

Optimizacija metode za određivanje cinka u uzorcima meda pomoću atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Šimunić, Bernarda

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:284466>

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](#)



Bernarda Šimunić

**Optimizacija metode za određivanje cinka u uzorcima meda
pomoću atomske apsorpcijske spektrofotometrije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan na strpljivosti, pruženoj pomoći te izrazitoj kolegijalnosti tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Mojoj obitelji - mami, tati, bratu, pa i onim četveronožnim članovima – veliko hvala što su uvijek vjerovali u mene, podržavali me i ohrabivali u mojim ciljevima te mi pružali neizmjernu ljubav i sigurnost.

Hvala mojem dečku i prijateljima zbog kojih će mi studentski dani zauvijek ostati u lijepom sjećanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Med	1
1.1.2 Podjela	1
1.1.3 Fizikalna svojstva	2
1.1.4 Kemijski sastav	2
1.1.5 Mineralni sastav	3
1.1.6 Korištenje meda u medicinske svrhe	3
1.2 Cink	4
1.2.1 Uloga cinka u organizmu	4
1.2.2 Deficijencija cinka	4
1.2.3 Intoksikacija cinkom	5
1.2.4 Nutritivni izvori cinka i preporučeni dnevni unos	6
1.3 Atomska apsorpcijska spektrofotometrija	7
1.3.1 Načelo metode	7
1.3.2 Dijelovi uređaja	9
1.4 Validacija	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1 Materijali	17
3.1.1 Korištene kemikalije	17
3.1.2 Aparatura	17
3.1.3 Laboratorijski pribor i posuđe	18
3.1.4 Uzorci	19
3.2 Metode	20
3.2.1 Princip metode	20
3.2.2 Priprema otopina	20
3.2.3 Box – Behnken dizajn	22
3.2.4 Priprema uzoraka za određivanje koncentracije cinka	23
3.2.5 Statistička obrada podataka	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1 Optimizacija uvjeta pripreme uzoraka	25
4.1.1 Eksperimentalni dizajn	25
4.1.2 Analiza modela	26
4.2 Validacija analitičke metode	30
4.2.1 Linearnost	30

4.2.2 Preciznost	31
4.2.3 Točnost	32
4.2.4 Granica dokazivanja i određivanja (LOD i LOQ)	33
4.4 Koncentracija cinka u medu ovisno o načinu proizvodnje.....	35
5. ZAKLJUČAK.....	36
6. LITERATURA	37
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	39
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1 Med

Grana poljoprivrede koja se bavi uzgojem pčela radi dobivanja meda i ostalih pčelinjih proizvoda (voska, matične mliječi, pčelinjeg otrova itd.) te oprašivanja kultiviranih i samoniklih biljaka naziva se pčelarstvo (www.enciklopedija.hr). Med je slatki i viskozni proizvod pčela medarica koje skupljaju nektar biljaka ili izlučevina kukaca. On je zbog svoje slatkoće i okusa od davnina korišten kao zaslađivač, a danas se često koristi kao zamjena za šećer (saharozu) te kao hrana vrlo visoke energetske vrijednosti koja ima ljekovita svojstva (Pohl i sur., 2012).

Na temelju članka 71. stavka 1. Zakona o poljoprivredi ministarstvo poljoprivrede definiralo je med kao prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (NN/53/15).

1.1.2 Podjela

Osnovne vrste meda dijele se prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje. Prema podrijetlu med se dijeli na cvjetni ili nektarni med koji je dobiven od nektara biljaka te medljikovac ili medun koji je uglavnom dobiven od izlučevina kukaca (Hemiptera) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka (NN/53/15). Cvjetni med nadalje se može podijeliti na onaj dobiven od jedne vrste cvijeća i onaj dobiven od više različitih vrsta cvijeća. Botaničko porijeklo, kao i klimatski uvjeti i geografsko porijeklo meda imaju utjecaj na njegovu kvalitetu i sastav (Tomasik, 2003).

Prema načinu proizvodnje ili prezentiranja med se dijeli na med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća, cijedeći med, vrcani med, prešani med i filtrirani med. Med u saću je med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća. Med sa saćem ili med s dijelovima saća sadrži jedan ili više dijelova saća. Cijedeći med je med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla. Vrcani med je med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla. Prešani med je med dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45

°C. Filtrirani med je med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi (NN/53/15).

1.1.3 Fizikalna svojstva

Fizikalna svojstva meda ovise o postotku vode, botaničkom porijeklu, temperaturi i postotku određenih šećera koje sadrži. Aroma i okus meda ovise o sadržaju šećera, kiseline i drugih hlapljivih komponenata poput C1–C5 aldehida i alkohola ili metil- i etil formata. Godišnje doba, izvor nektara te vrijeme između skupljanja nektara i prikupljanja meda kao i uvjeti proizvodnje određuju boju meda iako točna kemijska komponenta koja najviše pridonosi boji meda nije poznata (Ball, 2007). Svježi med je prezasićena otopina šećera, a njegova gustoća varira između 1,38 i 1,45 kg/L na 20 °C. Med je tvar visoke viskoznosti, oko 12 Pas, koja uvelike ovisi o temperaturi (iako se ta korelacija smanjuje iznad 40 °C), postotku šećera i vode kao i o sadržaju dekstrina, trisaharida i proteina (Tomasik, 2003, Ball, 2007).

Kristalizacija je prirodno svojstvo svakog meda i ne utječe na kvalitetu meda. Ona ovisi o temperaturi, sadržaju fruktoze i glukoze kao i o udjelu dekstrina i vode. Temperatura skladištenja, osim što određuje hoće li med biti u tekućem ili kristaliziranom stanju, također određuje i veličinu nastalih kristala. Pri nižim temperaturama nastaje više manjih kristala, dok su pri višim temperaturama kristali veći. Točka tališta kristaliziranog meda je između 40 i 50 °C, a ovisi o sastavu meda – prvenstveno o sadržaju fruktoze i glukoze. Što je veći udio ovih šećera, prije će doći do kristalizacije. Na kristalizaciju također utječe i sadržaj vode i dekstrina, čiji povećani udio usporava kristalizaciju (Tomasik, 2003).

1.1.4 Kemijski sastav

Med sadrži mnogo različitih sastavnica uključujući šećere, vodu, polifenole, slobodne aminokiseline, proteine, enzime, vitamine i esencijalne minerale. Udio vode u medu je između 16,9 i 18 %. Na ukupne ugljikohidrate otpada od 64,9 do 73,1%, od čega su najzastupljenija fruktoza (35,6 – 41,8%) i glukoza (25,4 – 28,1%). Udio glukoze i fruktoze smanjuje se s vremenom za oko 15%. Također, prisutne mogu biti i maltoza (1,8 – 2,7%) i sukroza (0,23 – 1,21%) kao i mnogo drugih jednostavnih šećera poput izomaltoze, nigeroze, turanoze i maltuloze. Neki od prisutnih polifenola u medu su cimetna kiselina, klorogenska kiselina, elaginska kiselina, galna kiselina i brojne druge. Di- i trisaharidi prisutni u medu hidroliziraju u monosaharide djelovanjem enzima poput invertaze i α -glukozidaze koji su također prisutni u medu i čine proteinski dio. Prisutni su i enzimi α - i β -amilaza, glukoza oksidaza, katalaza i

fosfataza. Ostatak proteinskog dijela čine slobodne aminokiseline (178 mg na 100g meda) od kojih je glavni prolin koji čini 49 – 59% ukupnog sadržaja slobodnih masnih kiselina. Prisutnost organskih kiselina pridonosi okusu meda kao i njegovoj kiseloj pH vrijednosti i antimikrobnoj aktivnosti. Najzastupljenija je glukonska kiselina, a zatim slijede asparaginska, limunska, galakturonska, malonska, mravlja kiselina i mnoge druge (Ball, 2007; Escuredo i sur., 2013; Nolan i sur., 2019).

1.1.5 Mineralni sastav

Botaničko i geografsko podrijetlo utječu na sastav minerala prisutnih u medu. Uglavnom su to kalij, fosfor, kalcij i natrij, a u tragovima su prisutni selen, olovo, kadmij, cink, željezo, magnezij, mangan, aluminij, silicij, bor, barij, srebro, molibden, krom i arsen (Leme i sur., 2014). U industrijskim područjima gdje je zagađenje veće, metali poput olova i kadmija, ali i aluminija, barija i olova nakupljaju se u biljkama s kojih pčele kasnije skupljaju nektar pa se to manifestira povećanom koncentracijom tih metala u medu (Karakowska i sur., 2015; Pohl i sur., 2012).

1.1.6 Korištenje meda u medicinske svrhe

Zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava, med se oduvijek, osim u prehrambene svrhe, koristio i u svrhu liječenja bolesti. Med ima antibakterijska svojstva zbog kojih je korišten u liječenju površinskih rana, opekline i upala (Nolan i sur., 2019), a zbog utjecaja na proliferaciju stanica može poboljšati imunosni odgovor i utjecati na razvoj tumora. Budući da sprječava oksidaciju lipoproteina male gustoće, ima pozitivan utjecaj na kardiovaskularni sustav. U tradicionalnoj medicini med je korišten u liječenju gastritisa i peptičkog ulkusa, a njegov pozitivan utjecaj na ova stanja potvrđuju moderna istraživanja koja su dokazala da med potiče obnavljanje oštećene intestinalne mukoze, stimulira rast novog tkiva i ima protuupalna svojstva. Redovita konzumacija meda također je pokazala pozitivne utjecaje na živčani sustav te respiratorni sustav u slučaju astme i bakterijskih infekcija sustava (Mandal i Mandal, 2011; Cianciosi i sur., 2018).

