

Usporedba klasične i instrumentalne analitičke metode za određivanje sadržaja kalcija u uzorcima dodataka prehrani

Herega, Sanja Ursula

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:163:431173>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sanja Ursula Herega

**Usporedba klasične i instrumentalne analitičke
metode za određivanje sadržaja kalcija u
uzorcima dodataka prehrani**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitička kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan.

Od srca zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Jasni Jablan na stručnom vodstvu, nesebičnoj pomoći, uloženom trudu, vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala Elvisu na strpljenju i bezuvjetnoj potpori pri svim mojim usponima i padovima.

Zahvalna sam svojoj obitelji što je navijala za svaki ispit.

Zahvalna sam na divnim prijateljima i kolegama, mojim štrebama Luciji i Bojani. Hvala Vam što ste mi uljepšali studentske dane.

Najveće hvala mojoj Mami, što me naučila da je sve moguće i da nikad ne smijem odustati.

Mama, ovo je za tebe.

Tata, znam da me čuvaš ♥

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 2 |
| 1.1. ANALITIČKA KEMIJA | 2 |
| 1.1.1. Kvalitativna kemijska analiza | 2 |
| 1.1.2. Kvantitativna kemijska analiza | 2 |
| 1.2. UZORAK..... | 3 |
| 1.3. GRAVIMETRIJSKA ANALIZA | 3 |
| 1.4. ATOMSKA APSORPCIJSKA SPEKTROFOTOMETRIJA | 7 |
| 1.5. KALCIJ | 9 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 3.1. MATERIJALI | 13 |
| 3.1.1. Kemikalije za gravimetrijsku analizu | 13 |
| 3.1.2. Kemikalije za atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju | 13 |
| 3.1.3. Aparatura | 13 |
| 3.1.4. Laboratorijski pribor i posuđe za gravimetrijsku analizu | 14 |
| 3.1.5. Laboratorijski pribor i posuđe za atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju | 14 |
| 3.1.6. Uzorci..... | 14 |
| 3.2. METODE | 14 |
| 3.2.1. Priprema 2% dušične kiseline | 14 |
| 3.2.2. Priprema 1% $\text{LaNO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 15 |
| 3.2.3. Priprema standardnih otopina kalcija za izradu baždarnog pravca | 15 |
| 3.2.4. Priprema uzoraka za analizu pomoću plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije (engl. Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS) | 16 |
| 3.2.5. Metoda standardnog dodatka..... | 16 |
| 3.2.6. Priprema uzoraka za analizu pomoću gravimetrijske metode | 16 |
| 3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA..... | 17 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 18 |
| 4.1. GRAVIMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA KALCIJA U DODACIMA PREHRANI METODOM TALOŽENJA IZ HOMOGENE OTOPINE | 18 |
| 4.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA KALCIJA U DODACIMA PREHRANI METODOM ATOMSKE APSORPCIJSKE SPEKTROFOTOMETRIJE | 18 |
| 4.2.1. Validacija analitičke metode | 18 |
| 4.2.2. Linearnost | 19 |
| 4.2.3. Preciznost..... | 20 |
| 4.2.4. Točnost..... | 23 |
| 4.2.5. Granica dokazivanja i granica određivanja..... | 23 |
| 4.2.6. Određivanje sadržaja kalcija po tableti | 24 |
| 5. ZAKLJUČCI | 26 |
| 6. LITERATURA | 27 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY | 30 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. Uvod

1.1. Analitička kemija

Analitička kemija bavi se kemijskom karakterizacijom tvari, poput razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije kemijskih sastojaka (elemenata ili spojeva) uzorka. Koristi i primjenjuje različite analitičke tehnike i metode. Mnoge se tvari međusobno razlikuju po sastavu, strukturi, fizikalnim i kemijskim svojstvima. Podaci dobiveni iz kemijske analize mogu biti: kvalitativni, sastoje se od općih opažanja o uzorku (ukazuju na prisutnost jedne ili više komponenata); kvantitativni, sastoje se od brojeva dobivenih raznim mjerenjima mase i volumena uzorka (Tablica 1); i strukturni, označavaju prisutnost karakteristične skupine atoma (funkcionalne skupine). Općenito, analitičke metode temelje se na dobivanju analitičkih signala i mjerenju intenziteta signala. Kvalitativne i kvantitativne analize mogu se provoditi različitim tehnikama i metodama (Harris, 2010; Radić i Modun, 2016).

Tablica 1. Podjela analitičke kemije

| Kvalitativna analiza | Kvantitativna analiza |
|--|---|
| Analiza za identifikaciju elemenata, vrsta i/ili spojeva u uzorku (Što je prisutno?) | Analiza za određivanje količina elemenata, vrsta i/ili spojeva u uzorku (Koliko je prisutno?) |

1.1.1. Kvalitativna kemijska analiza

Kvalitativnom kemijskom analizom identificira i/ili potvrđuje se prisutnost pojedinih sastojaka u uzorku bez obzira na stehiometrijski odnos. Klasična kvalitativna analiza za odjeljivanje prisutnih sastojaka koristi selektivno taloženje ili otapanje, ekstrakciju organskim otapalom, ionsku izmjenu, plošne kromatografije. Instrumentalna kvalitativna analiza koristi kromatografske postupke odjeljivanja, najčešće kolonske (Harris, 2010). Kvalitativna kemijska analiza prethodi kvantitativnoj kemijskoj analizi (Luterotti, 2011). U ovom tipu analize dobije se odgovor tipa pozitivno/negativno, odnosno da/ne (Higson, 2006).

1.1.2. Kvantitativna kemijska analiza

Cilj kvantitativne kemijske analize je utvrditi koliki je sadržaj neke vrste prisutan u uzorku. Metoda koja se koristi za kvantitativno mjerenje analita ovisi o brojnim čimbenicima, prvenstveno o tipu uzorka koji se analizira, o količini prisutnog analita te potrebnoj točnosti i

preciznosti same analize. Mnoge dostupne tehnike imaju različit stupanj selektivnosti, osjetljivosti, točnosti i preciznosti, te različitu cijenu i brzinu provedbe analize (Harris, 2010). Sve analitičke tehnike možemo podijeliti na klasične i instrumentalne tehnike (Tablica 2). Klasične tehnike koriste razdvajanje poput taloženja, ekstrakcije i kvalitativne analize prema boji, mirisu ili talogu. Ovisno o prirodi kemijske reakcije, brzini kemijske reakcije i praktičnosti, klasične se tehnike mogu podijeliti na gravimetrijske i titrimetrijske metode. Instrumentalne tehnike koriste uređaj/alat za mjerenje fizikalnih svojstava uzorka, poput apsorpcije i emisije svjetlosti, fluorescencije, električnih svojstava (npr. vodljivosti) i dr. Odjeljivanje tvari obično se vrši različitim kromatografskim metodama (Higson, 2006; Luterotti, 2011).

Tablica 2. Podjela kvantitativne analize

| Kvantitativna analiza | |
|--|--|
| Klasične tehnike | Instrumentalne tehnike |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Gravimetrijske metode (mjerenje mase) ○ Titrimetrijske ili volumetrijske metode (mjerenje volumena) | <ul style="list-style-type: none"> ○ Spektroskopske metode ○ Kromatografske metode ○ Elektroanalitičke metode |

Razvojem moderne analitičke kemije pokazalo se da opća definicija analitičke kemije može dovesti do pogrešnog zaključka. Cilj moderne analitičke kemije nije u provođenju rutinske analize na rutinskom uzorku (što se prikladnije naziva kemijskom analizom), već u poboljšanju i proširivanju postojećih metoda na nove vrste uzoraka i razvoju novih metoda za mjerenje kemijskih pojava. Prema tome, prikladnija definicija analitičke kemije glasi: znanost o pronalaženju i primjeni koncepata i principa te strategiji mjerenja karakteristika kemijskih sustava.

Analitički proces čini pet osnovnih koraka u pristupanju analitičkom problemu:

1. Utvrditi i definirati problem.
2. Dizajnirati eksperimentalni postupak.
3. Provesti eksperiment i prikupiti podatke.
4. Analizirati eksperimentalne podatke.
5. Predložiti rješenje problema (Harvey, 2000).

1.2. Uzorak

Uzorak je dio tvari o kojem su potrebne određene analitičke informacije, a uzorkovanje je propisani postupak u kojem se uzima dio ispitivanog materijala koji mora biti reprezentativni uzorak cjeline. Uzorak se sastoji od analita i matrice. Analit je dio uzorka koji se detektira ili odredi, a matrica je zbroj svih ostalih sastojaka uzorka koji se ne analiziraju i s kojima analit čini skupni uzorak (Radić i Modun, 2016).

