakon nanošenja uzorka, kolona je isprana s 1 ml fosfatnog pufera i ostavljena na sušenju 3 minute. Analit je na kraju eluiran s 2 ml diklormetana i ostavljen da ispari do suha u struji dušika. Suhi ekstrakt je otopljen u 1 ml diklormetana, nakon čega je prebačen u staklene tubice za GC-MS analizu.



Slika 7. Vakuum kada za ekstrakciju s kolonama

### 3.4. Instrumentalna analiza GC-MS metodom

Uzorci su analizirani plinskim kromatografom sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010 (Slika 8). Korištena je kapilarna kolona plinskog kromatografa, Restek, RTx-5MS, dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine filma nepokretne faze 0,25  $\mu\text{m}$ . Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GC-MS računalnim programom.



**Slika 8.** Plinski kromatograf sa spektrometrom masa; Shimadzu GCMS-QP2010

### 3.4.1. Radni uvjeti GC-MS-a za analizu

Za razvoj kvantitativne metode određivanja fenola u uzorcima mokraće postavljene su tri različite skupine programskih parametara analize:

Metoda 1:

- volumen injektiranja: 1  $\mu$ l (splitless)
- temperatura injektora: 250 °C
- protok plina nosioca: 1,2 ml/min
- ukupno trajanje temperaturnog programa: 10 minuta
  - 60 °C 1 minutu
  - 8 °C/min do 130 °C

Metoda 2:

- volumen injektiranja: 0,5  $\mu$ l (splitless)
- temperatura injektora: 250 °C
- protok plina nosioca: 0,6 ml/min
- ukupno trajanje temperaturnog programa: 10 minuta
  - 60 °C 0,7 minuta
  - 12 °C/min do 170 °C

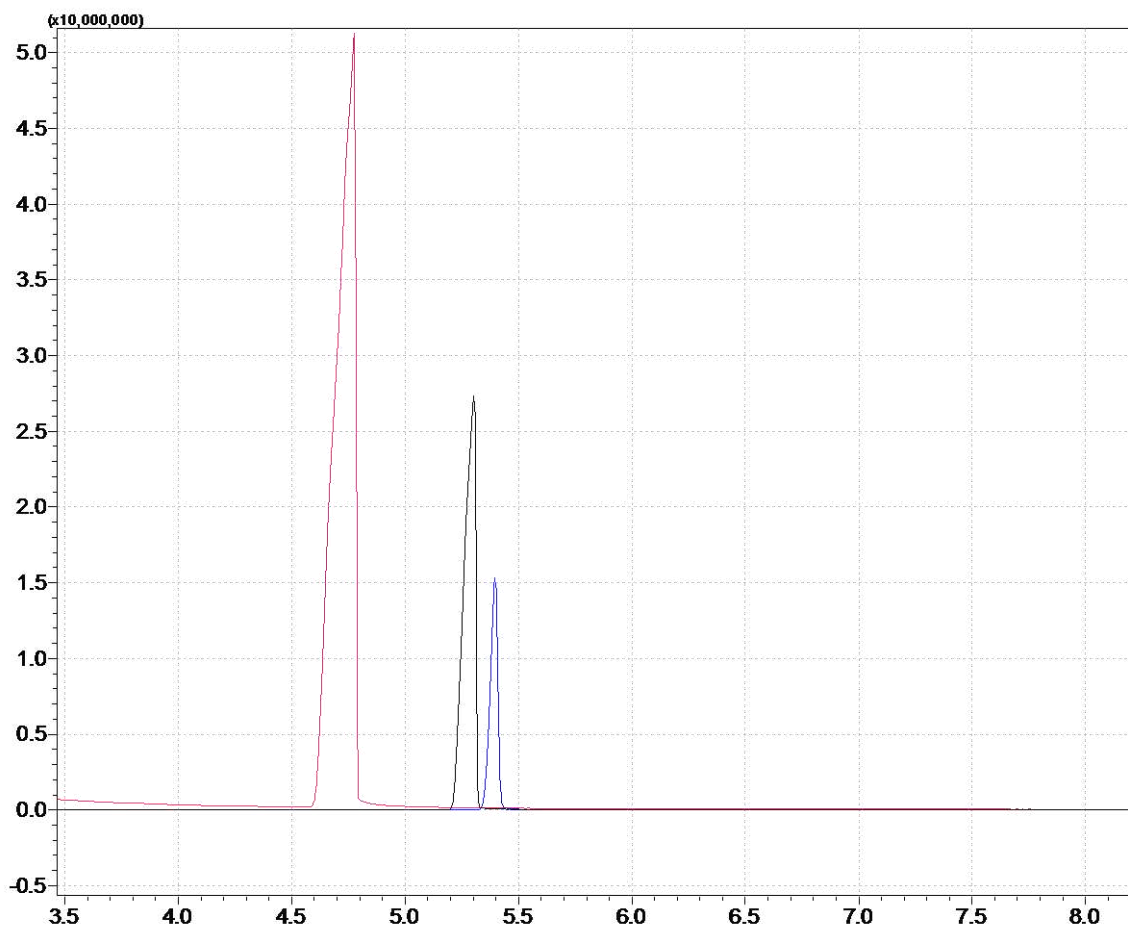
### Metoda 3:

- volumen injektiranja: 1  $\mu$ l (splitless)
- temperatura injektora: 250 °C
- protok plina nosioca: 1,54 ml/min
- ukupno trajanje temperaturnog programa: 10 minuta
  - 60 °C 1 minutu
  - 10 °C/min do 170 °C

Kromatografska analiza pripremljenih uzoraka izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (engl. *Total Ion Chromatogram, TIC*) u području od 40 - 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (engl. *Single Ion Monitoring, SIM*).

#### **4. REZULTATI**

Analizom dobivenih rezultata uočeno je da je metoda 3 najprikladnija za određivanje koncentracije fenola u uzorku urina, što se vidi iz Slike 9 i Slike 10. Na Slici 9 prikazana je usporedba sve tri metode ekstrakcije uzorka jednake koncentracije analita. Vidi se da su sva tri pika na kromatogramu ispala dobro, ali da je najveći signal dobijen metodom 3.



