

# Određivanje bakra u ljudskom urinu primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

---

Kovačević, Ivana

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:163:611747>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**Ivana Kovačević**

**Određivanje bakra u ljudskom urinu primjenom  
atomske apsorpcijske spektrofotometrije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim  
vodstvom doc. dr. sc. Suzane Inić.

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Suzani Inić i doc. dr. sc. Jasni Jablan na pruženoj pomoći  
u izradi ovog diplomskog rada, strpljenju i iznimnoj susretljivosti. Zahvalna sam i svojoj  
obitelji i bliskim prijateljima, koji su bili veliki oslonac i pružili mi potporu u ovom poglavlju  
života. Hvala!*

## KAZALO

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 1.1. Bakar u organizmu.....   | 2  |
| 1.2. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija.....                       | 5  |
| 1.2.1. Dijelovi AAS-a.....  | 7  |
| 1. Linijski izvor zračenja – žarulja sa šupljom katodom .....           | 7  |
| 2. Generator atomske pare – plameni atomizator laminarnog protoka ..... | 8  |
| 3. Monokromator.....  | 9  |
| 4. Detektor.....  | 9  |
| 5. Sustav za obradu podataka.....                                       | 9  |
| 1.3. Validacija analitičke metode.....                                  | 9  |
| 1.3.1. Preciznost.....  | 10 |
| 1.3.2. Specifičnost i selektivnost.....                                 | 10 |
| 1.3.3. Osjetljivost.....  | 11 |
| 1.3.4. Linearnost i radno područje.....                                 | 11 |
| 1.3.5. Točnost.....   | 12 |
| 1.3.6. Izdržljivost.....  | 12 |
| 2. Obrazloženje metode .....  | 13 |
| 3. Materijali i metode.....   | 15 |
| 3.1. Materijali.....  | 16 |
| 3.1.1. Korištene kemikalije.....  | 16 |
| 3.1.2. Aparatura.....   | 16 |
| 3.1.3. Laboratorijski pribor.....                                       | 16 |
| 3.1.4. Uzorci.....  | 17 |
| 3.2.1. Princip metode.....  | 17 |
| 3.2.2. Priprema otopina.....  | 17 |
| 3.2.3. Postupak određivanja koncentracije bakra.....                    | 18 |
| 3.2.4. Statistička obrada podataka.....                                 | 19 |
| 4. Rezultati i rasprava.....  | 20 |
| 4.1. Validacija metode.....   | 21 |
| 4.2. Linearnost.....  | 21 |
| 4.3. Preciznost.....  | 22 |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 4.4. Osjetljivost.....           | 23 |
| 4.5. Primjena metode.....        | 24 |
| 5. Zaključak.....                | 25 |
| 6. Literatura.....               | 27 |
| 7. Sažetak /Summary.....         | 30 |
| Temeljna dokumentacijska kartica |    |
| Basic documentation card         |    |

## 1.UVOD

## 1.1. Bakar u organizmu

Bakar je jedan od esencijalnih elemenata u tragovima, kojega u ljudskom organizmu pronalazimo u količinama od 100 mg. Svojom redoks aktivnošću važan je u antioksidativnoj zaštiti, sudjeluje u imunosti, eritropoezi, sintezi neuropeptida te funkcioniranju mnogih redoks enzima među kojima se posebno ističe ceruloplazmin. Oksidativna aktivnost ceruloplazmina je ovisna o bakru kao kofaktoru i superoksid dismutazi, SOD, enzimu u kojem je važna i homeostaza bakra i cinka. Stoga, svaka promjena koncentracije bakra u organizmu može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme (Osredkar i sur., 2011; Uriu-Adams i sur., 2005).

Iako je bakar esencijalni mikroelement on može izazvati i onečišćenje u vodi za piće. Ima veliku industrijsku vrijednost, u izradi cijevi i ventila, a bakar sulfat pentahidrat se dodaje u vodu kao algicid. Koncentracije bakra u vodi za piće jako variraju i najčešće su posljedica korozije cijevi i odvoda. Kisela hrana ili pića u produljenom dodiru s bakrenim posudama, cijevima ili poklopcima mogu biti onečišćena malim količinama bakra. Najpodložniji prekomjernom unosu bakra putem vode su dojenčad na dohranama, za čiju se pripremu koristi voda koja je dugo ležala u bakrenom sustavu za dovod vode ili bakrenim cijevima. Koncentracija bakra u vodi iznad 1 mg/L može dovesti do obojenja robe i posuđa ([www.who.int](http://www.who.int)).

Većina namirnica sadrži bakar i uglavnom je njegov dnevni unos hranom dovoljan organizmu bez potrebe za dodacima prehrani koji sadrže bakar. Dnevna potreba za unosom bakra različita je i ovisna o dobi i spolu. Prema studiji koja je provedena u Francuskoj, a čije vrijednosti su slične onima u drugim europskim zemljama, potreba za bakrom u mlađoj dobi je manja u oba spola te raste s godinama s time da je kod odraslih puno veća potreba za bakrom kod muškaraca nego kod žena (Bost i sur., 2016).

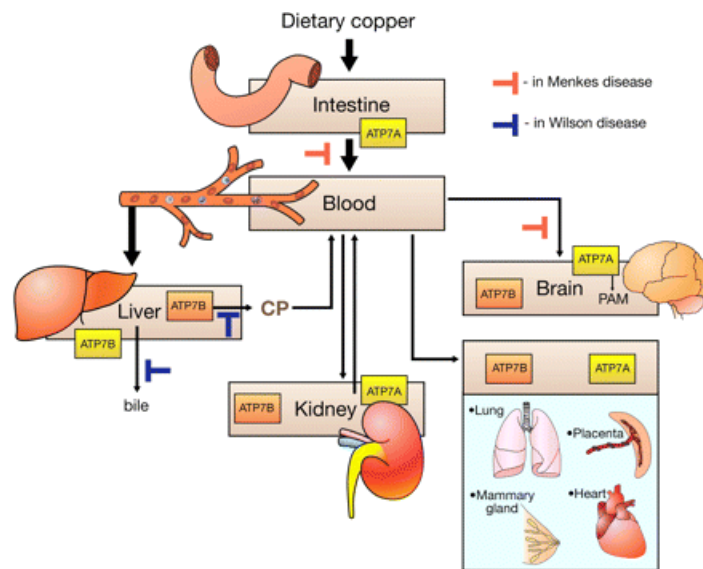
Bakar je u organizmu vezan za enzime, a slobodan, tj. nevezan može uzrokovati toksičnosti u organizmu. Uzimanje već relativno malih količina nevezanog bakra uzrokuje mučninu i povraćanje. Zajedno s enzimima bakar sudjeluje u prijenosu elektrona u stanicama i zaštiti organizma od slobodnih radikala. Nalazi se u crvenim i bijelim krvnim stanicama, sudjeluje u izgradnji elastičnog tkiva krvnih žila, u prijenosu živčanih impulsa, u normalnom funkcioniranju imunog sustava, te je dio sustava keratinizacije, pigmentacije i kakovće kose. Potreban je za normalan razvoj ploda u maternici, a njegov manjak tijekom trudnoće može uzrokovati oslabljen razvoj kardiovaskularnog sustava, poremećaje u imunološkom i

