

Određivanje koncentracija bakra u uzorcima humane plazme pomoću UV-VIS spektrofotometra i induktivno spregnute plazme vezane na spektrometar masa (ICP-MS)

Bažant, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:723898>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-13**



Repository / Repozitorij:

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



Mario Bažant

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA
BAKRA U UZORCIMA HUMANE PLAZME
POMOĆU UV-VIS SPEKTROFOTOMETRA
I INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME
VEZANE NA SPEKTROMETAR MASA
(ICP-MS)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku i na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar pod stručnim vodstvom dr. sc. Adele Krivohlavek s Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar i prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan sa Zavoda za farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan, ponajprije na prijateljskom odnosu, a onda i na strpljenju, pomoći i stručnom vodstvu, kako prilikom izrade diplomskog rada, tako i prilikom pisanja rada za Rektorovu nagradu.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i djelatnicima Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar na pomoći i strpljenju.

Posebno bih se htio zahvaliti najboljoj prijateljici Mateji i najboljem prijatelju Matiji koji su me bodrili, trpjeli i bili mi podrška kad mi je najviše trebalo za vrijeme cijelog studiranja, a također i prije i, nadam se, nakon studija, o čemu god da se radilo. Vas dvoje me činite boljom osobom iz dana u dan. Pravi prijatelji su rijetkost, a ja ih imam dvoje i zato mogu reći da sam pravi srećković. Gdje god bio, koliko god daleko bio od vas udaljen, znam da uvijek mogu računati na vas. Hvala vam na tome.

Hvala Antoniju na suradnji pri izradi rada za Rektorovu nagradu, na pomoći tijekom cijelog vremena studiranja i na bilješkama kad mi je zatrebalo (a bilo je često).

Također, hvala Mariji na pomoći oko učenja i na bilješkama s predavanja pojedinih kolegija jer sam ja bio prelijen voditi svoje.

Hvala Roberti, Katarini, Ivoni i Dubravki na pruženoj pomoći oko izrade diplomskog rada te na neiscrpnom znanju iz struke koje ste stekle prilikom rada u medicinsko-biokemijskim laboratorijima koje prenosite dalje na mene.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Uloga bakra u organizmu	1
1.2. UV-VIS spektrofotometrija	3
1.2.1. Princip metode	3
1.2.2. Dijelovi UV-VIS spektrofotometra.....	4
1.3. Induktivno spregnuta plazma – spektrometrija masa (ICP-MS).....	4
1.3.1. Princip metode	4
1.3.2. Priprema uzoraka	5
1.3.3. Dijelovi ICP-MS-a	5
1.3.3.1. Sustav za ubacivanje uzorka	5
1.3.3.2. Sustav za induktivno ioniziranje uzorka (induktivno spregnuta plazma – ICP).....	5
1.3.3.3. Sučelje između ICP-a i spektrometra masa.....	6
1.3.3.4. Ionsko fokusiranje	7
1.3.3.5. Analizator masa.....	7
1.3.3.5.1. Kvadrupolni analizator masa.....	8
1.3.3.5.2. Vrijeme preleta (TOF).....	8
1.3.3.5.3. Analizator masa magnetskog sektora.....	8
1.3.3.6. Detektor.....	9
1.3.3.6.1. Kanalni elektronski multiplikator.....	9
1.3.3.6.2. Elektronski multiplikator diskretne dinode	10
2. Obrazloženje teme	11
3. Materijali i metode.....	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Korištene kemikalije	12
3.1.2. Aparature.....	12

3.1.3.	Uzorci.....	12
3.2.	Metode	13
3.2.1.	Spektrofotometrijsko određivanje koncentracija bakra	13
3.2.1.1.	Princip metode	13
3.2.1.2.	Priprema otopina za analizu	13
3.2.1.3.	Priprema standardnih otopina bakra.....	14
3.2.1.4.	Izvođenje pokusa.....	14
3.2.2.	Određivanje koncentracija bakra pomoću ICP-MS-a	15
3.2.2.1.	Princip metode	15
3.2.2.2.	Priprema standardnih otopina bakra.....	15
3.2.2.3.	Priprema uzoraka za analizu	16
3.2.2.4.	Izvođenje pokusa.....	16
3.3.	Statistička obrada rezultata	17
4.	Rezultati i rasprava	19
4.1.	Validacija spektrofotometrijske i ICP-MS metode.....	19
4.1.1.	Linearnost	20
4.1.2.	Granica dokazivanja i granica određivanja.....	21
4.1.3.	Točnost.....	22
4.1.4.	Preciznost.....	23
4.2.	Usporedba pripreme uzoraka za analizu koncentracija bakra UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom.....	25
4.3.	Dobiveni rezultati koncentracija bakra u humanoj plazmi UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom.....	26
4.3.1.	Spearmanova korelacija	27
4.3.2.	Passing-Bablok regresija.....	28
4.4.	Usporedba dobivenih rezultata koncentracija bakra u humanoj plazmi UV- VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom	30
5.	Zaključci	33

6. Literatura.....	34
7. Sažetak.....	36
7.1. Sažetak	36
7.2. Summary	37
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

1. Uvod

1.1. Uloga bakra u organizmu

Bakar je kemijski element prijeko potreban za normalno funkcioniranje ljudskog organizma iako je prisutan u niskim koncentracijama. Takvi elementi prisutni u tragovima, a potrebni za funkcioniranje organizma nazivaju se i esencijalnim elementima. Bakar ima brojne uloge u organizmu. Nalazi se u aktivnim centrima nekih enzima. Jedan od enzima u čijem se aktivnom mjestu nalazi bakar je citokrom c oksidaza, enzim koji se nalazi u mitohondrijima i ključan je u procesu oksidativne fosforilacije za aerobni metabolizam eukariota. Pored toga nalazi se i u aktivnom mjestu enzima superoksid-dismutaze, antioksidativnog enzima koji ima ulogu razgradnje superoksidnog aniona, O_2^- , na molekularni kisik i vodikov peroksid (Roberts i sur., 2018; Štraus i Rumora, 2009).

Unos bakra u organizam odvija se putem hrane. Normalnom, raznolikom i dovoljnom prehranom, u organizam se unose dovoljne količine bakra što iznosi 3 – 5 mg na dan. Te količine su dovoljne za dnevne potrebe organizma, koje iznose 1,5 – 3,0 mg po kg tjelesne mase (Roberts i sur., 2018; Štraus i Rumora, 2009).

Normalne vrijednosti bakra u prosječnom ljudskom organizmu su 100 – 150 mg (1,5 – 2,5 $\mu\text{g/g}$ tkiva). U serumu odraslih zdravih osoba koncentracija bakra je 12,2 – 25,1 $\mu\text{mol/L}$. Koncentracije bakra u organizmu ovise o dobi. Novorođenčad ima do 3 puta manju koncentraciju bakra, ali se ona povećava i do druge godine doseže najveće vrijednosti, a nakon 12. godine života koncentracija bakra se smanji te je jednaka onima odraslih. U krvnom serumu bakar se prenosi vezan na metaloprotein ceruloplazmin i u manjoj mjeri na albumin i transkuprein. Promjena koncentracije ceruloplazmina utječe na koncentraciju bakra u serumu (Roberts i sur., 2018; Štraus i Rumora, 2009).

Koncentracija bakra u organizmu može biti povišena ili snižena. Snižene koncentracije bakra (hipokupremija) najčešće se javljaju kod prerano rođene djece i u stanjima malapsorpcije, malnutricije ili kroničnih proljeva. Simptomi manjka bakra se razlikuju u ranoj i kasnoj fazi nedostatka bakra u organizmu. U ranoj fazi se javljaju hipokromna anemija, neutropenija, osteoporoza, bljedilo i hipopigmentacija kože, a u kasnoj fazi su mogući neurološki poremećaji. Stanja i bolesti koje su posljedica sniženih koncentracija bakra su celijačna bolest, nefroza, Cushingova bolest, karcinom kore nadbubrežne žlijezde, hemolitička anemija, hemokromatoza, Wilsonova bolest i Menkesov sindrom (Roberts i sur., 2018; Štraus i Rumora, 2009).

Povišene koncentracije (hiperkupremija) su češće i štetne te u organizmu mogu dovesti do ometanja vezanja drugih esencijalnih metalnih iona na njihovo mjesto djelovanja. Simptomi toksičnog djelovanja bakra su mučnina, povraćanje, bolovi u želudcu, krvarenja gastrointestinalnog sustava, proljevi, grčevi, nekroza jetre, tahikardija, hemoliza, a u slučaju da se prevelike koncentracije ne uspiju vratiti u normalu, čovjek upada u komu, a moguć je i smrtni ishod. Stanja i bolesti u kojima dolazi do povišenih koncentracija bakra su opstrukcija žučnih vodova, reumatoidni artritis, reumatska vrućica, glomerulonefritis, sistemski eritemni lupus, anemije, limfogranulomatoza, akutna leukemija, zloćudni tumori raznih vrsta, Hodgkinova bolest, shizofrenija, poslijeoperacijska stanja, Addisonova bolest te hipopituitarizam (Roberts i sur., 2018; Štraus i Rumora, 2009).

Wilsonova bolest je bolest u kojoj dolazi do smanjene koncentracije ukupnog bakra u serumu, ali se ukupna količina bakra u organizmu povećava jer se bakar nakuplja u tkivima. Uzrok bolesti je mutacija gena za Wilsonovu ATP-azu koja kodira za enzim adenozin trifosfatazu koja prenosi bakar (ATP7B). Wilsonova ATP-aza je integralni protein koji sudjeluje u prijenosu bakra u stanicu i za njegovo izlučivanje iz stanica, a nalazi se najviše u jetri, gdje sudjeluje u izlučivanju bakra u žuč, a manje količine se nalaze u bubrezima, mozgu i posteljici. Posljedica Wilsonove bolesti je smanjeno ugrađivanje bakra u ceruloplazmin te smanjeno izlučivanje bakra bilijarnim traktom. Bolest se nasljeđuje autosomno recesivno, a gen za Wilsonovu ATP-azu nalazi se na kraćem kraku kromosoma 13. Više je mutacija spomenutog gena koje mogu dovesti do bolesti i zbog toga je klinička slika bolesnika izrazito varijabilna. Može se javiti kao kronični ili fulminantni hepatitis (uz ili bez ciroze jetre), progresivni neurološki poremećaj bez disfunkcije jetre ili kao psihijatrijski poremećaj. Javlja se prije 30. godine života, ali može se javiti i u 60-im godinama života. Dijagnostika Wilsonove bolesti može se sastojati od oftalmološkog pregleda utvrđivanjem prisutnosti Kayser-Fleischerovih kornealnih prstenova (koji se javljaju zbog nakupljanja bakra u oku), određivanja koncentracije ceruloplazmina i ukupnog bakra u serumu, određivanja koncentracije bakra u 24-satnoj mokraći te, u slučaju nejasnih laboratorijskih nalaza s obzirom na kliničku sliku, određivanja koncentracije bakra u bioptatu jetre i mikroskopski pregled bioptata jetre. Također može se odrediti slobodni bakar u serumu jer se kod bolesnika s Wilsonovom bolešću javljaju povišene vrijednosti slobodnog bakra dok su koncentracije ukupnog bakra (slobodnog i vezanog) snižene. Mikroskopski pregled bioptata jetre uključuje provjeru prisutnosti mikrovezikularnih i makrovezikularnih karakterističnih promjena, steatoze, fibroze te koncentracija bakra koja iznosi više od 250 µg bakra po gramu suhe tvari jetrenog tkiva.

Molekularna dijagnostika nema posebnu značajnost zbog izrazito velikog broja mogućih mutacija (više od 200) koje uzrokuju bolest i zbog toga što su bolesnici najčešće heterozigoti za dvije različite mutacije (Roberts i sur., 2018; Štraus i Rumora, 2009).

