

# Određivanje cinka u uzorcima dodataka prehrani primjenom plamene apsorpcijske spektrofotometrije

---

**Rođak, Bruno**

**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:163:260446>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Bruno Rodak**

**Određivanje cinka u uzorcima dodataka  
prehrani primjenom plamene apsorpcijske  
spektrofotometrije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan na ukazanom povjerenju, pruženoj pomoći i izrazitoj susretljivosti te kolegijalnosti tijekom cijelog studija, a posebno tijekom izvođenja eksperimentalnog i teorijskog dijela diplomskog rada.*

*Neizmjerno sam zahvalan svojoj obitelji, prijateljima i djevojci što su uvijek bili uz mene, omogućili mi lakše i ljepše studiranje te mi pružali bezuvjetnu podršku i pomoć.*

## SADRŽAJ:

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Cink u organizmu</b> .....  | <b>2</b>  |
| 1.1.1      | Uloga cinka u organizmu .....  | 2         |
| 1.1.2      | Deficit cinka u organizmu .....  | 2         |
| 1.1.3      | Suficit cinka u organizmu .....  | 4         |
| 1.1.4      | Potrebe i preporuke unosa cinka u organizam .....  | 5         |
| 1.1.5      | Farmakoterapija cinkom i njegovim proizvodima .....  | 6         |
| 1.1.6      | Interakcije cinka s drugim lijekovima .....  | 7         |
| <b>1.2</b> | <b>Atomska apsorcijska spektrofotometrija</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Validacija analitičkog postupka</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>1.4</b> | <b>Pogreške analitičkih mjerenja</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIJALI I METODE</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Materijali</b> .....  | <b>20</b> |
| 3.1.1      | Korištene kemikalije .....   | 20        |
| 3.1.2      | Aparatura .....  | 20        |
| 3.1.3      | Laboratorijski pribor i posuđe .....   | 20        |
| <b>3.2</b> | <b>Metode</b> .....  | <b>22</b> |
| 3.2.1      | Priprema otopina dušične kiseline različitih koncentracija.....                                  | 22        |
| 3.2.2      | Priprema standardne otopine cinka .....  | 22        |
| 3.2.3      | Priprema uzoraka suplemenata za analizu cinka.....   | 23        |
| 3.2.4      | Postupak određivanja koncentracije cinka u uzorcima AAS-om.....                                  | 24        |
| 3.2.5      | Statistička analiza .....  | 25        |
| <b>4</b>   | <b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Validacija analitičke metode</b> .....  | <b>27</b> |
| 4.1.1      | Linearnost.....  | 27        |
| 4.1.2      | Preciznost .....   | 27        |
| 4.1.3      | Granica dokazivanja i određivanja .....  | 29        |
| <b>4.2</b> | <b>Primjena validirane analitičke metode za određivanje koncentracije cinka u uzorcima</b> ..... | <b>29</b> |
| <b>5</b>   | <b>ZAKLJUČAK</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>6</b>   | <b>LITERATURA</b> .....  | <b>37</b> |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>7</b> | <b>SAŽETAK/SUMMARY .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>8</b> | <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION<br/>CARD</b> |           |

## **1 UVOD**

## 1.1 Cink u organizmu

### 1.1.1 Uloga cinka u organizmu

Cink (Zn) je esencijalni element nužan i neophodan za pravilan rast, razvoj i funkcioniranje ljudskog organizma. Tijelo čovjeka sadrži 2-3 grama cinka i on je nakon željeza drugi element u tragovima u ljudskom organizmu (Prashanth i sur., 2015). Ovaj mineral u čovjeku se nalazi gotovo u svakoj tjelesnoj stanici. Manje od 0,5 % ukupne tjelesne količine cinka nalazi se u plazmi, dok je najveći dio pohranjen uglavnom u mišićima i kostima (približno 90 %), ali i u jetri, zubima, kosi, koži, leukocitima, testisima i dr. Najveći dio plazmatskog cinka vezan je za bjelančevine, oko 50 % za albumine (Al-Assaf, 2010; Kovač i sur., 2004). Nadalje, ovaj metal ima visoki antioksidativni potencijal i sastavni je dio tristotinjak enzima, uključujući mnoge NADH<sup>1</sup> dehidrogenaze, RNA<sup>2</sup> i DNA<sup>3</sup> polimeraze, metaloproteinaze, alkalne fosfataze i karboanhidraze. Kao kofaktor enzima sudjeluju u sintezi i razgradnji ugljikohidrata, lipida i proteina, ali najznačajniji je u sintezi nukleinskih kiselina potrebnih za rast i razvoj stanica. Sudjeluje u stvaranju bijelih krvnih stanica u koštanoj srži, sazrijevanju T limfocita i stvaranju antitijela, što je izrazito značajno za imunološki sustav i obranu od raznih patogenih mikroorganizama. Važan je u procesu zacjeljivanja rana, povreda i opekotina. Potreban je u konverziji vitamina A u njegovu aktivnu formu što doprinosi zdravlju očiju i poboljšanju vida. Nadalje, cink ima važnu ulogu u produkciji hormona testosterona i balansiranju inzulina u tijelu čovjeka (Dart i sur., 2014; Berkov i sur., 2008; WHO, 2004).

### 1.1.2 Deficit cinka u organizmu

Manjak cinka u ljudi nastaje najčešće kao posljedica oslabljene ili onemogućene apsorpcije i skladištenja cinka u organizmu. Javlja se u ljudi s insuficijencijom jetre, u bolesnika koji terapijom uzimaju diuretike te u dijabetičara. Također se manifestira u bolesnika koji pate od malapsorpcije ili u ljudi koji proživljavaju stresna stanja (npr. sepsa, opekline i ozljede glave). Ljudi koji boluju od crijevnih bolesti kao što su ulcerozni kolitis, Crohnova bolest i sindrom iritabilnog crijeva nerijetko imaju problem s apsorpcijom važnih hranjivih i esencijalnih spojeva pa tako i cinka. Nepravilna i neredovita prehrana, pušenje, ispijanje kave i alkohola te stres glavni su uzročnici pojave manjka cinka u organizmu. Potrebno je obratiti pozornost na njegov status u starijih osoba zbrinutih u bolnice ili domove

---

<sup>1</sup> NADH- Nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide*)

<sup>2</sup> RNA- Ribonukleinska kiselina (engl. *Rybonucleic acid*)

<sup>3</sup> DNA- Deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

te bolesnika s karcinomom pluća (Berkov i sur., 2008). Vegetarijanci su također rizična skupina i razina bioraspoloživog cinka u njih puno je manja nego u ostalih. Razlozi toga su što se prehrana vegetarijanaca bazira na mahunarkama i cjelovitim žitaricama, a razina cinka u njima primjetno je manja u odnosu na meso. Prema tome, vegetarijanci zahtijevaju unos cinka i do 50 % više od preporučene dnevne količine. Ipak, najviše pozornosti treba posvetiti trudnicama te dojiljama jer je cink nužan za normalan rast i razvoj ploda i djeteta. Manjak cinka u trudnica može izazvati malformacije fetusa i nisku porođajnu težinu djeteta (Prashanth i sur., 2015; Roohani i sur., 2013; ods.od.nih.gov).

Stečena deficijencija cinka u ranoj životnoj dobi može uzrokovati usporen rast, neuropsihijatrijske poremećaje, poremećaj zacjeljivanja rana, hipogonadizam i imunodeficijenciju. Na manjak cinka treba posumnjati u pothranjenih osoba i bolesnika s tipičnim simptomima deficita cinka. Tipične kliničke manifestacije blagog manjka uključuju usporen rast i razvoj, smanjeni apetit, usporeno zacjeljivanje rana i oslabljen imunološki sustav. U ozbiljnijim slučajevima nedostatka cinka u organizmu uzrokuje odgođeno spolno i koštano sazrijevanje, dermatitis, pojavu peruti, alopeciju, dijareju i kognitivne disfunkcije. Ovaj mineral iznimno je važan za potentnost muškaraca te njegov nedostatak utječe na spermatogenezu i na nastanak hiperplazije prostate. Mnogi od tih simptoma su nespecifični i često povezani s drugim bolestima, stoga je potrebno obaviti pretrage kojima bi se ustanovilo je li njegov deficit zapravo uzrok istih. Osim toga, nedostatak cinka može biti uzrok nastanka i progresije nekih kroničnih bolesti poput ateroskleroze, neuroloških poremećaja, starenja i nastanka karcinoma. Zbog oslabljenog imunološkog sustava uslijed manjka cinka dolazi do pojave čestih prehlada i infekcija. Moguće je naglo mršavljenje uzrokovano gubitkom apetita, pojavom proljeva te oslabljenog imuniteta (Kovač i sur., 2013; Roohani i sur., 2013; WHO, 2004).

Akrodermatitis enteropatika (lat. *Acrodermatitis Enteropathica*) je nasljedni ili stečeni poremećaj metabolizma cinka pri čemu dolazi do smanjenja njegove apsorpcije iz crijeva. Manjak cinka manifestira se u obliku upale kože s osipom (pustularni dermatitis) oko usta i/ili anusa, pojavom dijareje, alopecije i distrofije noktiju. Također može doći do pojave razdražljivosti i emocionalnih poremećaja. Nasljeđivanje je autosomno recesivno i uzrokovano je mutacijom gena  $SLC39A4^4$  smještenog na kromosomu 8. Taj gen kodira

---

<sup>4</sup>SLC- Nosač topljivih tvari (engl. *Solute carrier*)



transmembranski protein koji je sastavni dio ZIP<sup>5</sup> proteinskog kompleksa nužnog za unos cinka u stanice enterocita. Stečeni oblik ove bolesti teško je razlikovati od ostalih poremećaja nedostatka cinka jer su im kliničke manifestacije slične. Nastanak stečene akrodermatitis enteropatike može biti rezultat niskog unosa cinka, malapsorpcije, pretjeranog gubitka cinka iz organizma ili kombinacije tih faktora. Primjerice, dijeta bez odgovarajućeg unosa cinka može biti uzrok nastanka stečene akrodermatitis enteropatike. Suplementacija cinkom obično uklanja simptome bolesti. Primjena cinkovog sulfata per os u dozi 30-150 mg/dan dovodi do njenog potpunog povlačenja (Kovač i sur., 2013; www.medscape.com).

Budući da su mnogi simptomi deficita cinka nespecifični, klinička dijagnoza blagog manjka je teška. Zbog niskih razina cinka u serumu laboratorijska dijagnoza je zahtjevna, no usprkos tome razine cinka u krvi su najčešći korišteni parametri za procjenu njegovog statusa u organizmu. Za dijagnozu deficita cinka obično je potrebna kombinacija niskih razina cinka u serumu/tkivu i povećanog izlučivanja istog urinom (Roohani i sur., 2013). Hipocinkemija, tj. stanje deficita cinka u organizmu, nastupa kada su vrijednosti cinka u serumu manje od 60 µg/dL (normalan raspon je 60-120 µg/dL) (Kovač i sur., 2013). Nadalje, treba obratiti pozornost na činjenicu da kliničke manifestacije manjka cinka mogu biti prisutne i u slučaju normalnih rezultata krvnih pretraga (Roohani i sur., 2013).