neurološkom sustavu te malformacije kostiju. Kod odraslih uzrokuje poremećaj metabolizma glukoze i kolesterola, strukture i funkcije imunskih i cirkulirajućih krvnih stanica te povećanje oksidativnog oštećenja. Nedostatak bakra pojavljuje se najčešće u djece koja su prerano rođena ili se oporavljaju od vrlo loše prehrane. Ljudi koji dugotrajno primaju intravensku (parenteralnu) prehranu su također u opasnosti od razvoja nedostatka bakra. Nedostatak bakra kod ljudi izrazito je rijedak, a prvi se simptomi pojavljuju tek nakon mjesec dana, ukoliko se bakar ne unosi u organizam. Simptomi koji se mogu razviti su zaostatak u rastu, smanjena keratinizacija i pigmentacija kose, hipotermija, degenerativne promjene u elastinu arterija, mentalni poremećaji te promjene na skeletu, kao kod skorbuta. Menkesova bolest povezana je s X vezanim genetskim mutacijama u Cu – transporterima (slika 1). Ta je bolest karakterizirana promjenom Cu- transportera P tipa ATP-aze (odgovoran za izlazak Cu iz stanice) kod muške djece (Almeida i sur., 2001; Uriu-Adams i sur., 2005; [www.msd.hr](http://www.msd.hr)).

Do toksičnosti bakra dolazi unosom znatno veće količine bakra kao što je trovanje modrom galicom, trovanje kod neispravnih aparata za dijalizu ili kod bakrenih posuda za kuhanje. Moguća su oštećenja jetre s pratećom žuticom, hemolizom, konvulzijama, hipotenzijom, povraćanjem, proljevima i dr. Veliki unos bakra može uzrokovati i Fenton tip redoks reakcije koja uzrokuje stanično oštećenje i smrt. Akutna intoksikacija bakrom može rezultirati nizom patoloških promjena, a u najtežim stanjima i smrt dok kroničnu intoksikaciju obilježavaju bolesti jetre i teški neurološki poremećaj (Bost i sur., 2016; Uriu-Adams i sur., 2005; [www.msd.hr](http://www.msd.hr)). Visoke vrijednosti bakra u organizmu mogu također biti uzrokovane Wilsonovom bolesti (hepatolentikularna degeneracija) do koje dolazi zbog genetske mutacije Cu – ATP-aze ATP7B na 13 kromosomu. Kod te bolesti dolazi do nakupljanja bakra u jetri, a kasnije i u ostalim organima, zbog nemogućnosti izbacivanja viška bakra koji unosimo redovitom prehranom. Zbog smanjene ugradnje bakra u ceruloplazmin, koncentracija ceruloplazmina u krvi je smanjena. Pojavnost bolesti je 1/30 000 ljudi bez obzira na njihovu rasu, nacionalnost ili zemlju u kojoj žive. Bolest dovodi do hepatitisa, te psihičkih i neuroloških poremećaja radi nakupljanja bakra u mozgu. U polovice oboljelih jetra je prvi i jedini organ koji je oštećen. Nakupljanje započinje od rođenja, a prvi simptomi se uočavaju u adolescenciji: tremor, smetnje hoda, bolesti jetre, te simptomi slični Parkinsonovoj bolesti. Posebnim pretragama moguće je dijagnosticirati Wilsonovu bolest pri čemu je koncentracija bakra u 24-satnom urinu, veća od 100 µg/24 h, ceruloplazmin u krvi je snižen ispod 20 mg, povećane su vrijednosti suhog tkiva jetre (više od 250 µg/g), a uočavaju se i mikroskopske



promjene na jetri. U postavljanju dijagnoze važno je, uz biopsiju jetre napraviti i oftalmološki pregled za Kayser-Fleischerov prsten. Liječenje Wilsonove bolesti moguće je D-penicilaminom i trienom koji djeluju na vezanje bakra te povećavaju njegovo izlučivanje mokraćom (slika 1). Jedna od često korištenih analitičkih tehnika za određivanje bakra u tjelesnim tekućinama je i atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) (Bost i sur., 2016; Uriu-Adams i sur., 2005; www.hubpp.mef.hr; https://ods.od.nih.gov).



Slika 1. Patofiziologija Menkes i Wilsonove bolesti

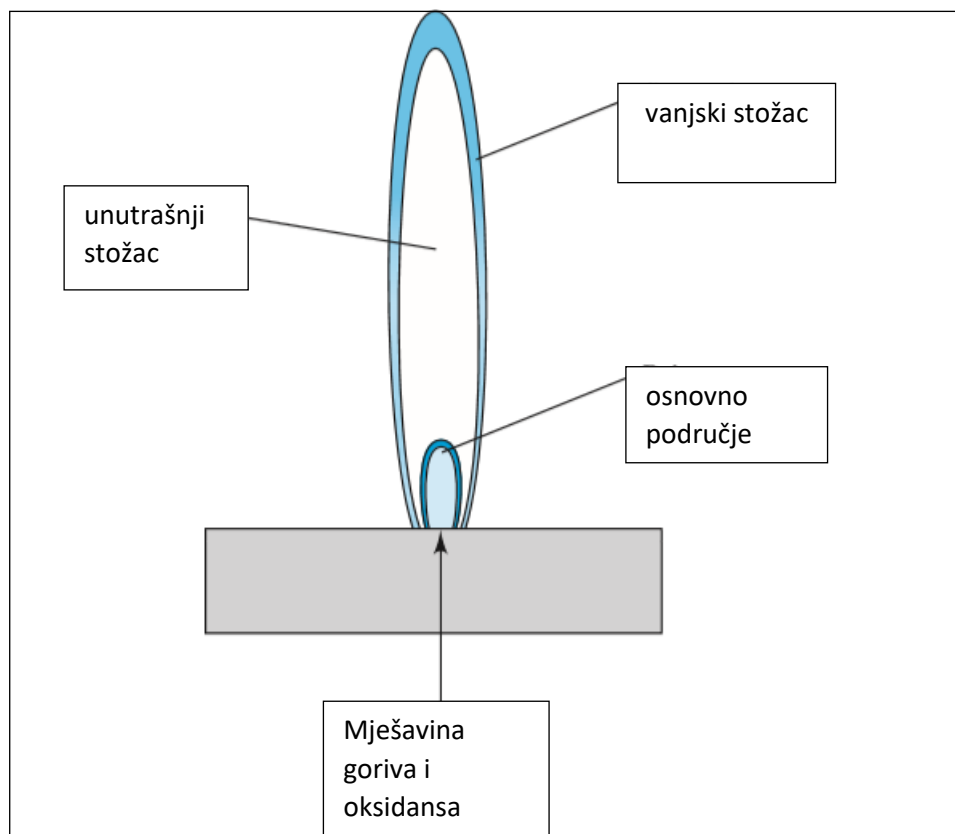
(preuzeto s <http://physrev.physiology.org/content/87/3/1011>)