1.2. UV-VIS spektrofotometrija

1.2.1. Princip metode

UV-VIS spektrofotometrija je metoda koja se temelji na apsorpciji svjetlosti koja prolazi kroz tekući uzorak, a u kojem se nalazi analit od interesa. Molekule koje imaju sposobnost apsorpcije svjetlosti nazivamo *kromoforima*. Nemaju sve tvari to svojstvo i zato, da bi se mogle odrediti spektrofotometrijski, moraju se vezati s nekom drugom molekulom koja je kromofor. Primjerice da bi se spektrofotometrijom mogla odrediti koncentracija bakra, ioni bakra se moraju vezati na molekule koje imaju to svojstvo te tako nastaje kompleks metalni ion-kromofor. Svaka molekula koja ima svojstvo apsorpcije svjetlosnog zračenja, apsorbira svjetlost druge valne duljine, na što utječe struktura i okolina same kromofore. Prilikom apsorpcije svjetlosti, elektroni u kompleksu prelaze iz osnovnog u pobuđena stanja. Apсорpciju svjetlosti opisuje *Beer-Lambertov zakon*:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gdje je I_0 intenzitet upadne zrake svjetlosti, I je intenzitet svjetlosti koja je prošla kroz uzorak, c je molarna koncentracija tvari koja apsorbira na unaprijed određenoj valnoj duljini, l je duljina puta koji svjetlost prolazi kroz uzorak (debljina kivete – najčešće 1 cm), a ε je molarni ekstincijski koeficijent i on je za svaki kromofor specifičan. Logaritam omjera I_0 i I , tj. intenziteta upadne zrake i intenziteta prolazne zrake, je zapravo apsorbancija (A) pa se formula može izraziti kao:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l.$$

S obzirom da se radi o logaritamskoj funkciji, vrijednost apsorbancije koja iznosi 3 znači da je samo 1 / 1000 upadne zrake prošla kroz uzorak do detektora. Tako mali intenziteti svjetlosti nisu mjerljivi sa zadovoljavajućom točnošću pa se apsorbancije iznad 3 izbjegavaju. Najtočnija mjerenja apsorbancije, koja pokazuju zadovoljavajuću linearnost pravca, postižu se apsorbancijom u području 0,0 do 1,0, a to je upravo mjerno područje koje se upotrebljava u današnjim spektrofotometrima. Ukoliko se dobije rezultat apsorbancije koji je veći od 1,0 i/ili

ukoliko je apsorbancija izvan baždarnog pravca, uzorak je potrebno razrijediti i ponoviti mjerenje te u konačnu koncentraciju uračunati faktor razrjeđenja (Sheehan, 2009).

1.2.2. Dijelovi UV-VIS spektrofotometra

UV-VIS spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Sadrži optički sustav za stvaranje monokromatskog svjetla valne duljine od 190 do 800 nm i odgovarajući detektor za mjerenje apsorbancije.

Osnovni dijelovi UV-VIS spektrofotometra su:

- izvor zračenja - deuterijeva lampa za UV-VIS (210-370 nm) područje i volframova lampa za vidljivo (290-900 nm) područje
- monokromator (dio UV-VIS spektrofotometra za selekciju specifične valne duljine na kojoj analit ima najveću apsorbanciju) koji može biti prizma ili rešetka s dvije pukotine
- nosač uzorka (kiveta) i
- detektor zračenja (Sheehan, 2009).

Ispravnost instrumenta se ispituje kalibracijom skale valnih duljina i apsorbancije.

1.3. Induktivno spregnuta plazma – spektrometrija masa (ICP-MS)

1.3.1. Princip metode

ICP-MS je vrsta spektrometrije masa u kojoj se uzorci ioniziraju u plazmi koja se stvara pomoću promjene jačine magnetskog zračenja, tj. indukcijom. U tako ioniziranom uzorku se potom može odrediti koncentracija određenog analita nekom od metoda spektrometrije masa, npr. analizatorom masa magnetskog sektora (engl. *magnetic sector mass analyzer*), vrijeme preleta - TOF (engl. *time of flight*) ili kvadrupolnim analizatorom masa (engl. *quadrupole mass analyzer*), a može se koristiti i više inačica u tzv. tandem spektrometriji masa. Svaka vrsta spektrometrije masa ima svoje prednosti i nedostatke i svaka je vrsta više ili manje pogodna za pojedinu upotrebu, ali svima njima je zajedničko da određuju analite na temelju omjera mase i naboja (m/z). ICP-MS (i bilo koja druga inačica spektrometrije masa) je jedna od boljih metoda za određivanje elemenata u tragu u uzorcima, a glavna prednost ICP-MS-a pred ostalim metodama je mogućnost određivanja više analita istovremeno iz jednog uzorka, dok neke druge metode (npr. spektrofotometrija) zahtijevaju onoliko uzoraka (izvornih ili razrijeđenih) koliko analita želimo odrediti te također isto toliko mjerenja (Wilschefski i Baxter, 2019).

1.3.2. Priprema uzoraka

Da bi uzorak bio spreman za analizu ICP-MS-om, potrebno ga je otopiti i razrijediti kako bi se u tekućem stanju mogao raspršiti u komori i nakon toga ionizirati. Za razrjeđivanje bioloških uzoraka koriste se kiseline ili baze. Razlog zbog kojeg se deionizirana voda ne koristi za razrjeđivanje je taj što su neke tvari nestabilne u deioniziranoj vodi. Od kiselina koristi se nitratna (HNO_3), a od baza amonijev hidroksid (NH_4OH) ili tetrametilamonijev hidroksid ($(\text{CH}_3)_4\text{N}^+\text{OH}^-$) (Wilschefski i Baxter, 2019).

1.3.3. Dijelovi ICP-MS-a

ICP-MS uređaj se sastoji od 6 dijelova:

- sustava za ubacivanje uzorka
- sustava za induktivno ioniziranje uzorka (ICP)
- sučelja između ICP-a i spektrometra masa
- sustava za ionsko fokusiranje
- analizatora masa i
- detektora (Wilschefski i Baxter, 2019).

1.3.3.1. Sustav za ubacivanje uzorka

Kako bi se uzorak mogao efikasno ionizirati, potrebno ga je pretvoriti u finu maglicu sitnih kapljica (aerosol) koja će, kada dođe u komoru za ioniziranje, biti podvrgnuta ionizaciji i tako biti spremna za analizu u spektrometru masa. Tu zadaću ima raspršivač. Od dostupnih pneumatskih, ultrazvučnih i desolvacijskih, najčešće se koriste pneumatski. Oni koriste tok plina kako bi stvorili maglicu uzorka. Raspršivač ubacuje aerosol u komoru za raspršivanje. Komora za raspršivanje ima jednu važnu ulogu, a to je „selekcija“ prevelikih kapljica uzorka. Ukoliko su kapljice uzorka prevelike, one neće biti u mogućnosti efikasno se ionizirati. Najveća veličina kapljica koje mogu biti efikasno ionizirane iznosi oko 10 μm u promjeru (Wilschefski i Baxter, 2019).

1.3.3.2. Sustav za induktivno ioniziranje uzorka (induktivno spregnuta plazma – ICP)

Smjesa pozitivnih iona i elektrona u plinovitom stanju naziva se plazma. Plazma u ICP-MS analizatorima ima ulogu ionizacije uzorka od interesa. Plazma koja se koristi je plazma argona. Mjesto gdje se stvara plazma je tzv. „baklja“ (engl. *torch*). Baklju čine 3 koncentrične kvarcne cijevi kroz koje teče argon. Unutarnja cijev, još nazivana i injektor, služi za ubacivanje aerosola uzorka u struji argona. Središnja cijev služi kao pomoćna cijev kroz

koju ulazi samo argon i čija svrha je nastajanje plazme argona. Vanjska cijev također ubacuje u komoru samo argon, ali ovakav argon služi samo kao sredstvo za hlađenje kako bi se spriječilo taljenje baklje. Krajnji dio baklje sadržava bakrenu indukcijsku zavojnicu koja je spojena na generator radijske frekvencije (RF). Generator stvara izmjeničnu struju visoke frekvencije koja, kada prolazi kroz indukcijsku zavojnicu, stvara promjenjivo elektromagnetsko polje u baklji. Kako argon prolazi kroz baklju, stvara se plazma argona na način da se izboj visokog napona dovodi do baklje. Tako nastali ioni argona i elektroni, se nađu pod utjecajem promjenjivog magnetskog polja i ubrzavaju te se potom sudaraju s drugim atomima argona pri čemu, ako ioni koji se sudare imaju dovoljnu kinetičku energiju (tj. brzinu kretanja), dolazi do daljnje ionizacije te do kaskadne reakcije. Rezultat brzog kretanja i sudaranja iona i elektrona je velika temperatura, a taj fenomen se naziva ICP. Temperature mogu dosežati i 10 000 K (Wilschefski i Baxter, 2019).

1.3.3.3. Sučelje između ICP-a i spektrometra masa

Nakon što se uzorak efikasno ionizira, dolazi do sučelja koje povezuje ICP i spektrometar masa. Glavna zadaća sučelja je efikasan, konstantan i ravnomjeran prijenos iona iz plazme do spektrometra masa. Najveći problem, koji sučelje jako dobro rješava, je taj što se plazma, prije nego što uđe u samo sučelje, nalazi pri atmosferskom tlaku (101 325 Pa), a tlak u spektrometru masa je 0,1 – 13,0 mPa. Sučelje se sastoji od dva stošca građena od nikla ili platine kroz koje prolazi plazma. Prvi stožac, koji je bliže uzorku, ima promjer između 0,8 i 1,2 mm, a drugi ima promjer između 0,4 i 0,8 mm. Tlak između dva stošca, koji su jako blizu jedan drugome (10^{-3} – 10^{-4} mm), iznosi 100 – 250 Pa (Wilschefski i Baxter, 2019; Thomas, 2004).

Iako je sučelje vrlo efikasan način da se plazma prenese u područje jako niskog tlaka koji je prisutan u spektrometru masa, također su prisutni i neki problemi. Naime, na samom vrhu prvog stošca, mogući su sekundarni izboji naboja. Posljedica tih izboja je ta što se tada javlja širi raspon ionskih energija koje ulaze u spektrometar masa. Pri uvjetima da je plazma na nultom potencijalu, ionske energije su u rasponu 5 – 10 eV, dok se pri sekundarnom izboju taj raspon povećava na 20 – 40 eV, a time se dobiva novi problem – ionsko fokusiranje se znatno otežava jer u spektrometar masa ulaze i čestice plazme, a ne samo ioniziranog uzorka. Međutim, moderna sučelja problem sekundarnih izboja svode na najmanju moguću razinu i ne predstavljaju značajnu prepreku u izvođenju mjerenja (Thomas, 2004).

1.3.3.4. Ionsko fokusiranje

Sustav za ionsko fokusiranje nalazi se neposredno prije samog spektrometra masa. Glavna uloga ionskog fokusiranja je usmjeravanje pogodnih čestica u spektrometar masa. Neionskim česticama (npr. fotonima, neutralnim česticama) ulazak u spektrometar masa je spriječen fizikalnom barijerom tako što se spektrometar masa postavi malo izvan putanje kojom se čestice kreću ili skretanjem iona pod djelovanjem električnog polja pod kutem od 90° . Razlog zbog kojeg se to želi spriječiti je taj što ako takve čestice dođu do detektora, dobiva se jaki pozadinski šum i smanjuje mogućnost točnog i preciznog određivanja analita od interesa (Wilschefski i Baxter, 2019; Thomas, 2004).

Druga uloga ionskog fokusiranja je vraćanje iona s manjom kinetičkom energijom u struju iona koji su pogodni za analizu u spektrometru masa. Prilikom ionizacije, čestice se ioniziraju na pozitivno nabijene ione (katione) i elektrone i kao takve ulaze zajedno pomiješane u sustav za ionsko fokusiranje prolazeći kroz sučelje u kojem se nalaze dva stošca. Kako se sučeljem smanjuje tlak u prostoru u koji ulaze kationi i elektroni, tako se i kationi i elektroni počinju udaljavati jedni od drugih zbog niskog tlaka jer sustav želi postići stanje najvišeg nereda, tj. stanje najviše entropije. Pri tome, čestice manje mase će se brže udaljavati od mjesta ulaska u sustav ionskog fokusiranja, tj. od drugog stošca sučelja. Najmanju masu imaju elektroni, ali oni nisu toliko bitni za analizu. Puno je važnije da postoje i kationi s manjom kinetičkom energijom koji nemaju tendenciju kretati se u smjeru spektrometra masa te će na takve katione ulazak u prostor smanjenog tlaka imati veći utjecaj nego na one s većom kinetičkom energijom. Drugim riječima, kationi s manjom kinetičkom energijom će „skretati s puta“. Taj negativni utjecaj se sprječava tako što se ti kationi niske kinetičke energije vraćaju na pravu putanju naponom na elektrodama koje se nalaze u sustavu za ionsko fokusiranje (Thomas, 2004).

1.3.3.5. Analizator masa

Analizator masa je najvažniji dio spektrometra masa. Uloga analizatora masa je odjeljivanje iona koji nas ne zanimaju, tvari matriksa, otapala i iona iz sustava za ioniziranje, a osiguravanje da do detektora dođu samo ioni od interesa i koji se žele odrediti. Tehnologija je s vremenom razvila nekoliko načina kako se ioni od interesa održavaju na putu do detektora. To su kvadrupolni analizator masa (engl. *quadrupole mass analyzer*), vrijeme preleta – TOF (engl. *time of flight*), analizator masa magnetskog sektora (engl. *magnetic sector mass analyzer*), sustav sudarno-reakcijske ćelije (engl. *collision/reaction cell technology*), analizator masa elektrostatskog sektora (engl. *electrostatic sector mass analyzer*), kvadrupolna ionska

stupica (engl. *quadrupole ion trap mass analyzer*) i ionska ciklotronska rezonancija (engl. *ion cyclotron resonance*) (Mass Analyzers (Mass Spectrometry), 2019; Thomas, 2004).

