Usporedba rezultata sadržaja cinka u urinu s dvije analitičke metode

Kozlović, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:996208

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Marko Kozlović

Usporedba rezultata sadržaja cinka u urinu s dvije analitičke metode

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2018.

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

„Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Jasni Jablan te svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na pruženoj pomoći u izradi ovog rada, a osobito na ukazanom povjerenju i novim znanjima.

Također zahvaljujem roditeljima, sestri i mojoj jubavi na neiscrpnom izvoru podrške i ljubavi na ovom dugom putu. Hvala svima koji su mi svojim prijateljstvom i životnim iskustvom pomogli postati osoba koja sam danas.”

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Elementi u tragovima 1
1.2. Urin 2
1.3. Cink 3
1.4. Metode određivanja metala u biološkim uzorcima 4
1.5. Spektroskopija i spektrometrijske metode 6
1.5.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija 9
1.5.2. Lampa sa šupljom katodom - linijski izvor zračenja 13
1.5.3. Atomizatori u atomskoj spektroskopiji 14
1.5.4. Spektrometar 14
1.6. Rendgenska fluorescenscijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF) 15
1.6.1. Priprema uzorka za TXRF 16
1.7. Validacija analitičke metode 18
2. OBRAZLOŽENJE TEME 19
3. MATERIJALI I METODE 20
3.1. Materijali 20
3.1.1. Korištene kemikalije 20
3.1.2. Aparatura 20
3.1.3. Laboratorijski pribor 21
3.1.4. Uzorci 21
3.2. Metode 22
3.2.1. Princip metoda 22
3.2.2. Priprema otopina 22
3.2.3. Postupak određivanja koncentracije cinka 23
3.2.4. Statistička obrada podataka 24
4. REZULTATI I RASPRAVA 25
4.1. Procjena preciznosti, točnosti i linearnosti 25
4.1.1. Linearnost 25
4.1.2. Preciznost 26
4.1.3. Osjetljivost 29
4.2. Validacija TXRF metode 30
4.2.1. Ponovljivost 31
4.2.2. Usporedivost 31
4.2.3. Dijagram raspršenja 33
4.2.4. Grafički prikaz razlike između dobivenih mjerenja 33
5. ZAKLJUČCI 36
6. LITERATURA 37
7. SAŽETAK/SUMMARY 40
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

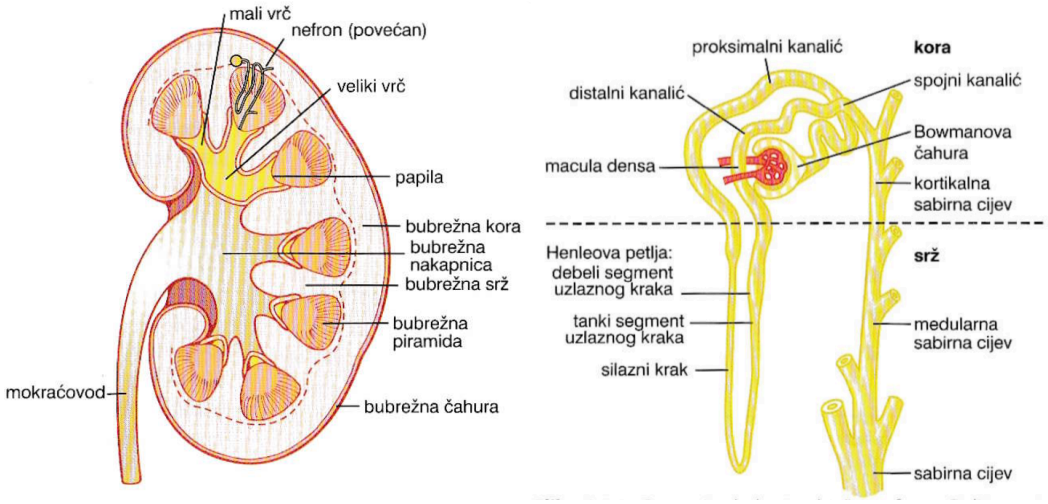
1.1. Elementi u tragovima

Elementi u tragovima sudjeluju u biokemijskim i fiziološkim procesima u ljudskom organizmu (Prashant i sur., 2015; Soetan i sur., 2009). Ovi elementi čine sastavne dijelove enzima i kao kofaktori štite stanice od oksidacijskog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima. Biološka uloga ovih elemenata kod različitih fizioloških i patoloških stanja intenzivno se istražuje zadnjih godina. Veliki broj studija se bavi istraživanjem međusobne povezanosti elemenata u tragovima s različitim oblicima karcinoma (Taylor, 1996). Tako je otkriveno da selen utječe na proliferaciju i normalnih i neoplastičnih stanica i ima inhibitorski efekt na kemijsku i virusnu karcinogenezu (Stosnach, 2010). Cink je sastavni dio DNA i RNA polimeraze i služi kao faktor u aktivaciji hormona timusne žlijezde i za odgovor T stanica. Ima modulatornu kao i zaštitnu ulogu i za normalne kao i za kancerogene stanice i ima važnu ulogu u obrani organizma od raka (Prashant i sur., 2015; Jablan i sur., 2018). Nadalje, bakar u nekim slučajevima zbog interakcije sa slobodnim radikalima kisika može povećati oštećenje stanica (Prashant i sur., 2015).

Razumijevanje važnosti elemenata u tragovima za normalno funkcioniranje ljudskog organizma dovelo je do povećane potrebe za brzom i točnom analitičkom metodom za rutinske analize velikog broja bioloških uzoraka. Dobiveni analitički rezultati, od iznimne su važnosti i koristi u području medicine, farmacije, istraživanja okoliša i dr.

1.2. Urin

Tekućina kojom se iz organizma izlučuju otpadni produkti metabolizma i strane štetne tvari naziva se urin. Nastaje filtracijom u glomerulima bubrega (Slika 1). Sastav urina ovisi o raznim čimbenicima, kao što su dob, prehrana, uzimanje tekućine, fizička aktivnost, te vanjski fizikalni čimbenici. Analizom urina mogu se otkriti i razni metabolički poremećaji i patološke promjene u radu jetre i mokraćnog sustava, smetnje cirkulacije i srčanog rada i drugi. Anorganske tvari koje nalazimo u urinu su: bikarbonati, kloridi, fosfor, sumpor, brom, fluor, jodidi, kalij, kalcij, magnezij, željezo, bakar, cink, kobalt, selen, arsen, olovo i živa (Guyton i Hall, 2012). Urin je jednostavniji uzorak za analizu zbog neinvazivnog načina prikupljanja za razliku od krvi ili seruma.



Slika 1. Opće ustrojstvo bubrega (lijevo) i osnovni tubularni odsječci nefrona (desno) (Guyton i Hall, 2012)

1.3. Cink

Cink je element u tragovima koji se nalazi u svim stanicama ljudskog organizma. Sudjeluje u sintezi i razgradnji ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina te je potreban za normalnu funkciju imunološkog sustava, diobu stanica i njihov rast.

Sastavni je dio više od 300 enzima među kojima je najvažnija karboanhidraza, koja je odgovorna za povezivanje ugljikovog dioksida i vode u crvenim krvnim stanicama te se nalazi u probavnom sustavu i bubrežnim kanalićima. Također je i sastavni dio nekih peptidaza koje imaju važnu ulogu u probavi proteina.

Potrebe za cinkom najviše su kod dojenčadi (120–140 μg/kg tjelesne mase po danu) te se smanjuju s godinama do odrasle dobi (30–40 μg/kg tjelesne mase po danu) (Jablan i sur., 2018). Uslijed nedovoljnog unosa javljaju se simptomi kao što su: smanjeni rast, smanjeno seksualno i koštano sazrijevanje, kožne lezije, proljev, alopecija, smanjeni apetit, smanjeni odgovor imunološkog sustava te promjene u ponašanju. Deficijencija je također povezana s nastankom autoimunih bolesti, starenjem i nastankom tumora.

S druge strane prevelike količine su toksične tako da je gornja granica preporučenog dnevnog unosa za odraslu osobu 45 mg/dan. Iz navedenih razloga te novih spoznaja o fiziološkom značaju potrebno je precizno pratiti njegovu količinu. U tu svrhu ga se kvantificira iz bioloških uzoraka kao što su krv, serum, urin, kosa te majčino mlijeko. U organizmu ga ima 2-4 g te je njegova koncentracija u serumu 0,8-1 μg/mL, a u eritrocitima 10-14 μg/mL (Dutra i sur., 2006).

Nedostatak cinka se događa zbog toga jer se ne apsorbira iz prehrane ili zbog gubitka nakon apsorpcije. Manjak iz prehrane ne mora nužno biti zbog premale količine unesenog cinka već može biti zbog vezanja cinka s vlaknima kakav se ne apsorbira. Ukoliko apsorpcija nije problem gubitak se može dogoditi uslijed rana, kolitisa i ciroze jetre. Glavni put eliminacije cinka iz organizma je putem fecesa dok je eliminacija putem urina sekundarna. Usporedbom izmjerenih vrijednosti cinka u urinu i serumu mogu nam pomoći u preciznijem dijagnosticiranju prolaznih stanja i bolesti.

1.4. Metode određivanja metala u biološkim uzorcima

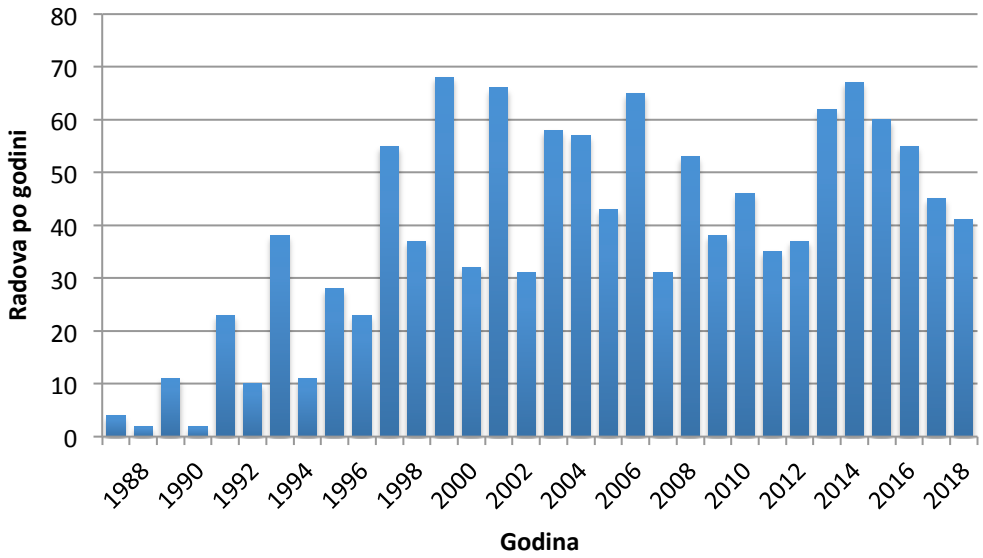
U upotrebi su mnoge tehnike određivanja metala u biološkim uzorcima, među kojima su: atomska apsorpcijska spektrometrija (eng. *Atomic absorption spectroscopy*, AAS), atomska emisijska spektrometrija (eng. *Atomic emision spectroscopy,* AES), rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (eng. *Total reflection X-ray fluorescence*, TXRF), induktivno spregnuta plazma povezana s atomskim apsorpcijskim spektrometrom (eng. *Inductively coupled plasma atomic absorption spectoscopy*, ICP-AAS) te induktivno spregnuta plazma povezana s masenim spektrometrom (eng. *Inductively coupled plasma mass spectrometry,* ICP-MS). Navedenim metodama je moguće vrlo precizno i točno odrediti koncentracije različitih metala. Usporedbom rezultata istih uzoraka s dvije analitičke metode možemo dobiti uvid koje su prednosti odnosno nedostatci jedne ili druge metode (Marco i sur., 1999; Greaves i sur., 2006).

