

Usporedba sadržaja željeza s dvije analitičke metode u uzorcima dodataka prehrani

Raguž, Andrea

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:163:484199>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



Andrea Raguž

Usporedba sadržaja željeza s dvije analitičke metode
u uzorcima dodataka prehrani

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan na susretljivosti, dostupnosti, strpljenju, stručnoj pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi tijekom izrade diplomskog rada!
Također zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjerne podršci tijekom studija!

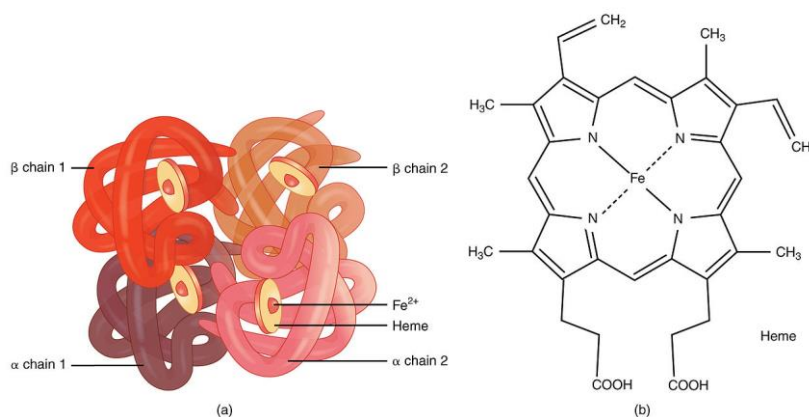
Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Uloga željeza u organizmu..... | 2 |
| 1.2. Ultraljubičasta i vidljiva sprektrofotometrija (UV-Vis) | 5 |
| 1.3. Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) | 8 |
| 1.4. Validacija analitičke metode | 11 |
| 1.4.1. Specifičnost i selektivnost | 11 |
| 1.4.2. Linearnost | 11 |
| 1.4.3. Radno područje | 12 |
| 1.4.4. Granica dokazivanja i granica određivanja | 12 |
| 1.4.5. Preciznost..... | 12 |
| 1.4.6. Točnost | 13 |
| 1.4.7. Izdržljivost | 13 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 16 |
| 3.1 Materijali | 17 |
| 3.1.1. Kemikalije..... | 17 |
| 3.1.2. Laboratorijski pribor i posuđe | 18 |
| 3.1.3. Aparatura | 19 |
| 3.2. Metode..... | 20 |
| 3.2.1. Priprema otopina za UV-Vis | 20 |
| 3.2.2. Priprema otopina za AAS | 22 |
| 3.2.3. Priprema uzoraka..... | 24 |
| 3.2.4. Statistička obrada podataka..... | 25 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 26 |
| 4.1. Validacija analitičkih metoda | 27 |
| 4.1.1. UV-Vis | 27 |
| 4.1.2. AAS | 30 |
| 4.2. Određivanje koncentracije željeza u uzorcima | 34 |
| 4.2.1. UV-Vis spektrofotometrija | 34 |
| 4.2.2. AAS | 35 |
| 5. ZAKLJUČCI | 38 |
| 6. LITERATURA | 40 |
| 7. SAŽETAK / SUMMARY | 42 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. Uloga željeza u organizmu

Željezo je prijelazni metal s vrlo važnom ulogom u ljudskom organizmu. Jedna od glavnih uloga željeza je prijenos kisika iz pluća do tkiva putem krvi i to kao sastavni dio hemoglobina u eritrocitima te je sastavni dio enzima u različitim tkivima. Zbog prisutnosti u malim količinama kao i njegove važne uloga u ljudskom organizmu, željezo pripada skupini esencijalnih elemenata u tragovima. U ljudskom tijelu je prisutno ukupno 3-5 g željeza (približno 45 mg/kg kod žena i približno 55 mg/kg kod muškaraca) od čega je 75% u krvi, a ostatak u jetri (Prashanth i sur., 2015) Većina željeza u ljudskom tijelu nalazi se u eritrocitima kao hemoglobin (Hb), odnosno kao fero oblik željeza (Fe^{2+}) u hemu (slika 1). U jednoj molekuli hemoglobina prisutne su 4 polipeptidne jedinice od kojih svaka veže prostetičnu skupinu koja sadrži hem. Hem se sastoji od tetrapiroloenskog porfirinskog prstena koji sadrži željezo kao Fe^{2+} . Svaki hem može nositi jednu molekulu kisika. Mioglobin je također važan protein u mišićima koji prenosi kisik jer u svojoj strukturi sadrži jednu hemsku skupinu u kojoj je prisutno željezo. Enzimi koji sadrže željezo u svojoj strukturi ponašaju se kao prenositelji elektrona te imaju ulogu u oksidativnom metabolizmu da prenose energiju unutar stanice, posebno u mitohondriju (WHO, 2004)