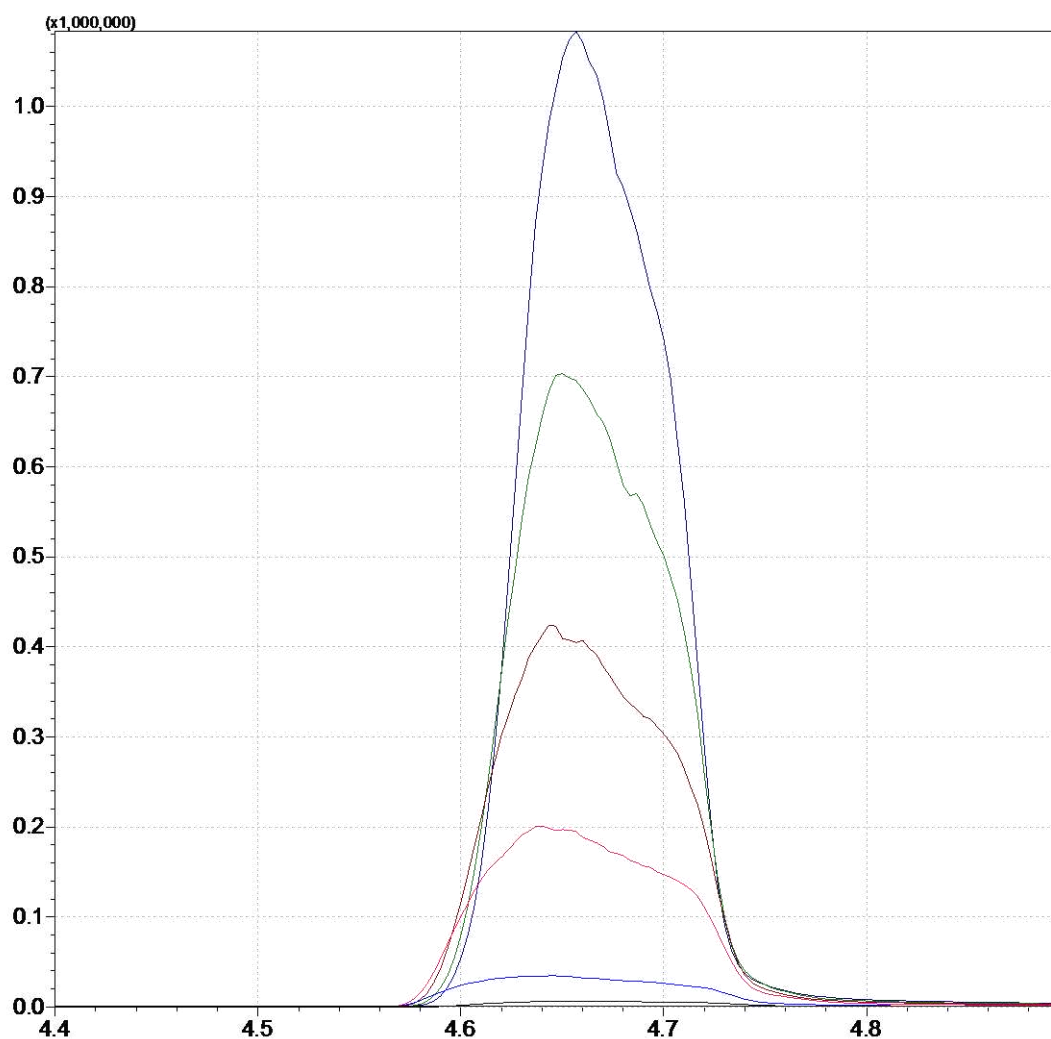
**Slika 9.** Slika prikazuje usporedbu tri postavljene metode za jednaku koncentraciju analita iz MIX-a 2 (metoda 1- crna linija, metoda 2- plava linija, metoda 3- roza linija)

-roza linija predstavlja metodu 3

-crna linija predstavlja metodu 1

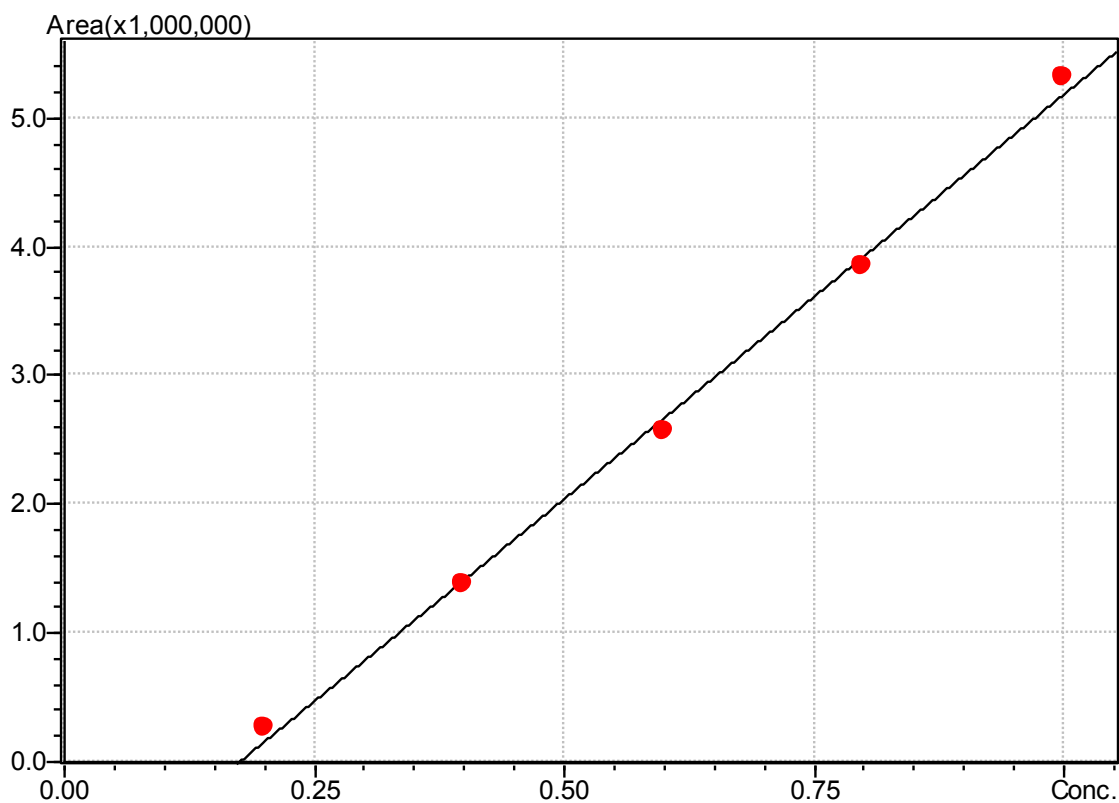
-plava linija predstavlja metodu 2

Slika 10 prikazuje usporedbu kromatograma za različite volumene injektiranja (0.1  $\mu$ l, 0.2  $\mu$ l, 0.4  $\mu$ l, 0.6  $\mu$ l i 0.8  $\mu$ l) za MIX 3 metodom 3, snimano u SIM načinu s postavljenim retencijskim vremenom od 4.4 do 4.9. Sukladno povećanju volumena injektiranja povećava se i odziv detektora (signal), koji je prikazan na y-osi kromatograma i u korelaciji je s koncentracijom fenola u uzorku. Na x-osi je prikazano retencijsko vrijeme fenola, odnosno vrijeme u kojem se fenol pojavljuje na detektoru.