Kod određivanja metala u biološkim uzorcima od velikog je značaja da se mjerenje obavlja direktno iz uzorka jer predobrada uzorka iziskuje više vremena i potencijalan je uzrok pogreškama koje se mogu odraziti na samo mjerenje. U Tablici 1 možemo vidjeti glavna svojstva korištenih metoda gdje su ključne prednosti TXRF-a mala količina uzorka, nedestruktivna metoda, multielementna analiza, jednostavna kvantifikacija zbog unutarnjeg standarda te prikladna za različite vrste uzoraka (ne samo otopine već suspenzije i tanki filmovi). Također je brza, jeftina, ima nisku granicu detekcije te je utjecaj matriksa primjenom ove metode manji u odnosu na AAS tehniku (Marco P i Hernandez-Caraballo, 2004).

Tablica 1. Usporedbe karakteristika TXRF-a, AAS-a i ICP-a (Borgese i sur., 2013)

Svojstvo	TXRF	AAS	ICP
Korištena tehnika	Nije destruktivna	Destruktivna	Destruktivna
Kalibracija	Jedan unutarnji standard za sve elemente	Vanjski standard za svaki element	Vanjski standard za svaki element
Priprema uzorka	Otopina, suspenzija, tanki film	Potpuno otopljen	Potpuno otopljen
Multielementna analiza	Da	Samo sekvencijalno	Da
Vrijeme mjerenja	300 - 1000 s	< 10 s za svaki element	< 10 s za svaki element
Proces razgradnje	Nije potreban	Da	Da

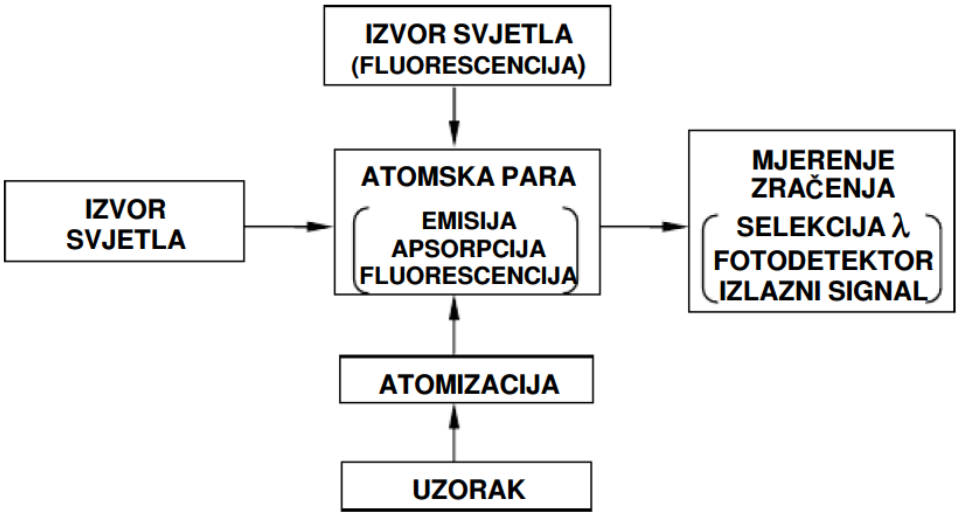
TXRF kao metoda, iako po svojim karakteristikama bolja od AAS-a, nema još široku primjenu i zastupljenost po kliničkim laboratorijima. Na Slici 2 prikazan je broj znanstvenih radova objavljen po godini u kojima se koristio TXRF. Taj broj je u porastu te možemo očekivati da će se razvojem tehnologije i smanjenjem cijene uređaja sve šire primjenjivati.



Slika 2. Graf koji prikazuje broj objavljenih radova po godinama uz korištenje „TXRF" kao ključne riječi (Web of Science, 2018)

1.5. Spektroskopija i spektrometrijske metode

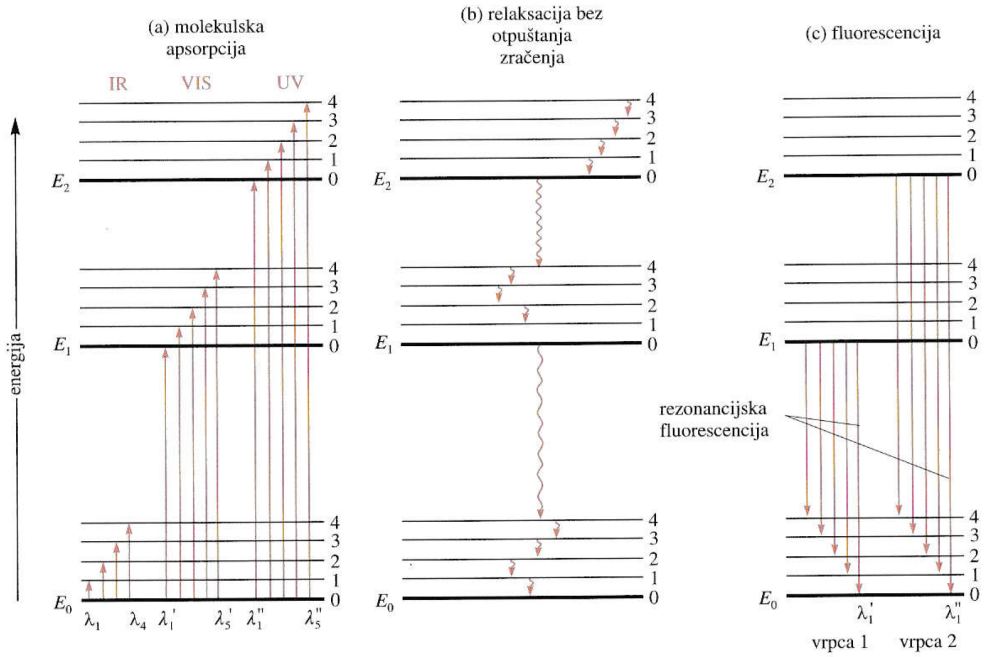
Građevne jedinice svih tvari su atomi i molekule, koje su zbog svoje veličine mikroskopski nevidljive i zbog toga ih se ne može na taj način ispitivati. No energetski nivoi tih molekula su diskretni i kvantizirani, te svaki prijelaz u viši ili niži energetski nivo uvjetuje apsorpciju ili emisiju potpuno određenog iznosa energije, obično u obliku fotona. Mjerenjem energije apsorbiranog ili emitiranog zračenja može se analizirati molekulski sastav uzorka. Određivanjem intenziteta takvog zračenja možemo odrediti količinu prisutne određene vrste. Atomska spektroskopija ograničena je na frekvencije ultraljubičastog, vidljivog i X-zračenja, jer su samo te frekvencije energijski prikladne za pobuđivanje elektronskih prijelaza. No molekule uz elektronske razine imaju i vibracijska, kao i rotacijska energijska stanja. Posljedica toga je da se molekulska spektroskopija temelji na zračenju ultraljubičastog, vidljivog, infracrvenog, mikrovalnog i radiofrekvencijskog područja (Skoog i sur., 1999) Spektroskopija proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i materije (Slika 3).



Slika 3. Dijagram instrumentalnih funkcija u analitičkoj atomskoj spektroskopiji

Spektrometrijske metode spadaju među najvažnije metode elementarne kemijske analize. To je područje koje se posljednjih nekoliko desetaka godina vrlo brzo razvija.

Temelje se na tri procesa: atomskoj apsorpciji, atomskoj emisiji i atomskoj fluorescenciji (Slika 4). Temelj atomske apsorpcijske spektrometrije je pobuda elektrona u vanjskoj ljusci metalnog atoma tj. prijelaz slobodnog atoma u više energetsko stanje, npr. apsorpcijom toplinske energije ili energije zračenja. U atomskoj emisiji analit emitira zračenje kao posljedicu pobuđivanja u plamenu, luku, iskri ili plazmi. U atomskoj fluorescenciji analit emitira zračenje kao posljedicu pobuđivanja pomoću snopa elektromagnetskog zračenja valne duljine koju apsorbira.



Slika 4. Dijagram energijskih razina koji prikazuje energijske promjene neke molekulske vrste pri apsorpciji, relaksaciji bez otpuštanja zračenja i fluorescenciji (Skoog i sur., 1999)

Fluorescencijske metode zahtijevaju vanjski izvor, koji je najčešće smješten pod pravim kutom u odnosu prema putu zračenja prema detektoru. Atomska emisija ne zahtjeva vanjski izvor zračenja. U atomskoj emisijskoj spektroskopiji analitički signal proizvode pobuđeni atomi ili ioni, a u atomskoj je apsorpciji signal rezultat apsorpcije nepobuđenih vrsta. Tipično broj nepobuđenih vrsta nadilazi broj pobuđenih za nekoliko redova veličine. Omjer nepobuđenih i pobuđenih atoma u vrućoj sredini eksponencijalno se mijenja s temperaturom. Stoga mala promjena u temperaturi uzrokuje relativno velike promjene broja pobuđenih atoma. Relativan broj nepobuđenih atoma vrlo se malo mijenja, jer su oni prisutni

u ogromnom suvišku. Stoga je emisijska spektroskopija osjetljivija na promjene temperature od apsorpcijske spektroskopije.