Slika 1. Struktura hemoglobina i hema (preuzeto s <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/18-3-erythrocytes>)

Željezo je pohranjeno u jetri kao feritin i hemosiderin, a prenosi se tijelom vezan na protein transferin. Transferin je β -globulin s dva vezna mjesta za feri (Fe^{3+}) željezo. Željezo je u

feritinu u topljivom obliku i kao takav se nalazi u svim stanicama, a izrazito visoke koncentracije sadrže mononuklearni fagociti jetre, slezene i koštane srži. Apoferritin je prekursor feritina koji veže Fe^{2+} , oksidira ga i pohranjuje kao Fe^{3+} u svoju šupljinu/jezgru i u tom obliku je to feritin. Hemosiderin je degradirani oblik feritina u kojem su nakupljene jezgre nekoliko molekula feritina. Koncentracija feritina u plazmi dobar je pokazatelj ukupnih zaliha željeza u organizmu jer je u ravnoteži s pohranjenim feritinom u stanicama (Božikov i sur., 2004).

U hrani životinjskog podrijetla (nemasno crveno meso, iznutrice, srdele, školjke i jaja) željezo se nalazi u hemu i kao takvo puno bolje apsorbira od željeza koje nije u hemu i pronalazimo ga u namirnicama biljnog podrijetla (grah, leća, slanutak, špinat, kupine, cikla, brokula, suhe šljive i marelice, listovi repe, integralna pšenica, ječam i orašasti plodovi). (WHO, 2004; (<https://www.dietpharm.com/blog/anemija-i-manjak-zeljeza-u-krvi/>).

Mjesto apsorpcije željeza u organizmu je dvanaesnik i proksimalni jejunum. Željezo u hrani vezano na hem apsorbira se kao cjeloviti hem, a u mukoznim stanicama se oslobađa djelovanjem hem-oksidge. Ne-hemsko željezo apsorbira se u fero obliku pa se unutar stanice oksidira u feri oblik koji se onda veže na transferin sličan protein nakon čega željezo može ostati pohranjeno u mukoznim stanicama kao feritin ako su zalihe željeza u organizmu velike ili prijeći u plazmu ako su zalihe željeza niske (Božikov i sur., 2004).

Tijelo ne može samo sintetizirati željezo pa ga je neophodno unositi hranom i suplementirati dodacima prehrani. Dodaci prehrane koji sadrže željezo često su u kombinaciji s askorbinskom kiselinom (vitamin C) koja povećava apsorpciju željeza ili u multivitaminskim kombinacijama. Fitati, oksalati, kofein, tanin i neki lijekovi (tetraciklini, penicilamin, fluorokinoloni i teobromin) smanjuju apsorpciju željeza. Preporučeni dnevni unos (engl. Recommended Daily Intake, RDI) željeza je 15 mg, a kod trudnice je povećana potreba (<https://www.dietpharm.com/blog/anemija-i-manjak-zeljeza-u-krvi/>; Millikan, 2012).

Ljudski organizam nema mogućnost aktivnog izlučivanja željeza. Neznatno male količine željeza tijelo gubi ljuštenjem mukoznih stanica koje sadrže feritin, vrlo malo putem žuči, znoja i mokraće, ukupno 1 mg na dan (Božikov i sur., 2004).