1.2 Cink

Cink je kao mineral otkriven 1869. u biljkama, 1934. u pokusnim životinjama, a 1961. u ljudima (Roohani i sur., 2013). Normalna koncentracija cinka u serumu je između 0,66 i 1,10 $\mu\text{g/mL}$ u odraslih osoba (Wang i sur., 2018) te je ona konstantna neovisno o unosu cinka (Osredkar i Sustar, 2011), a u ljudskom organizmu prosječno ima između 2 i 4 grama cinka, što ga čini drugim najzastupljenijim metalom u našem organizmu, odmah nakon željeza. Najveća koncentracija cinka nalazi se u dijelovima oka i u prostati, a ostatak je raspoređen u mišićima, kostima, mozgu, jetri i bubrezima. Cink se u plazmi nalazi vezan na transferin i albumin koji ga prenose, a metalotionein ga pohranjuje, dok u intestinalnim stanicama metalotionein može vezati ione cinka i utjecati na njegovu intestinalnu apsorpciju (Osredkar i Sustar, 2011).

1.2.1 Uloga cinka u organizmu

Cink ima ključnu ulogu u mnogim biokemijskim i fiziološkim funkcijama organizma na molekularnoj i staničnoj razini te je odgovoran za pravilno funkcioniranje čitavog organizma (Suzuki i sur., 2020). Katalitička aktivnost više od 200 enzima ovisi o cinku, poput karboanhidraze, koja katalizira stvaranje ili razgradnju ugljične kiseline i na taj način održava omjer CO_2 i ugljične kiseline u krvi, ili karboksipeptidaze koja kida peptidne veze tijekom probave proteina (Osredkar i Sustar, 2011). Cink regulira diferencijaciju, proliferaciju i funkciju T- i B – limfocita, te ima važnu ulogu u funkcioniranju imunološkog sustava (Suzuki i sur., 2020). Uključen je u sintezu proteina, DNA i RNA, stabilizaciju membrana stanica, reakcije oksidacije i redukcije u organizmu te apoptozu stanica (Maywald i sur., 2017). Nužan je za zacjeljivanje rana, osjet okusa i mirisa, a potiče i normalan rast i razvoj tijekom trudnoće, djetinjstva i puberteta (Osredkar i Sustar, 2011).

1.2.2 Deficijencija cinka

Deficijencija cinka vrlo je česta pojava. Gotovo 2 milijarde ljudi u zemljama u razvoju pati od deficijencije ovog mikroelementa (Osredkar i Sustar, 2011). Deficijencija je definirana koncentracijom cinka u plazmi ispod 60 $\mu\text{g/dL}$ kada se i počinju javljati prvi simptomi (Kogan i sur., 2017) poput usporavanja rasta, gubitka apetita i oslabljene funkcije imunološkog sustava. Pri težim oblicima deficijencije mogu se javiti i ozbiljniji simptomi poput gubitka kose, dijareje, odgođenog spolnog sazrijevanja, impotencije, hipogonadizma u muškaraca te kožnih lezija i lezija u oku, a mogu se pojaviti i gubitak težine, smanjeni apetit, promjene u osjetu okusa, odgođeno zacjeljivanje rana kao i kognitivni poremećaji, a neprepoznata teška deficijencija

može biti i fatalna (Osredkar i Sustar, 2011). Do deficijencije može doći zbog nedovoljnog unosa cinka hranom ili dodacima prehrani, zbog smanjene apsorpcije ili povećanog izlučivanja te zbog povećanih potreba za cinkom (Kogan i sur., 2017). Posebne dobne skupine ljudi, životne navike kao i određena stanja pridonose riziku od deficijencije cinka. Trudnice i dojilje često imaju smanjene razine cinka zbog povećanih potreba ploda odnosno djeteta (Osredkar i Sustar, 2011). Novorođenčad, mala djeca i adolescenti imaju povećane potrebe za cinkom zbog ubrzanog rasta. Starije osobe pate od nedostatka cinka zbog promjene prehrambenih navika tj. smanjenog unosa crvenog mesa, a smanjena apsorpcija cinka također je razlog za deficijenciju cinka (Roohani i sur., 2013). Biljna vlakna, koja vegetarijanci unose u većem postotku, vežu cink i tako dovode do njegove smanjene apsorpcije što može dovesti do deficijencije. Povećani unos etanola u alkoholičara smanjuje intestinalnu apsorpciju cinka te povećava izlučivanje cinka urinom što dovodi do toga da otprilike 30 – 50 % alkoholičara ima smanjene razine cinka u organizmu (Osredkar i Sustar, 2011). Primijećeno je da osobe s Chronovom bolešću, ulceroznim kolitisom, sindromom kratkog crijeva te sličnim gastrointestinalnim poremećajima kao što je dijareja imaju smanjenu apsorpciju i povećane gubitke cinka iz gastrointestinalnog trakta što u konačnici može dovesti do smanjenih vrijednosti cinka u organizmu (Kogan i sur., 2017). Rizična skupina su i osobe koje boluju od hipertenzije te u svojoj terapiji uzimaju ACE inhibitore, antagoniste angiotenzina II ili hidroklorotiazid (Mossink, 2020).

Nadalje, do deficijencije cinka može doći nakon terapije Wilsonove bolesti penicilaminom kao i zbog genetičkih poremećaja poput bolesti srpastih stanica ili akrodermatitisa enteropatike (Kogan i sur., 2017). Akrodermatitis enteropatika je nasljedni urođeni poremećaj u metabolizmu cinka. Manifestira se pustularnim dermatitisom, dijarejom te distrofijom noktiju. Ozbiljnost bolesti i njenih simptoma proporcionalna je koncentraciji cinka u organizmu, a bolest je prije uvođenja suplementacije cinkom bila smrtonosna za novorođenčad (Osredkar i Sustar, 2011).

1.2.3 Intoksikacija cinkom

Toksičnost uzrokovana cinkom je vrlo rijetka, a cink unesen oralnim putem se smatra sigurnim i netoksičnim (Kogan i sur., 2017). Usprkos tome, zabilježeno je nekoliko slučajeva trovanja cinkom uslijed višestrukog prekoračenja preporučene dnevne doze. Simptomi intoksikacije cinkom su mučnina, povraćanje, gubitak apetita, abdominalni grčevi, dijareja i glavobolja (Roohani i sur., 2013). Unos cinka koji je 10 – 20 puta veći od preporučene dnevne doze od 15

mg može dovesti do deficijencije bakra u organizmu te anemije i neutropenije (Kogan i sur., 2017).

1.2.4 Nutritivni izvori cinka i preporučeni dnevni unos

Cink je esencijalni mikroelement, što znači da ga se mora unijeti hranom ili dodacima prehrani jer ga ljudski organizam sam ne može sintetizirati. Na tržištu su dostupni razni oblici dodataka prehrani koji sadrže cink u obliku cinkovog glukonata, sulfata i acetata (Osredkar i Sustar, 2011). Cink je također sadržan i u crvenom mesu i piletini, ribi i morskim plodovima, mliječnim proizvodima, cjelovitim žitaricama, orašastim plodovima, sjemenkama i mahunarkama (Osredkar i Sustar, 2011; Mocchegiani i sur., 2013; Wang i sur., 2018; www.ods.od.nih.gov).

Preporučeni dnevni unos (engl. Recommended Dietary Allowances, RDA) je preporučena dnevna razina unosa nutrijenata dovoljna da zadovolji potrebe zdrave populacije (87-98%). RDA vrijednosti cinka za različite dobne i spolne skupine, kao i za trudnice i dojilje prikazane su u Tablici 1 (www.ods.od.nih.gov).

Tablica 1. RDA vrijednosti cinka

Dob	Muški spol	Ženski spol	Trudnoća	Dojenje
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

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

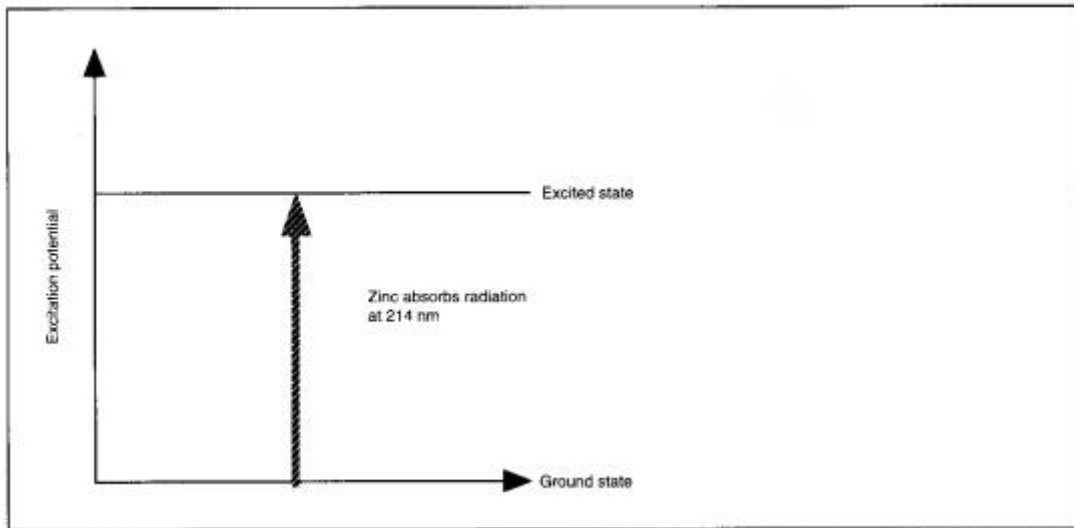
1.3 Atomska apsorpcijska spektrofotometrija

Atomske spektroskopske metode koriste se za kvalitativno i kvantitativno određivanje više od 70 elemenata. Ove metode mogu detektirati koncentracije metala u vrlo niskim koncentracijama (ppm (dijelovi na milijun), ppb (dijelovi na milijardu) ili manje), a također su vrlo brze i visoko selektivne metode kao i cjenovno prihvatljive (Harris, 2010).