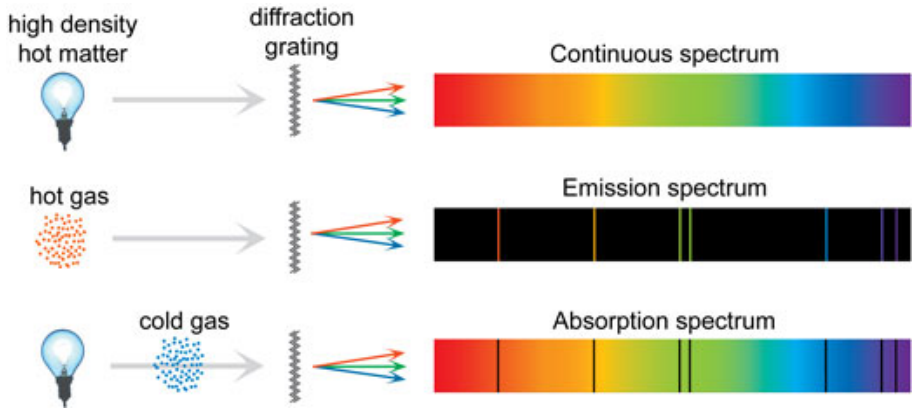
Tablica 2. Klasifikacija atomskih spektralnih metoda (Skoog i sur., 1999)

Metoda atomizacije	Tipična temperatura atomizacije; °C	Temelj metode	Uobičajeni naziv i kratica metode
Plamena	1700 - 3150	Apsorpcija Emisija Fluorescencija	Atomska apsorpcijska spektroskopija, AAS Atomska emisijska spektroskopija, AES Atomska fluorescencijska spektroskopija, AFS
Elektroplinska	1200 - 3000	Apsorpcija Fluorescencija	Elektroplinska atomska apsorpcijska spektroskopija Elektroplinska atomska fluorescencijska spektroskopija
Induktivno spregnuta argonska plazma	6000 - 8000	Emisija Fluorescencija	Induktivno spregnuta plazma spektroskopija, ICP Induktivno spregnuta plazma fluorescencijska spektroskopija
Istosmjerna argonska plazma	6000 - 10000	Emisija	Istosmjerna plazma spektroskopija, DCP
Električni luk	4000 - 5000	Emisija	Emisijska spektroskopija uz lučni izvor
Električna iskra	40000 (?)	Emisija	Emisijska spektroskopija uz iskru kao izvor

Vrlo veliku primjenu imaju u biološkoj analizi, ali i drugim granama, gdje je potrebno bilo kvalitativno (odrediti prisustvo) ili kvantitativno (količinu/koncentraciju) odrediti količinu metala u uzorku. Koristi se u bioanalitici za određivanje koncentracija metala u biološkim tekućinama (serum, urin,), analitici lijekova (u proizvodnji olova i platine kao katalizatora), ali i gotovim farmaceutskim proizvodima (potencijalne kontaminacije metala), u parenteralnim otopinama, identifikaciji krivotvorenih lijekova, te analizi elementnog sastava ambalaže, dodataka prehrani, hrane i pića, ekologiji (praćenja onečišćenja okoliša i utvrđivanja prisutnosti različitih elemenata u rijekama, jezerima, potocima, morskoj vodi, pitkoj vodi i zraku). U građevinskoj industriji se upotrebljava pri provjeri prisutnosti glavnih elemenata te toksičnih onečišćenja (npr. beton, u kojem je kalcij glavni sastojak, a olovo toksično onečišćenje) (Skoog i sur., 1999).

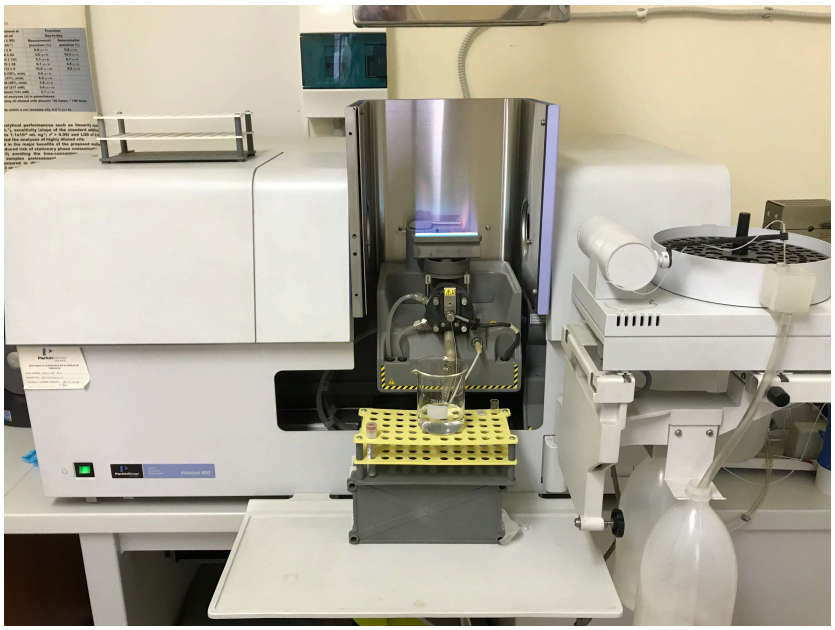
1.5.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) je instrumentalna spektrometrijska analitička tehnika, koja mjerenjem intenziteta apsorbiranog zračenja pri određenoj valnoj duljini definira koncentraciju određenog analita u ispitivanom uzorku. Osniva se na apsorpciji vidljivog ili ultraljubičastoga zračenja valnih duljina od 190 do 860 nm koje prolazi kroz sloj slobodnih atoma u nepobuđenom, osnovnom stanju. Slobodni atomi tvore tzv. atomsku paru, koja nastaje atomizacijom u plamenu ili elektrotermičkom atomizacijom pri temperaturi od 1000 do 3000 °C. Kada elektromagnetsko zračenje, karakteristično za prijelaze elektrona u vanjskim atomskim orbitalama nekog elementa, prolazi kroz atomsku paru, dio će se zračenja određenih frekvencija apsorbirati, a to će dati prepoznatljiv spektar tog elementa (Slika 5). Širina apsorpcijskih linija je određena energetskim razinama elektrona u atomu i iznosi između 0,002 nm i 0,005 nm (Kotra i sur., 2012).

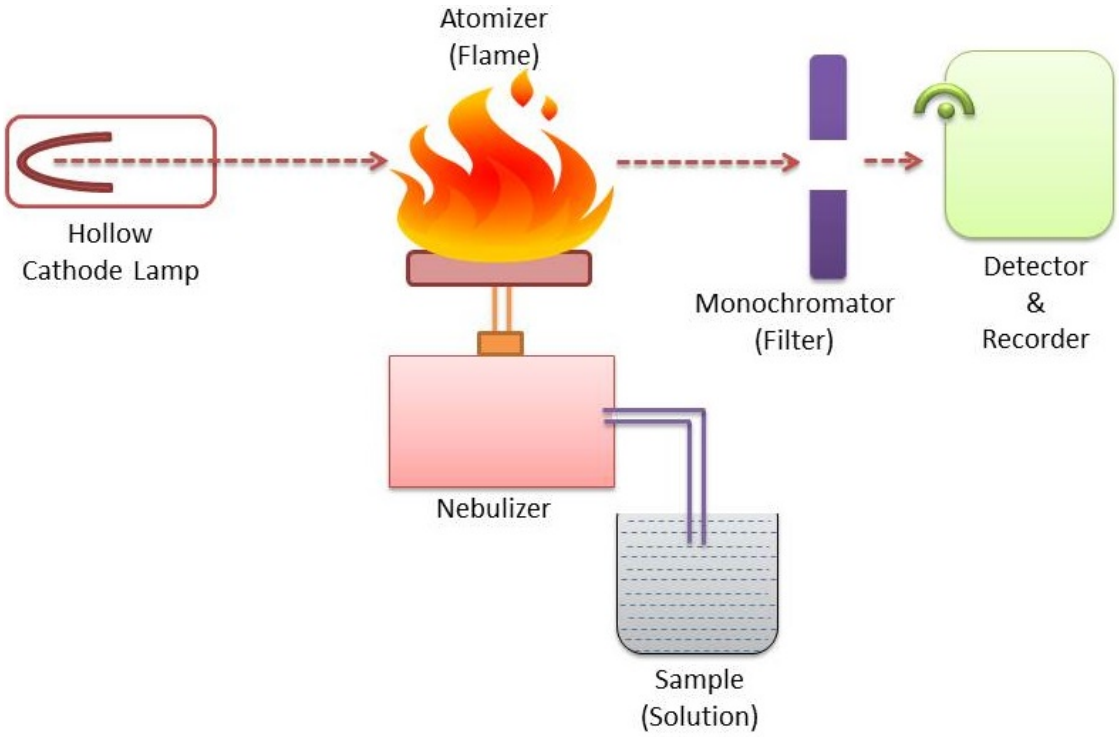


Slika 5. Primjer atomskog apsorpcijskog i emisijskog spektra

A



B



Slika 6. Atomski spektrometar **A** Uređaj u laboratoriju, **B** Dijelovi AAS-a: izvor zračenja (eng. *Hollow Cathode Lamp*), generator atomske pare (eng. *Nebuliser*), atomizator (eng. *Atomizer*), monokromator i detektor (preuzeto i prilagođeno sa http://namrataheda.blogspot.com)

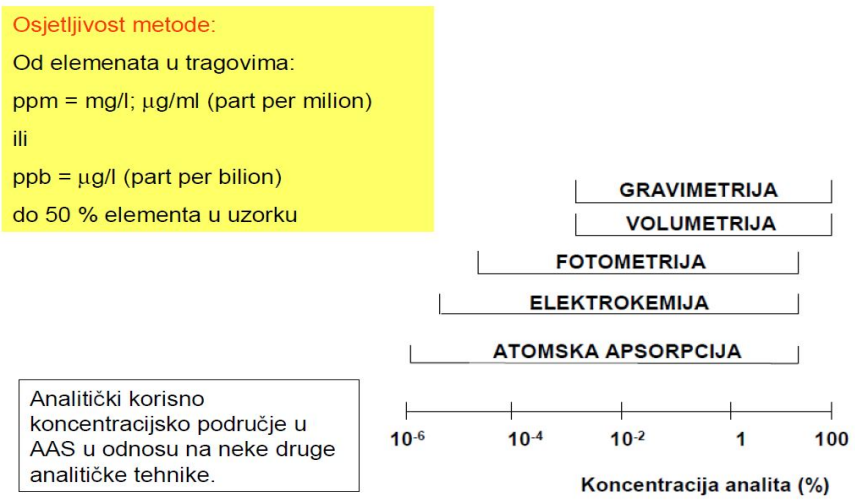
Prema shemi koja je prikazana na Slici 6, vidljivo je da je instrumentacijski sustav za AAS građen od:

- emisijskog sustava koji emitira spektar karakterističan za element koji se određuje (lampa sa šupljom katodom ili bezelektrodna lampa uz izbijanje) ali može biti i izvor kontinuiranog spektra;
- atomizatora tj. sustava koji stvara atomsku paru (plamen u koji se inicira aerosol uzorka, ili elektrotoplinski atomizator, ili sustav nastajanja lako isparljivih hidrida ili hladnih para, npr. Hg);
- sustav spektralne selekcije (filtri, monokromatori: optičke mrežice i prizme);
- fotodetekcijski i mjerni sustav (detektor, fotomultiplikator i dr.).

Osnovni princip je da svjetlo iz lampe prolazi kroz plamen u koji se usisava otopina uzorka te atomi analiziranog elementa apsorbiraju dio energije svjetla. Rezonantna linija se izdvaja pomoću filtera ili monokromatora te registrira fotodetekcijskim sustavom. Spektrometar može biti izgrađen od dvije ili jedne zrake: ovdje je svjetlo koje izlazi iz lampe isprekidano dok plamen zrači konstantno. Isprekidano svjetlo na izlazu iz detektora daje izmjeničnu struju pa se tako anulira svjetlo plamena (Skoog i sur., 1999).