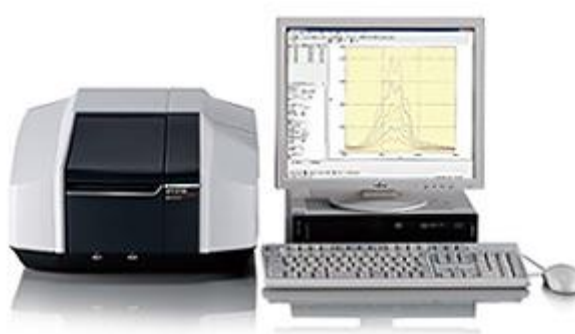
Smanjenom apsorpcijom željeza iz gastrointestinalnog trakta dolazi do njegovog nakupljanja koje za posljedicu ima mučninu, povraćanje, dijareju, kronični umor, oštećenje jetre, dijabetes, perifernu neuropatiju, kardiomiopatiju i hiperpigmentaciju (tzv. Brončani dijabetes). Do viška željeza u krvi može doći zbog učestale transfuzije krvi, prekomjerno

unos preparata željeza i bolesti jetre. Kronična toksičnost (preopterećenje željezom), poznata i pod nazivom hemokromatoza, nastaje kao posljedica odlaganja viška željeza u srcu, jetri, gušterači i drugim organima. Može uzrokovati otkazivanje organa i smrt. Osim sistemskih postoje i lokalne posljedice poremećaja homeostaze željeza. Neurološki poremećaj homeostaze željeza i odlaganje viška željeza u mozak, se veže za neurodegenerativne poremećaje kao na primjer Parkinsonovu bolest, Alzheimerovu bolest i Friedreichovu ataksiju.

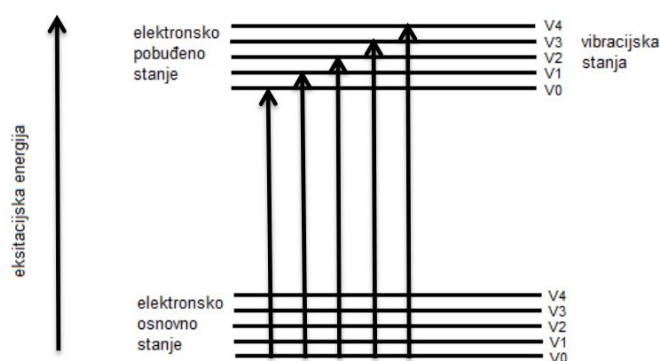
Manjak željeza je jedan od najčešćih oblika malnutricije i uzrok kronične anemije. Anemija zbog manjaka željeza najčešća je anemija u praksi. Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije >20% svjetske populacije boluje od anemije. Nastaje zbog poremećaja sinteze hemoglobina uzrokovanog nedostatnom opskrbom eritrocita željezom, bilo u slučajevima pojačanog gubitka krvi ili zbog povećanih potreba organizma za željezom (Brozović M., 2018). Uzrok mogu biti prehrana siromašna željezom, trudnoća, gastrointestinalno krvarenje, hemeroidi i dr. Simptomi vezani za nedostatak željeza ovise o trajanju i stupnju anemije, a uobičajeni su umor, bljedilo, tahikardija i slabije podnošenje fizičkih napora (<https://www.dietpharm.com/blog/anemija-i-manjak-zeljeza-u-krvi/>; Prashanth i sur., 2015; Millikan, 2012; WHO, 2004; Rang, 2006; Božikov i sur., 2004).

1.2. Ultraljubičasta i vidljiva sprektrofotometrija (UV-Vis)

UV-Vis spektrofotometrija je spektroskopska metoda koja mjeri količinu apsorbirane svjetlosti u ultraljubičastom (190-380 nm) i vidljivom području (380-800 nm). Metoda se zasniva na tome da molekule koje imaju kromofornu skupinu apsorbiraju fotone određene energije te njihovi valentni odnosno vezni elektroni prelaze iz orbitale niže u orbitalu više energije, odnosno molekule prelaze iz osnovnog elektronskog u pobuđeno elektronsko stanje. Pri tome dolazi do promjene raspodjele elektronske gustoće unutar molekule.



