

# Optimizacija metode za određivanje cinka u uzorcima funkcionalnih voda plamenom atomskom apsorpcijskom spektroskopijom

---

Rebernik, Roko

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:811437>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



Repository / Repozitorij:

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



**Roko Rebernik**

**Optimizacija metode za određivanje cinka u  
uzorcima funkcionalnih voda plamenom  
atomsom apsorpcijskom spektroskopijom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020

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

Zahvaljujem doc. dr. sc. Jasni Jablan na pruženoj pomoći, stečenom znanju te uloženom vremenu i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Uloga cinka u organizmu .....	2
1.2. Toksičnost cinka.....	4
1.3. Deficit cinka.....	4
1.4. Interakcije cinka i lijekova .....	5
1.5. Izvori cinka i potrebe za unosom .....	6
1.6. Funkcionalne vode .....	7
1.7. Atomska apsorpcijska spektroskopija .....	8
1.8. Validacija analitičke metode .....	12
2. Obrazloženje teme.....	14
3. Materijali i metode .....	16
3.1. Materijali .....	17
3.1.1. Korištene kemikalije .....	17
3.1.2. Aparatura.....	17
3.1.3. Laboratorijsko posuđe i pribor .....	17
3.1.4. Uzorci.....	18
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprema otopina .....	18
3.2.2. Priprema uzoraka .....	19
3.2.3. Priprema uzoraka sa standardnim dodatkom otopine cinka poznate koncentracije.....	19
3.2.4. Određivanje sadržaja cinka u uzorcima .....	20
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	20
4. Rezultati i rasprava.....	21
4.1. Validacija analitičke metode .....	22
4.2. Određivanje sadržaja cinka u funkcionalnim vodama .....	27
5. Zaključak.....	29
6. Literatura.....	31
7. Sažetak/Summary.....	35
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card .....	

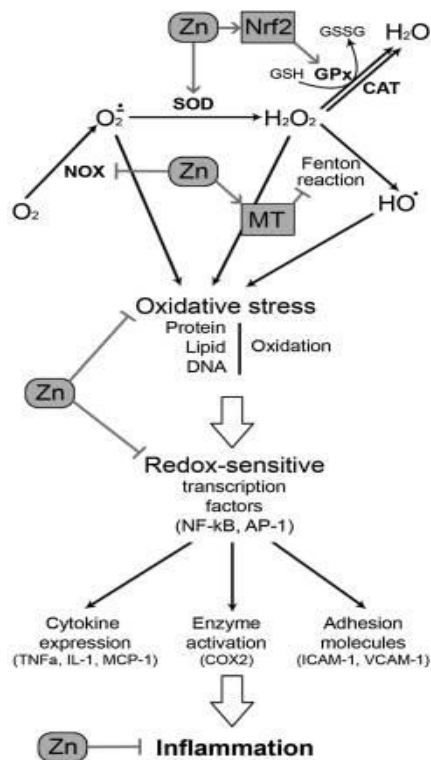
## 1. Uvod

## 1.1. Uloga cinka u organizmu

Cink je jedan od najvažnijih elemenata u tragovima za ljudski organizam s tri glavne biološke uloge, kao katalizator, strukturni i regulatorni ion. Cink-vezujući motivi pronađeni su kod mnogih proteina kodiranih ljudskim genomom, među kojima su RNA polimeraza, alkohol dehidrogenaza, karboanhidraza i alkalna fosfataza (Miller i sur.,1985; Krishna i sur. 2003). Ima važnu ulogu u imunološkom sustavu, oksidativnom stresu, apoptozi i starenju. (Prasad, 2008, [www.nrv.gov.au](http://www.nrv.gov.au)). Cink ima ključnu ulogu za normalan razvoj i funkciju stanica urođenog imunološkog sustava, neutrofila, makrofaga i stanica prirodnih ubojica (eng. Natural Killer Cells-NK Cells). Potvrđeno je, da su procesi fagocitoze, unutarstaničnog ubijanja i proizvodnje citokina ovisni o koncentraciji cinka. Sposobnost cinka da djeluje kao antioksidans i stabilizator membrana ukazuje da pomaže u prevenciji oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima tijekom upalnih procesa (Prasad, 2008).

Cink utječe i na razvoj i funkciju stanica stečenog imunološkog sustava, T i B limfocita. Cink je nužan za biološku aktivnost timulina, hormona timusa, koji se visokim afinitetom veže za receptore na T-stanicama i potiče ih na proizvodnju interleukina-2 (IL-2), receptora za interleukin 2 (IL-2R), alogenu citotoksičnost, ali i na supresorske funkcije. Osim za aktivnost timulina, dokazano je, da je vezanje nuklearnog faktora  $\kappa B$  (Nf- $\kappa B$ ) ovisno o cinku. Vezanje Nf- $\kappa B$  za DNA dovodi do transkripcije gena, među kojima su i oni za IL-2 i njegov receptor IL-2R. Spomenuti interleukin važan je za aktivaciju stanične imunosti posredovane T stanicama (Th1-odgovor) (Prasad, 2008).

Oksidacijski stres je jedan od uzročnika starenja i kroničnih bolesti kao što su dijabetes tipa dva, astma, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti i tumori. Cink inhibira NADPH oksidazu, enzim koji katalizira stvaranje superoksidnog aniona iz kisika koristeći NADPH kao donor elektrona. Superoksid dismutaza, enzim, koji prevodi superoksidni anion u vodikov peroksid u svom središtu zadrži cink. Na kraju katalaza prevodi vodikov peroksid u vodu i molekularni kisik. Osim što utječe na enzime koji sudjeluju u nastajanju reaktivnih kisikovih vrsta, cink potiče proizvodnju metalotioneina koji su izvrsni hvatači hidroksilnih radikala (Al-Assaf, 2010; Prasad, 2008, Maret, 2000).



Slika 1. Uloga cinka u pojedinim koracima oksidacijskog stresa. Preuzeto i prilagođeno iz J. Olechnowicz i sur, 2018

Ljudsko tijelo sadrži dva do tri grama cinka, a gotovo 90% se nalazi u kostima i mišićima. Ostali organi koji sadrže cink su: prostata, jetra, bubrezi, gastrointestinalni sustav, koža, pluća, mozak, srce i gušterača. Nakon oralnog uzimanja, cink se apsorbira u tankom crijevu te do drugih dijelova tijela dolazi plazmom u kojoj je vezan za albumin,  $\alpha$ -mikroglobulin i transferin. U samim stanicama, 30-40% cinka nalazi se u jezgri, 50% u citoplazmi, a ostatak u membranama. Homeostazu cinka u stanicama održava skupina cink-importera (Zip; Zrt-, Irt- slični proteini), koji transportiraju cink u citoplazmi i skupina cink-transportera (ZnT), koji transportiraju cink iz citoplazme. Isti transporteri reguliraju unutarstaničnu distribuciju cinka u endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijima i Golgijevom aparatu (Plum i sur., 2010; Maret, 2000).

Još jedna skupina proteina, koja sudjeluje u regulaciji količine cinka, su metalotioneini (MTs). Metalotioneini su proteini male molekulske mase (6-7 kDa) s velikim brojem cisteinskih ostataka i sposobnošću kompleksiranja metalnih iona. Jedna molekula metalotioneina može vezati do sedam cinkovih iona, a u stanici vežu do 20% unutar-staničnog cinka. Zbog različitog afiniteta veznog mjesta za metalni ion, metalotioneini djeluju i kao stanični puferi cinka (Smith i Nordberg 2014; Plum i sur., 2010).

Važno je još spomenuti da mnoge stanice sisavaca sadrže cinkosome, vezikularne strukture povezane s membranama koje sadrže velike količine cinka i oslobađaju ga nakon stimulacije faktorima rasta (Plum i sur., 2010).

## 1.2. Toksičnost cinka

Cink se u tijelo može apsorbirati dišnim, dermalnim i oralnim putem. Inhalacija para, koje sadrže cink, uglavnom se događa u industrijskim procesima kao što su galvanizacija i pogađa radnike u takvim tvornicama. Najpoznatija bolest uzrokovana inhalacijom cinkovih para je groznica uzrokovana metalnim parama (metal fume fever-MFF), a uzrokuje ju inhalacija cinkovog oksida, gdje je veličina čestica manja od jednog mikrometra (Vogelmeir i sur., 1987). Simptomi se javljaju nekoliko sati nakon izloženosti i uključuju: povišenu tjelesnu temperaturu, ukočenost mišića, mučninu, umor, bol u prsima, kašalj i dispneju. Bolest nije po život opasna i prolazi kroz nekoliko dana (Plum i sur., 2010; Brown, 1988; Rohrs, 1957).

Apsorpcija cinka putem kože se događa, ali mehanizam nije jasan i nema dovoljno podataka. Na apsorpciju utječu pH kože, količina primijenjenog cinka i njegov kemijski oblik, najjači iritansi su cinkov klorid i cinkov sulfat (Plum i sur., 2010; Lansdown, 1993; Agren, 1990).

Simptomi trovanja cinkom nakon oralne primjene su bol u trbuhu, mučnina, povraćanje i proljev, dodatni simptomi uključuju letargiju, vrtoglavicu i anemiju. Trovanje cinkom može se dogoditi unosom hrane i pića kiselih svojstava, koja se čuva u galvaniziranim spremnicima (Plum i sur., 2010).