1.3.3.5.1. Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupolni analizator masa sastoji se od 4 elektrode postavljene paralelno oko centralne osi. Dvema nasuprotnim elektrodama teče izmjenična (engl. *AC - alternate current*), a drugim dvjema elektrodama teče istosmjerna struja (engl. *DC – direct current*). Kontroliranjem omjera napona izmjenične i istosmjerne struje (engl. *AC/DC ratio*) te frekvencije izmjenične struje, vrlo lako se može kontrolirati koji ioni, tj. ioni s kojim omjerom mase i naboja, će proći kroz analizator do detektora, a upravo to su oni ioni koji se žele odrediti. Ostali ioni će udariti u neku od elektroda ili u zid komore u kojoj se nalazi kvadrupolni analizator i neće se detektirati (Mass Analyzers (Mass Spectrometry), 2019; Thomas, 2004).

1.3.3.5.2. Vrijeme preleta (TOF)

Analizatori masa bazirani na mjerenju vremenu preleta rade na principu razdvajanja iona bez upotrebe magnetskog ili električnog polja. *Time of flight* analizatori imaju poznatu duljinu koju svaki ion mora prijeći od mjesta ulaska u analizator do detektora. Također, kinetička energija svakog iona je konstantna i proporcionalna je njegovoj masi i kvadratu brzine prema formuli

$$E_k = \frac{m \cdot v^2}{2},$$

a kako se ioni ubrzavaju električnim poljem konstantnog napona U , posljedično će lakši ioni pri ulasku u detekcijsku komoru imati veću brzinu i brže će prijeći put L , tj. udaljenost između ulaska u komoru i detektora, a teži ioni će imati manju brzinu i njima će trebati više vremena za istu udaljenost. Konačna jednadžba glasi

$$\frac{m}{z} = \frac{2Ut^2}{L^2},$$

gdje je m masa iona, z njegov naboj, U napon kojim se ubrzavaju ioni, t vrijeme koje je potrebno ionu da prođe detekcijsku komoru, a L duljina detekcijske komore (Mass Analyzers (Mass Spectrometry), 2019; Thomas, 2004).

1.3.3.5.3. Analizator masa magnetskog sektora

Za razliku od analizatora baziranih na vremenu preleta, analizatori masa magnetskog sektora koriste magnetsko polje. Ioni se ubrzavaju u homogenom električnom polju tako da svi imaju isti iznos kinetičke energije. Kao takvi ulaze u područje poznatog, homogenog

magnetskog polja koje se može mijenjati po želji između mjerenja. U takvom polju, na ione djeluje centripetalna (poznata i kao Lorentzova) sila koja ih skreće s linearne putanje u kružnu. Teži ioni će se kretati putanjom kružnice većeg polumjera, dok će se lakši ioni kretati putanjom kružnice manjeg polumjera. Konačna jednačina glasi

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2U},$$

gdje je m masa iona, z njegov naboj, B jakost magnetskog polja, r polumjer kružnice po kojoj se ion kretao, a U napon električnog polja u kojem se ion ubrzao. Kako su jakost magnetskog i električnog polja poznate, polumjer je podatak koji dolazi nakon mjerenja iz detektora, a većina iona je nabijena jednostrukim nabojem, lako se može izračunati masa iona koji se odredio (Mass Analyzers (Mass Spectrometry), 2019; Thomas, 2004).

1.3.3.6. Detektor

Detektor je zadnji dio spektrometra masa. Uloga detektora je pretvaranje iona koji dođu do samog detektora u električne signale koji se potom obrađuju u složenom elektroničkom sustavu i programu na računalu. Količina analita prisutna u uzorku je proporcionalna signalu koji detektor šalje u obliku električnih impulsa. Također, izrada baždarnih krivulja je neophodna. Postoje 3 tipa detektora koji se koriste u spektrometrima masa. To su kanalni elektronski multiplikator, Faradayev kolektor i elektronski multiplikator diskretne dinode. Faradayev kolektor ima nedostatak što ima slabu osjetljivost u detekciji niskih koncentracija pa se ne koristi u ICP-MS-ovima (Thomas, 2004).

1.3.3.6.1. Kanalni elektronski multiplikator

Princip djelovanja kanalnog elektronskog multiplikatora se zasniva na stvaranju elektrona iz udarca iona u poluvodički sloj koji oblaže staklenu cijev. Poluvodičkim slojem teče istosmjerna struja kako bi privukla pozitivne ione na jednom, a negativne ione na drugom kraju. Kada ion udari u poluvodički sloj, stvore se sekundarni elektroni, a ti elektroni tada stvaraju još sekundarnih elektrona kako putuju niz cijev. Rezultat toga je impuls od milijuna elektrona koji su nastali od samo jednog iona koji je udario u poluvodički sloj. Nastali impuls se detektira složenim električnim sustavom za detekciju koji usto ima diskriminirajuću sposobnost da broji impulse samo iznad određene vrijednosti kako bi se isključilo brojanje sporadičnih izboja u cijevi i samim time spriječilo dobivanje lažno povišenih rezultata. Iz svega toga proizlazi činjenica da detektor ima tzv. mrtvo vrijeme, tj. vrijeme tijekom kojeg ne može detektirati novi ion koji dolazi iz analizatora masa i ono najčešće iznosi 30 – 50 ns (Thomas, 2004).

1.3.3.6.2. Elektronski multiplikator diskretne dinode

Elektronski multiplikator diskretne dinode djeluje na sličnom principu kao i kanalni elektronski multiplikator. Razlika je u tome što elektronski multiplikator diskretne dinode ima puno dinoda i svaka od njih, što se dalje nalazi od mjesta ulaska iona u detektor, stvara sve više sekundarnih elektrona dok kod kanalnog elektronskog multiplikatora taj proces nije odvojen nego se sve odvija u istom prostoru, tj. cijevi (Thomas, 2004).

2. Obrazloženje teme

Bakar je esencijalni element i ima važnu ulogu u ljudskome zdravlju. Snižena i povišena koncentracija bakra u organizmu povezuju se s razvojem bolesti. To ukazuje na važnost praćenja koncentracije bakra u organizmu.

Za određivanje koncentracija bakra u biološkom uzorku razvijeno je više metoda koje se primjenjuju u biokemijskom laboratoriju. Među prvim metodama razvijene su metode koje koriste UV-VIS spektrofotometar. UV-VIS spektrofotometrija je općenito robusna tehnika koja ne zahtjeva dugotrajnu pripremu uzorka te su stoga metode koje koriste UV-VIS spektrofotometriju za određivanje koncentracija bakra brze. Potreban instrument, UV-VIS spektrofotometar, dostupan je u svim medicinsko-biokemijskim laboratorijima te je stoga to i prva metoda odabira. Slijedeća metoda koja se koristi za određivanje koncentracija bakra u biološkim uzorcima je atomska apsorpcijska spektrofotometrija. To je metoda kojom se mjeri intenzitet apsorbiranog zračenja pri određenoj valnoj duljini elementa u ispitivanoj otopini. U postupku pripreme uzorka važan korak je atomizacija, postupak u kojem se uzorak isparava i razgrađuje uz nastajanje atomskih para. Kao i UV-VIS spektrofotometrija i ova je tehnika robusna, no instrument atomski apsorpcijski spektrofotometar nije dostupan u svakom biokemijskom laboratoriju. Zadnjih 20-ak godina sve više se za određivanje koncentracija metala pa tako i bakra u biološkom, ali i ne-biološkom uzorku koristi ICP-MS. To je suvremena metoda koja omogućuje određivanje više metala iz istog uzorka. Priprema uzorka nije zahtjevnost, no nedostatak je da je oprema još uvijek skupa te time i nedostupna za većinu biokemijskih laboratorija.

Cilj ovoga istraživanja bio je usporediti dvije metode određivanja bakra u biološkim uzorcima, UV-VIS spektrofotometrijsku i ICP-MS metodu. Metode su uspoređene s obzirom na parametre validacije i pripremu uzoraka, tj. jednostavnost izvedbe. Pored toga, obje su metode uspoređene i s obzirom na primjenjivost tako što su u istim uzorcima humane plazme s obje metode određene koncentracije bakra. Kako bi se metode mogle usporediti s obzirom na primjenjivost, sakupljeni su uzorci humane plazme te su u istim uzorcima izmjerene koncentracije bakra pomoću UV-VIS spektrofotometrijske i ICP-MS metode.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene kemikalije

U nastanku ovog rada korištene su slijedeće kemikalije:

- standard bakra (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, MO, SAD)
- gvanidin hidroklorid, gvanidin HCl (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, MO, SAD)
- natrijev acetat, CH₃COONa (Kemika, Zagreb)
- octena kiselina, CH₃COOH (Kemika, Zagreb)
- 5-brom-2-piridilazo-N-propil-N-sulfo-propil-amilo-anilin, 5-Br-PSAA (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, MO, SAD)
- nitratna kiselina, HNO₃ min. 65% w/w (Scharlab, Barcelona, Španjolska)

3.1.2. Aparature

Korištene aparature uključuju:

- centrifuga (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- mješalica (tzv. *vortex*), Ika Vortex (Ika, Staufen, Njemačka)
- spektrofotometar A Agilent 8453 UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- ICP-MS Elan DRCE Axial Field Technology (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)

3.1.3. Uzorci

Uzorci humane plazme dobiveni su od dobrovoljnih zdravih darivatelja te bolesnih darivatelja s bolestima štitne žlijezde u suradnji s liječnicima KBC-a Sestre milosrdnice. Bolesti koje su zahvaćale oboljelu populaciju pacijenata uključuju papilarni karcinom, folikularni adenom i druge bolesti štitne žlijezde kao što su Hashimotov tireoiditis te struma.

Prije samog istraživanja pribavljena je potvrda Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (broj: EP-717/13-14 iz 24. 01. 2013. godine) kao i potvrda Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Čitavo je istraživanje provedeno u skladu sa svim važećim i primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju. Svaki ispitanik prije sudjelovanja u ovom istraživanju obavješten je o detaljima istraživanja te je potpisao suglasnost o sudjelovanju u istraživanju uz prava na: anonimnost ispitanika u istraživanju, uvid

u sve svoje rezultate istraživanja te odustajanje iz istraživanja u bilo kojem trenutku bez obaveze objašnjavanja razloga odustajanja.

3.2. Metode

3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracija bakra

3.2.1.1. Princip metode

Princip spektrofotometrijskog određivanja bakra je reakcija u kojoj se bakar veže s kromoforom, 5-Br-PSAA (5-brom-2-piridilazo-N-propil-N-sulfopropil-amino-anilin) pri čemu nastaje kompleks crvene boje i čija se koncentracija može odrediti spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 580 nm (Makino, 1989). Otopina radnog reagensa ima pH 4,2 i sadrži gvanidin hidroklorid i kromofor 5-Br-PSAA. Pri pH 4,2 dvovalentni bakar se odvaja od proteina te se veže na kromofor. Intenzitet obojenja otopine izravno je proporcionalan koncentraciji bakra u uzorku. Koncentracije bakra u uzorcima određene su uz upotrebu prethodno izrađenog baždarnog pravca te su izražene u $\mu\text{g/L}$.

3.2.1.2. Priprema otopina za analizu

Radni reagens korišten za spektrofotometrijsko određivanje bakra u sebi je sadržavao gvanidin hidroklorid i kromofor 5-Br-PSAA. Cjelokupna priprema uključivala je pripremu acetatnog pufera, otopine gvanidin hidroklorida te otopine 5-Br-PSAA.

Za pripremu 0,4 M acetatnog pufera, pH 4,2 odvagano je 7,08 g Na-acetata koji je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 1 litre te je tikvica nadopunjena do otprilike 900 mL destiliranom vodom. Nakon toga je u tikvicu dodano 18,025 mL koncentrirane octene kiseline, a zatim je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Otopina gvanidin hidroklorida pripremljena je na način da se odvagalo 47,765 g gvanidin hidroklorida, kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 100 mL te na kraju nadopunila do oznake s pripremljenim 0,4 M acetatnim puferom pH 4,2. Tako pripremljena otopina imala je koncentraciju gvanidin hidroklorida od 5 mol/L.

Za otopinu kromofora, 5-Br-PSAA, odvagalo se 4,783 g 5-Br-PSAA te kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica se potom nadopunila destiliranom vodom do oznake, a otopina je sadržavala koncentraciju kromofora od 0,1 mol/L.

