

# Optimizacija metode plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije u svrhu određivanja kalcija u uzorcima žitarica

---

**Vučković, Teo**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:728667>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Teo Vučković**

**Optimizacija metode plamene atomske  
apsorpcijske spektrofotometrije u svrhu  
određivanja kalcija u uzorcima žitarica**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na kolegiju Analitička kemija 2 integriranog sveučilišnog preddiplomskog i diplomskog studija Farmacija na Zavodu za analitičku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan.

*Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici, docentici Jasni Jablan na prenesenom znanju i vještinama, korisnim sugestijama, iznimnoj predanosti, izvanrednoj komunikaciji, te ugodnoj radnoj atmosferi koja nas je pratila od vremena provedenog u laboratoriju pa sve do kraja pisanja rada.*

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Uloga kalcija u organizmu</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Homeostaza kalcija</b>	<b>5</b>
1.2.1. Hipokalcemija	8
1.2.2. Hiperkalcemija	8
<b>1.3. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija</b>	<b>9</b>
1.3.1. Uloga atomske apsorpcijske spektrofotometrije	9
1.3.2. Načelo atomske apsorpcijske spektrofotometrije	9
1.3.3. Atomski apsorpcijski spektrofotometar	11
<b>1.4. Validacija analitičke metode</b>	<b>13</b>
1.4.1. Preciznost	13
1.4.2. Specifičnost i selektivnost	14
1.4.3. Linearnost	14
1.4.4. Radno područje	14
1.4.5. Točnost	15
1.4.6. Granica dokazivanja i određivanja	15
1.4.7. Izdržljivost i otpornost	16
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Materijali</b>	<b>20</b>
3.1.1. Kemikalije	20
3.1.2. Laboratorijski pribor i posude	20
3.1.3. Aparatura	21
<b>3.2. Metode</b>	<b>22</b>
3.2.1. Princip metode	22
3.2.2. Priprema otopina	22
3.2.3. Priprema uzoraka za analizu	23
3.2.4. Postupak određivanja koncentracije kalcija	23
3.2.5. Statistička analiza	24

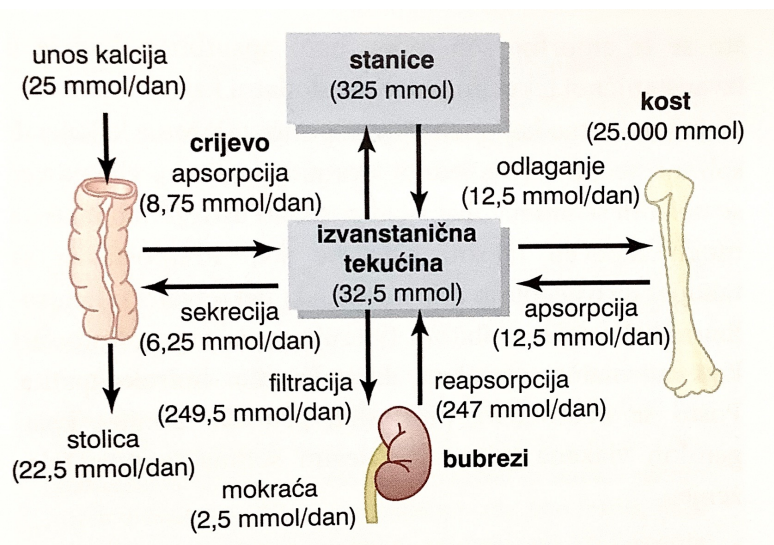
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Validacija analitičke metode</b>	<b>26</b>
4.1.1. Linearnost	27
4.1.2. Preciznost	28
4.1.3. Točnost	31
4.1.4. Granica dokazivanja i granica određivanja	33
<b>4.2. Primjena metode u određivanju kalcija u uzorcima</b>	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>38</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b>	<b>41</b>
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

## **1. UVOD**

## 1.1. Uloga kalcija u organizmu

Kalcij (Ca) je makroelement koji je najprisutniji u čovjeku. Kalcij čini 1,5-2,0% tjelesne mase čovjeka. Većina kalcija nalazi se u kostima (98%), oko 1% u zubima, gdje se nalazi u obliku kalcijevog hidroksiapatita,  $(Ca_5(PO_4)_3(OH))$ , koji se piše kao  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , da bi se označilo da kristalne jedinice imaju dva oblika. Kost i sadrže 150 mg kalcija po gramu suhe tvari (Bronner, 1994). Preostalih 1% ukupnog kalcija u organizmu nalazi se u tkivima i tjelesnim tekućinama, te u mekim tkivima gdje 1 gram suhe tvari sadrži 35 mg kalcija. Čovjek prosječne tjelesne mase od 70 kg u svome tijelu ima 1,54 kg kalcija.

Uloga kalcija u ljudskom organizmu je od velike važnosti za normalan metabolizam. Primarno, kalcij je važna sastavnica kostiju i zubiju, regulira kontrakciju i relaksaciju mišića, funkciju živčanog tkiva, zgrušavanje krvi, utječe na regulaciju krvnog tlaka i provođenje prijenosnih signala živčanog sustava. Eliminira se urinom i fecesom (Guyton i Hall, 2011).



Slika 1. Pregledni prikaz izmjene kalcija između pojedinih tkivnih odjeljaka u čovjeka koji dnevno unosi 25 mmola kalcija (Guyton i Hall, 2011).

Samo 20-50% ukupnog kalcija će se apsorbirati iz gastrointestinalnog trakta. Apsorpcija ovisi o vrsti hrane, sastavu obroka i općem fiziološkom stanju osobe. Neophodna je prisutnost vitamina D, fosfora (P) i magnezija (Mg). U kostima i zubima fosfor se nalazi u kemijskom entitetu zajedno s kalcijem. Vitamin D je nužan da bi se kalcij i fosfor apsorbirali

u tankom crijevu. Zajedno s paratireoidnim hormonom (PTH), vitamin D regulira koncentraciju kalcija (Guyton i Hall, 2011).

Balans kalcija u krvi je važan za srčanu funkciju, a najmanje promjene koncentracije kalcija mogu dovesti do značajnih patofizioloških promjena. Normalna krvna slika podrazumijeva oko 10 mg kalcija u 100 mL ljudske krvi. U krvi je u ionskom obliku  $\text{Ca}^{2+}$  (5,5 mg), vezan na proteine (oko 4,0 mg) ili u obliku fosfata i citrata (oko 0,5 mg) (Guyton i Hall, 2011).

Kalcij se može apsorbirati aktivnim putem ili pasivnom difuzijom. Uslijed niskog unosa kalcija u organizam, apsorpcija će se odvijati aktivno, preko prijenosnog proteina kalbindina. Pasivna difuzija se odvija pri većim koncentracijama kalcija u tankom crijevu (Lovrić Turjk, 2018).

Učinkovitost apsorpcije kalcija iz većine hrane uglavnom je jednaka. Moguća je manja apsorpcija iz obroka bogatih oksalatima (špinat, slatki krumpir i grah) te fitinskom kiselinom (beskvasni kruh, sjemenke, orašasti plodovi, sojin izolat). Organske kiseline (oksalna i fitinska kiselina) tvore s kalcijem teško topljive soli te se smanjuje količina raspoloživog kalcija za apsorpciju (Kerstetter i sur., 2005). Apсорpcija kalcija ovisi i o dobi, pa tako mlađe osobe bolje apsorbiraju kalcij u raznim oblicima. Razlike u apsorpciji makroelemenata kod muškaraca i žena pokazuju da muškarci bolje apsorbiraju kalcij od žena iste dobi, najvjerojatnije zbog hormona (Hope i sur., 1992; Bygrave i Benedetti, 1993).

Apsorpcija kalcija obrnuto je proporcionalna unosu, što je unos manji, apsorpcija će biti veća i obratno. Povećana apsorpcija tijekom iznimno malog unosa kalcija nije dovoljna za zadovoljavanje potreba organizma (Hope i sur., 1992).

Hrana koja sadrži omjer Ca:P u odnosu 2:1 do 1:2 dopušta optimalnu apsorpciju Ca. Ako je ovaj odnos drukčiji, unos kalcija bit će narušen (Allen, 1982; Anderson, 1991).

