

Određivanje bakra plamenom atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom u uzorcima dodataka prehrani

Perkov, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:587316>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

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



Josip Perkov

**Određivanje bakra plamenom atomskom
apsorpcijskom spektrofotometrijom u uzorcima
dodataka prehrani**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018. godina

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

Najveće hvala mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan na susretljivosti, razumijevanju, strpljenju, ugodnoj atmosferi i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela i pisanju ovog diplomskog rada.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji, majci i sestrama, koje su mi davale utjehu u teškim trenucima, podržavale me i vjerovala u mene onda kad ni ja u sebe nisam.

Veliko hvala djevojci Luciji na strpljenju dok je proživljavala sa mnom sve moje uspone i padove i pritom bila bezuvjetna potpora.

Zahvaljujem se najjačem cimeru Nikici na svakodnevnom "power" motiviranju, podršci i 5 nezaboravnih godina druženja.

Veliko hvala mom doturu Niki na podršci i razumijevanju svih ovih godina.

Hvala asevima Marcu i Zvoni na svim druženjima, materijalima, kavama i urlanjima zadnjih 5 godina.

Hvala Rođaku na pomoći, dobroj atmosferi pri izradi diplomskog i svim motivacijskim govorima.

Hvala ekipi s Biologije Ivi, Dori, Tanji, Juranu i svima ostalima na druženjima, spizi i slušanju.

Na kraju hvala svim prijateljima i kolegama koji su bili dio ovog razdoblja.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Uloga bakra u organizmu	2
1.2. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija	4
1.2.1. Uloga atomske apsorpcijske spektrofotometrije	4
1.2.2. Načelo atomske apsorpcijske spektroskopije	4
1.2.3. Atomska apsorpcijski spektrofotometar	5
1.2.4. Kvantitativna analiza AAS-om.....	6
1.3. Validacija analitičke metode	7
1.3.1. Preciznost	8
1.3.2. Selektivnost/Specifičnost	8
1.3.3. Linearnost.....	8
1.3.4. Radno područje	9
1.3.5. Točnost	9
1.3.6. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	9
1.3.7. Otpornost	10
2.OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Laboratorijski pribor i posuđe	14
3.1.3. Aparatura.....	15
3.2. Metode	15
3.2.1. Princip metode	15
3.2.2. Priprema otopina.....	16
3.2.3. Priprema otopina uzoraka	17
3.2.4. Postupak određivanja koncentracija bakra	18
3.2.5. Statistička analiza	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Validacija analitičke metode	20
4.1.1. Preciznost	20
4.1.2. Linearnost	22
4.1.3. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	23

4.2. Primjena metode u određivanju bakra u uzorcima	24
5. ZAKLJUČAK.....	28
6. LITERATURA	30
7.SAŽETAK / SUMMARY	33
8.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/	1
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Uloga bakra u organizmu

Bakar je jedan od esencijalnih elemenata u ljudskom organizmu kojeg nalazimo u količini od 100 mg (Yanet i sur., 2005). Nalazi se u cijelom tijelu, ali koncentriran je u organima sa visokom metaboličkom aktivnošću, kao što su jetra, bubrezi, mozak i srce. Taj prijelazni metal je kofaktor različitih enzima, među kojima je najvažniji ceruloplazmin čija je oksidativna aktivnost ovisna o bakru (Prashanth i sur., 2015; Berkow i sur., 2008). Bakar ima ulogu u različitim biološkim procesima kao što su antioksidativna zaštita, prevođenje željeza u aktivni ferri oblik, sinteza adrenalina, razvoj embrija, formiranje vezivnog tkiva, zarastanje rana, rast novih krvnih žila, razvoj stanica imunološkog sustava, kontrola tjelesne temperature i funkcija neurona (Bost i sur., 2016; Prashant i sur., 2015; Pizent i sur., 1998; Taylor, 1996).

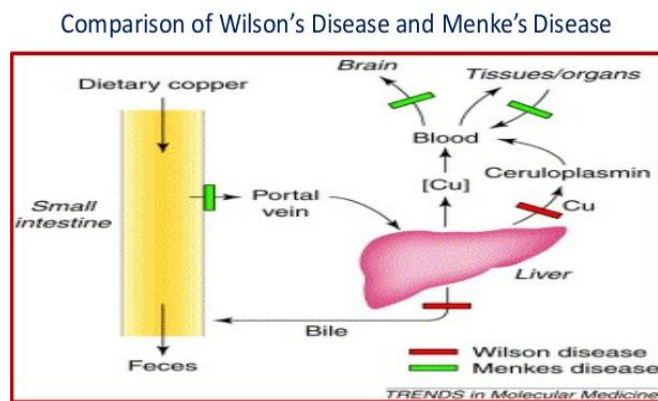
Prema preporuci Svjetske Zdravstvene Organizacije (World Health Organization, WHO) dnevno je potrebno unijeti od 1-3 mg bakra u organizam kako bi se spriječio deficit, ali ta količina varira ovisno o dobi. Veće količine, oko 1,5 mg se preporučaju kod trudnica i dojilja, a kod djece do 18 godina se preporuča unos od 0,4 do 1 mg. Namirnice kojima se osigurava unos bakra su žitarice, orašasti plodovi, meso (jetra i bubreg), mahunarke i tamna čokolada (Bost i sur., 2016; Prashanth i sur., 2015; WHO 2004; Taylor, 1996).

Deficit bakra povezan je s pojavom anemije, neutropenije, Menkesove, Alzheimerove bolesti, osteoporoze, raka, ali i sa neurološkim poremećajima pa je homeostaza bakra izrazito važna za organizam. U homeostazu su uključeni bakar transportirajuće P-tip ATP-aze, Wilsonov, Menkesov protein, te chaperoni bakra (Berkow i sur., 2008; Wang i sur., 2006). Mutacija Cu transportera P-tip ATP-aze dovodi do smanjenih serumskih koncentracija bakra i Menkesovog sindroma, X-vezane recesivne bolesti, čiji simptomi su vunasta kosa i duševna zaostalost. Terapija uključuje subkutane injekcije bakra. Djeca koja ne primaju terapiju, a oboljela su od te bolesti često ne dožive dob od 3 godine (de Bie i sur., 2007).