Radni reagens, korišten u spektrofotometrijskom određivanju bakra, dobiven je miješanjem otopine gvanidin hidroklorida u acetatnom puferu s otopinom 5-Br-PSAA u omjeru 1:1.

3.2.1.3. Priprema standardnih otopina bakra

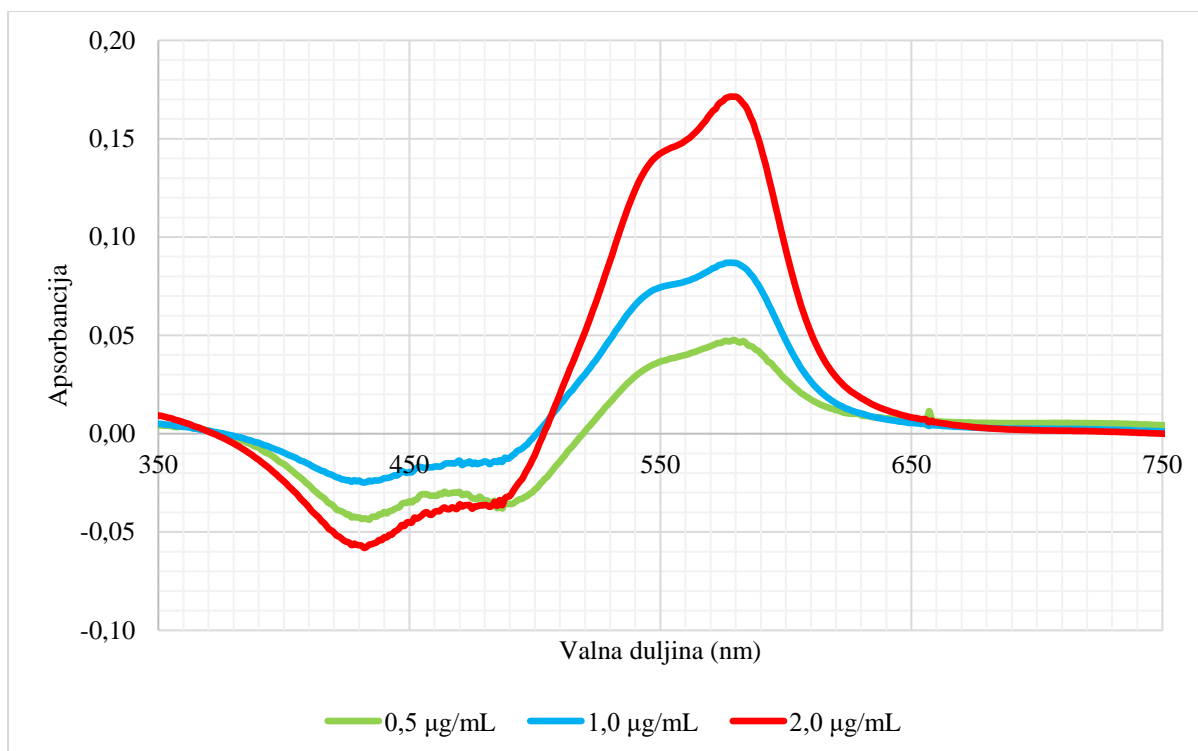
Standardne otopine bakra, korištene u izradi baždarnog dijagrama i određivanju ostalih parametara validacije metode, dobivene su serijskim razrjeđenjem matične otopine bakra koncentracije 10 000 µg/L (pripremljene u 10 % HNO₃). Serijska razrjeđenja bila su u rasponu koncentracija 500 – 5000 µg/L. Postupak pripreme standarda je prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Postupak pripreme standardnih otopina bakra za spektrofotometrijsko određivanje

koncentracija standardne otopine bakra (µg/L)	volumen matične otopine bakra (mL)	volumen destilirane vode (mL)	ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu bakra
500	0,5	9,5	20x
1000	1,0	9,0	10x
2000	2,0	8,0	5x
5000	5,0	5,0	2x

3.2.1.4. Izvođenje pokusa

Uzorci humane plazme su prvo centrifugirani 5 minuta na 2000 g. Nakon centrifugiranja, u novu, čistu Eppendorf epruvetu uzeto je 100 µL bistrog supernatanta. Daljnji postupak sa slijepom probom (100 µL destilirane vode), standardima bakra (100 µL) i supernatantom humane plazme (100 µL) bio je isti. Na 100 µL uzorka (slijepa proba, standard ili supernatant humane plazme) u Eppendorf epruveti dodano je 1,0 mL radnog reagensa koji je u sebi sadržavao gvanidin hidroklorid i kromofor 5-Br-PSAA u omjeru 1:1. Slijepom probom je spektrofotometar postavljen na nulu, a potom su slijedila mjerenja apsorbancije standarda bakra te uzoraka humane plazme. Mjerenja su izvršena odmah, bez inkubacije, pri valnoj duljini od 580 nm jer pri toj valnoj duljini kromofor ima apsorpcijski maksimum (vidljivo na slici 1). Iz izmjerene apsorbancije svakog uzorka, koncentracija bakra u svakom uzorku je određena korištenjem baždarnog pravca.



Slika 1. Prikaz ovisnosti apsorbancije kompleksa bakra i kromofora 5-Br-PSAA o korištenoj valnoj duljini

3.2.2. Određivanje koncentracija bakra pomoću ICP-MS-a

3.2.2.1. Princip metode

ICP-MS je tehnika u kojoj se uzorci ioniziraju pomoću plazme koja se stvara uz pomoć promjenjivog magnetskog polja. U ioniziranom uzorku određuje se koncentracija bakra na temelju njegovog omjera mase i naboja te intenziteta signala na detektoru koji se preko elektroničkih sklopova, računalnog programa te baždarnog pravca pretvara u podatak o koncentraciji.

3.2.2.2. Priprema standardnih otopina bakra

Za validaciju metode i za određivanje koncentracija bakra u uzorcima bilo je potrebno napraviti standardne otopine točno poznatih koncentracija bakra. Standardne otopine napravljene su serijskim razrjeđenjem otopine koja je sadržavala 150 µg/L bakra, a koncentracije standardnih otopina bakra bile su u rasponu 5,0 – 150,0 µg/L. Postupak pripreme standarda prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Postupak pripreme standardnih otopina bakra za određivanje pomoću ICP-MS-a

koncentracija standardne otopine bakra ($\mu\text{g/L}$)	volumen matične otopine bakra (mL)	volumen destilirane vode (mL)	ukupni volumen (mL)	ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu bakra
5,0	0,16	4,84	5,00	30x
10,0	0,33	4,67	5,00	15x
20,0	0,67	4,33	5,00	7,5x
50,0	1,67	3,33	5,00	3,0x
100,0	3,33	1,67	5,00	1,5x
150,0	5,00	0	5,00	1,0x

3.2.2.3. Priprema uzoraka za analizu

Uzorci humane plazme su za mjerenja pomoću ICP-MS-a morali biti razrijeđeni 20 puta u otopini 1 %-tne nitratne kiseline kako bi se proteini u uzorku denaturirali, a bakar koji je bio vezan za njih, oslobodio, tj. kako bi mogao biti detektabilan pomoću spektrometra masa. Nakon razrjeđenja, u uzorcima su se pojavili precipitati proteina (vjerojatno zbog starosti uzoraka i/ili ponavljanog smrzavanja/odmrzavanja). Precipitati su se uklonili centrifugiranjem 5 minuta na 1000 g kako bi se spriječilo začepljenje tankih kapilara koje unose uzorak u ICP-MS.

3.2.2.4. Izvođenje pokusa

Prije same analize uzoraka, ICP-MS je morao biti pravilno podešen. Sve postavke ICP-MS-a se mijenjaju pomoću računalnog programa preko kojeg se upravlja svim dijelovima ICP-MS-a. Kako bi ICP-MS mjerio samo ione bakra, računalnim programom su korištene postavke navedene u tablici 3.

Tablica 3. Postavke i karakteristike ICP-MS-a

Postavka	Vrijednost
analit	Cu-63
mrtvo vrijeme detektora (ns)	55
brzina unosa uzorka (mL/min)	1,4
RF snaga	1180
protok plina plazme (L/min)	15,0
protok plina raspršivača (L/min)	0,84
replike	3
<i>sweeps per reading</i>	10
vrijeme integriranja (ms)	250
vrijeme odgode (s)	15
vrijeme ispiranja (s)	60
injektor	kvarc
konusi	nikal

Prije određivanja koncentracija bakra u uzorcima, bilo je potrebno slijepom probom te standardnim otopinama bakra konstruirati baždarni pravac koji je zatim računalni program koristio za računanje koncentracija bakra u uzorcima. Slijepa proba korištena za ICP-MS bila je 1 %-tna nitratna kiselina. Otopine slijepa probe i standarda korištene za izradu kalibracijske krivulje snimane su pod istim uvjetima kao i uzorci.

3.3. Statistička obrada rezultata

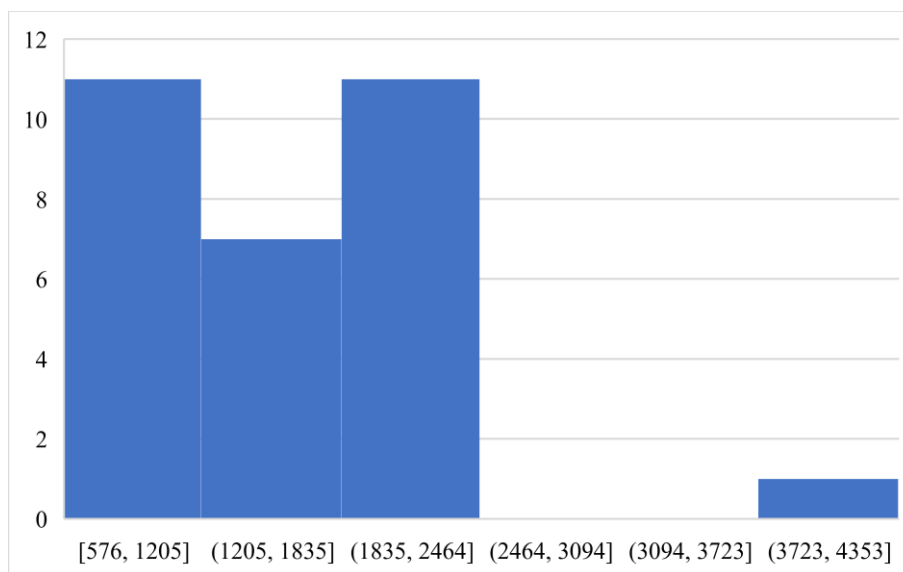
Parametri validacije UV-VIS spektrofotometrijske i ICP-MS metode: linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja i preciznost obrađeni su statistički u programu Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD). Linearnost je provjerena linearnom regresijom, a iz dobivenog pravca linearnosti izračunati su granica dokazivanja i granica određivanja.

Dobiveni rezultati koncentracija bakra u uzorcima humane plazme izmjereni UV-VIS spektrofotometrijskom metodom i ICP-MS metodom zbog malog broja uzoraka ($n = 28$) prvo su provjereni na razdiobu upotrebom histograma za obje metode (vidljivo na slici 2 i slici 3) te je utvrđeno da dobivene koncentracije ne slijede normalnu razdiobu. Stoga je za usporedbu dobivenih koncentracija bakra između dvije metode korištena Spearmanova korelacija za čiji

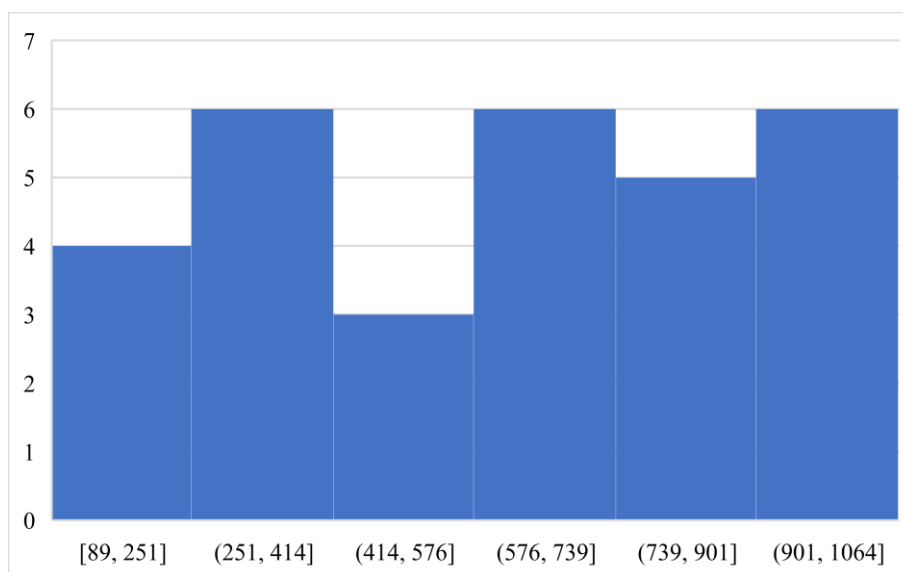
izračun su korišteni računalni programi Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD) i MedCalc statistički softver (verzija 19.5.2, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

Također je za usporedbu metoda korištena Passing-Bablok regresija za što je korišten MedCalc statistički softver (verzija 19.5.2, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

Razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$ u svim statističkim obradama.