Antidoti kod akutnih trovanja cinkom su EDTA i dimerkaprol, koji primijenjeni intravenski, vežu slobodni cink iz krvi te tako povećavaju njegovu eliminaciju putem bubrega (Dart i sur., 2004).

## 1.3. Deficit cinka

Najčešći uzroci smanjene količine cinka u ljudi su neadekvatan unos, povećane potrebe, malapsorpcija, i prekomjerno izlučivanje tijekom akutnih dijareja. Teški stečeni deficiti cinka mogu biti urođeni ili stečeni. Primjer urođenog deficita je acrodermatitis enteropathica, rijetki autosomno-recesivni metabolički poremećaj, čiji je uzrok mutacija u intestinalnom Zip4 transporteru. Simptomi ovog stanja su kožne lezije, alopecija, proljev, neurološke smetnje, gubitak tjelesne mase, smanjena funkcija imunološkog sustava kao i hipogonadizam kod muškaraca. Liječi se suplementacijom cinka, a izostanak liječenja dovodi do smrti. Stečeni deficit može biti posljedica nedovoljnog unosa hranom, zlouporabe



alkohola, malapsorpcije uslijed upalnih bolesti crijeva, kronične bubrežne bolesti te insuficijencije jetre. Simptomi stečenog deficita su usporenje rasta (djeca i adolescenti), hipogonadizam kod muškaraca, promjene na koži, smanjeni apetit, letargija, produljeno zacjeljivanje rana te promjene osjeta okusa. Kao i kod urođenih deficita, i stečeni se liječe suplementacijom cinka (Roohani i sur., 2013).

#### 1.4. Interakcije cinka i lijekova

Dosadašnje studije su pokazale interakcije pripravaka (soli) cinka s mnogim lijekovima, međutim, nisu sve od velikog kliničkog značaja i većina se može izbjeći prilagodbom intervala doziranja i odvojenim uzimanjem pripravaka cinka i lijekova. Klinički značajne interakcije prikazane su u Tablici 1 ([www.drugs.com](http://www.drugs.com); [www.lexi.com](http://www.lexi.com)).

Tablica 1. Klinički značajne interakcije cinka i lijekova

Lijek	Farmakoterapijska skupina	Mehanizam djelovanja	Vrsta interakcije
Kinoloni (Nalidiksinska kiselina i dr.) Fluorokinoloni (Ciprofloksacin, Ofloksacin, Levofloksacin i dr.)	Sintetski antimikrobni lijekovi	Inhibitori bakterijske DNA polimeraze II (primaze)	Farmakokinetički tip interakcije  Lijekovi stvaraju komplekse s ionima cinka, posljedično se smanjuje njihova apsorpcija iz gastrointestinalnog (GIT) sustava
Tetraciklini (Minociklin, Tetraciklin i dr.)	Bakteriostatici	Inhibitori sinteze bakterijskih proteina	
Raltegravir, Elvitegravir	Antivirolici (virus humane imunodeficijencije)	Inhibitori integraze	
Alendronska kiselina, Ibandronska kiselina, Risedronska kiselina	Antiresorptivi (terapija osteoporoze)	Potiču apoptozu osteoklasta	
Penicilamin	Terapija Wilsonove bolesti	Kelirajuće sredstvo za bakar	

Kada se govori o interakcijama cinka treba uzeti u obzir i interakcije koje se događaju s antikoagulansima prilikom uzimanja uzoraka krvi. U studiji *Jablan i sur.*, uočeno je, da je koncentracija cinka bila 18% manja u uzorcima plazme koji su uzeti uz citrat kao antikoagulans u odnosu na uzorke s heparinom i etilendiamintetraoctenom kiselinom. Pretpostavlja se da je uzrok tome reverzibilno vezanje kalcijevih iona za citrat te je on vezao i

ione cinka. Stoga je postupak prikupljanja plazme i seruma važan korak u analizi cinka u krvi i ne bi se trebao zanemariti (Jablan i sur., 2018).

### 1.5. Izvori cinka i potrebe za unosom

Cink je u dovoljnim količinama zastupljen u namirnicama. Najbogatiji izvori cinka u prehrani su meso i mesne prerađevine i riba koji najviše doprinose zadovoljavanju dnevnih potreba. Ostali izvori koji sadrže značajnu količinu cinka su jaja, mahunarke, mliječni proizvodi i žitarice. Apsorpcija cinka iz namirnica ovisi o načinu prehrane. Ona će biti bolja iz hrane bogate životinjskim proteinima za razliku od prehrane bazirane na proteinima dobivenim iz biljaka, uz to, fitinska kiselina, koja je zastupljena u mahunarkama i žitaricama, koje su temelj vegetarijanske prehrane, smanjuje apsorpciju cinka stvarajući s njim komplekse (Roohani i sur., 2013).

Potrebe za dnevnim unosom i maksimalnim dnevnim unosom cinka pružaju nam prosječni dnevni unos nutrijenta (eng. Recommended Dietary Allowence, *RDA*) i najveći prosječni unos nutrijenta (eng. Tolerable Upper Intake Level, *UL*).

*RDA* vrijednost je prosječni dnevni unos nutrijenata, dovoljan za nutritivne potrebe 97-98% zdravih osoba. *RDA* vrijednosti obuhvaćaju i dob i spol osobe. *RDA* vrijednosti za cink prikazane su u Tablici 2 ([www.nrv.gov.au](http://www.nrv.gov.au)).

Tablica 2. *RDA* vrijednosti za cink

Dob	Muškarci	Žene	Trudnoća	Laktacija
0–6 mjeseci	2 mg*	2 mg*		
7–12 mjeseci	3 mg	3 mg		
1–3 godine	3 mg	3 mg		
4–8 godina	5 mg	5 mg		
9–13 godina	8 mg	8 mg		
14–18 godina	11 mg	9 mg	12 mg	13 mg
19+ godina	11 mg	8 mg	11 mg	12 mg

*UL* vrijednost predstavlja najveći dnevni unos nutrijenata, koji neće imati negativne posljedice na zdravlje. *UL* vrijednosti za cink prikazane su u Tablici 3 ([www.nrv.gov.au](http://www.nrv.gov.au)).

Suplementacija cinka potrebna je kada unos hranom nije dovoljan, ili nije moguć zbog malapsorpcije ili drugih bolesti, primjerice kod vegetarijanske prehrane i kod parenteralne

prehrane bez dodatka cinka. U trudnoći, zbog intenzivnog rasta i razvoja fetusa, kao i kod djece i adolescenata suplementacija može biti potrebna (Roohani i sur., 2013).

Tablica 3. *UL* vrijednosti za cink

<b>Dob</b>	<b>UL</b>
<b>Novorođenčad</b>	
0-6 mjeseci	4 mg/dan
7-12 mjeseci	5 mg/dan
<b>Djeca i adolescenti</b>	
1-3 god	7 mg/dan
4-8 god	12 mg/dan
9-13 god	25 mg/dan
14-18 god	35 mg/dan
<b>Odrasli 19+ godina</b>	
Muškarci	40 mg/dan
Žene	40 mg/dan
<b>Trudnice</b>	
14-18 god	35 mg/dan
19-50 god	40 mg/dan
<b>Vrijeme laktacije</b>	
14-18 god	35 mg/dan
19-50 god	40 mg/dan

Na tržištu postoje različiti dodaci prehrani s različiti spojevima cinka i različitom njihovom količinom u oblicima tableta i kapsula. Među njima su najzastupljeniji cink-acetat, -citrat, -glukonat, -sulfat, -bisglicinat i -laktat, koji mogu biti dodani i u hranu i u dodatke prehrani. Iako postoje različiti spojevi cinka, istraživanja nisu pokazala razlike u apsorpciji, bioraspoloživosti i toleranciji ([www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)).

## 1.6. Funkcionalne vode

Funkcionalna hrana definirana je od strane europske komisije, kao prehrambeni proizvod, koji se može smatrati funkcionalnim, ako zajedno s osnovnim sastavnicama prehrane ima koristan učinak na jednu ili više funkcija ljudskog organizma poboljšavajući općenito stanje organizma ili smanjujući rizik od razvoja bolesti (Orrù i sur., 2018). Od svih vrsta funkcionalne hrane dostupne na tržištu, funkcionalni napitci su najpopularniji i imaju

sastav prilagođen različitim ulogama. Napitci koji sadrže omega-3-masne kiseline i CoQ10 reklamiraju se za zdravlje srca; vlakna i probiotici reklamiraju se za zdravlje crijeva i kontrolu tjelesne mase; kolagen i vitamin C za poboljšanje izgleda kože, a cink, vitamin C, i B12 za poboljšanje rada imunološkog sustava.

Europska agencija za sigurnost hrane, na temelju znanstvenih dokaza, određuje koje zdravstvene informacije smiju pisati na deklaracijama proizvoda na području Europske Unije te zabranjuje lažno oglašavanje proizvoda. Općenito funkcionalni napitci mogu se podijeliti na tri skupine: (i) probiotici i mineralima obogaćeni napitci, (ii) povrtni i voćni napitci i (iii) sportski i energetske napitci (Orrù i sur., 2018).

