

# Optimizacija metode određivanja željeza u medu atomskom apsorpcijskom spektrometrijom

---

**Vičić, Valentina**

**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:163:322275>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Valentina Vičić**

**Optimizacija metode određivanja željeza u medu  
atomsom apsorpcijskom spektrometrijom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

*Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Jasni Jablan na pružanoj pomoći i prenesenim znanjima u izradi ovog diplomskog rada.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, bratu i Juraju, bez njihove ljubavi i podrške sve ovo ne bi bilo moguće.*

*Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene i sve ove godine učinili nezaboravnima!*

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
	<b>1.1 Med.....</b>	<b>1</b>
	1.1.1 <i>Kemijski sastav meda.....</i>	<i>1</i>
	1.1.2 <i>Fizikalna svojstva meda.....</i>	<i>2</i>
	1.1.3 <i>Upotreba meda u terapijske svrhe.....</i>	<i>3</i>
	<b>1.2 Željezo.....</b>	<b>4</b>
	1.2.1 <i>Fiziološka funkcija.....</i>	<i>4</i>
	1.2.2 <i>Apsorpcija.....</i>	<i>5</i>
	1.2.3 <i>Deficit.....</i>	<i>5</i>
	<b>1.3 Atomska spektrometrija.....</b>	<b>6</b>
	1.3.1 <i>Vrste spektra.....</i>	<i>6</i>
	1.3.2 <i>Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS).....</i>	<i>7</i>
	<b>1.4 Validacija.....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>11</b>
	<b>3.1 Materijali.....</b>	<b>11</b>
	3.1.1 <i>Kemikalije.....</i>	<i>11</i>
	3.1.2 <i>Laboratorijski pribor i posude.....</i>	<i>11</i>
	3.1.3 <i>Radni instrumenti.....</i>	<i>12</i>
	3.1.4 <i>Uzorci.....</i>	<i>14</i>
	<b>3.2 Metode.....</b>	<b>15</b>
	3.2.1 <i>Priprema otopina.....</i>	<i>15</i>
	3.2.2 <i>Priprema uzorka.....</i>	<i>16</i>
	3.2.3 <i>Postupak određivanja željeza u medu.....</i>	<i>19</i>
	<b>3.3 Statistička obrada podataka.....</b>	<b>19</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>20</b>
	<b>4.1 Validacija analitičke metode.....</b>	<b>20</b>
	4.1.1 <i>Linearnost.....</i>	<i>20</i>
	4.1.2 <i>Preciznost.....</i>	<i>21</i>
	4.1.3 <i>Točnost.....</i>	<i>22</i>
	4.1.4 <i>Granica dokazivanja i granica određivanja.....</i>	<i>23</i>
	<b>4.2 Optimizacija metode.....</b>	<b>24</b>
	4.2.1 <i>Eksperimentalni dizajn.....</i>	<i>24</i>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>31</b>

<b>7.</b>	<b>SAŽETAK/ SUMMARY .....</b>	<b>33</b>
<b>8.</b>	<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

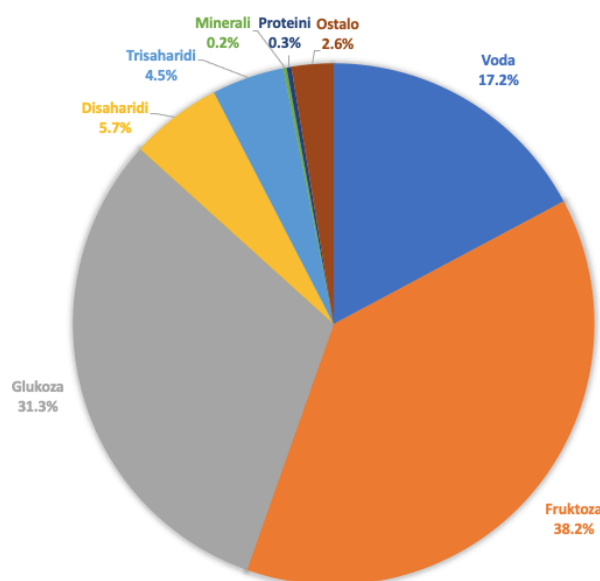
# 1. UVOD

## 1.1 Med

Prirodni med je slatka, vrlo viskozna tekućina bogatog nutritivnog sastava i ljekovitih svojstava, proizvode ga pčele (*Apis mellifera*, Apidae) prikupljanjem nektara s raznovrsnih cvjetova. Uporaba meda kao prirodnog sladila ima dugu tradiciju. Prvi zapisi o medu u povijesti sežu još daleko 2100-2000 pr.Kr., a do početka industrijske proizvodnje šećera u 18. st., med je bio jedini široko dostupan zaslađivač u upotrebi. Osim kao namirnica u prahrani, med se koristi i u kozmetici, industriji te u terapijske svrhe (Samarghandian i sur., 2017; Ajibola A i sur., 2012 Bogdanov i sur., 2008).

### 1.1.1 Kemijski sastav meda

Glavne sastavnice meda su ugljikohidrati koji čine 95% suhe mase meda. Najzastupljeniji ugljikohidrati su monosaharidi glukoza i fruktoza, no osim jednostavnih šećera med u svom sastavu ima 25 različitih oligosaharida. Uz ugljikohidrate, med sadrži manje količine esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina, vitamine i minerale (Bogdanov i sur., 2008). Kemijski sastav meda varira ovisno o vrsti meda, geografskom položaju te klimatskim uvjetima i sastavu tla (De-Melo i sur., 2017).



Slika 1: Kemijski sastav meda

Od vitamina i minerala, med je najbogatiji vitaminom C i kalijem, a količina nekih vitamina i minerala zajedno s preporučenim dnevnim unosom nalazi se u *tablici 1* (Bogdanov i sur., 2008). U pravilu tamnije vrste meda poput medljikovca imaju veći sadržaj minerala. Prisutnost teških metala u medu može biti indikator zagađenja okoliša (De-Melo i sur., 2017).

*Tablica 1. Sastav meda*

Sastavnica	Količina u 100 g (mg)	Adekvatni dnevni unos za odrasle (AR) <sup>1</sup>
Natrij (Na)	1,6 – 17	2000 mg/dan
Kalcij (Ca)	3 – 31	750 mg/dan
Kalij (K)	40 – 3500	3500 mg/dan
Magnezij (Mg)	0,7 – 13	300 mg/dan
Fosfor (P)	2 – 15	550 mg/dan
Cink (Zn)	0,05 – 2	8,9 mg/dan
Bakar (Cu)	0,02 – 0,06	1,3 mg/dan
Željezo (Fe)	0,03 – 4	7 mg/dan
Askorbinska kiselina (vitamin C)	2,2 – 2,5	80 mg/dan
Riboflavin (vitamin B <sub>2</sub> )	0,01 – 0,02	1,3 mg/dan

<sup>1</sup> Average requirement (AR) prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA) ([www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu))

### 1.1.2 Fizikalna svojstva meda

Fizikalna svojstva meda ovise o vrsti meda, geografskom položaju i klimatskim uvjetima, a uključuju boju, električnu provodnost, gustoću, viskoznost, optičku aktivnost, indeks loma,

higroskopnost, osmotski tlak i kristalizaciju. Boja meda varira od svijetlo žute sve do izrazito tamno smeđe, često i s crvenkastim ili zelenkastim odsjajem. Gustoća, viskoznost i indeks loma najviše ovise o udjelu vode, dok osmotski tlak i optička aktivnost ovise o ugljikohidratnom sastavu meda. Kristalizacija meda je spontani proces ovisan o temperaturi skladištenja meda. Optimalna temperatura za kristalizaciju je od 10 do 18 °C. U procesu kristalizacije zbog prezasićenosti glukoze iz meda dolazi do gubitka vode i prelaska u kristalni monohidratni oblik. Vrste meda s većim udjelom glukoze, a manjim udjelom fruktoze skloniji su kristalizaciji (De-Melo i sur., 2017).