## 1.2. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS)

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) je spektrofotometrijska tehnika kojom se na temelju mjerenja intenziteta apsorbiranog zračenja pri određenoj valnoj duljini određuje koncentracija elementa u ispitivanoj otopini (Skoog i sur., 1999). AAS je najčešće korištena analitička tehnika za određivanje metala u uzorcima. Metali koji se analiziraju apsorbiraju zračenje određene valne duljine pri čemu dolazi do ekscitacije elektrona te njihovog prelaska na više energijske razine (Jignesh i sur., 2012). Glavno obilježje ove spektrofotometrijske tehnike jest atomizacija, tj. postupak u kojem se uzorak isparava i razgrađuje uz nastajanje atomske pare. Pojam „atomska” uključuje i elementarne ione. Taj prvi i najkritičniji korak u atomskoj spektroskopiji može se ostvariti na četiri načina: atomizacijom u plamenu, elektrotermičkom atomizacijom, atomizacijom u induktivno spregnutoj plazmi i atomizacijom u plazmi istosmjerne struje (Skoog i sur., 1999; Watson i sur., 1999). U atomizaciji plamenom vodena otopina uzorka raspršuje se u obliku fine vodene prašine koja se miješa s plinovitim gorivom i oksidansom te uvodi u plamen, tu nastaje atomska para koja obasjana svjetlom točno određene valne duljine uzrokuje prijelaz atoma metala u pobuđeno stanje. Učinkovitost i reproducibilnost atomizacije naročito je važna jer utječe na osjetljivost, preciznost i točnost metode. Većina metala ima veliku energiju prijelaza iz osnovnog u pobuđeno stanje za termalno pobuđivanje. Spektar elektrona i iona, koji osim elementarnih atoma nastaju pri pobuđivanju, potpuno je različit od spektra pripadnog atoma. Omjer koncentracija atoma i iona ovisi o temperaturi plamena te ukupnoj koncentraciji atoma i elektrona drugih prisutnih elemenata pa je zbog toga vrlo važan nadzor temperature plamena i čistoća uzorka (Skoog i sur., 1999; Watson i sur., 1999; <http://lab-training.com>).

Za isti elektronski prijelaz, energija emitiranog fotona ekvivalentna je energiji apsorbiranog, odnosno valna duljina emitiranog jednaka je valnoj duljini apsorbiranog zračenja (Skoog i Leary, 1992).

Plamen korišten za atomizaciju sastoji se od osnovnog područja, unutrašnjeg i vanjskog stošca. Otapalo isparava u prvom, osnovnom području koje je najbliže plameniku. Isparavanjem otapala dobivamo fino raspodijeljene čvrste čestice koje ulaze u središnji dio plamena – unutrašnji stožac, u kojem je temperatura najviša (slika 2).



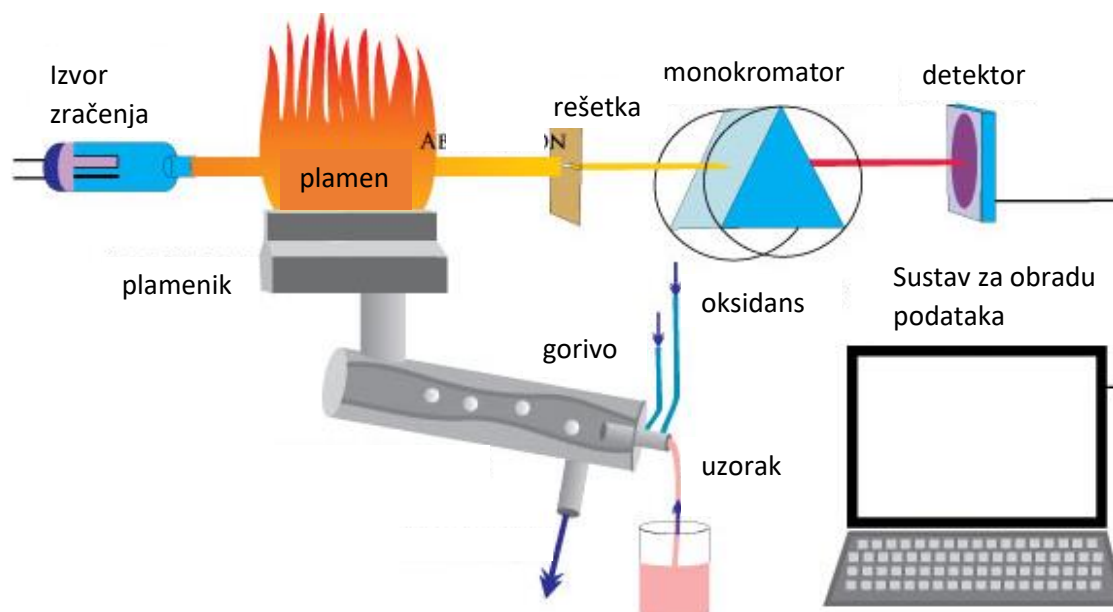
Slika 2. Područja plamena kod atomizacije uzorka na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru (AAS). Preuzeto iz Watson i sur., 1999.

Za dobivanje plamena najčešće se koristi smjesa zraka i acetilena čime se mogu postići temperature oko 2400 °C (Watson, 1999). Uzorak velikom brzinom prolazi kroz plamen i zbog toga samo dio uzorka prolazi kroz opisani proces. Iz tog razloga plamen nije izrazito djelotvoran za atomizaciju (Skoog i sur., 1999).

Kao ograničenja plamene atomizacije smatraju se i nemogućnost analize čvrstih uzoraka bez prethodnog otapanja, ili istovremeno određivanje više elemenata zbog potrebe odgovarajuće lampe sa šupljom katodom za svaki element, manja brzina unošenja uzorka, selektivno isparavanje miješanih otapala u komori, što može dovesti do analitičkih pogrešaka, a može doći i do uskakanja plamena (Skoog i sur., 1999; Watson, 1999). Prednosti AAS-a su brzina provođenja analize, jednostavnost, relativno niske cijene instrumenata te povoljna osjetljivost i selektivnost za mnoge elemente (određivanje koncentracija više od 70 metalnih elemenata) (Jignesh i sur., 2012; Skoog i sur. 1999; Watson, 1999).