### 1.1.3 Suficit cinka u organizmu

Toksičnost uzrokovana cinkom iznimno je rijetka. Unos elementarnog cinka u dozama 100-150 mg na dan ometa metabolizam bakra i uzrokuje njegove niske razine u krvi, mikrocitozu eritrocita, neutropeniju i poremećaj imuniteta. Unos prekomjernih količina cinka u rasponu doze 200-800 mg na dan, najčešće putem kisele hrane ili pića iz galvaniziranih (pocinčanih) posuda, može uzrokovati groznicu, povraćanje, grčeve u trbuhu, glavobolju i proljev. Udisanje metalnih para cinkovog oksida u industriji može biti uzrokom neuroloških oštećenja. Na svježem zraku simptomi se povlače nakon 12 do 24 sata. Posljedično, trovanjem cinkom javlja se klinička slika karakteristična za trovanje teškim metalima. Simptomi uključuju mučninu i povraćanje, metalni okus u ustima, niski tlak, konvulzije i kratkoću daha. U stanjima teških akutnih trovanja kao antidot se intravenozno primjenjuju EDTA<sup>6</sup> i dimerkaprol (poznatiji kao BAL, engl. *British anti-Lewisite*). Spomenuti spojevi

---

<sup>5</sup> ZIP- Cink/Željezo-regulirani transporteru slični protein (engl. *Zinc/Iron-regulated transporter-like protein*)

<sup>6</sup>EDTA- Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

keliranjem vežu slobodni cink iz krvi i povećavaju njegovo izlučivanje putem bubrega te time smanjuju njegovu koncentraciju u plazmi (Berkov i sur., 2008; Dart i sur., 2004).

#### 1.1.4 Potrebe i preporuke unosa cinka u organizam

S obzirom da je cink esencijalni metal, odnosno njegovo stvaranje u organizmu nije moguće, potrebno ga je unositi u organizam adekvatnom prehranom ili suplementacijom. Potrebe cinka visoke su u djece (120-140 µg/kg/dan) i adolescenata (60-80 µg/kg/dan) te trudnica i dojilja, dok su u odraslih zdravih osoba niže (30-40 µg/kg/dan) (WHO, 2004).

Referentni prehrambeni unosi (engl. *Dietary Reference Intakes*, DRI) koriste se za procjenu trenutnog prehrambenog unosa nekog pojedinca ili grupe te za planiranje njihove prehrane. DRI je utemeljio Odbor za hranu i prehranu (engl. *Food and Nutrition Board*) Nacionalne akademije znanosti (engl. *National Academy of Sciences*) (Murphy, 2016.). DRI vrijednosti sastoje se od 4 referentnih vrijednosti:

- Prosječni dnevni unos nutrijenta (engl. *Recommended Dietary Allowance*, RDA):

Preporučena dnevna razina unosa nutrijenata dovoljna da zadovolji zahtjeve 97-98 % zdrave populacije. Ove vrijednosti često se koriste za planiranje prehrambeno adekvatnih dijeta za pojedince (Murphy, 2016). RDA vrijednosti za cink različitih spolnih i dobnih skupine prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. RDA vrijednosti za cink

| Dob       | Muškarci | Žene | Trudnice | Dojilje |
|-----------|----------|------|----------|---------|
| 0-6 mj    | 2 mg     | 2 mg |          |         |
| 7-12 mj   | 3 mg     | 3 mg |          |         |
| 1-3 god   | 3 mg     | 3 mg |          |         |
| 4-8 god   | 5 mg     | 5 mg |          |         |
| 9-13 god  | 8 mg     | 8 mg |          |         |
| 14-18 god | 11 mg    | 9 mg | 12 mg    | 13 mg   |
| 19+ god   | 11 mg    | 8 mg | 11 mg    | 12 mg   |

- Odgovarajući unos nutrijenta (engl. *Adequate Intake*, AI):

Pretpostavlja se da unos na ovoj razini osigura adekvatnost prehrane. Ovaj parametar značajan je i ustanovljava se kada dokazi nisu dovoljni za procjenu RDA vrijednosti (Murphy, 2016).

- Procijenjeni dnevni unos nutrijenta (engl. *Estimated Average Requirement*, EAR):

Prosječna dnevna razina unosa za koju se procjenjuje da udovoljava zahtjevima 50 % zdrave populacije. Koristi se kao temelj za određivanje RDA vrijednosti te za procjenu unosa hranjivih tvari za određene skupine ljudi i za planiranje nutricionističkih adekvatnih dijeta za njih (Murphy, 2016).

- Najviši prosječni dnevni unos nutrijenta (engl. *Upper Tolerable Intake Level*, UL):

Najveći dnevni unos nutrijenta koji vjerojatno neće imati štetnih učinaka na zdravlje. Služi kao orijentacijska vrijednost za prevenciju prevelikog unosa i pojavu štetnosti (Murphy 2016). UL vrijednosti za cink različitih spolnih i dobnih skupina prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. UL vrijednosti za cink

| Dob       | Muškarci | Žene  | Trudnice | Dojilje |
|-----------|----------|-------|----------|---------|
| 0-6 mj    | 4 mg     | 4 mg  |          |         |
| 7-12 mj   | 5 mg     | 5 mg  |          |         |
| 1-3 god   | 7 mg     | 7 mg  |          |         |
| 4-8 od    | 12 mg    | 12 mg |          |         |
| 9-13 god  | 23 mg    | 23 mg |          |         |
| 14-18 god | 34 mg    | 34 mg | 34 mg    | 34 mg   |
| 19+ god   | 40 mg    | 40 mg | 40 mg    | 40 mg   |

### 1.1.5 Farmakoterapija cinkom i njegovim proizvodima

Cink je u većem ili manjem postotku prisutan u raznovrsnim namirnicama. Kamenice sadrže najveću količinu cinka u usporedbi s ostalim namirnicama, no crveno meso i perad čine glavninu cinka u ljudskoj prehrani. Ostali bogati izvori su grah, orašasti plodovi, plodovi mora (poput rakova), cjelovite žitarice, žitarice za doručak obogaćene cinkom i mliječni proizvodi. Fitati, koji su prisutni u kruhu, žitaricama, mahunarkama i drugoj hrani, vežu cink i smanjuju njegovu apsorpciju u organizmu. Dakle, bioraspoloživost cinka iz žitarica i biljne hrane niža je od one iz hrane životinjskog podrijetla. Ipak, mnoge žitarice i dalje su veliki izvor cinka za čovjeka (Roohani i sur., 2013; ods.od.nih.gov; www.interchopen.com).

Suplementi cinka, odnosno dodaci prehrani, na tržištu se nalaze u nekoliko oblika cinkovih soli, uključujući cinkov glukonat, pikolinat, sulfat i acetat. Postotak elementarnog cinka u suplementima varira od oblika do oblika. Primjerice, u određenom suplementu, u

kojem je cink u obliku cinkovog sulfata, nalazi se približno 23 % elementarnog cinka. Tako 220 mg cinkovog sulfata sadrži 50 mg elementarnog cinka. Istraživanja nisu ustvrdila postojeli razlike u apsorpciji, bioraspoloživosti ili toleranciji između različitih oblika cinkovih soli. Pored učestalijih tableta i kapsula, neke pastile isto mogu sadržavati cink te su također deklarirane kao dodatak prehrani (Roohani i sur., 2013; ods.od.nih.gov).

Osim oralne suplementacije kapsulama i tabletama, moguće je liječenje i parenteralnim farmaceutskim proizvodima na bazi cinka. Cinkova pasta bazirana na cinkovom oksidu primjer je takvog farmaceutskog oblika. Cinkov oksid je adstringens, a osim toga djeluje protektivno i antiseptički. Uobičajen u cinkovu pastu koristi se kao zaštitni premaz kod blagih kožnih iritacija, kod ispucale kože te za zaštitu kože kod pelenskog osipa. U kontaktu cinkovog oksida s upalnim sekretima kože nastaju cinkati koji stežu upaljeno tkivo i isušuju sekret. Cinkova pasta pomaže i olakšava tegobe kod raznih kožnih oboljenja kao što su ekcemi, psorijaza, svrbež, herpes simplex, posjekotine i ogrebotine. Upotrebljava se za zaštitu kože od sunčevih opekotina, dok u liječenju akni pospješuje sušenje kože, smanjuje sekreciju loja i ublažava lokalnu upalu (Dat i sur., 2004; [www.ljekarnasdz.hr](http://www.ljekarnasdz.hr); [www.medbroadcast.com](http://www.medbroadcast.com)).

### **1.1.6 Interakcije cinka s drugim lijekovima**

Suplementi cinka imaju potencijal za interakciju s određenim vrstama lijekova. Neke vrste antibiotika, penicilamin te neke vrste diuretika tipični su primjer interakcija s cinkom. Kinolinski antibiotici (kao što je Cipro®) i tetraciklinski antibiotici (kao što su Achromycin® i Sumycin®) interagiraju s cinkom u gastrointestinalnom traktu što za posljedicu ima smanjenje apsorpcije kako cinka tako i antibiotika. Preporuka za suzbijanje ove interakcije jest uzimanje antibiotika 2 sata prije ili 4 do 6 sati nakon uzimanja suplemenata. Nadalje, cink može smanjiti apsorpciju i djelovanje penicilamina, lijeka koji se koristi u terapiji reumatoidnog artritisa. Kako bi se smanjila ova interakcija preporuča se uzimanje suplementa najmanje 2 sata prije ili nakon uzimanja penicilamina. Tiazidni diuretici kao što su klortalidon (Hygroton®) i hidroklorotiazid (Esidrix® i HydroDIURIL®) povećavaju izlučivanje mokraćnog cinka za čak 60 %. Posljedica toga, dugoročno korištenje tiazidnih diuretika može smanjiti razinu cinka u tkivu, stoga bi klinički farmaceuti trebali obratiti pozornost na status cinka u pacijenata koji uzimaju spomenute lijekove (Roohani i sur., 2013; ods.od.nih.gov).

## 1.2 Atomska apsorpcijska spektrofotometrija

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (engl. *Atomic Absorption Spectroscopy*, AAS) je analitička metoda za određivanje koncentracije elemenata u uzorku. Opisao ju je 1956. godine Alan Walsh i danas se koristi interdisciplinarno u različite svrhe, ali s jednim zajedničkim ciljem - određivanje koncentracija metala u uzorcima. Širok je spektar primjene ove analitičke metode (Ata i sur., 2014). Koristi se u medicinske svrhe za analizu metala u biološkim tekućinama poput urina i krvi. Također se primjenjuje u ekologiji i toksikologiji pri praćenju onečišćenja i sastava tla, zraka i voda. U prehrambenoj i tehnološkoj industriji nužna je u utvrđivanju i praćenju prisutnosti teških metala u pitkoj vodi, vinu, pivu, sokovima i dr. Značajna je u farmaceutskoj industriji za kontrolu i analizu različitih materijala, uzoraka i pripravaka. Razvoj novih metoda, analiza lijekova, kontrola proizvodnje i gotovo svi procesi u farmaceutskoj industriji nezamislivi su bez ove metode (Pungor, 1995; Kenkel, 1994). Budući da se brojni metali koriste u procesima proizvodnje farmaceutskih pripravaka kao kemijski reagensi, katalizatori ili kao lijekovite tvari, važno je utvrditi granične vrijednosti metala u gotovim lijekovitim oblicima i spremnicima za lijekove (Jignesh, 2012; Harris, 2010; Skoog i sur., 1999).