Glavni izvor kalcija u prehrani su mlijeko i mliječni proizvodi, meso, riba, povrće i žitarice, a njihov deficit može dovesti do raznih poremećaja i bolesti (osteoporoze, rahitisa, neuroloških poremećaja) (Szefer i Nriagu, 2007).

Ukoliko unos kalcija i apsorpcija iz crijeva ne zadovoljavaju fiziološke potrebe ljudskog organizma, tada se kalcij resorbira iz kostiju, što narušava zdravlje kostiju. Kroničan deficit kalcija dovodi do smanjenja koštane mase, osteoporoze i učestale frakture kostiju (Guyton i Hall, 2011).



Bioraspoloživost kalcija je multifaktorijalna, stoga je preporučena dnevna doza i do četiri puta veća (800 mg Ca dnevno). U mnogim slučajevima potrebna je i dodatna suplementacija kad su potrebe za kalcijem povećane usred specifičnih okolnosti, načina života ili kliničke dijagnoze. U tu kategoriju spadaju sportaši, trudnice, žene u peri i post menopauzi, osobe koje obavljaju teške fizičke osobe ili osobe koje su izložene mentalnom naporu te pacijenti koji se oporavljaju nakon ozljede (Gómez i sur., 2011; Zofkóva i sur., 2013; Fanian i sur., 2013).

## 1.2. Homeostaza kalcija

Koncentracija kalcija u tijelu ovisi o njegovom unosu, apsorpciji i izlučivanju. Izvanstanična koncentracija određena je apsorpcijom kalcija u probavnom traktu, renalnom sekrecijom i otpuštanjem, odnosno skladištenjem kalcija u kostima. Svim tim procesima upravljaju hormoni koji održavaju plazmatske koncentracije kalcija od 2,40 mmol/L. Ta stroga kontrola razine kalcija nužna je kako bi se u organizmu mogli neometano odvijati procesi poput kontrakcije mišića, zgrušavanja krvi ili prijenosa signala (Guyton i Hall, 2011).

Prva crta obrane kod promjene koncentracije kalcija je mehanizam izmjenjivog koštanog kalcija koji "puferira" koncentraciju kalcija u izvanstaničnoj tekućini. Amforni spojevi kalcijevog fosfata (vjerojatno  $\text{CaHPO}_4$ ), labavo vezani u kostima, u reverzibilnoj su ravnoteži s kalcijevim i fosfatnim ionima u izvanstaničnoj tekućini. Količina tih soli koje se mogu izmjenjivati iznosi 0,5 - 1,0 % ukupne količine kalcijevih soli u kostima. Budući da se te izmjenjive soli lako odlažu i lako ponovo otapaju, povećanje koncentracije kalcijevih i fosfatnih iona u izvanstaničnoj tekućini iznad normalne razine smjesta izaziva odlaganje soli. Obrnuto, smanjenje koncentracija tih iona izaziva naglu apsorpciju izmjenjive soli. Ta reakcija je brza jer su amforni koštani kristali izvanredno maleni, a njihovna ukupna dodirna površina koja je izložena koštanim tekućinama iznosi oko 4000 m<sup>2</sup>, ili više. Osim puferske funkcije kostiju, mitohondriji u mnogim tkivima organizma, osobito u jetrima i u crijevima, također sadrže priličnu količinu izmjenjivog kalcija koji je dodatni puferski sustav za održavanje nepromijenjene koncentracije kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini (Guyton i Hall, 2011).

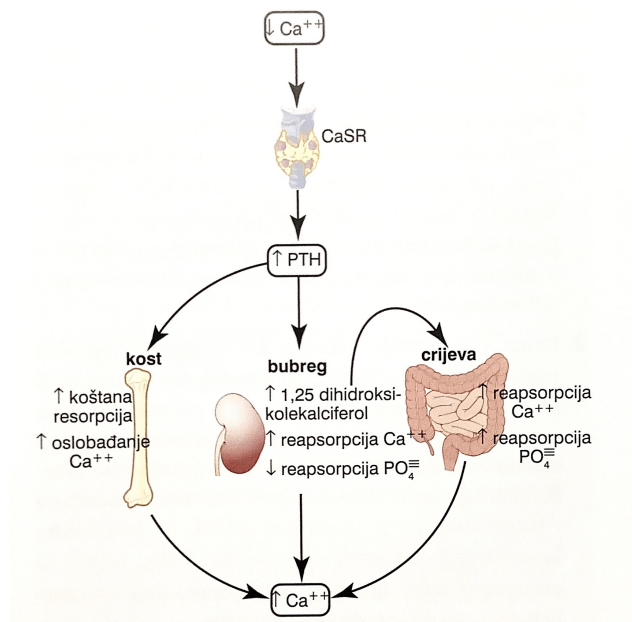
Hormonska kontrola koncentracije kalcijevih iona je druga crta obrane. Promjene koncentracije kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini zamjećuje receptor osjetljiv na kalcij (CaSR, engl. *calcium-sensing receptor*) u membrani paratireoidnih stanica, koji je spregnut s G-proteinom. Vezanjem kalcija na CaSR dolazi do promjene konformacije proteinskog receptora te receptor aktivira fosfolipazu C i povećava unutarstanično stvaranje inozitol-1,4,5-trifosfata i diacilglicerola. To potiče oslobađanje kalcija iz unutarstaničnih zaliha, što smanjuje sekreciju paratireoidnog hormona (PTH). Taj mehanizam razlikuje se od mehanizma u endokrinim tkivima koji za posljedicu ima lučenje hormona (Guyton i Hall, 2011).

Pad razine kalcija u serumu inaktivira CaSR u paratiroidnim stanicama i dovodi do povećanog izlučivanja PTH. Povećane razine oslobođenog PTH djeluju na paratiroidne receptore u bubrezima (PTHrP) kako bi se povećala reapsorpcija kalcija. PTH također djeluje na PTHrP u kostima gdje pospješuje resorpciju kostiju i na taj način povećava razinu kalcija u serumu (Peacock, 2010).

Ciklički adenzin-monofosfat posrednik je u djelovanjima paratiroidnog hormona. U djelovanju PTH na ciljna tkiva uvelike posreduje ciklički adenzin-monofosfat (cAMP), koji djeluje kao drugi glasnik, te je vjerojatno odgovoran za neka fiziološka stanja, stoga povećane razine paratiroidnog hormona stimuliraju bubrege na pojačanu sekreciju 1,25-dihidroksikolekalciferola. Naime, porast vrijednosti PTH je signal za stvaranje aktivnog oblika vitamina D (1,25-dihidroksikolekalciferola) iz 25-hidroksikolekalciferola lučenjem enzima 25-hidroksivitamin D3 1 $\alpha$ -hidroksilaze, preko drugog glasnika (cAMP) genskom regulacijom na razini jezgre stanice. Ta aktivna forma vitamina D veže se za receptore vitamina D (VDR) koji su prisutni u većini stanica i locirani u jezgrama. 1,25-dihidroksikolekalciferol promovira intestinalnu apsorpciju kalcija povećavajući ekspresiju kalcij-vezajućeg proteina, kalbindina u epitelnim stanicama crijeva, a ujedno djeluje i na VDR receptore u kostima i tako potpomaže resorpciju. Na taj način dolazi do porasta koncentracija Ca u serumu, a mehanizmom negativne povratne sprege zaustavljaju se procesi koji bi doveli do patofiziološkog rasta koncentracije kalcija, a aktiviraju oni koji je snižavaju (Guyton i Hall, 2011).

Kalcitonin je treći regulatorni mehanizam u homeostazi kalcija. Osnovni podražaj za lučenje kalcitonina je povećanje koncentracije kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini, suprotno od PTH. Kalcitonin je peptidni hormon (32 aminokiseline) koji luče parafolikularne stanice štitnjače (C-stanice) kao odgovor na povećane razine kalcija u krvi, svoj učinak iskazuje tako da smanjuje apsorptivnu aktivnost osteoklasta i stimulira odlaganje kalcija u kosti. Drugi, a ujedno i dulji učinak kalcitonina je smanjenje stvaranja novih osteoklasta. Sekundarni učinak smanjenja aktivnosti osteoklasta je povećanje aktivnosti osteoblasta i posljedično unos kalcija u kosti. U odraslih ljudi kalcitonin slabo djeluje na koncentraciju kalcija u plazmi jer to početno smanjenje koncentracije kalcija za nekoliko sati pospješuje lučenje PTH, koje gotovo potpuno nadvlada djelovanje kalcitonina. Nadalje, dnevna apsorpcija i odlaganje kalcija u odrasla čovjeka je mala u odnosu na unos, pa čak i kad se veličina apsorpcije djelovanjem

kalcitonina smanji, još uvijek je utjecaj na plazmatsku koncentraciju kalcija veoma slab. Suprotno, kod djece je uloga kalcitonina zbog brze pregradnje kostiju daleko izraženija, pri čemu se na dan apsorbira i odlaže više od 125 mmola Ca, što je 5 do 10 puta veća količina Ca od one koja se nalazi u cijeloj izvanstaničnoj tekućini (Guyton i Hall, 2011).