## 1.2.1. Dijelovi AAS-a

Atomski apsorpcijski spektrofotometer je uređaj koji se sastoji od pet osnovnih dijelova: linijski izvor zračenja (žarulja sa šupljom katodom), generator atomske pare (plameni ionizator laminarnog protoka), monokromator, detektor i sustav za obradu podataka (Skoog i sur., 1999).

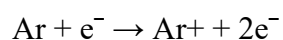


Slika 3. Dijelovi AAS-a: izvor zračenja, generator atomske pare, monokromator, detektor i sustav za obradu podataka. Preuzeto s <https://chemistry.stackexchange.com/>.

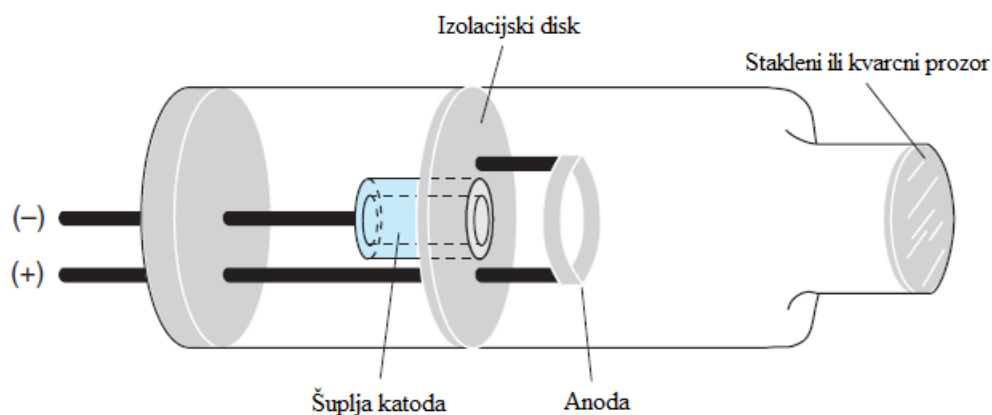
### 1. Linijski izvor zračenja – žarulja sa šupljom katodom

Kao linijski izvor zračenja u atomsko apsorpcijskoj spektrofotometriji najčešće se koristi žarulja sa šupljom katodom (slika 4). Sastoji se od zataljene staklene cijevi punjene inertnim plinom pod tlakom od 100-600 kPa u kojoj se nalaze volframova anoda i cilindrična katoda. Katoda je ili presvučena metalom koji se analizira ili je načinjena od istog (Skoog i sur., 1999).

Na elektrode se primjenjuje potencijal od oko 300 V što dovodi do ionizacije inertnog plina (primjerice argona) i nastanka struje jačine između 5 i 10 mA:



Nastali elektroni putuju prema anodi, a kationi prema katodi gdje, uz dovoljno visok potencijal, kationi argona udaranjem na katodu izbijaju određeni broj atoma metala s površine u atomski oblak. Taj proces naziva se izbijanje (Jignesh i sur., 2012). Dio tih izbijenih atoma nalazi se u pobuđenom stanju, a pri povratku u osnovno stanje, emitiraju karakteristične valne duljine koje su potrebne za pobuđivanje atoma ispitivanog uzorka u plamenu. Izbijeni atomi mogu se vratiti natrag na površinu katode ili se istaložiti na stijenke žarulje (Skoog i sur., 1999; Watson 1999).



Slika 4. Žarulja sa šupljom katodom na uređaju za AAS (preuzeto i prilagođeno prema: Harris, 2010)

## 2. Generator atomske pare – plameni atomizator laminarnog protoka

Kao generator atomske pare, u današnjim uređajima za AAS, koristi se plamenik laminarnog protoka ili plamenik s prethodnim miješanjem. U prošlosti je u primjeni bio plamenik turbulentnog protoka, ali je zamijenjen laminarnim zbog brojnih prednosti (Skoog i sur., 1999).

Najčešće korišteno gorivo je smjesa zraka i acetilena s temperaturom plamena od 2200 do 2400 °C koja je prikladna za mnoge atomske apsorpcijske analize. U plameniku laminarnog protoka uzorak se rasprši uz protok oksidansa pokraj kapilarnog vrška, a zatim se miješa s gorivom i prolazeći kroz niz zapreka uklanja se sve osim najsitnijih kapljica. Tako dobivene kapljice ulaze u plamenik dužine 5 do 10 centimetara (Skoog i sur., 1999; Watson 1999).

Prednosti ovakvih plamenika su mnogo veća duljina puta plamena i njegov relativno tihi rad. Također, zbog tih svojstava, imaju dobru reproducibilnost i osjetljivost, a problem začepljenja pojavljuje se vrlo rijetko (Skoog i sur., 1999).

### **3. Monokromator**

Monokromator za ultraljubičasto i vidljivo područje postavljen je između plamena i detektora. Odabire usku vrpću zračenja koje emitira žarulja sa šupljom katodom i zaustavlja interferirajuće zračenje plamena. Odabrana valna duljina usmjerava se na detektor (Skoog i sur., 1999).

### **4. Detektor**

Detektor prima izmjenični signal žarulje i neprekidan, istosmjerni signal plamena te ih prevodi u odgovarajući tip električne struje. Procesor signala u detektoru odvaja izmjenični signal žarulje i istosmjerni signal plamena, a do pojačala i sredstva za očitavanje propušta se samo izmjenični signal izvora. Dobivena vrijednost apsorbancije rezultat je logaritma omjera referentne komponente i komponente uzorka (Skoog i sur., 1999).

### **5. Sustav za obradu podataka**

Sustav za obradu podataka pristiglu struju pretvara u signal, koji se obradom prevodi u koncentraciju metala u uzorku (Skoog i sur., 1999).

#### **1.3. Validacija analitičke metode**

Validacija analitičke metode je postupak kojim se utvrđuje i bilježi prikladnost ispitivane metode za određenu primjenu. Time se jamči da će u propisanim uvjetima primjene, navedena metoda dati valjane rezultate (Nigović i sur., 2014).

Postupak validacije potrebno je provesti kod razvoja i uvođenja nove analitičke metode ili pri promjeni nekog parametra postojeće. Analitičke značajke koje se određuju u postupku validacije su: preciznost, specifičnost/selektivnost, osjetljivost, linearnost i radno područje, točnost i izdržljivost. Odabir značajki ovisi o samoj namjeni metode (Nigović i sur., 2014).