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (engl. Atomic Absorption Spectroscopy, AAS) je spektroskopska metoda koju je 1956. godine otkrio Alan Walsh. Ova metoda je široko rasprostranjena u različitim područjima analize poput analize metala u biološkim tekućinama, primjerice krvi i urina, u praćenju onečišćenja okoliša, u utvrđivanju prisutnosti različitih metala u zraku, riječnoj ili morskoj vodi i hrani. Često je korištena metoda i u analizi lijekova budući da se brojni metali koriste kao reagensi i/ili katalizatori u procesima njihove proizvodnje pa postoji mogućnost da zaostanu u ljekovitim pripravcima. Budući da su neki od tih metala štetni za ljudsko zdravlje, važno je utvrditi granične vrijednosti tih metala u gotovim ljekovitim oblicima kao i u njihovim spremnicima (Amidžić Klarić, 2020).

1.3.1 Načelo metode

Svaki atom ima jedinstvenu jezgru sastavljenu od protona i neutrona koja je okružena elektronima u elektronskom oblaku. Elektroni su raspoređeni u orbitale na način da zauzimaju stanje najmanje energije koje nazivamo osnovno stanje. Ako se atom u osnovnom stanju obasja zračenjem određene energije elektron vanjske orbitale prijeći će iz osnovnog u pobuđeno stanje koje je nestabilno (Slika 1). Količina energije, odnosno kvant energije, koja je apsorbirana karakteristična je za pojedini metal, stoga se u atomskoj apsorpcijskoj spektroskopiji koriste izvori zračenja točno određene valne duljine kako bi se mogao odrediti jedan metal u prisutnosti ostalih. Budući da je broj slobodnih atoma u plamenu proporcionalan količini apsorbiranog zračenja, moguće je kvantitativno odrediti količinu ispitivanog analita (Watson, 1999; Harris, 2010; Skoog i sur., 2014).



Slika 1. Prelazak cinka iz osnovnog u pobuđeno stanje apsorpcijom zračenja valne duljine 214 nm (preuzeto i prilagođeno iz: Watson, 1999)

Prvi korak u AAS-u je atomizacija – isparavanje i razgradnja uzorka pri kojoj atomi prelaze u dobro odvojene atome i elementarne ione. Na temelju načina atomizacije razlikuje se nekoliko tehnika za određivanje metala:

1. plamena (engl. Flame Atomic Spectroscopy, FAAS)
2. grafitna (engl. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy, GF AAS)
3. hidridna (engl. Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy, HG AAS)

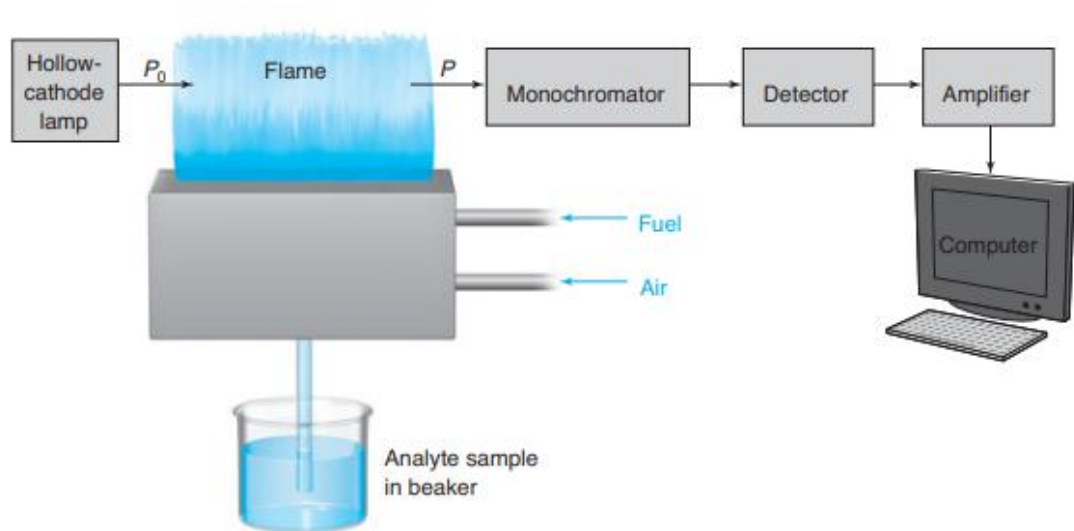
Tako atomizirane atome obasjava zračenje točno određene valne duljine pri čemu se atomi pobuđuju apsorpcijom točno određenim kvantima energije karakterističnih za pojedine elektronske prijelaze. Budući da je količina zračenja koje obasjava atome poznata, a količina zračenja koje izlazi bilježi detektor, moguće je izračunati koncentraciju analiziranog metala (Amidžić Klarić, 2020).

1.3.2 Dijelovi uređaja

AAS uređaj sastoji se od 5 ključnih dijelova:

1. Linijski izvor zračenja – žarulja sa šupljom katodom (engl. Hollow cathode lamp)
2. Generator atomske pare – plameni atomizator laminarnog protoka (engl. laminar flow flame atomiser)
3. Monokromator (engl. Monochromator)
4. Detektor (engl. Detector)
5. Sustav za obradu podataka (engl. Computer)

Dijelovi AAS uređaja sa plamenim atomizatorom prikazani su na Slici 2 (Harris, 2010).

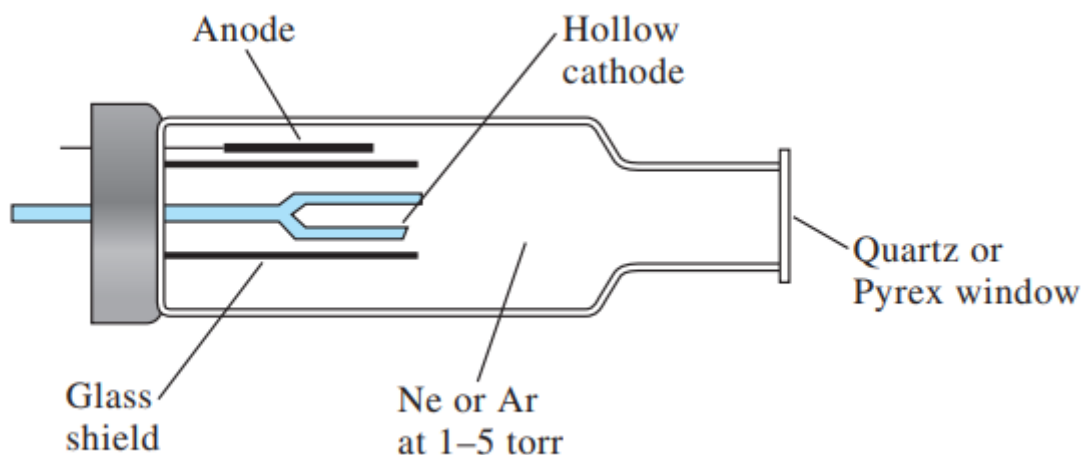


Slika 2. Dijelovi AAS-a: izvor zračenja – žarulja sa šupljom katodom, generator atomske pare – plamen, monokromator, detektor, sustav za obradu podataka (preuzeto iz: Harris, 2010)

Linijski izvor zračenja – žarulja sa šupljom katodom

Budući da monokromatori ne mogu izolirati dovoljno uske vrpce valnih duljina i točne frekvencije, kao izvor zračenja koriste se žarulje sa šupljom katodom. Takve žarulje sastoje se od anode (engl. Anode) izrađene od volframa i cilindrične šuplje katode (engl. Hollow cathode) izrađene od metala koji se analizira ili su obložene tim metalom. Takva anoda i katoda nalaze se pod tlakom u staklenoj cijevi ispunjenoj inertnim plinom – neonom ili argonom. Kada su te elektrode izložene razlici potencijala od otprilike 300 V, inertni plin ionizira i kationi inertnog plina kreću se između dvije elektrode i stvara se struja od 5 do 10 mA. Ako je stvoren dovoljno

veliki potencijal, kationi udaraju u katodu s dovoljno energije da izbiju atome metala i stvore atomski oblak. Neki od tako izbijenih atoma metala se nalaze u pobuđenom stanju koje je nestabilno te se brzo vraćaju u osnovno stanje pri čemu emitiraju zračenje uske vrpce valnih duljina koje onda u plamenu apsorbiraju atomi metala ispitivanog uzorka. Naposljetku se izbijeni atomi metala vraćaju na površinu katode ili se talože na stijenke žarulje. Za svaki element potrebna je druga lampa, a komercijalno su dostupne žarulje za oko 70 elemenata (Skoog i sur., 2014). Shematski prikaz žarulje sa šupljom katodom nalazi se na Slici 3 (Skoog i sur., 2014).