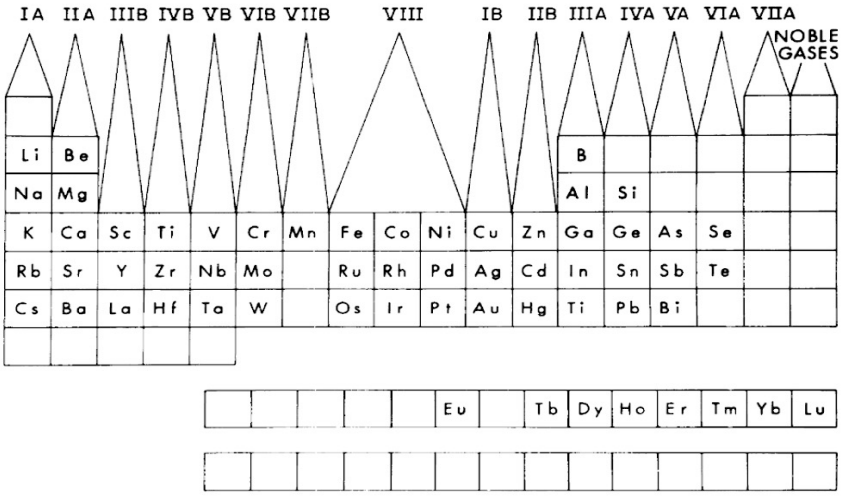
Atomizatori služe da prevedu uzorak u atomsku paru plamenom, električnom strujom ili laserom. Idealni atomizator u potpunosti pretvara uzorak u atomsku paru. Efikasnost stvaranja atomske pare određuje osjetljivost analize.

Vrlo veliko područje primjene duguje svojoj osjetljivosti u odnosu na neke druge, često korištene analitičke tehnike, kao što je vidljivo na Slici 7.



Slika 7. Osjetljivost AAS u usporedbi s analitičkim tehnikama

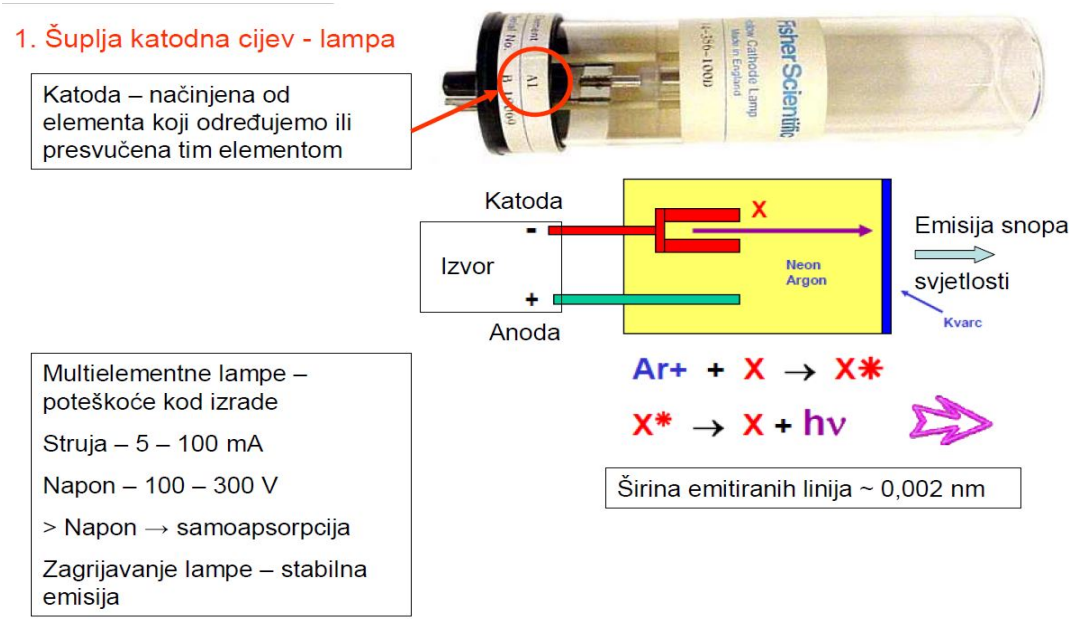
Atomska apsorpcijska spektrometrija je zbog osjetljivosti u području ppm (dijelova na milijun) i ppb (dijelova na milijardu) široko primjenjivana tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 elemenata u tragovima (Slika 8) koji se mogu naći u različitim tvarima kao što su u prašina, hrana, površinske vode te biološkim uzorcima. Metoda je brza, prikladna, selektivna, a instrumenti cijenom prihvatljivi.



Slika 8. Periodni sustav koji pokazuje elemente koji se mogu odrediti uz pomoć atomske apsorpcije (Van Loon, 1980)

1.5.2. Lampa sa šupljom katodom - linijski izvor zračenja

Najčešći izvor zračenja obično je šuplja katodna lampa (Slika 9), koja daje linijski spektar elementa od kojega je načinjena elektroda, odnosno njezina površina. Sastoji se od volframove anode i cilindrične katode, zataljene u staklenu cijev punjenu inertnim plinom, najčešće argonom, pri tlaku od 100-600 kPA. Do ionizacije argona dolazi pri 300 V, pri čemu njegovi elektroni putuju prema anodi, a kationi prema katodi, gdje izbijaju metale s površine u atomski oblak i prelaze u pobuđeno stanje. Pri povratku u osnovno stanje emitiraju zračenje, uske vrpce točno određene valne duljine potrebne za pobuđivanje atoma metala u plamenu, te prelaze natrag na površinu katode ili se istalože na stijenke lampe. Za svaku analizu metala od interesa potrebna je specifična lampa sa šupljom katodom presvučenom metalom koji se analizira. (Skoog i sur., 1999; Watson, 1999). Atomska apsorpcijska spektrometrija najšire je primjenjivana tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 elemenata u tragovima u širokom rasponu tvari (prašina, hrana, površinske vode, biološki uzorci i drugi).



Slika 9. Lampa sa šupljom katodom

1.5.3. Atomizatori u atomskoj spektroskopiji

Kako bi se mogao analizirati atomski sastav uzorka, potrebno ga je atomizirati. To se postiže na dva načina: plameno i elektroplinski (Tablica 2).

Plameni atomizator je najstariji i najčešće korišteni atomizator koji koristi smjestu zraka, acetilena i didušikovog oksida za pretvorbu uzorka u aerosol koji ulazi u komoru za raspršenje gdje najfinije kapljice ulaze u 5 - 10 cm dugačak plamen. Plameni atomizator koristi temperature od 1700 do 3150 °C koja je prikladna za mnoge atomske analize.

Elektroplinski atomizator koristi grafitnu cijev u kojoj se nalazi podložak na koji se nanosi uzorak. Uzorak se potom upari zagrijavanjem cijevi električnom strujom od 1200 do 3000 °C te se može preciznije regulirati jačinom puštene struje. Time postižemo da bilo koji uzorak, bio on krutina, tekućina ili plin može biti direktno analiziran za razliku od plamenog atomizatora. Ova metoda ima dva do tri puta veću osjetljivost od plamene te se stoga smatra jednom od najsnažnijih metoda za određivanja elemenata u tragovima u kompleksnim matriksima (Skoog i sur., 1999).

1.5.4. Spektrometar

Spektrometar je dio AAS-a koji se sastoji od monokromatora za ultraljubičasto i vidljivo područje te detektora. Monokromator koji se nalazi između plamena i detektora uklanja interferencije propuštanjem zračenja određene valne duljine.

Detektor mjeri intenzitet snopa svjetlosti. Prilikom prolaska zračenja kroz plamen metal kojeg mjerimo u uzorku apsorbira dio tog zračenja. Razliku jačine zračenja mjeri detektor koji je povezan s računalom gdje očitavamo dobivene vrijednosti (Skoog i sur., 1999).

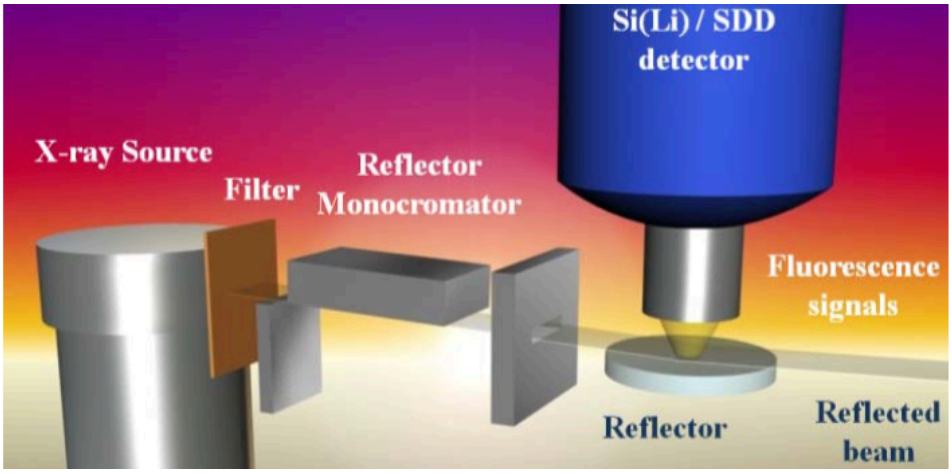
1.6. Rendgenska fluorescenscijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)

Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom razvila se iz rendgenske fluorescencijske spektrometrije koja se zasnivala na svojstvu da uzorak obasjan rendgenskim zračenjem emitira fluorescenciju koja je karakteristična za svaki element. 1923. A. H. Compton je otkrio fenomen totalne refleksije X-zraka koja je pokazala da se reflektivnost X-zraka s ravne matrice izrazito povećava ispod kritičnog kuta od 0,1° (Fernández Ruiz, 2014). Time je postignuto da se količina potrebnog uzorka za analizu drastično smanjila te je sama osjetljivost metode postala viša. Danas se TXRF smatra dobro uspostavljenom i snažnom metodom za određivanje količine elemenata u tragovima iz različitih bioloških tekućina i tkiva (Szoboszlai i sur., 2009; Fernandez-Ruiz, 2014). Preferira se da uzorak bude u tekućem obliku gdje se tekući matriks može lako ispariti korištenjem zamrzavanja, infracrvenog zračenja ili vakuuma ostavljajući tanki film na reflektoru (Khuder i sur., 2007).

XRF spektrometri se dijele u tri grupe: TXRF, energetska disperzijska rendgenska fluorescencijska spektrometrija (EDXRF) i valna disperzijska rendgenska fluorescencijska spektrometrija (WDXRF).

Prema shemi koja je prikazana na Slici 10, vidljivo je da je instrumentacijski sustav za TXRF građen od:

- Izvora X-zraka koji emitira kontinuirani spektar rendgenskog zračenja
- Sustava spektralne selekcije (filtri, monokromatori)
- Reflektora koji usmjerava fluorescenciju u detektor
- Fotodetekcijskog i mjernog sustava (detektor, fotomultiplikator i dr.)