Slika 2. Sažetak učinka PTH na kost, bubrege i crijeva u odgovoru na sniženu izvanstaničnu koncentraciju kalcijevih iona. CaSR, receptor osjetljiv na kalcij (Guyton i Hall, 2011).

Poremećaj u radu ovih mehanizama, koji zajedno održavaju plazmatske koncentracije kalcija normalnim, dovodi do pojave patoloških stanja kao što su hipokalcemija i hiperkalcemija.

### 1.2.1. Hipokalcemija

Hipokalcemija uzorkuje uzbuđenost živčanog sustava i tetaniju. Kad koncentracija kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini postane manje od normalne, dolazi do povećanja propusnosti živčane membrane za natrij (Na), lakše se pobuđuju akcijski potencijali te živčani sustav postaje sve podražljiviji. Ukoliko plazmatske koncentracija kalcija postane 50% manja od normalne vrijednosti, periferna živčana vlakna postanu toliko podražljiva da počnu sama od sebe okidati, pa odašilju salve živčanih impulsa koji idu u skeletne mišiće i ondje pobuđuju tetanične mišićne kontrakcije. Hipokalcemija uzrokuje tetaniju, a ponekad i epileptiformne grčeve, zato što povećava podražljivost mozga. Tetanija se redovito pojavljuje kad se koncentracija u krvi smanji s 2,4 mmol/L na 1,5 mmol/L, a postaje smrtonosna već pri koncentraciji od 1,0 mmol/L kalcija (Guyton i Hall, 2011).

### 1.2.2 Hiperkalcemija

Hiperkalcemija potiskuje aktivnost živčanoga sustava i mišića. Kad koncentracija kalcijevih iona u izvnanstaničnoj tekućini postane veća od normalne, aktivnost živčanog sustava je potisnuta, a refleksne djelatnosti središnjeg živčanog sustava postaju trome. Povećane plazmatske koncentracije kalcija skraćuju QT-interval srca, te izazivaju gubitak apetita i opstipaciju, vjerojatno zbog smanjenja kontraktilnosti mišićne stijenke probavnog sustava. Depresivni učinci povećane razine kalcija počinju se javljati već pri koncentraciji 3,0 mmol/L, a postanu izraziti kad razina prijeđe 3,8 mmol/L. Kad razina kalcija u krvi postane veća od približno 4,2 mmol/L, postoji sklonost da se kristali kalcija talože svuda po organizmu (Guyton i Hall, 2011).

### 1.3. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija

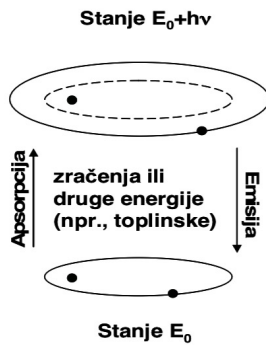
#### 1.3.1. Uloga atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) je analitička tehnika koja se koristi u kvantitativnoj kemijskoj analizi metala u određenom uzorku od interesa. Ova tehnika je široko primjenjiva, budući da je riječ o relativno jeftinoj i brznoj tehnici za čije se rukovanje stručnjaci lako educiraju. Metoda je isključivo kvantitativna i potrebno je koristiti zračenje točno određene valne duljine za kvantifikaciju određenog metala (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

Ovom tehnikom se nekada određivalo tetraetilolovo kao polutant u gorivu. Danas je široka primjena u biomedicini, toksikologiji, forenzici, u ekologiji za određivanje olova i žive, analizi namirnica i dodataka prehrani. Koristi se i u farmaceutskoj industriji za određivanje metala kao npr. onečišćenja zaostalih u procesu organske sinteze (Parker i sur., 1967; White, 2003).

#### 1.3.2. Načelo atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Atomi metala nalaze se u neutralnom obliku kao nenabijene čestice u plinovitom agregacijskom stanju i apsorbiraju zračenje jedinstvene valne duljine za određeni metal. Temelj AAS tehnike je ekscitacija elektrona vanjske ljuske metala, tj. kvantizirani prijelaz slobodnog atoma u stanje više energije, apsorpcijom toplinske energije ili zračenja određene valne duljine, tj. frekvencije. Energetske razlike ovih prijelaza određene su strukturom atoma, što znači da je energija apsorbiranog zračenja karakteristična za pojedini element. Slobodni atomi pokazuju linijski spektar pa mogu apsorbirati energiju svjetla pri određenim, diskretnim energijskim razinama. Ako se atomska para koja sadrži slobodne neionizirane atome u svom osnovnom stanju izloži izvoru svjetla koje zrači frekvencijom karakterističnom za element prisutan u pari onda će ti slobodni neutralni atomi apsorbirati rezonantnu frekvenciju, tj. upravo onu koju bi emitirali kada bi bili pobuđeni na emisiju (Luterotti i sur., 2013.).



Slika 3. Kvantizirani prijenos između dva energetska stanja (Luterotti i sur., 2013).

Svi elementi u osnovnom stanju imaju jedinstvenu elektronsku konfiguraciju koja se naziva osnovno stanje. Atomi koji se nalaze u osnovom i plinovitom stanju mogu apsorbirati zračenje točno određene energije koja osigurava prijelaz elektrona na neku od viših razina ekscitirajućeg stanja. U povratku iz pobuđenog u osnovno stanje emitira se zračenje specifične valne duljine koja je jednaka razlici energija jednog od dopuštenih prijelaza u atomu (Harris, 2010; White, 2003; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

Za metale koji nisu alkalijski ili zemnoalkalijski, količina termalne energije iz plamena nije dovoljna za prijelaz iz osnovnog u neko od pobuđenih stanja, stoga je potreban dodatni izvor zračenja, tada se koristi AAS. Budući da je raspon količine energije koju određeni element može apsorbirati ili emitirati veoma uzak, koristi se izvor svjetla katode (lampe) istog onog metala koji se analizira. Nedostatak je što se lampa mora mijenjati, te za svaki element mora postojati pojedinačna što uzrokuje da se istovremeno može kvantificirati samo jedan metal (Watson, 1999).

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

Slika 4. Elementi koji se mjere atomskom-apsorpcijskom spektrofotometrijom (označeni sivo) (Luterotti i sur., 2013).

### 1.3.3. Atomski apsorpcijski spektrofotometar

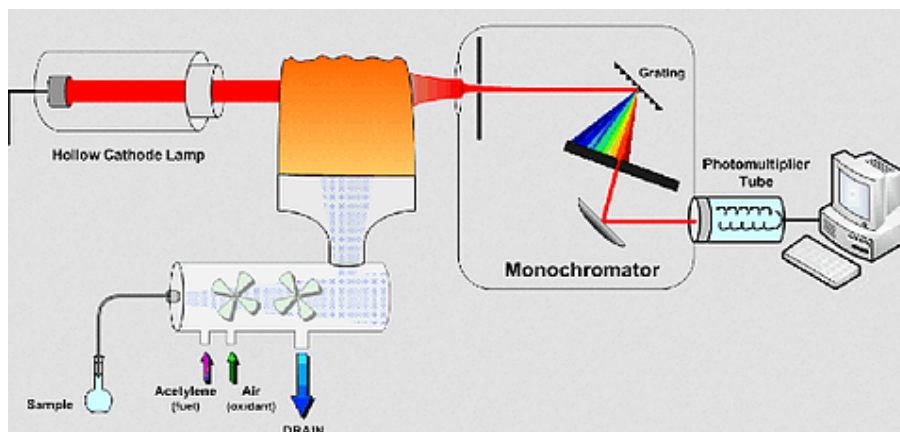
Atomski apsorpcijski spektrofotometar sastoji se od sljedećih sastavnica: izvor zračenja, stanica s uzorkom, monokromator, detektor i sustav za obradu podataka.