1.3. Gravimetrijska analiza

Gravimetrijska analiza je kvantitativna analitička metoda kod koje analitički signal čini masu ili promjenu mase. Smatra se najstarijom analitičkom metodom velike točnosti te se može povezati s temeljnim fizikalnim svojstvima, zahtjeva samo masu i broj molova te definirane konstante kao Avogadrov broj (Harvey, 2000).

Masa analita može se odrediti na direktan i indirektan način. Direktnim načinom određuje se masa samoga analita ili spoja koji sadrži analit. Indirektnim načinom određuje se masa analita iz razlike u masi uzorka zbog gubitka analita (na primjer otparavanjem) ili iz mase formiranog spoja koji je rezultat reakcije i sadrži analit. Izolacija željenih vrsta postiže se taložnim metodama (metode precipitacije), metodama otparavanja (metode volatilizacije) ili instrumentalnim gravimetrijskim metodama (elektrogravimetrija i termogravimetrija). Taložne metode su najčešće primjenjivane gravimetrijske metode koje se odvijaju u više faza s ciljem dobivanja taloga visoke čistoće i pogodnog za filtriranje, ispiranje i vaganje (Tablica 3) (Skoog i sur., 1999).

Tablica 3. Faze taložne gravimetrijske analize

| |
|--|
| 1. priprema uzorka za postupak taloženja |
| 2. taloženje |
| 3. filtriranje |
| 4. ispiranje taloga |
| 5. sušenje i/ili žarenje taloga |
| 6. vaganje taloga |
| 7. račun |

1. Priprema uzorka za postupak taloženja

Uzorak koji se analizira izvaže se te prevodi u oblik homogene otopine uz pomoć odgovarajućeg otapala. Eventualno prisutne interferirajuće vrste mogu se ukloniti određenim

postupkom odjeljivanja ili postupkom maskiranja iz uzorka pripremljenog na ovaj način. Reakcijska otopina treba osigurati odgovarajuće uvjete kao što su odgovarajući volumen otopine za taloženje, pH, prisutnost interferirajućih vrsta i dr. kako bi se dobio talog što manje topljivosti i da nastali talog bude prikladan za filtriranje (Skoog i sur., 1999).

2. Talozenje

Taloženje se temelji na heterogenoj ravnoteži koja se opisuje konstantom produkta topljivosti (K_{pt}). Talozni se trebaju stvarati polako čime se postiže veća čistoća taloga te određena veličina čestice taloga. Razlog tome je što krutine koje nastaju polako imaju visok stupanj uredenosti u svojoj strukturi. Veličina čestica taloga ovisi o kemijskom sastavu, topljivosti taloga te o eksperimentalnim uvjetima taloženja (npr. temperatura, koncentracija reaktanata, brzina miješanja reaktanata, pH otopine). Osnovni cilj prilikom taloženja je: i) postići što manje topljiv talog da gubitak ispitivanog analita zbog topljivosti taloga bude zanemariv; ii) postići što veće čestice taloga radi jednostavnijeg i bržeg filtriranja; iii) postići što veću čistoću samog taloga radi što točnijeg određivanja (Skoog i sur., 1999). Utjecaj eksperimentalnih varijabli na veličinu čestica taloga opisuje se pomoću veličine relativnog prezasićenja (eng. *relative supersaturation*, *RSS*, izraz 1). Ruski kemičar Peter Petrovich von Weymarn utvrdio je da se tijekom procesa taloženja veličina čestica taloga smanjuje s porastom relativne prezasićenosti u otopini:

- Von Weymarn-ov omjer

$$RSS = \frac{(Q-S)}{S} \quad (1)$$

gdje je Q koncentracija reagirajućih vrsta ($mol L^{-1}$) u trenutku početka taloženja, a S koncentracija zasićene otopine ($mol L^{-1}$) odnosno topljivost taloga.

Prilikom taloženja dodatak taložnog reagensa prvo dovodi do trenutne prezasićenosti otopine $Q > S$. Kako stanje prezasićenosti nije stabilno ubrzo se višak otopljene tvari istaloži tako da sustav dođe u ravnotežno stanje $Q=S$. Eksperimentalno se pokazalo da je veličina čestica obrnuto proporcionalna relativnom prezasićenju za vrijeme taloženja. S analitičke točke poželjno je da se dobiju talozni krupnijih čestica pa je potrebno kontrolirati RSS kontrolom veličina Q ili S . Kada je relativno prezasićenje veliko dobije se talog sitnijih čestica, a kada je relativno prezasićenje malo, talog će imati krupnije čestice odnosno kako bi se dobio talog sa

što krupnijim česticama potrebno je održavati Q što manjim, a S što većim. Smanjenje RSS postiže se:

- povećanjem temperature ($S \uparrow$)
- taloženjem iz razrijeđenih otopina ($Q \downarrow$)
- polaganim dodavanjem taložnog reagensa ($Q \downarrow$)
- miješanjem reaktanata ($S \uparrow$) ($Q \downarrow$)
- podešavanjem pH (ako topljivost taloga ovisi o pH, $S \uparrow$)
- digestija

Kontrolom navedenih eksperimentalnih uvjeta smanjuje se količina nečistoća koja se može ugraditi u čestice taloga. Što su veće čestice taloga, površina je manja te se manja količina čestica može ugraditi (Harvey, 2000).

Taloženje se provodi na dva načina:

a) Direktno taloženje – Taložni reagens se dodaje polagano, direktno u otopinu uzorka s ispitivanim analitom uz učinkovito miješanje te se na taj način sprječava visoka lokalna koncentracija taloga koji je u stehiometrijskom odnosu sa samim ispitivanim analitom. Nastali talog treba biti poznatog kemijskog sastava, visoke čistoće, pogodan za filtriranje, stabilan prilikom zagrijavanja, ne reagirati sa zrakom, vodom te ne smije stvarati taloge s drugim eventualno prisutnim ionima. Također, kako su mnogi talozi topljiviji pri nižim (kiselijim) pH vrijednostima samim tim brzina taloženja je sporija, pa je važno provoditi postupak taloženja na pH blizu kiselog kraja raspona pH u kojem je taloženje kvantitativno (Hage i Carr, 2011).

b) Talloženje iz homogene otopine – Talloženje iz homogenih otopina je najbolja od svih taložnih tehnika. Pri ovom obliku taloženja, taložni reagens se ne dodaje kao takav u otopinu nego se stvara direktno u otopini analita koji taložimo pomoću neke spore kemijske reakcije. Na ovaj način taložni reagens se stvara postepeno i homogeno u cijeloj otopini uzorka, reagira odmah s ispitivanim analitom te je izbjegnuto lokalno prezasićenje u otopini odnosno izbjegnuta je mjestimična prevelika koncentracija taložnog reagensa. Postoje dvije metode taloženja iz homogene otopine. Prva se odnosi na taloženje taloga koji su ovisni o promjeni pH reakcijske otopine. U tom se slučaju analit i taložni reagens mogu dodati u reakcijsku otopinu u kojoj postoje uvjeti koji ne omogućuju taloženje. Zatim se podešava pH vrijednost reakcijske otopine. Druga metoda taloženja iz homogene otopine jest kada se taložni reagens stvara nekom kemijskom reakcijom (Harvey, 2000; Harris, 2010).

3. Filtriranje

Filtriranje je postupak odvajanja taloga od matične otopine što se može postići na različite načine ovisno o vrsti samog taloga. Kao sredstvo za filtriranje u kemijskoj analizi se upotrebljavaju: filtarski papiri i lončići za filtriranje, a ponekad se talog odvaja od otopine centrifugiranjem. Filtar papir se koristi za taloge koji se ne mijenjaju pod utjecajem redukcijskog djelovanja ugljika prilikom spaljivanja i izgaranja papira. Razlikuju se prema brzini filtriranja, veličini pora filter papira te sadržaju pepela pri spaljivanju. Filtarski lončići upotrebljavaju se za filtriranje onih taloga koji bi se mogli kemijski mijenjati reduktivnim djelovanjem ugljika. U gravimetriji se koriste stakleni, porculanski i Gooch lončići. Koji će se od ovih lončića izabrati ovisi o svojstvima taloga, prvenstveno o temperaturi na kojoj talog treba zagrijavati ili žariti. Lončići za filtriranje u prednosti su pred filterima od papira jer nije potrebno spaljivanje papira kod kvantitativnog određivanja i jer ne dolazi do promjene taloga. Lončići su obično od porculana ili stakla. Stakleni lončići koriste se ako je talog potrebno sušiti ili grijati do najviše 400 °C. Za žarenje taloga kod viših temperatura (do 1000 °C) za filtriranje se uzima porculanski lončić (Harvey, 2000; Harris, 2010).