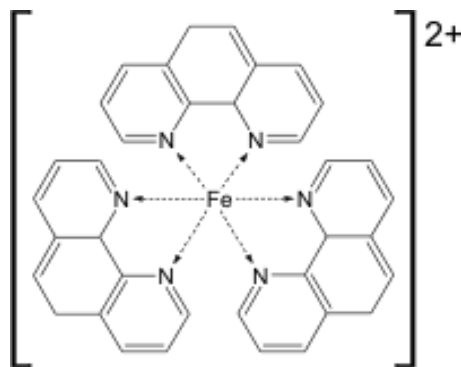
Slika 2. UV-Vis spektrofotometar (preuzeto s <https://www.shimadzu.hr/izvrsna-prilika-za-va%C5%A1-laboratorij-novi-i-demo-ure%C4%91aji-na-popustu-i-do-45>)



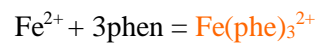
Slika 3. Prijelaz elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje (preuzeto i prilagođeno iz Watson, 1999)

Važno je da su pripremljene otopine standarda i uzoraka čije apsorbancije mjerimo, obojane jer na temelju intenziteta obojanosti prolazi određeni intenzitet svjetlosti kroz otopinu. U

slučaju određivanja željeza obojanost se postiže dodatkom 1,10-fenantrolina u ispitivane otopine. Naime, 1,10-fenantrolin sa Fe^{2+} stvara crveno-narančasti kompleks ferroin koji apsorbira svjetlost valjne duljine 510 nm. S obzirom da 1,10-fenantron reagira samo sa Fe^{2+} , potrebno je reducirati Fe^{3+} u Fe^{2+} dodatkom hidroksikinona. Za održavanje stabilnosti kompleksa ferroina, odnosno za sprječavanje oksidacije Fe^{2+} u Fe^{3+} potrebno je održati pH između 3-9 što je postignuto dodatkom Na-citrata u pripremljene otopine. Kod $\text{pH} > 9$ Fe^{2+} oksidira u Fe^{3+} , a pri $\text{pH} < 3$ H^+ se natječe s Fe^{2+} za vezno mjesto na 1,10-fenantrolinu. (Harris, 2015)



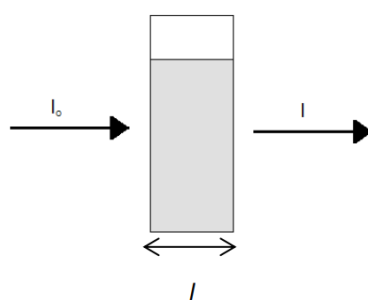
Slika 4. ferroin (Harris, 2015)



Mjerenje apsorpcije zračenja molekula u otopini odvija se prema Beer-Lambertovom zakonu:

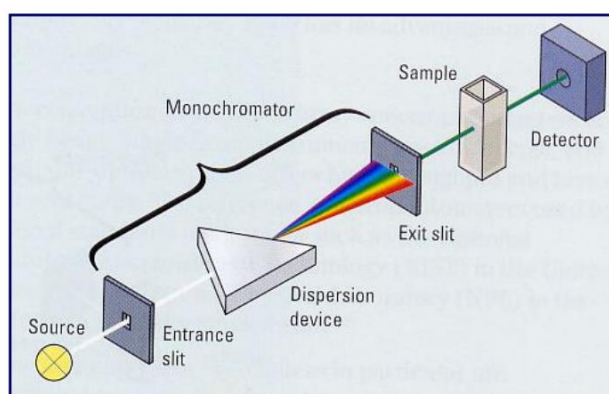
$$A = \varepsilon * c * l = \log (I_0/I)$$

gdje je A apsorpcija, I_0 intenzitet ulaznog zračenja, I intenzitet propuštenog zračenja, ε molarni koeficijent apsorpcije, c koncentracija otopine, l debljina sloja otopine, najčešće 1 cm. (Slika 5.) Dobiveni spektar prikazuje ovisnost izmjerene apsorpcije o valnoj duljini apsorbiranog zračenja.