### 1.3.1. Preciznost

Preciznost ili pouzdanost metode je sposobnost metode da pokazuje slaganje niza ponovljenih mjerenja koja su dobivena višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka, pri istim propisanim uvjetima. Potrebno je izvršiti 5 ili 6 određivanja za 2 do 3 koncentracije, a izražava se kao relativna standardna devijacija (RSD) definirana formulom:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

pri čemu je SD standardna devijacija, a  $\bar{x}$  srednja vrijednost dobivenih rezultata.

Tri su načina iskazivanja preciznosti: ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost ili preciznost u seriji (engl. repeatability) je podudaranje rezultata izmjerenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka, istom metodom i pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument, reagens, laboratorij) u kratkom vremenskom periodu. Srednja preciznost ili preciznost iz dana u dan (engl. intermediate precision) prikazuje se odstupanjem rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka, istom metodom pod različitim uvjetima (različiti analitičar, instrument ili reagensi različitih dobavljača), u istom laboratoriju, te kroz duži vremenski period. Preciznost u seriji je obično veća od preciznosti iz dana u dan. Obnovljivost (engl. reproducibility) označava odstupanje dobivenih rezultata iz različitih laboratorija ( Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

### 1.3.2. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost je sposobnost analitičke metode da se njome nedvojbeno može razlikovati samo jedna komponenta u uzorku. Takve metode su rijetke, pa zato češće govorimo o selektivnosti, tj. sposobnosti metode da odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka kao što su matrica, onečišćenja ili pomoćne tvari. Specifičnost je najviši stupanj selektivnosti. Za neku se metodu specifičnost, odnosno selektivnost, određuje tako da se uzorku čistog analita dodaju onečišćenja ili, ako onečišćenja nisu dostupna, uzorak se podvrgava uvjetima pri kojima dolazi do razgradnje ( Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

### 1.3.3. Osjetljivost

Osjetljivost se izražava preko granice dokazivanja i granice određivanja. Granica dokazivanja (engl. Limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati pri propisanim uvjetima, ali ne odrediti. Izračunava se prema jednadžbi:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \cdot \sigma}{a}$$

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, tj. standardno odstupanje regresijskog pravca ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je  $a$  nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

Granica određivanja (engl. Limit of quantitation, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću, pri propisanim uvjetima. Izračunava se prema jednadžbi:

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

Vrijednosti LOD i LOQ, osim preko navedenih jednadžbi, mogu se odrediti i iz omjera signala i šuma razrjeđivanjem ispitivane otopine, do vrijednosti omjera signal/šum 10 za granicu određivanja, te 2 ili 3 za granicu detekcije (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

### 1.3.4. Linearnost i radno područje

Linearnost je sposobnost analitičke metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Određuje se pomoću serije uzoraka različitih koncentracija analita, na kojoj se izvrši između 3 i 6 određivanja, za najmanje 5 koncentracija. Rezultati se prikazuju grafički kalibracijskom krivuljom ili grafom ovisnosti izmjenog analitičkog signala o koncentraciji analita. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca,  $R^2 > 0,999$ .

Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracije analita (s graničnim vrijednostima) u kojem analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost. U kvantitativnoj analizi preporučeno je radno područje od 80 do 120 % (Nigović i sur., 2014).



### 1.3.5. Točnost

Točnost analitičke metode prikazuje podudaranje srednje vrijednosti ispitivanog uzorka sa stvarnim ili prihvaćenim referentnim vrijednostima. Za utvrđivanje točnosti potrebna su najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri različite koncentracije, unutar radnog područja metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti prikazujemo kao analitički prinos ili postotak postignutog rezultata (engl. recovery) prema jednadžbi:

$$R = \frac{\chi}{X} \cdot 100$$

gdje je  $\chi$  srednja izmjerena vrijednost, a  $X$  je stvarna vrijednost analita u uzorku ( Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

### 1.3.6. Izdržljivost

Izdržljivost ili otpornost metode predstavlja mjeru njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pri izloženosti malim, ali namjernim promjenama parametara metode. Određena je promjenom jednog parametra dok ostali ostaju nepromijenjeni. Izbor promijenjenog parametra ovisi o metodi, a otpornost nam daje informaciju o pouzdanosti metode tijekom njezine normalne primjene, gdje se očekuju promjene uvjeta rada (Nigović i sur., 2014).

## **2. OBRAZLOŽENJE METODE**

Brojni minerali i elementi u tragovima važni su za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Bakar, kao jedan od esencijalnih elemenata u tragovima, iznimno je važan u procesima antioksidativne zaštite, eritropoeze i djelovanju mnogih redoks enzima. Promjena koncentracije bakra u organizmu može dovesti do teških patofizioloških poremećaja (Bost i sur., 2016).

Cilj ovog diplomskog rada je pomoću atomske apsorpcijske spektrofotometrije (AAS) pouzdano, precizno i osjetljivo, odrediti koncentraciju bakra u uzorcima urina. Jedan od ciljeva je i validirati analitičku metodu ispitivanjem sljedećih parametara: linearnosti, preciznosti (ponovljivosti i srednje preciznosti), limita dokazivanja (LOD) i limita određivanja (LOQ), a zatim uvedenu i validiranu metodu ispitati na uzorcima urina zdravih ispitanika.

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

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Korištene kemikalije

- Cu-standard za AAS (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Butan-1-ol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- HNO<sub>3</sub> 65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm<sup>-1</sup>)

Sve kemikalije korištene za razvoj metode bile su pro analysi čistoće.

#### 3.1.2. Aparatura

Analiza je provedena pomoću atomsko apsorpcijskog spektrofotometra AAnalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektom nespecifične površine prema parametrima:

- Žarulja: žarulja sa šupljom katodom (15mA)
- Valna duljina (nm): 324,8 nm
- Gorivo / oksidans: acetilen / zrak
- Acetilen (tlak (Pa) /protok (dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>): 0,9x10<sup>5</sup>/2
- Zrak (tlak (Pa) /protok (dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>): 5,5x10<sup>5</sup>/17
- Širina pukotine (nm): 0,7
- Fotodetektor
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Pisač, računalo: AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo+monitor+printer HP 5652

#### 3.1.3. Laboratorijski pribor

- Staklene epruvete od 10,00 mL
- Staklene čaše od 50 mL
- Odmjerne tikvice od 50,00 mL i 100,00 mL

- Kapaljke
- Mikropipete od 5-50  $\mu\text{L}$ , 50-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$ , 1000-10 000  $\mu\text{L}$

### 3.1.4. Uzorci

Uzorci urina sakupljeni su od zdravih dobrovoljaca i prije analize čuvani su na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 3.2. Određivanje bakra atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom

### 3.2.1. Princip metode

Koncentracija bakra određena je mjerenjem apsorbancije ispitivanog uzroka, raspršenog u smjesi zraka i oksidansa, pri čemu izgaranjem uzorka u plamenu dolazi do atomizacije. Dobiveni su atomi bili izloženi zračenju valne duljine 324,8 nm, te se pratila promjena intenziteta zračenja.