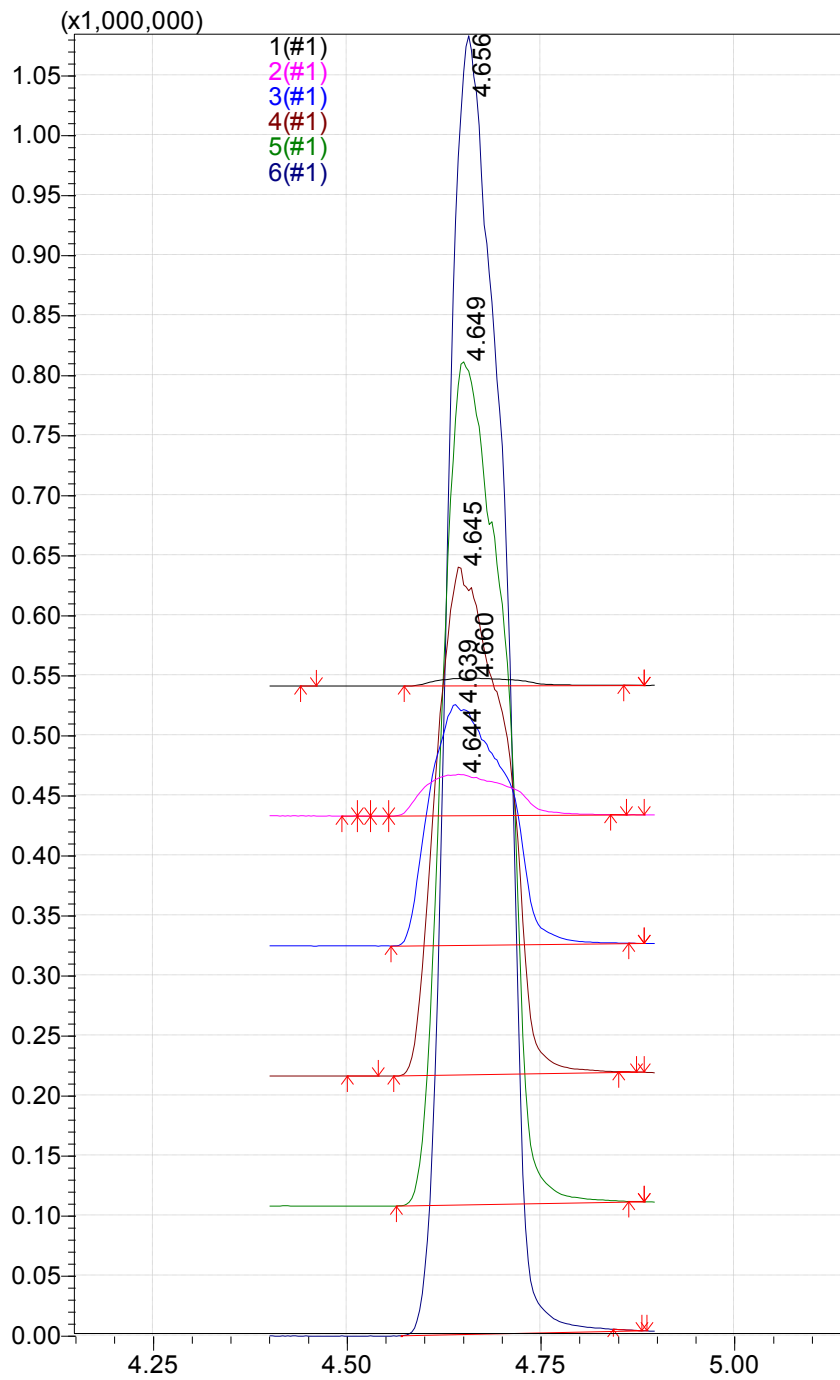
**Slika 10.** Usporedba kromatograma iz MIX-a 3 za volumen 0,1  $\mu$ l, 0,2  $\mu$ l, 0,4  $\mu$ l, 0,6  $\mu$ l i 0,8  $\mu$ l metodom 3

Slika 11 prikazuje baždarnu krivulju za MIX 3, a na slici 12 vidimo površine ispod krivulje (engl. *Area under the Curve, AUC*) za koncentracije iz MIX-a 3, koje su važne za određivanje koncentracije fenola u uzorku.



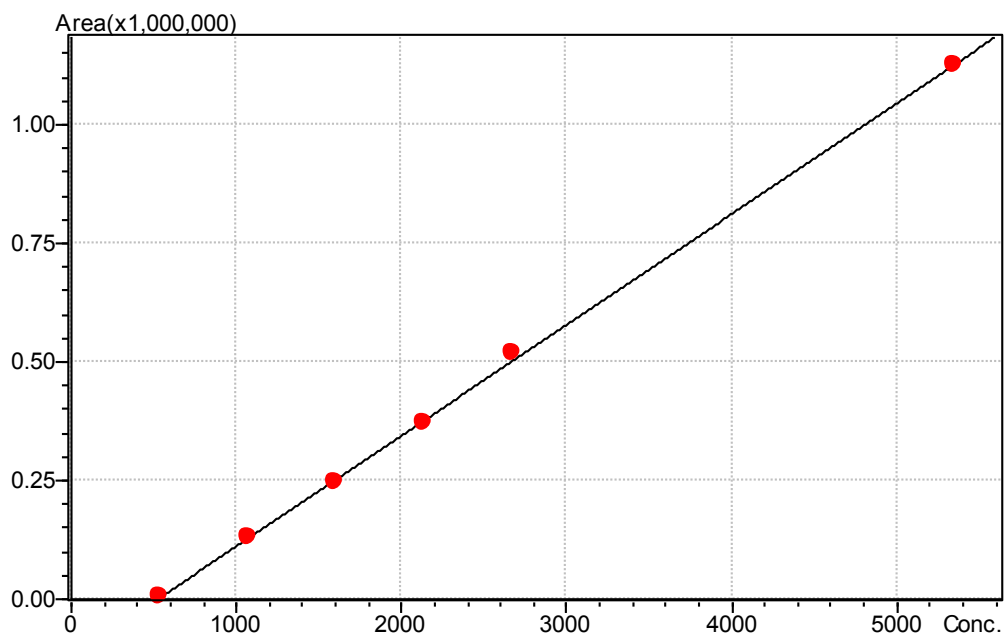
**Slika 11.** Grafički prikaz baždarne krivulje za MIX 3