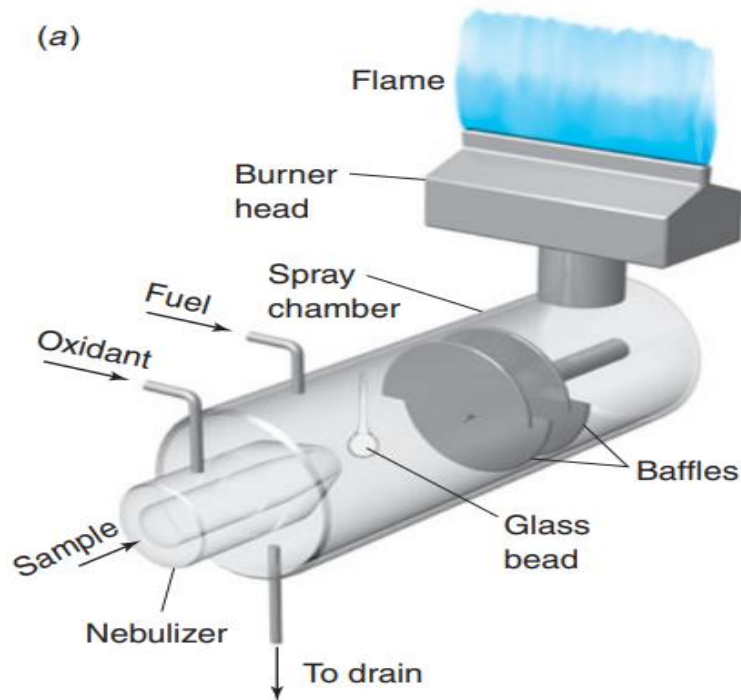


Slika 3. Dijelovi žarulje sa šupljom katodom: anoda, šuplja katoda, prozor od kvarca ili borosilikatnog stakla, inertni plin neon ili argon, stakleni štiti (preuzeto iz: Skoog i sur., 2014)

Generator atomske pare – plameni atomizator laminarnog protoka

Moderni AAS uređaji s plamenim atomizatorom koriste gotovo isključivo plamene atomizatore laminarnog protoka (Skoog i sur., 2014). U ovakvom tipu uređaja uzorak se raspršuje u protoku oksidansa (engl. Oxidant) (obično zraka) na vrhu kapilare te prelazi u oblik aerosola. Aerosol ulazi u komoru za raspršivanje (engl. Spray chamber), gdje se miješa s gorivom (engl. Fuel) te se kroz niz pregrada (engl. Baffles), uklanjaju sve osim najmanjih kapljica. Prolaskom kroz plamen (engl. Flame) kapljice isparavaju, a čvrste čestice raspadaju se na atome. Tipična brzina

protoka je 2 do 5 mL/min, a širina plamena je između 5 i 10 cm (Skoog i sur., 2014). Najčešća kombinacija goriva i oksidansa je smjesa acetilena i zraka koji mogu proizvesti temperature od 2100 do 2400 °C, a ukoliko su potrebne veće temperature može se koristiti smjesa acetilena i dušikovog oksida (Harris, 2010). Shematski prikaz plamenog atomizatora laminarnog protoka prikazan je na Slici 4 (Harris, 2010).



Slika 4. Dijelovi plamenog atomizatora laminarnog protoka: oksidans, gorivo, komora za raspršivanje, glava plamenika, plamen, pregrade, stakleni nišan, odvod, raspršivač, dovod uzorka (preuzeto iz: Harris, 2010.)

Monokromator je dio uređaja koji odabire jednu usku vrpću zračenja koje emitira žarulja sa šupljom katodom koju onda propušta do detektora (Harris, 2010), dok ostatak interferirajućeg zračenja iz plamena zaustavlja (Watson, 1999).

Detektor, pogođen fotonima, proizvodi električni signal (Harris, 2010).

Sustav za obradu podataka čini računalo koje prima i obrađuje električni signal iz detektora te prikazuje konačnu koncentraciju analita u uzorku (Harris, 2010).

1.4 Validacija

Validacija je proces koji znanstvenim ispitivanjem dokazuje da je određena analitička metoda primjerena za određenu primjenu. Potrebno je dovoljno laboratorijskih mjerenja i podataka kojima se može jasno potvrditi i dokumentirati da je metoda valjana u određenim uvjetima rada. Zahtjevi dobre proizvođačke prakse (Good manufacturing practises, GMP) i dobre laboratorijske prakse (Good laboratory practise, GLP) nalažu validaciju analitičkih postupaka kako bi se osiguralo da će se u propisanim uvjetima primjene analitičkog postupka dobiti valjani rezultati. Validaciju nije potrebno provoditi prije mjerenja svakog novog analita, već se ona provodi pri razvoju i uvođenju nove metode ili pri promjeni nekog od dijelova analitičke metode koja je već prethodno validirana. Promjena se može odnositi na promjenu namjene već validirane metode, prilagodbu i poboljšanje već validirane metode, prenošenje metode u drugi laboratorij ili na drugi instrument, promjene u sintezi glavne komponente ili u sastavu gotovog proizvoda te promjene u analitičkom postupku (Nigović i sur., 2014).

Analitički parametri koji se određuju postupom validacije su:

1. Točnost (engl. Accuracy)
2. Preciznost (engl. Precision)
3. Specifičnost / selektivnost
4. Granica dokazivanja engl. (Limit of detection, LOD)
5. Granica određivanja (engl. Limit of quantitation, LOQ)
6. Linearnost i koncentracijsko područje (engl. Linearity and range)
7. Izdržljivost

Ovisno o namjeni analitičke metode, ispituju se samo određeni parametri. Sve dok se ne zadovolje zahtjevi navedeni u propisima, analitički postupak mora se razvijati i validirati (Nigović i sur., 2014).

Točnost analitičkog postupka izražava stupanj slaganja između vrijednosti rezultata dobivenih mjerenjem i vrijednosti koje su prihvaćene kao stvarne ili referentne vrijednosti.

Točnost se određuje mjerenjem uzoraka poznate koncentracije i uspoređivanjem tih rezultata sa rezultatima mjerenja analita. Uzorak se mjeri najmanje tri puta na najmanje tri različite koncentracije u radnom području metode. Određivanjem točnosti mogu se utvrditi sustavne pogreške. Točnost se iskazuje analitičkim prinomom (engl. recovery), a definirana je formulom:

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

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

Preciznost analitičke metode je njena sposobnost da pokazuje slaganje između višestruko ponovljenog mjerenja uzoraka dobivenih višestrukim uzorkovanjem iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima.

Preciznost se određuje mjerenjem 5 do 6 puta na 2 do 3 različite koncentracije. Određivanjem preciznosti mogu se utvrditi slučajne pogreške metode. Preciznost se najčešće iskazuje kao relativna standardna devijacija (engl. Relative standard deviation, RSD, %), a računa se prema formuli:

$$RSD = \frac{SD}{\chi} \times 100$$

gdje je SD standardna devijacija (engl. Standard deviation), a χ srednja vrijednost dobivenih rezultata. Preciznost se izražava kao ponovljivost (engl. Repeatability), srednja preciznost (engl. Intermediate Precision) i obnovljivost (engl. Reproducibility). Ponovljivost iskazuje podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka na istom instrumentu, kod istog analitičara, korištenjem istih reagensa u istom laboratoriju u kratkom vremenskom razdoblju odnosno mjerenja pod istim uvjetima. Srednja preciznost označava odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom pod različitim uvjetima - različit je analitičar, instrument, reagensi – ali u istom laboratoriju kroz duži vremenski period. Srednja preciznost pokazuje hoće li metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom uporabe u laboratoriju. Obnovljivost označava podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem nekoliko istih uzoraka istom metodom, ali kod različitih analitičara u različitim laboratorijima i različitim radnim uvjetima unutar specificiranih parametara metode. Obnovljivost pokazuje hoće li metoda davati iste rezultate u različitim laboratorijima (Nigović i sur., 2014).

Specifičnost (engl. Specificity) je sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje jedan analit od ostalih komponenata prisutnih u uzorku.

Selektivnosti je sposobnost metoda da može točno odrediti željeni analit u prisutnosti drugih komponenata prisutnih u uzorku. Druge komponente mogu biti pomoćne tvari, onečišćenja ili razgradni produkti odnosno matrice uzoraka. Ispitivanje selektivnosti bitno je kod analitičkih

postupaka kojim se određuje sadržaj ili ispituje čistoća uzorka. Provode se dodatkom onečišćenja ili pomoćnih tvari čistoj ljekovitoj tvari te se potom provodi mjerenja, a ukoliko onečišćenja nisu dostupna, uzorak se može podvrgnuti uvjetima razgradnje te se nakon toga utvrđuju interferencije (Nigović i sur., 2014).

Granica dokazivanja (engl. Limit of detection, LOD) predstavlja najmanju koncentraciju analita u uzorku koja se može detektirati, ali se ne može točno kvantificirati, pri zadanim uvjetima metode (Nigović i sur., 2014).

Granica određivanja (engl. Limit of quantitation, LOQ) predstavlja najmanju koncentraciju analita u uzorku koju je moguće odrediti sa prihvatljivom točnošću i preciznošću, pri zadanim uvjetima metode (Nigović i sur., 2014).

Objekti vrijednosti, LOD i LOQ, određuju se razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma: $LOD = 3:1$; $LOQ = 10:1$ (Nigović i sur., 2014).

Vrijednosti LOD i LOQ mogu se izračunati iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca prema formulama:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a} \quad LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

gdje σ označava standardno odstupanje rezultata dobivenih odgovarajućim brojem ponovljenih uzastopnih mjerenja slijepog uzorka, odnosno standardno odstupanje regresijskog pravca, ili standardno odstupanje y -odsječka regresijskog pravca, a a označava nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

Linearnost predstavlja sposobnost metode da unutar određenog intervala vrijednosti daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita mjenjenog uzorka. Linearnost je moguće odrediti mjerenjem tri do šest puta najmanje pet različitih koncentracija analita. Linearnost metoda iskazuje se koeficijentom korelacije regresijskog pravca, R , a vrijednost mora biti $R > 0,999$. Grafičkim prikazom ovisnosti izmjenjenog analitičkog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja (Nigović i sur., 2014).