Slika 10. Dijelovi TXRF spektrometra

Princip rada TXRF-a zasniva se na tome da izvor X-zraka generira snop rendgenskog zračenja koji se prolaskom kroz monokromator koji propušta rendgenske zrake samo određene valne duljine. Monokromatsko rendgensko zračenje zatim dolazi do glatke površine nosača uzorka (kvarcno ili akrilno staklo) pod vrlo malim kutom. X-zrake se totalno reflektiraju od površine nosača uzorka pod kutom od 0,3 do 0,6 °. Pri ovakvom procesu dolazi do emitiranja fluorescentne radijacije koju opažamo detektorom (Fernandez-Ruiz, 2014).

1.6.1. Priprema uzorka za TXRF

TXRF je važna metoda za analizu elemenata u tragovima gdje su interferencije matriksa svedene na minimum te omogućava paralelnu analizu više elemenata. No, kvantitativna analiza s TXRF-om zahtjeva adekvatnu pripremu uzorka kako bi se zadovoljili zahtjevi tankog filma uzorka. Takvo stanje je ponekad teško postići posebno u biološkim i organskim uzorcima. Kako bi se prevladali ove poteškoće razvijeni su posebni postupci pripreme uzorka koji se mogu vidjeti u Tablici 3.

Tablica 3. Pregled pripreme uzorka za TXRF

Vrsta uzorka	Volumen	Priprema uzorka
Krv - Puna krv	500 μL	1 : 1 razrijeđenje s vodom, dodatak Ga unutarnjeg standarda
Krv - Serum	< 10 μL	1 : 2 razrijeđenje s vodom, dodatak 1μL Ga standardne otopine
Urin	mL	Direktni dodatak unutarnjeg standarda, uklanjanje klora s HNO_3
Tkivni homogenat	mL	1 :1 razrijeđenje sa standardnom otopinom Y
Majčino mlijeko	mL	Direktni dodatak unutarnjeg standarda

Uzorak u tekućem stanje se prvo miješa s unutarnjim standardom (najčešće Ga ili Y), homogenizira te nanosi na nosač. Zatim se suši pod utjecajem topline ili vakuuma, stavlja u instrument te očitavaju rezultati. Analiza urina predstavila je novi izazov jer su elementi u tragovima pokazatelj zdravlja čovjeka te je potreban limit detekcije u niskom ppb (dijelova na milijardu) rasponu. Visoki udio klora i kalcija mogu biti uzrok smetnji pri TXRF mjerenju te se uzorak stoga tretira s dušičnom kiselinom kako bi se uklonio klor. Zatim se radi drugo mjerenje istog uzorka te se iz usporedbe spektara dobiva precizna i točna analiza urina.

1.7. Validacija analitičke metode

Glavni cilj svakog analitičara je postizanje/dobivanje brzih, točnih i vjerodostojnih podataka/rezultata. Pri tome je jako važno da se ovisno o kompleksnosti ispitivanog uzorka odabere adekvatna metoda i osigura odgovarajući instrument. Biološki uzorci kao što su serum i urin, koji zbog svoje složenosti u tom kontekstu predstavljaju vrlo specifičan i odgovoran izazov za svakog analitičara. Obzirom da se prema dobivenim rezultatima često određuju medicinske terapije i ovisi sam ishod liječenja, nije potrebno naglašavati važnost već spomenutih zahtjeva rezultata analize: brzi, točni i vjerodostojni. Uvođenjem regulatornih zahtjeva GLP-a (eng. *Good Laboratory Practice*) u analitičke laboratorije, potrebno je metode validirati (Luterotti, 2013). Svi protokoli vezani uz razvoj i validaciju metode, kao i dobiveni rezultati moraju biti jako dobro dokumentirani, u obliku pisanih izvještaja, te uvijek dostupni. Nakon provedene validacije metode, po svim parametrima struke koju definiraju ustanove diljem svijeta: US FDA (od eng. *United States Food and Drug Administration*), EDQM (eng. *European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care*), ICH (eng. *International Conference on* Harmonisation *of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) i druge nacionalne (HALMED-hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode), dokazuje se da je ispitni ili mjerni postupak prikladan za točno određenu namjenu, te je kao takav spreman za redovno i sigurno provođenje analiza niza predviđenih uzoraka (Peters i Mauer, 2001).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ljudsko zdravlje ovisi o osjetljivom balansu između nekoliko fizioloških sustava kao što su živčani, mišićni, krvožilni, probavni, endokrini, koji se konstantno obnavljaju. U tom konstantnom ciklusu obnavljanja koji obuhvaćaju mnoge enzimatske sustave uključen je i cink, jedan od elemenata u tragovima (Dutra i sur., 2006).

Cink kao jedan od esencijalnih elemenata u tragovima iznimno je bitan za homeostazu ljudskog organizma. Promjene u koncentraciji cinka u tkivima mogu dovesti do ozbiljnih poremećaja u organizmu te je zbog toga potrebna pouzdana, brza i jednostavna metoda za određivanje njegove koncentracije kod bolesnih i zdravih ljudi. Prije pojave AAS plamenika koji je bio sposoban usisati viskozne otopine kao što je serum bila je potrebna predobrada uzoraka koja je dugo trajala i bila potencijalni uzrok pogrešaka u dobivenim rezultatima (Smith i sur., 1979). Danas se mjerenja vrše direktno iz samog uzorka što sprječava potencijalne pogreške koje mogu nastati pripremom uzorka za analizu. Iako se AAS danas koristi rutinski za određivanje koncentracije mnogih metala u biološkim uzorcima, razvojem tehnologije razvijene su mnoge nove analitičke metode među kojima je i TXRF.

Prije uvođenja nove metode ili sustava u rutinski rad laboratorija potrebno je provesti kratku analitičku validaciju kako bi se potvrdile analitičke značajke metode ili sustava dane od strane proizvođača. Sukladno tome, cilj ovog rada je provesti kratku analitičku validaciju određivanja cinka u urinu primjenom AAS i TXRF tehnike te usporediti TXRF metodu s već postojećom metodom AAS. Pritom su određivani sljedeći validacijski parametri:

a) linearnost

b) preciznost, koja uključuje ponovljivost i međupreciznost

c) točnost

d) usporedivost (usporedba s postojećom metodom AAS)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene kemikalije

Za AAS su korištene slijedeće kemikalije:

- Zn-standard za AAS 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- HNO_3 65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 µScm-1)

Za TXRF su korištene sljedeće kemikalije:

- Y standardna otopina (1 g/L, Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standardni referentni materijal za TXRF: Seronorm urine level 2 (SERO AS, Norveška)

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

3.1.2. Aparatura

Mjerenja AAS-a su provedena na atomskom apsorpcijskom spektrometru Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine prema parametrima:

- Žarulja sa šupljom katodom (15mA)
- Valna duljina (nm): 213,9 nm
- Gorivo / oksidans: acetilen / zrak
- Acetilen (tlak (Pa) /protok (dm3min-1): 0,9x105/2
- Zrak (tlak (Pa) /protok (dm3min-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

TXRF mjerenja su provedena na rendgensko fluorescenscijskom spektrometru s totalnom refleksijom „S2 Picofox" (Bruker Nano GmbH, Berlin, Njemačka) (Jablan i sur., 2017).

- Mo cijev s mikrofokusom s postavkom na 50 kV/750µA
- Višeslojni monokromator s 80% reflektivnosti „XFlash"
- Nesilikonizirani nosač uzorka od kvarcnog stakla
- Detektor s energetskom rezolucijom <150 eV

3.1.3. Laboratorijski pribor

- Odmjerne tikvice: 100,00 mL i 25,00 mL
- Staklene epruvete: 10,00 mL
- Staklene čaše: 50 mL
- Mikropipete: 50-200 µL, 200-1000 µL, 1000-10 000 µL

3.1.4. Uzorci

Uzorci za AAS i TXRF:

Svi uzorci urina su bili prikupljeni u označene sterilne plastične posudice neposredno prije utrke. Uzorci su potom analizirani testnom trakom (rezultati nisu prikazani) te alikvotirani i pohranjeni na -20°C.

3.2. Metode

3.2.1. Princip metoda

Količina cinka kod AAS-a se određivala mjerenjem apsorbancije uzorka raspršenog u smjesi zraka i oksidansa te potom izgorenog u plamenu pri čemu dolazi do atomizacije. Nastali atomi izlažu se zračenju valne duljine 213,9 nm te se prati promjena intenziteta zračenja.

Kod TXRF-a količina cinka određivala se obasjavanjem osušenog uzorka X-zrakama pod niskim kutom pri čemu dolazi do fluorescencije. Jačina fluorescencije koja obasjava detektor proporcionalna je količini cinka u uzorku.

3.2.2. Priprema otopina

- 2 % HNO_3

  2 %-tna otopina HNO_3 dobivena je razrijeđivanjem 10,00 mL 65 %-tne otopine HNO_3 u odmjernoj tikvici nadopunjenoj do 500,00 mL s ultračistom vodom. Dobivena otopina je korištena u ispiranju plamenog atomizatora.
- Standardna otopina cinka za AAS

Matična standardna otopina cinka koncentracije 10,00 µg/mL pripremila se iz komercijalno pripremljene otopine cinka koncentracije 1000,00 µg/mL tako da se 1,00 ml komercijalne otopine razrijedio vodom u odmjernoj tikvici od 100,00 mL. Za izradu kalibracijskog pravca korištene su standardne otopine različitih koncentracija pripremljene razrijeđivanjem matične otopine u odmjernim tikvicama volumena 25,00 mL. Standardne otopine cinka pripremljene su kako je prikazano u Tablici 4:

Tablica 4. 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×
0,4 (ST4)	1000 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	25×
0,6 (ST5)	1500 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	16,67×
0,8 (ST6)	2000 µL matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	12,5×
1 (ST7)	nadopuni ultra čistom vodom do 25,00 mL	10×

3.2.3. Postupak određivanja koncentracije cinka

Za mjerenje količine cinka a AAS-om 0,4 mL urina se u staklenoj epruveti razrijedi s 1,6 mL ultračiste vode i pomiješa. Također se pripremi slijepa proba koja umjesto urina sadrži samo ultračistu vodu. Plameni ionizator se pročisti uporabom 2% HNO_3. Na tako pripremljenim otopinama vršimo višestruka mjerenja jer uređaj ima sposobnost uzastopnog mjerenja i analizu uzorka u kratkom vremenskom intervalu. Količinu cinka pratili smo mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 213.9 nm. Količina cinka u urinu je izračunata pomoću kalibracijske krivulje.

Za mjerenje količine cinka s TXRF metodom se 10 µL standardne otopine Y koncentracije 1 g/L dodalo u svaki uzorak urina od 1,00 mL. Nakon homogenizacije, 10 µL pripremljene otopine je naneseno na središte nosača uzorka koji je zatim osušen na grijaćoj

ploči na 50 °C te stavljen u TXRF spektrometar. Vrijeme mjerenja za uzorke urina bilo ja 1000 s. Količina izmjerenog cinka je izračunata s obzirom na poznatu količinu unutarnjeg standarda.