Izvor zračenja je šuplja katodna žarulja čija je katoda presvučena metalom koji se analizira, tj. emisijski sustav koji emitira spektar karakterističan za element koji se određuje. Naponom se atomi metala u toj katodi pobude te povratkom iz pobuđenog u osnovno stanje emitiraju zračenje određene energije. Količina energije tog emitiranog zračenja je jednaka količini energiju koju će metal koji se analizira apsorbirati da bi prešao iz osnovnog u pobuđeno stanje. Na tržištu postoje i katode napravljene od legura više metala, ali neće sve kombinacije metala dati željen učinak (Luterotti i sur., 2013; Soylak i sur., 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).



Svjetlo iz lampe prolazi kroz plamen u koji se usisava otopina uzorka te atomi analiziranog elementa apsorbiraju dio energije zračenja. Rezonantna linija se izdavaja pomoću filtera ili monokromatora te registrira fotodetekcijskim sustavom (Luterotti i sur., 2013).

Djelovanjem generatora atomske pare uzorak se atomizira u stanici s uzorkom. Nakon ispravanja otapala i desolvatacije metalni ioni se prevode u slobodne atome. Korišten plamen zahtijeva i gorivo i oksidans, a najčešće upotrebljavane kombinacije su zrak-acetilen ili dušikov oksid-acetilen, ovisno o temperaturi koja je potrebna za atomizaciju. Zrak-acetilen osigurava temperatura od 2400 °C, a dušikov oksid-acetilen temperaturu od 2800 °C (Skoog i sur., 1999; Watson 1999).



Slika 5. Atomski apsorpcijski spektrofotometar

(preuzeto i prilagođeno s [www.jsanalytical.com](http://www.jsanalytical.com), pristupljeno 11. 02. 2020.)

## 1.4. Validacija analitičke metode

Validacijom analitičkog postupka utvrđuje se i dokumentira prikladnost ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. Validacija analitičkog postupka jamči da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti valjani rezultati. Potrebno ju je provesti pri razvoju i uvođenju nove metode, ali i kod promjene bilo kojeg dijela već postojeće metode. Prema regulatornim zahtjevima Dobre proizvođačke prakse (*Good manufacturnig praxis*, GMP) i Dobre laboratorijske prakse (*Good laboratory praxis*, GLP) postupci validacije analitičkih postupaka postali su obveza (Nigović i sur., 2014; Olmedo i sur., 2009).

Analitičke značajke koje se određuju u postupku validacije su: preciznost, specifičnost i selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i radno područje, točnost i izdržljivost (otpornost). Ako je metoda namijenjena za određivanje sadržaja tada se ispituju točnost, preciznost, selektivnost i specifičnost, linearnost te radno područje (Nigović i sur., 2014; Peters i sur., 2002).

Analitički postupak se razvija i validira sve dok validacijski parametri ne zadovolje zahtjeve predviđene određenim propisima. Na temelju usporedbe dobivenih rezultata s postavljenim kriterijima donosi se odluka o prihvaćanju analitičke metode ili nastavku njenog razvoja (Nigović i sur., 2014).

### 1.4.1. Preciznost

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost (engl. *repeatability*) i odnosi se na podudaranje rezultata dobivenih istom metodom u istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu (isti analitičar, isti instrument, isti laboratorij). Srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) govori o odstupanju rezultata dobivenih u različitim uvjetima (isti laboratorij, ali različiti dan, analitičar, instrument). Obnovljivost (engl. *reproducibility*) podrazumijeva odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Preciznost se izražava statističkim veličinama kao što su standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD %). Preciznost se

ispituje kroz najmanje pet do šest određivanja uz upotrebu dvije do tri različite koncentracije (Nigović i sur., 2014).

#### 1.4.2. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost analitičke metode je njezina sposobnost da nedvojbeno razlikuje samo jednu komponentu od ostalih prisutnih u uzorku. Praktično se češće govori o selektivnosti metode, obzirom da je specifičnost rijetka pojava. Selektivnost je definirana kao mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti matrice uzorka, tj. drugih komponenata uzorka, poput onečišćenja, razgradnih produkata, pomoćnih tvari. Ispitivanja selektivnosti analitičkih metoda za određivanje sadržaja ili ispitivanje čistoće provode se dodavanjem onečišćenja ili pomoćnih tvari čistoj tvari, koja se potom analizira. Ukoliko onečišćenja nisu dostupna, uzorak se podvrgava uvjetima koji potiču razgradnju i potom se utvrđuju interferencije (Nigović i sur., 2014).

#### 1.4.3. Linearnost

Linearnost analitičke metode podrazumijeva njezinu sposobnost da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost metode utvrđuje se kroz tri do šest mjerenja primjenom najmanje pet različitih koncentracija analita. Grafičkim prikazom ovisnosti izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja. Linearnost metode se izražava koeficijentom regresijskog pravca ( $k > 0,999$ ) (Nigović i sur., 2014).

#### 1.4.4. Radno područje

Radno područje mjerenja označava raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku, uključujući i granične vrijednosti, unutar kojega primjenjena analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost (Nigović i sur., 2014).

#### 1.4.5. Točnost

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Za utvrđivanje točnosti provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuje kao analitički prinos (engl. *recovery*) koji je jednak razmjeru srednje izmjerene vrijednosti i stvarne vrijednosti analita u uzorku. Točnost se određuje u radnom području metode nakon ispitivanja selektivnosti, linernosti i preciznosti (Nigović i sur., 2014).

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

#### 1.4.6. Granica dokazivanja i određivanja

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija koja se može dokazati prema zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku i moguće ju je odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. LOD i LOQ se određuju razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD = 3:1; LOQ = 10:1), ili iz standardnog odstupanja i nagiba kalibracijskog pravca, gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca, ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je  $a$  nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad \text{i} \quad LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a}$$

#### 1.4.7. Izdržljivost (otpornost)

Izdržljivost (otpornost) analitičke metode (engl. *robustness*) je mjera njene sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih, promjena parametara metode. Indikator je pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize. Prosuđuje se variranjem jednog parametra, dok ostali ostaju nepromijenjeni, a njegov izbor ovisi o samoj metodi (Nigović i sur., 2014).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Kalcij je makroelement koji u ljudskom organizmu ima više uloga. Sastavni je dio kosti, regulira kontrakciju i relaksaciju mišića, sudjeluje u prijenosu signala i ima uloga u zgrušavanju krvi (Marjanović-Balban i sur., 2015). Kako bi se postiglo neometano odvijanje ovih fizioloških funkcija, nužno je opskrbiti i adekvatan unos kalcija prehranom ili suplementacijom. Svjetska zdravstvena organizacija i Američka agencija za lijekove su propisale dnevne preporučene vrijednosti (RDA) kalcija za svaku pojedinu dobnu skupinu. Apsorpcija kalcija mijenja se s dobi. U novorođenčadi ona iznosi 60% i odvija se uglavnom pasivnom difuzijom. U ranom djetinjstvu postotak apsorpcije kalcija se smanjuje, a ulaskom u pubertet ponovo raste jer je tada proces oblikovanja kostiju na vrhuncu. U mlađih osoba postotak apsorpcije je oko 25%. Kako organizam stari, apsorpcija kalcija se smanjuje, posebice kod starijih od 55 godina i žena u menopauzi (Ross i sur., 2011). Nedovoljan unos kalcija tijekom kratkog vremenskog perioda neće dovesti do razvoja uočljivih simptoma jer će se koncentracija u serumu održavati pomoću zaliha kalcija u kostima. Ipak, ako se potrebe za kalcijem ne zadovoljavaju putem prehrane, proces nadoknađivanja kalcija iz kostiju dovodi do smanjenja gustoće kostiju - osteopenije i povećanja rizika od osteoporoze i fraktura. Uslijed dugotrajnog nedotataka kalcija, javljaju se simptomi poput konvulzija, trnci u prstima ili abnormalni srčani ritam s ozbiljnim rizicima po život čovjeka ako se na vrijeme ne prepoznaju ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)).