4. Ispiranje

Talog se ispiri malim obrocima tekućine za ispiranje i to do negativne reakcije na ion koji se želi ispirati. Svrha ispiranja je maksimalno uklanjanje topljivih nečistoća, a da pri tom ne dođe do značajnog gubitka taloga. Gubitak zbog topljivosti može se umanjiti upotrebom malih obroka otopine za ispiranje. Sastav otopine za ispiranje ovisi o topljivosti taloga, kemijskim svojstvima taloga, svojstvima nečistoća te djelovanju otopine za ispiranje pri konačnoj obradi taloga. Primijenjena otopina treba sadržavati taložni reagens koji se lako uklanja sušenjem i/ili lako hlapljivi elektrolit koji ne reagira s talogom. Dije se na: i) otopine koje smanjuju topljivost taloga; ii) otopine koje sprječavaju peptizaciju taloga; iii) otopine koje sprječavaju hidrolizu soli slabe kiseline ili slabe baze (Harris, 2010; Harvey, 2000).

5. Sušenje i/ili žarenje

U gravimetrijskoj analizi konačni produkt mora biti poznatog i stabilnog sastava pa se nakon postupka filtriranja i ispiranja, talog suši dok njegova masa ne postane stalna. Sušenjem se uklanja otapalo i sve hlapljive vrste povučene s talogom. Sušenje je dovoljno samo za one taloge koje je moguće vagati u istom obliku u kojem su istaloženi. Takve taloge treba filtrirati u lončićima. Talog se suši u sušioniku na temperaturi od 105 do 130 °C do konstantne mase. Vaganje do konstantne mase znači da se uzorak suši i hladi sve dok razlika masa ne bude

manja od 0,2 do 0,3 mg. Neki se suše u pećima na 110 – 120 °C kroz nekoliko sati ili da bi se skratilo vrijeme sušenja u mikrovalnim pećima.

Nakon provedenog sušenja lončić je potrebno ohladiti. Ohlađeni lončići se važu na analitičkoj vagi. Iz razlike mase lončića s talogom i praznog lončića određuje se masa taloga.

Pojedini talozi moraju se spaljivati da bi se razgradili i da bi nastao spoj poznatog sastava, tzv. vagani oblik. Postupkom žarenja talog se prevodi u pogodan oblik za vaganje. Žari se u porculanskom lončiću na temperaturi od 800 do 1300 °C. Temperatura potrebna da se dobije prikladan vagani oblik ovisi o svojstvima samog taloga (Harris, 2010; Harvey, 2000).

6. i 7. Vaganje i račun

Stehiometrija reakcije nastajanja teško topljivog taloga daje matematičku povezanost mase analita i mase taloga. Gravimetrijska analiza zasniva se na eksperimentalnom mjerenju dvije veličine: mase uzorka uzetog za analizu i mase taloga poznatog kemijskog sastava dobivenog analizom. Iz ovih veličina izračuna se maseni udio ispitivanog analita koja se često izražava u postotcima (izraz 2).

$$w(A) \% = \frac{m_p \cdot GF}{m_u} \cdot 100 \quad (2)$$

Analitički talog koji se u gravimetrijskoj analizi poslije sušenja ili žarenja važe vrlo rijetko je upravo ispitivani analit. Najčešće vagani talog ili sadrži ispitivani analit ili se može s njim stehiometrijski povezati, a stehiometrijska veza između njih omogućava preračunavanje mase vaganog taloga u odgovarajuću masu tražene komponente. Preračunavanje se vrši pomoću tzv gravimetrijskog faktora.

Gravimetrijski faktor (GF) je omjer molarne mase tvari čiju masu želimo izračunati (analita) i molarne mase tvari čiju masu mjerimo (izvaganog taloga), pomnoženo omjerom broja molova analita i broja molova taloga (izraz 3):

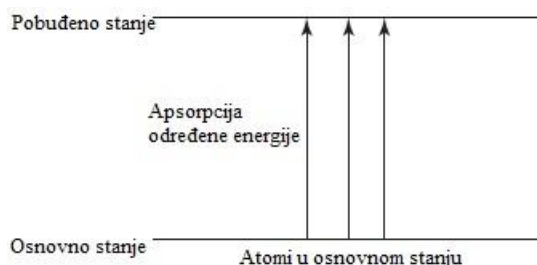
$$GF = \frac{a}{b} \cdot \frac{M_{\text{analita}}}{M_{\text{vaganog oblika}}} \quad (3)$$

gdje su a i b stehiometrijski odnos između analita i produkta gravimetrijske analize (Generalić i Krka, 2011; Hage i Carr, 2011; Harris, 2010; Harvey, 2000).

1.4. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija

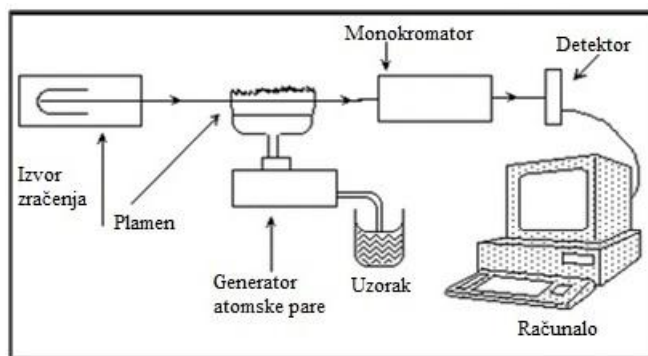
Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (engl. *Atomic Absorption Spectroscopy*, AAS) je instrumentalna spektrofotometrijska analitička tehnika koja definira koncentraciju određenog analita u ispitivanom uzorku mjerenjem intenziteta apsorbiranog zračenja pri određenoj valnoj

duljini. Koristi se kao rutinska metoda za određivanje mnogih elemenata u tragovima u raznim matricama uzoraka. Princip metode temelji se na apsorpciji vidljivog ili ultraljubičastoga zračenja valnih duljina od 190 do 860 nm koje prolazi kroz sloj slobodnih atoma u nepobuđenom, osnovnom stanju. Atomizacijom u plamenu ili elektrotermičkom atomizacijom pri temperaturi od 1000 do 3000 °C nastaju slobodni atomi koji tvore tzv. atomsku paru. Kada elektromagnetsko zračenje prolazi kroz atomsku paru, dolazi do apsorpcije zračenja određenih frekvencija, a to daje prepoznatljiv spektar tog elementa (Kotra i sur., 2012). Temelj je ekscitacija elektrona u vanjskoj ljusci metalnog atoma odnosno kvantizirani prijelaz slobodnog atoma u pobuđeno, više energetske stanje. Energetske razlike prijelaza određene su atomskom strukturom elementa i karakteristične su za element (Luterotti, 2013). Količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je broju slobodnih atoma u plamenu.



Slika 1. Shematski prikaz atomske apsorpcije (preuzeto i prilagođeno s <http://rxpharmaworld.blogspot.com>)

Osnovni dijelovi spektrofotometra su: linijski izvor zračenja, generator atomske pare, monokromator, detektor i software (Watson, 1999).



Slika 2. Dijelovi plamenog AAS (preuzeto i prilagođeno s <http://chemicalinstrumentation.weebly.com>)

1.5. Kalcij

Kalcij (Ca), kemijski element, jedan je od zemnoalkalijskih metala iz skupine 2 (IIa) periodnog sustava. Najzastupljeniji je metalni element u ljudskom tijelu i peti po zastupljenosti element u Zemljinoj kori. Sir Humphrey Davy ga je prvi izolirao 1808. godine. Ime je dobio po latinskoj riječi *calx* što znači vapno. Drevni narodi koristili su kalcijev oksid, odnosno živo vapno, za gradnju. Danas se koristi kao sredstvo za legiranje aluminijskih, bakra, olova, magnezija i ostalih metala. Kalcij je bitan i za život biljaka i životinja gdje ga nalazimo kao enzimski kofaktor i strukturni element (npr. stanične membrane, kosti i zubi). Veliki broj živih organizama koncentrira kalcij u ljuskama ili kosturima, a kod viših životinja kalcij je najzastupljeniji anorganski element. U ljudskom tijelu Ca čini 2% tjelesne mase čovjeka (<https://www.britannica.com>).

1.5.1. Izvori kalcija

Nalazi se u nekim namirnicama, dodaje se drugima, dostupan je kao dodatak prehrani i prisutan je u pojedinim lijekovima. Glavni izvori kalcija u ljudskoj prehrani su mlijeko, mliječni proizvodi (npr. jogurt, sir, posebno tofu), riba (npr. sardine, školjke, posebno losos) i zeleno lisnato povrće (kelj, kupus, špinat, repa, blitva). Kalcij se dodaje npr. žitaricama za doručak i voćnim sokovima. Također, nalazi se u tabletama antacida i otopinama za peritonejsku dijalizu (Kroner, 2011).