3.2.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i Prism GraphPad (Graph pad Software, Inc., San Diego, SAD, www.graphpad.com). Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Svi doneseni zaključci u radu provedeni su uz razinu značajnosti $P < 0,05$.

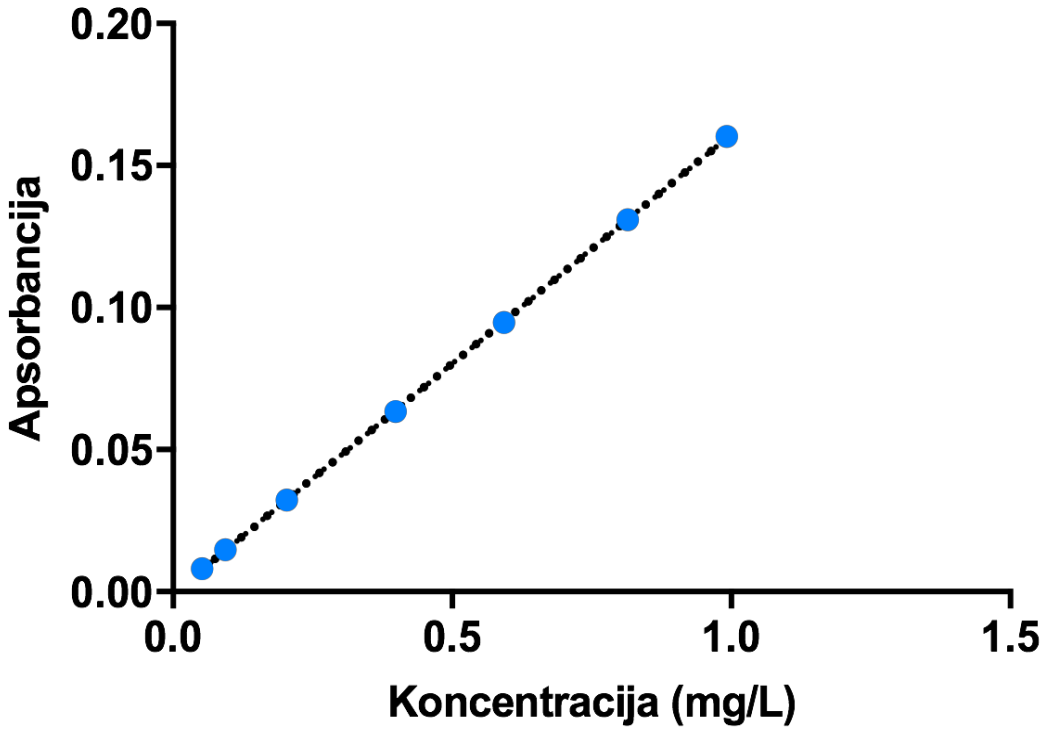
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Procjena preciznosti, točnosti i linearnosti

Rezultati su dobiveni korištenjem postupaka analize određivanja cinka atomskom apsorpcijskom spektrometrijom koji su opisani u poglavlju 1.5.1. Prikazani su tablično i grafički.

4.1.1. Linearnost

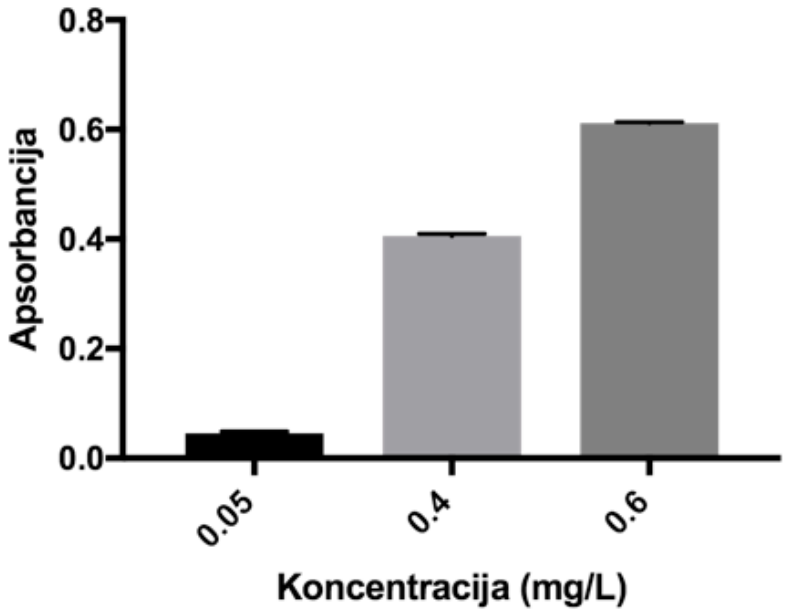
Linearnost je svojstvo metode da unutar određenog intervala daje vrijednosti koje su izravno proporcionalne koncentraciji analita. Linearnost se može odrediti iz kalibracijske krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji analita i izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca k ili R^2, koji treba biti veći od 0,999. Linearnost analitičke metode utvrđena je mjerenjem pripremljenih standardnih otopina različitih koncentracija. Dobiveni kalibracijski pravac prikazan je na Slici 11: Dobivena je jednadžba pravca y=0,1616x – 0,0006 s koeficijentom korelacije R^2= 1. Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti da je metoda linearna i primjenjiva za određivanje koncentracije cinka u uzorcima (Nigović i sur., 2014).



Slika 11. Graf ovisnosti koncentracije standardnih otopina cinka i apsorbancije

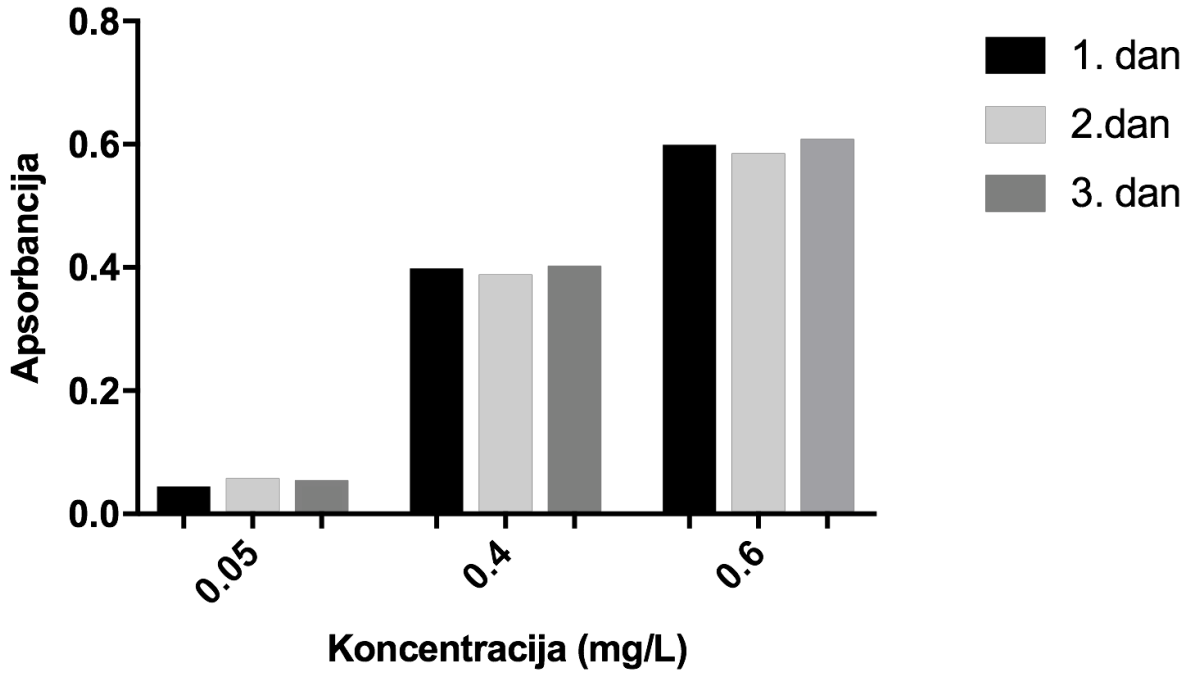
4.1.2. Preciznost

Preciznost analitičke metode ukazuje na slaganje niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Ovisi isključivo o veličini slučajne pogreške te stoga ne daje informacije o točnosti niti o stvarnoj vrijednosti. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost izražava podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pri istim uvjetima u kratkom vremenskom periodu. Ponovljivost se utvrdila provođenjem šest mjerenja za tri standarda različitih koncentracija u kraćem vremenskom periodu. Na Slici 12 prikazana je ponovljivost određivanja sadržaja cinka AAS metodom unutar jednog dana.



Slika 12. Graf ponovljivosti uzastopnih mjerenja izražen kao ovisnost apsorbancije o koncentraciji

Srednja preciznost dobivena je mjerenjem apsorbancije za tri različite koncentracije standarda unutar jednog dana te su se ta mjerenja ponavljala u iduća dva dana. Iz grafičkog prikaza (Slika 13) je vidljivo da su vrijednosti apsorbancije za pojedinu koncentraciju približno jednake. Najveće odstupanje se vidi iz izračunate RSD vrijednosti (Tablica 5) kod standarda najniže koncentracije što se može objasniti njegovom nestabilnošću.



Slika 13. Graf ovisnosti apsorbancije o koncentraciji tri uzorka mjerena kroz tri dana

Tablica 5. Statistička obrada podataka sa Slike 13 uz izračunatu prosječnu vrijednost, standardnu devijaciju i relativnu standardnu devijaciju

	ST 1 (0.05 mg/L)	ST 4 (0.4 mg/L)	ST 5 (0.6 mg/L)
1. dan	0,045	0,399	0,6
2. dan	0,058	0,389	0,586
3.dan	0,055	0,403	0,609
AVERAGE	0,0527	0,397	0,5983
SD	0,0068	0,0072	0,0116
RSD%	12,9244	1,8164	1,9371

4.1.3. Osjetljivost

Granica dokazivanja (limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati, ali ne i odrediti, pri zadanim uvjetima. Računa se prema jednadžbi:

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

gdje je σ standardno odstupanje određenog broja mjerenja signala slijepog pravca ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović, 2014; Skoog i Leary, 1992). Granica dokazivanja za određivanje sadržaja cinka iznosi 0,004 mg/L.

Granica određivanja (limit of quantification, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri zadanim uvjetima metode. Računa se prema jednadžbi:

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

gdje je σ standardno odstupanje određenog broja mjerenja signala slijepog pravca ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992). Granica određivanja za sadržaj cinka iznosi 0,02 mg/L.

4.2. Validacija TXRF metode

Za validaciju TXRF metode korišten je standardni referentni materijal Urine Seronorm Level 2 koji sadrži različite elemente u tragovima u različitim koncentracijama. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 6. Uzimajući u obzir razinu pouzdanosti referentnih vrijednosti, može se reći da je korespondencija TXRF i referentnih vrijednosti za cink izvrsna. Usporedba referentnih standardnih vrijednosti sa standardnim odstupanjima TXRF mjerenja, procijenjenih pomoću šest mjerenja, ukazuje na usporedivu visoku ponovljivost ove metode.