Slika 5. Prolazak svjetlosti kroz ispitivanu otopinu u spektroskopskim mjerenjima (preuzeto i prilagođeno iz Watson, 1999)

UV-Vis spektrofotometar sastoji se od izvora zračenja, monokromatora, nosača uzorka i detektora zračenja. Izvor zračenja mogu biti vodikova (deuterijska) ili živina lampa za UV područje i volframova lampa za vidljivo područje. Monokromator je prizma ili rešetka s ulaznom i izlaznom pukotinom, koja rasprši svjetlost na valne duljine od kojih neke prolaze kroz pukotnu, rotira se tako da raspon valnih duljina prođe kroz uzorak dok instrument skenira duž spektra (Watson, 1999).



Slika 6. Dijelovi UV-Vis spektrofotometra (preuzeto s Mihoci, 2015)

UV/Vis spektrofotometrija primjenjuje se farmaceutskoj industriji, tj. u analitici lijekova za kvalitativnu i kvantitativnu analizu lijekova, određivanje fizikalno-kemijskih svojstava lijekova i za ispitivanje čistoće lijekova.

1.3. Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS)

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (engl. Atomic Absorption Spectroscopy, AAS) je spektrofotometrijska tehnika koja mjerenjem inteziteta apsorbiranog zračenja pri određenoj valnoj duljini određuje koncentraciju elementa u ispitivanoj otopini. Načelo metode je da atomi metala ispareni u plamenu obasjani frekvencijom svjetla apsorbraju zračenje i prelaze u pobuđeno stanje. Prilikom gorenja uzorka dolazi do procesa atomizacije, a nastali se atomi metala izlažu linijskom zračenju specifične valne duljine. Valna duljina apsorbiranog zračenja karakteristična je za ispitivani element, za željezo je to 248,3 nm. Količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je broju slobodnih atoma u plamenu. Vodena otopina uzorka raspršuje se u obliku fine vodene prašine i miješa s plinovitim gorivom i oksidansom koji ga unose u plamen. Otapalo ispari u osnovnom području plamena, smještenom odmah iznad plamenika. Čvrste čestice nošene su u središnji najtopliji dio plamena gdje iz njih nastaju plinoviti atomi važni za daljnji proces metode. Svaki je element specifičan i ima svojstvenu nuklearnu strukturu pa tako i elektronsku konfiguraciju. Elektroni, koji nasumice putuju u orbitama, u takozvanom elektronskom oblaku, okružuju jezgru atoma formiranu od protona i neutrona. Takav elementa je stabilan i obitava u osnovnom atomskom stanju. Dovođenjem određene količine energije, kvanta energije, moguće je pobuditi elektron, koji posljedično prelazi iz stabilnog osnovnog stanja u pobuđeno stanje. Takvo pobuđeno stanje je nestabilno i elektron će se spontanom prijelazom vratiti u osnovno stanje, pri čemu se otpušta ekvivalent prethodno apsorbirane energije (Watson, 1999).

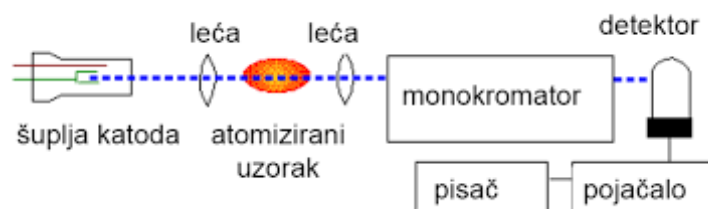


Slika 7. AAS na Zavodu za analitičku kemiju, FBF, Zagreb

U plamenu se svi elementi ioniziraju do određenog stupnja što rezultira time da u plamenu osim atoma metala su prisutni i elektroni i ioni čiji spektar je potpuno različit od spektra pripadnog atoma. Omjer koncentracija atoma i iona ovisi o temperaturi plamena te ukupnoj koncentraciji atoma i elektrona drugih prisutnih elemenata pa je zbog toga vrlo važan nadzor temperature plamena i čistoća uzorka. (White, 2009)

Prednost ove analitičke tehnike je jednostavnost, relativno niska cijena, učinkovitost i specifičnost u određivanju koncentracije oko 70-ak metalnih elemenata u ljekovitim tvarima i biološkim tekućinama što predstavlja ujedno i ograničenje jer je potrebna specifična žarulja sa šupljom katodom pri određivanju svakog elementa (Nigović, 2018).