### 1.1.3 Upotreba meda u terapijske svrhe

Ljekovita svojstva meda poznata su već dugi niz godina, posebice njegovo antioksidativno, protuupalno i antimikrobno djelovanje. Med i njegovi alkoholni ekstrakti inhibiraju rast velikog broja bakterija uključujući neke anaerobne i aerobne te gram pozitivne i gram negativne bakterije. Neke *in-vitro* studije pokazuju njegovo djelovanje na rezistentne bakterijske sojeve poput meticilin-rezistentnog *S. aureus* i *A. baumannii* koje su vrlo česti uzrok bolničkih infekcija u imunokompromitiranih pacijenata. Med posjeduje brojne mehanizme antimikrobne aktivnosti od kojih je najvažnija produkcija hidrogen peroksida (Gobin i sur.; 2018; Abeshu i sur., 2016). Oksidativni stres predstavlja stanje organizma nastalo prekomjernom produkcijom slobodnih radikala koje mehanizmi u tijelu nisu sposobni neutralizirati što rezultira oštećenjem stanica. Dokazano je da oksidativni stres igra važnu ulogu u pozadini mnogih bolesti poput kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesu, malignim bolestima i drugim. Snažnu antioksidativnu aktivnost med duguje svom bogatom kemijskom sastavu od kojih najsnažniju aktivnost imaju mnogobrojni fenoli poput kvercetina i krisina (Liguori i sur., 2018; Abeshu i sur., 2016). Najstarija poznata uporaba meda u terapijske svrhe je liječenje rana zbog prethodno navedenih antimikrobnih svojstva, ali i zbog poznatog imunomodulacijskog i protuupalnog djelovanja. Osim za tretiranje rana, med se u dermatologiji koristi i za liječenje ekcema, dermatitisa, akni, psorijaze, hemoroida i dr. Med i njegovi derivati se vrlo često nalaze i u sastavu brojnih dermatokozmetičkih preparata gdje se njihov sadržaj kreće od 0,5 do 5% (Burlando i sur., 2013).



## 1.2 Željezo

### 1.2.1 Fiziološka funkcija

Željezo je široko rasprostranjen element, već je tisućama godina korišten u raznolike svrhe te su još stari Grci utvrdili njegovu važnost za zdravlje ljudskog organizama. Unatoč tome najčešći poremećaji ravnoteže nutrijenata su upravo vezani uz nedostatak ili prekomjernu količinu željeza u organizmu. Željezo za razliku od ostalih minerala nema jedinstveni fiziološki mehanizam eliminacije iz tijela već se količina željeza regulira na tri načina: pohranom u obliku feritina, recikliranjem željeza te najvažnije regulacijom apsorpcije željeza u gastrointestinalnom sustavu. Željezo je sastavni dio velikog broja proteina, prostetskih skupina i kofaktor mnogim enzimima. Glavne funkcije uključuju transport kisika, prijenos elektrona i sintezu deoksiribonukleotida. Proteini koji u svojem sastavu sadrže željezo dijele se na hem proteine (hemoglobin, mioglobin, citokromi, mono- i di-oksigenaze, oksidaze), željezo-sumpor proteine (akonitaza, ferokelataza) te mononuklearne i dinuklearne ne-hemske proteine željeza. Željezo se u hem proteinima nalazi unutar porfirinskog prstena, ima pet ili šest koordinacijskih mjesta, od kojih četiri mjesta zauzimaju atomi dušika iz porfirinskog prstena, peto mjesto zauzima aminokiselina koja je sastavni dio proteina, dok se na šesto mjesto može vezati molekula kisika, ali i druge molekule poput NO ili aminokiselina. Hemoglobin i mioglobin na šesto mjesto vežu molekulu kisika čime omogućuju transport molekule O<sub>2</sub> krvlju i pohranu u skeletnim mišićima. U transportnom lancu elektrona citokromi i željezo-sumpor proteinski kompleksi sudjeluju u pretvorbi Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup> što omogućuje prijenos elektrona i stvaranje energijom bogate molekule ATP-a. Željezo koje u organizmu nije iskorišteno pohranjuje se u obliku feritina (jetra, slezena i skeletni mišići) i hemosiderina (makrofagi), a prenosi u obliku transportnog proteina transferina. Glavni regulator homeostaze željeza je hormon hepcidin, izlučuju ga hepatociti kao odgovor na povišenu razinu željeza u serumu. Hepcidin uzrokuje internalizaciju i razgradnju proteina feroportina. Uloga feroportina je transport željeza iz enterocita, makrofaga i hepatocita u krvnu plazmu, njegovom razgradnjom se posljedično smanjuje razina željeza u krvi (Polin i sur., 2013; Stipanuk i sur., 2012; Gibney i sur., 2009).

## 1.2.2 Apsorpcija

Apsorpcija željeza ovisi o tri faktora: količini željeza u prehrani, bioraspoloživosti željeza iz namirnice i kapacitetu enterocita za apsorpciju željeza. Apsorpcija hemskog željeza iz namirnice životinjskog porijekla kreće se od 15% do 35%, dok apsorpcija nehenskog željeza uvelike ovisi o ostalim komponentama obroka zbog stvaranja netopljivih kompleksa koji smanjuju apsorpciju, iz tog razloga nehensko željezo apsorbira se samo 1-20%. Željezo se dobro apsorbira iz mesa, ribe, morskih plodova i nekih organskih proizvoda, a apsorpciju dodatno pospješuje vitamin C. Na apsorpciju negativno utječu fitati, kalcij, vlakna i neke fenolne kiseline (galna kiselina, taninska kiselina) ( Stipanuk i sur., 2012; Gibney i sur., 2009).

## 1.2.3 Deficit

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) učestalost deficita željeza u razvijenim zemljama iznosi čak 15%, a nedostatak željeza je najčešći uzrok anemije. Status željeza u organizmu najčešće se određuje mjerenjem feritina u serumu, normalna koncentracija iznosi 20-200 µg/L, dok mjerenje ukupnog željeza, transferina i saturacije transferina pruža detaljniji uvid u kliničku sliku. Deficitu željeza podložnija su djeca, adolescenti i žene reproduktivne dobi. Glavni simptomi uključuju umor, iscrpljenosti, poremećaj termoregulacije i drugi. Deficit se liječi oralnom suplementacijom željeza u obliku željezo(III) fumarata i željezo (II) sulfata u dozi od 200 mg/dan. Najčešće nuspojave oralnih oblika uključuju intoleranciju, konstipaciju, proljev i mučninu. Kada oralna suplamentacija nije moguća ili je ona nedostatna moguća je intravenska administracija željezove saharoze ili niskomolekularnog željezo dekstana (Polin i sur., 2013; Stipanuk i sur., 2012).

## 1.3 Atomska spektrometrija

Atomskom spektrometrijom moguće je kvantitativno i kvalitativno odrediti više od 70 elemenata u vrlo niskim koncentracijama, najčešće *parts per milion* (ppm), što ju čini metodom izbora za kvantitativno određivanje elemenata u tragovima. U atomskoj spektrometriji otopljeni uzorak se aspirira u plamen gdje dolazi do isparavanja otapala i atomizacije uzorka. Atomizacija je proces u kojem nastaju plinoviti neutralni atomi elemenata. Upravo se vrste atomskih spektrometrijskih metoda dijele prema načinu atomizacije uzorka navedene u *tablici 2* (Skoog, 2014; Watson, 2012; Harris, 2010).