AAS se primjenjuje za kvalitativno i kvantitativno određivanje oko šezdeset elemenata. Riječ „atomska“ ne odnosi se samo na neutralne atome, nego i na elementarne ione. Spektroskopska proučavanja atoma mogu se obavljati pomoću ultraljubičastog ili vidljivog zračenja, samo u plinovitim uvjetima u kojima su pojedinačni atomi i ioni međusobno dobro razdvojeni. Svaki je element specifičan i ima svojstvenu nuklearnu strukturu pa tako i elektronsku konfiguraciju. Elektroni, koji nasumice putuju u orbitama, u takozvanom elektronskom oblaku, okružuju jezgru atoma formiranu od protona i neutrona. Takav elementa je stabilan i obitava u osnovnom atomskom stanju. Dovođenjem određene količine energije, kvanta energije, moguće je pobuditi elektron, koji posljedično prelazi iz stabilnog osnovnog stanja u pobuđeno stanje. Takvo pobuđeno stanje je nestabilno i elektron će se spontanim prijelazom vratiti u osnovno stanje, pri čemu se otpušta ekvivalent prethodno apsorbirane energije. Prijelaze elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje i obratno, kao i apsorpciju i emisiju energije, nužno je razumjeti za sam proces atomskih spektrofotometrija (Al-Assaf, 2010; Harris, 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999; Hargiss, 1988).

Atomske spektroskopske metode baziraju se na procesu atomizacije, odnosno postupku kojim se uzorak isparava i razgradnjom pretvara u plinovite atome i elementarne

ione. Najčešći načini atomizacije su atomizacija u plamenu, elektrotermička atomizacija, atomizacija u induktivno spregnutnoj plazmi i atomizacija u plazmi istosmjerne struje. Nama bitna plamena atomizacija odvija se pri temperaturi od 1700 do 3150 °C (Siraj i Kitte , 2013). Vodena otopina uzorka raspršuje se u obliku fine vodene prašine i miješa s plinovitim gorivom i oksidansom koji ga unose u plamen. Otapalo ispari u osnovnom području plamena, smještenom odmah iznad plamenika. Čvrste čestice nošene su u središnji najtopliji dio plamena gdje iz njih nastaju plinoviti atomi važni za daljnji proces metode (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

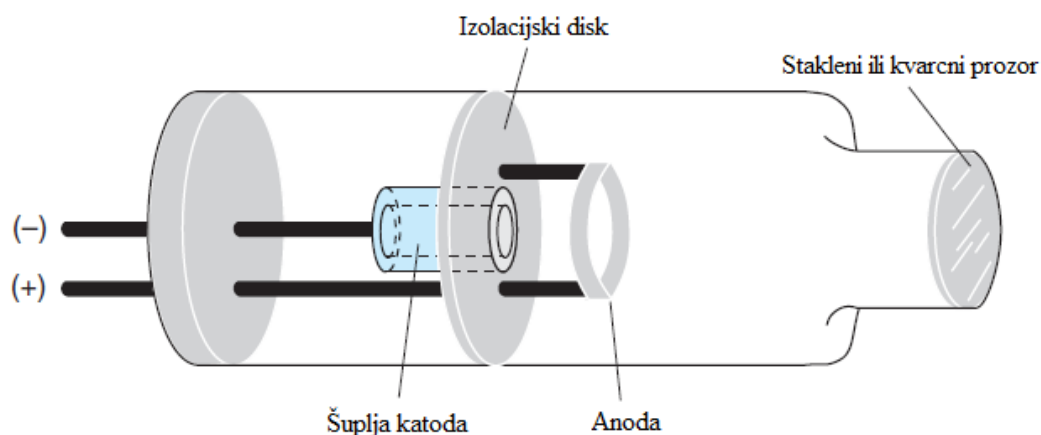
U plamenoj emisijskoj spektroskopiji pobuđeni ioni uzorka služe kao izvor zračenja, odnosno ne primjenjuje se nikakav vanjski izvor zračenja. Takvi atomi i ioni u plinovitom stanju bivaju pobuđeni apsorpcijom energije vrućeg izvora, te se relaksiraju do svog osnovnog stanja otpuštanjem fotona zračenja. Tako nastaju emisijski spektri atoma i iona. Suprotno tome, atomska apsorpcija nastaje pobuđivanjem plinovitog atoma ili iona apsorpcijom fotona zračenja iz vanjskog izvora posebne vrste. Emisijski i apsorpcijski spektri su komplementarni, odnosno valna duljina emitiranog zračenja jednaka je valnoj duljini apsorbiranog zračenja (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

Zaključno, svaki atom u pobuđenom stanju ima specifičan emisijski i apsorpcijski spektar. Najčešće atomske tehnike za određivanje metala u uzorcima su plamena, grafitna i hibridna AAS te induktivno spregnuta plazma-AES uz induktivno spregnutu plazma-masenu spektrometriju (Donnici i sur., 2016). Od svih atomskih tehnika, plamena atomska apsorpcijska spektroskopija (engl. *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*, FAAS) je zbog svoje jednostavnosti, učinkovitosti, brzine izvedbe i relativno niskih cijena, najčešće primjenjivana. Metoda se koristi za rutinska mjerenja te nije zahtjevnija za izvedbu i mogu je obavljati relativno nevjeshi izvođači. Osim svojih prednosti, metoda ima i neke mane, npr. ovom metodom istovremeno je moguće određivanje samo jednog metala u uzorku. (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

Mjerenja koncentracija metala u uzorcima, bazirana na AAS, provode se na spektrofotometru. To je uređaj koji se sastoji od 5 ključnih dijelova (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999):

- 1) Linijski izvor zračenja- žarulja sa šupljom katodom

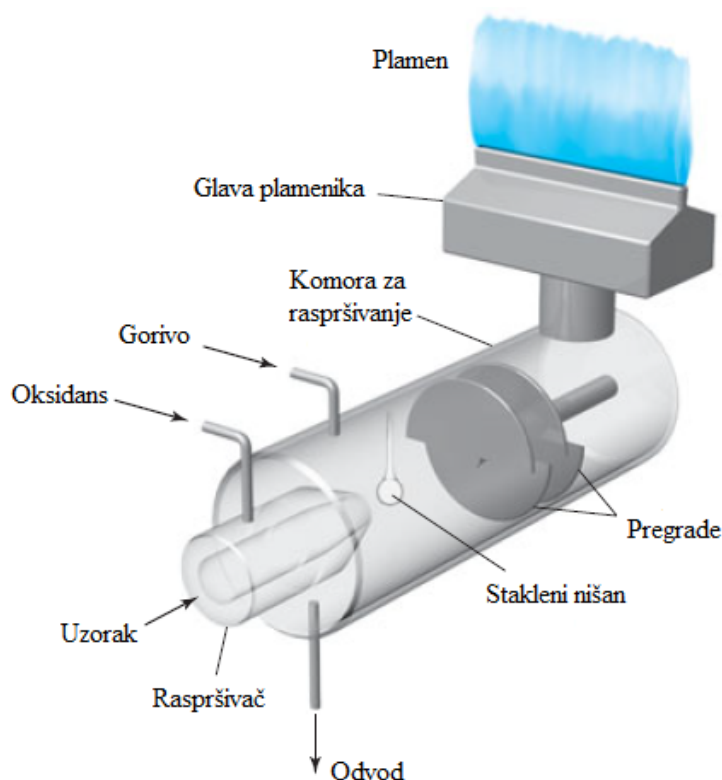
Najčešći izvor zračenja u metodi je žarulja sa šupljom katodom (Slika 1). Žarulja se sastoji od volframove anode i cilindrične katode, zajedno zataljenih u staklenoj cijevi punjenoj inertnim plinom, npr. argonom, pod tlakom od približno 100-600 Pa. Katoda mora biti napravljena od metala koji se analizira. Djelovanjem potencijala od približno 300 V na elektrodama dovodi do ionizacije inertnog argona i nastajanje struje od 5 do 10 mA. Kada je potencijal dostatan velik, kationi argona udaraju anodu dovoljno velikom energijom za izbijanje određene količine atoma metala. Time nastaje atomski oblak. Dio takvih atoma nalazi se u pobuđenom stanju koji pri povratku u osnovno atomsko stanje emitiraju valne duljine potrebne za daljnji proces atomizacije metala u uzorku. Nadalje, izbijeni atomi metala u žarulji mogu prijeći natrag na površine katode ili na stjenke žarulje i tamo se istaložiti (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999, Kenkel, 1994).



Slika 1. Žarulja sa šupljom katodom (preuzeto i prilagođeno prema: Harris, 2010)

## 2) Generator atomske pare - plameni atomizator laminarnog protoka

Plameni atomizator laminarnog protoka (Slika 2) ili plamenik s prethodnim miješanjem najčešći je tip plamenika u AAS-u koji je zamijenio izrazito bučni plamenik turbulentnog protoka. Protokom oksidansa uzorak se raspršuje u aerosol koji se potom miješa s gorivom i ulazi u plamen. Najčešće korišteno gorivo je smjesa zraka i acetilena s temperaturom plamena 2200-2400 °C (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999).



Slika 2. Plamene atomizator laminarnog protoka (preuzeto i prilagođeno prema: Harris, 2010)

### 3) Monokromator

Monokromator za ultraljubičasto i vidljivo područje postavljen je između plamena i detektora. Odabire usku vrpću zračenja koje emitira žarulja sa šupljom katodom i zaustavlja interferirajuće zračenje plamena. Valna duljina koju odabire monokromator usmjeruje se na detektor (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999).

### 4) Detektor

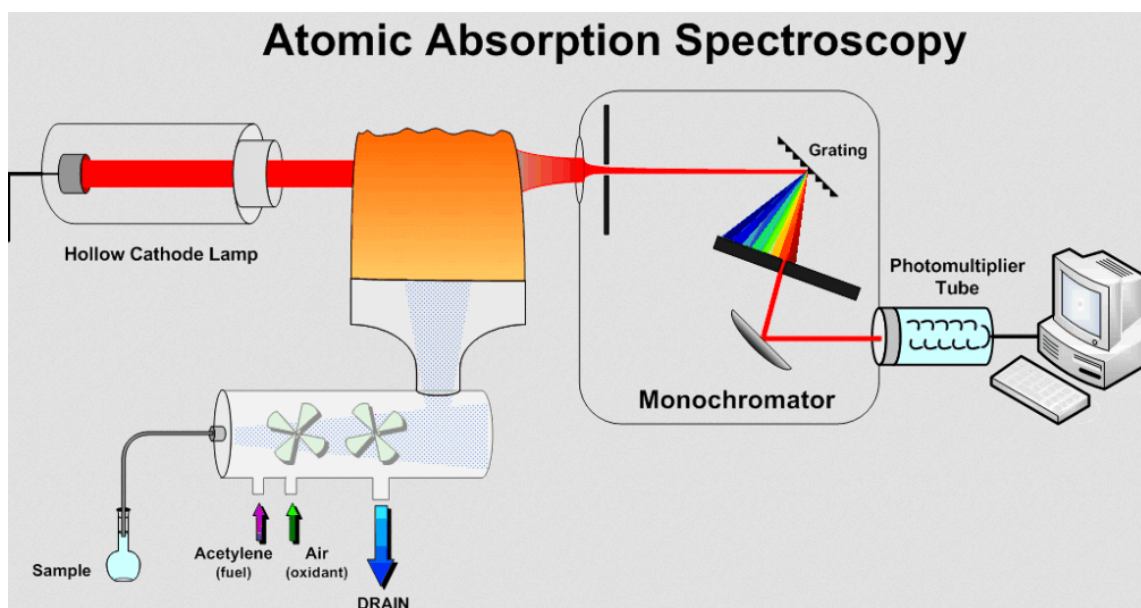
Detektor prima izmjenični signal žarulje i neprekidan, istosmjerni signal plamena. Najčešće je to fotomultiplicirajuća cijev koja ovisno o intenzitetu svjetlosti stvara električnu struju (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999).