Najveća dopuštena količina kalcija u dnevnoj dozi u dodacima prehrani iznosi 1500 mg (NN 160/2013). Dodaci prehrani s kalcijem sadrže kalcij u obliku karbonata, laktata, glukonata, citrata i citrat malata. Kalcij karbonat je cjenovno najpristupačniji. Većina pripravaka treba se uzimati uz obrok, dok se kalcij u obliku citrata i citrat malata može uzimati neovisno o hrani. Oblik citrata preporuča se osobama sa želučanim tegobama, posebice starijim osobama s aklorhidrijom (smanjenim lučenjem želučane kiseline) te pacijentima koji uzimaju lijekove protiv gastritisa i žgaravice (<http://www.vitamini.hr>).

1.5.2. Uloga kalcija u organizmu

Kalcij ima važnu ulogu za odvijanje normalnog metabolizma. Potreban je za vaskularnu kontrakciju i vazodilataciju, mišićnu funkciju, prijenos živčanih impulsa, unutarstaničnu signalizaciju i hormonalnu sekreciju, iako je za potporu tim metaboličkim funkcijama potrebno manje od 1% ukupnog tjelesnog kalcija. Koncentracija kalcija u serumu je čvrsto regulirana i ne fluktuiraju s promjenama u prehrani; tijelo koristi koštano tkivo kao rezervoar i izvor kalcija za održavanje konstantnih koncentracija u krvi, mišićima i međustaničnim

tekućinama. Preostalih 99% tjelesnog kalcija u tijelu pohranjuje se u kostima i zubima gdje podupire njihovu strukturu i funkciju. Kost se konstantno preoblikuje, odnosno konstantno se događa resorpcija i taloženje kalcija. Ta ravnoteža između resorpcije i taloženja kosti mijenja se s godinama. Stvaranje kosti premašuje resorpciju tijekom rasta djece i adolescenata, dok su u odrasloj dobi oba procesa relativno jednaka. U starijih odraslih osoba, posebno među ženama u postmenopauzi, razgradnja kosti premašuje stvaranje, što dovodi do smanjenja koštane mase, osteoporoze i učestale frakture kostiju (<https://www.britannica.com>; Hall i Guyton, 2011).

1.5.3. Disbalans kalcija

Hipokalcijemija je stanje smanjene koncentracije kalcija u krvi. Nedostatak kalcija uzrokovan je nedovoljnim unosom, smanjenom apsorpcijom, pojačanim izlučivanjem ili kombinacijom navedenog. Može se javiti kod osoba intolerantnih na laktozu, vegetarijanaca, žena u postmenopauzi, bubrežnih bolesti i dr. Simptomi hipokalcijemije su: grčevi mišića, ukočenost i trnci u prstima, konvulzije, letargija, loš apetit, abnormalan srčani ritam, poteškoće s disanjem zbog grčeva grkljana i bronhijalnih cijevi, promjene u funkciji mozga (depresija, demencija, čak psihoza). Kod dugotrajne hipokalcijemije može doći do oticanja mozga, katarakte i trajnog oštećenja srca. Također, dolazi do osteopenije (smanjene gustoće kostiju) koja ako se ne liječi dovodi do osteoporoze (Kroner, 2011; Berdanier, 1998).

Hiperkalcijemija je stanje povišene koncentracije kalcija u krvi. Simptomi su poliurija (povećano mokrenje), mišićna slabost, opstipacija i smetenost. Visok unos kalcija može uzrokovati konstipaciju ili nadutost, osobito ako se radi o kalcijevom karbonatu. U rijetkim slučajevima može se razviti mliječno-alkalni sindrom koji rezultira hiperkalcijemijom, hipertenzijom, kalcifikacijom tkiva, alkalozom, neurološkim simptomima te oštećenjem bubrega (Webb, 2006).

1.5.4. Preporučeni dnevni unos

Preporučeni dnevni unos (engl. *Recommended Dietary Allowance, RDA*) je prosječna dnevna razina unosa dovoljna da zadovolji potrebe za hranjivim sastojcima gotovo svih (97% –98%) zdravih osoba; često se koristi za planiranje prehrane za pojedince (WHO, 2004).

Tablica 4. RDA vrijednosti kalcija u miligramima po danu

| Dob | Muški spol | Ženski spol | Trudnoća | Dojenje |
|-----------------------|-------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| 0 – 6 mjeseci | 200 mg * | 200 mg * | | |
| 6 – 12 mjeseci | 260 mg * | 260 mg * | | |
| 1 – 3 godine | 700 mg | 700 mg | | |
| 4 – 8 godina | 1000 mg | 1000 mg | | |
| 9 – 13 godina | 1300 mg | 1300 mg | | |
| 14 – 18 godina | 1300 mg | 1300 mg | 1300 mg | 1300 mg |
| 19 – 50 godina | 1000 mg | 1000 mg | 1000 mg | 1000 mg |
| 51 – 70 godina | 1000 mg | 1200 mg | | |
| 71+ godina | 1200 mg | 1200 mg | | |

* Adekvatan unos (engl. *Adequate intake, AI*) je razina unosa nutrijenta za koju se smatra da je dovoljna da zadovolji nutritivne potrebe; određuje se kada nema dovoljno dokaza za određivanje RDA (preuzeto iz: WHO, 2004).

1.5.5. Utjecaj na bolesti i zdravlje

Rahitis, bolest kostiju, javlja se kad nedostatak vitamina D oslabi apsorpciju kalcija iz gastrointestinalnog trakta u izvanstanične tekućine. Bolest posebno pogađa dojenčad i djecu (<https://www.britannica.com>).

Povećanje unosa kalcija, kod oba spola, blago smanjuje i sistolički i dijastolički krvni tlak, pogotovo ako su doze veće od 1000 mg/dan (Cormick i sur., 2015). Kalcij u kombinaciji s vitaminom D djeluje sinergijski i zajedno smanjuju rizik od fraktura u oba spola, te se zato koriste u prevenciji i liječenju osteoporoze (<http://www.vitamini.hr>).

Istraživanja pokazuju da uzimanje kalcija u obliku dodatka prehrani može uzrokovati nastanak bubrežnih kamenaca, ali ako se unosi hranom smanjuje rizik od nastanka kamenaca. Utjecaj kalcija na kardiovaskularne bolesti potrebno je dodatno istražiti jer se u istraživanjima nalaze oprečni rezultati. Isto tako i za utjecaj kalcija na kontrolu, odnosno smanjenje tjelesne mase i sprječavanje raka debelog crijeva. Neka istraživanja su pokazala neznatnu povezanost visokog unosa kalcija s povećanim rizikom od razvoja raka prostate, ali potrebno je provesti još istraživanja (<https://definicijahrane.hr>).

2. Obrazloženje teme

Kalcij kao makroelement u ljudskom organizmu ima vrlo važnu ulogu kod neuromuskularnih, enzimskih, hormonalnih te drugih metaboličkih aktivnosti. Za normalno funkcioniranje ljudskog organizma važno je postići odgovarajuću razinu kalcija u organizmu bilo adekvatnom prehranom i/ili suplementacijom. Manji deficit kalcija nema značajnih kliničkih simptoma jer se koncentracija u serumu održava pomoću zaliha kalcija iz kostiju. Nedostatak kalcija najčešće se uoči kad je već narušena gustoća kostiju. Konvulzije, trnci u prstima, abnormalni srčani ritam koji može biti opasan i za život čovjeka su posljedice dugotrajnog nedostatka kalcija u ljudskom organizmu. Svjetska zdravstvena organizacija i Američka agencija za lijekove propisale su dnevne preporučene vrijednosti kalcija za svaku pojedinu dobnu skupinu. Tijekom dodatnog unošenja kalcija u organizam preporuča povremeno napraviti pauzu i uzimati druge minerale (npr. željezo, magnezij, bakar i dr.) kako se ne bi narušila prirodna ravnoteža. Uzimanje kalcija prema preporučenom dnevnom unosu i tijekom kraćeg vremenskog perioda (cca. par mjeseci), nema opasnosti za pojavu nuspojava kao i negativnog utjecaja na zdravlje čovjeka.

Cilj ovoga diplomskog rada bio je:

- eksperimentalna primjena gravimetrijske analize
- određivanje sadržaja kalcija u dodacima prehrani gravimetrijskom metodom taloženja iz homogene otopine
- ispitati odabrane validacijske parametre za primijenjenu AAS metodu prema ICH smjernicama (smjernice Međunarodne konferencije o harmonizaciji, prema engl. *International Conference of Harmonization*)
- određivanje sadržaja kalcija u dodacima prehrani pomoću validirane AAS metode
- usporedba dvije primijenjene analitičke metode.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije za gravimetrijsku analizu

- 0,1 M HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- urea (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- metilno crvenilo (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Sve korištene kemikalije su pro analysis stupnja kakvoće.