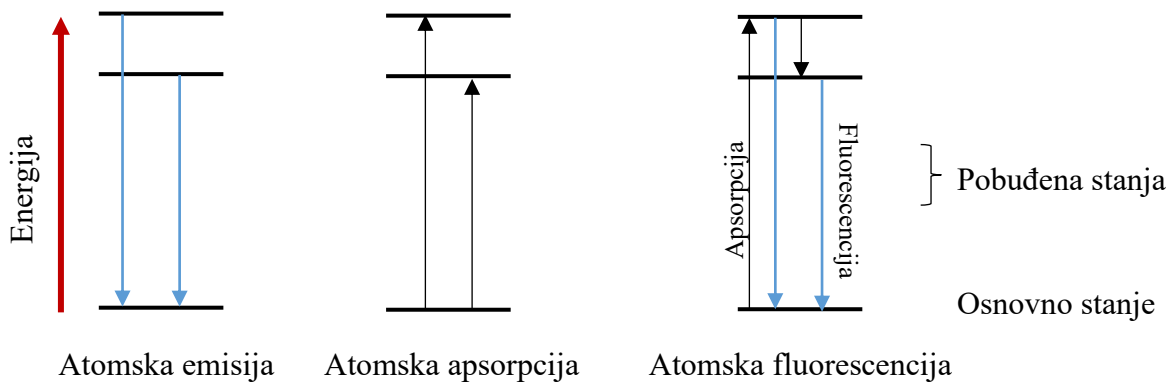
*Tablica 2. Podjela atomskih spektrometrijskih metoda prema vrsti atomizacije*

Metoda atomizacije	Temperatura atomizacije (°C)	Vrsta spektrometrije
Plamen	1700-3150	Apsorpcija
		Emisija
		Fluorescencija
Induktivno spregnuta plazma	6000-8000	Emisija
		Masena
Elektrotermička	1200-3000	Apsorpcija
		Fluorescencija

### 1.3.1 Vrste spektra

Atomska spektrometrija može dati tri vrste spektra: emisijski, apsorpcijski i fluorescencijski. Prilikom emisije, atomi elemenata djelovanjem visoke temperature prelaze u pobuđeno stanje te vraćanjem u osnovno stanje emitiraju energiju pri točno određenoj valnoj duljini što rezultira tankom linijom na spektru. Energija plamena ipak nije dovoljna za pobuđivanje većine elemenata stoga se ova metoda može koristiti samo za Ca, Ba, Na, Li i K.

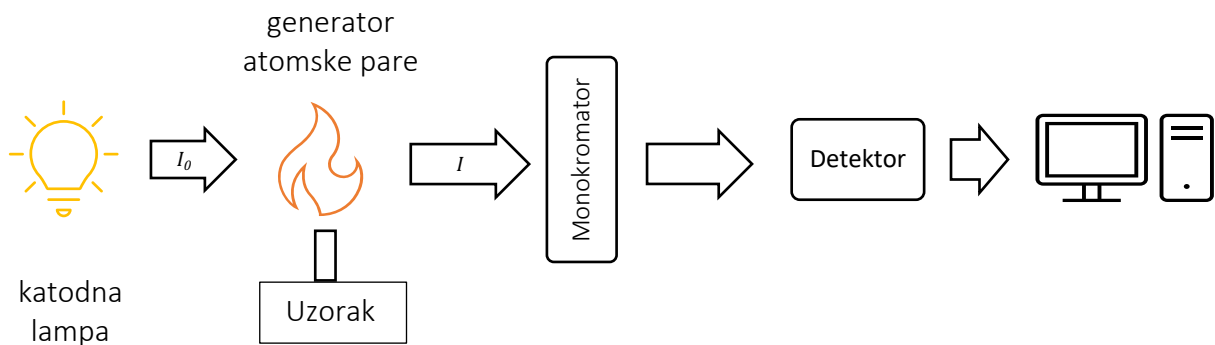
Za atome koji zahtijevaju veliku energiju za prelazak iz osnovnog u pobuđeno stanje, atomska apsorpcija je metoda izbora. Atomi metala u plamenu apsorbiraju energiju jednaku razlici energije osnovnog i pobuđenog stanja pri određenoj valnoj duljini ( Watson, 2012; Harris, 2010).



Slika 2. Vrste prijelaza u atomskoj spektrometriji

### 1.3.2 Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS)

Zbog svoje jednostavnosti i učinkovitosti AAS je jedna od najkorištenijih analitičkih tehnika danas. Kod AAS-a uzorak se prvo aspirira u plamen gdje se analit prevodi u atomsku paru. Nakon atomizacije uzorka u plamenu, atomi metala iz uzorka nemaju sposobnost emitirati energiju jer je razlika između osnovnog i pobuđenog stanja prevelika, stoga apsorbiraju energiju što rezultira apsorpcijskim vrpčama na detektoru. Kako bi apsorpcijske linije spektra bile mjerljive, koristi se šuplja katodna žarulja koja je presvučena analiziranim metalom. Svaki atomski apsorpcijski spektrometar sastoji se od nekoliko dijelova prikazanih na slici 3.



Slika 3. Shematski dijagram atomskog apsorpcijskog spektrometra

Nakon prolaska zraka kroz uzorak, monokromator odabire točno određene vrpce koje su zatim vidljive na detektoru, nakon čega kompjuterski program analizira dobivene podatke apsorbancije. AAS-om moguće je kvalitativno i kvantitativno odrediti sastav uzorka.

Kvantitativna analiza temelji se kao i kod ostalih spektrometrijskih metoda na Beer-Lambertovom zakonu prema kojem je apsorbancija izravno proporcionalna broju slobodnih atoma u atomskoj pari. Metoda je vrlo osjetljiva stoga je moguće odrediti i vrlo niske koncentracije metala, što ju čini dobrom metodom za analizu onečišćenja teškim metalima.

*Beer-Lambertov zakon:* 
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc$$

gdje je:

$A$  – apsorbancija

$I_0$  – intenzitet ulaznog zračenja

$I$  – intenzitet propuštenog zračenja

$\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$b$  – duljina uzorka kroz koju prolazi zraka (cm)

$c$  – molarna koncentracija otopine ( $\text{mol dm}^{-3}$ )

Neke od prednosti AAS-a uključuju brzinu analize, jednostavnu pripremu uzorka i vrlo visoku osjetljivost. S druge strane metoda ima i nekih ograničenja, prilikom analize više elemenata u jednom uzorku potrebno je mijenjati žarulje za svaku analizu. Također metoda se može koristiti samo za analizu metala (Skoog, 2014; Watson, 2012; Harris, 2010)

## 1.4 Validacija

Validacija analitičke metode je proces dokazivanja da je korištena metoda prikladna za određenu namjenu. Proces validacije analitičke metode uključuje određivanje osam parametra: specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, radno područje, granica dokazivanja, granica određivanja i izdržljivost ( Nigović i sur., 2014).

- *Specifičnost* je sposobnost nedvojbenog dokazivanja analita u prisustvu ostalih komponenti uzorka koje uključuju onečišćenja, razgradne produkte, matriks i dr.
- *Linearnost* je sposobnost metode da u određenom intervalu daje linearnu ovisnost koncentracije i količine analita u uzorku.
- *Točnost* metode opisuje podudaranje rezultata sa stvarnim ili prihvaćenim referentnim vrijednostima.
- *Preciznost* metode opisuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja istog uzorka pri određenim uvjetima. Preciznost uključuje ponovljivost, srednju preciznost i obnovljivost.
- *Radno područje* je interval između najmanje i najveće koncentracije analita (uključujući i granične vrijednosti) za koji je dokazano da metoda ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost.
- *Granica dokazivanja* je najmanja količina analita koju je moguće dokazati u uzorku, ali ne nužno i kvantificirati.
- *Granica određivanja* je najmanja količina analita koju je moguće kvantitativno odrediti sa zadovoljavajućom preciznosti i točnosti.
- *Otpornost* je mjera sposobnosti metode da ostane nepromijenjena prilikom malih, namjernih promjena parametra ispitivanja što daje uvid u pouzdanost metode prilikom normalnih uvijeta ispitivanja (Nigović i sur., 2014; Harris, 2010; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Željezo kao jedan od najvažnijih minerala za ljudski organizam igra važnu ulogu u sveukupnom zdravlju čovjeka. Njegov deficit u čovjeka može izazvati ozbiljne poremećaje u zdravlju, stoga je od iznimne važnosti osigurati njegov adekvatan unos. Iako većinu potrebnog željeza ljudski organizam dobiva iz namirnica animalnog porijekla, vrlo je važan unos željeza putem nekih drugih namirnica ili dodataka prehrani naročito kod različitih restriktivnih dijeta (npr. vegetarijanska dijeta). Sastav meda pretežito čini kompleksni ugljikohidratni matriks što ga čini vrlo složenim uzorkom za analizu vitamina i minerala. Sastav meda varira i prema geografskom porijeklu kao i kvaliteti proizvodnje. Iz navedenih razloga u rezultatima prethodnim istraživanja, koja su uključivala različite metode pripreme i analize uzoraka, dobiven je širok raspon koncentracija željeza u medu.