Koncentracijsko područje mjerenja označava raspon između donje i gornje koncentracije analita u uzorku, a uključuje i granične vrijednosti. Unutar koncentracijskog područja analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost (Nigović i sur., 2014). Preporučeno radno područje za određivanje sadržaja aktivne tvari je između 80 i 120% (Nigović i sur., 2014).

Izdržljivost (engl. Robustness) označava sposobnost analitičkog postupka da ostane nepromijenjen pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metoda. Izdržljivost je pokazatelj pouzdanosti metode tijekom njene normalne primjene uz male promjene uvjeta do kojih realno dolazi u svakodnevnom radu. Procjenjuje se variranjem jednog (unutarnjeg) faktora, a ostali ostaju nepromijenjeni kako bi se utvrdilo koji točno faktori utječu na metodu. Uvjete koji se moraju strogo kontrolirati tijekom provođenja metode određuje analitičar (Nigović i sur., 2014).

Otpornost (engl. Ruggedness) je mjera reproducibilnosti rezultata dobivenih analizom istog uzorka pod nizom očekivanih radnih uvjeta ispitivanja. Procjenjuje se variranjem vanjskih faktora metode, npr. različitog laboratorija, analitičara, instrumenta ili šarže reagensa. Otpornost daje uvid u utjecaj okoline i radnih varijabli metode na njene rezultate (Nigović i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Med je prirodno sladak proizvod pčela medarica. Od davnina se koristi kao prirodni zaslađivač, a zbog svojih antibakterijskih i protuupalnih svojstava te bogatog vitaminskog i mineralnog sastava med se često koristiti i u medicinske svrhe.

Cink je metal iz skupine esencijalnih elemenata u tragovima koji ima ključnu ulogu u mnogim biokemijskim i fiziološkim funkcijama organizma na molekularnoj i staničnoj razini te je odgovoran za pravilno funkcioniranje čitavog organizma. Katalitička aktivnost više od 200 enzima ovisi o cinku te on ima bitnu ulogu u funkcioniranju imunološkog sustava (Suzuki i sur., 2020). Nužan je za zacjeljivanje rana, osjet okusa i mirisa, a potiče i normalan rast i razvoj tijekom trudnoće, djetinjstva i puberteta (Osredkar i Sustar, 2011). Deficijencija cinka vrlo je česta pojava te gotovo 2 milijarde ljudi u zemljama u razvoju pati od deficijencije ovog mikroelementa (Osredkar i Sustar, 2011).

Cilj ovog rada je optimizirati metodu za određivanje koncentracije cinka primjenom atomske apsorpcijske spektrofotometrije. Optimizirana metoda primijenit će se za određivanje cinka u uzorcima meda različitog proizvodnog podrijetla – industrijska proizvodnja meda na veliko te mala proizvodnja u obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Korištene kemikalije

- 70 % HClO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 65 % HNO₃ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Standard Zn 1000 mg/L (Sigma, Aldrich, Njemačka)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm⁻¹, pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, SAD)

Sve korištene kemikalije su pro analysi čistoće.

3.1.2 Aparatura

- Analitička vaga AB204 - S (Mettler Toledo, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka)

Mjerenja su provedena na atomsko apsorpcijskom spektrofotometru Aanalyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine pri uvjetima:

- žarulja: žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
- valna duljina (nm): 213,9
- gorivo/oksidans: acetilen/zrak
- acetilen (tlak (Pa)/protok (dm³ min⁻¹)): 0,9x10⁵/2
- zrak (tlak (Pa)/protok (dm³ min⁻¹)): 5,5x10⁵/17
- širina pukotine (nm): 0,7
- korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- fotodetektor

- pisač, računalo: AA Winlab 32 Software Dell OptiPlex GX270, računalo + monitor + printer HP 5652

3.1.3 Laboratorijski pribor i posuđe

- odmjerne tikvice veličine 25 mL, 50 mL, 2000 mL s čepovima
- čaša
- lijevak
- automatske mikropipete volumena 100-1000 μL , 1000-5000 μL
- metalni stalak, mufa, klema
- filter papir F2045 grade (bezpepelni filter papir), promjer 90 mm (Chmlab Group, Španjolska)
- plastične kapalice
- plastične epruvete volumena 50 mL s čepovima
- plastični stalci za epruvete
- boce štrcaljke

3.1.4 Uzorci

Korišteni uzorci cvjetnog meda prikupljeni od različitih proizvođača te prikladno označeni i čuvani. Geografsko porijeklo kao i mase uzoraka odmjerene za samu analizu navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Porijeklo i mase uzoraka meda

Redni broj uzorka	Porijeklo	Masa uzorka (g)
1	Lekenik, Sisačko-moslavačka županija	0,5036
2	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija	0,5036
3*	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija	0,5046
4	Križevci, Koprivničko-križevačka županija	0,5025
5	Grad Zagreb	0,5047
6	Pisarovina, Zagrebačka županija	0,5098
7	Đakovo, Osječko-baranjska županija	0,504
8	Volim med	0,5
9	Orle, Zagrebačka županija	0,5003
10	Novska, Sisačko-Moslavačka županija	0,5
11	Žumberak, Zagrebačka županija	0,5026
12	Novska, Sisačko-Moslavačka županija	0,5005
13	Grad Zagreb	0,5019
14	Grad Zagreb	0,5046
15	Pula, Istarska županija	0,5014
16	Ludbreg, Varaždinska županija	0,5071
17*	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija	0,5059
18	Kloštar Podravski, Koprivničko-Križevačka županija	0,5075
19	Podravka	0,5012
20	Daruvar, Bjelovarsko-bilogorska županija	0,506
21	Apimel	0,5042

*med istog proizvođača

3.2 Metode

3.2.1 Princip metode

- Za optimizaciju pripreme uzoraka meda korišten je Box – Behnkenov dizajn koji se temeljio na metodi odzivne površine (engl. Response Surface Methodology, RMS). Analiziran je utjecaj nezavisnih varijabli (uvjeta pripreme uzoraka - temperature (X_1), vremena soniciranja (X_2) i udjela HClO_4 u smjesi otapala (X_3)) na promatrani odziv (izmjerenu koncentraciju cinka u uzorcima meda).
- Količina cinka u uzorku izmjerena je mjerenjem apsorbancije uzorka raspršenog u smjesi zraka i acetilena pri čemu je došlo do atomizacije te su tako nastali atomi izloženi zračenju valne duljine 213,9 nm pri čemu se pratila promjena intenziteta zračenja.

3.2.2 Priprema otopina

- **priprema 2 % HNO_3**

2 % HNO_3 pripremljena je razrjeđivanjem 10 mL koncentrirane HNO_3 u odmjernoj tikvici od 500 mL. U tikvicu je najprije stavljena manja količina ultračiste vode, zatim je dodano 10 mL koncentrirane HNO_3 te je tikvica nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Dobivena otopina koristila se za ispiranje plamenog atomizatora.

- **priprema standardnih otopina cinka koncentracije od 0,05 do 2 mg/L**

Iz komercijalno dostupne standardne otopine cinka koncentracije 1000 mg/L (Sigma, Aldrich, Njemačka) pripremljena je matična standardna otopina cinka koncentracije 10 mg/L tako da se 0,5 mL komercijalno dostupne standardne otopine cinka dodalo u tikvicu od 50 mL i nadopunilo ultračistom vodom do oznake.

Iz tako pripremljene matične standardne otopine cinka koncentracije 10 mg/L pripremljene su standardne otopine cinka koncentracija od 0,05 do 2 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL na način kako je prikazano u Tablici 3. Tako pripremljene standardne otopine služile su za izradu kalibracijskog pravca.

Tablica 3. Koncentracije i priprema standardnih otopina cinka

Koncentracija standarda cinka (mg/L)	Priprema standarda	Ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu
0,05 (ST1)	125 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	200×
0,1 (ST2)	250 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	100×
0,2 (ST3)	500 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	50×
0,5 (ST4)	1250 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	20×
1 (ST5)	2500 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	10×
2 (ST6)	5000 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	5×

- **priprema uzoraka za ispitivanje točnosti metodom standardnog dodatka**

Točnost metode ispitana je metodom standardnog dodatka pri kojoj se unaprijed određene količine standardne otopine analita poznate koncentracije dodaju otopini uzorka nepoznate koncentracije analita te se iz razlike signala izračuna točna koncentracija analita u uzorku. Ovu metodu moguće je koristiti ukoliko je odnos signala i koncentracije analita linearan (Harris, 2010).

Stoga su uzorcima meda dodane različite točno poznate količine standardne otopine cinka koncentracije 10 mg/L te su nadopunjene ultračistom vodom do ukupne mase od 3 g. Podaci su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Priprema uzoraka za određivanje točnosti metode.

Masa uzorka (g)	Volumen standardne otopine cinka (mL)	Koncentracija dodanog standarda Zn (mg/L)
0,5042	0,03	0,1
0,5042	0,06	0,2
0,5042	0,09	0,3

3.2.3 Box – Behnken dizajn

Cilj korištenja Box-Behnken dizajna bio je odabir optimalnih uvjeta pripreme uzoraka meda za određivanje sadržaja Zn pomoću AAS. Ispitivani su sljedeći parametri: temperatura, vrijeme soniciranja pomoću ultrazvučne kupelji i udio HClO_4 u smjesi kiselina (HClO_4 i HNO_3) koja se koristila za razaranje samog uzorka. Udio HClO_4 u smjesi otapala iznosio je 20, 30 ili 40 %, uzorci su sonicirani 15, 30 ili 45 min u ultrazvučnoj kupelji pri snazi od 360 W i frekvenciji 35 Hz na temperaturi od 20, 40 ili 60 °C. Kako bi se utvrdili optimalni uvjeti pripreme uzoraka, 0,5 g uzorka izvagano je u plastičnu epruvetu od 50 mL, otopljeno u 6 mL odgovarajućeg otapala te izloženo različitim uvjetima. Uvjeti pripreme uzoraka odabrani su u skladu s Box – Behnkenovim dizajnom gdje su nezavisne varijable bile temperatura = X_1 , vrijeme soniciranja = X_2 i udio HClO_4 u smjesi otapala = X_3 što je prikazano u Tablici 5.