Međutim, pretjerani unos bakra dovodi do Fentonove reakcije koja uključuje oksidaciju lipida i proteina i staničnu smrt (Mobarhan i sur., 2005). Akutno trovanje bakrom je rijetko te se događa kod ingestije bakrova sulfata ili nitrata te dovodi do vrtoglavice, mučnine, povraćanja i dijareje. Kronično trovanje dovodi do oštećenja jetre i neuroloških poremećaja (Berkow i sur., 2008; Taylor 1996).

Wilsonova bolest, jedan od uzroka visokih vrijednosti bakra u organizmu, se javlja kao posljedica mutacije Cu-ATP-aze ATP7B gena na kromosomu 13. Bolest dovodi do smanjenog vezanja bakra na ceruloplazmin i smanjenog izlučivanja viška bakra putem jetre,

što uzrokuje nakupljanje bakra u jetri, mozgu, očima i drugim tkivima. Nakupljeni bakar u rožnici stvara zlatne ili zelenkasto zlatne Kayser-Fleischerove prstenove koji su važni u dijagnostici (Berkow i sur., 2008; Yanet i sur., 2005). Simptomi koji se rano uočavaju su otežan govor, salivacija, tremor ruku, ali dolazi i do kroničnog aktivnog hepatitisa, ciroze i ascitesa. Kasniji simptomi su distonija, ukočenost i epileptički napadaji tipa grand mal. Simptome je važno prepoznati jer je bolest smrtonosna ako se ne dijagnosticira i ne liječi na vrijeme. Liječenje se provodi kelirajućim sredstvima, penicilaminom i trienom, koji povećavaju izlučivanje mokraćom (de Bie i sur., 2007).



Slika 1. Patofiziologija Menkes i Wilsonove bolesti (preuzeto i prilagođeno sa www.hubpp.mef.hr, pristupljeno 18.9.2018).

1.2. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija

1.2.1. Uloga atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) je važna analitička tehnika koja se koristi za određivanje koncentracije elemenata u uzorku, a temelji na apsorpciji zračenja od strane slobodnih atoma u plinovitom stanju. To je široko primjenjivana tehnika s obzirom da je relativno jeftina, brza i zahtijeva kratko obrazovanje stručnjaka za rukovanje instrumentom. Nedostatak metode je što je za analizu svakog metala potrebna katoda izrađena od tog istog elementa (Kotra i sur., 2012; Harris, 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

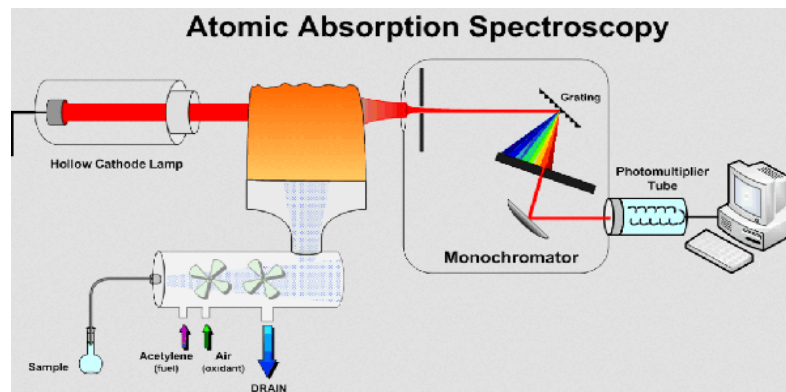
Metoda se primjenjivala u prošlosti za određivanje tetraetilolova kao polutanta u gorivu, a danas u analizi tragova metala u medicini, toksikološkim ispitivanjima, forenzičkoj patologiji, praćenju zagađenja okoliša olovom i živom, analizi hrane, vode za piće, analiza minerala u dodacima prehrani. S obzirom da se brojni metali koriste kao katalizatori u proizvodnji lijekova jako je važna primjena i u analitici lijekova gdje se koristi u određivanju granične vrijednosti metala u gotovim lijekovima, ali i u analizi spremnika (Parker i sur., 1967; White, 2003).

1.2.2. Načelo atomske apsorpcijske spektroskopije

Tehnika se zasniva na činjenici da atomi svih elemenata u osnovnom stanju imaju specifičnu elektronsku konfiguraciju koja se naziva osnovno stanje. Atomi u plinovitom i osnovnom stanju imaju sposobnost apsorpcije zračenja određene energije koja omogućava prijelaz elektrona na neku od viših razina pobuđenog stanja. Povratkom elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje dolazi do emisije zračenja specifične valne duljine, koja odgovara razlici energija jednog od dozvoljenih prijelaza u atomu (Harris, 2010; Sardans i sur., 2009; White, 2003; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

1.2.3. Atomsko apsorpcijski spektrofotometar

Glavni dijelovi atomsko apsorpcijskog spektrofotometra su: izvor zračenja, ćelija s uzorkom, monokromator, detektor i sustav za obradu podataka.



Slika 2. Atomsko apsorpcijski spektrofotometar (preuzeto i prilagođeno sa www.quora.com, pristupljeno 18.9.2018.)

Izvor zračenja je šuplja katodna žarulja čija je katoda presvučena metalom koji se analizira. Atomi metala u toj katodi se naponom pobude i emitiraju zračenje povratkom u osnovno stanje. Emitirano zračenje je jednake energije onom zračenju koje će apsorbirati atomi metala u plamenu. Postoje i katodne žarulje napravljene od legura više metala, ali samo određene kombinacije metala funkcioniraju (Soylak i sur., 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

Iz ćelije s uzorkom uzorak se atomizira djelovanjem generatora atomske pare. Prvi korišteni generator atomske pare bio je plamen koji uzrokuje isparavanje otapala ostavljajući kristale metalne soli. Naposljetku, metalni ioni se prevode u slobodne atome. Plamen zahtijeva i gorivo i oksidans, a najčešće upotrebljavane kombinacije su zrak-acetilen ili dušikov oksid-acetilen, ovisno o temperaturi koja je potrebna za atomizaciju. Zrak-acetilen osigurava temperaturu od 2400 °C, a dušikov oksid-acetilen temperaturu od 2800 °C (Skoog i sur., 1999; Watson 1999).

Danas su u upotrebi i drugi generatori atomske pare. Jedan od tih je grafitna peć (elektrotoplinski atomizator) koja osigurava bolju osjetljivost i jedna je od najosjetljivijih tehnika za određivanje tragova metala. Monokromator eliminira zračenje drugih komponenti uzorka i plamena i izolira zračenje željene valne duljine koje registrira detektor. Detektor je obično fotomultiplicirajuća cijev koja ovisno o intenzitetu svjetlosti stvara električnu struju.