3.1.2. Kemikalije za atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju

- Standard Ca za AAS 1000mg/L (Sigma Aldrich, Njemačka)
- HNO_3 65% (Kemig, Hrvatska)
- Lantanov (III) nitrat heksahidrat, $\text{LaNO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Honeywell FlukaTM, Njemačka)
- Ultračista voda (provodljivost $0,005 \mu\text{Scm}^{-1}$, pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, SAD)

3.1.3. Aparatura

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Švicarska)

Mjerenja su provedena na atomsko apsorpcijskom spektrofotometru Analyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine pri parametrima koji su navedeni u Tablici 5.

Tablica 5. Parametri atomsko apsorpcijskog spektrofotometra Analyst 800

| Žarulja | žarulja sa šupljom katodom (15 mA) |
|---|---|
| valna duljina (nm) | 423 |
| gorivo (oksidans) | acetilen (zrak) |
| acetilen [tlak (Pa) : protok ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$)] | $0,9 \cdot 10^5 : 2$ |
| zrak [tlak (Pa) : protok ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$)] | $5,5 \cdot 10^5 : 17$ |
| širina pukotine (nm) | 0,7 |
| korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine | deuterijski korektor |
| Fotodetektor | |
| računalo, pisac | AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo - zaslon - pisac HP 5652 |

3.1.4. Laboratorijski pribor i posuđe za gravimetrijsku analizu

- staklene čaše od 250 mL
- staklene čaše od 500 mL
- satno stakalce
- stakleni štapić
- plastična boca štrcaljka
- Gooch lončići
- Büchnerova tikvica (boca za odsisavanje)
- vakuum sisaljka
- tarionik i pistil
- eksikator
- sušionik

3.1.5. Laboratorijski pribor i posuđe za atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju

- odmjerne tikvice od 25 mL i 50 mL sa čepovima
- staklena trbušasta pipeta
- mikropipete Rainin pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS i L-200 LTS (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- tarionik i pistil
- grubi filter papir

3.1.6. Uzorci

Analizirani su uzorci kalcija (dodatak prehrani) od dva različita proizvođača, komercijalno dostupnih na tržištu, i s različitom deklariranom količinom kalcija.

- Uzorak 1 – kalcijev karbonat: 1 šumeća tableta sadrži 267 mg kalcija
- Uzorak 2 – kalcijev karbonat: 1 tableta sadrži 200 mg kalcija

3.2. Metode

3.2.1. Priprema 2% dušične kiseline

Otopina dušične kiseline, HNO_3 , pripravljena je razrjeđivanjem 20 mL koncentrirane HNO_3 u odmjerne tikvici od 1000 mL. Najprije se u tikvicu doda dio ultračiste vode, zatim koncentrirana HNO_3 i na kraju se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Otopina se koristi za ispiranje instrumenta.

3.2.2. Priprema 1% $\text{LaNO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Otopina je pripremljena otapanjem 1,00 g LaNO_3 ultračistom vodom u tikvici volumena 100,00 mL.

3.2.3. Priprema standardnih otopina kalcija za izradu baždarnog pravca

Pripremljena je matična standardna otopina kalcija koncentracije 10 mg/L na način da se 0,5 mL komercijalno dostupne standardne otopine kalcija koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$ prenese u tikvicu od 50 mL i 0,5 mL 1% $\text{LaNO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ te nadopuni ultračistom vodom do oznake. Uloga otopine La je za sprječavanje kemijskih interferencija.

Iz pripremljene matične standardne otopine kalcija koncentracije 10 mg/L pripremljene su standardne otopine kalcija koncentracija u rasponu od 0,2 do 4 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL na način kako je prikazano u Tablici 6. Tako pripremljene standardne otopine korištene su za izradu baždarnog pravca za ispitivanje linearnosti analitičke metode.

Tablica 6. Koncentracija i priprema standardnih otopina kalcija

| Koncentracija standardne otopine kalcija (mg/L) | Priprema standardne otopine | Ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu (10 mg/L) otopinu |
|---|---|--|
| 0,2 | 0,5 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL | 50x |
| 0,5 | 1,25 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL | 20x |
| 1,0 | 2,5 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL | 10x |
| 2,0 | 5,0 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL | 5x |
| 4,0 | 10 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L + 2,50 mL 1% otopine La, nadopuni se ultračistom vodom do 25,00 mL | 2,5x |

3.2.4. Priprema uzoraka za analizu pomoću plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije (engl. *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*, FAAS)

Izvaže se 0,2 g uzorka prethodno usitnjenog i homogeno izmiješanog u tarioniku s pistilom i prebaci u čašu od 100 mL. U čašu s uzorkom se doda 20 mL koncentrirane HCl i miješa oko 1 minute. Otopina se kvantitativno prebaci u odmjernu tikvicu od 100 mL, a zatim se nadopuni tikvica s ultra čistom vodom do oznake. 20 mL ove otopine profiltrira se kroz grubi filter papir te se 5 mL otopine prebaciti u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti do oznake s ultra čistom vodom. 5 mL ovako pripremljene otopine prebaci se u odmjernu tikvicu od 50 mL, doda 1 mL otopine La 1% i nadopuni do oznake s ultra čistom vodom.

3.2.5. Metoda standardnog dodatka

Uzorcima kalcija dodane su različite, točno poznate, količine standardne otopine kalcija koncentracije 10 mg/L. U tikvicu od 50,00 mL s već pripremljenim uzorkom i otopinom La prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.4, doda se 0,1 mL standardne otopina kalcija 10 mg/L odnosno 0,2 mL standardne otopina kalcija 10 mg/L. Tikvice se nadopune ultračistom vodom do 50,00 mL.

3.2.6. Priprema uzoraka za analizu pomoću gravimetrijske metode

Za određivanje kalcija korištena je metoda homogenog taloženja pri čemu se kalcij taloži s oksalatom u lužnatoj otopini (pH vrijednost otopine važna je za selektivnost taloženja te za smanjenje topljivosti taloga) u obliku $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Uzorak se pripremio tako da se tablete usitne u tarioniku te se dobiveni prah kvantitativno prenese u staklenu čašu te otopi u 200 mL destilirane vode. 25,00 mL ovako pripremljene homogene otopine analita razrijedi se s 75 ml $0,1 \text{ molL}^{-1}$ HCl te se doda po 5 kapi metil crveno indikatora. Indikator se dodaje kako bi se pratila pH vrijednost otopine, budući da se kalcij taloži s oksalatom samo u bazičnoj otopini dok pri niskim pH vrijednostima oksalatni ion može sudjelovati u paralelnoj reakciji protoniranja pri čemu nastaje slaba kiselina. Zatim se doda 25 mL otopine amonijevog oksalata uz miješanje staklenim štapićem te 15 g uree. Otopina se pokrije satnim stakalcem te se zagrijava oko 30 minuta, dok indikator nije promijenio boju u žuto uz povremeno miješanje. Lužnati medij omogućava selektivno taloženje kalcijevog oksalata što za posljedicu ima promjenu boje metil crveno indikatora u žutu.

Prethodno se osuši Gooch lončić 1 h na $105 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega se ohladi u eksikatoru kroz 30 minuta te se izvaže. Postupak se ponavlja s 30-minutnim periodima zagrijavanja i 15-

minutnim periodima hlađenja sve dok se ne postigne konstantna masa lončića (uzastopne odvage ne smiju se razlikovati više od 0,2 - 0,3 mg).

Otopina s talogom vruća se filtrira kroz izvagani lončić pomoću sustava za odsisavanje. Preostali talog kvantitativno se prebaci iz čaše pomoću 3 mL ledeno hladne destilirane vode, a zatim se talog ispire s dva obroka od po 10 mL ledeno hladne destilirane vode. Dobiveni talog se suši u sušioniku na 105 °C 30 minuta te ohladi u eksikator kroz 15 minuta.