### **1.7. Atomska apsorpcijska spektroskopija**

Atomska apsorpcijska spektroskopija (eng. Atomic Absorption Spectroscopy-AAS) je važna analitička tehnika temeljena na apsorpciji elektromagnetnog zračenja. Tehnika je vrlo precizna, točna i osjetljiva te većina metala može biti dokazana i određena. Osim metala, tehnika može poslužiti i za indirektno određivanje i dokazivanje nekih elemenata nemetala.

Atomska apsorpcijska spektroskopija ima široku primjenu. Određivanje metala u tragovima, toksikologija metala, patologija, te određivanje kakvoće i sadržaja ljekovitih tvari i gotovih oblika samo su neka od područja primjene AAS-a u medicini i farmaciji (White 2009; Watson 1999).

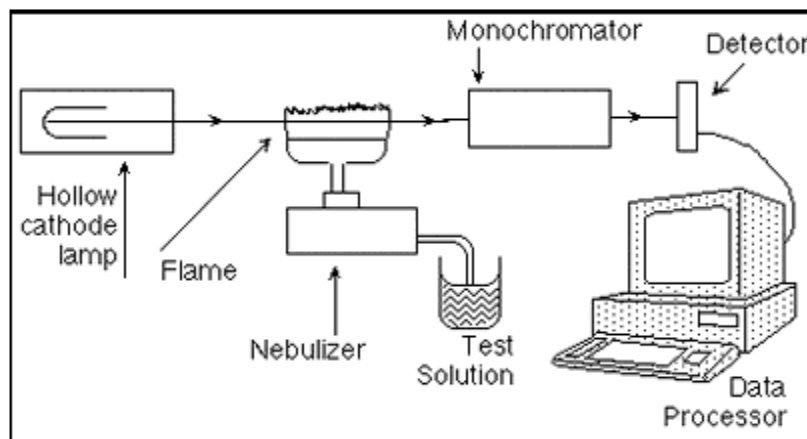
Spregnuta sa elektronskom mikroskopijom X-zrakama primjenjuje se za analizu čvrstih uzoraka u metalurgiji za analizu legura i industrijskih metala. U industrijskim procesima koristi se za ispitivanje onečišćenja međuprodukata i završnog proizvoda te otpadnih produkata neželjenim metalima. Važna je primjena AAS-a u analizi tla, koje će se koristiti za poljoprivredu. Ispituje se prisutnost i količina, esencijalnih metala, metala u tragovima te aditiva u tlu što omogućuje dobivanje tla specifičnog sastava za uspješan uzgoj željene kulture. Primjenjuje se i u ispitivanju hrane na toksične metale, ali i za analizu esencijalnih metala u tragovima, koji su neophodni za normalno funkcioniranje organizma. U sprezi s drugim analitičkim tehnikama, AAS se primjenjuje u forenzici za analizu metala u metcima, barutu, oštricama i drugim uzorcima kako bi se utvrdio njihov izvor (White 2009).

Atomska apsorpcijska spektroskopija temelji se na apsorpciji elektromagnetnog zračenja, gdje zračenje apsorbiraju atomizirane čestice u uzorku. Prolazak ultraljubičastog ili

vidljivog zračenja kroz medij s atomiziranim česticama dovodi do apsorpcije točno određenih frekvencija zračenja (Jingesh i sur., 2012).

Atomi svakog elementa u osnovnom stanju imaju specifičnu elektronsku konfiguraciju. Oni mogu apsorbirati kvant elektromagnetnog zračenja samo kada ono ima energiju jednaku energiji dopuštenih elektronskih prijelaza. Za atome koji apsorbiraju kažemo da su u pobuđenom stanju. Njihovi elektroni apsorbiraju točno određenu energiju, prelaze na više energetske nivoe i zatim se vraćaju u osnovno stanje emitirajući fotone svjetlosti. Emitirana svjetlost ima specifičnu valnu duljinu i odgovara energiji jednom od dozvoljenih prijelaza atoma iz osnovnog u pobuđeno stajje. Zbog toga, emitirana svjetlost daje spektar specifičnih valnih duljina. Za razliku od emisijske spektroskopije, koja mjeri emisiju zračenja kada se elektroni vraćaju iz pobuđenog u osnovno stanje, apsorpcijska spektroskopija mjeri izvorno zračenje koje apsorbiraju elektroni u osnovnom stanju. S obzirom da je većina atoma u uzorcima u osnovnom stanju, apsorpcijska mjerenja su općenito osjetljivija od emisijskih. Također, atomska apsorpcijska spektroskopija pogodnija je za elemente gdje su razlike u energijama prevelike da bi se postiglo emisijsko zračenje (Jingesh i sur., 2012; Watson 1999).

Atomski apsorpcijski spektrofotometar sastoji se od izvora linijskog zračenja, atomizatora, monokromatora i detektora (Watson 1999).



Slika 2. Dijelovi plamenog atomskog apsorpcijskog spektrofotometra. Preuzeto iz Chemical Instrumentation-Weebly

### Izvor linijskog zračenja

Kao izvor linijskog zračenja u atomskoj apsorpcijskoj spektroskopiji koristi se lampa sa šupljom katodom. Lampa sadrži cilindričnu metalnu katodu, zatvorenu u staklenu cijev i ispunjenu inertnim plinom neonom ili argonom. Primjenom napona dolazi do ionizacije neutralnog plina. Pozitivno ionizirane atome plina privlači metalna katoda i dolazi do sudara

atoma plina s atomima metala na katodi i prijenosa energije. Posljedica toga je prelazak atoma metala u pobuđeno stanje. Povratkom u osnovno stanje atomi metala emitiraju zračenje točno one energije, koju mogu apsorbirati atomi u ispitivanom uzorku (Jingesh i sur., 2012; White). Za svaki element potrebno je koristiti drugu lampu tj. lampu čija katoda sadrži element koji želimo ispitati. Iako je moguće napraviti višeelementne lampe od legura ili mješavina atoma, prihvatljive su samo određene kombinacije. Primjer takvih kombinacija su PerkinElmer® Lumina Lamp Ca-Mg-Zn i PerkinElmer® Lumina Lamp Co-Cr-Cu-Fe-Mn-Ni (Arnold i sur., 2011; White 2009).

### Atomizator

U atomizatoru dolazi do pretvorbe iona metala i njegovih spojeva u oblik slobodnih atoma i plinovito agregatno stanje. Najčešće se koriste plameni atomizator i grafitna peć (elektro-termalni atomizator) (Jingesh i sur., 2012).

U plamenoj apsorpcijskoj spektroskopiji (eng. Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS) tekući uzorak se dovodi u plamen putem raspršivača. U raspršivaču se uzorak prevodi u kapljice koje lako izgaraju u plamenu. Plamen služi kao izvor neutralnih atoma ili molekula, uklanja otapalo i atomizira uzorak tj. oslobađa analit iz soli ili drugih spojeva. Plamen zahtjeva oksidans i gorivo. U tu svrhu najčešće se koriste kombinacija zraka i acetilena za postizanje temperature od 2400 °C. Kombinacija dušikovog oksida i acetilena koristi se za postizanje temperature od 2800 °C i služi u analizi metala čiji su spojevi otporni na termalnu razgradnju (npr. oksidi bora, uranija i cirkonija). Prednosti plamene apsorpcijske spektroskopije su cijena, relativno je jeftina, jednostavna za uporabu i brza ako je postupak automatiziran. Nasuprot tome, potrebni su veliki volumeni uzorka, ograničeno je vrijeme prisutnosti atoma u plamenu zbog velike brzine izgaranja te nemogućnost analize čvrstih uzoraka (Jingesh i sur., 2012).

Iako su uzorci uglavnom u vodenim otopinama moguće je provesti analizu i iz nevedenih otapala. Najpogodnija otapala za takvu analizu su etanol i metil izobutil keton čija je viskoznost slična viskoznosti vode. Također pokazano je da uporaba organskih otapala u FAAS povećava učinkovitost atomizacije jer su viskoznost i površinska napetost uglavnom manji od onih u vodi, što dovodi do stvaranja manjih kapljica i većeg volumena uzorka u plamenu. Analiza elemenata FAAS-om u organskim otapalima obično daje rezultate jednake onima analizi u vodenim otopinama (Bader, 2011).

U grafitnoj peći atomizacija se događa u cilindričnoj grafitnoj cijevi, koja je otvorena na oba kraja i ima centralni otvor za dovod uzorka. Grijanje grafitne cijevi se postiže prolaskom električne struje. Postupak atomizacije provodi se u nekoliko koraka. Korak sušenja se provodi zbog uklanjanja otapala iz uzorka, a postiže se održavanjem temperature iznad točke vrelišta otapala. U drugom koraku počinje uništavanje matriksa uzorka, on uključuje zagrijavanje grafitne cijevi na temperaturu između 350 °C i 1200 °C 45 sekundi. Tijekom sušenja i destrukcije matriksa održava se protok dušika i argona koji uklanja vanjska onečišćenja. Podizanjem temperature između 2000 °C i 3000 °C postiže se atomizacija analita i mjeri se apsorpcija zračenja. U svrhu čišćenja instrumenta moguće je na kraju dodati još jedan korak zagrijavanja (Jingesh i sur., 2012).