Cilj ovog rada bio je optimizirati analitičku metodu pomoću koje će se odrediti kalcij u različitim uzorcima žitarica. Za određivanje sadržaja kalcija korištena je metoda plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije.

Za optimizaciju metode ispitani su sljedeći parametri validacije: linearanost, preciznost, granica dokazivanja i granica određivanja pomoću standardnih otopina kalcija. Nakon što je provedena validacija, razvijena metoda primjenjena je za određivanje sadržaja kalcija u komercijalno dostupnim uzorcima ( $n = 3$ ).

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



### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

Tablica 1. Popis kemikalija

6,00 mol/L HCl ( <i>Kemig</i> , Hrvatska)
HNO <sub>3</sub> 65% ( <i>Kemig</i> , Hrvatska)
HNO <sub>3</sub> 5% ( <i>Kemig</i> , Hrvatska)
HNO <sub>3</sub> 2% ( <i>Kemig</i> , Hrvatska)
Ca standard za AAS koncentracije 1000,00 mg/L ( <i>SigmaAldrich</i> , Njemačka)
ultračista voda (provodljivost 0,005 μScm <sup>-1</sup> )
lantanov (III) nitrat heksahidrat ( <i>Honeywell Fluka<sup>TM</sup></i> , Njemačka)

Korištene kemikalije bile su *proanalysis* čistoće.

#### 3.1.2. Laboratorijski pribor i posuđe

Tablica 2. Popis laboratorijskog pribora i posuđa

plastične epruvete s čepom za pohranu uzorka
tarionik s pistilom
žlica
porculanske zdjelice za žarenje
Mufolna peć
odmjerne tikvice volumena 100,00 mL i 50,00 mL
graduirane pipete od 20,00 mL, 10,00 mL, 5,00 mL
plastični stalak za epruvete
automatske mikropipete volumena 5,00-50,00 μL, 50,00-200,00 μL, 200,00-1000,00 μL, 1000,00-10000,00 μL
hladnjak za pohranu uzoraka i standarda
analitička vaga

### 3.1.3. Aparatura

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

Tablica 3. Parametri instrumenta

<b>žarulja</b>	žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
<b>valna duljina (nm)</b>	422,7
<b>gorivo (oksidans)</b>	acetilen (zrak)
<b>acetilen [tlak (Pa) : protok (L/min)]</b>	$0,9 \cdot 10^5 : 2$
<b>zrak [tlak (Pa) : protok (L/min)]</b>	$5,5 \cdot 10^5 : 17$
<b>širina pukotine (nm)</b>	0,7
<b>korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine</b>	deuterijski korektor
<b>fotodetektor</b>	
<b>računalo, pisač</b>	<i>AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo - zaslon - pisač HP 5652</i>

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Princip metode

Koncentracija kalcija određivana je mjerenjem apsorbancije uzorka raspršenog u smjesi acetilena i zraka otparenog u plamenu pri čemu dolazi do atomizacije. Atomi u plinovitom osnovnom stanju apsorbiraju zračenje valne duljine 422,7 nm te se mjeri promjena inteziteta zračenja (White, 2003).

### 3.2.2. Priprema otopina

Tablica 4. Priprema otopina

otopina	izrada otopine	svrha korištenja izradene otopine
HNO <sub>3</sub> 5%	razrjeđenjem 50,00 mL 65% HNO <sub>3</sub> u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 1000,00 mL ultračistom vodom	ispiranje svog posuđa prije korištenja u eksperimentu
HNO <sub>3</sub> 2%	razrjeđenjem 10,00 mL 65% HNO <sub>3</sub> u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 500,00 mL ultračistom vodom	ispiranje plamenog atomizatora
LaNO <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 1%	1 gram lantanovog nitrata heksahidrata se otopi u odmjernoj tikvici do 100,00 mL ultračistom vodom	uklanjanje kemijskih interferencija

Standardna otopina kalcija koncentracije 1000,00 mg/L korištena je za izradu standardne otopine kalcija koncentracije 100,00 mg/L i volumena 10,00 mL. Dobivena je razrjeđenjem 1,00 mL standardne otopine koncentracije 1000,00 mg/L u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 10,00 mL ultračistom vodom (White, 2003).

Standardna otopina kalcija koncentracije 100,00 mg/L je korištena je u izradi standardnih otopina koje su se koristile za izradu kalibracijskog pravca.

Tablica 5. Priprema standardnih otopina kalcija

<b>koncentracija standarda za izradu kalibracijskog pravca (mg/L)</b>	<b>volumen standardne otopine kalcija koncentracije 100 mg/L (mL)</b>	<b>ukupan volumen otopine standarda (mL)</b>	<b>ukupno razrijeđenje u odnosu na standardnu otopinu (100 mg/L)</b>
2,00	0,20	10,00	50 x
5,00	0,50	10,00	20 x
10,00	1,00	10,00	10 x
15,00	1,50	10,00	6,68 x
20,00	2,00	10,00	5 x

### 3.2.3. Priprema uzoraka za analizu

Uzorci su sakupljeni u travnju 2019. godine te pohranjeni na sobnoj temperaturi. Analizirana su tri uzorka različitih žitarica istog proizvođača. Uzorci žitarica se prvo usitne u tarioniku s pistilom te se prenesu pomoću žlice u porculanske zdjelice za žaranje te odvagnu. Za svaku pojedinu vrstu žitarica potrebno je imati tri uzorka i jednu praznu porculansku zdjelicu. Uzorci se zatim prenose u Mufolnu peć gdje ih se izlaže toplinskog energiji dva sata na 600 °C. Prije daljnje analize potrebno je da se uzorci u porculanskim posudama ohlade na sobnoj temperaturi barem 30 minuta. Zatim se svakom uzorku, prethodno odvagano na analitičkoj vagi na četiri decimale, približne mase 0,50 g, dodaje 5,00 mL 6,00 mol/L otopine HCl-a koja otapa ostatak dobiven žarenjem. Dobivene otopine kvantitativno se prenose u tikvice volumena 100,00 mL pažljivo ispirući ultračistom vodom te se nadopuni do oznake i promućka, i tako za svaki uzorak pojedinačno. Od tako pripremljenog uzorka se odpipetira 5,00 mL alikvota u tikvice volumena 50,00 mL i doda 5,00 mL 1%-tne otopine La. I tako za svaki pojedinačni uzorak u triplikatu.

Za metodu standardnog dodatka pripremi se otopina kalcija 20,00 µg/mL (dobivena iz matične standardne otopine kalcija 1000,00 mg/L). Otpipetira se 5,00 mL alikvota svakog prethodno pripremljenog pojedinačnog uzorka u tikvicu volumena 50,00 mL, zatim se doda u

jednu tikvicu 5,00 mL, u drugu 10,00 mL, a u treću 20,00 mL 20,00 µg/mL otopine Ca standarda, da se dobiju otopine koncentracija 2,00 4,00 i 8,00 µg/mL. U svaku tako pripremljenu otopinu doda se i 5,00 mL 1%-tne otopine La te nadopuni do oznake ultračistom vodom. Postupak se ponavlja za svaki uzorak pojedinačno. Dakle, za metodu standardnog dodatka, za svaki uzorak različitih žitarica, rade se tri otopine standardnog dodatka koncentracije 2,00, 4,00 i 8,00 µg/mL (ppm). Za slijepu probu se pomiješa 5,00 mL 1%-tne otopine La u tikvici volumena 50,00 mL i nadopuni do oznake ultračistom vodom.

#### 3.2.4. Postupak određivanja koncentracije kalcija

Postupku određivanja prethodi ispiranje plamenog atomizatora 2%-tnom otopinom HNO<sub>3</sub> te konačno ultračistom vodom. Pripremljene otopine standarda se analiziraju atomskim apsorpcijskim spektrofotometrom svaki radni dan prije početka određivanja koncentracije Ca u uzorcima.

Na taj način se dobiva kalibracijska krivulja, koja je važna u određivanju koncentracije Ca u uzorcima, ali se i ispituju validacijski parametri kao što su točnost, preciznost (ponovljivost unutar jednog dana i ponovljivost unutar tri dana), granica dokazivanja i granica određivanja. Pripremljene otopine uzorka se mjere uranjanjem plastične cjevčice koja automatski usisava otopinu uzorka.