Slika 2. Histogram raspodjele koncentracija bakra dobivenih mjerenjem spektrofotometrijskom metodom



Slika 3. Histogram raspodjele koncentracija bakra dobivenih mjerenjem ICP-MS metodom

4. Rezultati i rasprava

Bakar je važan esencijalni element te je stoga važno pratiti njegovu koncentraciju u humanim uzorcima poput krvi, urina ili humane plazme. U medicinsko-biokemijskim laboratorijima više je metoda dostupno za određivanje koncentracija bakra u humanim uzorcima. Metoda poput ICP-MS ima svoju prednost zbog visoke osjetljivosti, no njen je nedostatak što je zbog svoje skupoće teže dostupna u medicinsko-biokemijskim laboratorijima. S druge strane UV-VIS spektrofotometar je jednostavan za korištenje i lakše dostupan u medicinsko-biokemijskom laboratoriju te je stoga metoda odabira.

Metode pomoću kojih se određuju pojedini analiti se dijele na definitivne, referentne i rutinske. Definitivne metode su one metode koje su najtočnije i za njih nije poznat niti jedan izvor netočnosti. Nedostatak tih metoda je taj što su uređaji zahtjevniji te zbog toga nisu prikladni za svakodnevni rad, a i vrlo često zahtijevaju za svoja mjerenja spojeve koje je teško skladištiti i teško ih je prikladno odlagati nakon upotrebe. Definitivne metode se koriste kako bi se ispitale referentne metode, a referentne se koriste kako bi se ispitale rutinske metode koje se koriste u svakodnevnom radu. Velika prednost rutinskih metoda, zbog čega se najčešće i koriste, je ta što se promjenom valne duljine, promjenom reagensa i nekad promjenom vremena inkubacije, može vrlo lako u rad laboratorija uvesti metoda za određivanje novog analita. Isto tako, rutinske metode je lako automatizirati što je jako bitno u svakodnevnom radu zbog protočnosti uzoraka (Čepelak i Štraus, 2009).

U ovom istraživanju uspoređene su UV-VIS spektrofotometrijska i ICP-MS metoda određivanja koncentracija bakra u biološkom uzorku. Metode su uspoređene s obzirom na parametre validacije i pripreme uzoraka. Pored toga cilj je bio usporediti te dvije metode i provjeriti mogu li obje metode dati zadovoljavajuće rezultate za koncentracije bakra u humanoj plazmi. UV-VIS spektrofotometar je uređaj koji je lako dostupan u svakom laboratoriju, jeftin je i UV-VIS spektrofotometrijsku metodu je lako automatizirati. S druge strane ICP-MS je skuplji te time i teže dostupan uređaj.

4.1. Validacija spektrofotometrijske i ICP-MS metode

Validacija analitičkih metoda je ključna kako bi se metoda korištena u svakodnevnoj upotrebi usporedila i, ukoliko zadovoljava sve zahtjeve, koristila za određivanje koncentracija određenog analita. Prilikom validacije metode, parametri koji se provjeravaju su: selektivnost, specifičnost, preciznost, točnost, linearnost, raspon, granica dokazivanja (LOD), granica

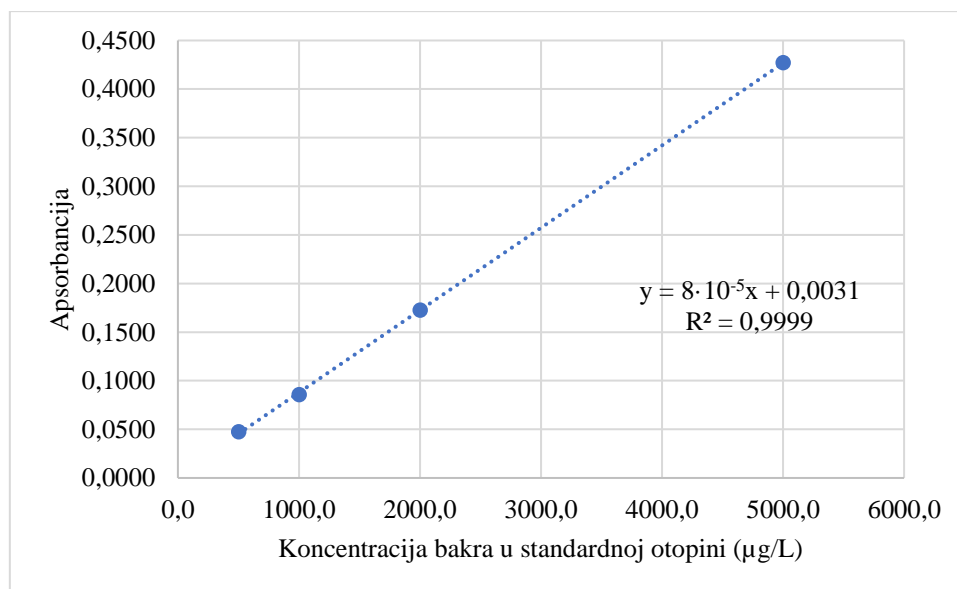
određivanja (LOQ) i robusnost (Bilić-Zulle, 2011; Medić-Šarić i sur., 2006; van Zoonen i sur., 1998).

Za validaciju obiju metoda korišteni su standardi bakra te su podvrgnuti istim postupcima kao i uzorci, a postupci su detaljnije opisani u Materijali i metode (poglavlje 3.).

4.1.1. Linearnost

Linearnost analitičke metode je parametar koji nam pokazuje da li određena metoda daje rezultate, u određenom koncentracijskom intervalu, koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Postupak dobivanja podatka linearnosti se sastoji od određivanja najmanje 5 koncentracija i to svaku najmanje u triplikatu. Nakon toga slijedi izrada grafa koji pokazuje ovisnost jakosti analitičkog signala o koncentraciji analita. U takvom grafu, linearnost je zapravo koeficijent korelacije dobivenog regresijskog pravca (Medić-Šarić i sur., 2006; van Zoonen i sur., 1998).

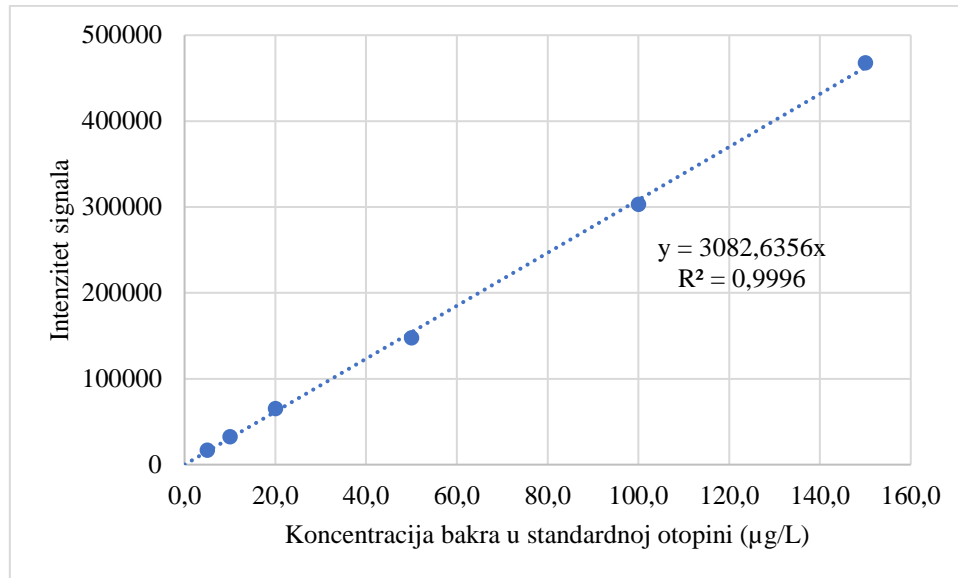
Za izradu baždarnog pravca za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu pripremljene su otopine standarda bakra u koncentracijskom rasponu 500 – 5000 µg/L. Baždarni pravac dobiven je višestrukim mjerenjem standardnih otopina bakra. Baždarni pravac bio je linearan ($R^2 = 0,9999$), a jednadžba pravca bila je $y = 8 \cdot 10^{-5}x + 0,0031$ (slika 4). Baždarni pravac potvrdio je linearnost određivanja bakra pomoću UV-VIS spektrofotometrijske metode.



Slika 4. Baždarni pravac spektrofotometrijske metode

Za izradu baždarnog pravca za ICP-MS metodu pripremljeni su standardi bakra u koncentracijskom rasponu 5,0 – 150,0 µg/L. Dobiveni baždarni pravac bio je linearan s

jednadžbom pravca $y = 3082,6356x$ i koeficijentom korelacije ($R^2 = 0,9996$) (slika 5). To pokazuje da je u ispitivanom koncentracijskom području ICP-MS metoda linearna.



Slika 5. Baždarni pravac ICP-MS metode

Ispitivanje linearnosti pokazalo je da su oba baždarna pravca i za UV-VIS spektrofotometrijsku i za ICP-MS metodu linearna te se stoga obje metode mogu koristiti za određivanje bakra. Može se primijetiti da je koncentracijski raspon standarda 1000x niži za ICP-MS metodu, što potvrđuje njegovu bolju osjetljivost od UV-VIS spektrofotometrijske metode.

4.1.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najmanja koncentracija analita koju je moguće dokazati u uzorku, ali ne i kvantificirati. Granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) je najmanja koncentracija analita koju možemo, sa zadovoljavajućom točnošću i preciznošću, odrediti u uzorku. Granica dokazivanja i određivanja se računaju po formulama:

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

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

gdje σ predstavlja standardnu devijaciju odziva, a a nagib kalibracijskog pravca (Medić-Šarić i sur., 2006; van Zoonen i sur., 1998).

LOD i LOQ za UV-VIS spektrofotometrijsku i ICP-MS metodu izračunate su iz podataka kojima su konstruirani baždarni pravci za pojedinu metodu. LOD za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu iznosila je 85,47 µg/L, a za ICP-MS je iznosila 5,24 µg/L. LOQ za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu iznosila je 259,01 µg/L, a za ICP-MS je iznosila 15,89 µg/L (tablica 4).

Tablica 4. Vrijednosti za LOD i LOQ UV-VIS spektrofotometrijske i ICP-MS metode

	UV-VIS spektrofotometrijska metoda	ICP-MS metoda
LOD	85,47 µg/L	5,24 µg/L
LOQ	259,01 µg/L	15,89 µg/L

Vrijednosti za LOD i LOQ pokazuju da je ICP-MS metoda osjetljivija od UV-VIS spektrofotometrijske metode.

4.1.3. Točnost

Točnost metode je parametar koji pokazuje odstupanje izmjerenih vrijednosti od stvarnih koncentracija određenog analita u uzorku. Glavna svrha određivanja točnosti je otkrivanje potencijalnih pogrešaka ili nepravilnosti, bilo da se radi o analizatoru, reagensu ukoliko ga analizator koristi ili ljudskih pogrešaka. Za određivanje točnosti, potrebno je provesti mjerenje u najmanje 3 koncentracije i to svaku u triplicatu, a nakon toga slijedi račun po formuli:

$$R = \left(\frac{\bar{x}}{x} \cdot 100 \right) \%,$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost za pojedini triplicat, a x je stvarna vrijednost koncentracije analita u tom istom uzorku (Medić-Šarić i sur., 2006; van Zoonen i sur., 1998).

Ispitivanje točnosti za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu zbog nedostatka referentnog materijala nije provedeno. Za ispitivanje točnosti ICP-MS metode korišten je jedan uzorak s poznatom koncentracijom bakra koji je dobiven od uzoraka koji su ranije analizirani na ICP-MS-u. Takvi uzorci se često koriste u laboratorijima te su takvi postupci poznati pod nazivom „unutarnja kontrola kvalitete“. Izračunata vrijednost točnosti za ICP-MS metodu je iznosila 98,69 %.