Tablica 5. Nezavisne varijable i njihove vrijednosti u Box – Behnken - ovom dizajnu

Nezavisne varijable	Kod	Razine		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	X ₁	20	40	60
Vrijeme soniciranja (min)	X ₂	15	30	45
Udio HClO ₄ (% V/V)	X ₃	20	30	40

3.2.4 Priprema uzoraka za određivanje koncentracije cinka

Da bi se AAS - om mogla odrediti koncentracija metala u uzorku potrebno je ukloniti kemijske i fizikalne interferencije koje uglavnom predstavljaju ugljikohidratne komponente meda. Te interferencije moguće je ukloniti mokrim spaljivanjem korištenjem smjese 70% HClO₄ i koncentrirane HNO₃ na određenoj temperaturi kako bi se izbjeglo pjenjenje (Pohl i sur., 2012).

Uzorci (1-21) su pripremljeni tako da se približno 0,5 g uzorka (točne mase prikazane su u Tablici 2) izvaže izravno u plastičnu epruvetu od 50 mL te se doda 2400 µL 70% HClO₄ i 3600 µL koncentrirane HNO₃ te se ostavi otvoreno na zraku 5 minuta. Uzorci su zatim sonicirani u ultrazvučnoj kupelji 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon soniciranja uzorci su preneseni u odmjerne tikvice od 25 mL na način da se u odmjernu tikvicu najprije ulio dio ultračiste vode, zatim se kvantitativno prenio uzorak preko lijevka koji je onda ispiran ultračistom vodom te se odmjerne tikvica nadopunila do oznake ultračistom vodom.

3.2.5 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 9* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, SAD, www.graphpad.com). Za design eksperimenata korišten je program *Design Expert v. 12.0.12.0.* (Stat Ease, USA). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti 3 mjerenja \pm standardna devijacija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Optimizacija uvjeta pripreme uzoraka

4.1.1 Eksperimentalni dizajn

Nezavisne varijable pripreme uzoraka za koje se smatra da kasnije mogu utjecati na uspješnost mjerenja koncentracije metala metodom AAS bile su temperatura, vrijeme soniciranja i udio HClO_4 u smjesi otapala. Koncentracija cinka u uzorku izmjerena je nakon otapanja uzorka u smjesi otapala HClO_4 i HNO_3 u kojoj je udio HClO_4 iznosio 20, 30 ili 40 %, soniciranja 15, 30 ili 45 min na temperaturi od 20, 40 ili 60 °C. Korištenjem Box – Behnkenovog dizajna dobiveno je 17 različitih kombinacije nezavisnih varijabli s 5 ponavljanja u centralnoj točki (30% HClO_4 , 30 min, 30 °C) što je prikazano u Tablici 6 što čini jednu od prednosti ovog dizajna jer značajno smanjuje broj potrebnih ispitivanja za dizajniranje modela.

Tablica 6. Box – Behnken dizajn i izmjerene vrijednosti koncentracije cinka

Redni broj mjerjenja	Udio HClO₄ (% , V/V)	Temperatura (°C)	Vrijeme soniciranja (min)	Koncentracija Zn (mg/L)
1	30	20	15	4,552
2	30	60	15	4,091
3	30	20	45	3,14
4	30	60	45	4,143
5	20	20	30	4,093
6	20	60	30	4,369
7	40	20	30	4,415
8	40	60	30	4,931
9	20	40	15	3,889
10	20	40	45	4,515
11	40	40	15	4,210
12	40	40	45	4,701
13	30	40	30	4,800
14	30	40	30	4,263
15	30	40	30	4,113
16	30	40	30	4,433
17	30	40	30	4,330

Izmjerena koncentracija cinka varirala je između 3,14 i 4,931 mg/L te je ovisila o uvjetima pripreme uzoraka. Uzimajući u obzir složenost pripreme većeg broja uzoraka te preciznost mjerenja, optimalnim uvjetima pokazala se smjesa otapala 2400 μ L 70% HClO₄ i 3600 μ L koncentrirane HNO₃, soniciranje 15 minuta na sobnoj temperaturi (20 °C).

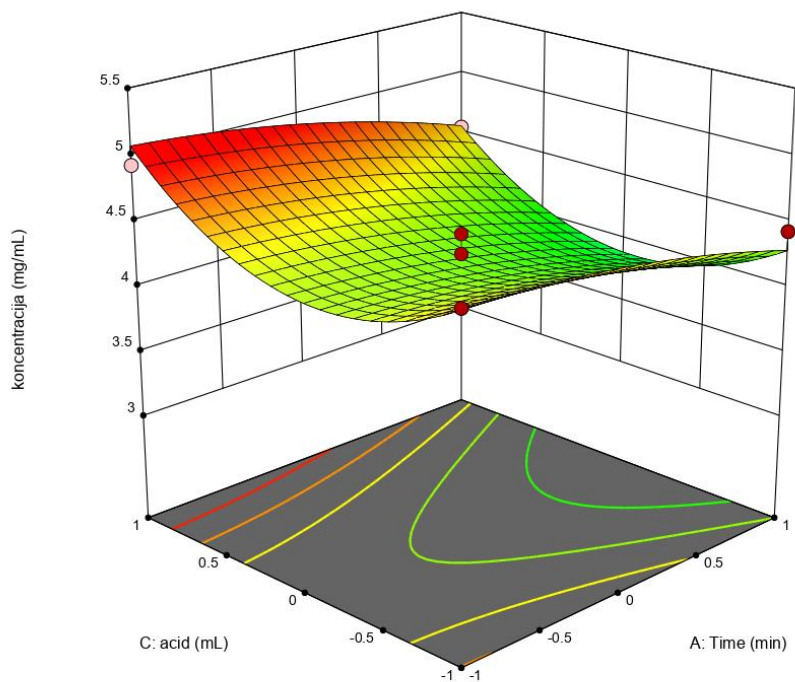
4.1.2 Analiza modela

Analizom eksperimentalnih podataka u programu Design Expert utvrđeno je da se utjecaj uvjeta pripreme uzoraka na koncentraciju izmjerenog cinka može prikazati modelom kvadratne polinomne jednadžbe:

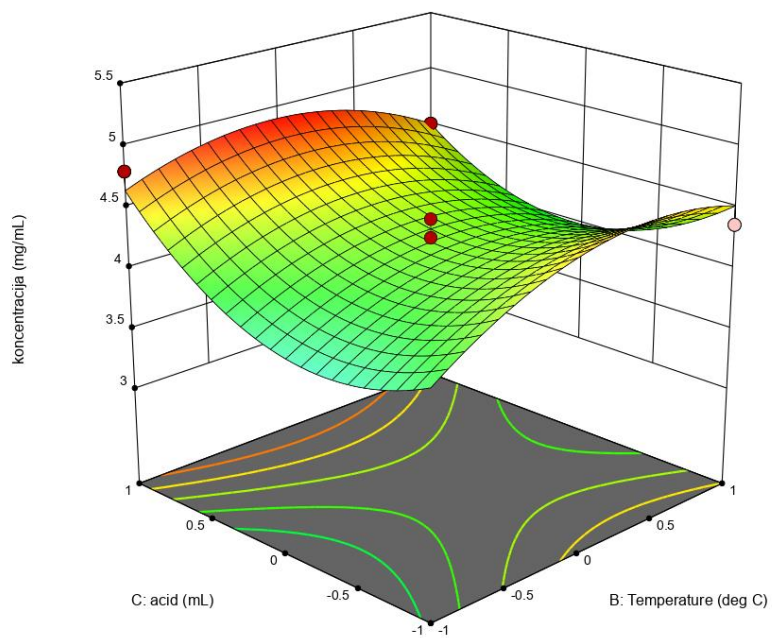
$$c(\text{Zn}) (\text{mg/mL}) = -0,090625 \times X_1^2 - 0,329625 \times X_2^2 (*) + 0,516375 \times X_3^2 (*) - 0,22775 \times X_1 (*) + 0,10425 \times X_2 + 0,16475 \times X_3 + 0,19275 \times X_1 \times X_2 - 0,02775 \times X_1 \times X_3 - 0,16925 \times X_2 \times X_3 + 4,2285$$

gdje X_1 predstavlja temperaturu ($^{\circ}\text{C}$), X_2 predstavlja vrijeme soniciranja (min), X_3 predstavlja udio HClO_4 u smjesi otapala (%), a (*) predstavlja značajne faktore.