Tablica 6. Validacija standardne otopine Urine Seronorm Level 2

	Seronorm Level 2 (µg/L)		TXRF (µg/L)		
Element	Srednja vrijednost	Prihvatljiv raspon	Koncentracija	SD	LOD
Zn	1168	984 - 1352	1180	20	6.5

Granica dokazivanja (limit of detection, LOD) računa se prema jednadžbi:

$$LOD = 3 \cdot \frac{c}{I_{net}} \cdot \sqrt{2 \cdot I_{bg}}$$

gdje je c, koncentracija analita, I_{net} signala, a I_{bg} intenzitet šuma (Klockenkämper, 1997).

4.2.1. Ponovljivost

Ponovljivost se utvrdila provođenjem šest mjerenja za dva različita uzorka u kraćem vremenskom periodu. U Tablici 7 prikazana je ponovljivost određivanja sadržaja cinka TXRF metodom unutar jednog dana.

Tablica 7. Ponovljivost određivanja sadržaja cinka TXRF metodom unutar jednog dana

	Uzorak 1(µg/L)	Uzorak 2(µg/L)
1	940	893
2	891	850
3	1117	903
4	1337	875
5	990	820
6	1028	844
AVERAGE	1050.5	864.167
SD	160.201	31.670

4.2.2. Usporedivost

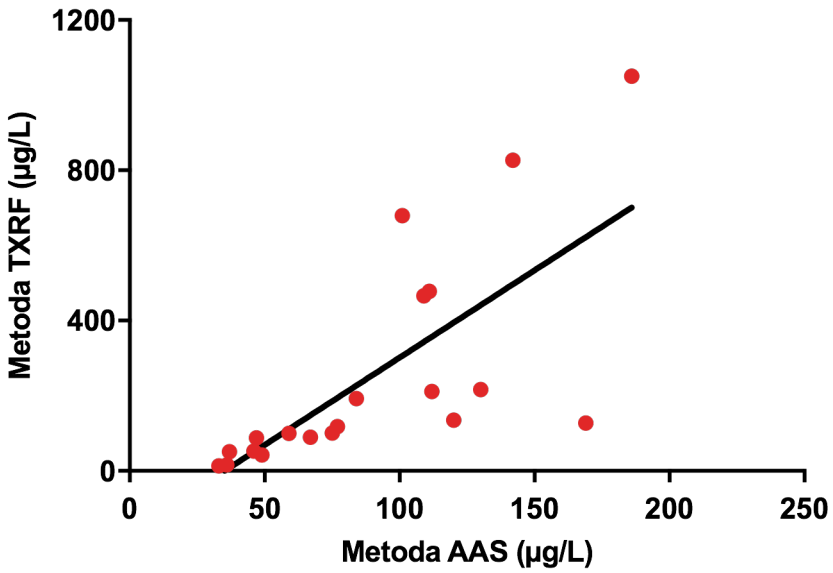
Procjena usporedivosti je utvrđivanje odstupanja između dvaju mjernih postupaka koji mjere istu veličinu. Njezin je cilj donošenje zaključka postoji li statistički značajna razlika između točnosti tih dvaju postupaka prilikom analize uzoraka pacijenata (Bilić-Zulle, 2011).

Prvi korak procjene usporedivosti je vizualni pregled. Njime se dobiva uvid u prirodu odnosa uspoređivanih metoda i raspon mjerenih vrijednosti koje su obuhvaćene usporedbom, a uočavaju se i ekstremne vrijednosti (engl. outliers) koje su najčešće posljedica pogreške instrumenta, interferencija ili krivog upisa podataka. Vizualni se pregled najčešće provodi dijagramom raspršenja (engl. scatter plot) koji se konstruira tako da se na apscisu nanesu vrijednosti izmjerene postojećom, a na ordinatu novom metodom.

Tablica 8. Rezultati analize 21 uzorka urina AAS i TXRF metodom

Uzorak	**AAS** c1 µg/L	**TXRF** c2 µg/L	x **(c1, c2)**	***bias*** **(apsolutni, c1 – c2)**
1.	59	100	79.5	-41
2.	142	826.76	484.38	-684.76
3.	33	13	23	20
4.	112	211	161.5	-99
5.	186	1050	618	-864
6.	111	478	294.5	-367
7.	101	679	390	-578
8.	84	192	138	-108
9.	37	51	44	-14
10.	130	216	173	-86
11.	49	42	45.5	7
12.	109	466	287.5	-357
13.	67	89.4	78.2	-22.4
14.	77	118	97.5	-41
15.	75	101	88	-26
16.	169	127	148	42
17.	36	16	26	20
18.	7	<LOD	7	7
19.	47	88.118	67.559	-41.118
20.	120	135	127.5	-15
21.	46	53	49.5	-7

4.2.3. Dijagram raspršenja



Slika 14. Graf raspršenja

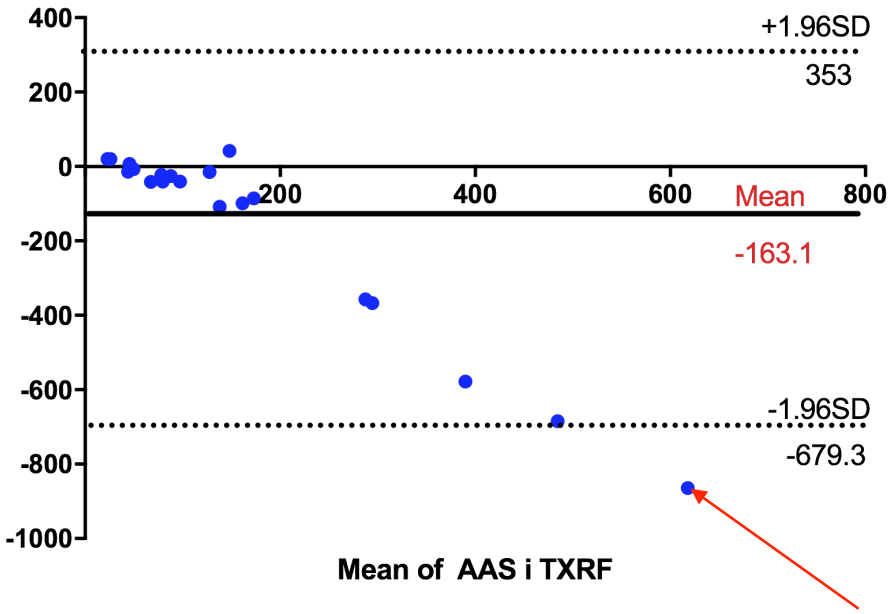
Iz dijagrama raspršenja zaključuje se da su metode slične kod nižih koncentracija dok postoje veća odstupanja kod viših koncentracija. Na dijagramu se vidi i par ekstremnih vrijednosti (engl. outliers) koje značajnije odstupaju od dobivenog pravca.

4.2.4. Grafički prikaz razlike između dobivenih mjerenja

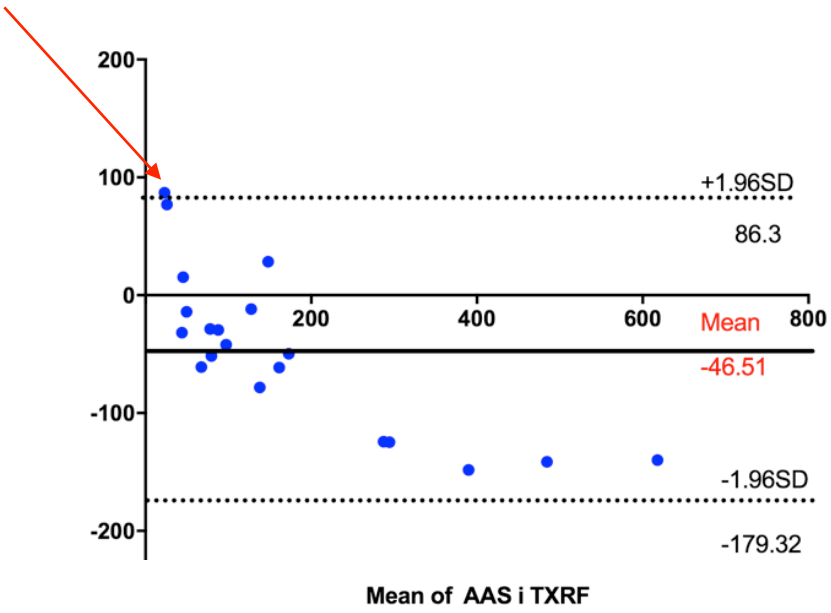
Razlike između dobivenih mjerenja (engl. difference plot) grafički se mogu prikazati na nekoliko načina, a u najširoj su uporabi Bland-Altmanova i Krouwerova metoda. Bland-Altmanov dijagram se konstruira tako da se na apscisu nanosi aritmetička sredina rezultata obiju metoda, a na ordinatu razlika između rezultata izmjerenih postojećom i novom metodom koji se mogu prikazati udjelom, postotkom ili omjerom. Kod Krouwerovog se dijagrama na apscisu nanose vrijednosti dobivene postojećom ili referentnom metodom, a na ordinatu također razlika između rezultata dobivenih postojećom i novom metodom iskazana udjelom ili postotkom. Kako je za Krouwerovu metodu potreban veći broj uzoraka rezultati su prikazani samo pomoću Bland-Altmanove metode. Rezultati dobivenih dijagrama interpretiraju se informativno na osnovu prosječnog odstupanje, odnosno razliku između metoda (95%-tni interval pouzdanosti prosječnog odstupanja i granice prihvatljivosti koje

obuhvaćaju raspon definiran sa ±1,96 standardne devijacije od srednje vrijednosti). Dobiveni grafički prikazi prema tome upozoravaju na prirodu odstupanja i postojanje konstantnog ili proporcionalnog odstupanja između dviju metoda (Šimundić, 2013; Giavarna, 2015).

Bland-Altmanov dijagram



Slika 15. Bland-Altmanov dijagram (razlika između rezultata izmjerenih AAS i TXRF metodom prikazana udjelom)



Slika 16. Bland-Altmanov dijagram (razlika između rezultata izmjerenih AAS i TXRF metodom prikazana postotkom)

Na osnovu grafičkih prikaza moguće je izvesti zaključke o raspršenosti tj. o razlici između rezultata mjerenja, no ne i o tome je li nova metoda prikladna za korištenje u kliničkoj praksi (Giavarina, 2015). Raspršenost razlike između mjerenja manja je pri nižim izmjerenim koncentracijama analita, a kod svih se mjerenja osim jednog nalazi u dozvoljenom rasponu odstupanja definiranom sa ±1,96 standardne devijacije od srednje vrijednosti dok je jedan na samoj granici. Ta razlika koja izlazi iz dozvoljenog raspona odstupanja (označena crvenim strelicama na Slikama 15 i 16) odgovara uzorku 5 u kojem je koncentracija cinka izmjerena AAS metodom iznosila 186 mg/L, dok je ona izmjerena TXRF metodom iznosila 1050 mg/L. Na grafu se uočava jako veliki "rep", koji ukazuje na jaku metodološku razliku u određenom spektru podataka, a ovdje se radi o velikim brojevima.