Sustav za obradu podataka struju pretvara u signal koji može obradom i validacijom metode biti izražen kao koncentracija (Beaty i Kerber, 1993).

1.2.4. Kvantitativna analiza AAS-om

Svjetlost početnog intenziteta I_0 usmjerena u plamen u kojem se nalaze atomi u osnovnom stanju. Prolaskom svjetla kroz plamen intenzitet svjetla je umanjen za iznos koji ovisi o koncentraciji atoma u plamenu.

Količina apsorbiranog svjetla se odredi usporedbom početnog intenziteta I_0 i intenziteta svjetlosti nakon prolaska kroz plamen I (Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

Transmitancija je definirana kao:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

ili u postotku

$$T = 100\% \cdot \frac{I}{I_0}$$

Apsorbancija je definirana kao:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \text{ ili kao } A = 100 - T(\%).$$

Najprikladniji termin za karakterizaciju apsorbiranog svjetla je apsorbancija, budući da je linearno proporcionalna koncentraciji prema Beer – Lambertovom zakonu:

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

gdje je (A -apsorbancija, ε -koeficijent apsorpcije, c - koncentracija i l -duljina puta svjetlosti koji presijeca analit u ćeliji) (Beaty i Kerber, 1993).

1.3. Validacija analitičke metode

Validacija analitičkog postupka je proces u kojem se dokumentira i utvrđuje prikladnost ispitivanog postupka za određenu primjenu. Validacija osigurava da će se u propisanim uvjetima primjenom validirane metode dobiti valjani rezultati. Potrebno ju je provesti pri razvoju i uvođenju nove metode, ali i kod promjene bilo kojeg dijela već postojećemetode. Parametri koji se ispituju u postupku validacije su: točnost, preciznost, selektivnost/specifičnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost, radno područje i izdržljivost (Olmedo i sur., 2009).

Ovisno o namjeni analitičke metode ispituju se određeni parametri. Ako je metodanamijenjena za određivanje sadržaja tada se ispituju točnost, preciznost, selektivnost/specifičnost, linearnost te radno područje (Nigović i sur., 2014; Peters i sur., 2002).

1.3.1. Preciznost

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Može se iskazati kao ponovljivost (engl. *Repeatability*) i odnosi se na podudaranje rezultata dobivenih istom metodom u istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu (isti analitičar, isti instrument, isti laboratorij). Srednja preciznost (engl. *Intermediate precision*) govori o odstupanju rezultata dobivenih u različitim uvjetima (isti laboratorij, ali različiti dan, analitičar, instrument). Obnovljivost (engl. *Reproducibility*) podrazumijeva odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Preciznost se izražava statističkim veličinama kao što su standardna devijacija, relativna standardna devijacija (RSD %). Preciznost se ispituje kroz najmanje 5-6 određivanja uz upotrebu 2-3 različite koncentracije (Nigović i sur., 2014).

1.3.2. Selektivnost/Specifičnost

Specifičnost je sposobnost metode da razlikuje samo jednu komponentu od svih preostalih u uzorku. To je vrlo rijedak slučaj pa se češće koristi termin selektivnost koji podrazumijeva sposobnost metode da u uzorku odredi analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka kao što su matrica uzorka, raspadnuti produkti, onečišćenja i pomoćne tvari. Ispitivanja se provode dodavanjem pomoćnih tvari ili onečišćenja čistoj tvari koja se potom analizira (Nigović i sur., 2014).

1.3.3. Linearnost

Linearnost podrazumijeva sposobnost metode da u određenom području daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Ispituje se kroz 3-6 mjerenja primjenom najmanje 5 različitih koncentracija. Grafički prikaz izmjerenih analitičkih signala u ovisnosti o koncentraciji analita daje kalibracijski pravac. Izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca ($k > 0,999$) (Nigović i sur., 2014).

1.3.4. Radno područje

Radno područje metode predstavlja raspon između gornje i donje koncentracije analita, uključujući i granične vrijednosti, unutar kojeg ispitivana analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost (Nigović i sur., 2014).

1.3.5. Točnost

Točnost metode govori o slaganju srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Utvrđuje se na način da se provedu najmanje 3 mjerenja uzorka za najmanje 3 koncentracije unutar radnog područja. Odstupanje od stvarne vrijednosti se izražava kao analitički prinos (engl. *Recovery*) :

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

gdje je χ srednja izmjerena vrijednost analita, a x stvarna vrijednost (Nigović i sur., 2014).

1.3.6. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, u zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (engl. *Limit of quantitation*, LOQ) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću u propisanim uvjetima. Određuje se razrijeđenjem ispitivane otopine i predstavlja omjer signala i šuma (LOD=3:1 ili 2:1, a LOQ=10:1) ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca.

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

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

gdje je σ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, odnosno standardno odstupanje regresijskog pravca ili standardno odstupanje y -

odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

1.3.7. Otpornost

Otpornost metode (engl. *Robustness*) je mjera sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih, promjena parametara metode. Ovaj parametar je indikator pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine normalne primjene kada se uvjeti rada realno mogu promijeniti. Definira se promjenom jednog parametra dok ostali ostaju nepromijenjeni (Nigović i sur., 2014).

2.OBRAZLOŽENJE TEME

Bakar je jedan od esencijalnih elemenata za ljudski organizam. Taj prijelazni metal je kofaktor različitih enzima, među kojima je najvažniji ceruloplazmin čija je oksidativna aktivnost ovisna o bakru. Bakar ima ulogu u različitim biološkim procesima kao što su antioksidativna zaštita, prevođenje željeza u aktivni ferični oblik, sinteza adrenalina, razvoj embrija, formiranje vezivnog tkiva, zarastanje rana, rast novih krvnih žila, razvoj stanica imunološkog sustava, kontrola tjelesne temperature i funkcija neurona pa je homeostaza bakra izrazito važna (Bost i sur., 2016; Berkow i sur., 2008).

Prema preporuci Svjetske Zdravstvene Organizacije dnevno je potrebno unijeti od 1-3 mg bakra u organizam kako bi se spriječio deficit, ali ta količina varira ovisno o dobi. Veće količine, oko 1,5 mg se preporučaju kod trudnica i dojilja, a kod djece do 18 godina se preporuča unos od 0,4 do 1 mg. (Bost i sur., 2016; WHO, 2004).