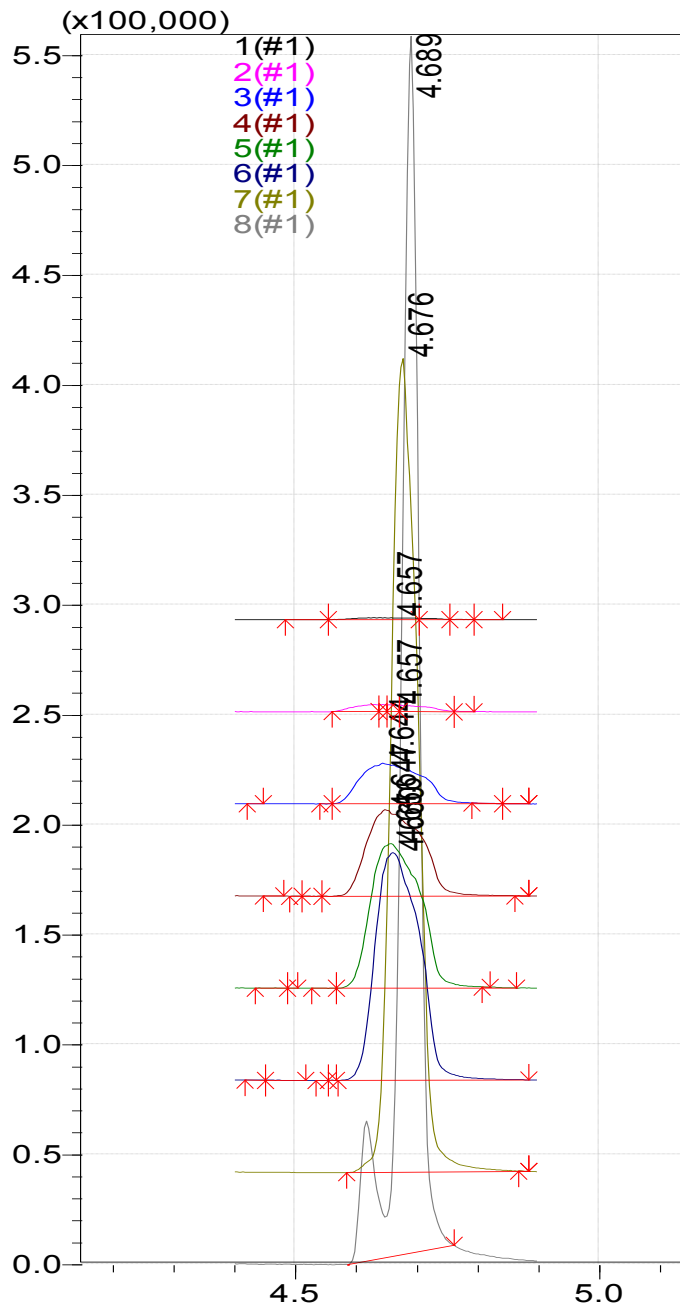


**Slika 12.** Grafični prikaz karakterističnih površina ispod krivulje (AUC) za koncentracije iz MIX-a 3

Slika 13 prikazuje baždarnu krivulju za MIX 4, a slika 14 karakteristične površine ispod krivulje (AUC) za koncentracije iz MIX-a 4.



**Slika 13.** Grafički prikaz baždarne krivulje za MIX 4



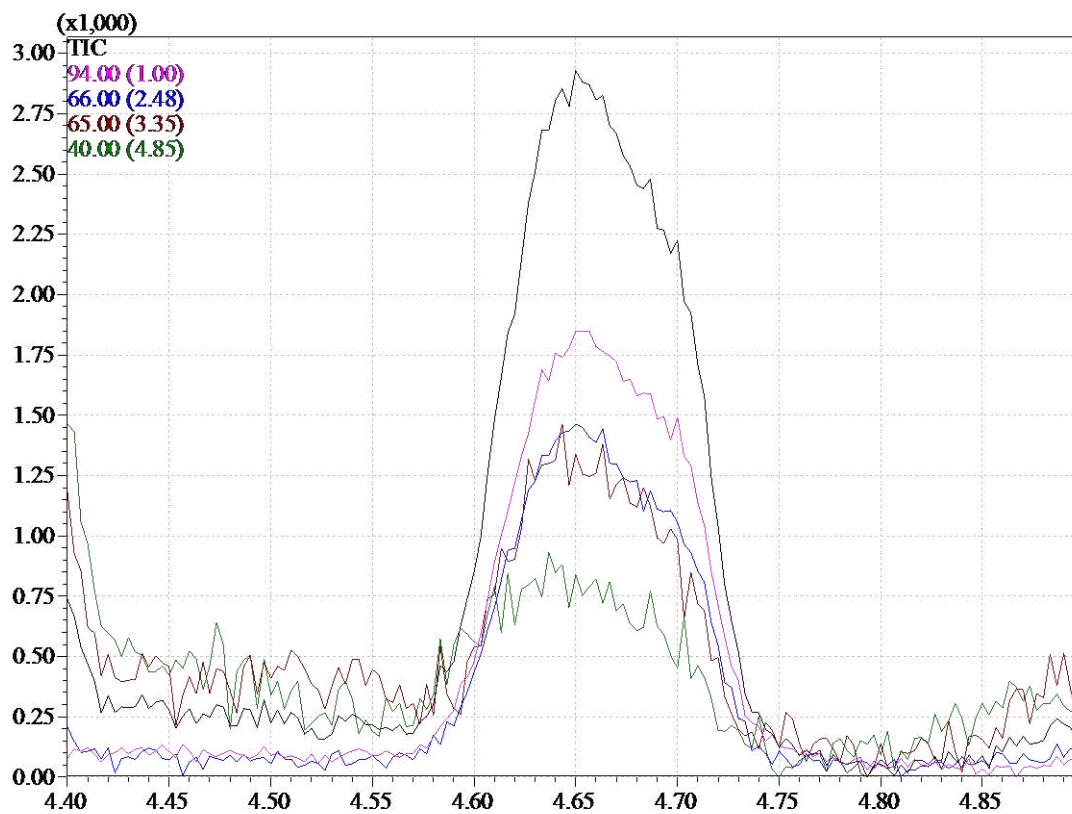
Slika 14. Prikaz karakterističnih površina ispod krivulje (AUC) za koncentracije iz MIX-a 4

Na Slikama 15 i 16 prikazani su kromatogrami za uzorak 1 i volumen MIX-a 2 od 30  $\mu\text{l}$  (Slika 15) i za uzorak 2 i volumen MIX-a 2 od 10  $\mu\text{l}$  (Slika 16) pušteni u TIC načinu rada GC-MS-a. Izračunate koncentracije fenola prema baždarnoj krivulji MIX-a 4 metodom 3 su:

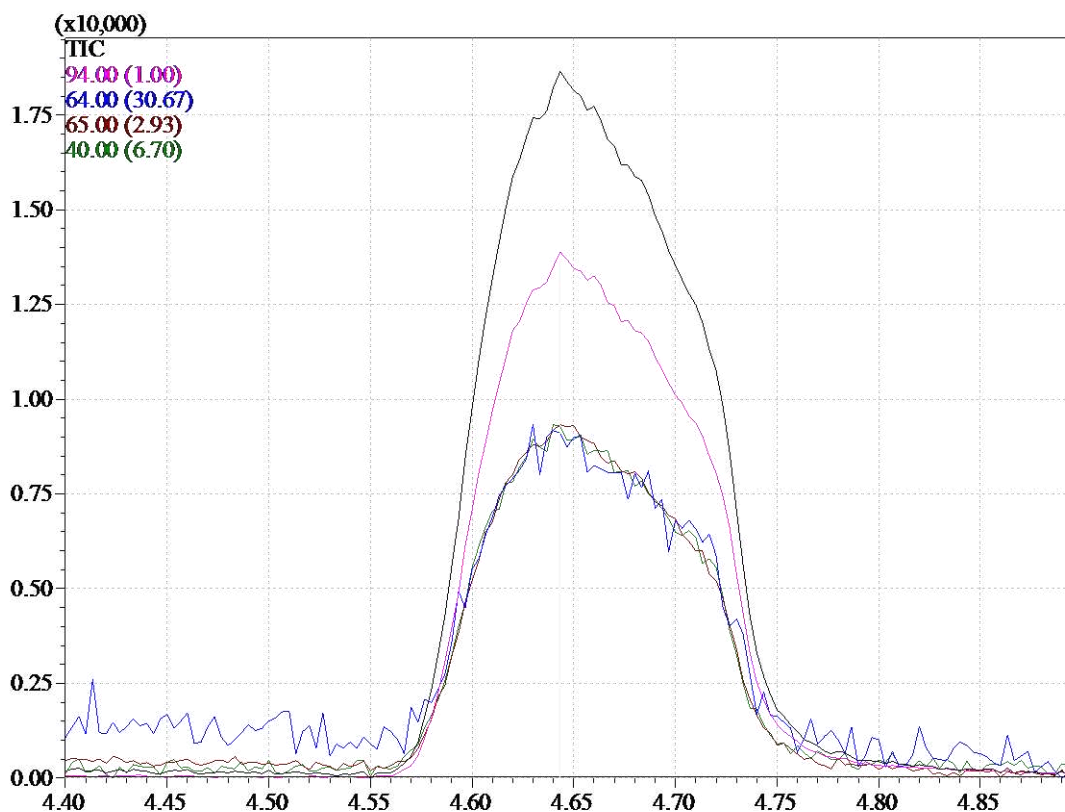
- uzorak 1: 593,74 ng/ml

- uzorak 2: 1080 ng/ml

Kromatogram uzorka 3 nije dao karakteristične spektre fenola i nije bilo moguće očitati koncentraciju.

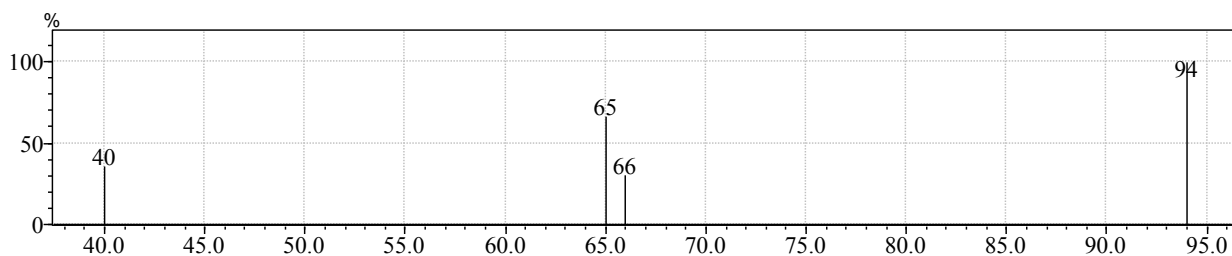


**Slika 15.** Grafički prikaz kromatograma za uzorak 1 (koncentracija 593,74 ng/ml)



**Slika 16.** Grafički prikaz kromatograma za uzorak 2 (koncentracija 1080 ng/ml)

Slika 17 prikazuje karakteristične spektre masa dobivene masenim spektrometrom za fenol. Na x-osi prikazana je vrijednost odnosa mase i naboja, a y-os prikazuje njihov intenzitet. Usporedbom dobivenih spektara sa spektrima u bazama podataka identificirana su četiri karakteristična oblika fenola u uzorcima s omjerima  $m/z$  40, 65, 66, 94.



**Slika 17.** Karakterističan spektar masa za fenol ( $m/z$  40, 65, 66, 94)

Analizom kromatograma za uzorak 3 (volumen MIX-a 2 od 100  $\mu$ l) nije uočen karakterističan oblik krivulje fenola dobijen u uzorcima 1 i 2. Usporedbom masenog spektra s bazom podataka nisu očitani karakteristični spektri masa  $m/z$  za fenol.

## **7. RASPRAVA**

S obzirom na široku primjenu fenola i toksičnost u koncentracijama od samo nekoliko mikrograma po litri, koja ima ozbiljne posljedice na zdravlje ljudi, koji su direktno ili indirektno izloženi utjecaju fenola, posljednjih se nekoliko godina javila potreba za razvitkom analitičkih metoda koje će omogućiti detekciju onih koncentracija fenola u mokraći koje još uvijek ne predstavljaju potencijalnu smrtnu opasnost za ljudsko zdravlje. Stoga je cilj ove eksperimentalne studije bio razviti metodu na plinskom kromatografu s masenim detektorom (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*) koja će omogućiti kvalitativnu i kvantitativnu detekciju fenola u uzorku mokraće, kao jednom od najčešćih bioloških uzoraka u toksikološkoj analizi.

Iako su sve tri postavljene metode, odnosno sve tri različite skupine instrumentalnih parametara, za jednaku koncentraciju analita, dale zadovoljavajuće pikove na kromatogramu (poglavlje 4, Rezultati, Slika 9), analizom dobivenih rezultata uočeno je da je metoda 3, s parametrima analize: volumen injektiranja: 1  $\mu$ l (splitless), temperatura injektora: 250 °C, protok plina nosioca: 1,54 ml/min i ukupno trajanje temperaturnog programa: 10 minuta (60 °C 1 minutu, 10 °C/min do 170 °C), najprikladnija metoda za određivanje koncentracije fenola u uzorku mokraće (najveći pik na kromatogramu, odnosno najveći signal), kojom je u dva od tri analizirana uzorka mokraće uspješno dokazano prisustvo i određena koncentracija fenola. U uzorku 1, analizom po metodi 3, je dobijena koncentracija fenola 593,74 ng/ml, a u uzorku 2 1080 ng/ml.