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti optimalne uvjete za pripremu uzoraka meda koji bi osigurali brzu, pouzdanu i jeftinu metodu za određivanje sadržaja željeza. Zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti za analizu sadržaja željeza u uzorcima meda korištena je atomska apsorpcijska spektrometrija. Za izvođenje eksperimenta korišten je Box-Behnkenov dizajn i u skladu s njim definirane su tri varijable u pripremi uzorka – temperatura, udio kiseline i duljina soniciranja kako bi se uvidio njihov utjecaj na koncentraciju željeza te u konačnici definirali optimalni uvjeti pripreme uzorka meda za analizu. Nakon optimizacije metode određen je sadržaj željeza u svim prikupljenim uzorcima meda.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1 Materijali

#### 3.1.1 Kemikalije

- 70% HClO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 65% HNO<sub>3</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Standard Fe 1000 µg/mL (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 µScm<sup>-1</sup>, pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, SAD)

#### 3.1.2 Laboratorijski pribor i posuđe

- odmjerne tikvice volumena 10 mL, 25 mL, 50 mL, 150 mL
- plastične samostojeće epruvete volumena 50 mL (Isolab Laborgeräte GmbH)
- trbušasta pipeta volumena 10 mL
- propipeta
- stakleni lijevak
- kvantitativni filter papir F2045 promjer 90 mm (CHMLAB Group, Španjolska)
- boca štrcaljka
- plastična kapaljka
- Mikropipete masterpette volumena 50-200 µL, 200-1000 µL, 1000-5000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Metalni stalci, mufe, kleme
- plastični stalak za epruvete



### 3.1.3 Radni instrumenti

- **ATOMSKI APSORPCIJSKI SPEKTROMETAR**

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

- Žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
- Valna duljina (nm): 248,3 nm
- Gorivo/ oksidans: acetilen/ zrak
- Acetilen (tlak (Pa)/ protok (dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>) : 0,9x10<sup>5</sup>/2
- Zrak tlak (Pa)/ protok (dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>) : 5,5x10<sup>5</sup>/17
- Širina pukotine (nm): 0,2
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Fotodetektor
- Pisač, računalo: AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo, monitor, printer HP 5652



*Slika 4. Atomski apsorpcijski spektrometar AAnalyst 800, Zavod za analitičku kemiju*

- **ANALITIČKA VAGA**

Za vaganje uzoraka korištena je analitička vaga AB204-S (Mettler Toledo, Švicarska).



*Slika 5. Analitička vaga, Zavod za analitičku kemiju*

- **ULTRAZVUČNA KUPELJ**

Za pripremu uzoraka korištena je ultrazvučna vodena kupelj Sono2rex Digital 10P (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Njemačka)



*Slika 6. Ultrazvučna vodena kupelj, Zavod za farmakognoziju*

### 3.1.4 Uzorci

Za potrebe ove analize prikupljen je 21 uzorak cvjetnog meda iz različitih obiteljskih poljoprivrednih gospodarstva (OPG-ova) iz svih dijelova Hrvatske te od velikih proizvođača čiji su proizvodi komercijalno dostupni u svim većim trgovačkim lancima.

*Tablica 3. Prikupljeni uzorci meda i porijeklo*

Broj uzorka	
1	Lekenik, Sisačko-moslavačka županija, Hrvatska
2	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija, Hrvatska
3	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija, Hrvatska
4	Križevci, Koprivničko-križevačka županija, Hrvatska
5	Grad Zagreb, Hrvatska
6	Pisarovina, Zagrebačka županija, Hrvatska
7	Đakovo, Osječko-baranjska županija, Hrvatska
8	Hrvatska i Kina
9	Orle, Zagrebačka županija, Hrvatska
10	Novska, Sisačko-Moslavačka županija, Hrvatska
11	Žumberak, Zagrebačka županija, Hrvatska
12	Novska, Sisačko-Moslavačka županija, Hrvatska
13	Grad Zagreb, Hrvatska
14	Grad Zagreb, Hrvatska
15	Pula, Istarska županija, Hrvatska
16	Ludbreg, Varaždinska županija, Hrvatska
17	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija, Hrvatska
18	Kloštar Podravski, Koprivničko-Križevačka županija, Hrvatska
19	Hrvatska
20	Daruvar, Bjelovarsko-bilogorska županija, Hrvatska
21	Hrvatska i zemlje van EU

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema otopina

#### Priprema 2% HNO<sub>3</sub>

2% otopina HNO<sub>3</sub> korištena je za ispiranje atomskog apsorpcijskog spektrometra. Pripremljena je razrjeđivanjem 20 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> u 1000 mL ultračiste vode. U odmjernu tikvicu dodana je mala količina ultračiste vode te je zatim trbušastom pipetom dodano 20 mL konc. HNO<sub>3</sub>, a zatim je tikvica nadopunjena do oznake, začepljena i dobro promiješana.

#### Priprema standardnih otopina željeza

Matična standardna otopina koncentracije 10 ppm priređena je iz komercijalno dostupne standardne otopine željeza koncentracije 1000 ppm. U odmjernu tikvicu volumena 50 mL mikropipetom dodano je 0,5 mL komercijalne standardne otopine željeza te je tikvica nadopunjena ultračistom vodom do baždarne crte.

Za izradu kalibracijskog pravca pripremljeno je šest standardnih otopina različitih koncentracija te se za njihovu izradu koristila ranije pripremljena matična standardna otopina. Otopine su izrađene pipetiranjem određenog volumena matične otopine u odmjernu tikvicu volumena 25 mL i nadopunjavanjem ultračistom vodom do baždarne crte. Detaljna priprema otopina navedena je u *tablici 4*.

Tablica 4. Priprema standardnih otopina

Oznaka standarda	Koncentracija standarda željeza (ppm)	Ukupno razrijeđenje u odnosu na matičnu otopinu	Volumen matične otopine koncentracije 10 ppm	Konačni volumen otopine standarda (mL)
ST1	0,05	200x	125 $\mu$ L	25
ST2	0,1	100x	250 $\mu$ L	25
ST3	0,2	50x	500 $\mu$ L	25
ST4	0,5	20x	1250 $\mu$ L	25
ST5	1	10x	2500 $\mu$ L	25
ST6	2	5x	5000 $\mu$ L	25
ST7	3	3,33x	7500 $\mu$ L	25

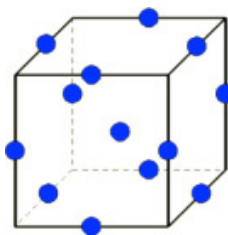
### 3.2.2 Priprema uzorka

#### Eksperimentalni dizajn

Kako bi se odredili optimalni uvjeti provođenja analize korišten je Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn u tri razine koji se temelji na metodi odzivne površine (eng. Response Surface Methodology, RSM). RSM koristi linearne i kvadratne polinomne funkcije kako bi se opisao eksperimentalni sustav te modelirao eksperiment i njegovi optimalni uvjeti. Ova tehnika optimizacije može se podijeliti u nekoliko faza:

- Odabir nezavisnih varijabli i eksperimentalne domene ovisno o cilju eksperimenta
- Odabir eksperimentalnog dizajna i provedba eksperimenata prema matrici
- Statistička obrada dobivenih podataka i uklapanje u polinomnu funkciju
- Provjera prikladnosti metode
- Provjera mogućnosti pomaka prema optimalnoj regiji
- Dobivanje optimalnih varijabli za eksperiment

Prema Box-Behnekovom dizajnu provodi se broj analiza po jednadžbi  $N = 2k(k - 1) + cp$ , gdje  $k$  predstavlja broj nezavisnih varijabli, a  $cp$  broj ponavljanja u centralnoj točki. Sve se varijable u analizi moraju biti svedene na tri razine (-1, 0, 1).



Slika 7. Prikaz Box-Behnekovog dizajna u tri razine, preuzeto s <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/box-behnken-design>

Med se sastoji od kompleksnog organskog matriksa čijim se razaranjem postiže oslobađanje metala što omogućava precizniju analizu stvarnog sadržaja. U tu svrhu u preliminarnoj analizi utvrđene su tri varijable: udio kiseline ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) i vrijeme ( $X_3$ ). Vrijednosti varijabla po razinama prikazane su u *tablici 5*.

Tablica 5. Vrijednosti nezavisnih varijabli po Box-Behnkenov-om modelu

Razina (Box-Behnkenov model)	Udio HClO <sub>4</sub> (%)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
-1	20	20	15
0	30	40	30
1	40	60	45

Korištenjem ovakvog dizajna smanjuje se broj eksperimenata potrebnih za postizanje zadovoljavajućih rezultata. Cilj optimizacije je dobivanje uzorka s realnim sadržajem željeza uz uvijete pogodne za brzu i ekonomičnu analizu (Bezzera i sur., 2008).