### Monokromator

Monokromator je uređaj koji uklanja zračenje raznih komponenti uzorka i samog plamena, dok propušta zračenje željene valne duljine do detektora, a postavljen je između plamena i detektora. Uređaji za atomsku apsorpcijsku spektroskopiju izrađeni su s monokromatorom koji ima jednu zraku s obzirom, da bi bilo teško izraditi referentnu zraku s vlastitim raspršivačem i plamenom identičnima kao kod zrake uzorka (White 2009).

### Detektor

Intenzitet odabranog svjetla, koje dolazi do detektora, najčešće se mjeri pomoću fotomultiplicirajuće cijevi. Fotomultiplicirajuća cijev detektira fotone koristeći fotoelektrični efekt i sekundarnu emisiju kako bi pretvorila svjetlost u električni signal. Na jednom kraju spojena je s scintilatorom koji proizvodi fotone kao odgovor na dolazno zračenje. Nastali fotoni dolaze na katodu proizvodeći elektrone fotoelektričnim efektom. Multiplikaciju elektrona provodi sustav dioda-elektroda između kojih su postavljeni visoki naponi, koji dodatno ubrzavaju elektrone te u sudaru s diodama nastaju novi elektroni te se na kraju procesa dobiva pojačani električni signal na anodi. Fotomultiplicirajuća cijev se često koristi, jer može mjeriti veliki raspon valnih duljina, ima veliku dinamičnost, veliku mogućnost pojačanja signala, a malu razinu smetnji (Settle 1997; Leo 1987).

## 1.8. Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je postupak kojim se utvrđuje i dokumentira da je metoda prikladna za željenu namjenu. Validacija analitičke metode potvrđuje visokim stupnjem sigurnosti, da će analitička metoda davati valjane rezultate u propisanim uvjetima. Prema regulatornim zahtjevima dobre proizvođačke prakse i dobre laboratorijske prakse postupci validacije postali su obvezni. Validacija treba provesti pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode, kao i pri promjeni bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode. S obzirom da je proces validacije potvrda prikladnosti metode, s njime ne bi trebali započeti ukoliko nije siguran njegov uspješan završetak (Nigović i sur, 2014; Ahuja i Scypinski 2001).

Opis analitičkog postupka uključuje pripremu uzoraka, poredbenih tvari i reagensa, opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize, kao i primjenu formula za izračunavanje rezultata, kako bi ga svaki analitičar mogao ponoviti.

Analitičke značajke koje se određuju validacijom su preciznost, specifičnost, selektivnost, granica dokazivanja, granica dokazivanja, linearnost, radno područje, točnost i izdržljivost.

*Preciznost* analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Iskazuje se kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (Nigović i sur, 2014; Ahuja i Scypinski 2001).

*Specifičnost* analitičke metode je njezina sposobnost da razlikuje samo jednu komponentu od ostalih prisutnih u uzorku, dok je selektivnost mogućnost metode da točno odredi analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka (onečišćenja, pomoćnih tvari itd.).

*Linearnost* predstavlja sposobnost analitičke metode, da unutar određenog intervala daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Izražava se koeficijentom korelacije regresijskom pravca ( $k > 0,999$ ).

*Radno područje* je raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku unutar kojeg analitička metoda ima prihvatljivu točnost preciznost i linearnost.

*Točnost analitičke metode* pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Odstupanje se iskazuje kao analitički prinos (eng. Recovery). Određuje se nakon ispitivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti.

*Granica dokazivanja* (eng. Limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može odrediti.

*Granica određivanja* (eng. Limit of quantitation, LOQ) je najniža koncentracija analita koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.



*Izdržljivost analitičke metode* je mjera njezine sposobnosti da pod utjecajem malih i namjernih promjena parametara ostane nepromijenjena. Izdržljivost je indikator pouzdanosti analitičke metode tijekom normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize (Nigović i sur, 2014, Medić-Šarić, 2006).

## **2. Obrazložnje teme**

Cink je esencijalni element, u ljudskom organizmu prisutan u tragovima i kao takav ima značajnu ulogu za normalan rad i razvoj ljudskog organizma. Važan je u regulaciji imunološkog sustava, procesa apoptoze i starenja. Prepoznata je uloga cinka u odgovoru na oksidacijski stres, koji je jedan od uzročnika kroničnih bolesti kao npr. dijabetesa, ateroskleroze te neurodegenerativnih bolesti. Do deficita cinka dovode smanjen unos hranom, malapsorpcija, insuficijencija jetre i bubrega te autosomno-recesivna bolest acrodermatitis enteropathica. Simptomi deficita su produljeno zacjeljivanje rana, zastoj u rastu, poremećena funkcija imunološkog sustava, neurološke smetnje te hipogonadizam kod muškaraca. Kao terapija i prevencija deficita primjenjuju se suplementi s cinkom u obliku otopina za intravensku primjenu, kapsule, tablete i funkcionalni napitci.

Za određivanje cinka iz bioloških i drugih uzoraka koriste se atomska apsorpcijska spektroskopija, polarigrafija, atomska emisijska spektroskopija, fluorescencijska spektroskopija, rentgenska fluorescencijska spektroskopija (XRF), ionska spregnuta plazma povezana s masenim spektrometrom (ICP-MS) i ionska spregnuta plazma povezana s optičkom emisijskom spektroskopijom (ICP-OES). Izbor metode ovisi o tipu uzorka, granici detekcije, dostupnosti metode, cijeni i vremenu analize. U elementarnoj analizi dodataka prehrani sve se više rabi ICP-MS zbog niskih granica detekcije, linearnosti, i malog broja interferencija (American Herbal Products Association 2009; Jingesh i sur; 2012). Prije primjene analitičke metode potrebno je provesti njezinu validaciju, postupak, kojim će se utvrditi prikladnost te metode za željenu analizu.

Prvi cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za kvantitativnu analizu cinka iz uzoraka funkcionalnih voda pomoću plamene atomske apsorpcijske spektroskopije. U tu svrhu ispitani su neki od validacijskih parametara kao što su linearnost, preciznost, točnost, osjetljivost, LOD i LOQ. Drugi cilj bio je primjena optimizirane metode za određivanje sadržaja cinka u uzorcima funkcionalnih voda. Dobiveni rezultati usporedili su se s deklariranim sadržajem cinka u ispitivanim uzorcima.

### **3. Materijali i metode**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Korištene kemikalije

- Standardna otopina cinka za AAS 1000 mg/L (Sigma, Aldrich, Njemačka)
- Dušična kiselina (HNO<sub>3</sub>) 65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Dušična kiselina (HNO<sub>3</sub>) 2%
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm)

Sve korištene kemikalije su pro analizi stupnja kakvoće.

#### 3.1.2. Aparatura

Mjerenja su provedena na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru Analyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim detektorom nespecifične površine prema parametrima:

- Žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
- Valna duljina (nm): 213,9 nm
- Gorivo/oksidans: acetilen/zrak
- Acetilen (tlak(Pa)/protok(dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>): 0,9x10<sup>5</sup>/2
- Zrak (tlak(Pa)/protok(dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>): 5,5x10<sup>5</sup>/17
- Širina pukotine (nm): 0,7 nm
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski detektor
- Fotodetektor

Računalo, pislač: AA winlab 32 Software, Dell Optiplex GX270 računalo, monitor, pislač HP 5652

#### 3.1.3. Laboratorijsko posuđe i pribor

- Automatska pipeta 2000 μL, 200 uL
- Staklena trbušasta pipeta 20 mL
- Gumena propipeta
- Šprica
- Filter veličine pora 0,45 μm (Sartorius Minisart® Syringe Filters)
- Odmjerna tikvica 1000 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL
- Erlenmeyerova tikvica 50 mL
- Čaša 50 mL

#### 3.1.4. Uzorci

Skupljeni su uzorci funkcionalnih voda od različitih proizvođača (n=5), komercijalno dostupnih na tržištu, i s različitom deklariranom količinom cinka.

### 3.2. **Metode**

#### 3.2.1. Priprema otopina

##### Priprema 2% dušične kiseline (HNO<sub>3</sub>)

2% otopina HNO<sub>3</sub> pripremljena je razrjeđivanjem 20 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> u odmjerne tikvici od 1000 mL. U tikvicu se prije kiseline doda dio ultračiste vode, zatim koncentrirana HNO<sub>3</sub> i na kraju se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Otopina se koristila za ispiranje instrumenta.

##### Priprema standardne otopine cinka

Standardna otopina cinka koncentracije 100 mg/L (Stock 1) pripremljena je razrjeđivanjem otopine primarnog standarda cinka koncentracije 1000 mg/L. 5 mL otopine primarnog standarda razrijeđeno je ultračistom vodom u odmjerne tikvici od 50 mL. Standardna otopina cinka koncentracije 10 mg/L (Stock 2) pripremljena je razrjeđivanjem standardne otopine cinka koncentracije 100 mg/L (Stock 1). 5 mL Stock 1 otopine razrijeđeno je ultračistom vodom u odmjerne tikvici od 50 mL.