### 5) Sustav za obradu podataka

Električna struja, nastala u detektoru, prenosi se do sustava za obradu podataka. Struja se pretvara u signal koji obradom predstavlja koncentraciju ili masu metala u uzorku (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999).

Shematski prikaz spektrofotometra prikazan je na Slici 3.





Slika 3. Shematski prikaz spektrofotometra (preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.quora.com>)

### 1.3 Validacija analitičkog postupka

Validacija analitičkog postupka je proces kojim se utvrđuje i dokumentira prikladnost ispitivanog postupka za određenu primjenu. Validacija određenog postupka jamči nam da će se primjenom istog, u propisanim i točno definiranim uvjetima, dobiti valjani rezultati. Prema regulatornim zahtjevima GMP<sup>7</sup> i GLP<sup>8</sup> postupci validacije analitičkih postupaka postali su obavezni i neizbježni. Validacija se provodi pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode, kao i pri promjeni bilo kojeg dijela već postojeće validirane analitičke metode. Definirane su analitičke značajke i parametri koji se određuju u postupku validacije, a to su preciznost, specifičnost i selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i radno područje, točnost te izdržljivost metode. U postupku validacije već postojeće metode nije potrebno ispitivati sve analitičke parametre. Koji od njih će se ispitivati ovisit će o namjeni same metode. Na primjer, pri ispitivanju graničnih vrijednosti onečišćenja prosuđuje se specifičnost/selektivnost te granica dokazivanja, dok se u postupcima određivanja sadržaja ispituje točnost, preciznost, specifičnost/selektivnost, linearnost te radno područje (Nigović i sur., 2014; Szpunar i sur., 1997).

<sup>7</sup> GMP- Dobra proizvođačka praksa (engl. *Good manufacturing practise*)

<sup>8</sup> GLP- Dobra laboratorijska praksa (engl. *Good laboratory practise*)

- Preciznost

Preciznost analitičke metode je njena sposobnost da pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Potrebno je izvršiti najmanje 5-6 određivanja za 2-3 različite koncentracije kako bi se dobili valjani rezultati. Najčešće se izražava kao relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD, %), a izračunava se prema formuli:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

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

Preciznost se može izraziti kao ponovljivost (engl. *Repeatability*), srednja preciznost (engl. *Intermediate Precision*) i obnovljivost (engl. *Reproducibility*). Ponovljivost predstavlja podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom razdoblju (preciznost u seriji). Srednja preciznost, često nazvana i reproducibilnost unutar laboratorija, iskazuje odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti dani, analitičari, instrumenti). Obnovljivost, tj. reproducibilnost među laboratorijima, označava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima (Nigović i sur., 2014).

- Točnost

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih referentnih vrijednosti. Točnost metode pokazuje sustavne pogreške te se treba stalno ispitivati i kontrolirati u laboratoriju s obzirom na velik broj čimbenika koji mogu utjecati: pogreške instrumenta u radu analitičara, upitna ispravnost i čistoća pribora, kvaliteta standarda korištenog u kalibraciji i ostalo. Za utvrđivanje točnosti potrebno je provesti najmanje 3 mjerenja uzorka za najmanje 3 koncentracije u radnom području metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuje kao analitički prinos (engl. *Recovery*) definiran formulom:

$$R = \frac{\bar{x}}{X} \times 100$$

gdje  $\bar{x}$  predstavlja srednju izmjerenu vrijednost, a *X* stvarnu vrijednost analita u uzorku (Nigović i sur., 2014).

- Specifičnost/selektivnost

Specifičnost analitičke metode predstavlja njezinu sposobnost da nedvojbeno razlikuje samo jednu komponentu od ostalih prisutnih u uzorku. Selektivnost analitičke metode predstavlja mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti matrice, odnosno ostalih komponenata uzorka, poput onečišćenja, razgradnih produkata i pomoćnih tvari. Najveći stupanj selektivnosti zapravo predstavlja specifičnost. Metode se opisuju kao više ili manje selektivne, dok specifičnost govori o tome je li analit prisutan u uzorku ili nije (Nigović i sur., 2014).

- Linearnost

Linearnost analitičke metode predstavlja njezinu sposobnost da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Ona se utvrđuje kroz 3-6 mjerenja primjenom najmanje 5 različitih koncentracija analita. Grafičkim prikazom ovisnosti izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja. Kalibracijska krivulja karakterizirana je jednadžbom pravca  $y = ax + b$  i koeficijentom korelacije regresijskog pravca  $R^2$ , a preporuka je da  $R^2$  bude veći od 0,999 (Nigović i sur., 2014).

- Radno područje

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

- Granica dokazivanja i određivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima pojedine analitičke metode. Granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće odrediti određenom analitičkom metodom s prihvatljivom točnošću i preciznošću, pri propisanim uvjetima. LOD i LOQ se određuju razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD = 3:1 ili 2:1, LOQ = 10:1), a računaju iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca. Granica dokazivanja i određivanja opisane su formulama:

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

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

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

- Izdržljivost/otpornost

Izdržljivost ili otpornost analitičke metode je mjera njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih, promjena parametara metode. Za prosudbu izdržljivosti, varira se jedan parametar, a ostali ostaju nepromijenjeni. Pokazatelj je pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine normalne promjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize (Nigović i sur., 2014).

#### 1.4 Pogreške analitičkih mjerenja

Zbog nesavršenosti mjernih instrumenata i naših osjetila, nijedno mjerenje nije apsolutno točno. Svako mjerenje podložno je mnogobrojnim vanjskim očekivanim i neočekivanim utjecajima. Oštrina ljudskog razlučivanja kao i razlučivanje mjernih instrumenata je ograničena, stoga pojedinačni rezultati mjerenja nerijetko odstupaju od referentnih općeprihvaćenih vrijednosti. Postoje tri vrste pogrešaka analitičkih mjerenja: sustavne (sistemske), grube i slučajne. **Sustavne** pogreške nastaju zbog neispravnih mjernih instrumenata, izbora pogrešne metode ili njenog pogrešnog izvođenja. Njih smanjujemo provjerom instrumenata i poboljšanjem aparature. **Grube** pogreške nastaju ljudskim propustima u toku mjerenja, naglim poremećajem u okolini ili u mjernom uređaju. Rezultat su grubog propusta u mjernom postupku. Analitičar može zabilježiti krivu vrijednost, krivo očitati, zaboraviti znamenku prilikom očitavanja ili napraviti drugi sličan propust. Rezultati dobiveni kao posljedica ovakvih pogrešaka trebali bi vidljivo odskakati od ostalih i oni se u pravilu isključuju iz analize podataka. **Slučajne** pogreške mogu se smanjivati, ali ne daju se potpuno izbjeći. To su pogreške koje donosi samo mjerenje. Uzrokovane su iznenadni promjenama u eksperimentalnim uvjetima (npr. bukom) ili kao posljedica umora analitičara. Boljom izolacijom od okoline i savršenijim uređajem mogu se smanjivati do određenih granica. Vrijednosti nastale kao posljedice slučajnih pogrešaka pozitivne su ili negativne i proizvoljno su raspršene oko prave vrijednosti. Mogući uzroci nastanka ovakvih pogrešaka su

npr. neočekivana promjena vlage i temperature ili kolebanje napona. Za razliku od sistemskih pogrešaka, slučajne pogreške mogu se obraditi statističkom analizom (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999).

## **2 OBRAZLOŽENJE TEME**

Cink je esencijalni element nužan i neophodan za pravilan rast, razvoj i funkcioniranje ljudskog organizma. Ovaj mineral nalazi se gotovo u svakoj stanici i neophodan je za sudjelovanje u važnim biološkim funkcijama. Ima visoki antioksidativni potencijal i sastavni je dio tristotinjak enzima gdje kao kofaktor sudjeluje u sintezi i razgradnji ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Važan je u stvaranju, razvijanju i održavanju imunološkog sustava te sudjeluje u zacjeljivanju rana, povreda i opekotina. Potreban je u konverziji vitamina A u njegov aktivni oblik te ima važnu ulogu u produkciji hormona testosterona i balansiranju inzulina u tijelu čovjeka. Svojim antioksidativnim karakterom sudjeluje u obrani organizma od slobodnih i štetnih radikala. Svaka pa i najmanja promjena koncentracije cinka u organizmu može dovesti do razvoja i progresije brojnih lakših i težih akutnih te kroničnih bolesti. Akrodermatitis enteropatika primjer je poremećaja metabolizma cinka što za posljedicu ima nedostatak istog u organizmu. Manjak cinka manifestira se u obliku upale kože s osipom (pustularni dermatitis) oko usta i/ili anusa, pojavom dijareje, pucanjem kose i pojavom distrofije noktiju. U bolesti su moguća stanja razdražljivosti i emocionalnih poremećaja. Nadalje, iznimno je važno regulirati status svih esencijalnih nutrijenata u organizmu, pa tako i cinka. U slučaju pojave deficita cinka u organizmu potrebno je prilagoditi prehranu ili pomoću suplemenata nadomjestiti manjak istog. Na tržištu postoje razni farmaceutski oblici i načini unosa cinka u organizam, ipak najznačajniji način suplementacije cinkom je onaj putem tableta ili kapsula. Suficit cinka u ljudi je rijedak, ali u slučaju akutnog ili kroničnog trovanja cinkom, potrebno je u što kraćem vremenu vratiti status u normalu, npr. primjenom kelatora dimerkaprola.

Cilj ovog diplomskog rada je validirati metodu plamene apsorpcijske spektrofotometrije i primjenom iste precizno te pouzdano odrediti sadržaj cinka u odabranim uzorcima dodataka prehrani. Nadalje, usporedbom izmjerenih podataka s onima priloženim na deklaracijama sastava uzoraka, trebalo je ustvrditi zadovoljavaju li ispitivani suplementi zahtjevima deklariranih normi.