### 3.2.2. Priprema otopina

#### *2% $\text{HNO}_3$*

2%-tna otopina  $\text{HNO}_3$  pripremljena je razrjeđivanjem 10,00 mL 65 %-tne otopine  $\text{HNO}_3$  s ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 500,00 mL.

#### *6% n-butanol*

6%-tna otopina n-butanola dobivena je razrjeđivanjem 6,00 mL 100%-tne otopine butanola u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 100,00 mL s ultračistom vodom. Dobivena otopina korištena je u pripremi otopina za analizu.

#### *Standardne otopine bakra*

Standardne otopine bakra za izradu kalibracijskog pravca pripremljene su razrjeđivanjem komercijalno pribavljenog standarda bakra koncentracije 1000 mg/L u odmjernoj tikvici do volumena od 50,00 mL kako je prikazano u tablici 1:

Tablica 1. Koncentracije i priprema standardnih otopina bakra razrjeđivanjem

| <b>Koncentracija standarda bakra (mg/L)</b> | <b>Priprema standarda</b>  | <b>Ukupno razrjeđenje u odnosu na otopinu komercijalnog standarda</b> |
|---|--|---|
| 0,25 (ST1)                                  | 12,50 $\mu$ L komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL  | 4000 X  |
| 0,5 (ST2)                                   | 25,00 $\mu$ L komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL  | 2000 X  |
| 1,0 (ST3)                                   | 50,00 $\mu$ L komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL  | 1000 X  |
| 2,0 (ST4)                                   | 100,00 $\mu$ L komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL | 500 X   |
| 3,0 (ST5)                                   | 150,00 $\mu$ L komercijalnog standarda konc. 1000 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 50,00 mL | 333 X   |

### 3.2.3. Postupak određivanja koncentracije bakra

Standardne otopine za mjerenje su pripremljene tako da se u staklene epruvete otpipetira 2,00 mL prethodno pripremljene standardne otopine bakra određene koncentracije i doda 8,00 mL n-butanola (6%) te otopina homogenizira. Uzorci urina su pripremljeni tako da se u staklenu epruvetu doda 2,00 mL uzorka urina i 0,10 mL n-butanola te homogenizira. Kao slijepa proba koristi se butanol (6%).

Plameni atomizator potrebno je prethodno pročistiti pomoću 2% HNO<sub>3</sub> na početku i na kraju mjerenja, a između pojedinih mjerenja za ispiranje se koristi ultračista voda.

Nakon pripreme i homogenizacije, slijedi mjerenje uzoraka. Uređaj omogućuje višestruko uzastopno mjerenje istog uzorka u kratkom vremenskom periodu, što doprinosi većoj točnosti mjerenja.

Koncentracija bakra u uzorku urina računa se pomoću kalibracijske krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije u linearnoj ovisnosti o koncentraciji. Mjerenje se izvodi na valnoj duljini od 324,8 nm.

#### **3.2.4. Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD).



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

#### 4.1. Validacija metode

Validacija analitičke metode je postupak koji definira prikladnost analitičke metode za određenu primjenu, te jamči dobivanje valjanog rezultata pri propisanim uvjetima.

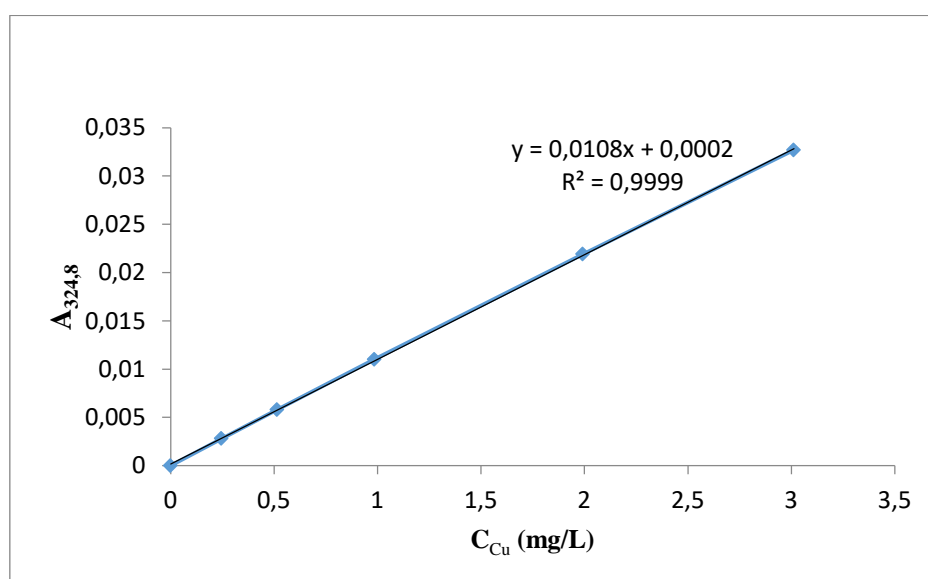
Izrađeni standardi, uzorci i slijepa proba pripremljeni su prema opisanom postupku u materijalima i metodama te su korišteni u svrhu ispitivanja: linearnosti, preciznosti (ponovljivost i srednja preciznost), točnosti i osjetljivosti (Nigović i sur., 2014).

#### 4.2. Linearnost

Linearnost analitičke metode je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Odredi se upotrebom pripremljenih standardnih otopina različitih koncentracija, mjerenjem standarda u triplikatu. Time se dobije graf ovisnosti odaziva detektora, prikazan kao apsorbancija, o koncentraciji standarda kao što je prikazano na slici 2. Jednadžba pravca dobivene kalibracijske krivulje glasi  $y=0,0108x+0,0002$  s koeficijentom korelacije  $R^2=0,9999$ .

Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da je metoda linearna i primjenjiva za određivanje koncentracije bakra u nepoznatim uzorcima.



Slika 5. Kalibracijski pravac standardnih otopina bakra u rasponu koncentracija 0,25 – 3,0 mg/L.

### 4.3. Preciznost

Preciznost metode je sposobnost analitičke metode da pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja koja su dobivena višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Za određivanje preciznosti potrebno je izvršiti pet do šest mjerenja u dvije do tri različite koncentracije uzorka. Rezultati se iskazuju kao relativna standardna devijacija. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost koja uključuje mjerenje u kratkom vremenskom razdoblju, srednja preciznost koja uključuje mjerenje kroz dulje vremensko razdoblje i obnovljivost koja uključuje mjerenje u različitim laboratorijima.