Osnovni dijelovi atomskog apsorpcijskog spektrofotometra su: linijski izvor zračenja, generator atomske pare, monokromator, detektor i software (Watson, 1999).



Slika 8. Dijelovi AAS-a, (preuzeto iz Welz, Sperling, 1996.)

Ispitivane otopine se aspiriraju pomoću plastične cjevčice tako da se cjevčica uroni u otopinu pri čemu uređaj automatski kontinuirano usisava otopinu. Budući da uređaj omogućuje višestruko uzastopno mjerenje i analizu istog homogenog uzorka u kratkom periodu, temeljem unaprijed obavljenog podešavanja, provode se 3 mjerenja te izračunava prosječna vrijednost. Gumena cjevčica se prije svakog mjerenja ispire aspiracijom 2% HNO₃ i ultračistom vodom.

Najčešći izvor zračenja u AAS-u je žarulja sa šupljom katodom koja se sastoji od volframove anode i cilindrične katode (prevučene metalom koji se analizira) koje su zataljene u staklenu cijev punjenu inertnim plinom, najčešće argonom, pri tlaku od 100 – 600 kPa. Upotrebom potencijala od 300V na elektrodama dolazi do ionizacije argona čiji elektroni putuju prema anodi, a kationi prema katodi gdje, uz dovoljno visok potencijal, izbijaju metale s površine u atomski oblak gdje prelaze u pobuđeno stanje. Vraćanjem 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 žarulje. Za svaki analizirani metal

potreba je specifična žarulja sa šupljom katodom prevučenom metalom koji se analizira (White, 2009; Watson, 1999).

Generator atomske pare je sistem za uvođenje ispitvane otopine i propisane smjese plinova u plamen (Nigović, 2018). Karakteriziran je time da se uzorak raspršuje protokom oksidansa u aerosol koji se miješa s gorivom. Najčešće korišteno gorivo je smjesa zraka i acetilena s temperaturom plamena 2300 K, a dušikov oksid-acetilen proizvodi topliji plamen s temperaturom blizu 2900 K (White, 2009).

Monokromator odabire usku vrpca zračenja koje emitira žarulja sa šupljom katodom, na valnoj duljini na kojoj apsorbiraju analizirani atomi u plamenu (Nigović, 2018). Postavljen između plamena i detektora uklanja većinu interferencija (Watson, 1999).

U detektoru se svjetlosna energija pretvara u električni signal koji se pojačava i registrira. Software instrumenta prevodi intenzitet zračenja u koncentraciju metala u uzorku (Watson, 1999.).

Atomska apsorpcijska spektroskopija koristi se u farmaceutskoj analitici za ispitivanje čistoće utvrđivanjem graničnih vrijednosti onečišćenja metalima i kvantitativno određivanje sadržaja metala (Nigović, 2018).

1.4. Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu. Validacija osigurava da će se u propisanim uvjetima primjenom validirane metode dobiti valjani rezultati. Prema regulatornim zahtjevima dobre proizvođačke i laboratorijske prakse (GMP i GLP) postupci validacije analitičkih postupaka postali su obveza i provodi se prema ICH smjernicama (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for human use, članak Q2) Potrebno ju je provesti pri razvoju i uvođenju nove metode te kod promjene bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode. Analitički parametri koji se određuju u postupku validacije su: točnost, preciznost, selektivnost/specifičnost, granica dokazivanja LOD, granica određivanja LOQ, linearnost, radno područje i izdržljivost (Ahuja, 2001).

1.4.1. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost se definira kao sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje jedan analit od ostalih komponenti prisutnih u uzorku, a selektivnost je mogućnost metode da može točno odrediti željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka (Ahuja, 2001; Watson, 1999). Pritom se najvišim stupnjem selektivnosti smatra specifičnost. Metode se mogu opisati kao više ili manje selektivne, dok specifičnost govori o tome je li analit prisutan ili nije. Specifični postupci su oni kojima ne smeta prisustvo drugih komponenti u uzorku dok kod selektivnih postupaka nije moguće dokazati samo jedan analit (Peters i Maurer, 2002).