Za ispitivanje linearnosti analitičke metode izrađen je koncentracijski niz standardnih otopina, dobivenih razrjeđivanjem standardne otopine cinka koncentracije 10 mg/L (Stock 2) u odmjernim tikvicama od 25 mL. Način izrade i koncentracije otopina prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Koncentracija i priprema standardnih otopina cinka

Koncentracija standardne otopine cinka (mg/L)	Priprema standardne otopine	Ukupno razrjeđenje u odnosu na Stock 2 (10 mg/L) otopinu
Slijepa proba	Tikvica od 25 mL nadopuni se ultračistom vodom do oznake	
0,5 (ST 1)	1,25 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 25 mL	20x
1,0 (ST 2)	2,5 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 25 mL	10x
2,0 (ST 3)	5,0 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 25 mL	5x
3,5 (ST 4)	8,75 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 25 mL	2,86x
5,0 (ST 5)	12,5 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 25 mL	2x
7,0 (ST 6)	17,5 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L nadopuni se ultračistom vodom do 25 mL	1,43x

### 3.2.2. Priprema uzoraka

Uzorak se pripremi na način, da se uzorak funkcionalne vode prvo protrese, zatim se špricom uzme dio te se filtrira kroz filter s veličinom pora od 0,45  $\mu\text{m}$  da se uklone moguća čvrsta onečišćenja. 5 mL filtrata otpipetira se u plastičnu epruvetu te se uzorku doda 5 mL ultračiste vode (razrjeđivanje u omjeru 1:1). Postupak se ponovi za svaki od uzoraka.

### 3.2.3. Priprema uzoraka sa standardnim dodatkom otopine cinka poznate koncentracije

U svaku od tri odmjerne tikvice od 50 mL (A, B, C) dodano je 5 mL uzorka funkcionalne vode kojem je izmjerena koncentracija 1,159 mg/L (uzorak broj 3). U tikvicu A zatim je dodano 0,5 mL, u tikvicu B 1,0 mL i u tikvicu C 5,0 mL standardnog dodatka cinka koncentracije 10 mg/L da bi konačna koncentracije otopina u tikvicama bile 0,1 mg/L, 0,2 mg/L i 0,4 mg/L. Tikvice se na kraju dopune do oznake ultračistom vodom te se provodi mjerenje.

#### 3.2.4. Određivanje sadržaja cinka u uzorcima

Atomskom apsorpcijskom spektroskopijom koncentracija cinka određuje se mjerenjem apsorpcije uzoraka funkcionalnih voda. Uzorak se plastičnom cjevčicom unosi u instrument, cink se u plamenu atomizira i izlaže linijskom zračenju valne duljine 213,9 nm. Promjene u intenzitetu zračenja detektiraju se fotodetektorom. Iz razlike u intenzitetu zračenja dobije se apsorpcija te se iz dobivene apsorpcije pomoću kalibracijskog pravca izračuna koncentracija cinka u uzorcima.

Kalibracija instrumenta izvodi se mjerenjem koncentracije niza prethodno pripremljenih kalibracijskih otopina standarda cinka. Prije početka mjerenja instrument se ispire 2%-tnom dušičnom kiselinom ( $\text{HNO}_3$ ) i ultračistom vodom, kojom se ispire i nakon svakog mjerenja. Uzorci i standardi se prije mjerenja homogeniziraju protresivanjem. Uzorci i standardi mjereni su u duplikatu, te su uzete srednje vrijednosti za izradu kalibracijske krivulje.

#### 3.2.5. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu dobivenih rezultata korišten je računali program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 8* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija određivanja. Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test- Sva zaključivanja u radu provedena su uz razinu značajnost  $P < 0,05$



#### **4. Rezultati i rasprava**

Rezultati su dobiveni postupcima analize sadržaja cinka tehnikom atomske apsorpcijske spektroskopije, koji su opisani u poglavlju materijali i metode. Ispitivani su validacijski parametri metode linearnost, preciznost, granica dokazivanja i granica određivanja te točnost. Nakon što je metoda validirana određen je stvarni sadržaj cinka u uzorcima funkcionalnih voda i dobivene vrijednosti uspoređene su s deklariranim.

#### 4.1. Validacija analitičke metode

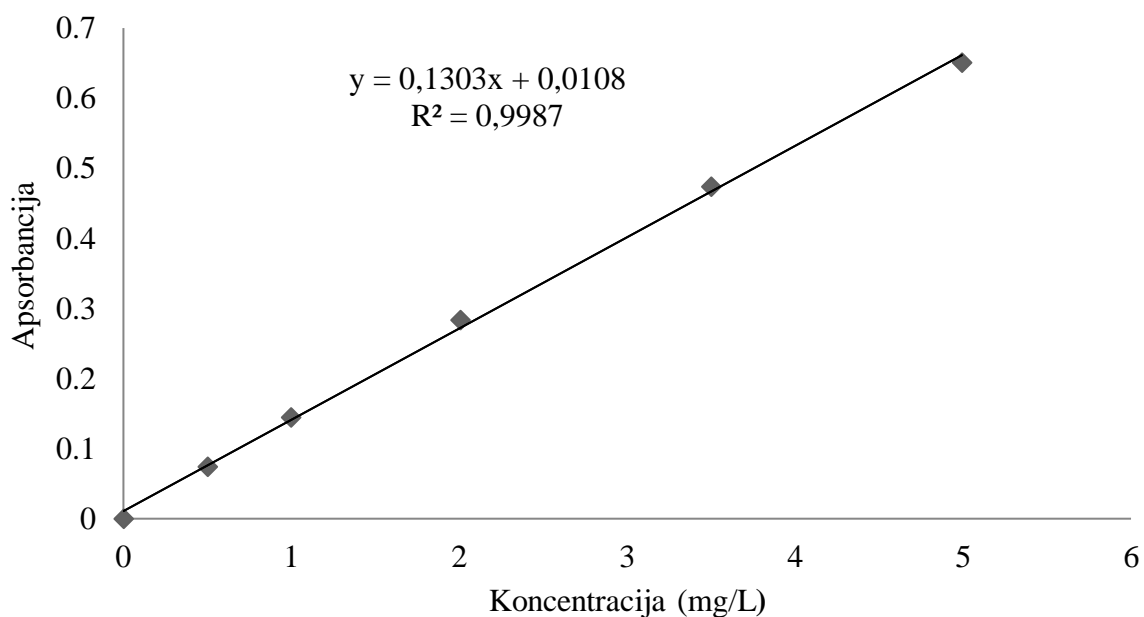
##### Linearnost

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

Za provjeru linearnosti izrađene su otopine koncentracije 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3,5 mg/L, 5 mg/L i 7 mg/L. Svaka otopina izrađena je u duplikatu i izmjerena šest puta te je izračunata srednja vrijednost. Iz dobivenih rezultata dobivena je jednadžba pravca  $y = 0,1303x + 0,0108$  i koeficijent korelacije  $R^2 = 0,9987$ . Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da metoda ima prihvatljivu linearnost za određivanje cinka u uzorcima funkcionalnih voda.

Tablica 5. Izmjerene apsorbancije otopina za izradu kalibracijske krivulje

Koncentracija standarda (mg/L)	Srednja vrijednost izmjerene koncentracije standarda (mg/L)	Analitički signal (apsorbancija)
0	0	0
0,5	0,501	0,0743
1	0,996	0,145
2	2,007	0,283
3,5	3,499	0,474
5	4,993	0,651
7	7,005	0,875



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

#### Preciznost

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Iskazuje se kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (Nigović i sur., 2014).

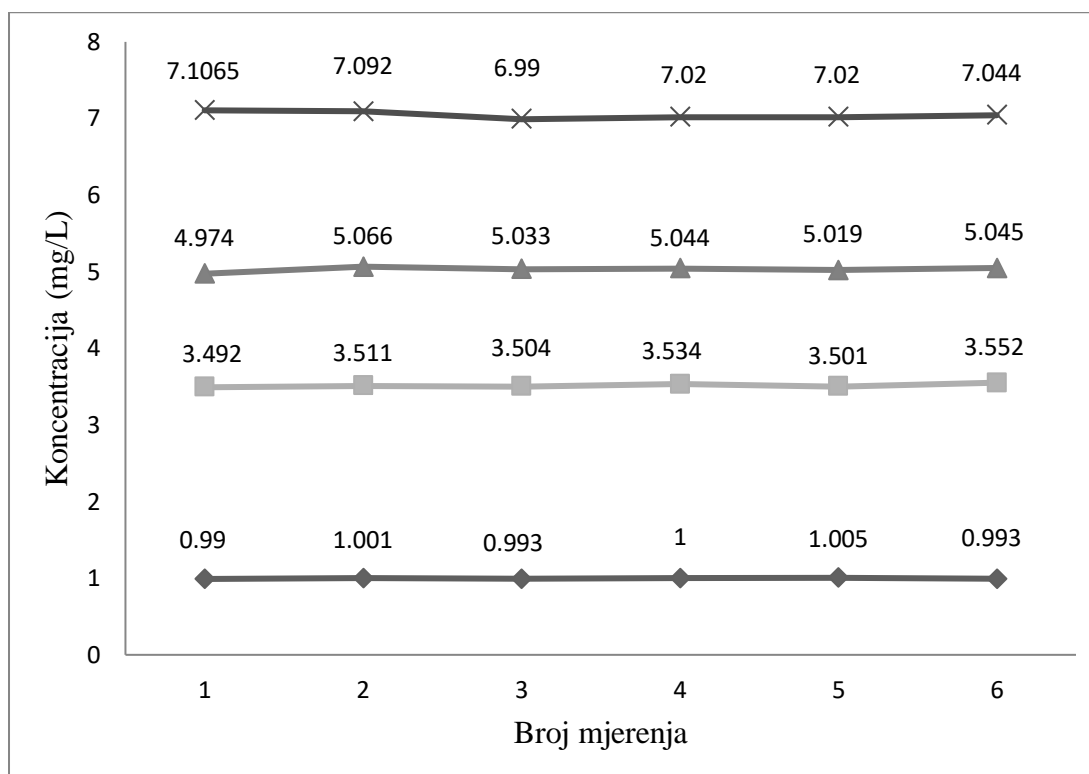
Ponovljivost pokazuje podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom razdoblju. Srednja preciznost pokazuje odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti dani, različiti analitičari itd.) (Nigović i sur., 2014).