### Priprema uzoraka za optimizaciju metode

Koristeći Box-Behnkenov dizajn provedeno je ukupno 17 načina pripreme uzorka (*tablica 6*), uključujući pet ponavljanja u centralnoj točki. Protokol pripreme uzoraka razlikovao se u tri varijable: postotku dodane kiseline (HClO<sub>4</sub>), duljini soniciranja uzorka te temperaturi pri kojoj su uzorci sonicirani.

Uzorci su pripremljeni redosljedom navedenim u *tablici 6* tako da je za svaku pripremu izvagano 0,5 g cvjetnog meda iz istog izvora u samostojeće plastične epruvete te je u svaki

pojedini uzorak dodan različit omjer perklorne i dušične kiseline, nakon čega su ostavljeni 15 minuta na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak je zatim soniciran 15, 30 ili 45 minuta pri različitim temperaturama od 20, 40 ili 60 °C. Nakon što su uzorci sonicirani u različitom trajanju i na različitim temperaturama, kvantitativno su preneseni u odmjerne tikvice od 25mL i nadopunjeni ultračistom vodom do oznake. Prije same analize uzorci su uz pomoć lijevka i filter papira profiltrirani u plastične epruvete.

*Tablica 6. Priprema uzoraka za analizu prema Box-Behnken dizajnu eksperimenta*

Uzorak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Postotak kiseline HClO <sub>4</sub> (%)
1	20	15	30
2	60	15	30
3	20	45	30
4	60	45	30
5	20	30	20
6	60	30	20
7	20	30	40
8	60	30	40
9	40	15	20
10	40	45	20
11	40	15	40
12	40	45	40
13	40	30	30
14	40	30	30
15	40	30	30
16	40	30	30
17	40	30	30

## **Priprema uzoraka za analizu**

Nakon optimizacije metode i definiranja optimalnih vrijednosti varijabli analizirani su svi prikupljeni uzorci. Uzorci su sakupljeni tijekom 2020. godine te pohranjeni na sobnoj temperaturi do same analize. U plastične epruvete volumena 50 mL izvagano je približno 0,5 g svakog uzorka te je u svaki uzorak dodano 1800  $\mu$ L perklorne kiseline i 4200  $\mu$ L dušične kiseline. Uzorci su ostavljeni mirovati na sobnoj temperaturi 15 minuta, nakon čega su prebačeni u ultrazvučnu kupelj, gdje su sonicirani 30 minuta na 40 °C. Nakon soniciranja uzorci su kvantitativno preneseni u odmjerne tikvice volumena 25 mL, a potom su nadopunjeni ultračistom vodom do oznake. Prije analize na AAS-u, uzorci su uz pomoć lijevka i filter papira profiltrirani u plastične epruvete.

### **3.2.3 Postupak određivanja željeza u medu**

Za određivanje koncentracije željeza u medu korištena je plamena tehnika AAS-a. Prije analize plameni atomizator ispire se 2%-tnom  $\text{HNO}_3$  i ultračistom vodom. Mjerenjem apsorbancije otopina standarda konstruira se kalibracijski pravac pomoću kojeg je moguće izračunati koncentraciju željeza u početnom uzorku. Svaki uzorak se analizira uranjanjem plastične cjevčice u epruvetu s uzorkom, nakon čega instrument uzima dostatnu količinu za tri mjerenja. Analize su provedene mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 248,3 nm. Između svakog mjerenja instrument se ispire ultračistom vodom.

## **3.3 Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i GraphPad Prism 9 (Graph pad Software, Inc., San Diego, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) te je za dizajn eksperimenta korišten Box-Behnkenov model u programu Design Expert verzije 12.0.8.0. (Stat-Ease, USA).

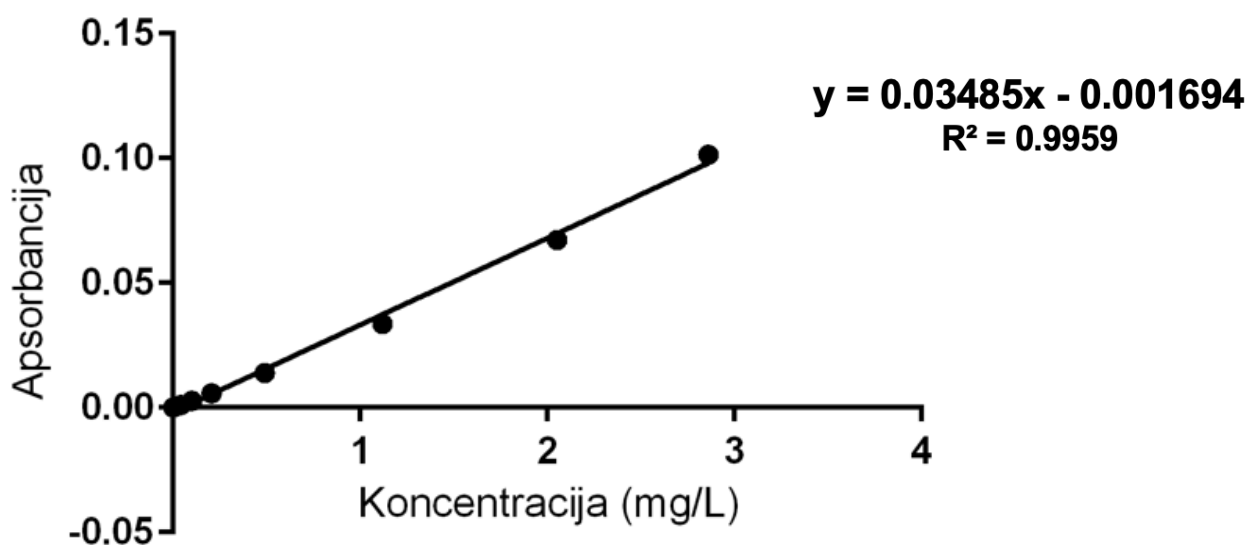


## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Validacija analitičke metode

#### 4.1.1 Linearnost

Linearnost analitičke metode izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca koji se određuje iz kalibracijske krivulje. Kalibracijska krivulja je linearni grafički prikaz ovisnosti izmjerene apsorbancije o koncentraciji, dobivena mjerenjem apsorbancije šest standardnih otopina željeza poznatih koncentracija (0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm i 2 ppm) (Nigović i sur., 2014).



Slika 8. Ovisnost koncentracije standarda i apsorbancije

Iz grafičkog prikaza i jednačbe pravca vidi se da koeficijent korelacije regresijskog pravca iznosi 0,9959 što ukazuje na prihvatljivu linearnost metode.

## 4.1.2 Preciznost

Preciznost analitičke metode može se iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost metode pokazuje slaganje rezultata dobivenih istom metodom, pod istim uvjetima u kratkom vremenskom periodu. Za određivanje ponovljivosti korištene analitičke metode provedena su šest mjerenja triju otopina različitih koncentracija (0,1 ppm, 1 ppm i 2 ppm), nakon čega su izračunate srednja vrijednost koncentracija, standardna devijacija ( $\sigma$ ) i relativna standardna devijacija (RSD) čija je prihvatljiva vrijednost unutar 2%. Dobivene vrijednosti za ST5 i ST6 zadovoljavaju kriterij  $RSD < 2\%$ , dok za ST3 postoji značajnije odstupanje koje se može prepisati nešto većoj nestabilnosti standarda kod vrlo niskih koncentracija. Dobiveni rezultati prikazani su u *tablici 7*.

*Tablica 7. Ponovljivost metode izražena kao reaktivna standardna devijacija*

	ST3	ST5	ST6
Teorijska koncentracija (ppm)	0,1	1,0	2,0
Izmjerena koncentracija (ppm)	0,093	0,987	1,958
	0,111	1,008	1,971
	0,095	1,019	1,979
	0,098	1,034	1,965
	0,109	1,03	1,975
	0,084	1,023	1,987
Srednja koncentracija (ppm)	0,098	1,017	1,973
Standardna devijacija ( $\sigma$ )	0,010	0,017	0,010
Relativna standardna devijacija (RSD, %)	10,364	1,691	0,521

Srednja preciznost izražava podudaranje rezultata dobivenih istom analitičkom metodom, ali pod različitim uvjetima. Srednja preciznost za ovu metodu dobivena je mjerenjem šest različitih uzoraka poznatih koncentracija kroz tri radna dana. Rezultati su prikazani u *tablici 8*.