1.4.2. Linearnost

Linearnost je sposobnost analitičke metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Određuje se na način da se napravi koncentracijski niz standardnih otopina analita te se izvrši 3-6 određivanja za najmanje 5 koncentracija. Tako se dobiva kalibracijska krivulja ili graf ovisnosti izmjenog analitičkog signala o koncentraciji analita. Kalibracijska krivulja karakterizirana je jednadžbom pravca $y = ax + b$ i koeficijentom korelacije regresijskog pravca koji treba iznositi $R^2 > 0,999$ (Watson, 1999).

1.4.3. Radno područje

Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracije analita u kojem analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost. Preporučeno radno područje za određivanje sadržaja aktivne tvari je 80-120 % (Ahuja, 2001). UV detektor ima dinamičano radno područje od oko 10^3 i za određeni analit može izmjeriti koncentraciju između 0,1 i 100 $\mu\text{g/mL}$. Za usporedbu, plameni fotometar ima radno područje ne puno veće od 10^1 . Koncentracije uzoraka moraju biti prilagođene tako da ulaze u radno područje opreme koja se koristi za mjerenje (Watson, 1999).

1.4.4. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja je najniža koncentracija analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena, pri zadanim uvjetima metode, a granica određivanja je najniža koncentracija koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. Određuju se razrijeđenjem ispitivane otopine te se uspoređuju signali uzroka poznatih niskih koncentracija sa signalom slijepog uzorka.

Granica dokazivanja (engl. limit of detection, LOD) i granica određivanja (engl. limit of quantitation, LOQ) definirane su formulom:

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

gdje je SD standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca, dok je a nagib kkalibracijskog pravca (Watson, 1999).

1.4.5. Preciznost

Preciznost ili pouzdanost metode je sposobnost metode da pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja koja su dobivena višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Potrebno je izvršiti 5–6 određivanja za 2–3 koncentracije, a iskazuje se kao relativna standardna devijacija RSD (%) definirana formulom:

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

pri čemu je SD standardna devijacija, a \bar{X} srednja vrijednost dobivenih rezultata. Razlikuju se tri načina iskazivanja preciznosti: ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost ili preciznost u seriji (engl. repeatability) govori o podudaranju rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka, istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument, reagens, jedan laboratorij u kratkom vremenskom periodu). Srednja preciznost ili preciznost iz dana u dan (engl. intermediate precision) predstavlja odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka, istom metodom pod različitim uvjetima (različiti analitičar, instrument, reagensi različitih dobavljača) u istom laboratoriju kroz duži vremenski period. Preciznost u seriji je obično veća od preciznosti iz dana u dan. Obnovljivost (engl. reproducibility) je definirana kao podudaranje rezultata uzastopnim mjerenjem istih uzoraka istom metodom, ali u različitim laboratorijima (Peters i Maurer, 2002).

1.4.6. Točnost

Točnost pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Analizira se uzorak poznate koncentracije te se uspoređuju izmjerene i stvarne vrijednosti. Točnost metode pokazuje sustavne pogreške te se treba stalno ispitivati i kontrolirati u laboratoriju s obzirom na veliki broj čimbenika koji mogu utjecati: pogreške instrumenta u radu, u radu analitičara, ispravnost i čistoća pribora, kvaliteta standarda korištenog u kalibraciji te drugi. Utvrđuje se kroz najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Ispituje se određivanjem analitičkog prinosa ili postotka postignutog rezultata (engl. Recovery) prema formuli:

$$R = \frac{\bar{x}}{x} * 100$$

gdje je \bar{x} srednja izmjerena vrijednost, a x je stvarna vrijednost analita u uzorku (Watson, 1999).

1.4.7. Izdržljivost

Izdržljivost metode predstavlja mjeru njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Procjenjuje se variranjem jednog parametra dok ostali ostaju nepromijenjeni. Izbor parametra ovisi o metodi. Važan je indikator pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode ispitivanja. (ICH, 2005)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Željezo je prijelazni metal s vrlo važnom ulogom u ljudskom organizmu, prenosi kisik iz pluća do tkiva putem krvi kao sastavni dio hemoglobina u eritrocitima te je sastavni dio enzima u različitim tkivima. Usljed prisutnosti u malim količinama kao i njegove važne uloge u ljudskom organizmu, željezo spada u skupinu esencijalnih elemenata u tragovima. Kako ljudski organizam ne može sam sintetizirati željezo neophodno ga je unositi hranom ili dodatno u obliku dodataka prehrani. Dodaci prehrane koji sadrže željezo često dolaze su kombinaciji s askorbinskom kiselinom (vitamin C) koja povećava apsorpciju željeza ili u različitim multivitaminskim kombinacijama.