Otopine uzorka se mjere tri puta, budući da instrument ima mogućnost višestruke analize istog uzorka u kratkom vremenu. Koncentracija Ca praćena je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 422,7 nm. Koncentracija Ca u uzorku izračunata je pomoću programskog paketa koji za račun koristi dobiveni kalibracijski pravac.

#### 3.2.5. Statistička analiza

Za statističku analizu dobivenih rezultata korišten je računali program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 8* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Dobiveni podaci prikazni su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija šest mjerenja. Za testiranje statističke razlike

između dvije skupine podataka korišten je t-test. Sva zaključivanja u radu provedena su uz razinu značajnosti  $P < 0,05$ .

#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Validacija analitičke metode

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

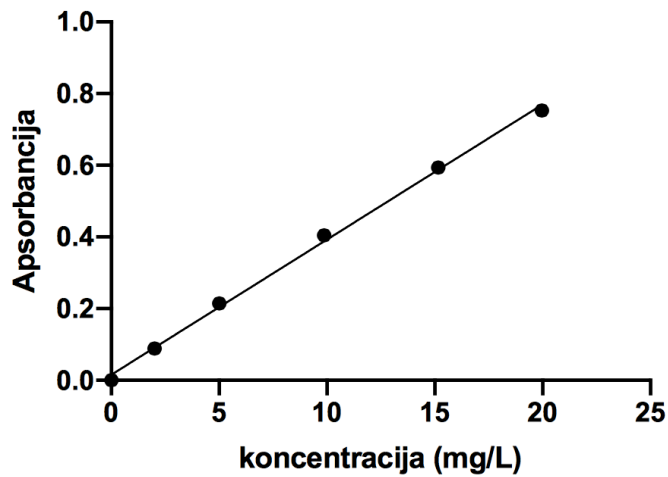
### 4.1.1. Linearnost

Linearnost se ispitivala provođenjem tri mjerenja za pet različitih koncentracija. Rezultat dobivenih mjerenja izražava se grafom ovisnosti analitičkog signala o koncentraciji standarda, tj. kalibracijskom krivuljom. Linearnost se definira koeficijentom korelacije regresijskog pravca.

Tablica 6. Linearnost

<b>koncentracija standarda (mg/L)</b>	<b>izmjerena koncentracija (mg/L)</b>	<b>analitički signal (apsorbancija)</b>
0	0	0
2	2,006	0,089
5	5,003	0,215
10	9,872	0,405
15	15,16	0,594
20	19,96	0,753





Slika 6. Graf ovisnosti koncentracije standardnih otopina kalcija i apsorbancije

Na temelju dobivenih rezultata regresijskom analizom dobivena je jednadžba kalibracijskog pravca  $y = 0,0377x + 0,0155$ . Koeficijent korelacije regresijskog pravca  $k$  za dani graf iznosi 0,9979. Na temelju dobivenih podataka može se zaključiti da je metoda linearna, te se može primjeniti za određivanje sadržaja Ca u ispitivanim uzorcima.

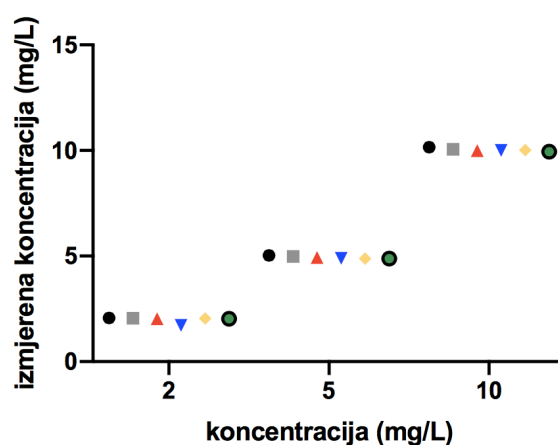
#### 4.1.2. Preciznost

Preciznost se ispitivala provođenjem šest mjerenja za tri različite koncentracije i može se iskazati kao ponovljivost, što podrazumijeva mjerenje u kratkom vremenskom razdoblju tijekom jednog dana, i kao srednja preciznost što podrazumijeva ponovljivost između dana. Izražava se vrijednostima kao što su SD i RSD.

Tablica 7. Ponovljivost u danu

<b>koncentracija standarda (mg/L)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>1. mjerenje</b>	2,072	5,031	10,16
<b>2. mjerenje</b>	2,057	4,978	10,06
<b>3. mjerenje</b>	2,035	4,931	9,988
<b>4. mjerenje</b>	1,723	4,894	10,00
<b>5. mjerenje</b>	2,038	4,877	10,02
<b>6. mjerenje</b>	2,031	4,876	9,943
<b>srednja vrijednost</b>	1,993	4,931	10,03
<b>SD</b>	0,133	0,062	0,075
<b>RSD (%)</b>	6,675	1,267	0,748

Rezultati dobiveni za ponovljivost u danu, izražena kao RSD (%), su unutar prihvatljivih granica (manji od 10%) te je metoda prihvatljiva za određivanje kalcija u uzorcima.

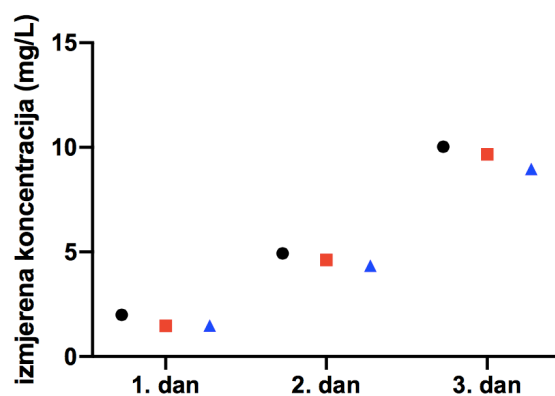


Slika 7. Grafički prikaz ponovljivosti uzastopnih mjerenja (n = 6) unutar dana

Tablica 8. Ponovljivost kroz tri dana

<b>koncentracija standarda (mg/L)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>1. dan (n = 6)</b>	1,993	4,931	10,03
<b>2. dan (n = 6)</b>	1,472	4,622	9,664
<b>3. dan (n = 6)</b>	1,485	4,343	8,972
<b>srednja vrijednost</b>	1,649	4,631	9,555
<b>SD</b>	0,297	0,295	0,537
<b>RSD (%)</b>	18,00	6,372	5,617

Rezultati dobiveni za ponovljivost kroz dane su unutar prihvatljivih granica i metoda se može primjeniti za određivanje kalcija u ispitivanim uzorcima. Dobivne visoke vrijednosti RSD za standardne otopine najniže koncentracije mogu se objasniti nestabilnošću standardnih otopina niskih koncentracija tijekom stajanja.



Slika 8. Grafički prikaz ponovljivosti kroz tri dana (n = 6)

#### 4.1.3 Točnost

Točnost je određena mjerenjem apsorbancije kalcija u prethodno pripremljenim uzorcima žitarica. U takve uzorke dodan je točno određeni volumen (5,00, 10,00 i 20,00 mL) prethodno pripremljene standardne otopine kalcija (20 µg/mL), te je zatim ponovo mjerena apsorbancija. Iz dobivene apsorbancije izračunata je koncentracija kalcija. Dopuštena vrijednost analitičkog prinosa je između 95% i 115%. Dobivene vrijednosti su između 93,57 - 107,10 %. Iz navedenog se može zaključiti da je metoda prihvatljive točnosti.

Tablica 9. Analitički prinos kalcija uzorcima žitarica (1) u kojima je dodano 5,00, 10,00 i 20,00 mL standardne otopine kalcija (20 µg/mL).