Manjak unosa bakra dovodi do niske serumske razine bakra, a posljedično i do umora kod ljudi. Posljedice deficita bakra su anemija, leukopenija, neutropenija i osteoporoza. Pojavljuju se i mala točkasta krvarenja u koži i arterijske aneurizme.

Adekvatan unos bakra potrebno je osigurati unosom hrane koja je bogata tim mineralom (meso, mahunarke, tamna čokolada i orašasti plodovi) i po potrebi dodacima prehrani koji sadržavaju bakar (Bost i sur., 2016; WHO, 2004).

Svrha ovog diplomskog rada je korištenjem atomske apsorpcijske spektrofotometrije i validiranjem postojeće metode odrediti sadržaj bakra u dodacima prehrani. Prvi cilj ovog rada bio je validirati metodu za određivanje bakra ispitivanjem validacijskih parametara (točnost, preciznost, linearnost i radno područje). Drugi cilj rada bio je korištenjem validirane metode odrediti sadržaj bakra u dodacima prehrani i provjeriti podudaranje rezultata istraživanja sa deklariranim podacima na pakiranju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- 65 % HNO₃(Kemika, Zagreb)
- 7,9 M HNO₃
- 0,16 M HNO₃
- 5 % HNO₃
- 2 % HNO₃
- Cu standard za AASkoncentracije 1000 mg/L(SigmaAldrich, Njemačka)
- ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm⁻¹)

Korištene kemikalije su bile *pro analysi*čistoće.

3.1.2. Laboratorijski pribor i posuđe

- tarionik s pistilom
- plastična kartica za kvantitativan prijenos
- lijevak
- metalni stalak, mufa, držač za lijevak
- filter papir
- laboratorijska čaša volumena 500 mL
- odmjerne tikvice volumena 1000 mL, 500 mL, 20 mL, 10 mL
- plastični stalak za epruvete
- hladnjak za pohranu uzoraka i standarda
- automatske mikropipete volumena
5-50 μL, 50-200 μL, 200-1000 μL, 1000-10 000 μL
- graduirana pipeta
- magnetski mješač

3.1.3. Aparatura

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

- Žarulja: žarulja sa šupljom katodom (15mA)
- Valna duljina (nm): 324,8
- Gorivo / oksidans: acetilen / zrak
- Acetilen (tlak (Pa) /protok ($\text{dm}^3\text{min}^{-1}$)): $0,9 \times 10^5 / 2$
- Zrak (tlak (Pa) /protok ($\text{dm}^3\text{min}^{-1}$)): $5,5 \times 10^5 / 17$
- Širina pukotine (nm): 0,7
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Fotodetektor
- Računalo, printer: AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo+monitor+printer HP 5652

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode

Koncentracija bakra određivala se mjerenjem apsorpcije uzorka raspršenog u smjesi acetilena i zraka te otparenog u plamenu pri čemu dolazi do atomizacije. Atomi u plinovitom osnovnom stanju apsorbiraju zračenje valne duljine 342,8 nm te se mjeri promjena intenziteta zračenja (White, 2003).

3.2.2. Priprema otopina

- 7,9 M HNO₃

7,9 M HNO₃ je pripravljena razrjeđenjem 273,55 mL 65% HNO₃ u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 500,00 mL ultračistom vodom. Dobivena otopina se koristila za otapanje šumećih tableta ili tableta ispitivanih dodataka prehrani (White, 2003).

- 0,16 M HNO₃

0,16 M HNO₃ je pripravljena razrjeđenjem 11,08 mL 65% HNO₃ u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 1000,00 mL ultračistom vodom. Dobivena otopina je korištena za ispiranje filter papira i za pripremu otopina šumećih tableta ili tableta ispitivanih dodataka prehrani (White, 2003).

- 5% HNO₃

5% HNO₃ je dobivena razrjeđenjem 76,93 mL 65% HNO₃ u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 1000,00 mL ultračistom vodom. Dobivena otopina je korištena za ispiranje svog posuda prije korištenja u ovom eksperimentu.

- 2% HNO₃

2% HNO₃ je dobivena razrjeđenjem 15,38 mL 65% HNO₃ u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 500,00 mL ultračistom vodom. Dobivena otopina je korištena za ispiranje plamenog atomizatora.

Standardne otopine bakra

Komercijalno nabavljena standardna otopina bakra koncentracije 1000 ppm je korištena za izradu matične standardne otopine bakra koncentracije 100 ppm i volumena 10,00mL. Dobivena je razrjeđenjem 1,0 mL matične standardne otopine koncentracije 1000 ppm u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 10,00 mL ultračistom vodom (White, 2003).

Matična standardna otopina bakra koncentracije 100 ppm je korištena u izradi standardnih otopina koje su se koristile za izradu kalibracijskog pravca. Te otopine su pripremljene kako je prikazano u tablici 1:

Tablica 1: koncentracije i priprema standardnih otopina

Koncentracije standarda za izradu kalibracijskog pravca (ppm)	Volumen standardne otopine bakra koncentracije 100 ppm (mL)	Volumen dodane vode (mL)	Ukupan volumen otopine standarda (mL)	Razrijeđenje u odnosu na matičnu otopinu (100 ppm)
1	0,1	9,9	10	100 X
2	0,2	9,8	10	50 X
5	0,5	9,5	10	20 X
10	1	9	10	10 X
20	2	8	10	5 X

3.2.3. Priprema otopina uzoraka

Uzorci su sakupljeni tijekom 2017. godine i bili su pohranjeni na sobnoj temperaturi. Analizirani su dodaci prehrani 4 različita proizvođača. Šumeća tableta ili tableta svakog ispitivanog dodatka prehrani se najprije usitni u tarionikus pistilom. Idući korak je kvantitativno prenošenje uzorka plastičnom karticom u čašu. U čašu s usitnjenim uzorkom za analizu se doda 20 mL 7,9 M HNO₃, promiješa na magnetskoj miješalici i ostavi da stoji 5 minuta. Potom se otopina filtrira preko filter papira u odmjernu tikvicu volumena 100,00mL. Slijedi ispiranje čaše s 2 puta po 20 mL 0,16 M HNO₃, ispiranje filter papira i nadopunjavanje s 0,16 M HNO₃ do oznake na odmjernoj tikvici.

Dobivene otopine uzorka se razrijede 10 x u odmjernoj tikvici volumena 10,00mL. Razrijeđene otopine se izrade tako da se 1 mL pripravljene otopine uzorka razrijedi ultračistom vodom u odmjernoj tikvici volumena 10,00mL. Sve pripremljene otopine uzoraka se označe i čuvaju u hladnjaku (White, 2003).