3.3. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti 3 mjerenja \bar{x} standardno odstupanje. Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i PrismGraphPad 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD, www.graphpad.com).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Gravimetrijsko određivanje sadržaja kalcija u dodacima prehrani metodom taloženja iz homogene otopine

Uzorci su pripremljeni prema propisu navedenom u poglavlju 3.2.4. i to u triplikatu. Iz razlike masa punih i praznih lončića izračunata je masa taloga koja je uz pomoć izračunatog GF (izraz 4) preračunata na masu samog analita što je prikazano u Tablici 7 i 8. Eksperimentalna pogreška je kod oba ispitivana uzorka bila približno 5% s tim da je kod uzorka 1 bila pozitivna pogreška dok kod uzorka 2 negativna.

$$GF = \frac{1}{1} \cdot \frac{M_{\text{CaCO}_3}}{M_{\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}} = \frac{40,08 \text{ g mol}^{-1}}{146,12 \text{ g mol}^{-1}} = 0,274 \quad (4)$$

Tablica 7. Rezultati gravimetrijskog određivanja kalcija u uzorku 1

| Uzorak 1 | | | | |
|---|------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|
| Masa praznih lončića (g) | Masa punih lončića (g) | Dobivena masa uzorka (g) | Masa Ca u 25 mL (g) | Masa Ca u 200 mL (mg) |
| 33,0735 | 33,1872 | 0,1137 | 0,03115 | 249,23 |
| 33,1256 | 33,2361 | 0,1105 | 0,03028 | 242,22 |
| 33,0098 | 33,1314 | 0,1216 | 0,0333 | 266,55 |
| Srednja vrijednost | | | | 252,66 |
| Standardna devijacija (SD) | | | | 12,52 |
| Odstupanje od deklarirane vrijednosti (%) | | | | 5,37 |

Tablica 8. Rezultati gravimetrijskog određivanja kalcija u uzorku 2

| Uzorak 2 | | | | |
|---|------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|
| Masa praznih lončića (g) | Masa punih lončića (g) | Dobivena masa uzorka (g) | Masa Ca u 25 mL (g) | Masa Ca u 200 mL (mg) |
| 32,7555 | 32,855 | 0,0995 | 0,0273 | 218,104 |
| 31,9882 | 32,0899 | 0,1107 | 0,0279 | 222,93 |
| 32,3535 | 32,4395 | 0,086 | 0,0236 | 188,51 |
| Srednja vrijednost | | | | 209,85 |
| Standardna devijacija (SD) | | | | 18,63 |
| Odstupanje od deklarirane vrijednosti (%) | | | | -4,92 |

4.2. Određivanje sadržaja kalcija u dodacima prehrani metodom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

4.2.1. Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je proces kojim se utvrđuje i dokumentira da je metoda prikladna za željenu namjenu i time se potvrđuje, visokim stupnjem sigurnosti, da će analitička metoda

davati valjane rezultate u propisanim uvjetima. Potrebno je provesti validaciju pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode, ali i u slučaju bilo kakve promjene na već validiranoj metodi. Postupci validacije postali su obvezni prema regulatornim zahtjevima dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing practices*, GMP) i dobre laboratorijske prakse (engl. *Good laboratory practice*, GLP) (Nigović i sur., 2014; Ahuja i Scypinski 2001).

4.2.2. Linearnost

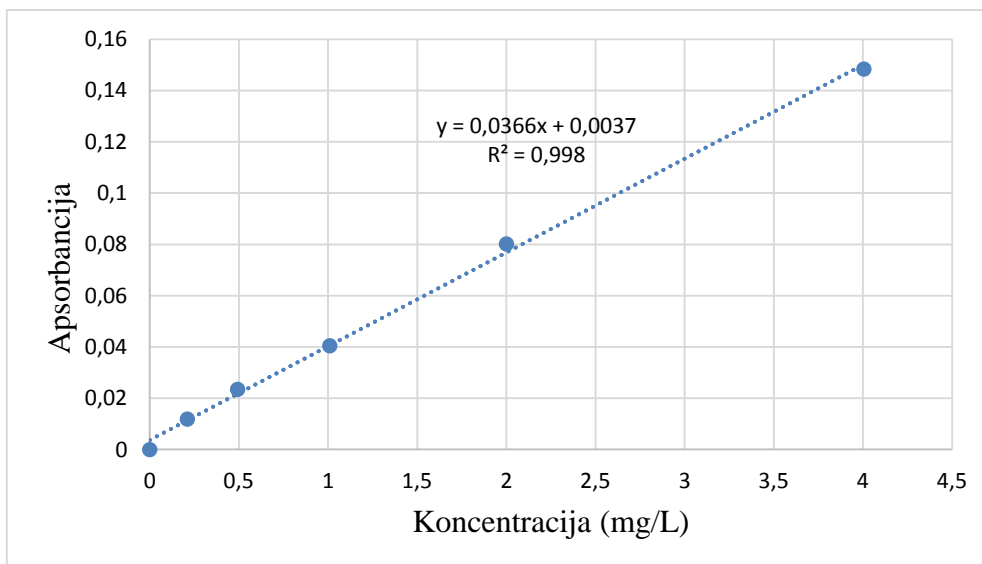
Linearnost analitičke metode je sposobnost metode da daje rezultate, unutar određenog intervala, koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost se određuje tako da se napravi koncentracijski niz otopina standarda te se izvrši tri do šest mjerenja najmanje pet različitih koncentracija. Izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca (Nigović i sur., 2014; Medić-Šarić, 2006).

Za provjeru linearnosti izrađene su otopine koncentracije 0,2 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L i 4 mg/L.

Iz dobivenih rezultata (Tablica 9, Slika 3) dobivena je jednadžba pravca $y = 0,0366x + 0,0037$ i koeficijent korelacije $R^2 = 0,998$.

Tablica 9. Izmjerene apsorbancije otopina za izradu kalibracijske krivulje

| Koncentracija standarda (mg/L) | Srednja vrijednost izmjerene koncentracije standarda (mg/L) | Analitički signal (apsorbancija) |
|--------------------------------|---|----------------------------------|
| 0,2 | 0,211 | 0,0119 |
| 0,5 | 0,493 | 0,0235 |
| 1 | 1,010 | 0,0405 |
| 2 | 2,001 | 0,0802 |
| 4 | 4,006 | 0,1484 |



Slika 3. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije standardnih otopina kalcija i apsorbancije

Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da metoda ima prihvatljivu linearnost za određivanje kalcija u uzorcima dodatka prehrani.

4.2.3. Preciznost

Preciznost analitičke metode je sposobnost da pokazuje slaganje između višestruko ponovljenog mjerenja uzoraka dobivenih višestrukim uzorkovanjem iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Postupak određivanja je izvršiti mjerenja 5 do 6 puta na 2 do 3 različite koncentracije. Preciznost pomaže utvrditi slučajne pogreške metode. Izražava se relativnom standardnom devijacijom (engl. *Relative standard deviation*, RSD, %, izraz 5):

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (5)$$

gdje je SD standardna devijacija (engl. *Standard deviation*), a \bar{x} srednja vrijednost dobivenih rezultata.

Može se izraziti kao ponovljivost (engl. *Repeatability*), srednja preciznost (engl. *Intermediate Precision*) i obnovljivost (engl. *Reproducibility*).

Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka na istom instrumentu, kod istog analitičara, korištenjem istih reagensa u istom laboratoriju u kratkom vremenskom razdoblju odnosno mjerenjem pod istim uvjetima.

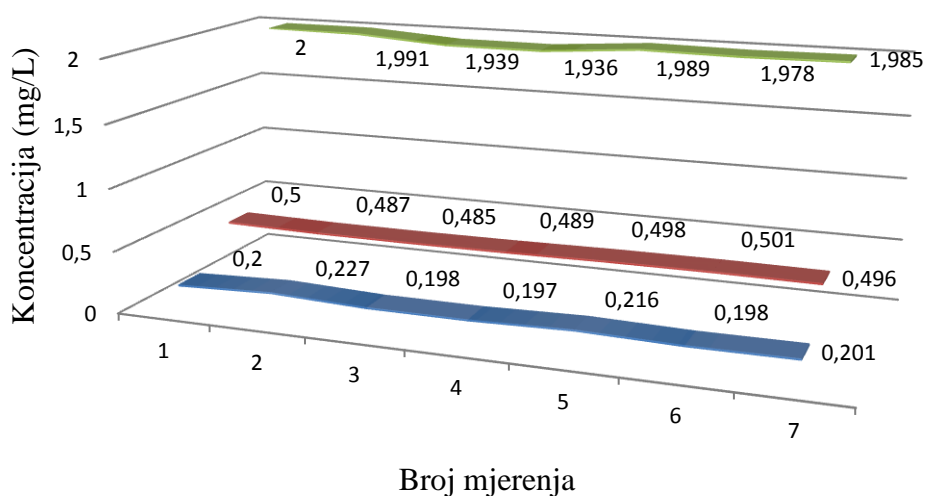
Obnovljivost označava podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem nekoliko istih uzoraka istom metodom, ali kod različitih analitičara u različitim laboratorijima i različitim

radnim uvjetima unutar specificiranih parametara metode. Obnovljivost će pokazati hoće li metoda davati iste rezultate u različitim laboratorijima (Nigović i sur., 2014).

Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 10 i grafički na Slici 4.

Tablica 10. Ponovljivost unutar jednog dana

| Koncentracija standarda (mg/L) | 0,2 | 0,5 | 2 |
|---|-------|-------|-------|
| Izmjerene koncentracije (mg/L) | 0,227 | 0,487 | 1,991 |
| | 0,198 | 0,485 | 1,939 |
| | 0,197 | 0,489 | 1,936 |
| | 0,216 | 0,498 | 1,989 |
| | 0,198 | 0,501 | 1,978 |
| | 0,201 | 0,496 | 1,985 |
| Srednja vrijednost (mg/L) | 0,206 | 0,493 | 1,970 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,012 | 0,007 | 0,025 |
| Relativna standardna devijacija (RSD %) | 6,038 | 1,326 | 1,286 |



Slika 4. Grafički prikaz ponovljivosti u danu

RSD vrijednost za koncentraciju standardne otopine od 0,5 i 2 mg/L bila je ispod 2% dok za koncentraciju standardne otopine od 0,2 mg/L 6,038%. Nešto viša RSD vrijednost kod niže koncentracije standarda može se objasniti s manjom stabilnošću same standardne otopine.