*Tablica 8. Srednja preciznost izražena kao relativna standardna devijacija*

	STD 4 (0,2 ppm)	STD 5 (0,5 ppm)	STD 7 (2 ppm)
1. radni dan	0,205	0,503	2
2. radni dan	0,209	0,495	2
3. radni dan	0,205	0,489	2,052
Srednja koncentracija (ppm)	0,206	0,496	1,979
Standardna devijacija ( $\sigma$ )	0,002	0,007	0,085
Relativna standardna devijacija (RSD, %)	1,119	1,417	4,00

Relativna standardna devijacija STD 4 i STD 5 odgovara uvjetu  $< 2\%$ , dok je za STD 7 ona nešto veća, ali još uvijek osigurava dobru srednju preciznost.

### 4.1.3 Točnost

Za određivanje točnosti mjerenja korištena je metoda standardnog dodatka. Pripremljen je uzorak kojem je izmjerena apsorbancija, nakon čega su pripremljena tri dodatna uzorka na isti način te je u svaki dodana otopina Fe standarda u koncentracijama 0,2 ppm, 0,4 ppm i 0,6 ppm. Tako pripremljenim otopinama izmjerena je apsorbancija iz čega je izračunat analitički prinos (*tablica 9*). Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa kreću se od 96,66% do 100,57% što je unutar prihvatljivih vrijednosti od 90% do 110% (Shabir, 2004.).

Tablica 9. : Analitički prinos dobiven metodom standardnog dodatka

$c_{Fe}$ u uzorku (ppm) + $c_{Fe}$ (ppm) dodanog standarda	Ukupna koncentracija $c_{total}$ (ppm)	Izmjerena koncentracija $c_{real}$ (ppm)	Koncentracija dodatka $c_{recovered}$ (ppm)	Analitički prinos (%)
0,1152 + 0,2	0,315	0,317	0,201	100,571
0,1152 + 0,4	0,515	0,498	0,387	96,661
0,1152 + 0,6	0,715	0,697	0,585	97,455

#### 4.1.4 Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) mogu se matematički izračunati iz standardne devijacije ( $\sigma$ ) i nagiba kalibracijskog pravca ( $a$ ) pomoću jednadžba (1) i (2) (Nigović i sur., 2014).

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{a} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{a} \quad (2)$$

gdje je:

- $a$  – nagib kalibracijskog pravca
- $\sigma$  – standardna devijacija

Izračunate vrijednosti LOD i LOQ iz podataka dobivenih mjerenjem:

$$LOD = 0,323 \text{ ppm}$$

$$LOQ = 0,978 \text{ ppm}$$

## 4.2 Optimizacija metode

### 4.2.1 Eksperimentalni dizajn

Kako bi odredili što bolju metodu za analizu uzorka meda sa što manje provedenih eksperimenata, koja je pritom ekonomična i pouzdana, korišten je Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn koji se temelji na metodi odzivne površine odnosno skupu statističkih i matematičkih modela kojima se analiziraju utjecaji nekoliko nezavisnih varijabli na promatrani odziv. U tablici 10 prikazani su rezultati mjerenja 17 pripremljenih uzoraka s različitim vrijednostima nezavisnih varijabli. Koncentracija željeza u uzorcima kretala se između 9,767 ppm (Run 9) do 23,843 ppm (Run 3).

Tablica 10. Sadržaj željeza u uzorcima - Box-Behnkenen dizajn

Run	Temperatura (°C) – $X_1$	Vrijeme (min) – $X_2$	Postotak kiseline (%) – $X_3$	$c_{Fe}$ (ppm)
1	20	15	30	14,945
2	60	15	30	15,964
3	20	45	30	23,843
4	60	45	30	13,973
5	20	30	20	14,503
6	60	30	20	14,221
7	20	30	40	15,342
8	60	30	40	15,881
9	40	15	20	9,767
10	40	45	20	15,558
11	40	15	40	17,200
12	40	45	40	16,991
13	40	30	30	18,543
14	40	30	30	18,067
15	40	30	30	18,254
16	40	30	30	17,861
17	40	30	30	19,067

Box-Behnken program korišten je za višestruku regresijsku analizu dobivenih eksperimentalnih podataka čime je utvrđeno da model kvadratne polinomne jednadžbe najbolje opisuje utjecaj triju parametra pripreme uzoraka na sadržaj željeza u uzorcima meda. Statistički značajni parametri označeni su crvenom bojom.

Kvadratni polinomni model prema jednadžbi:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

gdje je:

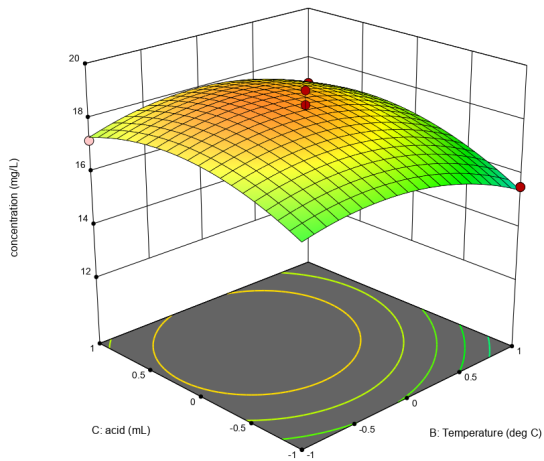
- $Y$  – odaziv
- $\beta_0$  – konstanta modela
- $\beta_1, \beta_2$  i  $\beta_3$  – linearni koeficijenti
- $\beta_{12}, \beta_{13}$  i  $\beta_{23}$  – koeficijenti člana interakcije
- $\beta_{11}, \beta_{22}$  i  $\beta_{33}$  – kvadratni koeficijenti
- $X_1, X_2, X_3$  – nezavisne varijable

***Kvadratna polinomna jednadžba:***

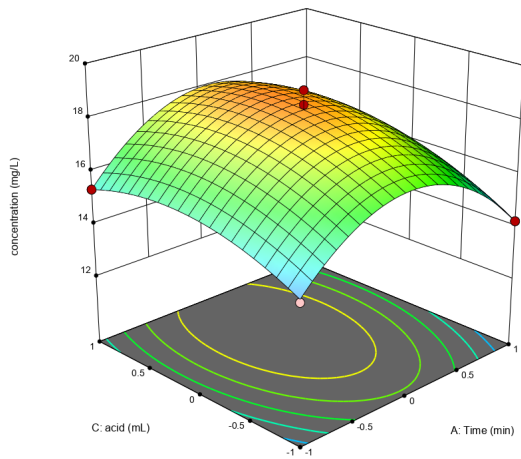
$$c \text{ (mg/mL)} = -2,46908 \times X_1^2 - 0,867075 \times X_2^2 - 0,902575 \times X_3^2 + 0,005250 \times X_1 - 0,373250 \times X_2 + 0,56575 \times X_3 - 0,56325 \times X_1 \times X_2 + 0,20525 \times X_1 \times X_3 + 0,20975 \times X_2 \times X_3 + 18,3584$$

Analizom ovog polinomnog modela može se zaključiti da je udio kiseline statistički najznačajniji parametar i opisan je kvadratnim i linearnim faktorom. Drugi značajni faktori uključuju kvadratne faktore temperature i vremena soniciranja.

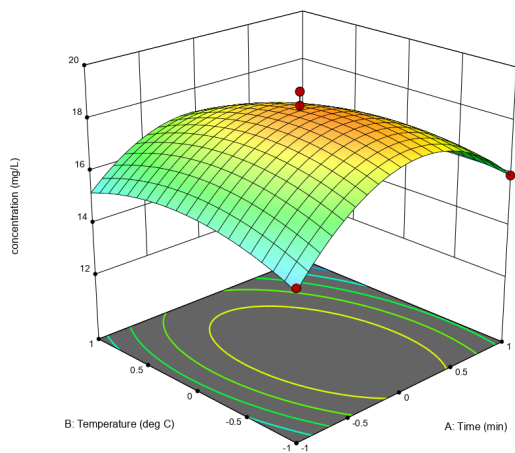
Uz pomoć dobivene matematičke funkcije konstruirani su trodimenzionalni grafički prikazi odzivne površine na kojima se jasno vidi utjecaj dviju nezavisnih varijabla na koncentraciju željeza. Konstruirana su tri takva prikaza gdje je jedna nezavisna varijabla fiksna, a uzete su vrijednosti ostalih dviju nezavisnih varijabli.