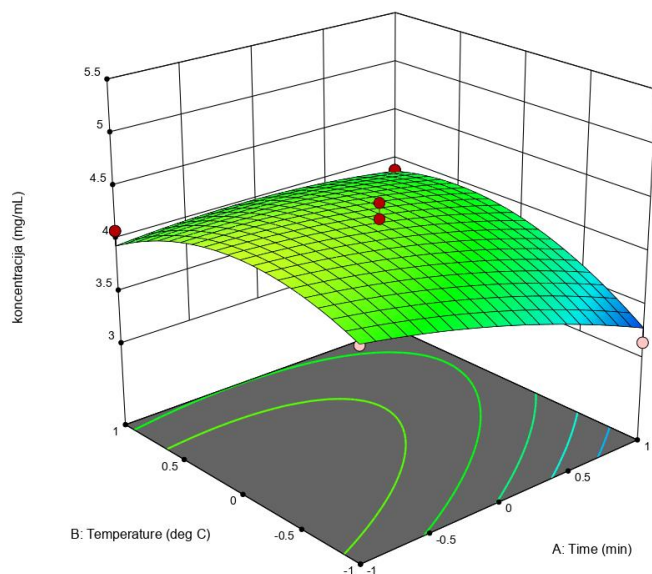
Iz same jednadžbe vidljivo je da koncentracija cinka ovisi najviše od kvadratnom faktoru temperature i udjela kiseline kao i o linearnom faktoru vremena. Na temelju dobivenog kvadratnog polinoma može se prikazati odzivna površina koja daje vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara (udjela HClO_4 u smjesi otapala, temperature i vremena) i njihove interakcije na iznos zavisne varijable (koncentracije cinka). Grafički prikaz odzivne površine dobiven je smještanjem zavisne varijable i dvije nezavisne varijable na odgovarajuće osi koordinatnog sustava (x, y, z), dok je srednja vrijednost treće nezavisne varijable uzeta kao fiksna. Grafički prikaz nalazi se na Slikama 5, 6 i 7.



Slika 5. Odzivna površina koncentracije cinka u ovisnosti o udjelu HClO₄ i vremenu



Slika 6. Odzivna površina koncentracije cinka u ovisnosti o udjelu HClO₄ i temperaturi



Slika 7. Odzivna površina koncentracije cinka u ovisnosti o temperaturi i vremenu soniciranja,

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je određivanju koncentracije cinka najviše pogodovala kombinacija visokog udjela HClO_4 i minimalnog vremena soniciranja dok temperatura nije imala značajniji utjecaj. Valjanost modela potvrđena je analizom varijance (ANOVA) nakon uklapanja eksperimentalnih podataka u odgovarajuće polinomne modele. Niske F – vrijednosti pokazuju da odstupanje modela ni u kojem slučaju nije statistički značajno. P – vrijednost manja od 0,05 pokazuje da je odabrani kvadratni model statistički značajan. Vrijednost koeficijenta determinacije, r^2 , je blizu 1 što označava dobru reprezentativnost modela. ANOVA prikazana je u Tablici 7.

Tablica 7. Analiza varijance (ANOVA) za kvadratni model optimizacije uvjeta pripreme uzoraka meda

Izvor	SS	Df	MS	F -vrijednost	P -vrijednost
Model	2,42	9	0,2693	6,99	0,0227
Prikladnost podudaranja	0,1309	2	0,0655	3,19	0,1811
Čista pogreška	0,0616	14	0,0205		

SS = zbroj kvadrata; df = stupnjevi slobode; MS = aritmetička sredina kvadrata

$r^2 > 0,9264$

4.2.2 Preciznost

Preciznost ove metode iskazana je kao ponovljivost i srednja preciznosti, a izražena je statističkim veličinama kao standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD).

Ponovljivost je ispitana mjerenjem 4 standardne otopine cinka različitih koncentracija (ST2, ST4, ST5 i ST6) mjerenih 6 puta u istom danu. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati mjerenja 4 standardne otopine cinka različitih koncentracije u istom danu

Broj mjerenja	ST2 (0,1 mg/L)	ST4 (0,5 mg/L)	ST5 (1 mg/L)	ST6 (2 mg/L)
1	0,126	0,516	0,991	1,933
2	0,120	0,528	1,050	2,010
3	0,099	0,473	0,979	1,979
4	0,089	0,505	0,954	1,984
5	0,116	0,506	0,968	1,988
6	0,099	0,517	0,999	1,973
Srednja vrijednost	0,108	0,508	0,990	1,978
SD	0,015	0,019	0,033	0,025
RSD	13,428	3,719	3,375	1,281

Najviša RSD vrijednost dobivena je za ST2 što se može pripisati nestabilnosti standardnih otopina nižih koncentracija. Ostale dobivene vrijednosti su bile u rasponu od 1,281 do 3,719. Možemo zaključiti da je metoda odgovarajuće ponovljivosti.

Srednja preciznost ispitana je mjerenjem 3 standardne otopine različitih koncentracija (ST1, ST4, ST6) kroz 3 dana. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati mjerenja 3 standardne otopine cinka različitih koncentracije tijekom 3 dana

Redni broj dana	ST1 (0,05 mg/L)	ST4 (0,5 mg/L)	ST6 (2 mg/L)
1. dan	0,051	0,498	1,964
2. dan	0,048	0,503	1,991
3. dan	0,045	0,520	1,955
Mean	0,048	0,507	1,970
SD	0,003	0,012	0,01
RSD	6,250	2,275	0,951

Dobivene vrijednosti RSD su bile u rasponu od 0,951 do 6,250. Više RSD vrijednosti mogu se pripisati nestabilnosti standardnih otopina nižih koncentracija, dok dobivene vrijednosti za standardne otopine viših koncentracija pokazuju bolju srednju preciznost.

4.2.3 Točnost

Točnost je ispitana metodom standardnog dodatka. Način pripreme uzoraka prikazan je u Tablici 4.

Točnost se iskazuje analitičkim prinosom (engl. recovery), a definirana je formulom:

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

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

Tablica 10. Izmjerene koncentracije cinka u čistom uzorku te uzorku uz dodatak standardne otopine cinka.

Koncentracija Zn u uzorku ($\mu\text{g/mL}$) + koncentracija dodanog standarda Zn (mg/L)	Ukupna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) – teorijski (X)	Ukupna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) – izmjereno (χ)	Koncentracija dodane standardne otopine Zn ($\mu\text{g/mL}$)	Analitički prinos (%)
0,074 + 0,1	0,174	0,173	0,099	99,61
0,074 + 0,2	0,274	0,273	0,199	99,76
0,074 + 0,3	0,374	0,368	0,295	98,48

Dobivene vrijednosti za točnost su bile u rasponu od 98,48 i 99,76 % što ukazuje na zadovoljavajuću točnost ispitivane metode za određivanje cinka.

4.2.4 Granica dokazivanja i određivanja (LOD i LOQ)

Granica dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ) izražene se u mg/L, a izračunate su korištenjem jednadžbe pravca $y = 0,1585x + 0,0006$ prema formulama:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a} \quad LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

gdje σ označava standardno odstupanje rezultata te iznosi 0,0006, dok a označava nagib kalibracijskog pravca te iznosi 0,1585.

LOD stoga iznosi 0,0144 mg/L, a LOQ iznosi 0,0436 mg/L.

4.3 Određivanje koncentracije cinka u uzorcima meda u optimiziranim uvjetima

Svrha optimizacije uvjeta pripreme uzoraka meda primjenom Box-Behnken dizajna jest dobivanje maksimalnog sadržaja cinka u ispitivanim uzorcima. Numeričkom optimizacijom uvjeta u programu Design Expert dobiveno je više mogućih rješenja, pri čemu su kao najprikladnija rješenja odabrana ona kod kojih je poželjnost (eng. *desirability*) iznosila 1 pa je utvrđeno da su optimalni uvjeti za pripremu uzoraka smjesa otapala 2400 μL 70% HClO_4 i 3600 μL koncentrirane HNO_3 , soniciranje 15 minuta na sobnoj temperaturi (20 °C).

Prethodno validiranom metodom AAS određena je koncentracija cinka u uzorcima meda. Svaki uzorak mjeren je u triplicatu, a dobivene vrijednosti prikazane kao srednje vrijednosti tri uzastopna mjerenja nalaze se u Tablici 11.

Tablica 11. Koncentracija cinka u uzorcima meda

Broj uzorka	Koncentracija Zn (mg/L)
1	8,770
2	12,841
3	3,699
4	2,537
5	3,517
6	5,492
7	9,044
8	8,667
9	5,065
10	2,433
11	3,631
12	3,280
13	4,367
14	2,940
15	3,723
16	4,782
17	3,986
18	3,169
19	6,235
20	5,945
21	9,090

Koncentracije cinka izmjerene u uzorcima kreću se između 2,433 i 12, 841 mg/L.

4.4 Koncentracija cinka u medu ovisno o načinu proizvodnje

Botaničko i geografsko podrijetlo, kao i način proizvodnje meda utječu na sastav minerala prisutnih u medu (Leme i sur., 2014).

Koncentracija cinka u uzorcima cvjetnog meda proizvedenog u obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima kretala se između 2,433 i 12,841 mg/L s prosječnom vrijednosti od 4,98 mg/L, dok se u uzorcima meda proizvedenog u industrijskog proizvodnji kretala između 3,169 i 9,09 mg/L s prosječnom vrijednošću od 6,36 mg/L. Iako se dobivene vrijednosti prilično razlikuju između pojedinih proizvođača, odnosno uzoraka, iz dobivenih mjerenja vidljivo je da je viša prosječna koncentracija cinka izmjerena u cvjetnom medu proizvedenom u industrijskoj proizvodnji.

5. ZAKLJUČAK

Pomoću statističkih metoda dizajniranja eksperimenata u mogućnosti smo istovremeno pratiti promijene više faktora i naknadnom analizom dobiti podatke o utjecaju pojedinih faktora na sami proces. Ujedno, moguće je i izraditi odgovarajući model, te koristeći njega optimirati uvjete eksperimenta i na taj način smanjiti broj potrebnih eksperimenata (samim time i troškove). Korištenjem Box – Behnkenovog dizajna utvrđeni su optimalni uvjeti pripreme uzoraka meda za određivanje koncentracije metala metodom AAS – smjesa otapala 2400 μL 70% HClO_4 i 3600 μL koncentrirane HNO_3 , soniciranje 15 minuta na sobnoj temperaturi (20 $^\circ\text{C}$).

Ispitivanjem parametara validacije kao što su linearnosti, preciznosti, točnost te LOD i LOQ vrijednosti potvrđeno je da je metoda AAS prikladna za određivanje koncentracije cinka u uzorcima meda.