<b><math>c</math> (µg/mL) kalcija u uzorku + <math>c</math> (µg/mL) dodanog standarda</b>	<b>ukupna <math>c</math> (µg/mL)</b>	<b>izmjerena <math>c</math> (µg/mL)</b>	<b><math>c</math> dodatka (µg/mL)</b>	<b>analitički prinos (%)</b>
2,112 + 2	4,112	3,848	1,871	93,57
2,112 + 4	6,211	5,967	3,843	96,07
2,112 + 8	10,112	10,83	8,567	107,1

Tablica 10. Analitički prinos kalcija u uzorcima žitarica (2) u kojima je dodano 5,00, 10,00 i 20,00 mL standardne otopine kalcija (20 µg/mL)

<b><i>c</i> (µg/mL) kalcija u uzorku + <i>c</i> (µg/mL) dodanog standarda</b>	<b>ukupna <i>c</i> (µg/mL)</b>	<b>izmjerena <i>c</i> (µg/mL)</b>	<b><i>c</i> dodatka (µg/mL)</b>	<b>analitički prinos (%)</b>
1,955 + 2	3,955	3,768	1,905	95,26
1,955 + 4	5,955	5,883	3,951	98,79
1,955 + 8	9,955	9,910	7,963	99,55

Tablica 11. Analitički prinos kalcija u uzorcima žitarica (3) u kojima je dodano 5,00, 10,00 i 20,00 mL matične standardne otopine kalcija (20 µg/mL)

<b><i>c</i> (µg/mL) kalcija u uzorku + <i>c</i> (µg/mL) dodanog standarda</b>	<b>ukupna <i>c</i> (µg/mL)</b>	<b>izmjerena <i>c</i> (µg/mL)</b>	<b><i>c</i> dodatka (µg/mL)</b>	<b>analitički prinos (%)</b>
3,064 + 2	5,064	5,066	2,001	100,0
3,064 + 4	7,064	6,974	3,949	98,73
3,064 + 8	11,06	11,08	3,009	100,1

#### 4.1.4. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja je vrijednost koja se odredila prema formuli:

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

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje  $y$ -odsječka regresijskog pravca, a  $a$  je nagib pravca (Nigović i sur., 2014).

$$LOD = 1,334 \text{ mg/L}$$

Granica određivanja je vrijednost koja se odredila prema formuli:

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

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje  $y$ -odsječka regresijskog pravca, a  $a$  je nagib pravca (Nigović i sur., 2014).

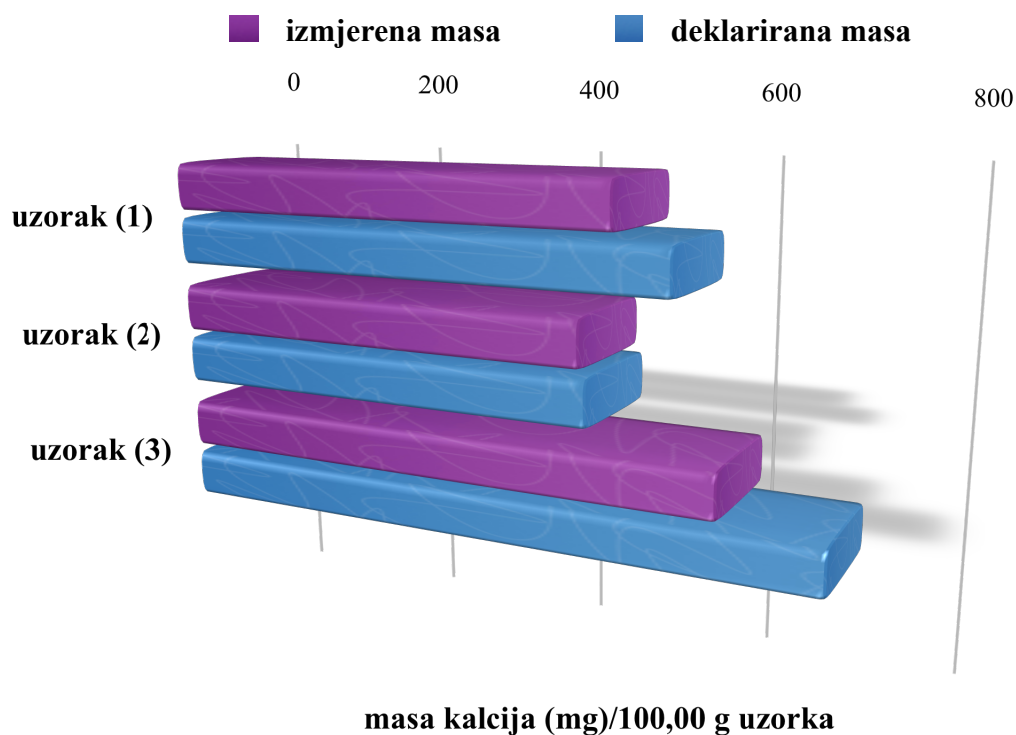
$$LOQ = 4,043 \text{ mg/L}$$

## 4.2. Primjena metode u određivanju kalcija u uzorcima

Validiranom metodom određen je sadržaj kalcija u uzorcima žitarica. Svaki pripremljeni uzorak mjereno je u triplikatu. Analiza je provedena na 3 različita proizvoda istog proizvođača.

Tablica 12. Mase kalcija (mg) u uzorcima žitarica analizanih optimiranom metodom

uzorak žitarica	(1)	(2)	(3)
srednja vrijednost (n = 3) (mg)	2,528	2,359	3,064
srednja vrijednost ± SD	0,015	0,028	0,019
RSD (%)	0,621	1,19	0,625



Slika 9. Usporedba izmjerenih i deklariranih masa kalcija u analiziranim uzorcima

U ispitivama uzorcima žitarica potvrđeno je prisustvo elementa kalcija i dobivene su sljedeće vrijednosti kalcija: u uzorku (1) 501,58 mg na 100,00 g uzorka, u uzorku (2) 467,31 mg na 100,00 g uzorka, te 605,53 mg na 100,00 g uzorka (3). S obzirom da deklaracije analiziranih uzoraka žitarica navode količinu sadržanog kalcija, dobivene vrijednosti uspoređene su s deklariranim.

Usporedbom rezultata dobivenih AAS analizom za količinu kalcija u analiziranim uzorcima žitarica s vrijednostima koje su deklarirane, može se zaključiti da ne postoji značajna statistička razlika između deklarirane vrijednosti i izmjerene vrijednosti svih analiziranih uzoraka.

Odstupanje može biti posljedica pogreške analitičara u nekom od koraka analize ili varijacija u sadržaju kalcija u pojedinim žitaricama.

Dobiveni rezultati potvrdili su da je optimirana metoda primjenjiva za pouzdano i precizno određivanje sadržaja kalcija u uzorcima žitarica.



## **5. ZAKLJUČAK**

Kalcij je makronutrijent s višestrukim ulogama u čovjekovom organizmu. Deficit kalcija može se nadomjestiti uravnoteženom prehranom konzumirajući namirnice obogaćene kalcijem ili dodacima prehrani. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija je pouzdana i točna metoda za određivanja sadržaja kalcija u uzorcima žitarica.
2. Predložena metoda validirana je prema važećim smjernicama. Dobiveni rezultati pokazali su da je metoda linerana, ponovljiva i točna.
3. Validirana metoda je jednostavna, brza, jeftina i pouzdana. Pogodna je za analizu velikog broja različitih uzoraka i može imati široku primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

## 6. LITERATURA

Allen LH. Calcium bioavailability and absorption. *Am J Clin Nutr*, 1982, 35, 783-808.

Anderson JB. Nutritional biochemistry of calcium and phosphorus. *J Nutr Biochem*, 1991, 2, 300-307.

Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), 2017, <https://www.jsanalytikal.com>, pristupljeno 11. 02. 2020.

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

Bygrave FL, Benedetti. Calcium: its modulation in liver by cross-talk between the action of glucagon and calcium mobilizing agonists. *J Biochem*, 1993, 296, 1-14.

Dietary Supplements: What You Need to Know, 2011, <https://ods.od.nih.gov>, pristupljeno 17. 02. 2020.

Fanian F, Mac-Mary S, Jeudy A, Lihoreau T, Messikh R, Ortonne J-P, Elkhyat A, Sainthillier JM, Guichard A, Kenari KH, Humber P. Efficacy of micronutrient supplementation on skin aging and seasonal variation: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Clin Interv Aging*, 2013, 8, 1527-1537.

Gómez QJM, Blanch R, Curiel DM, Pérez Diéz A. Calcium citarate and vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Clin Drug Investig*, 2011, 31, 285-298.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology, Philadelphia, Elsevier Saunders, 2011, str. 955, 957-960, 962-965.

Harris CD. Quantitative Chemical Analysis, 8<sup>th</sup> Edition, New York, W.H. Freeman and Company, 2010, str. 51-67, 393-501.