Za validaciju ove metode utvrđene su ponovljivost i srednja preciznost. Ponovljivost se utvrdila provođenjem šest mjerenja za tri standarda u kraćem vremenskom periodu. Rezultati su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Izmjerene koncentracije za tri standarda bakra unutar istog dana

| <b>BROJ MJERENJA</b>                             | <b>ST1 (0,25 mg/L)</b> | <b>ST3(1,0 mg/L)</b> | <b>ST4(2,0 mg/L)</b> |
|--|------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>1.</b>  | 0,226                  | 1,035                | 2,059                |
| <b>2.</b>  | 0,237                  | 1,035                | 2,043                |
| <b>3.</b>  | 0,245                  | 1,025                | 2,045                |
| <b>4.</b>  | 0,226                  | 1,027                | 2,032                |
| <b>5.</b>  | 0,226                  | 1,025                | 2,041                |
| <b>6.</b>  | 0,227                  | 1,03                 | 2,045                |
| <b>Srednja vrijednost (<math>\bar{x}</math>)</b> | 0,2312                 | 1,0295               | 2,0442               |
| <b>Standardna devijacija (SD)</b>                | 0,0080                 | 0,0046               | 0,0087               |
| <b>Relativna standardna devijacija (RSD, %)</b>  | <b>3,4760</b>          | <b>0,4504</b>        | <b>0,4269</b>        |

Prihvatljiva relativna standardna devijacija (RSD, %) za ponovljivost je do 2%. Dobivene vrijednosti za ST4 i ST5 odgovaraju uvjetu, a kod ST1 zbog niske koncentracije dolazi do odstupanja.

Srednja preciznost utvrđena je mjerenjem vrijednosti koncentracija za tri standarda kroz tri dana. Dobivene vrijednosti RSD prikazane su u tablici 3.

Tablica 3 Izmjerene koncentracije za tri standarda bakra kroz vremenski period od tri dana

| <b>BROJ MJERENJA</b>                     | <b>ST1 (0,25 mg/L)</b> | <b>ST3 (1,0 mg/L)</b> | <b>ST4 (2,0 mg/L)</b> |
|--|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1.                                       | 0,25                   | 1,036                 | 2,058                 |
| 2.                                       | 0,239                  | 1,057                 | 2,102                 |
| 3.                                       | 0,238                  | 0,968                 | 1,991                 |
| Srednja vrijednost ( $\chi$ )            | 0,2423                 | 1,0203                | 2,0503                |
| Standardna devijacija (SD)               | 0,0067                 | 0,0465                | 0,0311                |
| Relativna standardna devijacija (RSD, %) | <b>2,7476</b>          | <b>4,5595</b>         | <b>1,5174</b>         |

Prihvatljiva relativna standardna devijacija (RSD, %) za srednju preciznost je do 3 %.

Iz dobivenih vrijednosti RSD za srednju preciznost može se zaključiti da je metoda precizna za određivanje koncentracije bakra u nepoznatom uzorku, s tim da je kod ST4 vrijednost RSD nešto veća od zadanih granica prihvatljivosti za RSD.

#### 4.4. Osjetljivost

Granica dokazivanja (LOD) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena, pri zadanim uvjetima metode, a granica određivanja (LOQ) je najniža koncentracija koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. LOD i LOQ su izračunati iz nagiba kalibracijskog pravca ( $a$ ) i standardnog odstupanja y-odsječka regresijskog pravca ( $\sigma$ ) prema formuli u uvodnom poglavlju o validaciji metode. Dobivene su sljedeće vrijednosti:

$$\text{LOD} = 0,0054 \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 0,0163 \text{ mg/L}$$

#### 4.5. Primjena optimizirane metode

Ispitivana metoda, optimizirana i validirana, korištena je za određivanje koncentracije bakra u uzorcima urina (n = 7) sakupljenim od zdravih dobrovoljaca. Rezultati analize su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Koncentracije bakra u uzorcima ljudskog urina

| <b>UZORCI</b> | <b>KONCENTRACIJE (mg/L)</b> |
|---------------|-----------------------------|
| <b>1.</b>     | 0,0546                      |
| <b>2.</b>     | 0,0279                      |
| <b>3.</b>     | 0,0258                      |
| <b>4.</b>     | 0,0363                      |
| <b>5.</b>     | 0,0361                      |
| <b>6.</b>     | 0,0168                      |
| <b>7.</b>     | 0,0202                      |

Raspon koncentracije bakra u uzorcima ljudskog urina je od 0,0168 do 0,0546 mg/L. Izmjerene koncentracije odgovaraju normalnim vrijednostima bakra u urinu zdravog čovjeka pa se može zaključiti da se ovom metodom može pouzdano i precizno odrediti koncentracija bakra u urinu.

## **5.ZAKLJUČAK**

Bakar je u ljudskom organizmu jedan od važnih elemenata u tragovima jer sudjeluje u mnogim biološkim procesima. Svaka promjena koncentracije bakra može dovesti do patofizioloških poremećaja i utjecati na zdravlje ljudi. Stoga je mjerenje koncentracije bakra u biološkim uzorcima važno u dijagnosticiranju bolesti uzrokovanih promjenom koncentracije bakra u organizmu.

Uvedena je i validirana AAS metoda za brzo, pouzdano, precizno i osjetljivo određivanje koncentracije bakra u ljudskom urinu.

Dobiveni rezultati istraživanja pokazuju da je AAS prikladna metoda za rutinsko određivanje koncentracije bakra u urinu.

## **6.LITERATURA**



Almeida A, Lima JFC. Optimized conditions and analytical performance for the determination of Cu in serum and urine samples using a single GFAAS procedure. *Atomic Spectroscopy*, 2001, 22, 324 – 330.

Atomic Absorption Spectrometer, 2017., <http://lab-training.com> , pristupljeno 8. 8.2020.

Bakar, 2014., [www.msdpriurcnici.placebo.hr](http://www.msdpriurcnici.placebo.hr), pristupljeno 27. 8. 2020.

Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Francois Huneau J, Margaritis I, Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 2016, 107 – 110.

Copper, Fact Sheet for Health Professionals, <https://ods.od.nih.gov> , pristupljeno 30. 8. 2020.

Copper in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. 2004, str. 3 – 8, [www.who.int](http://www.who.int), pristupljeno 27. 8. 2020.

Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases, 2007., <http://www.physrev.physiology.org>, pristupljeno 25. 8. 2020.

Harris CD. Quantitative Chemical Analysis, 8th Edition. New York, W.H. Freeman and Company, 2010, str. 51 – 67.