Iz uzorka 3 nije uspješno kvantificiran fenol, a pretpostavka tomu je predobrada uzorka za analizu. Predobrada uzorka za analizu GC-MS provodila se ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction, SPE*) i otapanjem dobivenog suhog ekstrakta u diklormetanu. SPE se sastoji od niza koraka u kojima može doći do pogreške, koja je najvjerojatnije dovela do nemogućnosti kvantifikacije fenola u uzorku 3. Međutim, sva su tri uzorka istovremeno pripremljena na vakuum kadi za ekstrakciju istim postupkom u istom vremenu, a iz dva uzorka je uspješno određen fenol pa je jedna od pretpostavki da je došlo do pogreške u otapanju suhog ekstrakta u diklormetanu nakon sušenja u struji dušika, a toj sumnji pridonosi i činjenica brojnih znanstvenih radova koji su za pripremu uzorka za analizu koristili upravo SPE, a koji tvrde da je ona jedna od selektivnijih, jednostavnijih i reproducibilnijih tehnika za obradu uzorka prije instrumentalne analize (32). Osim toga, postoji vjerojatnost da je došlo do zagađenja uzorka nakon otapanja, što nije omogućilo dobijanje reprezentabilnog rezultata.

Nadalje, oslanjajući se na znanstveni rad skupine autora koji su određivali koncentraciju fenola u tjelesnim tekućinama nakon fatalnog otrovanja fenolom (2), obrada uzorka se, kako je već prethodno spomenuto, radila ekstrakcijom na čvrstoj fazi, SPE. Po shemi njihovog postupka ekstrakcije su se obradili i naši uzorci, s tim da smo smanjili volumene korištenih otapala što se vidi u Tablici 5. Signali koje su oni dobili bili su sukladni postupku ekstrakcije, odnosno uzorak se „očistio” od interferirajućih komponenti i fenol je „slobodan” ušao u instrument. Uzorci broj 1 i 2 iz ovog istraživanja dali su zadovoljavajuće signale, odnosno uspjelo se detektirati i kvantificirati fenol. Međutim, uzorak 3 nije uspješno kvantificiran pa bi možda bilo potrebno provesti ponovnu ekstrakciju, ali s većim volumenima



otapala kako bi se utvrdila mogućnost pogreške u tom koraku „čišćenja“ komponente od interesa tijekom ekstrakcije.

**Tablica 5.** Usporedba procesa ekstrakcije na čvrstoj fazi između znanstvenog rada određene skupine autora (2) i diplomskog rada

Otapalo i uzorci (ml)	Znanstveni članak	Diplomski rad
Mokraća	1 ml	neodređeno
Fosfatni pufer	2 ml	1 ml
Metanol	3 ml	1 ml
Diklormetan	4 ml	2 ml
Diklormetan za otapanje suhog ekstrakta	1 ml	1 ml

Svaki laboratorij za toksikološku analizu mora imati postavljene i primjenjive metode za određivanje pojedinih komponenti iz različitih uzoraka koji dođu na analizu. Stoga je vrlo bitno obraditi uzorak prije stavljanja u instrument kako bi dobijeni rezultati bili što vjerodostojniji i komponente od interesa u što čistijem stanju, te odrediti optimalne parametre u instrumentalnoj analizi pri kojima je moguće detektirati i kvantificirati analit na čiju se prisutnost sumnja. Kao i ostali instrumenti, tako i plinski kromatograf sa spektrometrom masa dopušta prilagodbu određenih parametara u analizi kako bi u konačnici analiza bila što brža, odnosno kako bi se ispitivane komponente u što kraćem vremenu pojavile na detektoru, a da pritom ne dođe do nemogućnosti određivanja uzorka.

Usporedbom dobivenih kromatograma za jednaku koncentraciju standarda zaključeno je da je metoda 3 najprikladnija za kvantifikaciju fenola u uzorcima mokraće. Na temelju usporedbe parametara sve 3 metode može se vidjeti da se povećanjem linearne brzine protjecanja s 28,3 cm/s (metoda 2) i 40 cm/s (metoda 1) na 45,3 cm/s povećala brzina razdvajanja i da je metodom 3 uzorak najbrže došao na detektor s najkraćim retencijskim vremenom. Povećanjem linearne brzine protjecanja došlo je i do povećanja tlaka u koloni s 21,8 kPa (metoda 2) i 72,8 kPa (metoda 1) na 95,8 kPa (metoda 3), što je također dovelo do povećanja brzine razdvajanja. Ovi dobijeni rezultati u skladu su i sa studijom Thermo Fisher Scientific-a (33) u kojoj se uspoređivala učinkovitost analize koristeći standardnu metodu za određivanje fenola prema EPA-i (34) te standardnu i brzu metodu Thermo Fisher-a, gdje se također pokazalo da se povećanjem linearne brzine protjecanja i tlaka u koloni smanjuje retencijsko vrijeme, odnosno dolazi do brže detekcije željenih komponenti iz uzorka na detektoru.

U prikazu masenog spektra vidi se da su dobijeni glavni fragmenti s omjerom  $m/z$  40, 65, 66, 94 s retencijskim vremenom 4,661, što se donekle poklapa s već spomenutim analizama u smrtnom slučaju otrovanja fenolom (2) u kojem su glavni fragmenti imali omjer  $m/z$  65, 66, 94, 95 i retencijsko vrijeme 3,90. Usporedbom metoda je primijećeno da su

kolona u aparatu, temperatura injektora (250 °C) i plin nosioc (helij) bili isti kao i u našoj odabranoj metodi, ali je vrijeme analize bilo dulje i temperatura se u odnosu na naših 140 °C povisila na 250 °C. Stoga bi dodatnim analizama bilo potrebno vidjeti kako se s promjenom temperature i vremena trajanja analize mijenja i omjer m/z detektiranih fragmenata fenola.

U ovom eksperimentalnom radu analizirani su uzorci mokraće u koje se izravno dodao fenol, odnosno sastav fenola u uzorcima mokraće nije mogao odgovarati stvarnim biološkim uzorcima mokraće koji su uzeti nakon sumnje na otrovanje fenolom, bilo zbog letalnog ishoda ili zbog simptoma koji bi mogli upućivati na otrovanje fenolom. Fenol bi u realnom uzorku bio podvrgnut prethodnim procesima metabolizma u organizmu, što bi dovelo do promjena u njegovoj strukturi i samoj količini slobodnog fenola izučenog mokraćom. Stoga je jasno da se ova analiza ne može jednoznačno povezati sa stvarnom analizom realnih bioloških uzoraka mokraće u kojima bi se metaboliti fenola i sam slobodni fenol zasigurno drugačije detektirali. Zasigurno bi neka od sljedećih ispitivanja trebala uključivati obradu stvarnih uzoraka kontaminiranih fenolom navedenim postupkom ekstrakcije na čvrstoj fazi te instrumentalnu analizu na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa odabranom metodom 3.