*Slika 9. Odzivna površina koncentracije Fe u ovisnosti o udjelu kiseline i temperature*



*Slika 10. Odzivna površina koncentracije Fe u ovisnosti o udjelu kiseline i vremena soniciranja*



*Slika 11. Odzivna površina koncentracije Fe u ovisnosti o vremenu soniciranja i temperature*

Kako bi se potvrdila valjanost modela napravljena je analiza varijance (ANOVA).  $P$ -vrijednost  $< 0,05$  i  $F$ -vrijednost  $22,34$  ukazuju na to da je model značajan, dok  $F$ -vrijednost prikladnosti podudaranja koja iznosi  $0,38$  nije značajna u odnosu na čistu pogrešku. Koeficijent determinacije ( $r^2$ ) iznosi  $r^2 > 0,9757$  što ukazuje na to da je model reprezentativan.

Tablica 11: Analiza varijancije (ANOVA) za kvadratne modele optimizacije

Izvor	SS	df	MS	$F$ -vrijednost	$P$ -vrijednost
Model	38,72	9	4,30	22,34	0,0016
Prikladnost podudaranja	0,0835	1	0,0835	0,38	0,7549
Čista pogreška	0,8794	4	0,2199		

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

Cilj ove optimizacije bio je pronaći pouzdanu metodu uz prihvatljive ekonomske uvjete i vrijeme provedbe eksperimenta. Vidljivo je da udio kiseline ima najveći utjecaj na koncentraciju te su najbolji rezultati analize pri razini 0, odnosno udjelu kiseline od 30% te je upravo taj postotak kiseline korišten u daljnjoj analizi ostalih uzoraka. Nadalje optimalna temperatura i duljina soniciranja također daju optimalne vrijednosti pri razini 0, stoga su uzorci za daljnju analizu pripremljeni soniciranjem 30 min na temperaturi od  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



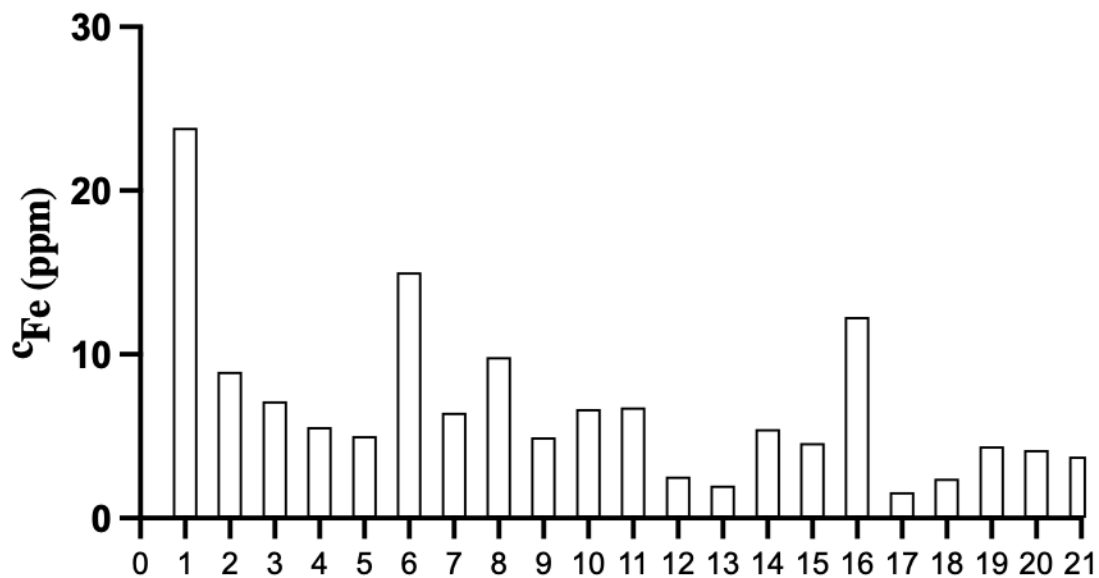
### 4.3 Određivanje koncentracije željeza u uzorcima cvjetnog meda

Nakon optimizacije i validacije analitičke metode uzorci su analizirani na atomskom apsorpcijskom spektrometru. Ukupno je analizirano 21 različitih uzoraka meda s različitih područja Hrvatske. Rezultati analize prikazani su u *tablici 12*.

*Tablica 12. Sadržaj željeza u ispitanim uzorcima meda*

Broj uzorka	Porijeklo	Koncentracija željeza (ppm)
1	Lekenik, Sisačko-moslavačka županija, Hrvatska	23,828
2	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija, Hrvatska	8,936
3	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija, Hrvatska	7,134
4	Križevci, Koprivničko-križevačka županija, Hrvatska	5,572
5	Grad Zagreb, Hrvatska	5,003
6	Pisarovina, Zagrebačka županija, Hrvatska	15,006
7	Đakovo, Osječko-baranjska županija, Hrvatska	6,448
8	Hrvatska i Kina	9,850
9	Orle, Zagrebačka županija, Hrvatska	4,947
10	Novska, Sisačko-Moslavačka županija, Hrvatska	6,650
11	Žumberak, Zagrebačka županija, Hrvatska	6,765
12	Novska, Sisačko-Moslavačka županija, Hrvatska	2,547
13	Grad Zagreb, Hrvatska	1,992
14	Grad Zagreb, Hrvatska	5,450
15	Pula, Istarska županija, Hrvatska	4,587
16	Ludbreg, Varaždinska županija, Hrvatska	12,276
17	Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija, Hrvatska	1,581
18	Kloštar Podravski, Koprivničko-Križevačka županija, Hrvatska	2,414
19	Hrvatska	4,389
20	Daruvar, Bjelovarsko-bilogorska županija, Hrvatska	4,150
21	Hrvatska i zemlje van EU	3,768

Ispitana koncentracija željeza u uzorcima meda kretala se u rasponu 1,58 – 23,83 ppm što odgovara količini željeza u medu određenoj u nekim ranijim ispitivanjima gdje se sadržaj u prosjeku kretao između 1 i 15 ppm (Pawel, 2009).



Slika 12. Koncentracija željeza u ispitanim uzorcima

Analiza nije obuhvaćala dovoljan broj uzoraka kako bi se ustanovila statistički značajna razlika između industrijskih proizvođača i OPG-ova kao niti varijacije u sadržaju željeza prema teritorijalnoj raspodjeli.

Ova metoda pokazala se kao dobar spoj pouzdane, brze i ekonomski prihvatljive metode za određivanje željeza u kompleksnom uzorku meda. Neka buduća istraživanja mogla bi koristiti ovu metodu na većem broj uzoraka kako bi se utvrdile međusobne razlike u koncentraciji željeza u medu ovisno o geografskom položaju te o načinu proizvodnje.

## 5. ZAKLJUČCI

Željezo je jedno od najvažnijih elemenata zbog brojnih uloga u ljudskom organizmu. Deficiti željeza vrlo su česti u populaciju stoga je vrlo važan adekvatan unos putem hrane i suplemenata. Med sa svojim kompleksnim matriksom predstavlja vrlo zahtjevan uzorak za analizu vitamina i minerala.

Atomska apsorpcijska spektrometrija pokazala se kao dobra metoda za određivanje željeza u medu. Validacijom metode potvrđena je preciznost, točnost, linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja metode. Korištenjem Box-Behnkenovog dizajna određeni su optimalni uvjeti pripreme uzoraka meda u svrhu određivanja sadržaja željeza koji uključuju optimalan udio perklorne kiseline, temperaturu i vrijeme soniciranja. Rezultati optimizacije pokazali su da je udio kiseline najznačajniji faktor u pripremi uzoraka meda za određivanje sadržaja željeza. Optimizirana metoda je brza i jeftina te uključuje jednostavnu pripremu uzorka što ju čini primjenjivom za ispitivanja većeg broja uzoraka. Dobiveni rezultati sadržaja željeza u skladu su s ranije provedenim istraživanjima.