Za svaki od 4 uzorka dodatka prehrani potrebno je prethodno opisani proces ponoviti 2 puta pri čemu se dobije 8 različitih otopina uzoraka za analizu.

3.2.4. Postupak određivanja koncentracija bakra

Postupku određivanja prethodi podešavanje instrumenta za mjerenje (položaj plamena), ispiranje plamenog atomizatora 2 % HNO₃ i naposljetku vodom. Pripremljene otopine standarda se analiziraju atomskim apsorpcijskim spektrometrom svaki radni dan prije početka određivanja koncentracije bakra u uzorcima.

Tako se dobiva kalibracijski pravac, koji je važan u određivanju koncentracije bakra u uzorcima, ali se i ispituju validacijski parametri kao što su točnost, preciznost (ponovljivost unutar jednog dana i ponovljivost u 3 dana), linearnost i granica dokazivanja. Pripremljene otopine uzorka se mjere uranjanjem plastične cjevčice koja automatski uzima otopinu uzorka.

Otopine uzorka se mjere 3 puta budući da instrument ima mogućnost višestruke analize istog uzorka u kratkom vremenu. Koncentracija bakra praćena je mjerenjem apsorbanacije pri valnoj duljini od 324,8 nm. Koncentracija bakra u uzorku izračunata je pomoću programskog paketa koji za račun koristi dobiveni kalibracijski pravac.

3.2.5. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2016 programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 7* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com*). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija šest određivanja. Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Sva zaključivanja u radu provedena su uz razinu značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija analitičke metode

Određivanje bakra u 4 različita dodatka prehrani provedeno je korištenjem postojeće metode plamenom tehnikom atomizacije na atomsko apsorpcijskom spektrofotometru Aanalyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD). Metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije: preciznost (ponovljivost unutar jednog dana i ponovljivost između dana), linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja.

4.1.1. Preciznost

Preciznost se ispitivala provođenjem 6 mjerenja za 3 različite koncentracije i može se iskazati kao ponovljivost, što podrazumijeva kratko vremensko razdoblje unutar dana, i kao srednja preciznost što podrazumijeva ponovljivost između dana. Izražava se vrijednostima kao što su SD i RSD. Rezultati su prikazani u Tablicama 2 i 3:

Tablica 2: ponovljivost u danu

Koncentracija standarda (ppm)	2	5	10
1. mjerenje	2,056	5,059	10,20
2. mjerenje	2,054	5,120	10,16
3. mjerenje	2,051	5,116	10,06
4. mjerenje	2,049	5,089	10,18
5. mjerenje	2,055	5,115	10,18
6. mjerenje	2,049	5,095	9,98
Srednja vrijednost	2,052	5,099	10,13
SD	0,031	0,023	0,087
RSD (%)	0,150	0,456	0,862

Rezultati dobiveni za ponovljivost u danu, izraženi kao RSD, su unutar prihvatljivih granica od 3% i metoda je pogodna za određivanje bakra u uzorcima.

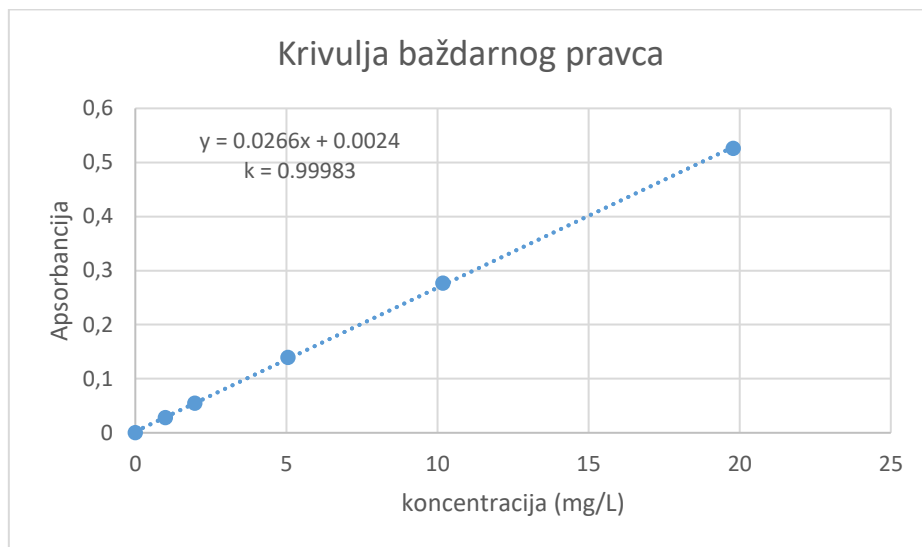
Tablica 3: Ponovljivost unutar 3 dana

Koncentracija standarda (ppm)	2	5	10
1. mjerenje	2,005	5,006	9,985
2. mjerenje	1,972	5,051	10,18
3. mjerenje	2,052	5,099	10,127
Srednja vrijednost	2,010	5,052	10,097
SD	0,040	0,047	0,101
RSD (%)	2,00	0,921	0,999

Rezultati dobiveni za ponovljivost između dana, izraženi kao RSD, su unutar prihvatljivih granica od 2 % i metoda je pogodna za određivanje bakra u uzorcima.

4.1.2. Linearnost

Linearnost se ispitala provođenjem 3 mjerenja za 5 različitih koncentracija. Iz mjerenja se dobije graf ovisnosti analitičkog signala o koncentraciji standarda, odnosno kalibracijska krivulja. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca. Slika 3 prikazuje dobivene rezultate:



Slika 3: Graf ovisnosti srednje vrijednosti apsorbancije o koncentraciji

Koeficijent korelacije regresijskog pravca za dani graf iznosi 0,9998. Na temelju dobivenih podataka može se zaključiti da je metoda linearna i da je pogodna za određivanje bakra u uzorcima.

4.1.3. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja je vrijednost koja se odredila prema formuli:

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

gdje je σ standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca, a a je nagib pravca (Nigović i sur., 2014). Vrijednost σ je iznosila 0,0016, a vrijednost nagiba a je iznosila 0,0266.

Uvrštavanjem vrijednosti u formulu dobije se vrijednost LOD od 0,199 mg/L ili 0,199 ppm.