Jignesh S, Vineeta K, Abhay S, Vilasrao K. Analytical methods for estimation of metals. *Int J Res Pharm Chem*, 2012, 2(1), 146 – 149.

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

Osredkar J, Sustar N. Copper and Zinc. Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clin Toxicol*, 2011, S3:001, 1 – 8.

Skoog DA, Leary JJ. An introduction to optical atomic spectrometry. U: Principles of Instrumental Analysis, 4th edition, Philadelphia, Sauder College Publishing, 1992, str. 196 – 210.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Atomska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivu zračenju. U: Osnove analitičke kemije, 6.izd. Bešenić, D, urednica. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 595 – 620.

Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26, 268 – 298.

Watson DG. Atomic absorption spectrophotometry. U: Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Liingstone, 1999, str. 125 – 132.

Wilsonova bolest, 2014., [www.hubpp.mef.hr](http://www.hubpp.mef.hr), pristupljeno 27. 8. 2020.

Why shoud AAS use element lamps?, <https://chemistry.stackexchange.com/>, pristupljeno 23. 9. 2020.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

Bakar je jedan od esencijalnih elemenata u tragovima i iznimno je važan za mnoge biološke procese u ljudskom organizmu. Promjena njegove koncentracije u tjelesnim tekućinama i organima može izazvati brojne patofiziološke poremećaje. Stoga je određivanje bakra u biološkim uzorcima važno za otkrivanje bolesti uzrokovanih promjenom njegove koncentracije u organizmu. U ovom diplomskom radu određena je koncentraciju bakra u uzorcima urina primjenom atomske apsorpcijske spektrofometrije (AAAnalyst 800, Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) na valnoj duljini od 324,8 nm. Analitička metoda je validirana korištenjem standardnih otopina bakra u rasponu koncentracija od 0,25 do 3,0 mg/L. Metoda je bila linearna u ispitivanom području ( $R^2 = 0,9999$ ). Ponovljivost metode iskazana kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je do 3,5 %, a srednja preciznost iskazana kao RSD bila je do 5%. Granica dokazivanja (LOD) iznosila je 0,0054 mg/L, a granica određivanja (LOQ) 0,0163 mg/L što ukazuje na osjetljivost metode. Koncentracija bakra u sedam uzoraka urina zdravih ispitanika bila je u rasponu 0,0168 – 0,0546 mg/L. Uvedena i validirana AAS metoda se pokazala prikladnom za osjetljivo, precizno i brzo određivanje koncentracije bakra u ljudskom urinu.

Copper is one of the essential trace elements and it is very important for many biological processes in the human body. Change in the concentration of copper in body fluids and organs can lead to numerous pathophysiological disorders. Therefore, the determination of copper in biological samples is important to detect diseases caused by changes its concentration in the body. In this thesis, concentration of copper in urine samples was determined by atomic absorption spectrophotometry (AAAnalyst 800, Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) at wavelenght of 324,8 nm. The method was validated using a copper standard in the concentration range of 0,25 to 3.0 mg/L. The method was linear in test area ( $R^2=0,9999$ ). The repeatability of the method, expressed as relative standard deviation (RSD), was up to 3,5% and intermediate precision expressed as RSD was under 5%. The limit of detection (LOD) was 0,0054 mg/L, and limit of quantification (LOQ) was 0,0163 mg/L, that indicating the sensitivity of the method. The concentration of copper, measured in seven healthy human urine samples were in the range from 0.0168 to 0.0546 mg/L. The developed and validated AAS method is suitable for an accurate, precise and fast determination of copper in the human urine.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

# Određivanje bakra u ljudskom urinu primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Ivana Kovačević

## SAŽETAK

Bakar je jedan od esencijalnih elemenata u tragovima i iznimno je važan za mnoge biološke procese u ljudskom organizmu. Promjena njegove koncentracije u tjelesnim tekućinama i organima može izazvati brojne patofiziološke poremećaje. Stoga je određivanje bakra u biološkim uzorcima važno za otkrivanje bolesti uzrokovanih promjenom njegove koncentracije u organizmu. U ovom diplomskom radu određena je koncentraciju bakra u uzorcima urina primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije (AAAnalyst 800, Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) na valnoj duljini od 324,8 nm. Analitička metoda je validirana korištenjem standardnih otopina bakra u rasponu koncentracija od 0,25 do 3,0 mg/L. Metoda je bila linearna u ispitivanom području ( $R^2 = 0,9999$ ). Ponovljivost metode iskazana kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je do 3,5 %, a srednja preciznost iskazana kao RSD bila je do 5%. Granica dokazivanja (LOD) iznosila je 0,0054 mg/L, a granica određivanja (LOQ) 0,0163 mg/L što ukazuje na osjetljivost metode. Koncentracija bakra u sedam uzoraka urina zdravih ispitanika bila je u rasponu 0,0168 – 0,0546 mg/L. Uvedena i validirana AAS metoda se pokazala prikladnom za osjetljivo, precizno i brzo određivanje koncentracije bakra u ljudskom urinu.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 5 grafičkih prikaza, 4 tablice i 17 literaturnih navoda. Izvorno je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bakar, atomska apsorpcijska spektrofotometrija, validacija

Mentor: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

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

**Dr. sc. Mirela Matić**, *docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

Rad prihvaćen: 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

# Determination of copper in human urine with use of atomic absorption spectrophotometry

**Ivana Kovačević**

## SUMMARY

Copper is one of the essential trace elements and it is very important for many biological processes in the human body. Change in the concentration of copper in body fluids and organs can lead to numerous pathophysiological disorders. Therefore, the determination of copper in biological samples is important to detect diseases caused by changes its concentration in the body. In this thesis, concentration of copper in urine samples was determined by atomic absorption spectrophotometry (AAAnalyst 800, Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) at wavelength of 324,8 nm. The method was validated using a copper standard in the concentration range of 0,25 to 3.0 mg/L. The method was linear in test area ( $R^2=0,9999$ ). The repeatability of the method, expressed as relative standard deviation (RSD), was up to 3,5% and intermediate precision expressed as RSD was under 5%. The limit of detection (LOD) was 0,0054 mg/L, and limit of quantification (LOQ) was 0,0163 mg/L, that indicating the sensitivity of the method. The concentration of copper, measured in seven healthy human urine samples were in the range from 0.0168 to 0.0546 mg/L. The developed and validated AAS method is suitable for an accurate, precise and fast determination of copper in the human urine.

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

Thesis includes: 32 pages, 5 figures, 4 tables, and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: copper, atomic absorption spectrophotometry, validation

Mentor: Suzana Inić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Suzana Inić**, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

**Mirela Matić**, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 2020.