## 6. LITERATURA

Abeshu MA, Geleta B. Medicinal Uses of Honey. *Biol Med*, 2016, 8, 279.

Ajibola A, Chamunorwa JP, Erlwanger KH. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutr Metab*, 2012, 9, 61.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaliera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 2008, 76, 965-977.

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for Nutrition and Health: A Review. *J Am Coll Nutr*, 2009, 27, 677-689.

Burlando B, Cornara L. Honey in dermatology and skin care: a review. *J Cosmet Dermatol*, 2013, 12, 306-313.

Crichton RR. Iron. U: Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition. Stipanuk MH, Caudill MA, urednici, St. Louis, Elsevier, 2012, str. 801-828.

De-Melo AAM, Ligia BAM, Sancho MT, Pascual-Maté A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J Apic Res*, 2018, 57, 5-37.

Dietary reference Values for EU, 2019., <http://www.efsa.europa.eu>, pristupljeno 4.02.2021.

Gobin I, Crnković G, Magdalenić M, Begić G, Babić A, Lušić D, Vučković D. Antibacterial potential of Croatian honey against antibiotic resistant pathogenic bacteria. *Med Glas*, 2018, 15, 139-144.

Harris DC. Quality Assurance and Calibration Methods. U: Quantitative Chemical Analysis, 8<sup>th</sup> edition. New York, W. H. Freeman and Company, 2010, str. 96-117.

Harris DC. Atomic Spectroscopy. U: Quantitative Chemical Analysis, 8<sup>th</sup> edition. New York, W. H. Freeman and Company, 2010, str. 479-501.

Liguori I, Russo G, Curcio F. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 2018, 13, 757-772.

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

Pawel P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC*, 2009, 28, 117-128.

Polin V, Coriat R, Perkins G, Dhooge M, Abitbol V, Leblanc S, Prat F, Chaussade S. Iron deficiency: from diagnosis to treatment. *Dig Liver Dis*, 2013, 45, 803-809.

Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Res*, 2017, 9, 121-127.

Shabir G. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *J Valid Technol*, 2004, 10, 314-324.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentals of analytical chemistry, 9<sup>th</sup> edition, Belmont, Brooks/Cole, 2014, str. 773-802.

Strain JJ, Cashman KD. Minerals and Trace Elements. U: Introduction to Human Nutrition 2<sup>nd</sup> Edition. Gibney MJ, Lanham-New SA, Cassidy A, Vorster HH, urednici, United Kingdom, Wiley-Blackwell, 2009, str. 188-138.

Validation of Analytical Procedures, 1995., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 4.02.2021.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2012, str. 138-152.

## 7. SAŽETAK/ SUMMARY

Željezo je jedan od najvažnijih elemenata za ljudski organizam. Njegove biološke uloge u tijelu čovjeka su mnogobrojne. Sastavni je dio velikog broja proteina, prostetskih skupina i kofaktor mnogim enzimima. Deficit željeza je najčešći deficit minerala u globalnoj populaciji, a pogađa posebno osjetljive skupine poput djece, adolescenata i mladih žena. Med je namirnica prirodnog porijekla bogatih nutritivnih svojstva i poznata po terapijskim svojstvima. Kompleksni matriks oligosaharida čini ga zahtjevnim uzorkom za analizu vitamina i minerala. U ovom radu je pomoću Box-Behnkenovog dizajna optimizirana metoda pripreme uzorka za analizu sadržaja željeza u medu atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Višestrukom regresijskom analizom dobivena je kvadratna polinomna jednadžba koja opisuje utjecaj triju odabranih parametra (temperatura, udio kiseline i vrijeme) na sadržaj željeza u medu. Utvrđeni su optimalni parametri te je provedena analiza ukupno 21 različitih uzoraka meda. Provođenjem validacije analitičke metode utvrđeno je da metoda ima zadovoljavajuću linearnost, preciznost i točnost. Nakon analize uzoraka meda utvrđeno je da su koncentracije željeza u medu u korelaciji s rezultatima iz prethodnih istraživanja te da nema statistički značajne razlike između meda različitog geografskog porijekla.

Iron is one of the most important elements for the human body. Its biological roles in the human body are numerous. Iron is an integral part of many proteins, prosthetic groups, and a cofactor to many enzymes. Iron deficiency is the most common mineral deficiency in the global population, and affects particularly vulnerable groups such as children, adolescents, and young women. Honey is a food substance of natural origin with rich nutritional properties and known for its therapeutic properties. The complex matrix of oligosaccharides makes it a demanding sample for vitamin and mineral analysis. In this paper, the method of sample preparation for the analysis of iron content in honey by atomic absorption spectrometry was optimized using the Box-Behnken design. Multiple regression analysis yielded a quadratic polynomial equation describing the influence of three selected parameters (temperature, acid content and time) on the iron content in honey. Optimal parameters were determined and a total of 21 different honey samples were analyzed. The validation of the analytical method determined that the method has satisfactory linearity, precision, and accuracy. After the analysis of honey samples, it was found that the iron concentrations in honey correlated with the results from previous studies and that there was no statistically significant difference between honey of different geographical origin.

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



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA METODE ODREĐIVANJA ŽELJEZA U MEDU ATOMSKOM APSORPCIJSKOM SPEKTROMETRIJOM

Valentina Vičić

#### SAŽETAK

Željezo je jedan od najvažnijih elemenata za ljudski organizam. Njegove biološke uloge u tijelu čovjeka su mnogobrojne. Sastavni je dio velikog broja proteina, prostetskih skupina i kofaktor mnogim enzimima. Deficit željeza je najčešći deficit minerala u globalnoj populaciji, a pogađa posebno osjetljive skupine poput djece, adolescenata i mladih žena. Med je namirnica prirodnog porijekla bogatih nutritivnih svojstva i poznata po terapijskim svojstvima. Kompleksni matriks oligosaharida čini ga zahtjevnim uzorkom za analizu vitamina i minerala. U ovom radu je pomoću Box-Behnkenovog dizajna optimizirana metoda pripreme uzorka za analizu sadržaja željeza u medu atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Višestrukom regresijskom analizom dobivena je kvadratna polinomna jednadžba koja opisuje utjecaj triju odabranih parametara (temperatura, udio kiseline i vrijeme) na sadržaj željeza u medu. Utvrđeni su optimalni parametri te je provedena analiza ukupno 21 različitih uzoraka meda. Ispitivanjem validacijskih parametara utvrđeno je da primijenjena metoda ima zadovoljavajuću linearnost, preciznost i točnost. Nakon analize uzoraka meda utvrđeno je da su koncentracije željeza u medu u korelaciji s rezultatima iz prethodnih istraživanja te da nema statistički značajne razlike između meda različitog geografskog porijekla.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 12 grafičkih prikaza, 12 tablica i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: željezo, med, atomska apsorpcijska spektrometrija, validacija analitičke metode, Box-Behnken

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: lipanj 2021.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### METHOD OPTIMIZATION FOR DETERMINATION OF IRON IN HONEY BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

Valentina Vičić

#### SUMMARY

Iron is one of the most important elements for the human body. Its biological roles in the human body are numerous. Iron is an integral part of many proteins, prosthetic groups, and a cofactor for many enzymes. Iron deficiency is the most common mineral deficiency in the global population, and particularly affects vulnerable groups such as children, adolescents, and young women. Honey is a food of natural origin with rich nutritional value and known for its therapeutic properties. The complex matrix of oligosaccharides makes it a challenging sample for vitamin and mineral analysis. In this work, the method of sample preparation was optimized for the analysis of iron content in honey by atomic absorption spectrophotometry using Box-Behnken design. Multiple regression analysis yielded a quadratic polynomial equation describing the influence of three selected parameters (temperature, acid content and time) on the iron content in honey. Optimal parameters were determined and a total of 21 different honey samples were analyzed. Validation of the analytical method showed that the method has satisfactory linearity, precision, and accuracy. After the analysis of honey samples, it was found that the iron concentrations in honey correlated with the results of previous studies and there was no statistically significant difference between honeys of different geographical origin.

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

Thesis includes: 34 pages, 12 figures, 12 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: iron, honey, atomic absorption spectrometry, validation of analytical method, Box-Behnken

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: June 2021.