4.1.4. Preciznost

Preciznost metode je parametar koji pokazuje odstupanja od srednje vrijednosti prilikom višestrukog određivanja istog analita u najmanje 5 ponavljanja. Preciznost, za razliku od točnosti, ne uspoređuje stvarnu i izmjerenu koncentraciju, nego samo daje podatak koliko se ponovljena mjerenja razlikuju. Potrebno je napraviti mjerenja u 2 do 3 koncentracije. Preciznost metode se računa po formuli:

$$RSD = \left(\frac{STD}{\bar{x}} \cdot 100\right)\%$$

gdje je *STD* standardna devijacija, a \bar{x} je srednja vrijednost provedenih mjerenja za pojedini uzorak (Medić-Šarić i sur., 2006; van Zoonen i sur., 1998).

Za određivanje preciznosti spektrofotometrijskom metodom korištene su standardne otopine bakra u koncentracijskom rasponu 500 – 5000 µg/L. Za ICP-MS metodu standardne otopine bakra bile su koncentracijskog raspona 5,0 – 150,0 µg/L. Vrijednosti za preciznost za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu su prikazani u tablici 5 i tablici 6, a za ICP-MS u tablici 7 i tablici 8.

Tablica 5. Izračun preciznosti iz vrijednosti apsorbancija za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu korištenjem standardne otopine bakra koncentracije 500 µg/L

standard koncentracije 500 µg/L	apsorbancija
1. mjerenje	0,047000
2. mjerenje	0,048000
3. mjerenje	0,048000
4. mjerenje	0,046000
5. mjerenje	0,047000
srednja vrijednost	0,047200
standardna devijacija (SD)	0,000836
relativna standardna devijacija (RSD) [%]	1,772584

Tablica 6. Izračunate relativne standardne devijacije za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu korištenjem standardnih otopina bakra koncentracija 500 – 5000 $\mu\text{g/L}$

koncentracija standardne otopine bakra [$\mu\text{g/L}$]	relativna standardna devijacija (RSD) [%]
500	1,772584
1000	2,481076
2000	1,229750
5000	2,318382

Tablica 7. Izračun preciznosti iz vrijednosti intenziteta signala na detektoru ICP-MS-a korištenjem standardne otopine bakra koncentracije 5,0 $\mu\text{g/L}$

standard koncentracije 5,0 $\mu\text{g/L}$	intenzitet signala
1. mjerenje	16886,74200
2. mjerenje	16564,14800
3. mjerenje	17136,20900
4. mjerenje	16576,53700
5. mjerenje	17148,19600
srednja vrijednost	16862,36640
standardna devijacija (SD)	286,31938
relativna standardna devijacija (RSD) [%]	1,69798

Tablica 8. Izračunate relativne standardne devijacije za ICP-MS metodu korištenjem standardnih otopina bakra koncentracija 5,0 – 150,0 µg/L

koncentracija standardne otopine bakra [µg/L]	relativna standardna devijacija (RSD) [%]
5,0	1,69798
10,0	0,85234
20,0	2,99596
50,0	1,48005
100,0	0,86265
150,0	0,67624

Preciznost izražena kao RSD za UV-VIS spektrofotometrijsku metodu bila je u rasponu od 1,23 % do 2,48 %. Za ICP-MS metodu preciznost izražena kao RSD je bila u rasponu od 0,68 % do 3,00 %. Navedeni rezultati pokazuju da su obje metode zadovoljavajuće preciznosti, odnosno RSD je niži od 5 %.

4.2. Usporedba pripreme uzoraka za analizu koncentracija bakra UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom

U ovome istraživanju za UV-VIS spektrofotometrijsko određivanje bakra bilo je potrebno pripremiti radni reagens koji se sastojao od kromofora, acetatnog pufera i gvanidin hidroklorida. Izrada reagensa nije zahtijevala puno vremena, a sam reagens stabilan je te se može koristiti neko vrijeme. Kod samog određivanja koncentracije bakra u uzorku humane plazme, uzorak se pomiješa s reagensom te se odmah mjeri. Dakle, prije samog mjerenja nije potrebno inkubirati uzorak s reagensom. Analiza uzoraka na UV-VIS spektrofotometru može se ubrzati, ako je u laboratoriju dostupan UV-VIS spektrofotometar s više mjesta za kivetu. No u svakom slučaju uzorak treba prelići iz epruvete u kivetu te onda mjeriti.

Priprema uzorka za analizu s ICP-MS metodom nije uključivala pripremu radnog reagensa te je to svakako prednost te metode. Prije same analize uzorke je potrebno razrijediti s nitratnom kiselinom kako bi se proteini denaturirali. Nakon razrjeđivanja uzoraka slijedi određivanje koncentracija bakra u pojedinim uzorcima pomoću ICP-MS-a. Od predanalitičkog dijela analize ICP-MS metoda uključuje samo razrjeđivanje uzoraka u nitratnoj kiselini.

S obzirom da priprema uzoraka za spektrofotometrijsko određivanje nije zahtjevana, može se reći da nema značajnije razlike u pripremi uzoraka između metoda. Ipak, prilikom određivanja koncentracija bakra spektrofotometrijski, dodaje se puno više reagensa/kemikalija koji mogu biti različite čistoće što sve može doprinijeti nepouzdanosti rezultata.

Industrija analitičke kemije svakim danom otkriva nove spojeve pa tako i kromofore. Ti novi spojevi imaju bolju osjetljivosti za analit, a manje su osjetljivi na interferencije, a u većini slučajeva i jednostavniji za upotrebu. Stoga postoji mogućnost da se u dogledno vrijeme sintetizira novi kromofor koji bi povećao osjetljivost UV-VIS spektrofotometrijske metode za određivanje bakra.

4.3. Dobiveni rezultati koncentracija bakra u humanoj plazmi UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom

Validacija UV-VIS spektrofotometrijske i ICP-MS metode pokazala je da su obje metode zadovoljavajuće linearnosti, preciznosti i točnosti te da imaju zadovoljavajuće LOD i LOQ te se stoga mogu koristiti za određivanje koncentracija bakra u uzorcima humane plazme. U istim uzorcima humane plazme i s UV-VIS spektrofotometrijskom metodom i s ICP-MS metodom izmjerene su koncentracije bakra. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Brojčane vrijednosti koncentracija bakra u uzorcima humane plazme izmjerenih na spektrofotometru i ICP-MS-u

oznaka uzorka	metoda određivanja		omjer spektrofotometrije i ICP-MS-a
	spektrofotometrija ($\mu\text{g/L}$)	ICP-MS ($\mu\text{g/L}$)	
84	1422,20	905,91	1,57
K5	824,55	345,51	2,39
91	1947,93	1054,50	1,85
97	1962,57	1064,02	1,84
81	1201,89	852,90	1,41
92	2034,95	793,62	2,56
K28	2390,32	802,86	2,98
85	2115,70	601,31	3,52
K37	608,36	457,16	1,33
K23	2349,94	801,23	2,93

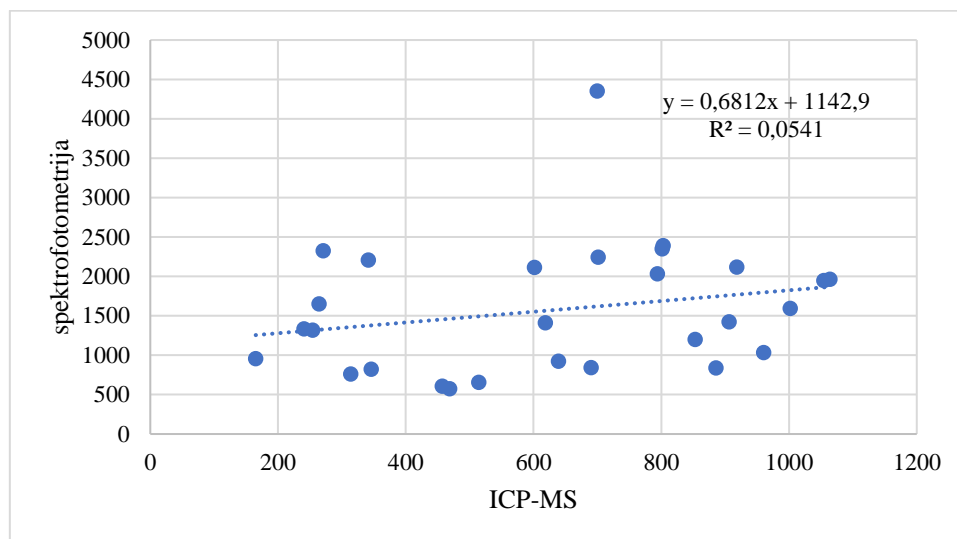
101	925,95	638,80	1,45
K15	838,02	885,20	0,95
K29	2244,63	701,02	3,20
K10	1334,59	240,55	5,55
98	4352,54	699,67	6,22
K11	575,54	468,53	1,23
93	2120,19	917,99	2,31
K38	2325,86	270,31	8,60
83	1651,95	264,16	6,25
99	1412,40	618,54	2,28
80	1318,83	253,91	5,19
K7	955,10	165,01	5,79
96	2209,21	340,98	6,48
K17	759,76	313,80	2,42
K12	655,08	513,94	1,27
K22	1032,67	960,21	1,08
K9	1594,69	1001,80	1,59
K21	841,87	689,75	1,22

Raspon koncentracija bakra u humanoj plazmi izmjeren UV-VIS spektrofotometrijskom metodom iznosio je 575,54 – 4352,54 $\mu\text{g/L}$, a raspon koncentracija bakra u humanoj plazmi izmjeren ICP-MS metodom iznosio je 165,01 – 1064,02 $\mu\text{g/L}$. Omjer izmjerene najviše i najniže koncentracije bakra spektrofotometrijskom metodom iznosio je oko 7 (raspon od 575,54 do 4352,54 $\mu\text{g/L}$). Sličan omjer u istim uzorcima dobiven je i ICP-MS metodom (raspon 165,01 – 1064,02 $\mu\text{g/L}$).

4.3.1. Spearmanova korelacija

U slijedećem koraku su rezultati koncentracija bakra u humanoj plazmi dobiveni UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom uspoređeni. Za to je korištena Spearmanova korelacija. Spearmanova korelacija je tzv. korelacija ranga koja se koristi u slučajevima kada se žele povezati varijable od kojih barem jedan niz varijabli nije razdijeljen po normalnoj razdiobi (Rosner, 2015).

Rezultati Spearmanove korelacije prikazani su na slici 6. Spearmanova korelacija je pokazala da nema korelacije u rezultatima koncentracija bakra u humanoj plazmi između dviju metoda.

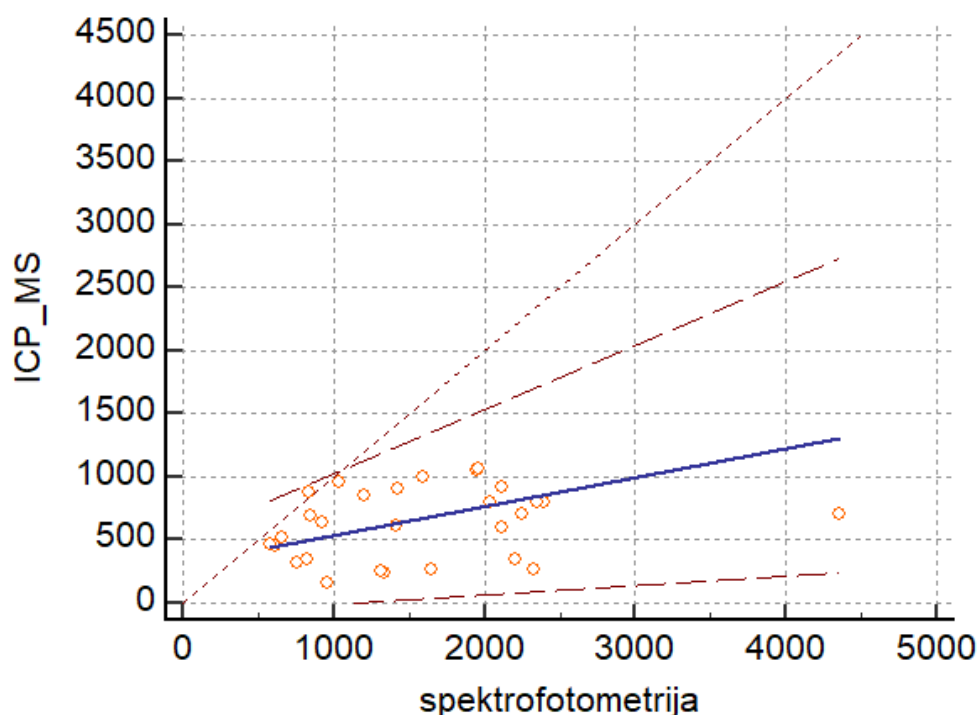


Slika 6. Grafički prikaz parova vrijednosti koncentracija bakra svakog uzorka dobivenih mjerenjem na spektrofotometru i ICP-MS-u

4.3.2. Passing-Bablok regresija

Passing-Bablok regresija je vrsta linearne regresije koja se najčešće upotrebljava u medicinsko-biokemijskim laboratorijima za usporedbu dviju analitičkih metoda. Velika prednost Passing-Bablok regresije je ta što je neparametrijska, nije osjetljiva na tzv. stršeće vrijednosti (engl. *outliers*), pretpostavlja da su pogreške u obje metode razdijeljene prema istoj razdiobi te da obje metode imaju neku mjeru nepreciznosti. Uvjeti koji moraju biti zadovoljeni za analizu Passing-Bablok regresijom su širok koncentracijski raspon koji pokrivaju uzorci i linearna ovisnost između obje metode. Kao rezultat analize dobije se grafički prikaz, tj. raspršeni dijagram s regresijskim pravcem i jednadžba regresijskog pravca ($y = ax + b$) s 95-postotnim intervalima pouzdanosti za varijable a i b . Ako se u 95-postotnom intervalu pouzdanosti za varijablu a nalazi vrijednost 1, može se zaključiti da nema proporcionalne razlike između dviju metoda. Ukoliko se u 95-postotnom intervalu pouzdanosti za varijablu b nalazi vrijednost 0, može se zaključiti da nema konstantne razlike između dvije metode koje se analiziraju (Bilić-Zulle, 2011).