Granica određivanja je vrijednost koja se odredila prema formuli:

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

gdje je σ standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca, a a je nagib pravca (Nigović i sur., 2014). Vrijednost σ je iznosila 0,0016 a vrijednost nagiba a iznosila 0,0267.

Uvrštavanjem vrijednosti u formulu dobije se vrijednost LOQ od 0,604 mg/L ili 0,604 ppm.

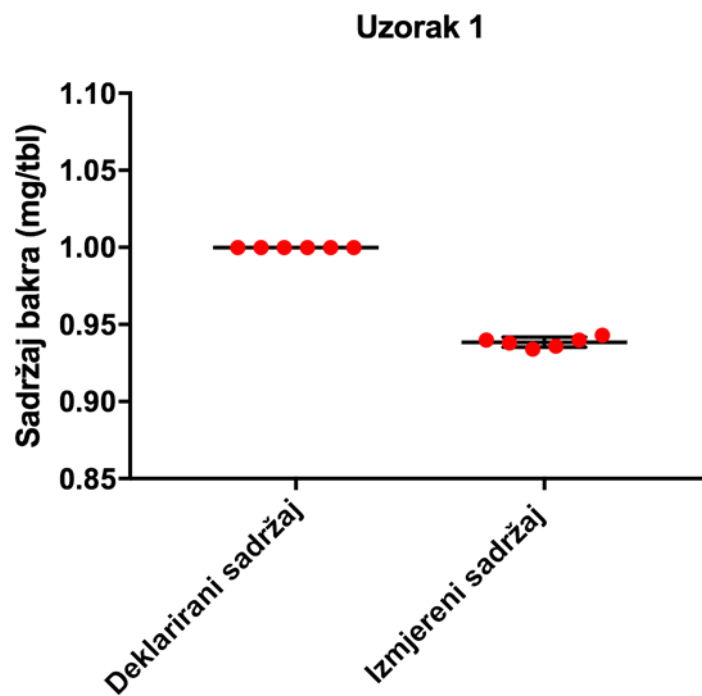
4.2. Primjena metode u određivanju bakra u uzorcima

Validiranom metodom je određena koncentracija bakra u otopinama šumećih tableta ili tableta koje sadržavaju bakar kao dodatak prehrani. Rađen je duplikat svakog uzorka kako bi svaki uzorak imao svoju kontrolu. Analiza je provedena na 4 različita proizvoda. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tablici 4

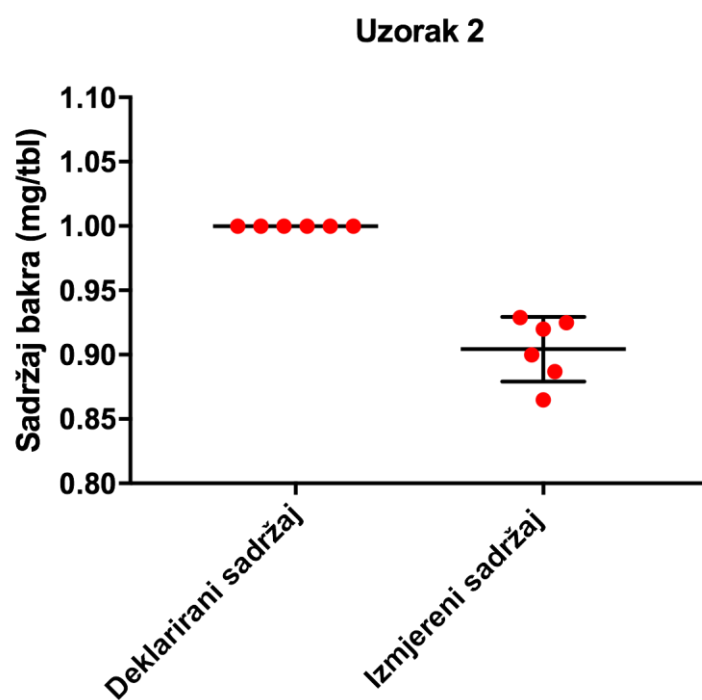
Tablica 4: Mase bakra u uzorcima dodataka prehrani

	Uzorak 1 (n=6) (mg/tbl)	Uzorak 2 (n=6) (mg/tbl)	Uzorak 3 (n=6) (mg/tbl)	Uzorak 4 (n=6) (mg/tbl)
srednja vrijednost	0,938	0,901	0,452	0,904
srednja vrijednost ± SD	0,938 ± 0,003	0,901 ± 0,027	0,452 ± 0,004	0,904 ± 0,004
RSD (%)	0,37	2,96	0,96	0,49

Na slikama 4, 5, 6, 7, prikazana je usporedba deklariranih vrijednosti sadržaja bakra s izmjerenim vrijednostima u ispitivanim uzorcima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD šest neovisnih određivanja.