## **8. ZAKLJUČCI**

1. Analizom provedenom GC-MS instrumentalnom metodom dokazano je prisustvo fenola u dva od tri analizirana uzorka mokraće.
2. Usporedbom dobivenih kromatograma za jednaku koncentraciju standarda na sve tri metode, utvrđeno je da je metoda tri, s najvećim odzivom signala na kromatogramu, najprikladnija za određivanje koncentracije fenola u biološkom uzorku mokraće.
3. Usporedbom instrumentalnih parametara analize za sve tri metode može se zaključiti da na brzinu odziva komponenti na detektoru utjecaj imaju linearna brzina protjecanja i tlak u koloni (što su brzina protjecanja i tlak veći, to je retencijsko vrijeme kraće, odnosno vrijeme potrebno da se komponenta od interesa pojavi na detektoru je kraće).
4. Postupak obrade uzorka za analizu ekstrakcijom na čvrstoj fazi, SPE, mogao je rezultirati prisustvom veće koncentracije nečistoća koje su mogle interferirati s analitom i otežati njegovu kvantifikaciju u uzorku 3.
5. Potrebno je provesti dodatne analize s većim volumenima otapala u predobradi uzorka kako bi se utvrdio utjecaj na čistoću analita, odnosno na njegovu kvantifikaciju.
6. Potrebno je provesti dodatne analize primjenom odabranih metoda predobrade i analize uzorka s pripadajućim instrumentalnim parametrima na realnim biološkim uzorcima mokraće za koje postoji sumnja da sadrže metabolizmom promijenjene oblike fenola.

## **8. LITERATURA**

- (1) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. PUBLIC HEALTH STATEMENT. Phenol [Internet]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=146&tid=27>.
- (2) Boatto G, Nieddu M, Carta A, Pau A, Lorenzoni S, Manconi P, Serra D. Determination of phenol and o-cresol by GC/MS in fatal poisoning case. *Forensic Sci Int.* 2004 Jan 28;139:191-4.
- (3) Public Health England. Compendium of Chemical Hazards: Phenol. Toxicological Overview [Internet]. Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/500822/Phenol\\_PHE\\_TO\\_120216.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/500822/Phenol_PHE_TO_120216.pdf)
- (4) The Essential Chemical Industry [Internet]. Available from: <http://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/phenol.html>
- (5) Center for Disease Control and Prevention (CDC). The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). International Chemical Safety Cards: Phenol [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0070.html>.
- (6) INCHEM. Phenol. TOXICOLOGY. Toxicity [Internet]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim412.htm#PartTitle:7.%20%20TOXICOLOGY>.
- (7) Meena MC, Band R, Sharma G. Phenol and its Toxicity: A Case Report. *IJT.* 2015;27(8):1222-4.
- (8) World Health Organization: Geneva International Programme on Chemical Safety (IPCS). Phenol. Poisons Information Monograph 412, 1999.
- (9) EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (EFSA CEF Panel). Scientific opinion on the toxicological evaluation of phenol. *EFSA J.* 2013; 11(4):3189.
- (10) U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR PHENOL. September, 2006. p. 110.
- (11) New Jersey Department of Health. Hazardous Substance Fact Sheet. PHENOL [Internet]. Available from: <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1487.pdf>.
- (12) U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR PHENOL. September, 2006. p. 173-176.
- (13) Lee MR. PHENOLS. *Gas Chromatography.*

- (14) D. Sutlović i sur. Analiza bioloških uzoraka. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 337.
- (15) Atapattu S N, Rosenfeld M J. Solid phase analytical derivatization as a sample preparation method. J Chromatogr A. 2013 Jun 28;1296:204-13.
- (16) Guide to Solid Phase Extraction [Internet]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
- (17) Poole CF. New Trends in Solid-Phase Extraction. TrAC Trends Anal Chem [Internet]. 2003 Jun;22(6):362-73.
- (18) Augusto F, Hantao WL, Mogollo'n GSN, Braga CGNS. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. TrAC Trends Anal Chem. Feb 2013; 43:14-23.
- (19) D. Sutlović i sur. Analiza bioloških uzoraka. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 339.
- (20) Pozzebon JM, Queiroz SCN, Jardim I. Development of Solid-Phase Extraction for Triazines: Application to a Biological Sample. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. Jun 2003;26(5):781-790.
- (21) D. Sutlović i sur. Analiza bioloških uzoraka. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 340.
- (22) Luterotti S. PLINSKA KROMATOGRAFIJA [Internet]. Available from: [http://free-zg.t-com.hr/Svjatlana\\_Luterotti/09/091/0912.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjatlana_Luterotti/09/091/0912.htm).
- (23) Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. In: Osnove analitičke kemije. Školska knjiga; 1999. p. 645-74.
- (24) D. Sutlović i sur. Analiza uzoraka. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 346-48.
- (25) Rajić V. SPEKTROMETAR MASA [Internet]. Available from: <https://prezi.com/4g4xie75dsn/spektrometar-masa/>.
- (26) Stashenko E, Martinez JR. Advances in Gas Chromatography. Gas Chromatography-Mass Spectrometry [Internet]. Available from: <https://cdn.intechopen.com/pdfs/46209.pdf>.
- (27) Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. In: Osnove analitičke kemije. Školska knjiga; 1999. p. 645-74.
- (28) Pine SH. Organska kemija. Zagreb: Školska knjiga; 1994. 1130-32.
- (29) Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC/MS). GC-MS sheme [Internet]. Available from:

<http://www.skz.de/en/research/technicalfacilities/pruefverfahren1/spektroskopie1/4870.Gas-Chromatography-coupled-with-Mass-Spectrometry-GCMS.html>

(30) Gas Chromatography-Mass spectroscopy [Internet]. Available from:  
[http://cires1.colorado.edu/jimenez/CHEM-5181/Labs/Gas\\_Chromatography.pdf](http://cires1.colorado.edu/jimenez/CHEM-5181/Labs/Gas_Chromatography.pdf)

(31) Sutlovic D i sur. Plinska kromatografija-spektrometrija masa. Osnove forenzične toksikologije. Split: Tisak; 2011. p. 357.

(32) Buszewski B, Szultka M. Past, Present and Future of Solid Phase Extraction: A Review. Crit Rev Anal Chem. 2012; 42: 198-213.

(33) Khan IA. Fast Analysis of Phenol Using Conventional GC Instrumentation. Thermo Fisher Scientific. 2013 [Internet]. Available from: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-GC-Phenols-TraceGOLD-AN20737\\_E.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-GC-Phenols-TraceGOLD-AN20737_E.pdf).

(34) United States Environmental Protection Agency, EPA. Method 625: Base/Neutrals and Acids. 1984 [Internet]. Available from: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method\\_625\\_1984.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_625_1984.pdf).