### **3 MATERIJALI I METODE**



## 3.1 Materijali

### 3.1.1 Korištene kemikalije

- Zn-standard za AAS, koncentracije 1000 mg/L (Sigma, Aldrich, Njemačka)
- 65 % HNO<sub>3</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2 % HNO<sub>3</sub>
- 5 % HNO<sub>3</sub>
- 0,16 M HNO<sub>3</sub>
- 7,9 M HNO<sub>3</sub>
- ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm<sup>-1</sup>)

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

### 3.1.2 Aparatura

Mjerenja su provedena na atomsko apsorpcijskom spektrofotometru Aanalyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) kojeg karakteriziraju parametri:

- žarulja: žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
- valna duljina (nm): 213,9
- gorivo/oksidans: acetilen/zrak
- acetilen (tlak (Pa)/protok (dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>)): 0,9x10<sup>5</sup>/2
- zrak (tlak (Pa)/protok (dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>)): 5,5x10<sup>5</sup>/17
- širina pukotine (nm): 0,7
- korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- fotodetektor
- pisac, računalo: AA Winlab 32 Software Dell OptiPlex GX270, računalo + monitor + printer HP 5652

### 3.1.3 Laboratorijski pribor i posuđe

- tarionik s pistilom
- plastična kartica (špatula)
- filter papir
- stakleni lijevak
- metalni tronožac s držačem za lijevak
- staklene čaše volumena 100 mL, 250 mL i 500 mL

- odmjerne tikvice veličine 10,00 mL, 20,00 mL i 25,00 mL, 500,00 mL, 1000,00 mL
- automatske mikropipete veličine 5-50  $\mu$ L, 50-200  $\mu$ L i 200-1000  $\mu$ L
- plastične kapaljke
- staklena graduirana pipeta
- magnetski mješač

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema otopina dušične kiseline različitih koncentracija

- 2 %-tna HNO<sub>3</sub>

2 %-tna otopina HNO<sub>3</sub> dobivena je razrjeđivanjem 10,00 mL 65 %-tne (koncentrirane) dušične kiseline ultračistom vodom i nadopunjavanjem u odmjernoj tikvici volumena 500,00 mL. Dobivena otopina korištena je za ispiranje plamenog atomizatora.

- 5 %-tna HNO<sub>3</sub>

5 %-tna otopina HNO<sub>3</sub> dobivena je razrjeđivanjem 50,00 mL 65 %-tne (koncentrirane) dušične kiseline ultračistom vodom i nadopunjavanjem u odmjernoj tikvici volumena 1000,00 mL. Dobivena otopina korištena je za pranje laboratorijskog posuđa.

- 0,16 M HNO<sub>3</sub>

0,16 mol/L otopina dušične kiseline dobivena je razrjeđivanjem 11,08 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> ultračistom vodom i nadopunjavanjem u odmjernoj tikvici volumena 1000,00 mL. Dobivena otopina korištena je u procesu ekstrakcije cinka iz primarnih čvrstih ljekovitih oblika uzoraka suplemenata.

- 7,9 M HNO<sub>3</sub>

7,9 mol/L otopina dušične kiseline dobivena je razrjeđivanjem 273,50 mL koncentrirane dušične kiseline (65 %) ultračistom vodom i nadopunjavanjem u odmjernoj tikvici volumena 1000,00 mL. Dobivena otopina korištena je u procesu ekstrakcije cinka iz primarnih čvrstih ljekovitih oblika uzoraka suplemenata.

### 3.2.2 Priprema standardne otopine cinka

Razrjeđivanjem 2,00 mL primarnog standarda cinka (Stock1 otopina, koncentracije 1000) ultračistom vodom i nadopunjavanjem, u odmjernoj tikvici volumena 20,00 mL, dobivena je matična standardna otopina cinka koncentracije 100 mg/L (Stock2 otopina). Razrjeđivanjem 20 µL matične standardne otopine cinka (Stock2 otopina) i nadopunjavanjem ultračistom vodom, u odmjernoj tikvici volumena 20,00 mL, dobivena je otopina ST1 koncentracije 0,2 mg/L. Ostale standardne otopine cinka (ST2, ST3, ST4, ST5 i ST6),

potrebne za dobivanje kalibracijskog pravca, pripremljene su istim načinom kao i ST1, a podaci su prikazani u Tablici 3:

Tablica 3. Koncentracije i priprema standardnih otopina cinka

| Koncentracija standarda cinka (mg/L) | Priprema standarda  | Ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu (100 mg/L) |
|--------------------------------------|---|---|
| 0,2 (ST1)                            | 20 $\mu$ L Stock2 otopine cinka konc. 100 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 20,00 mL  | 500x  |
| 0,5 (ST2)                            | 50 $\mu$ L Stock2 otopine cinka konc. 100 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 20,00 mL  | 200x  |
| 1,5 (ST3)                            | 150 $\mu$ L Stock2 otopine cinka konc. 100 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 20,00 mL | 66,67x  |
| 2,5 (ST4)                            | 250 $\mu$ L Stock2 otopine cinka konc. 100 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 20,00 mL | 40x   |
| 5,0 (ST5)                            | 500 $\mu$ L Stock2 otopine cinka konc. 100 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 20,00 mL | 20x   |
| 6,5 (ST6)                            | 650 $\mu$ L Stock2 otopine cinka konc. 100 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 20,00 mL | 15,38x  |

### 3.2.3 Priprema uzoraka suplemenata za analizu cinka

Jedna tableta uzorka suplementa pistilom se usitni u tarioniku te se usitnjeni prah, pomoću plastične špatule, kvantitativno prenese u čašu od 100 mL. U čašu s usitnjenim uzorkom dodaje se 20,00 mL 7,9 M HNO<sub>3</sub> i sadržaj se lagano promiješa. Čašu sa sadržajem, u koju smo prethodno stavili magnet za miješanje, miješamo 5 minuta na magnetnoj miješalici umjerenom brzinom. Nakon petominutnog miješanja, sadržaj se pusti mirovati 5 minuta, a nakon toga se kvantitativno filtrira u odmjernu tikvicu od 100,00 mL. Ekstrakcija cinka ponavlja se 2 puta sa po 20 mL 0,16 M HNO<sub>3</sub>. Filtar papir se ispiri s 0,16 M HNO<sub>3</sub> i

odmjerna tikvica u koju se skuplja filtrat nadopuni se do oznake istom kiselinom. Tako je dobivena primarna otopina uzorka u tikvici volumena 100,00 mL (White, 2003).

Za analizu AAS-om dobivenu primarnu otopinu potrebno je razrijediti 1000 puta u odmjernu tikvicu od 10,00 mL (White, 2003). Sadržaj prethodno pripremljene otopine uzorka potrebno je dobro promiješati i odmah nakon toga otpipetirati 0,1 mL otopine te nadopuniti ultračistom vodom do 10,00 mL. Uzorak je spreman za kvantitativno određivanje cinka atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom.

Uzorci dodataka prehrani prikupljeni su od različitih proizvođača tijekom 2017. godine. Za svaki od 4 uzoraka suplemenata potrebno je prethodno opisani proces ponoviti 2 puta pri čemu se dobije 8 različitih otopina uzoraka za analizu.

Sve pripremljene otopine uzoraka prikladno su označene i čuvane na adekvatan način. Pripremljene otopine standarda, zajedno s otopinama uzoraka, držane su u hladnjaku termostatiranom na 4 °C.

#### **3.2.4 Postupak određivanja koncentracije cinka u uzorcima AAS-om**

Princip ove metode je mjerenjem apsorpcije uzorka odrediti koncentracije cinka u različitim uzorcima suplemenata. Prilikom gorenja uzorka dolazi do procesa atomizacije, a nastali se atomi metala cinka izlažu linijskom zračenju specifične valne duljine (213,9 nm). Promjena intenziteta zračenja detektirana je fotodetektorom, a software instrumenta prevodi intenzitet zračenja u koncentraciju metala u uzorku (Skoog i sur., 1999; Watson, 1999). Na temelju dobivenih podataka, naknadnom obradom podataka u Microsoft Excelu dobivamo koncentracije metala u uzorcima.

Prije svake upotrebe, instrument je potrebno kalibrirati prethodno pripremljenim koncentracijskim nizom standardnih otopina cinka. Nakon kalibracije instrumenta, tj. izrade kalibracijskog pravca, moguće je provesti određivanje cinka u uzorcima suplemenata. Uzorci se homogeniziraju protresivanjem odmjernih tikvica i aspiriraju pomoću plastične cjevčice na način da se cjevčica uroni u otopinu uzorka pri čemu uređaj automatski kontinuirano usisava otopinu. Budući da uređaj omogućuje višestruko uzastopno mjerenje i analizu istog homogenog uzorka u kratkom periodu, temeljem unaprijed obavljenog podešavanja, provode se 3 mjerenja te izračunava prosječna vrijednost.

Plameni atomizator i gumena cjevčica se prije svakog mjerenja ispiru i pročišćuju desetominutnom aspiracijom 2 %-tne HNO<sub>3</sub>, a potom i destiliranom vodom. Svaki od prethodno pripremljenih uzoraka mjerimo u triplikatu. Slijepa proba je ultračista voda. Određivanje cinka u uzorcima suplemenata provedeno je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 213,9 nm. Na temelju dobivenih rezultata mjerenja, obradom podataka u Microsoft Excelu izračunate su koncentracije cinka u uzorcima suplemenata.

Postupak validacije i protokol analitičke metode trebaju biti detaljno opisani kako bi ih svaki analitičar mogao ponoviti. Opis analitičke metode uključuje pripravu uzorka, poredbenih tvari i reagensa, opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize te primjenu formula za izračunavanje rezultata analize (Nigović i sur., 2014).

### **3.2.5 Statistička analiza**

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i Prism GraphPad (Graph pad Software, Inc., San Diego, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija šest neovisnih određivanja. Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Svi doneseni zaključci u radu provedeni su uz razinu značajnosti  $P < 0,05$ .

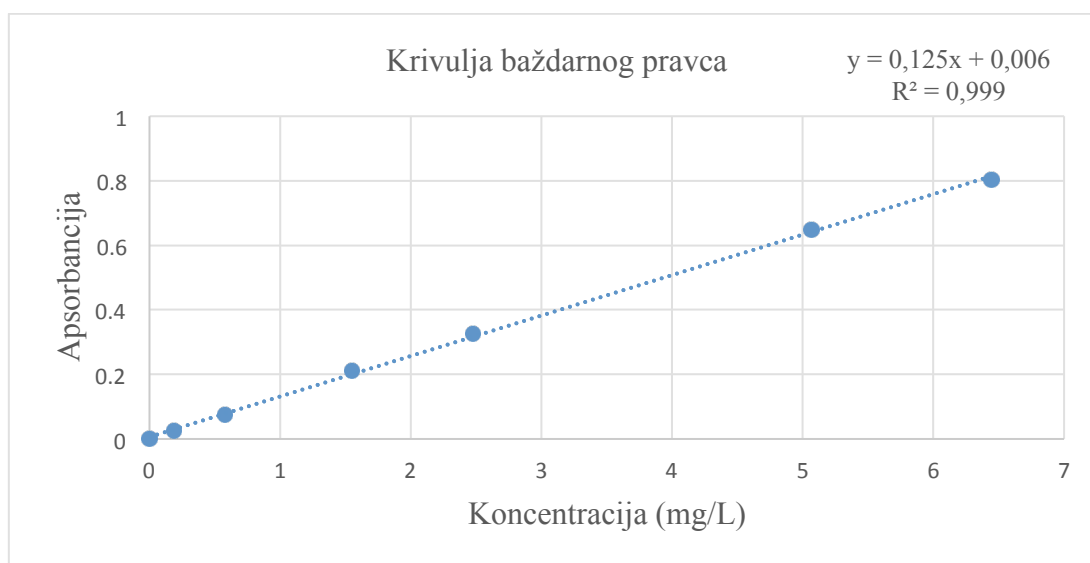
## **4    REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1 Validacija analitičke metode

Temeljem izrađenih otopina standarda cinka, uzoraka i slijepe probe u provedenoj analizi ispitivani su sljedeći validacijski parametri: linearnost, preciznost, granica dokazivanja i granica određivanja (Nigović i sur., 2014). Mjerenja su provedena korištenjem FAAS metode na spektrofotometru Aanalyst 800.