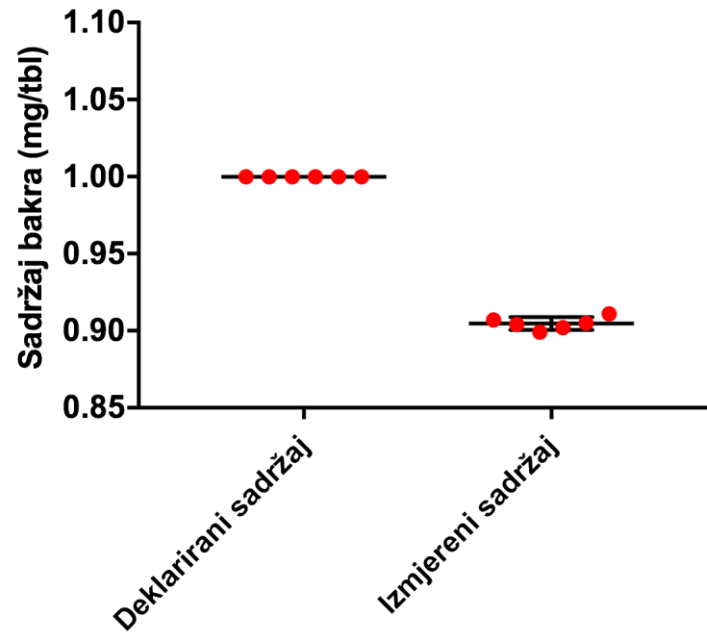


Slika 4: Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja bakra u uzorku 1



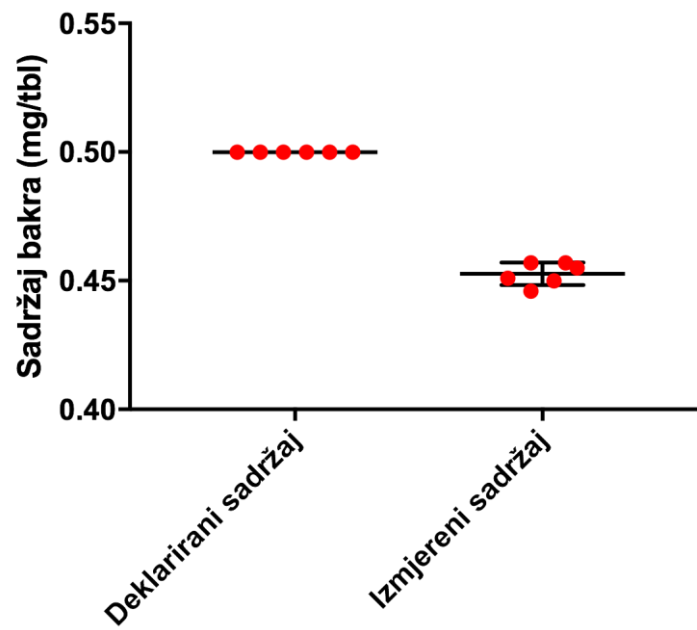
Slika 5: Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja bakra u uzorku 2

Uzorak 3



Slika 6: Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja bakra u uzorku 3

Uzorak 4



Slika 7: Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja bakra u uzorku 4

U svim ispitivanim uzorcima dodataka prehrani potvrđeno je prisustvo elementa bakra. Bakar je pronađen u rasponu od 0,450 mg do 0,940 mg. S obzirom da deklaracije ispitivanih dodataka prehrani navode količinu sadržanog bakra, dobivene vrijednosti mogu se usporediti s deklariranima.

Usporedbom rezultata dobivenih AAS analizom za količinu bakra u analiziranim pripravcima dodataka prehrani s vrijednostima koje su deklarirane, može se zaključiti da postoji statistički značajna razlika od $P = 0,0022$ ($P < 0,05$) između deklarirane vrijednosti i izmjerene vrijednosti svih analiziranih uzoraka.

Odstupanje može biti posljedica pogreške analitičara u nekom od koraka analize ili varijacija u sadržaju bakra u pojedinoj tableti.

Uvedena metoda se pokazala primjenjivom za pouzdano i precizno određivanje sadržaja bakra u dodacima prehrane.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- AAS metoda pokazala se primjenjiva u određivanju sadržaja bakra u uzorcima dodataka prehrani.
- Metoda je jednostavna, brza, jeftina i pouzdana.
- Pogodna je za analizu velikog broja različitih uzoraka i ima široku primjenu u farmaceutskoj industriji i u medicini.
- Dobiveni rezultati upućuju na manje vrijednosti bakra u svim analiziranim dodacima prehrani od onih navedenih na deklaraciji.

6. LITERATURA

- After Absorption in Atomic Absorption Spectrometry (AAS) do electrons re-emit the absorbed light, www.quora.com, pristupljeno 19.9.2018.
- Beatty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, The Perkin - Elmer Corporation, 1993, str. 1-4, 1-5, 1-6.
- Berkow R, Beers HM, Fletcher JA, The Merck Manual of Medical Information, Home Edition. Urednici: Ivančević Z, Bergovec M, Rumboldt Z, Maliči I, Mirić D, Cvitanović S. MSD Medicinski priručnik za pacijente, Drugo hrvatsko izdanje. Zagreb, Placebo d.o.o., 2008, str. 674-675.
- Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau FJ, Margaritis I, Dietary Copper and Human Health: Current Evidence and Unresolved Issues, Elsevier GmbH, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2016, 35, 107-110.
- de Bie P, Muller PA, Wijmenga C, Klomp, LW. Molecular Pathogenesis of Wilson and Menkes Disease: Correlation of Mutations with Molecular Defects and Disease phenotypes. *Journal of Medical Genetics*, 2007, 673-688.
- Harris CD, Quantitative Chemical Analysis, 8th Edition, New York, W.H. Freeman and Company, 2010, str 51-67, 393-501.
- Janet Y, Uriu A, Carl LK. Copper, Oxidative Stress and Human Health, Elsevier L. Molecular Aspects of Medicine. 2005, 26, str. 268- 272, 285-286.
- 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.
- Olmedo, P, Pla A, Hernández AF, López G, Rodrigo L, Gil F. Validation of a Method to Quantify Chromium, Cadmium, Manganese, Nickel and Lead in Human whole Blood, Urine, Saliva and Hair Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 60-67.
- Parker, Mary M., Fred L, Humoller, Delmar J. Mahler. Determination of Copper and Zinc in Biological Material. *Clinical Chemistry*, 1967, 40-48.
- Prashanth, L, Kattapagari, KK, Chitturi, RT, Baddam, VRR, Prasad LKA. Review on Role of Essential Trace Elements in Health and Disease. *Journal of Dr. Ntr University of Health Sciences*, 2015, 75.
- Peters FT, Murer HH. Bioanalytical Method Validation—How, how much and why. A

review. *TIAFT Bulletin*, 2002, 32, 16-23.

- Pizent, A., Jurasović, J., Pavlović, M., & Telišman, S. Serum copper, zinc and selenium levels with regard to psychological stress in men. *Journal of trace elements in medicine and biology*. 1999, 13, 34-39.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ, Fundamentals of analytical chemistry 6th edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti, Živković A. Atomska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivoj zračenju. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str 595-620.
- Soylak M, Aydin A. Determination of Some Heavy metals in Food and Environmental Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry after Coprecipitation. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 1242-1248.
- Taylor A. Detection and Monitoring of Disorders of Essential trace elements. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1996, 486-510.
- Wang T, Guo Z. *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 525-537.
- Watson DG, Pharmaceutical Analysis: Atomic Spectrophotometry. Edinburgh; Churchill Livingstone, 1999, str. 125-132.
- White C, Atomic Absorption Determination of Zinc and Copper in a Multivitamin. *Journal of Atomic Absorption Spectrophotometry*, 2003, 12-14.
- 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. 38, 123-129, 284.
- Wilsonova bolest, 2014, www.hubpp.mef.hr , pristupljeno 18.9.2018.