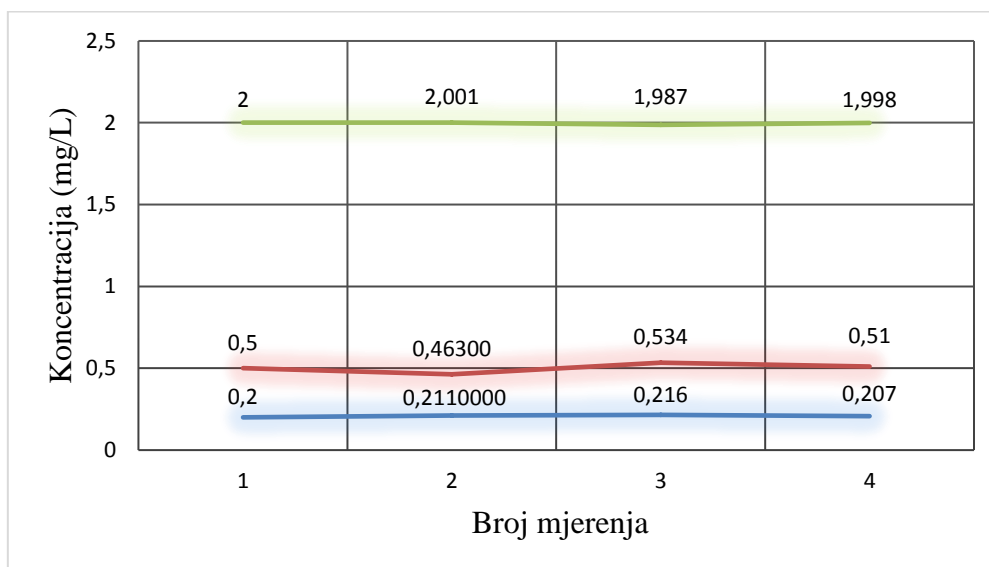
Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da se ponovljivost u danu, izražena kao RSD, nalazi unutar prihvatljivih granica što ukazuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode.

Srednja preciznost označava odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom pod različitim uvjetima. Različit je analitičar, instrument, reagensi, ali u istom laboratoriju kroz duži vremenski period. Rezultati pokazuju hoće li metoda, nakon razvoja, davati iste rezultate tijekom uporabe u laboratoriju.

Dobivene vrijednosti (Tablici 11, Slika 5) prikazane su kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom (SD) i relativnom standardnom devijacijom (RSD).

Tablica 11. Ponovljivost kroz uzastopna 3 dana

| Koncentracija standarda (mg/L) | 0,2 | 0,5 | 2 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|
| 1. dan \bar{x} (n=6) | 0,211 | 0,463 | 2,001 |
| 2. dan \bar{x} (n=6) | 0,216 | 0,534 | 1,987 |
| 3. dan \bar{x} (n=6) | 0,207 | 0,510 | 1,998 |
| Srednja vrijednost (mg/L) | 0,211 | 0,502 | 1,995 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,005 | 0,036 | 0,007 |
| RSD (%) | 2,134 | 7,190 | 0,369 |



Slika 5. Grafički prikaz ponovljivosti kroz 3 uzastopna dana

Najveća RSD vrijednost dobivena je kod standardne otopine koncentracije od 0,5 mg/L što je najvjerojatnije posljedica greške analitičara prilikom pripreme otopine.

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da metoda ima zadovoljavajuću preciznost i da je prihvatljiva za određivanje sadržaja kalcija u ispitivanim uzorcima.

4.2.4. Točnost

Točnost analitičke metode označava slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Pokazuje odstupanja od prihvaćene referentne vrijednosti (Nigović i sur., 2014). Izražava se kao analitički prinos (engl. *Recovery*, izraz 6):

$$R = \frac{\bar{X}}{X} \cdot 100 \quad (6)$$

gdje je \bar{X} srednja izmjerena vrijednost, a X stvarna vrijednost analita u uzorku.

Točnost je ispitana metodom standardnog dodatka. Najprije se odredi koncentracija kalcija u ispitivanim uzorcima. Zatim se u uzorke dodala točno određena količina standardne otopine kalcija koncentracije 10 mg/mL da bi koncentracija standardnog dodatka u jednom uzorku iznosila 0,1 mg/L, u drugom 0,2 mg/L. Ponovno je izmjerena koncentracija kalcija u svim otopinama. Analitički prinos unutar intervala 98 – 102% govori o velikoj točnosti metode.

Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa prikazane su u Tablici 12 i 13.

Tablica 12. Analitički prinos uzorka broj 1

| \bar{c} (mg/L) kalcija u uzorku + c(mg/L) standardnog dodatka | $c_{(\text{ukupno})}$ (mg/L) | $c_{(\text{izmjereno})}$ (mg/L) | $c_{(\text{dodatka})}$ (mg/L) | Analitički prinos (%) | RSD(%) |
|---|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------|
| 0,103 + 0,1 | 0,203 | 0,214 | 0,105 | 105,42 | 1,13 |
| 0,103 + 0,2 | 0,302 | 0,311 | 0,206 | 102,98 | 0,59 |

Tablica 13. Analitički prinos uzorka broj 2

| \bar{c} (mg/L) cinka u uzorku + c(mg/L) standardnog dodatka | $c_{(\text{ukupno})}$ (mg/L) | $c_{(\text{izmjereno})}$ (mg/L) | $c_{(\text{dodatka})}$ (mg/L) | Analitički prinos (%) | RSD(%) |
|---|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------|
| 0,085 + 0,1 | 0,185 | 0,192 | 0,104 | 103,78 | 1,13 |
| 0,085 + 0,2 | 0,285 | 0,277 | 0,194 | 97,19 | 0,59 |

Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da analitički prinos oba uzorka pokazuje manja odstupanja od vrijednosti prihvatljivog intervala.

4.2.5. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD, izraz 7) je najniža koncentracija analita, koja se, prema zadanim uvjetima metode, može dokazati, ali ne i odrediti.

Granica određivanja (eng. *Limit of quantitation*, LOQ, izraz 8) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim

uvjetima metode. LOD i LOQ određuju se razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD=3:1 ili 2:1, LOQ=10:1) ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a} \quad (7)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a} \quad (8)$$

gdje je σ standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib regresijskog pravca.

Određen je nagib kalibracijskog pravca $a = 0,0366$ i standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca $\sigma = 0,0037$ te su izračunati LOD i LOQ:

$$LOD = 0,0315 \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 0,0956 \text{ mg/L}$$

4.2.6. Određivanje sadržaja kalcija po tableti

Nakon što je provedena validacija metode pripremljeni su uzorci u duplikatu kako je opisano u poglavlju 3.2.4. Svaki pripremljeni uzorak mjeren je šest puta. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Izmjerene koncentracije kalcija u uzorcima

| | Uzorak 1 | Uzorak 2 |
|---------------------------|----------|----------|
| 1. mjerenje | 0,103 | 0,082 |
| 2. mjerenje | 0,104 | 0,085 |
| 3. mjerenje | 0,104 | 0,089 |
| 4. mjerenje | 0,101 | 0,079 |
| 5. mjerenje | 0,105 | 0,090 |
| 6. mjerenje | 0,099 | 0,087 |
| Srednja vrijednost (mg/L) | 0,103 | 0,085 |
| SD | 0,103 | 0,086 |
| RSD (%) | 0,102 | 0,086 |

Dobivene vrijednosti analiziranih uzoraka navedene su u Tablici 15 i uspoređene su s deklariranim vrijednostima sadržaja kalcija.

Tablica 15. Usporedba određenog i deklariranog sadržaja kalcija u uzorcima dodataka prehrani

| | Uzorak 1 (mg) | Uzorak 2 (mg) |
|---|---------------|---------------|
| 1. | 258 | 198 |
| 2. | 269 | 202 |
| 3. | 272 | 203 |
| 4. | 260 | 205 |
| 5. | 262 | 195 |
| 6. | 255 | 203 |
| Srednja vrijednost | 262,67 | 201 |
| Standardna devijacija (SD) | 6,56 | 3,74 |
| RSD (%) | 2,5 | 1,86 |
| Odstupanje od deklarirane vrijednosti (%) | 1,62 | -0,5 |

Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da je odstupanje od deklarirane vrijednosti minimalno.