Izražava se vrijednostima kao što je relativno standardno odstupanje (RSD, %) ili sa standardnim odstupanjem (SD).

Ponovljivost analitičke metode ispitana je provođenjem šest mjerenja za četiri različite koncentracija standardnih otopina u kratkom vremenskom periodu unutar istog dana. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici i grafički. Dobivene vrijednosti ponovljivosti u danu, izražene kao RSD su unutar prihvatljivih granica što ukazuju na zadovoljavajuću ponovljivost metode.

Tablica 6. Ponovljivost unutar jednog dana

Koncentracija standarda (mg/L)	1	3,5	5	7
Izmjerene koncentracije (mg/L)	0,99	3,492	4,974	7,1065
	1,001	3,511	5,066	7,092
	0,993	3,504	5,033	6,99
	1	3,534	5,044	7,02
	1,005	3,501	5,019	7,02
	0,993	3,552	5,045	7,044
Srednja vrijednost (mg/L)	0,997	3,516	5,030	7,045
Standardna devijacija (SD)	0,006	0,023	0,032	0,045
Relativna standardna devijacija (RSD %)	0,58	0,65	0,63	0,64



Slika 4. Grafički prikaz ponovljivosti uzastopnih mjerenja u jednom danu (n=6)

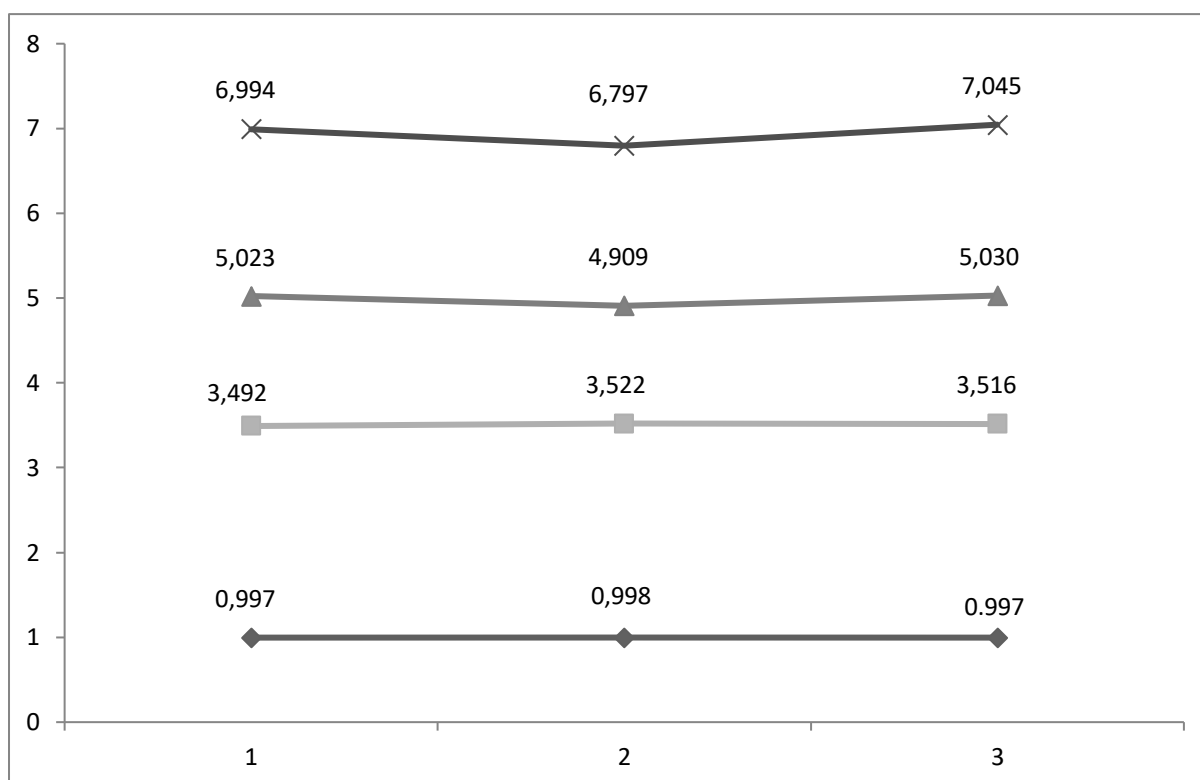
#### Srednja preciznost

Srednja preciznost određena je mjerenjem apsorbancije standarda koncentracije 1,0 mg/L, 3,5 mg/L, 5,0 mg/L i 7,0 mg/L kroz tri dana. Iz dobivene apsorbancije i jednadžbe pravca određena je koncentracija cinka u ispitivanim standardnim otopinama. Dobivene

vrijednosti prikazane su u Tablici 7 kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom (SD) i relativnom standardnom devijacijom (RSD) te su prikazani i grafički.

Tablica 7. Srednja preciznost metode tijekom uzastopna tri dana

Koncentracija standarda (mg/L)	1,0	3,5	5,0	7,0
1. dan $\bar{x}$ (n=6)	0,997	3,492	5,023	6,994
2. dan $\bar{x}$ (n=6)	0,998	3,522	4,909	6,797
3. dan $\bar{x}$ (n=6)	0,997	3,516	5,030	7,045
Srednja vrijednost (mg/L)	0,997	3,510	4,987	6,945
SD	0,0004	0,016	0,068	0,131
RSD (%)	0,039	0,45	1,36	1,89



Slika 5. Grafički prikaz ponovljivosti kroz 3 dana

Iz dobivenih RSD vrijednosti ( $< 2\%$ ), određenih za tri standardne otopine tijekom tri dana, može se zaključiti da metoda ima zadovoljavajuću preciznost i da je prihvatljiva za određivanje sadržaja cinka u ispitivanim uzorcima.

## Točnost

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Točnost se iskazuje kao analitički prinos (eng. recovery), i pokazuje odstupanja od prihvaćene referentne vrijednosti (Nigović i sur., 2014). Računa se prema izrazu:

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

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

Točnost je ispitana metodom standardnog dodatka. Prvo se odredila koncentracije cinka u pripremljenim uzorcima funkcionalnih voda. Zatim se u uzorke dodala točno određena količina standardne otopina cinka koncentracije 10 mg/mL da bi koncentracija standardnog dodatka u jednom uzorku iznosila 0,1mg/L, u drugom 0,2 mg/L , a u trećem uzorku 0,4 mg/L., te je u svim otopinama ponovno izmjerena koncentracija cinka. Interval prihvatljivog analitičkog prinosa je od 98% do 102%. Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa (Tablica 8) potvrđuju zadovoljavajuću točnost optimirane metode.

Tablica 8. Analitički prinos uzorka koncentracije cinka 1,159 mg/L

$\bar{c}$ (mg/L) cinka u uzorku + c(mg/L) standardnog dodatka	$c_{(ukupno)}$ (mg/L)	$c_{(izmjereno)}$ (mg/L)	$c_{(dodatka)}$ (mg/L)	Analitički prinos (%)	RSD(%)
A+0,1	1,259	1,244	0,0988	98,81	1,13
B+0,2	1,359	1,354	0,199	99,66	0,59
C+0,4	1,559	1,546	0,397	99,17	0,45

## Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (eng. limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita, koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode.

Granica određivanja (eng. limit of quantitation, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. LOD i LOQ određuju se razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD=3:1 ili 2:1, LOQ=10:1) ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

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

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

Gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je  $a$  nagib regresijskog pravca.

Određen je nagib kalibracijskog pravca  $a = 0,1303$  i standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca  $\sigma = 0,0163955$  te su izračunati LOD i LOQ:

$$LOD = 0,4326 \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 1,3109 \text{ mg/L}$$

#### 4.2. Određivanje sadržaja cinka u funkcionalnim vodama

Nakon što je metoda validirana, pripremljeni su uzorci u duplikatu kako je opisano u poglavlju materijali i metode, te je svaki pripremljeni uzorak mjeren šest puta. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 9.