## **8. SAŽETAK**

## **NASLOV RADA:**

Kvantitativno određivanje fenola iz uzoraka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode

## **CILJEVI ISTRAŽIVANJA:**

Ciljevi ovog eksperimentalnog rada bili su razviti metodu određivanja fenola plinskim kromatografom s masenim spektrometrom te odrediti optimalne parametre plinskoga kromatografa pri kojima se dobije najbolji odziv signala na kromatogramu. Također, cilj je bio utvrditi koncentraciju fenola u trima biološkim uzorcima mokraće primjenom odabrane metode.

## **USTROJ ISTRAŽIVANJA:**

eksperimentalna studija

## **MJESTO ISTRAŽIVANJA:**

Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

## **MATERIJALI I METODE:**

Pripremljena su četiri miksa standardnih otopina s postupnim razrijeđenjem fenola na način da je u MIX-u 1 pomiješano 5  $\mu$ l fenola i 995  $\mu$ l kloroforma, u MIX-u 2 100  $\mu$ l MIX-a 1 i 900  $\mu$ l kloroforma, u MIX-u 3 100  $\mu$ l MIX-a 2 i 900  $\mu$ l kloroforma i u MIX-u 4 100  $\mu$ l MIX-a 3 i 900  $\mu$ l kloroforma. Odabrane su tri različite skupine instrumentalnih parametara (metoda 1, metoda 2 i metoda 3) kako bi se utvrdilo na kojoj metodi se dobije najbolji odziv signala na kromatogramu. U tri biološka uzorka mokraće dodan je proizvoljno određen volumen MIX-a 2 (uzorak 1 30  $\mu$ l, uzorak 2 10  $\mu$ l i uzorak 3 100  $\mu$ l). Uzorci su za analizu obrađeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi, SPE, i analizirani na GC-MS uređaju metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području 40 - 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (SIM).

## **REZULTATI:**

Provedenom analizom za istu koncentraciju standarda najbolji odziv signala na detektoru dobijen je metodom 3 s parametrima analize: volumen injektiranja: 1  $\mu$ l (splitless),

temperatura injektora: 250 °C, protok plina nosioca: 1,54 ml/min i ukupno trajanje temperaturnog programa: 10 minuta (60 °C 1 minutu, 10 °C/min do 170 °C). Analizom uzoraka mokraće uspješno je detektiran i kvantificiran fenol u dva od tri uzorka. Dobivena koncentracija fenola u uzorku 1 bila je 593,74 ng/ml, a u uzorku 2 1080 ng/ml. Prisutni fragmenti fenola dali su karakteristične spektre masa s omjerom m/z 40, 65, 66, 94.

## **ZAKLJUČAK:**

Odabranim instrumentalnim parametrima plinskoga kromatografa sa spektrometrom masa moguće je detektirati i kvantificirati fenol iz bioloških uzoraka mokraće. Ekstrakcija na čvrstoj fazi je vrlo dobra tehnika predobrade uzorka, ali su potrebne dodatne analize da bi se utvrdila količina nečistoća koje mogu interferirati u analizi. Osim toga, potrebno je provesti dodatne analize kako bi se potvrdila tehnika predobrade uzorka i primjenjivost same metode na realne biološke uzorke mokraće.

## **9. SUMMARY**

**DIPLOMA THESIS TITLE:**

Quantification of phenol in blood and urine samples by using GC-MS method

**OBJECTIVES:**

The objective of this study was to develop a method for determination of phenol with gas chromatography-mass spectrometry and to determine optimal parameters of the instrument which give the best signal on the chromatogram. The other objective was to quantify the phenol in three different biological samples of urine by using the selected method.

**DESIGN:**

Experimental study

**SETTINGS:**

Laboratory of Toxicology, Department of pathology, forensic medicine and cytology, University Hospital of Split.

**MATERIALS AND METHODS:**

Four mixes of standard solutions were prepared on the way that MIX 1 consisted of 5  $\mu$ l of phenol and 995  $\mu$ l of chloroform, MIX 2 of 100  $\mu$ l of MIX 1 and 900  $\mu$ l of chloroform, MIX 3 of 100  $\mu$ l MIX 2 and 900  $\mu$ l of chloroform and MIX 4 of 100  $\mu$ l of MIX 3 and 900  $\mu$ l of chloroform. Three different groups of instrumental parameters were selected (method 1, method 2 and method 3) to determine which method gives the best signal on the chromatogram. A voluntary defined volume of MIX 2 was injected in undetermined volume of three urine samples (sample 1 30  $\mu$ l, sample 2 10  $\mu$ l and sample 3 100  $\mu$ l). The samples were prepared for the analysis by using solid phase extraction and analyzed with GC-MS method using mode that simultaneously records total ion chromatogram (TIC) in the area of 40-600 m/z ratio and single ion monitoring (SIM) scanning mode.

**RESULTS:**

By analysing three same concentrations of standard solution on all three methods, it was noticed that method 3 gives the best signal on the detector. Method 3 consisted of parameters of analysis: injection volume: 1  $\mu$ l (splitless), injector temperature: 250 °C, carrier gas flow

(helium): 1,54 ml/min, program time: 10 minutes overall (60 °C for 1 minute and 10 °C per minute til 170 °C). Two out of three urine samples were successfully detected and quantified with phenol. Sample 1 had the phenol concentration of 593,74 ng/ml and sample 2 1080 ng/ml. Characteristic fragments of phenol detected in mass spectrometer had m/z ratio 40, 65, 66, 94.

## **CONCLUSION:**

It is possible to detect and quantify the phenol from the biological samples of urine by using selected method 3 with its optimal instrumental parameters. Solid-phase extraction is a good technique of sample preparation, but additional analysis are necessary to establish the quantity of interferences that drop behind and can affect the analysis. Beside that, it is also necessary to carry out additional analysis on real biological samples to be able to confirm these techniques of sample preparation (Solid-Phase Extraction) and sample analysis (GC-MS).

## **10. ŽIVOTOPIS**

Andrea Perković rođena je 19. srpnja 1994. godine. U gradu Sinju završila Osnovnu školu Ivana Lovrića s odličnim uspjehom. Nakon osnovne škole upisala Franjevačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Sinju. Tijekom osnovne i srednje škole sudjelovala na županijskim natjecanjima iz geografije, hrvatskog jezika, kemije i vjeronauka. Iz vjeronauka osvojeno 2. mjesto na državnom natjecanju („Vjeronaučna olimpijada“) 2012. godine. Tijekom četiri godine srednje škole primala nagrade za odličan uspjeh od nastavnčkog vijeća. Nakon srednje škole 2013. godine upisuje Medicinski i Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, smjer Farmacija. U govoru i pismu odlično se služi engleskim jezikom, položeni A1 i A2 Goethe certifikati iz njemačkog jezika, poznavanje talijanskog jezika u govoru i pismu (pet godina učenja u osnovnoj školi). 2018. pripravnički staž od 6 mjeseci obavlja u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, područna jedinica „Solin“.