Na osnovu dobivenih rezultata, kao i prema povećanoj raspršenosti razlika pri višim koncentracijama analita, zaključuje se da se varijabilnost razlika povećava povećanjem veličine mjerenja te da između ove dvije metode postoji proporcionalno odstupanje. Ovakvi rezultati mogu biti posljedica utjecaja matriksa što je naročito izraženo kod TXRF kada se mjere direktno uzorci tipa urina koji imaju velik sadržaj soli kao što su Cl, Na, Ca i dr. (Lué-Merú i Hernández-Caraballo, 2004).

Na razini obične statističke usporedbe korištenjem t-testa dobiva se statistički značajna razliku, od P=0,023, što govori u prilog izraženim statistički značajnim razlikama među metodama.

5. ZAKLJUČCI

Cink kao jedan od elemenata u tragovima važan je za ljudski organizam jer sudjeluje u mnogim biološkim procesima. Neravnoteža koncentracije cinka u organizmu može imati mnoge neželjene posljedice kao što su smanjeni rast, smanjeno seksualno i koštano sazrijevanje, kožne lezije, proljev, alopecija, smanjeni apetit, smanjeni odgovor imunološkog sustava te promjene u ponašanju.

Uvedene su i validirane dvije metode (AAS i TXRF) metode koje se mogu koristiti za određivanje količine cinka u urinu. Validacijski parametri koji su bili ispitivani su: linearnost, preciznost, granica dokazivanja i granica određivanja i točnost.

Iako dobiveni rezultati nisu pokazali dobru usporedivost ove dvije metode, zbog povoljnijih analitičkih karakteristika i svih drugih prednosti koje pruža TXRF metoda kao što su multielementna analiza, mala količina uzorka, brza metoda, jednostavna ona bi trebala naći primjenu u rutinskom radu mnogih laboratorija.

6. LITERATURA

B for Biology, 2016., http://namrataheda.blogspot.com, pristupljeno 14. 9. 2018.

Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia medica*, 2011, 2, 49-52.

Borgese L, Bilo F, Bontempi E, Seralessandri L, Cinosi A, Siviero G and Depero LE. Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF) spectroscopy for environmental and biological analysis. *International Congress of Metrology*, 2013.

Dutra RL, Cantos GA and Carasek E. Analysis of zinc in biological samples by flame atomic absorption spectrometry: use of addition calibration technique. *Biol Trace Elem* Res, 2006, 111, 265-279.

Fernández Ruiz R. TXRF Spectrometry as a Powerful Tool for the Study of Metallic Traces in Biological Systems, *Development in Analytical Chemistry,* 2014, 1, 1-14.

Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia* Medica, 2015, 25, 141-151.

Greaves ED, Angeli-Greaves M, Jaehde U, Drescher A, A. von Bohlen. Rapid determination of platinum plasma concentrations of chemotherapy patients using total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2006, 61, 1194-1200.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 304 - 308.

Jablan J, Inic S, Stosnach H, Hadziabdic MO, Vujic L, Domijan AM. Level of minerals and trace elements in the urine of the participants of mountain ultra-marathon race. *J Trace Elem Med* Biol, 2017, 41, 54-59.

Jablan J, Grdić Rajković M, Inić S, Petlevski R, Domijan A. Impact of Anticoagulants on Assessment of Zinc in Plasma. *Croatica Chemica* Acta, 2018, 91, 1-5.

Khuder A, Bakir MA, Karjou J, Sawan MK. XRF and TXRF techniques for multi-element determination of trace elements in whole blood and human hair samples. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2007, 273, 435-442.

Klockenkämper R. Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis. Hoboken, John Wiley & Sons, 1997, str. 385-388.

Kotra V, Alekhya G, Surapaneni R, Hima Tejaswini N, Sireesha V. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy. *Journal of Scientific Research in Pharmacy*, 2012, 1, 16-19.

Lué-Merú M i Hernández-Caraballo E. Direct Analysis of Biological Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B*, 2004, 59, 1077-1090.

Luterotti S, Bićanić D. Odabrane teme iz bioanalitike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2013, str. 1-12.

Marcó LM, Greaves ED, Alvarado J. Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1999, 54, 1469-1480.

Marcó P, Lué M, Hernández-Caraballo EA. Direct analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2004, 59, 1077-1090.

Nigović B, Jurišić-Grubešić R, Vuković J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 135-138.

Prashanth LK, Chitturi KR, Baddam V, Prasad L. A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2015, 4, 75-85.

Soetan K, Olaiya C, Oyewole O. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*, 2009, 4, 200-222.

Stosnach H. Analytical determination of selenium in medical samples, staple food and dietary supplements by means of total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2010, 65, 859-863.

Šimundić AM. Bias in research. *Biochemia Medica*, 2013, 23, 12-15.

Skoog DA i Leary JJ. Principles of instrumental analysis. Belmont, Saunders College Pub. 1992, str. 20-22.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 493-498, 542-554, 596-614.

Smith JC, Butrimovitz GP, Purdy WC. Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem*, 1979, 25, 1487-1491.

Szoboszlai N, Polgári Z, Mihucz VG , Záray G. Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 633, 1-18.

Taylor A. Detection and Monitoring of Disorders of Essential Trace Elements. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1996, 33, 486-510.

Van Loon JC. Analytical atomic absorption spectroscopy: selected methods. Toronto, Academic Press, 1980, str. 1-5.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 145-151.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Cink je jedan od esencijalnih mikroelemenata vrlo važan za razvoj ljudskog organizma te kao dio mnogih enzima sudjeluje u rastu i razvoju stanica. Na razini organizma je ključan u procesima normalne funkcije imunološkog sustava te male promjene količine mogu dovesti do većeg broja fizioloških poremećaja. Stoga je nužno imati metodu koja omogućava brzo, točno i reproducibilno mjerenje njegove količine.

U tu svrhu korištene su atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) kao već dobro uhodana i široko korištena metoda te rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF) koja se zadnjih godina počinje sve više koristiti i ima potencijala za omogućavanje još brže, jednostavnije, multielementne analize u nanogramskim količinama uz nisku cijenu održavanja.

Provođenjem kratke analitičke validacije metode atomske apsorpcijske spektrofotometrije kao i metode rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom za određivanje koncentracije cinka u urinu pokazano je da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti za točnost, preciznost i linearnost. Usporedbom s postojećom metodom određivanja koncentracije cinka u urinu Bland-Altmanovom analizom pokazano je da postoje proporcionalno i konstantno odstupanje između metoda, tj. da one nisu usporedive.

Usprkos činjenici da metode nisu usporedive, zbog mnogih prednosti koje uključuju analitičke karakteristike TXRF tehnika ima sve veću primjenu na širokom spektru uzoraka.

Zinc is one of the essential microelements important for the development of human body and participates in the growth and development of cells as part of many enzymes. At the organism level it is the key in processes of normal function of the immune system and small changes in the amount can lead to a greater number of physiological disorders. Therefore, it is necessary to have a method that allows a quick, accurate and reproducible measurement of its quantity.

For this purpose, Atomic Absorption Spectrometry (AAS) has been used as the well-established and widely used method together with the Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry (TXRF), which has become increasingly used in recent years and has the potential to enable even faster, simpler, multi-elemental analysis in nanogram quantities at a low cost of maintenance.

By carrying out a brief analytical validation of the atomic absorption spectrophotometry method, as well as the total reflection x-ray fluorescence spectrometry method for determining urine zinc concentrations, it has been shown that the eligibility criteria for accuracy, precision and linearity have been met. Comparison with the existing method of determination of zinc concentrations in urine Bland-Altman analysis showed that there is a proportional and constant deviation between the methods, that is, that they are not comparable.

Despite the fact that the methods are not comparable, due to the many advantages that include the analytical characteristics of the TXRF technique, it is increasingly applied to a wide spectrum of samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Usporedba rezultata sadržaja cinka u urinu s dvije analitičke metode

Marko Kozlović

SAŽETAK

Cink je jedan od esencijalnih mikroelemenata vrlo važan za razvoj ljudskog organizma te kao dio mnogih enzima sudjeluje u rastu i razvoju stanica. Na razini organizma je ključan u procesima normalne funkcije imunološkog sustava te male promjene količine mogu dovesti do većeg broja fizioloških poremećaja. Stoga je nužno imati metodu koja omogućava brzo, točno i reproducibilno mjerenje njegove količine.

U tu svrhu korištene su atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) kao već dobro uhodana i široko korištena metoda te rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF) koja se zadnjih godina počinje sve više koristiti i ima potencijala za omogućavanje još brže, jednostavnije, multielementne analize u nanogramskim količinama uz nisku cijenu održavanja.

Provođenjem kratke analitičke validacije metode atomske apsorpcijske spektrofotometrije kao i metode rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom za određivanje koncentracije cinka u urinu pokazano je da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti za točnost, preciznost i linearnost. Usporedbom s postojećom metodom određivanja koncentracije cinka u urinu Bland-Altmanovom analizom pokazano je da postoje proporcionalno i konstantno odstupanje između metoda, tj. da one nisu usporedive.

Usprkos činjenici da metode nisu usporedive, zbog mnogih prednosti koje uključuju analitičke karakteristike TXRF tehnika ima sve veću primjenu na širokom spektru uzoraka.

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

Rad sadrži: 41 stranica, 16 grafičkih prikaza, 8 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Cink, atomska apsorpcijska spektrometrija, rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom

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

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

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Comparison of zinc content in urine with two analytical methods

Marko Kozlović

SUMMARY

Zinc is one of the essential microelements important for the development of human body and participates in the growth and development of cells as part of many enzymes. At the organism level it is the key in processes of normal function of the immune system and small changes in the amount can lead to a greater number of physiological disorders. Therefore, it is necessary to have a method that allows a quick, accurate and reproducible measurement of its quantity.

For this purpose, Atomic Absorption Spectrometry (AAS) has been used as the well-established and widely used method together with the Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry (TXRF), which has become increasingly used in recent years and has the potential to enable even faster, simpler, multi-elemental analysis in nanogram quantities at a low cost of maintenance.

By carrying out a brief analytical validation of the atomic absorption spectrophotometry method, as well as the total reflection x-ray fluorescence spectrometry method for determining urine zinc concentrations, it has been shown that the eligibility criteria for accuracy, precision and linearity have been met. Comparison with the existing method of determination of zinc concentrations in urine Bland-Altman analysis showed that there is a proportional and constant deviation between the methods, that is, that they are not comparable.

Despite the fact that the methods are not comparable, due to the many advantages that include the analytical characteristics of the TXRF technique, it is increasingly applied to a wide spectrum of samples.

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

Thesis includes: 41 pages, 16 figures, 8 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Zinc, atomic absorption spectrometry, total reflection X-ray fluorescence

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

Reviewers: **Jasna Jablan**, **Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Suzana Inić, **Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** *Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.