Passing-Bablok regresijskom analizom korišteni su isti podaci za uzorke prikazani u tablici 9 te su rezultati prikazani slikom 7.



Slika 7. Passing-Bablok regresijska analiza. Plavi deblji pravac predstavlja regresijski pravac najmanjih kvadrata podataka uključenih u analizu, dva isprekidana pravca s dugim linijama predstavljaju 95-postotne intervale pouzdanosti, a kratko isprekidani pravac predstavlja idealan linearni odnos između dvije metode

Broj uzoraka obuhvaćen Passing-Bablok regresijskom analizom je 28. Jednadžba regresijskog pravca iznosi $y = 0,228267x + 307,213144$. Intervali pouzdanosti (95 %-tni) za nagib pravca, tj. varijablu a , iznose $0,07392 - 0,5060$, a za odsječak pravca, tj. varijablu b , $-83,9108 - 524,6120$. Iz tih rezultata se može zaključiti da, prema podacima o koncentraciji bakra u korištenim uzorcima, postoji proporcionalna razlika između dviju metoda (jer interval za nagib pravca ne sadrži vrijednost 1), ali i da nema konstantne razlike između spektrofotometrije i ICP-MS-a (jer interval za odsječak pravca sadrži vrijednost 0). Također, treba uzeti u obzir i kako su parovi vrijednosti svakog uzorka „razasuti“ na grafu prikazanim na slici 7.

4.4. Usporedba dobivenih rezultata koncentracija bakra u humanoj plazmi UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom

Referentne vrijednosti koncentracija bakra u serumu su 12,2 – 25,1 $\mu\text{mol/L}$, tj. 1404,6 – 2889,8 $\mu\text{g/L}$ prema podacima Hrvatske komore medicinskih biokemičara (Čvorišćec i sur., 2007). UV-VIS spektrofotometrijskom metodom u humanoj plazmi izmjeren je raspon vrijednosti koncentracija bakra i puno niži od referentnog intervala (575,54 $\mu\text{g/L}$ vs. 1404,6 $\mu\text{g/L}$) i puno viši (4352,54 $\mu\text{g/L}$ vs. 2889,8 $\mu\text{g/L}$). Iako je raspon koncentracija bakra izmjeren UV-VIS spektrofotometrijskom metodom veći od referentnog intervala, može se reći da su spektrofotometrijskom metoda ipak izmjerene vrijednosti u referentnom intervalu, uzimajući u obzir da su uzorci humane plazme ipak sakupljeni i od pacijenata, a ne samo od zdravih osoba. S druge strane koncentracije bakra u istim uzorcima izmjerene ICP-MS metodom bile su niže (165,01 – 1064,02 $\mu\text{g/L}$) od referentnog intervala koji je 1404,6 – 2889,8 $\mu\text{g/L}$. ICP-MS se smatra vrlo pouzdanim uređajem te izmjerene niže vrijednosti koncentracije bakra u humanoj plazmi nisu posljedica nepravilnosti rada uređaja.

Referentna vrijednost za koncentracije bakra navedena je za uzorak seruma. U pravilu, bakar se određuje u serumu jer postoji mogućnost da u uzorku humane plazme antikoagulansi interferiraju s njegovim određivanjem. Neki od antikoagulansa koji se koriste prilikom uzimanja krvi kako bi se odvojila humana plazma sadrže metale ili ih keliraju te na taj način onemogućuju njihovo točno određivanje. Antikoagulansi koji utječu na mjerenje koncentracija bakra u uzorcima humane plazme su EDTA, heparin, citrati, oksalati i fluoridi te svi oni dovode do lažno sniženih vrijednosti bakra u uzorcima humane plazme (Sertić i sur., 2011). Istraživanje autora Frank i sur. (2001) pokazalo je da nema značajnijih razlika u vrijednosti koncentracija bakra između seruma i humane plazme uzete na različite antikoagulanse, odnosno da se dobivene vrijednosti za koncentraciju bakra u humanoj plazmi mogu uspoređivati s koncentracijama bakra u serumu. Stoga se referentne vrijednosti za serum mogu primijeniti i na humanu plazmu. S obzirom da su vrijednosti za koncentracije bakra izmjerene u ovome istraživanju pomoću UV-VIS spektrofotometra bile u referentnom intervalu može se reći da je i ovo je istraživanje potvrdilo da veće razlike u koncentracijama bakra između seruma i humane plazme nema.

Prilikom mjerenja jednake su mjere poduzete oko prisutnih zagađenja uzoraka, laboratorijskog pribora i instrumenata od vanjskih utjecaja okoliša.

Razlozi koji bi moguće doveli do odstupanja u izmjerenim vrijednostima koncentracija bakra u humanoj plazmi UV-VIS spektrofotometrijskom metodom su interferencije drugih iona metala, hemoliza ili lipemija. Naime, prilikom određivanja koncentracija bakra spektrofotometrijskom metodom, u kivetu se nalazi uzorak plazme pomiješan s reagensom. Stoga i ostale molekule koje su kromofori te apsorbiraju svjetlost ili fizički sprječavaju prolazak svjetlosti u sličnom području kao i kompleks bakra i 5-Br-PSAA (oko 580 nm) i prisutne su u uzorku plazme, mogu ometati mjerenje, odnosno interferirati. U takve molekule se ubrajaju i hilomikroni koji se javljaju u lipemičnim uzorcima. Oni su, uz hemoglobin u hemoliziranom (*in vivo* ili *in vitro*) i bilirubin u ikteričnom uzorku, najčešći izvori interferencija u svakodnevnom radu medicinsko-biokemijskih laboratorija gdje se koriste uglavnom spektrofotometrijske metode za veliku većinu analita. U takvim uzorcima, javljaju se lažno povišene ili lažno snižene vrijednosti analita od interesa jer interferirajuće tvari (hemoglobin, bilirubin i/ili lipidi) će „oponašati“ prisutnost molekula koje apsorbiraju svjetlost. Do lažno povišenih vrijednosti će doći u slučajevima kad se promatra porast apsorbancije (npr. kada nastaje kompleks analita i kromofora), a do lažno sniženih vrijednosti će doći kada se promatra pad apsorbancije (npr. kod određivanja transaminaza, AST-a i ALT-a, gdje se promatra pad apsorbancije pri 340 nm zbog oksidacije koenzima NADH u NAD⁺). Hemoglobin ima apsorpcijske maksimume pri 415, 540 i 570 nm. S obzirom da kompleks bakra i 5-Br-PSAA ima apsorpcijski maksimum pri 580 nm, moguće je da je i hemoglobin utjecao na dobivene vrijednosti bakra dovodeći do lažno povišenih rezultata. Prema Šimundić i sur. (2010) nedostatak vidljive hemolize golim okom, ne znači sigurno da hemolize u uzorku i nema. Stoga je moguće da je i hemoliza utjecala na vrijednosti spektrofotometrijskog određivanja, bez obzira na to što niti u jednom uzorku nije bila vidno prisutna. S druge strane, kod određivanja ICP-MS metodom, lipemični uzorci (a tako i hemolizirani i ikterični) nemaju utjecaja na same analize jer se sve molekule prisutne u otopini koja dođe do komore za ionizaciju, ioniziraju na manje ione koji se onda još razdvajaju u analizatoru masa na temelju omjera mase i naboja što se lako podešava da kroz analizator do detektora dođu samo ioni koje želimo odrediti. Jedini način kako lipemija može utjecati na mjerenja ICP-MS-om je taj što lipidi mogu začepiti tanke kapilare koje provode uzorak do uređaja. Osim toga, kod jako lipemičnih uzoraka, može doći do razrjeđenja uzorka lipidima te se u tom slučaju javljaju lažno snižene vrijednosti analita koje određujemo. Oba navedena uzroka interferencija koja se mogu javiti kod mjerenja ICP-MS-om su izbjegnuta centrifugiranjem uzoraka prije razrjeđivanja (Šimundić i sur., 2018).

Dobivene vrijednosti koncentracija bakra u humanoj plazmi izmjerene UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom su se razlikovale. Raspon koncentracija bakra u humanoj plazmi izmjeren spektrofotometrijskom metodom bio je 575,54 – 4352,54 $\mu\text{g/L}$, a raspon koncentracija bakra u istim uzorcima humane plazme izmjeren ICP-MS metodom iznosio je 165,01 – 1064,02 $\mu\text{g/L}$. Iz tih vrijednosti vidljivo je da dvije metode nisu dale slične vrijednosti za koncentracije bakra u humanoj plazmi. Korelacijom dobivenih rezultata potvrđeno je da se dobivene vrijednosti razlikuju. U slučaju da se radi o nekoj sistemskoj grešci, jedna od metoda daje dvostruko ili višestruko više rezultate, korelacija između rezultata bi postojala. Vrijednosti koncentracija bakra u humanoj plazmi dobivene mjerenjem na ICP-MS-u bile su niže od referentnog intervala. Kako je već i navedeno, ICP-MS je vrlo pouzdan uređaj te izmjerene niže vrijednosti koncentracija bakra u humanoj plazmi nisu posljedica nepravilnosti rada uređaja. Također, ni pohranjivanje uzoraka do analize ne može dovesti do smanjenja koncentracije bakra. Dobivene niže vrijednosti mogu se pripisati nepravilnoj pripremi uzorka prije same analize na ICP-MS-u. U ovom istraživanju uzorci humane plazme tretirani su s 1 %-tnom nitratnom kiselinom što moguće nije dovelo do potpunog oslobađanja bakra iz proteina, odnosno do potpunog razaranja uzorka. Za pretpostaviti je da bi 5 %-tna nitratna kiselina dovela do kompletnog oslobađanja bakra. Također, uzorci su se mogli pripremiti i spaljivanjem u mikrovalnoj pećnici. U narednim istraživanjima bilo bi potrebno ispitati različite načine pripreme uzoraka humane plazme prije analize na ICP-MS-u kako bi izmjerene vrijednosti koncentracija bakra u humanoj plazmi bile očekivane, odnosno u referentnom intervalu.

5. Zaključci

U ovom istraživanju uspoređene su UV-VIS spektrofotometrijska i ICP-MS metoda za određivanje koncentracija bakra u humanoj plazmi. UV-VIS spektrofotometar je uređaj koji je prisutan u svakom laboratoriju, dok je ICP-MS skuplji i složeniji uređaj koje nije dostupan u svakom laboratoriju. Obje metode su uspoređene na razini podataka validacije, pripreme uzoraka te su ispitane i određivanjem koncentracija bakra u uzorcima humane plazme.

1. Ispitivanje validacije provedeno sa standardnim otopinama bakra pokazalo je da su i UV-VIS spektrofotometrijska i ICP-MS metoda linearne, precizne te zadovoljavajućeg LOD i LOQ te se stoga obje metode mogu koristiti za određivanje koncentracija bakra u biološkim uzorcima.
2. Dobiveni rezultati za LOD i LOQ pokazuju da je ICP-MS metoda osjetljivija od spektrofotometrijske metode te je stoga ICP-MS metoda primjenjivija za one uzorke u kojima se očekuju niže koncentracije bakra.
3. U 28 uzoraka humane plazme koncentracije bakra izmjerene UV-VIS spektrofotometrijskom metodom bile su u intervalu referentnih vrijednosti koncentracija bakra u serumu te se može zaključiti da se i spektrofotometrijskom metodom mogu dobiti pouzdani rezultati za koncentracije bakra. Također, s obzirom da su vrijednosti bakra u humanoj plazmi odgovarale referentnim vrijednostima za koncentracije bakra u serumu, može se zaključiti da se koncentracija bakra može odrediti i u humanoj plazmi.
4. Korelacijski račun upotrebom Spearmanove korelacije i Passing-Bablok regresijske analize dobivenih vrijednosti koncentracija bakra spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom potvrdila je da dobivene vrijednosti ne koreliraju što se vjerojatno može pripisati nepotpunom razaranju uzorka i njegovoj nepotpunoj ionizaciji, a što se treba ispitati u daljnjim istraživanjima.