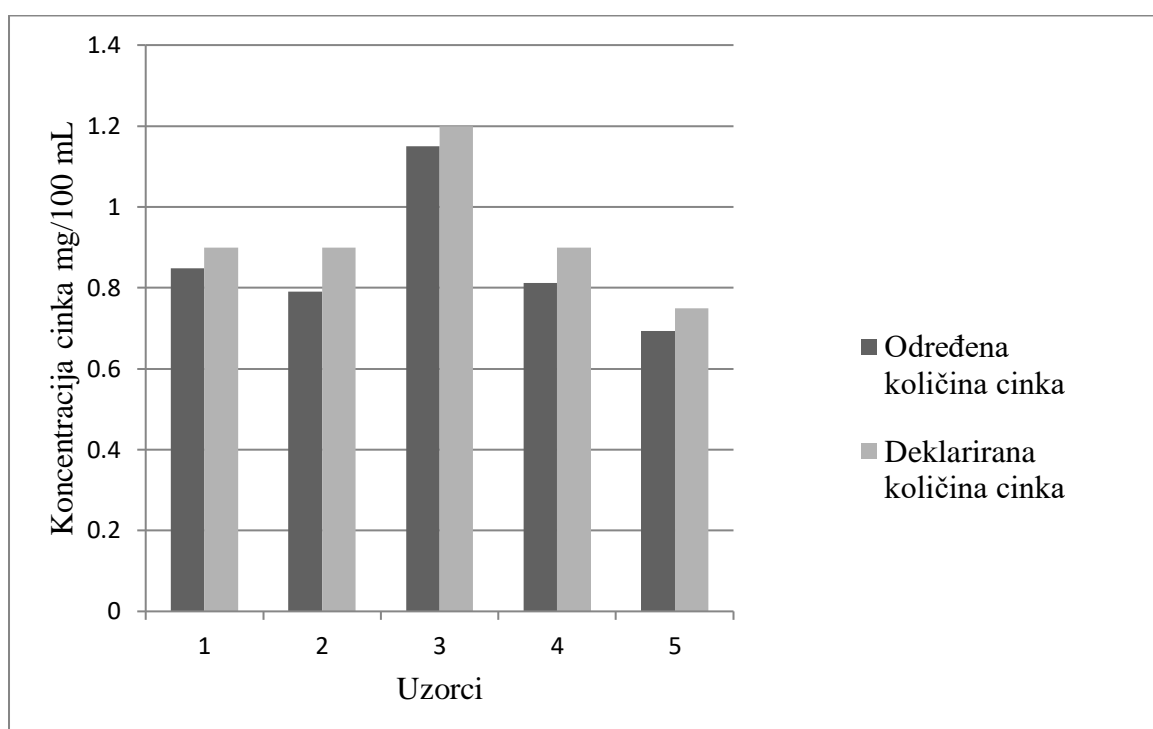
Tablica 9. Izmjerene koncentracije cinka u uzorcima funkcionalnih voda

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
Srednja vrijednost (mg/L)	4,242	3,952	5,748	4,06	3,464
SD	0,01	0,09	0,04	0,08	0,05
RSD (%)	0,339	2,343	0,690	1,874	1,465

Dobivene vrijednosti analiziranih uzoraka funkcionalnih voda navedene su u Tablici 10 i uspoređene su s deklariranim vrijednostima sadržaja cinka (Slika 6).

Tablica 10. Usporedba određenog i deklariranog sadržaja cinka u uzorcima funkcionalnih voda

		Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
Izmjerena količina cinka	mg/L	8,485	7,904	11,496	8,12	6,929
	mg/100 mL	0,848	0,790	1,150	0,812	0,693
	mg/500 mL	4,242	3,952	5,748		3,464
Deklarirana količina cinka	mg/100 mL	0,9	0,9	1,2	0,9	0,75
	mg/500 mL	4,5	4,5	6		3,75



Slika 6. Usporedba određenog i deklariranog sadržaja cinka u funkcionalnim vodama

Usporedbom rezultata dobivenih AAS analizom za količinu cinka u analiziranim uzorcima funkcionalnih voda s vrijednostima koje su deklarirane, može se zaključiti da ne postoji značajna statistička razlika (t-test) između deklarirane vrijednosti i izmjerene vrijednosti sadržaja cinka kod svih analiziranih uzoraka.

Dobiveni rezultati potvrdili su da je optimirana metoda primjenjiva za pouzdano, precizno i točno određivanje koncentracije cinka u uzorcima funkcionalnih voda.



## **5. Zaključak**

Cink je element u tragovima neophodan za normalan rad i razvoj ljudskog organizma te je potreban adekvatan unos prehranom ili suplementacijom.

Dobiveni rezultati potkazali su sljedeće:

1. Plamena atomska apsorpcijska spektroskopija prikladna je metoda za određivanje i dokazivanje cinka u uzorcima funkcionalnih voda.
2. Predložena metoda validirana je prema važećim smjernicama, a dobiveni rezultati pokazali su da je metoda linearna, precizna, točna i brza.
3. Sama predložena metoda ne zahtjeva dugotrajnu pripremu uzoraka, a sam postupak mjerenja može biti i brži, ukoliko je automatiziran.

Funkcionalne vode dostupne na tržištu sadrže određenu količinu cinka, ali koja je relativno mala pa općenito ne mogu biti zamjena zdravoj i uravnoteženoj prehrani te farmaceutskim pripravcima za suplementaciju.

## 6. Literatura

- Agren, M.S. Percutaneous absorption of zinc from zinc oxide applied topically to intact skin in man. *Dermatologica* 1990, 180, 36-39.
- 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.
- Arnold J. Randy, Arndt Brett, Blaser Emilia, Blosser Chris, Caulton Dana, Chung Won Sog, Fiorenza Garrett, Heath Wyatt, Jacobs Alex, Kahng Eunice, Koh Eun, Le Thao, Mandla Kyle, McCory Chelesy, Newman Laura, Pithadia Amit, Reckelhoff Anna, Rheinhardt Joseph, Skljarevski Sonja, Stuart Jordyn, Tyylor Cassie, Thomas Scott, Tse Kyle, Wall Rachel, Warkentien Chad. Overcoming Matrix Effects in a Complex Sample: Analysis of Multiple Elements in Multivitamins by Atomic Absorption Spectroscopy. *Journal of Chemical Education* 2011, 484-487.
- Bader NB. Sample preparation for flame atomic absorption spectroscopy: An overview. *Rasayan Journal Chemical* 2011, 49-55.
- Brown, J.J. Zinc fume fever. *Br. J. Radiol.* 1988, 61, 327-329.
- Crowther JB. Validation of Pharmaceutical Test Methods. U: Handbook of modern pharmaceutical analysis, Ahuja S, Scypinski S, urednici, San Diego, Academic Press, 2001, str. 415-419.
- 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.
- Drug interactions/zinc, <https://www.drugs.com>, pristupljeno 17. 5. 2020.
- Drug interactions, [www.lexi.com](http://www.lexi.com), pristupljeno 30.5. 2020.
- Flame-AAS, <http://chemicalinstrumentation.weebly.com>, pristupljeno 13. 5. 2020.
- Heavy Metals: Analysis and Limits in Herbal Dietary Supplements, 2009, Silver Spring MD, American herbal products association, December 2009.
- Introduction, <https://www.nrv.gov.au>, pristupljeno 2. 4. 2020.
- Jablan J, Grdić Rajković M, Inić S, Petlevski R, Domijan AM. Impact of Anticoagulants on Assesment of Zinc in Plasma. *Croatica Chemica Acta*, 2018, 91 (3), 317-321.
- Jignesh S, Vineeta K, Abhay S, Vilasrao K. Analytical Methods for Estamation of Metals. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2012, 146-163.

- Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. "Structural classification of zinc fingers: survey and summary". *Nucleic Acids Res.* 2003, 31 (2), 532–550. doi:10.1093/nar/gkg161.
- Lansdown, A.B. Influence of zinc oxide in the closure of open skin wounds. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1993, 15, 83-85.
- Leo W. R. *Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments*, Springer, 1987, str. 169-189.
- Medić-Šarić M, Jasprica I, Debeljak Ž. Uvod u validaciju metoda analize lijekova. *Farmaceutski glasnik*, 2006, 62(1), 1-7.
- Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*". *EMBO J.* 1985, 4 (6), 1609–1614.
- 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.
- Nutrients-Zinc, <https://www.nrv.gov.au>, pristupljeno 2. 4. 2020.
- Olechnowicz J, Tinkov A, Skalny A, Suliburska J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid and glucose metabolism. *J Physiol Sci* 2018, 68, 19-31.
- Orrù Stefania, Imperlini Esther, Nigro Ersilia, Alfieri Andreina, Cevenini Armando, Polito Rita, Daniele Aurora, Buono Pasqualina and Mancini Annamaria. Role of Functional Beverages on Sport Performance and Recovery. *Nutrients* 2018, 10, 1470. doi:10.3390/nu10101470.
- Plum LM, Rink L, and Hasse H. The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2010, 7(4), 1342-1365.
- Prasad AS. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *Mol Med* 2008, 353-357.
- Rohrs, L.C. Metal-fume fever from inhaling zinc oxide. *AMA Arch. Ind. Health* 1957, 16, 42-47.
- 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.
- Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *European Food Safety Authority (EFSA) Journal* 2014, <https://www.efsa.europa.eu>

- Smith DR i Nordberg M. General Chemistry, sampling, analytical methods and speciation. U: Handbook on the toxicology of metals. Nordberg GF, Fawler BA i Nordberg M, urednici, London, Academic press 2014, str. 16-22.
- Vogelmeier, C.; Konig, G.; Bencze, K.; Fruhmann, G. Pulmonary involvement in zinc fume fever. *Chest* 1987, 92, 946-948.
- Watson DG, Pharmaceutical Analysis: Atomic spectrophotometry. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 125-132.
- Wehry Earl L. Molecular Fluorescence and Phosphorescence Spectrometry. U: Instrumental techniques for analytical chemistry, Frank Settle, urednik, New Jersey, Prantice Hall PTR 1997, str. 507-531
- White, C. Atomic Absorption Determination of Zinc and Copper in a Multivitamin 2009, <http://www.scribd.com/doc/10513921>. Pristupljeno 30. 3. 2020.