### 4.1.1 Linearnost

Pripremljen je koncentracijski niz otopina standarda cinka (ST1 do ST6) i utvrđena je linearnost analitičke metode na način da je za svaku koncentraciju standarda izmjeren triplikat i izračunata srednja vrijednost. Tako se dobije kalibracijska krivulja, odnosno graf ovisnosti odaziva detektora o koncentraciji standarda cinka. Kalibracijska krivulja karakterizirana je jednadžbom pravca  $y = ax + b$  i koeficijentom korelacije regresijskog pravca  $R^2$  (Nigović i sur., 2014). Krivulja baždarnog pravca opisanog jednadžbom pravca prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Krivulja baždarnog pravca

Dobivena je jednadžba pravca  $y = 0,125 + 0,006$  s koeficijentom korelacije  $R^2 = 0,999$ . Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da je metoda linearna za određivanje koncentracije cinka u uzorcima suplemenata.

### 4.1.2 Preciznost

Kao što je opisano u uvodu (poglavlje 1.3), preciznost analitičke metode predstavlja njenu sposobnost podudaranja između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim



uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Na temelju izvršenih 5-6 određivanja za 2-3 različite koncentracije preciznost se iskazuje kao relativna standardna devijacija u postotku. Razlikuju se preciznost u seriji, tj. u kraćem vremenskom periodu (ponovljivost u danu), preciznost iz dana u dan (srednja preciznost ili reproducibilnost unutar laboratorija) i preciznost vezana uz različite laboratorije (Nigović i sur., 2014). U ovom istraživanju određene su ponovljivost i srednja preciznost analitičke metode.

Ponovljivost analitičke metode utvrđena je provođenjem 6 mjerenja za 3 različite koncentracije standarda u kraćem vremenskom periodu unutar istog dana. Dobivene vrijednosti ponovljivosti prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Izmjerene koncentracije 3 standarda cinka dobivene unutar istog dana

|   | <b>ST1</b><br>(0,2 mg/L) | <b>ST4</b><br>(2,5 mg/L) | <b>ST6</b><br>(6,5 mg/L) |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>1. mjerenje</b>                              | 0,250                    | 2,586                    | 6,825                    |
| <b>2. mjerenje</b>                              | 0,248                    | 2,621                    | 6,82                     |
| <b>3. mjerenje</b>                              | 0,256                    | 2,603                    | 6,847                    |
| <b>4. mjerenje</b>                              | 0,258                    | 2,596                    | 6,827                    |
| <b>5. mjerenje</b>                              | 0,263                    | 2,593                    | 6,848                    |
| <b>6. mjerenje</b>                              | 0,253                    | 2,587                    | 6,878                    |
| <b>Srednja vrijednost</b>                       | 0,256                    | 2,600                    | 6,844                    |
| <b>Standardna devijacija (SD)</b>               | 0,006                    | 0,013                    | 0,226                    |
| <b>Relativna standardna devijacija, RSD (%)</b> | 2,19                     | 0,50                     | 0,33                     |

Vrijednosti RSD za nisku koncentraciju ST1 neznatno odstupaju od preporučene i prihvatljive vrijednosti (do 2 %). Vrijednosti RSD koncentracija standarda 4 i standarda 6 unutar su granice prihvatljivosti.

Osim ponovljivosti unutar dana, ispitivana je i srednja preciznost analitičke metode (obnovljivost unutar laboratorija kroz nekoliko dana ili reproducibilnost). Mjerenja za tri različite koncentracije standarda provedena su kroz tri dana te su dobivene sljedeće vrijednosti reproducibilnosti prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Izmjerene koncentracija 3 standarda cinka dobivene kroz 3 dana

|   | <b>ST1</b><br>(0,2 mg/L) | <b>ST4</b><br>(2,5 mg/L) | <b>ST6</b><br>(6,5 mg/L) |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Dan 1</b>                                    | 0,142                    | 2,556                    | 6,412                    |
| <b>Dan 2</b>                                    | 0,199                    | 2,546                    | 6,442                    |
| <b>Dan 3</b>                                    | 0,256                    | 2,600                    | 6,844                    |
| <b>Srednja vrijednost</b>                       | 0,199                    | 2,567                    | 6,567                    |
| <b>Standardna devijacija (SD)</b>               | 0,057                    | 0,029                    | 0,241                    |
| <b>Relativna standardna devijacija, RSD (%)</b> | 28,36                    | 1,12                     | 3,67                     |

Iz dobivenih vrijednosti RSD za srednju preciznost, nakon mjerenja 3 standarda tijekom 3 dana, može se zaključiti da je metoda precizna za određivanje koncentracije cinka u uzorcima dodataka prehrani. Uočeno je da kod vrlo niskih koncentracija cinka (0,2 mg/L) dolazi do značajnog odstupanja od referentnih granica prihvatljivosti za RSD (do 3 %), što se može objasniti manjom stabilnošću standarda pri nižim koncentracijama. Isto tako, kod koncentracije 6,5 mg/L uočeno je neznatno odstupanje (3,67 %) od zadanih granica prihvatljivosti RSD.

#### 4.1.3 Granica dokazivanja i određivanja

Standardna devijacija  $\sigma$  iznosila je 0,0110, a nagib regresijskog pravca  $a$  je 0,1374. Prema formulama opisanim u uvodnom poglavlju (poglavlje 1.3) izračunate su granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) te su njihove vrijednosti iznosile:

$$\text{LOD} = 0,264 \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 0,801 \text{ mg/L}$$

#### 4.2 Primjena validirane analitičke metode za određivanje koncentracije cinka u uzorcima

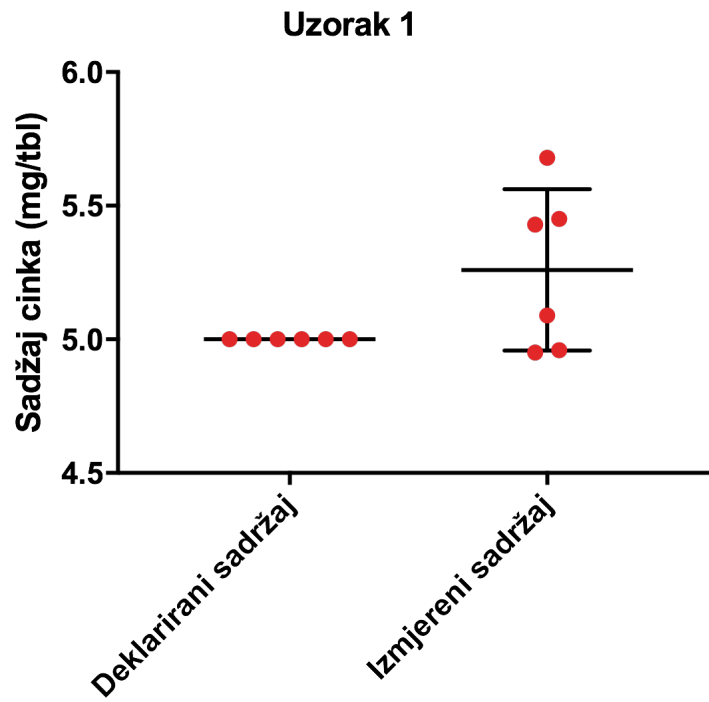
Nakon optimiziranja i validiranja metode provedena su određivanja koncentracija cinka u 4 različita uzorka dodataka prehrani prikupljenih od različitih proizvođača tijekom 2017. godine. Ranije opisanim postupkom pripremljene su primarne otopine svakog od

uzorka u odmjerne tikvice volumena 100,00 mL. Primarne otopine uzoraka razrjeđivale su se (1:1000) svaka po dva puta u tikvice volumena 10,00 mL. Otopine uzoraka rađene su u duplikatu kako bi svaki uzorak imao svoju kontrolu. Tako je dobiveno 8 uzoraka koji su bili podvrgnuti analizi. Svaki od uzoraka mjeran je 6 puta. Mjerenjem su dobivene koncentracije cinka u ispitivanim uzorcima, a naknadnom obradom podataka dobivene su mase cinka izražene u mg po jednoj tableti za svaki od uzoraka. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 6.

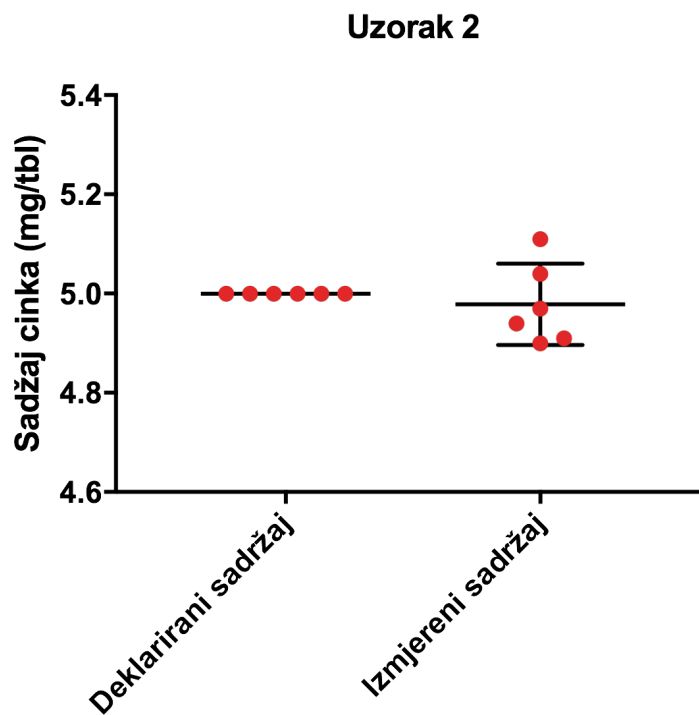
Tablica 6. Izmjerene mase cinka u uzorcima suplemenata izražene u mg po tableti

|   | <b>Uzorak 1 (n=6)</b><br>(mg/tbl) | <b>Uzorak 2 (n=6)</b><br>(mg/tbl) | <b>Uzorak 3 (n=6)</b><br>(mg/tbl) | <b>Uzorak 4 (n=6)</b><br>(mg/tbl) |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Srednja vrijednost</b>                       | 5,18                              | 4,98                              | 9,46                              | 9,31                              |
| <b>Srednja vrijednost ± SD</b>                  | 5,18 ± 0,25                       | 4,98 ± 0,09                       | 9,46 ± 0,44                       | 9,31 ± 0,16                       |
| <b>Relativna standardna devijacija, RSD (%)</b> | 4,78                              | 1,83                              | 4,65                              | 1,71                              |

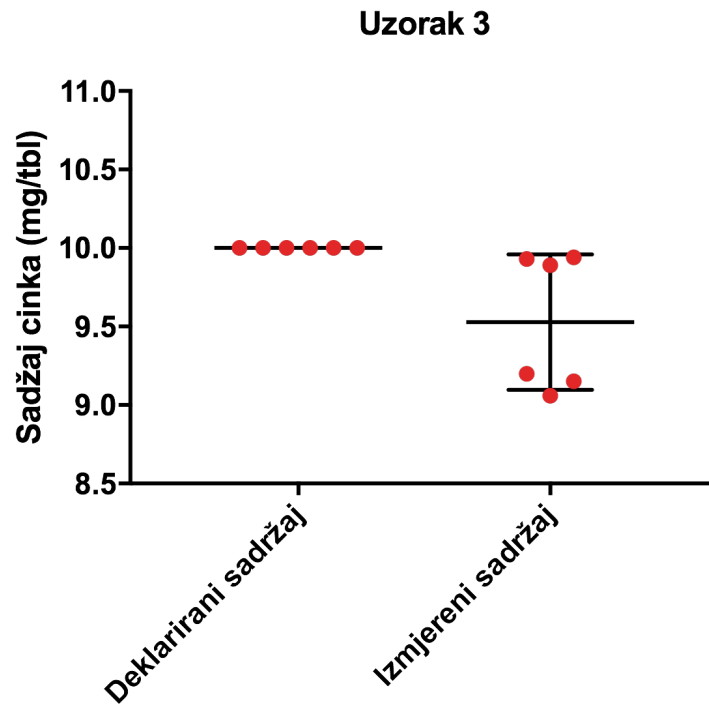
Na Slikama 5, 6, 7 i 8 prikazana je usporedba deklariranih vrijednosti sadržaja cinka s izmjerenim vrijednostima u ispitivanim uzorcima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija 6 neovisnih određivanja.