6. Literatura

- Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med*, 2011, 21(1), 49–52.
- Čepelak I, Štraus B. Uvodni dio. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D i Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 10.
- Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije. Zagreb, Medicinska naklada, 2007
- Frank EL, Hughes MP, Bankson DD, Roberts WL. Effects of Anticoagulants and Contemporary Blood Collection Containers on Aluminum, Copper, and Zinc Results. *Clin Chem*, 2001, 47(6), 1109–1112.
- Makino T. A sensitive, direct colorimetric assay of serum copper using 5-Br-PSAA. *Clin Chim Acta*, 1989, 185(1), 7–16.
- Mass Analyzers (Mass Spectrometry), 2019., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 17. 07. 2020.
- Medić-Šarić M, Jasprica I, Debeljak Ž. Uvod u validaciju metoda analize lijekova. *Farm glas*, 2006, 62(1), 1–7.
- Roberts NB, Taylor A, i Sodi R. Vitamins and Trace Elements. U: Tietz Textbook Of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (6. izd.). Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT, St. Louis (Missouri, SAD), Elsevier, 2018, str. 697–702.
- Rosner B. Fundamentals of Biostatistics (8. izd.). Boston (Massachusetts, SAD), Cengage Learning, 2015
- Sertić J i sur. Katalog dijagnostičkih laboratorijskih pretraga s primjerima iz kliničke prakse. Zagreb, Medicinska naklada, 2011
- Sheehan D. Physical Biochemistry - Principles and Applications (2. izd.). Chichester (West Sussex, Ujedinjeno Kraljevstvo Velike Britanije i Sjeverne Irske), Wiley-Blackwell, 2009

- Šimundić A-M, Nikolac N, i Guder WG. Preanalytical Variation and Preexamination Processes. U: Tietz Textbook Of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (6. izd.). Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT, St. Louis (Missouri, SAD), Elsevier, 2018, str. 81–94.
- Šimundić A-M, Topić E, Nikolac N, Lippi G. Hemolysis detection and management of hemolyzed specimens. *Biochem Med*, 2010, 20(2), 154–159.
- Štraus B, Rumora L. Elementi u tragu. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D i Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 402–405.
- Thomas R. Practical Guide to ICP-MS. New York (New York, SAD), Marcel Dekker Inc, 2004
- van Zoonen P, van 'T Klooster HA, Hoogerbrugge R, Gort SM, van der Wiel HJ. Validation of analytical methods and laboratory procedures for chemical measurements. *Arh hig rada toksikol*, 1998, 49(4), 355-370.
- Wilschefski SC, Baxter MR. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem*, 2019, 40(3), 115–133.

7. Sažetak

7.1. Sažetak

Bakar je esencijalni element koji se nalazi u aktivnim mjestima enzima neophodnih za normalno funkcioniranje ljudskog organizma te je stoga važno pratiti njegovu koncentraciju. Analitičke metode kojima se bakar određuje su spektrofotometrija, spektrometrija masa te atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS), a upravo je AAS preporučena metoda za njegovo određivanje. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti UV-VIS spektrofotometrijsku metodu i spektrometriju masa (ICP-MS) za određivanje koncentracija bakra u biološkom uzorku. Obje su metode uspoređene s obzirom na parametre validacije i postupak pripreme uzorak te su primijenjene za analizu koncentracija bakra u uzorcima humane plazme. Uzorci humane plazme dobiveni su od dobrovoljnih zdravih i bolesnih darivatelja s bolestima štitne žlijezde ($n = 28$). Svi prikupljeni rezultati statistički su obrađeni, a dobiveni rezultati za koncentracije bakra u humanoj plazmi UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom su uspoređeni upotrebom Spearmanove korelacije i Passing-Bablok regresijske analize ($p < 0,05$). Ispitivanje validacije sa standardima bakra ($500 - 5000 \mu\text{g/L}$ za spektrofotometrijsku metodu i $5,0 - 150,0 \mu\text{g/L}$ za ICP-MS) pokazalo je da su obje metode linearne i precizne te da imaju zadovoljavajući limit detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ). Također pokazano je da priprema uzoraka za obje metode nije zahtjevna, iako je priprema uzoraka za spektrofotometrijsko određivanje koncentracija bakra podložnija mogućim interferencijama. Vrijednosti koncentracija bakra izmjerene UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom su se razlikovale (raspon vrijednosti: $575,54 - 4352,54 \mu\text{g/L}$ za spektrofotometrijsku metodu i $165,01 - 1064,02 \mu\text{g/L}$ za ICP-MS) što je potvrdila i statistička obrada koja je pokazala da nema korelacije u rezultatima dobivenim dvjema metodama. Vrijednosti koncentracija bakra izmjerene spektrofotometrijskom metodom bile su u referentnom intervalu, dok su vrijednosti izmjerene ICP-MS metodom bile niže od referentnog intervala. Mogući razlog nižih vrijednosti koncentracija bakra izmjerenih ICP-MS metodom je nepotpuno razaranje uzorka i njegova ionizacija, a što se treba ispitati u daljnjim istraživanjima.

7.2. Summary

Copper is essential element found in active sites of enzymes necessary for normal function of human organism. Because of low concentrations in organism, it is important to keep track of copper concentrations. Analytical methods used for copper concentration measurement are spectrophotometry, mass spectrometry and atomic absorption spectroscopy (AAS), from which later is recommended method for copper measurement. The aim of this study was to compare UV-Vis spectrophotometry and mass spectrometry (ICP-MS) as methods for measurement of copper in biological samples. Both methods were compared with validation parameters as well as sample preparation process and were used to measure copper concentrations in human plasma samples. Samples were collected from voluntary healthy subjects and subjects with diagnosed thyroid gland diseases ($n = 28$). All results were statistically processed with Spearman correlation and Passing-Bablok regression analysis ($p < 0,05$). Validation testing with copper standards ($500 - 5000 \mu\text{g/L}$ for spectrophotometric method and $5,0 - 150,0 \mu\text{g/L}$ for ICP-MS) showed that both methods are linear in given range of concentrations, precise and that they have satisfactory limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Sample preparation process for both methods is not challenging, although sample preparation for spectrophotometry is more susceptible to possible interferences. Copper concentration values were different (value range: $575,54 \mu\text{g/L} - 4352,54 \mu\text{g/L}$ for spectrophotometry and $165,01 - 1064,02 \mu\text{g/L}$ for ICP-MS) which was also confirmed by statistical analysis which showed there is no correlation between values measured by both methods. Values obtained by spectrophotometry were in reference range of values of copper in serum, while values measured with ICP-MS were lower than reference range. Most probable cause of lower values of copper concentrations obtained by ICP-MS is improper sample preparation and its ionisation that should be investigated in further research.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA BAKRA U UZORCIMA HUMANE PLAZME POMOĆU UV-VIS SPEKTROFOTOMETRA I INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME VEZANE NA SPEKTROMETAR MASA (ICP-MS)

Mario Bažant

SAŽETAK

Bakar je esencijalni element koji se nalazi u aktivnim mjestima enzima neophodnih za normalno funkcioniranje ljudskog organizma te je stoga važno pratiti njegovu koncentraciju. Analitičke metode kojima se bakar određuje su spektrofotometrija, spektrometrija masa te atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS), a upravo je AAS preporučena metoda za njegovo određivanje. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti UV-VIS spektrofotometrijsku metodu i spektrometriju masa (ICP-MS) za određivanje koncentracija bakra u biološkom uzorku. Obje su metode uspoređene s obzirom na parametre validacije i postupak pripreme uzorak te su primijenjene za analizu koncentracija bakra u uzorcima humane plazme. Uzorci humane plazme dobiveni su od dobrovoljnih zdravih i bolesnih darivatelja s bolestima štitne žlijezde (n = 28). Svi prikupljeni rezultati statistički su obrađeni, a dobiveni rezultati za koncentracije bakra u humanoj plazmi UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom su uspoređeni upotrebom Spearmanove korelacije i Passing-Bablok regresijske analize ($p < 0,05$). Ispitivanje validacije sa standardima bakra (500 – 5000 $\mu\text{g/L}$ za spektrofotometrijsku metodu i 5,0 – 150,0 $\mu\text{g/L}$ za ICP-MS) pokazalo je da su obje metode linearne i precizne te da imaju zadovoljavajući limit detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ). Također pokazano je da priprema uzoraka za obje metode nije zahtjevna, iako je priprema uzoraka za spektrofotometrijsko određivanje koncentracija bakra podložnija mogućim interferencijama. Vrijednosti koncentracija bakra izmjerene UV-VIS spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom su se razlikovale (raspon vrijednosti: 575,54 – 4352,54 $\mu\text{g/L}$ za spektrofotometrijsku metodu i 165,01 – 1064,02 $\mu\text{g/L}$ za ICP-MS) što je potvrdila i statistička obrada koja je pokazala da nema korelacije u rezultatima dobivenim dvjema metodama. Vrijednosti koncentracija bakra izmjerene spektrofotometrijskom metodom bile su u referentnom intervalu, dok su vrijednosti izmjerene ICP-MS metodom bile niže od referentnog intervala. Mogući razlog nižih vrijednosti koncentracija bakra izmjerenih ICP-MS metodom je nepotpuno razaranje uzorka i njegova ionizacija, a što se treba ispitati u daljnjim istraživanjima.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 7 grafičkih prikaza, 9 tablica i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bakar, spektrometrija, induktivno spregnuta plazma, spektrometrija masa, usporedba metoda, Spearmanova korelacija, Passing-Bablok regresija

Mentori: **prof dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **dr. sc. Adela Krivohlavek**, Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar
prof dr. sc. Ana-Marija Domijan, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

dr. sc. Adela Krivohlavek, Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar

doc. dr. sc. Erim Bešić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: siječanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry and laboratory medicine
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

MEASUREMENT OF COPPER CONCENTRATIONS IN HUMAN PLASMA SAMPLES USING UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY AND INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY (ICP-MS)

Mario Bažant

SUMMARY

Copper is essential element found in active sites of enzymes necessary for normal function of human organism. Because of low concentrations in organism, it is important to keep track of copper concentrations. Analytical methods used for copper concentration measurement are spectrophotometry, mass spectrometry and atomic absorption spectroscopy (AAS), from which later is recommended method for copper measurement. The aim of this study was to compare UV-Vis spectrophotometry and mass spectrometry (ICP-MS) as methods for measurement of copper in biological samples. Both methods were compared with validation parameters as well as sample preparation process and were used to measure copper concentrations in human plasma samples. Samples were collected from voluntary healthy subjects and subjects with diagnosed thyroid gland diseases ($n = 28$). All results were statistically processed with Spearman correlation and Passing-Bablok regression analysis ($p < 0,05$). Validation testing with copper standards (500 – 5000 $\mu\text{g/L}$ for spectrophotometric method and 5,0 – 150,0 $\mu\text{g/L}$ for ICP-MS) showed that both methods are linear in given range of concentrations, precise and that they have satisfactory limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Sample preparation process for both methods is not challenging, although sample preparation for spectrophotometry is more susceptible to possible interferences. Copper concentration values were different (value range: 575,54 $\mu\text{g/L}$ – 4352,54 $\mu\text{g/L}$ for spectrophotometry and 165,01 – 1064,02 $\mu\text{g/L}$ for ICP-MS) which was also confirmed by statistical analysis which showed there is no correlation between values measured by both methods. Values obtained by spectrophotometry were in reference range of values of copper in serum, while values measured with ICP-MS were lower than reference range. Most probable cause of lower values of copper concentrations obtained by ICP-MS is improper sample preparation and its ionisation that should be investigated in further research.

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

Thesis includes: 37 pages, 7 figures, 9 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: copper, spectrophotometry, inductively coupled plasma, mass spectrometry, method comparison, Spearman correlation, Passing-Bablok regression

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Adela Krivohlavek, Ph.D., *Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health*

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Adela Krivohlavek, Ph.D. *Andrija Štampar Teaching institute of Public Health*
Erim Bešić, Ph.D. *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: January 2021.