5. Zaključci

Cilj ovog rada bio je usporedba dvije analitičke metode u svrhu određivanja sadržaja kalcija u uzorcima dodataka prehrani. Na temelju provedenog ispitivanja, usporedbom svih koraka analize kao i dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- Obje metode pokazale su se vrlo točnima i preciznima.
- Gravimetrijska metoda je primjerena za jednostavnije uzorke, zahtjeva jednostavan, pouzdan pribor koji se lako održava, što dovodi do toga da osjetljivost i točnost nisu ograničene instrumentima, ali ovise o postupku izdvajanja analita i vaganja. Nedostatak gravimetrijske metode je dugotrajnost postupka i manja specifičnost od drugih metoda.
- Provedenim istraživanjem FAAS metoda se pokazala jednostavnijom, bržom i osjetljivijom metodom – naročito za veći broj uzoraka, ali sama analiza zahtijeva veće troškove jer za svoj rad koristi skuplji instrument, plinove, standarde i dr.
- Niske dobivene RSD vrijednosti upućuju na zadovoljavajuću ponovljivost određivanja koncentracije kalcija plamenom tehnikom.
- Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te vrijednosti za točnost provedene metode, plamena tehnika se može smatrati prikladnom za određivanje kalcija u uzorcima dodataka prehrani.

6. Literatura

Atomic absorption spectroscopy, 2016, <http://rxpharmaworld.blogspot.com>, pristupljeno 08.06.2021.

Abdelrahman M. Steps of Gravimetric Analysis and different between post presiptation and Eclusion, *ResearchGate*, 2020.

Berdanier CD. Advanced Nutrition: Micronutrients, CRC Press, Boca Raton, 1998, str. 172-186.

Cormick G, Ciapponi A, Cafferata M, Belizán JM. Calcium supplementation for prevention of primary hypertension. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2015, Issue 6. Art. No.: CD010037.

Crowther JB. Validation of Pharmaceutical Test Methods. U: Handbook of modern pharmaceutical analysis, Ahuja S, Scypinski S, urednici, San Diego, Academic Press, 2001, str. 415-419.

Flame Atomic Absorption Spectrometry, <http://chemicalinstrumentation.weebly.com>, pristupljeno 08.06.2021.

Generalić E, Krka S. Analitička kemija vježbe. Split, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011, str. 30-35.

Hage DS, Carr JD. Analytical chemistry and quantitative analysis. Boston, Prentice Hall, 2011, str. 259-283.

Hall JE, Guyton AC. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2011, str. 980-983.

Hanusa TP. Calcium. *Encyclopedia Britannica*. 2019, <https://www.britannica.com>, pristupljeno 12.06.2021.

Harris DC. Quantitative Chemical Analysis, 8. izd., W. H. Freeman and CO., New York, 2010, str. 1-4, 146-157, 380-387, 751-754, 771-781.

Harvey D. Modern Analytical Chemistry. Boston, McGraw-Hill, 2000, str. 2-6, 9, 38, 232-249, 273-275, 354.

Higson S. Analytical Chemistry. New York, Oxford University Press Inc., 2006, str. 5.

Kalcij, <https://definicijahrane.hr>, pristupljeno 16.06.2021.

Kalcij pod povećalom, 2021, <http://www.vitamini.hr>, pristupljeno 12.06.2021.

Kotra V, Alekhya G, Surapaneni R, Hima Tejaswini N, Sireesha V. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy. *J Res Pharm Pract*, 2012, 1, 16-19.

Kroner, Z. Calcium. U: Vitamins and Minerals. Greenwood, Santa Barbara, 2011, str. 37-48.

Luterotti S, Bićanić D. Odabrane teme iz bioanalitike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2013, str. 4-9.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2011, str. 1-5, 17-26.

Medić-Šarić M, Jasprica I, Debeljak Ž. Uvod u validaciju metoda analize lijekova. *Farm glas*, 2006, 62, 1-7.

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

Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 39, (NN/160/2013).

Radić NJ, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb, Školska knjiga, 2016, str. 492-533.

Skoog D, West D, Holler J. Prevodilac: Kujundžić N., Živčić-Alegretti V., Živković A. Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, 1999, str. 1-5, 60-84.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Crouch S. R. Fundamentals of Analytical Chemistry, 7th ed., Saunders College publishing, 1996, str.71-97.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone. 1999, str. 125-130.

Webb GP. Dietary Supplements and Functional Foods. London, Blackwell Publishing, 2006, str. 1-3, 8-9, 86-90.

WHO, Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition, Second Edition, World Health Organisation and Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Geneva, 2004, str. 1-10, 59-85.

7. Sažetak

Kalcij je esencijalni makronutrijent važan za normalno funkcioniranje mnogih procesa u ljudskom organizmu. Nedostatak kalcija u organizmu nadomješta se dodacima prehrani.

Kao uzorci za usporedbu dviju analitičkih metoda i određivanje sadržaja kalcija poslužili su dodaci prehrani dvaju različitih proizvođača.

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti klasičnu – gravimetrijsku i instrumentalnu – FAAS metodu u svrhu određivanja sadržaja kalcija u dodacima prehrani. Obje metode su visoke točnosti i preciznosti. Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije kalcija plamenom tehnikom koja se pokazala kao jednostavnija i brža metoda naročito za veći broj uzoraka. Niske dobivene RSD vrijednosti upućuju na zadovoljavajuću ponovljivost određivanja koncentracije kalcija plamenom tehnikom. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te vrijednosti za točnost provedene metode, plamena tehnika se može smatrati prikladnom za određivanje kalcija u uzorcima dodataka prehrani te u usporedbi s klasičnom gravimetrijskom metodom i metodom izbora.

Summary

Calcium is an essential macronutrient that is important for the normal functioning of many processes in the human body. A deficiency of calcium in the body is compensated for dietary supplements.

Dietary supplements from two different manufacturers served as samples to compare the two methods of analysis and determine the calcium content.

The aim of this work was to compare the classical - gravimetric and the instrumental - FAAS method for the determination of calcium content in food supplements. Both methods are characterised by high accuracy and precision. The study showed the advantages of the determination of calcium concentration by FAAS, which proved to be an easier and faster method, especially with a larger number of samples. The obtained low RSD values indicate a satisfactory repeatability of the determination of calcium concentration by the flame technique. Based on the obtained LOD and LOQ values and the values for the accuracy of the performed method, FAAS can be considered suitable for the determination of calcium in samples of food supplements and the method of choice compared to the classical gravimetric method.

8. Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Usporedba klasične i instrumentalne analitičke metode za određivanje sadržaja kalcija u uzorcima dodataka prehrani

Sanja Ursula Herega

SAŽETAK

Kalcij je esencijalni makronutrijent važan za normalno funkcioniranje mnogih procesa u ljudskom organizmu. Nedostatak kalcija u organizmu nadomješta se dodacima prehrani.

Kao uzorci za usporedbu dviju analitičkih metoda i određivanje sadržaja kalcija poslužili su dodaci prehrani dvaju različitih proizvođača.

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti klasičnu – gravimetrijsku i instrumentalnu – FAAS metodu u svrhu određivanja sadržaja kalcija u dodacima prehrani. Obje metode su visoke točnosti i preciznosti. Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije kalcija plamenom tehnikom koja se pokazala kao jednostavnija i brža metoda naročito za veći broj uzoraka. Niske dobivene RSD vrijednosti upućuju na zadovoljavajuću ponovljivost određivanja koncentracije kalcija plamenom tehnikom. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te vrijednosti za točnost provedene metode, plamena tehnika se može smatrati prikladnom za određivanje kalcija u uzorcima dodataka prehrani te u usporedbi s klasičnom gravimetrijskom metodom i metodom izbora.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 5 grafičkih prikaza, 15 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: gravimetrija, atomska apsorpcijska spektrofotometrija, kalcij, dodaci prehrani, validacija

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

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Doc dr. sc. Maja Bival Štefan, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

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

Comparison of classical and instrumental analytical methods for determination of calcium content in samples of food supplements

Sanja Ursula Herega

SUMMARY

Calcium is an essential macronutrient that is important for the normal functioning of many processes in the human body. A deficiency of calcium in the body is compensated for dietary supplements.

Dietary supplements from two different manufacturers served as samples to compare the two methods of analysis and determine the calcium content.

The aim of this work was to compare the classical - gravimetric and the instrumental - FAAS method for the determination of calcium content in food supplements. Both methods are characterised by high accuracy and precision. The study showed the advantages of the determination of calcium concentration by FAAS, which proved to be an easier and faster method, especially with a larger number of samples. The obtained low RSD values indicate a satisfactory repeatability of the determination of calcium concentration by the flame technique. Based on the obtained LOD and LOQ values and the values for the accuracy of the performed method, FAAS can be considered suitable for the determination of calcium in samples of food supplements and the method of choice compared to the classical gravimetric method.

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

Thesis includes: 31 pages, 5 figures, 15 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: gravimetric, atomic absorption spectrometry, calcium, dietary supplements, validation.

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

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.