6. LITERATURA

1. Amidžić Klarić D. Primjena Atomske spektrometrije u kontroli kvalitete lijekova i dodataka prehrani. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2020.
2. Ball DW. Chemical Composition of Honey. *J. Chem. Educ*, 2007, 1643 - 1646.
3. Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodriguez P, Manna PP, Zhang J, Bravo Lamas L, Martínez Flórez S, Agudo Toyos P, Quiles JL, Giampieri F, Battino M. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*, 2018, 2322.
4. Escuredo O, Míguez M, Fernández-González M, Carmen Seijo M. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chem*, 2013, 851 – 856.
5. Harris CD. Quantitative Chemical Analysis, 8th Edition. New York, W.H. Freeman and Company, 2010, str. 479 - 498.
6. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, 2021., www.enciklopedija.hr, pristupljeno 17.2.2021.
7. Karakowska A, Muszyńska B, Reczyński W, Opoka W, Turski W. Trace metal analyses in honey samples from selected countries. A potential use in bio-monitoring. *Intern J. of Environ. Anal. Chem*, 2015, 855 - 866.
8. Kogan S, Sood A, Granick MS. Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. *Wounds*, 2017, 102 – 106.
9. Leme ABP, Bianchi SR, Carneiro RL, Nogueira ARA. Optimization of Sample Preparation in the Determination of Minerals and Trace Elements in Honey by ICP-MS. *Food Anal. Methods*, 2014, 1009 - 1015.
10. Mandal MD, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacteril activity. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2011, 154 – 160.
11. Maywald M, Wessels I, Rink L. Zinc Signals and Immunity. *Int J Mol Sci*, 2017, 2222.
12. Mocchegiani E, Romeo J, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Diaz L-E, Marcos A. Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. *Age*, 2013, 839 – 860.
13. Mossink JP. Zinc as nutritional intervention and prevention measure for COVID-19 disease. *BMJ Nutr Prev Health*, 2020, 1136.

14. National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements, 2020., www.ods.od.nih.gov, pristupljeno 23.1.2020.
15. Nigović B, Jurišić-Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 135 - 138.
16. Nolan VC, Harrison J, Cox JAG. Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. *Antibiotics*, 2019, 251.
17. Osredkar J, Sustar N. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clin Toxicol*, 2011, 3.
18. Pohl P, Sergiel I, Jamroz P. Different Aspects of the Elemental Analysis of Honey by Flame Atomic Absorption and Emission Spectrometry: A Review. *Food Anal Method*, 2012, 737 – 751.
19. Pravilnik o medu, 2015, Zagreb, Narodne novine, broj 53 (NN/53/15).
20. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci*, 2013, 144 – 157.
21. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentals of analytical chemistry, 9th Edition. Belmont, Brooks/Cole, 2014, str. 773 - 799.
22. Suzuki M, Suzuki T, Watanabe M, Hataheyama S, Kimura S, Nakazono A, Honma A, Nakamaru Y, Vreugde S, Homma A. Role of intracellular zinc in molecular and cellular function in allergic inflammatory diseases. *Allergol Int*, 2020, 190 – 200.
23. Tomasik P. Chemical and Functional Properties of Food Saccharides. CRC Press, 2003, str. 83 - 88.
24. Wang J, Um P, Dickerman BA, Liu J. Zinc, Magnesium, Selenium and Depression: A Review of the Evidence, Potential Mechanisms and Implications. *Nutrients*, 2018, 584.
25. Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 119 - 121.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Med se zbog svoje vrlo visoke energetske vrijednosti oduvijek koristio kao hrana, a zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava koristio se za liječenje bolesti. Dobar je izvor raznih minerala, uključujući i cink. Cink je mikroelement koji ima ključnu ulogu u mnogim biokemijskim i fiziološkim funkcijama organizma na molekularnoj i staničnoj razini te je odgovoran za pravilno funkcioniranje čitavog organizma.

Metoda atomske apsorpcijske spektrofotometrije koristi se za kvalitativno i kvantitativno određivanje više od 70 elemenata među kojima je i cink. Ova metoda može detektirati vrlo niske koncentracije metala, a također je vrlo brza i cjenovno prihvatljiva metoda.

Korištenjem Box – Behnkenovog dizajna utvrđeni su optimalni uvjeti pripreme uzoraka meda za određivanje koncentracije metala metodom AAS – smjesa otapala 2400 μL 70% HClO_4 i 3600 μL koncentrirane HNO_3 , soniciranje 15 minuta na sobnoj temperaturi (20 $^{\circ}\text{C}$). Prihvatljivost optimirane metode za određivanje cinka u ispitivanim uzorcima meda potvrđena je ispitivanjem parametara validacije kao što su linearnost, preciznost, točnost, LOD i LOQ.

Koncentracije cinka izmjerene u uzorcima kreću se u intervalu između 2,433 i 12,841 mg/L, a prosječna izmjerena koncentracija cinka iznosi 5,391 mg/L.

Provedena mjerenja pokazuju veću koncentraciju cinka u uzorcima meda iz industrijske proizvodnje.

Honey has always been used as a food due to its very high energy values, and due to its antioxidant and anti-inflammatory properties it is used to treat diseases. It is a good source of various minerals, including zinc. Zinc is a microelement that plays a key role in many biochemical and physiological functions of the organism at the molecular and cellular level and is responsible for the proper functioning of the whole organism.

The method of atomic absorption spectrophotometry is used for the qualitative and quantitative determination of more than 70 elements, including zinc. This method can detect very low metal concentrations and is also a very fast and cost effective method.

Using Box - Behnken design, optimal conditions for preparation of honey samples for determination of metal concentration by AAS method - solvent mixture containing 2400 μL 70% HClO_4 and 3600 μL concentrated HNO_3 , sonication for 15 minutes at room temperature (20°C) were determined. The acceptability of the optimized method for the determination of zinc in the tested honey samples was confirmed by examining validation parameters such as linearity, precision, accuracy, LOD and LOQ.

The zinc concentrations measured in the samples range between 2,433 and 12,841 mg / L, and the average measured zinc concentration is 5.391 mg / L.

The measurements show a higher concentration of zinc in samples of honey from industrial production

**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

OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE CINKA U UZORCIMA MEDA POMOĆU ATOMSKE APSORPCIJSKE SPEKTROFOTOMETRIJE

Bernarda Šimunić

SAŽETAK

Med se zbog svoje vrlo visoke energetske vrijednosti oduvijek koristio kao hrana, a zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava koristio se za liječenje bolesti. Dobar je izvor raznih minerala, uključujući i cink. Cink je mikroelement koji ima ključnu ulogu u mnogim biokemijskim i fiziološkim funkcijama organizma na molekularnoj i staničnoj razini te je odgovoran za pravilno funkcioniranje čitavog organizma.

Metoda atomske apsorpcijske spektrofotometrije koristi se za kvalitativno i kvantitativno određivanje više od 70 elemenata među kojima je i cink. Ova metoda može detektirati vrlo niske koncentracije metala, a također je vrlo brza i cjenovno prihvatljiva metoda.

Korištenjem Box – Behnkenovog dizajna utvrđeni su optimalni uvjeti pripreme uzoraka meda za određivanje koncentracije metala metodom AAS – smjesa otapala 2400 μL 70% HClO_4 i 3600 μL koncentrirane HNO_3 , soniciranje 15 minuta na sobnoj temperaturi (20 °C). Prihvatljivost optimirane metode za određivanje cinka u ispitivanim uzorcima meda potvrđena je ispitivanjem parametara validacije kao što su linearnost, preciznost, točnost, LOD i LOQ.

Koncentracije cinka izmjerene u uzorcima kreću se u intervalu između 2,433 i 12,841 mg/L, a prosječna izmjerena koncentracija cinka iznosi 5,391 mg/L.

Provedena mjerenja pokazuju veću koncentraciju cinka u uzorcima meda iz industrijske proizvodnje.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 8 grafičkih prikaza, 11 tablica i 25 literaturnih navoda.
Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: cink, med, atomska apsorpcijska spektrofotometrija, Box-Behnken, 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
Prof. dr. sc. Živka Juričić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu*
Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta
Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, *docentica Sveučilišta u Zagrebu*
Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: svibanj 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF ZINC IN HONEY SAMPLES USING ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

Bernarda Šimunić

SUMMARY

Honey has always been used as a food due to its very high energy values, and it is used to treat diseases because of its antioxidant and anti-inflammatory properties. It is a good source of several minerals, including zinc. Zinc is a microelement that plays a key role in many biochemical and physiological functions of the organism at the molecular and cellular levels, and is responsible for the proper functioning of the entire organism.

The method of atomic absorption spectrophotometry is used for qualitative and quantitative determination of more than 70 elements, including zinc. This method can detect very low concentrations of metals and is also a very fast and inexpensive method.

Using the Box - Behnken design, the optimum conditions for the preparation of honey samples for the determination of metal concentration were determined by the AAS method - solvent mixture containing 2400 μL of 70% HClO_4 and 3600 μL of concentrated HNO_3 , sonication for 15 minutes at room temperature (20 ° C). The acceptability of the optimized method for the determination of zinc in the studied honey samples was confirmed by studying the validation parameters such as linearity, precision, accuracy, LOD and LOQ.

The zinc concentrations measured in the samples range from 2.433 to 12.841 mg / L, and the average zinc concentration measured is 5.391 mg / L.

The measurements show a higher concentration of zinc in samples of honey from industrial production.

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

Thesis includes: 39 pages, 8 figures, 11 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: zinc, honey, atomic absorption spectrophotometry, Box-Behnken, analytical method 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*

Živka Juričić, Ph.D. Full professor, *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: May 2021.