## **7. Sažetak/Summary**

Cink je esencijalni mikronutrijent nužan za pravilan rad i razvoj organizma. Neophodan je za razvoj i funkciju stanica urođene i stečene imunosti. Smanjuje posljedice oksidacijskog stresa hvatajući reaktivne kisikove vrste i inhibicijom enzima koji ih stvaraju. Deficit cinka uzrokovan je, neadekvatnim unosom, povećanim potrebama, malapsorpcijom, i prekomjernim izlučivanjem tijekom akutnih proljeva. Primjer urođenog deficita je acrodermatitis enteropathica, rijetki autosomno-recesivni metabolički poremećaj, čiji je uzrok mutacija u intestinalnom Zip4 transporteru. Funkcionalna hrana definirana je kao prehrambeni proizvod, koji se može smatrati funkcionalnim, ako ima koristan učinak na jednu ili više funkcija ljudskog organizma poboljšavajući općenito stanje organizma ili smanjujući rizik od razvoja bolesti. Cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za kvantitativnu analizu cinka iz uzoraka funkcionalnih voda pomoću plamene atomske apsorpcijske spektroskopije. Optimizirana metoda se primijenila za određivanje sadržaja cinka u uzorcima funkcionalnih voda i dobiveni rezultati su se usporedili s deklariranim sadržajem cinka u ispitivanim uzorcima.

Provedeno ispitivanje pokazalo je da u ispitivanom području metoda ima prihvatljivu linearnost,  $R^2 = 0,9987$ . Ponovljivost metode izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je od 0,58 % do 0,64 %, što ukazuje na prihvatljivu ponovljivost. Srednja preciznost određena je mjerenjem koncentracija za tri standardne otopine tijekom tri dana. Iz dobivenih RSD vrijednosti, može se zaključiti da metoda ima zadovoljavajuću preciznost i da je prihvatljiva za određivanje sadržaja cinka u ispitivanim uzorcima. Dobiveni analitički prinos bio je unutar dogovorenih granica 98 %-102 %, što pokazuje zadovoljavajuću točnost metode. Granica dokazivanja (LOD) iznosila je 0,4326 mg/L, a granica određivanja (LOQ) 1,3109 mg/L. Iz navedenih podataka može se zaključiti da optimirana metoda ima zadovoljavajuću selektivnost i osjetljivost. Nakon optimizacije metode, izmjerene su koncentracije cinka u uzorcima. Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti da ne postoji značajna statistička razlika između deklarirane vrijednosti i izmjerene vrijednosti sadržaja cinka kod svih analiziranih uzoraka predloženom metodom.



Zinc is a micronutrient essential for the regular function and growth of the human organisms. Zinc plays a substantial role in innate and adaptive immunity cell development. It also reduces oxidative stress by catching reactive oxygen species and by inhibition of enzymes that create them. Zinc deficiency is caused by inadequate intake, higher demands, malabsorption, and excretion by acute diarrhea. The inherited form of zinc deficiency is acrodermatitis enteropathica, a rare autosomal-recessive metabolic disorder resulting from a mutation in the intestinal Zip4 transporter. Functional foods are defined as food products that can only be considered useful if, together with the essential nutritional impact, it has beneficial effects on one or more functions of the human organism, thus improving the general physical conditions or decreasing the risk of the disease evolution. The aim of this research paper was validation of a method for quantification of zinc in functional waters using flame atomic absorption spectroscopy. The validated method was applied for determining zinc in samples of functional waters, and results were compared with officially declared amounts of zinc. The conducted tests showed that the method has satisfying linearity in the examined area,  $R^2 = 0,9987$ . The repeatability of the method expressed as relative standard deviation (RSD) was between 0,58 % and 0,64 % and suggested acceptable repeatability. The reproducibility of the method was determined by measuring the absorbance of standard solutions for three days. Acquired RSD data during three days showed acceptable reproducibility. Recovery results between 98 % and 102 % show great accuracy of the method. Limit of detection (LOD) was 0,4326 mg/L, and limit of quantitation (LOQ) 1,3109 mg/L. These results confirm that the optimized method has satisfying selectivity and sensitivity for determining zinc in samples of functional waters. After the sample analysis, the obtained results showed that there is no statistical difference between declared and measured amounts of zinc in functional waters.

## **8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card**

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Optimizacija metode za određivanje cinka u uzorcima funkcionalnih voda plamenom atomskom apsorpcijskom spektroskopijom

Roko Rebernik

### SAŽETAK

Cink je esencijalni mikronutrijent nužan za pravilan rad i razvoj organizma. Neophodan je za razvoj i funkciju stanica urođene i stečene imunosti. Smanjuje posljedice oksidacijskog stresa hvatajući reaktivne kisikove vrste i inhibicijom enzima koji ih stvaraju. Deficit cinka uzrokovan je, neadekvatnim unosom, povećanim potrebama, malapsorpcijom, i prekomjernim izlučivanjem tijekom akutnih proljeva. Primjer urođenog deficita je acrodermatitis enteropathica, rijetki autosomno-recesivni metabolički poremećaj, čiji je uzrok mutacija u intestinalnom Zip4 transporteru. Funkcionalna hrana definirana je kao prehrambeni proizvod, koji se može smatrati funkcionalnim, ako ima koristan učinak na jednu ili više funkcija ljudskog organizma poboljšavajući općenito stanje organizma ili smanjujući rizik od razvoja bolesti. Cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za kvantitativnu analizu cinka iz uzoraka funkcionalnih voda pomoću plamene atomske apsorpcijske spektroskopije. Optimizirana metoda se primijenila za određivanje sadržaja cinka u uzorcima funkcionalnih voda i dobiveni rezultati su se usporedili s deklariranim sadržajem cinka u ispitivanim uzorcima. Provedeno ispitivanje pokazalo je da u ispitivanom području metoda ima prihvatljivu linearnost,  $R^2 = 0,9987$ . Ponovljivost metode izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je od 0,58 % do 0,64 %, što ukazuje na prihvatljivu ponovljivost. Srednja preciznost određena je mjerenjem koncentracija za tri standardne otopine tijekom tri dana. Iz dobivenih RSD vrijednosti, može se zaključiti da metoda ima zadovoljavajuću preciznost i da je prihvatljiva za određivanje sadržaja cinka u ispitivanim uzorcima. Dobiveni analitički prinos bio je unutar dogovorenih granica 98 %-102 %, što pokazuje zadovoljavajuću točnost metode. Granica dokazivanja (LOD) iznosila je 0,4326 mg/L, a granica određivanja (LOQ) 1,3109 mg/L. Iz navedenih podataka može se zaključiti da optimirana metoda ima zadovoljavajuću selektivnost i osjetljivost. Nakon optimizacije metode, izmjerene su koncentracije cinka u uzorcima. Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti da ne postoji značajna statistička razlika između deklarirane vrijednosti i izmjerene vrijednosti sadržaja cinka kod svih analiziranih uzoraka predloženom metodom.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 4 grafičkih prikaza, 10 tablica i 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: cink, atomska apsorpcijska spektroskopija, funkcionalne vode, optimizacija metode

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

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

**Dr. sc. Marijana Zovko-Končić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: Lipanj 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Method optimisation for determining zinc in samples of functional waters by flame atomic absorption spectroscopy

Roko Rebernik

#### SUMMARY

Zinc is a micronutrient essential for the regular function and growth of the human organisms. Zinc plays a substantial role in innate and adaptive immunity cell development. It also reduces oxidative stress by catching reactive oxygen species and by inhibition of enzymes that create them. Zinc deficiency is caused by inadequate intake, higher demands, malabsorption, and excretion by acute diarrhea. The inherited form of zinc deficiency is acrodermatitis enteropathica, a rare autosomal-recessive metabolic disorder resulting from a mutation in the intestinal Zip4 transporter. Functional foods are defined as food products that can only be considered useful if, together with the essential nutritional impact, it has beneficial effects on one or more functions of the human organism, thus improving the general physical conditions or decreasing the risk of the disease evolution. The aim of this research paper was validation of a method for quantification of zinc in functional waters using flame atomic absorption spectroscopy. The validated method was applied for determining zinc in samples of functional waters, and results were compared with officially declared amounts of zinc. The conducted tests showed that the method has satisfying linearity in the examined area,  $R^2 = 0,9987$ . The repeatability of the method expressed as relative standard deviation (RSD) was between 0,58 % and 0,64 % and suggested acceptable repeatability. The reproducibility of the method was determined by measuring the absorbance of standard solutions for three days. Acquired RSD data during three days showed acceptable reproducibility. Recovery results between 98 % and 102 % show great accuracy of the method. Limit of detection (LOD) was 0,4326 mg/L, and limit of quantitation (LOQ) 1,3109 mg/L. These results confirm that the optimized method has satisfying selectivity and sensitivity for determining zinc in samples of functional waters. After the sample analysis, the obtained results showed that there is no statistical difference between declared and measured amounts of zinc in functional waters.

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

Thesis includes: 37 pages, 4 figures, 10 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: zinc, atomic absorption spectroscopy, functional waters, method optimization

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  
**Marijana Zovko-Končić, Ph.D.** Full 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: June 2020.