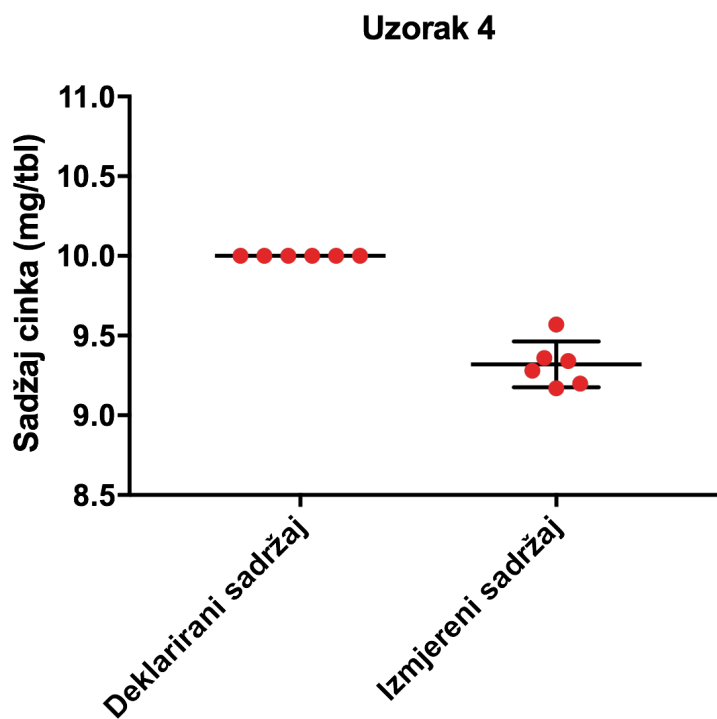
Slika 5. Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja u uzorku 1



Slika 6. Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja u uzorku 2

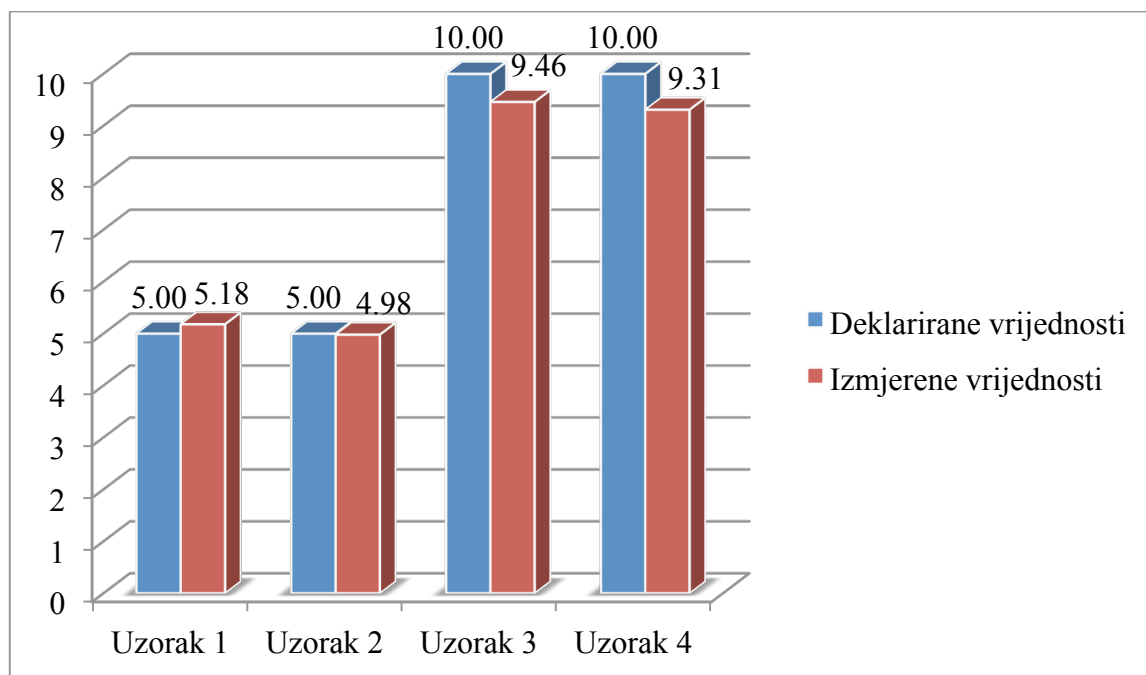


Slika 7. Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja u uzorku 3



Slika 8. Odnos deklariranog i izmjerenog sadržaja u uzorku 4

Odnos deklarirane vrijednosti masa cinka s masama dobivenim mjerenjem uzoraka prikazani su dijagramom na Slici 9.



Slika 9. Odnos deklariranog sadržaja cinka i masa određenih mjerenjem uzoraka izraženih u mg po tableti

Iz dijagrama odnosa deklariranog sadržaja i konačno dobivenih masa cinka vidljivo je da izmjerene vrijednosti uzorka 1 premašuju masu od 5 mg po tableti (5,18 mg/tbl). Vrijednosti uzorka 3 nešto su niže (9,46 mg/tbl), ali u okviru očekivanih, dok su vrijednosti uzorka 4 dosta niže od očekivanih (9,31 mg/tbl). Vrijednost uzorka 2 (4,98 mg/tbl) pokazuje najbližu vrijednost deklarativnoj masi.

Statistička obrada dobivenih vrijednosti, korištenjem t-testa, pokazala je da kod prva dva uzorka ne postoji statistički značajna razlika između deklariranog sadržaja i izmjerenog ( $P = 0,3636$ ), dok je kod druga dva uzorka prisutna statistički značajna razlika ( $P = 0,0022$ ).

Dobivanje većih i manjih neočekivanih vrijednosti mogu se objasniti kroz sustavne, slučajne i grube pogreške nastale u svim koracima provedenog istraživanja (Harris, 2010; Skoog i sur., 1999). Previdi i pogreške analitičara nerijetko su uzrok dobivanja rezultata koji odstupaju od očekivanih. Adekvatno oprano i pripremljeno laboratorijsko posuđe te pribor ključni su za dobivanje točnih i relevantnih rezultata. Postoji mogućnost da je zbog umora ili nepažnje analitičara došlo do pogrešnog pipetiranja ili neadekvatnog nadopunjavanja

odmjernih tikvica. Nadalje, u procesu ekstrakcije cinka iz tableta moguće je da su zaostale manje količine istog na stjenkama tarionika i pistila ili na filter papiru. Posljedica toga je narušavanje kvantitativnosti i u konačnici dobivanje manjih vrijednosti rezultata. Isto tako, moguće je da sam protokol ekstrakcije cinka iz uzoraka suplemenata nije apsolutne učinkovitosti. Prilikom pripreve otopine uzorka 4 uočeno je da su se procesi otapanja tablete i filtracije odvijali znatno teže i sporije u odnosu na ostale uzorke. Pretpostavka je da su ti procesi bili usporeni zbog sastava pomoćnih tvari samih tableta. U tom slučaju moguće je da ekstrakcija cinka iz tableta nije bila potpuna, što bi objasnilo dobivanje manjih rezultata od očekivanih. Isto tako, sistemske pogreške, koje se odnose na sam spektrofotometar i proces mjerenja, također mogu biti uzrok dobivenih rezultata koji odstupaju od očekivanih.

Osim toga, moguće je da sadržaj cinka u odabranim tabletama, koje su bile podvrgnute analizama, odstupa od masa navedenih na deklaracijama proizvoda.

## 5 ZAKLJUČAK



Nakon provedenog istraživanja, temeljem dobivenih rezultata i rasprave definirani su sljedeći zaključci:

- AAS je jednostavna, jeftina, brza i pouzdana analitička metoda za određivanje koncentracije metala u uzorcima. AAS ima široku primjenu kako u farmaceutskim tako i u ostalim biomedicinskim područjima.
- U ispitivana 4 uzorka dodataka prehrani potvrđeno je prisutnost elementa cinka. Cink je detektiran u rasponu od 4,98 do 9,46 mg/tbl.
- Konačne dobivene mase cinka u prva 2 uzorka dodataka prehrani ne odstupaju značajno od masa navedenih na deklaracijama. Kod druga dva uzorka postoji statistički značajna razlika, ali u dopuštenim okvirima. Zaključno, analitička metoda pokazala se primjenjivom za pouzdano i precizno određivanje sadržaja cinka u dodacima prehrani.

## 6 LITERATURA

Acrodermatitis Enteropathica, 2017., <https://www.medscape.com/>, pristupljeno 4.9.2018.

Al-Assaf NA. Determination of Serum Trace Elements Magnesium, Copper, Zinc, and Selenium in Asthmatic Patients by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Journal of Al-Nahrain University*, 2010, 20-25.

Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. Perkin-Elmer: Norwalk, CT, 1973.

Ata S, Wattoo FH, Ahmed M, Wattoo MHS, Tirmizi SA, Wadood A. A Method Optimization Study for Atomic Absorption Spectrophotometric Determination of Total Zinc in Insulin Using Direct Aspiration Technique. *Alexandria Journal of Medicine*, 2014, 19-23.

Berkow R, Beers HM, Fletcher JA. The Merck manual of medical information, Home Edition. Urednici: Ivančević Z, Bergovec M, Silobrčić V, Rumboldt Z, Malčić I, Mirić D, Cvitanović S. MSD Medicinski priručnik za pacijente, Drugo hrvatsko izdanje. Zagreb, Placebo d.o.o., 2008, str. 666, 674.

Cinkova pasta, 2018., <http://www.ljekarnasdz.hr/>, pristupljeno 17.8.2018.

Dart RC, Caravati EM, McGuigan MA, Whyte IM, Dawson AH, Seifert SA, Schonwald S, Yip L, Keyes DC, Hurlbut KM, Erdman AR. Medical toxicology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004, str. 1472-1473.