Hope WG, Ibarra MJ, Thomas ML. Testosterone alters duodenal calcium transport and longitudinal bone growth rate in parallel in the male rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992, 200, 536-541.

Kerstetter JE, O'Brien KO, Caseria DM, Wall DE, Insogna KL. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90, 26-31.

Lovrić Turjak N. Učinkovitost i sigurnost primjene kalcija i vitamina D u kliničkoj praksi, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018, str. 5-6.

Luterotti S, Bičanić D. Odabrane teme iz bioanalitike, 4. izdanje, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 1-3, 7-17, 28-32, 35-57.

- Marjanović-Balaban Ž, Antunović V, Jelić D, Živković T. Determination of calcium content in dietary supplements, *Hrana u zdravlju i bolesti*, 2015, 4, 28-33.
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodríguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum: Validacija analitičkog postupka. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučiliša u Zagrebu, 2014, str. 135-137.
- Olmedo, P, Pla A, Hernández AF, López G, Rodrigo L, Gil F. Validation of a method of quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2010, 60-67.
- Parker, Mary M, Fred L, Humoller, Delmar J Mahler. Determination of Copper and Zinc in Biological Material. *Clin Chem*, 1967, 40-48
- Peacock M. Calcium Metabolism in Health and Disease, *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010, 5, 23-30.
- Pravilnik o dodacima prehrani, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 126 (NN 126/2013)
- Peters FT, Murer HH. Bioanalytical Method Validation: How, how much and why. *A review. TIAFT Bulletin*, 2002, 32, 16-23.
- Ross CA, Taylor C, Yaktine AL, Del Valle HB. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D, 2011, Washington, D.C.: The National Academies Press, 37-38.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of Analytical Chemistry 6<sup>th</sup> Edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alrgretti, Živković A., Atomska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivom zračenju. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 595-620.
- Soylak M, Aydin A. Determination of some heavy metals in food and environmental samples by flame atomic absorption spectrometry after co-precipitation. *Food Chem Toxicol*, 2011, 1242-1248.
- Watson DG. Pharmaceutical Analysis: Atomic spectrophotometry. Edinburgh; Churchill Livingston, 1999, str. 125-132.
- White C. Atomic absorption determination of zinc and copper in multivitamins. *J At Abs Spectrosc*, 2003, 12-14.
- Zofkóva I, Nemcikova P, Matucha P. Trace elements and bone health. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51, 1555-1561.

## **7. SAŽETAK /SUMMARY**

Kalcij je najzastupljeniji mineral u čovjekovom organizmu. Uloga kalcija u ljudskom organizmu je od velike važnosti za normalan metabolizam. Važna je sastavnica kostiju i zubiju, regulira kontrakciju i relaksaciju mišića, funkciju živčanog tkiva, zgrušavanje krvi, utječe na regulaciju krvnog tlaka i provođenje prijenosnih signala živčanog sustava. Eliminira se urinom i fecesom. Ukoliko unos kalcija i apsorpcija iz crijeva ne zadovoljavaju fiziološke potrebe ljudskog organizma, tada se kalcij resorbira iz kostiju, što narušava zdravlje kostiju. Kroničan deficit kalcija dovodi do smanjenja koštane mase, osteoporoze i učestale frakture kosti. Deficit kalcija moguće je spriječiti korištenjem namirnica obogaćenih kalcijem u svakodnevnoj prehrani. Cilj ovoga rada bila je optimizacija metode plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije u svrhu određivanja kalcija u uzorcima žitarica. Ispitivanja su provedena na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru *Analyst 800* (*PerkinElmer Instruments*, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine na valnoj duljini od 422,7 nm. Postojeća metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije prema važećim smjernicama. Dobiveni rezultati su pokazali da su izmjerene mase kalcija u uzorcima usporedive s deklariranim masama proizvođača. Metoda se pokazala brzom, jeftinom, pouzdanom i pogodnom za određivanje kalcija u različitim uzorcima žitarica.

Calcium is one of the most prevalent elements in the human body. As such, it plays an important role in normal human metabolism. It is a significant part of the human bones and teeth, regulates muscle contraction and relaxation, nerve tissue function, blood coagulation, affects high blood pressure regulation and conducting nerve system transmission signals. It is eliminated by urine and feces. If calcium supply and bowel absorption are not sufficient to satisfy the physiological needs of the human body, then calcium is resorbed from bones, which impairs bones' health. Chronic calcium deficit leads to bone mass decreasing, osteoporosis, and frequent bone fractures. Calcium deficit can be stopped using calcium enriched food daily. The main purpose of this thesis was optimisation of flame atomic absorption spectroscopy due to calcium quantification in cereal samples. Tests were done using atomic absorption spectrophotometer *Analyst 800* with non-specific surface deuterium corrector at the wavelength of 422,7 nm. The existing method has been validated by validation parameter examination. Results show that measured calcium masses in samples are comparable with declared masses. The method proved to be fast, cheap, reliable, and appropriate for calcium determination in different cereal samples.



## **9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA METODE PLAMENE ATOMSKE APSORPCIJSKE SPEKTROFOTOMETRIJE U SVRHU ODREĐIVANJA KALCIJA U UZORCIMA ŽITARICA

Teo Vučković

#### SAŽETAK

Kalcij je najzastupljeniji mineral u čovjekovom organizmu. Uloga kalcija u ljudskom organizmu je od velike važnosti za normalan metabolizam. Važna je sastavnica kostiju i zubiju, regulira kontrakciju i relaksaciju mišića, funkciju živčanog tkiva, zgrušavanje krvi, utječe na regulaciju krvnog tlaka i provođenje prijenosnih signala živčanog sustava. Eliminira se urinom i fecesom. Ukoliko unos kalcija i apsorpcija iz crijeva ne zadovoljavaju fiziološke potrebe ljudskog organizma, tada se kalcij resorbira iz kostiju, što narušava zdravlje kostiju. Kroničan deficit kalcija dovodi do smanjenja koštane mase, osteoporoze i učestale frakture kostiju. Deficit kalcija moguće je spriječiti korištenjem namirnica obogaćenih kalcijem u svakodnevnoj prehrani. Cilj ovoga rada bila je optimizacija metode plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije u svrhu određivanja kalcija u uzorcima žitarica. Ispitivanja su provedena na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru *Analyst 800* s deuterijskim korektorom nespecifične površine na valnoj duljini od 422,7 nm. Postojeća metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije prema važećim smjernicama. Dobiveni rezultati su pokazali da su izmjerene mase kalcija u uzorcima usporedive s deklariranim masama proizvođača. Metoda se pokazala brzom, jeftinom, pouzdanom i pogodnom za određivanje kalcija u različitim uzorcima žitarica.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 9 grafičkih prikaza, 12 tablica i 27 literaturnih navoda.  
Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Atomska apsorpcijska spektrofotometrija, kalcij, žitarice

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu*  
*Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu*  
*Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu*  
*Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### OPTIMISATION OF FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY METHOD DUE TO CALCIUM QUANTIFICATION IN CEREAL SAMPLES

**Teo Vučković**

#### SUMMARY

Calcium is one of the most prevalent elements in the human body. As a such, it plays an important role in normal human metabolism. It is a significant part of human bones and teeth, regulates muscle contraction and relaxation, nerve tissue function, blood coagulation, affects high blood pressure regulation, and conducting nerve system transmission signals. It is eliminated by urine and feces. If calcium supply and bowel absorption are not sufficient to satisfy the physiological needs of the human body, then calcium is resorbed from bones, which impairs bones' health. Chronic calcium deficit leads to bone mass decreasing, osteoporosis and frequent bone fractures. Calcium deficit can be stopped using calcium enriched food daily. The main purpose of this thesis was optimisation of flame atomic absorption spectroscopy due to calcium quantification in cereal samples. Tests were done using atomic absorption spectrophotometer *Analyst 800* with non-specific surface deuterium corrector at the wavelength of 422,7 nm. The existing method has been validated by the validation parameter examination. Results show that measured calcium masses in samples are comparable with declared masses. The method proved to be fast, cheap, reliable and appropriate for calcium determination in different cereal samples.

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

Thesis includes: 43 pages, 9 figures, 12 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Atomic absorption spectroscopy, calcium, cereal

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

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry.*  
**Jasmina Lovrić Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry.*  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry.*

The thesis was accepted: May, 2020.