7.SAŽETAK / SUMMARY

Bakar je jedan od esencijalnih elemenata za ljudski organizam. Ima ulogu u različitim biološkim procesima kao što su antioksidativna zaštita, prevođenje željeza u aktivni ferični oblik, sinteza adrenalina, razvoj embrija, formiranje vezivnog tkiva, zarastanje rana, rast novih krvnih žila, razvoj stanica imunološkog sustava, kontrola tjelesne temperature i funkcija neurona pa je homeostaza bakra izrazito važna.

Prema preporuci Svjetske Zdravstvene Organizacije dnevno je potrebno unijeti od 1-3 mg bakra u organizam kako bi se spriječio deficit, ali ta količina varira ovisno o dobi. Veće količine, oko 1,5 mg se preporučaju kod trudnica i dojilja, a kod djece do 18 godina se preporuča unos od 0,4 do 1 mg. (Bost i sur., 2016).

Manjak unosa bakra dovodi do umora i niske serumske razine bakra. Posljedice deficita bakra su anemija, leukopenija, neutropenija i osteoporoza. Adekvatan unos bakra potrebno je osigurati unosom hrane koja je bogata bakrom (meso, mahunarke, tamna čokolada i orašasti plodovi) i po potrebi dodacima prehrani koji sadržavaju bakar. Ispitivanja sadržaja bakra u 4 dodatka prehrani su provedena na AAS-u Aanalyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektom nespecifične površine na valnoj duljini od 324,8 nm. Postojeća metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije. Korišteni su standardi bakra koncentracije od 1 do 20 mg/L. Bakar je dokazan u svim dodacima prehrani i to u količini od 0,450 do 0,940 mg. Usporedbom rezultata s deklaracijom na pakiranju zaključeno je da uzorci sadržavaju nešto manje bakra od navedene količine. Metoda se pokazala brзом, jeftinom, pouzdanom i pogodnom za određivanje bakra u različitim uzorcima dodataka prehrani.

Copper is one of the essential elements in human organism. It has a role in many biological processes such as antioxidant protection, adrenalin synthesis, embryo development, wound healing, angiogenesis, controlling body temperature and development of immune system cells. Recommended daily intake for copper by World Health Organization is from 1 to 3 mg. Bigger intake is recommended for pregnant women. Deficit of copper intake results in tiredness and low serum copper. Anemia, leukopenia, neutropenia and osteoporosis are consequences of low copper level in organism. Food rich with copper such as meat, dark chocolate, nuts, legumes and if necessary dietary supplement is providing recommended copper intake. Four dietary supplements were examined on AAS Analyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) with a deuterium correction of a non specific surface at a wavelength of 324.8 nm. Existing method was validated. Copper standards with a concentration range from 1 to 20 mg/L were used in the process of validation. The range of concentration of copper found in the four samples varies from 0,450 mg/L to 0,940 mg/L. Dietary supplements were containing less copper than stated. Method is fast, cheap, reliable and good for copper determination in various samples.

**8.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASICDOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ODREĐIVANJE BAKRA PLAMENOM ATOMSKOM APSORPCIJSKOM SPEKTROFOTOMETRIJOM U UZORCIMA DODATAKA PREHRANI

Josip Perkov

SAŽETAK

Bakar je jedan od esencijalnih elemenata za ljudski organizam. Ima ulogu u različitim biološkim procesima kao što su antioksidativna zaštita, prevođenje željeza u aktivni ferri oblik, sinteza adrenalina, razvoj embrija, formiranje vezivnog tkiva, zarastanje rana, rast novih krvnih žila, razvoj stanica imunološkog sustava, kontrola tjelesne temperature i funkcija neurona pa je homeostaza bakra izrazito važna. Prema preporuci Svjetske Zdravstvene Organizacije dnevno je potrebno unijeti od 1-3 mg bakra u organizam kako bi se spriječio deficit, ali ta količina varira ovisno o dobi. Veće količine, oko 1,5 mg se preporučaju kod trudnica i dojilja, a kod djece do 18 godina se preporuča unos od 0,4 do 1 mg. Manjak unosa bakra dovodi do umora i niske serumske razine bakra. Posljedice deficita bakra su anemija, leukopenija, neutropenija i osteoporoza. Adekvatan unos bakra potrebno je osigurati unosom hrane koja je bogata bakrom (meso, mahunarke, tamna čokolada i orašasti plodovi) i po potrebi dodacima prehrani koji sadržavaju bakar. Ispitivanja sadržaja bakra u 4 dodatka prehrani su provedena na AAS-u Aanalyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektom nespecifične površine na valnoj duljini od 324,8 nm. Postojeća metoda je validirana ispitivanjem parametara validacije. Korišteni su standardi bakra koncentracije od 1 do 20 mg/L. Bakar je dokazan u svim dodacima prehrani i to u količini od 0,450 do 0,940 mg. Usporedbom rezultata s deklaracijom na pakiranju zaključeno je da uzorci sadržavaju nešto manje bakra od navedene količine. Metoda se pokazala brzom, jeftinom, pouzdanom i pogodnom za određivanje bakra u različitim uzorcima dodataka prehrani.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 7 grafičkih prikaza, 4 tablice i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Atomska apsorpcijska spektrometrija, bakar, 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. Suzana Inić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Prof. dr.sc. Živka Juričić, *redovni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytical chemistry
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

COPPER DETERMINATION IN DIETARY SUPPLEMENTS WITH FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Josip Perkov

SUMMARY

Copper is one of the essential elements in human organism. It has a role in many biological processes such as antioxidant protection, adrenalin synthesis, embryo development, wound healing, angiogenesis, controlling body temperature and development of immune system cells. Recommended daily intake for copper by World Health Organization is from 1 to 3 mg. Bigger intake is recommended for pregnant women. Deficit of copper intake results in tiredness and low serum copper. Anemia, leukopenia, neutropenia and osteoporosis are consequences of low copper level in organism. Food rich with copper such as meat, dark chocolate, nuts, legumes and if necessary dietary supplement is providing recommended copper intake. Four dietary supplements were examined on AAS Analyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) with a deuterium correction of a non specific surface at a wavelength of 324.8 nm. Existing method was validated. Copper standards with a concentration range from 1 to 20 mg/L were used in the process of validation. The range of concentration of copper found in the four samples varies from 0,450 mg/L to 0,940 mg/L. Dietary supplements were containing less copper than stated. Method is fast, cheap, reliable and good for copper determination in various samples..

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

Thesis includes: 35 pages, 7 figures, 4 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Atomic absorption spectrometry, copper, 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
Suzana Inić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.