Donnici C Souza CC, Beinner MA, da Silva JBB. Fast Determination of Iron and Zinc in Hair and Human Serum Samples After Alkaline Solubilization by GF AAS. *Sociedade Brasileira de Quimica*, 2016, 119-126.

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

Hargis LG. Analytical Chemistry: Principles and Techniques. Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, 1988, str. 451-463.

Jignesh S, Vineeta K, Abhay S, Vilasrao K. Analytical Methods for Estimation of Metals. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2012, str. 146-163.

Kenkel J. Analytical Chemistry for Technicians, 2nd Edition. Lewis: Boca Raton, FL, 1994, str. 289-297.

Kovač Z i suradnici. Klinička patofiziologija – Etiopatogeni čvorovi. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 708-709, 2037-2038.

Murphy SP, Yates AA, Atkinson SA, Barr SI, DWyer J. History of Nutrition: The Long Road Leading to the Dietary Reference Intakes for the United States and Canada. *Advances in Nutrition an International Review Journal*, 2016, 157-168.

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.

Nutrient recommendations: Dietary reference intakes (DRI), 2018., <https://ods.od.nih.gov/>, pristupljeno 12.8.2018.

Nutritional Metal sin Food by AAS, [www.interchopen.com](http://www.interchopen.com), pristupljeno 20. 8. 2018.

Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VRR, Prasad LK. A Review on Role of Essential Trace Element sin Health and Disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2015, 75-85.

Pungor E. *A Practical Guide to Instrumental Analysis*. CRC: Boca Raton, FL, 1995, str. 115-149.

Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health. *An integrative review. Journal of Research in Medical Sciences*, 2013, 144-157.

Shema spektrofotometra, 2018, [www.quora.com](http://www.quora.com), pristupljeno 10.8.2018.

Siraj K, Kite SA. Analysis of Copper, Zinc and Lead using Atomic Absorption Spectrophotometer in ground Water of Jimma town of Southwestern Ethiopia. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 2013, 201-204.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Fundamentals of analytical chemistry, 6th Edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti V, Živković A. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 6-31, 489-620.

Szpunar J, Bettmer J, Robert M, Chassaigne H, Cammann K, Lobinski R, Donard OFX. Validation of the Determination of Copper and Zinc in Blood Plasma and Urine by ICP MS with Cross-flow and Direct Injection Nebulization, *Talanta*, 1997, 1389-1396

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 Agricultural Organisation of the United Nations. Geneva, 2004, str. 230-243.

Zinc Oxide Cream, 2018, [www.medbroadcast.com](http://www.medbroadcast.com), pristupljeno 15.8.2018.

Zinc, 2018, <https://ods.od.nih.gov/>, pristupljeno 7.8.2018.

## **7 SAŽETAK/SUMMARY**

Cink je značajan za rast, razvoj i pravilno funkcioniranje ljudskog organizma. Izuzetno je važan u razvoju i održavanju imunološkog sustava te sudjeluje u zacjeljivanju rana, povreda i opekotina. Svaka pa i najmanja promjena koncentracije cinka u organizmu može dovesti do razvoja i progresije brojnih bolesti (npr. akrodermatitis enteropatika). Nadalje, iznimno je važno regulirati status cinka u organizmu. U slučaju pojave deficita cinka u organizmu potrebno je prilagoditi prehranu ili pomoću suplemenata nadomjestiti njegov manjak. Na tržištu postoje razni farmaceutski oblici i načini unosa cinka u organizam, ipak najčešći način suplementacije je onaj putem tableta ili kapsula. Suficit cinka u ljudi je rijedak, ali u slučaju akutnog ili kroničnog trovanja cinkom, potrebno je u što kraćem vremenu vratiti status istog u normalu.

Cilj ovog istraživačkog rada bio je validirati AAS metodu te njenom primjenom precizno i pouzdano odrediti koncentraciju cinka u odabranim uzorcima suplemenata. Nadalje, usporedbom izmjerenih podataka s onima priloženim na deklaracijama sastava uzoraka, trebalo je ustvrditi zadovoljavaju li ispitivani suplementi zahtjevima deklariranih normi.

Analiza uzoraka provedena FAAS analitičkom metodom. Četiri uzorka dodataka prehrani sakupljeni su od različitih proizvođača tijekom 2017. godine. Cink iz tableta uzoraka suplemenata kvantitativno je ekstrahiran prema protokolu te je dobivena primarna otopina. Razrjeđivanjem primarne otopine (1:1000) dobivene su otopine koje su podvrgnute analizi. Svakog dana, prije mjerenja uzoraka, metoda je validirana te je pokazivala zadovoljavajuće vrijednosti validacijskih parametara. Nakon provedene trodnevne analize, rezultati su obrađeni i dobivene su vrijednosti masa cinka u uzorcima suplemenata. Usporedbom istih sa masama cinka navedenim na deklaracijama proizvoda uočena su mala odstupanja koja se mogu pripisati sistemskim, slučajnim i grubim pogreškama nastalim prilikom istraživanja. Osim toga, moguće je da sadržaj cinka u odabranim tabletama, koje su bile podvrgnute analizama, odstupa od masa navedenih na deklaracijama proizvoda.

Zinc is essential for the growth, development and proper functioning of the human body. Zinc plays an important role in cell proliferation, differentiation and metabolic activity of the cell. Any all change the zinc concentrations in the body can lead to the development and progression of many diseases (eg Acrodermatitis enteropathy). Furthermore, it is extremely important to regulate the status of zinc in the body. In the case of zinc defficiency in human body it is necessary to adjust the diet or supplements to compensate for its deficiency. There are various pharmaceutical forms and methods of zinc intake on the market, but the most commonly used route is tablet or capsule delivery. The levels of zinc increases in the case of acute or chronic poisoning with zinc in humans is rare.

The aim of this research work was to validate AAS method and to apply it precisely and reliably to determine the concentration of zinc in selected samples of supplements. Furthermore, by comparing the measured data with those provided in the sample composition declarations, it was necessary to ascertain whether the test complies with the requirements of the declared standards.

Sample analysis carried out by FAAS analytical method. Four samples of dietary supplements were collected from various manufactures during 2017. Zinc from the sample blend tables was quantitatively extracted to the protocol and a primary solution was obtained. Dilution of the primary solution (1:1000) provided solutions that were subjected to the assay. Every day, prior to sample measurement, the method was validated and showed satisfactory validation parameter values. After a three-day analysis, the results were processed and the values of zinc mass were obtained in the samples of supplements. Comparison of the same with the zinc masses mentioned on the product declarations has been shown to be minor deviations that can be attributed to systematic and random. In addition, it is possible that the content of zinc, in the selected samples, which were subjected to the analyzes, deviates from the masses indicated on the product declarations.



**8      TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### ODREĐIVANJE CINKA U UZORCIMA DODATAKA PREHRANI PRIMJENOM PLAMENE APSORPCIJSKE SPEKTROFOTOMETRIJE

**Bruno Rodak**

#### SAŽETAK

Cink je značajan za rast, razvoj i pravilno funkcioniranje ljudskog organizma. Izuzetno je važan u razvoju i održavanju imunološkog sustava te sudjeluje u zacjeljivanju rana, povreda i opekotina. Svaka pa i najmanja promjena koncentracije cinka u organizmu može dovesti do razvoja i progresije brojnih bolesti (npr. akrodermatitis enteropatika). Nadalje, iznimno je važno regulirati status cinka u organizmu. U slučaju pojave deficita cinka u organizmu potrebno je prilagoditi prehranu ili pomoću suplemenata nadomjestiti njegov manjak. Na tržištu postoje razni farmaceutski oblici i načini unosa cinka u organizam, ipak najčešći način suplementacije je onaj putem tableta ili kapsula. Suficit cinka u ljudi je rijedak, ali u slučaju akutnog ili kroničnog trovanja cinkom, potrebno je u što kraćem vremenu vratiti status istog u normalu.

Cilj ovog istraživačkog rada bio je validirati AAS metodu te njenom primjenom precizno i pouzdano odrediti koncentraciju cinka u odabranim uzorcima suplemenata. Nadalje, usporedbom izmjerenih podataka s onima priloženim na deklaracijama sastava uzoraka, trebalo je ustvrditi zadovoljavaju li ispitivani suplementi zahtjevima deklariranih normi.

Analiza uzoraka provedena FAAS analitičkom metodom. Četiri uzorka dodataka prehrani sakupljeni su od različitih proizvođača tijekom 2017. godine. Cink iz tableta uzoraka suplemenata kvantitativno je ekstrahirano prema protokolu te je dobivena primarna otopina. Razrjeđivanjem primarne otopine (1:1000) dobivene su otopine koje su podvrgnute analizi. Svakog dana, prije mjerenja uzoraka, metoda je validirana te je pokazivala zadovoljavajuće vrijednosti validacijskih parametara. Nakon provedene trodnevne analize, rezultati su obrađeni i dobivene su vrijednosti masa cinka u uzorcima suplemenata. Usporedbom istih sa masama cinka navedenim na deklaracijama proizvoda uočena su mala odstupanja koja se mogu pripisati sistemskim, slučajnim i grubim pogreškama nastalim prilikom istraživanja. Osim toga, moguće je da sadržaj cinka u odabranim tabletama, koje su bile podvrgnute analizama, odstupa od masa navedenih na deklaracijama proizvoda.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 9 grafičkih prikaza, 6 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: cink, dodatak prehrani, atomska apsorpcijska spektrofotometrija, validacija analitičke metode

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

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

**Doc. dr. sc. Suzana Inić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Prof. dr. sc. Živka Juričić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### ZINC DETERMINATION IN DIETARY SUPPLEMENTS WITH FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

**Bruno Rođak**

#### SUMMARY

Zinc is essential for the growth, development and proper functioning of the human body. Zinc plays an important role in cell proliferation, differentiation and metabolic activity of the cell. Any all change the zinc concentrations in the body can lead to the development and progression of many diseases (eg Acrodermatitis enteropathy). Furthermore, it is extremely important to regulate the status of zinc in the body. In the case of zinc defficiency in human body it is necessary to adjust the diet or supplements to compensate for its deficiency. There are various pharmaceutical forms and methods of zinc intake on the market, but the most commonly used route is tablet or capsule delivery. The levels of zinc increases in the case of acute or chronic poisoning with zinc in humans is rare.

The aim of this research work was to validate AAS method and to apply it precisely and reliably to determine the concentration of zinc in selected samples of supplements. Furthermore, by comparing the measured data with those provided in the sample composition declarations, it was necessary to ascertain whether the test complies with the requirements oft he declared standards.

Sample analysis carried out by FAAS analitical method. Four samples of dietary supplements were colected from various manufactures during 2017. Zinc from the sample blend tables was quantitatively extracted to the protocol and a primary solution was obtained. Dilution oft he primary solution (1:1000) provided solutions that were subjected to the assay. Every day, prior to sample measurement, the method was validated and showed satisfactory validation parameter values. After a three-day analysis, the result were processed and the values of zinc mass were obtained in the samples of supplements. Comparison of the same with the zinc masses mentioned on the product declarations has been shown to be minor deviations that can be attributetd to systematic and random. In additin, it is possible that the content of zinc, in the selected samples, which were subjected to the analyzes, deviations from the masses indicated on the product declarations.

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

Thesis includes: 43 pages, 9 figures, 6 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cinc, dietary supplements, atomic absorption spectroscopy, 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.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September 2018.