Današnje tržište sadrži mnogobrojne vitaminske dodatke prehrani koji uglavnom ne podliježu strogim kontrolama kvalitete kao lijekovi. Zbog zdravstvene ispravnosti takvih pripravaka važno je provoditi i kontrolu kvalitete takvih pripravaka.

Prvi cilj ovog rada bio je validacija dvije analitičke metode, atomske apsorpcijske spektroskopije i UV-Vis spektroskopije za kvantitativnu analizu dodataka prehrani koji u sebi sadrže željezo. Drugi cilj bio je primjena validiranih metoda za određivanje sadržaja željeza u ispitivanim uzorcima dodataka prehrani. Usporedbom dobivenih rezultata zaključilo se o preciznosti i točnosti primjenjenih metoda u svrhu određivanja sadržaja željeza.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Standardna otopina Fe za AAS, koncentracije 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Sigma, Aldrich, Njemačka)
- 65%-tna HNO_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm^{-1} pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, SAD)
- 6M HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- amonij-željezo (II) sulfat-6 hidrat, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 98% H_2SO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- stock otopina željeza (Fe^{2+}), 0,04 $\mu\text{g Fe}/\text{mL}$
- hidrokinon (Honeywell Fluka™, Njemačka)
- Etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 1,10-phenanthroline (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Na-citrat x 2 H_2O (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Sve korištene kemikalije bile su pro analysi čistoće

3.1.2. Laboratorijski pribor i posuđe

- plastična lađica
- špatula, žličica
- odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100, 500 i 1000 mL
- laboratorijske čaše volumena 100, 200 i 500 mL
- stakleni štapić
- staklene graduirane pipete volumena 1, 2, 5 i 10 mL
- propipeta
- mikropipete Rainin pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS, L-20 LTS i L-200

LTS (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)

- nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- plastične epruvete od 10 mL i 50 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- lijevak
- filter papir Whatman no. 42 (GE Healthcare, Life Science, China)
- plastične kapaljke
- grijača ploča Cimarec 2 (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa, SAD)
- staklene kivete
- celulozni nitratni membranski filteri za filtraciju uzoraka veličine pora 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- plastična šprica
- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Švicarska)

3.1.3. Aparatura

Atomsko absorpcijski spektrofotometer AAnalyst 800 (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) kojeg karakterizira:

- žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
- valna duljina (nm): 248,3
- gorivo/oksidans: acetilen/zrak
- acetilen (tlak (Pa)/protok ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$): $0,9 \times 10^5/2$
- zrak (tlak (Pa)/protok ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$): $5,5 \times 10^5/17$
- širina pukotine (nm): 0,2
- korekcija nespecifične absorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- fotodetektor
- pisac, računalo: AA Winlab 32 Software Dell OptiPlex GX270, računalo + monitor + printer HP 5652

UV-Vis

- UV-Vis spektrofotometer (Agilent 8453, SAD)
- valna duljina (nm): 510

3.2. Metode

3.2.1. Priprema otopina za UV-Vis

Stock otopina željeza (Fe^{2+}): $0,04 \mu\text{g Fe/mL}$

Stock otopina željeza pripravljena je otapanjem $0,2805 \text{ g}$ amonij-željezo (II) sulfat-6 hidrata u odmjernoj tikvici od 1000 mL . U tikvicu se stavi $0,2805 \text{ g}$ amonij-željezo (II) sulfat-6 hidrata, zatim se doda 1 mL $98\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Ova otopina korištena je za pripremu standardnih otopina.

1%-tna otopina hidrokinona

1%-tna otopina hidrokinona pripravljena je otapanjem $1,001 \text{ g}$ hidrokinona u odmjernoj tikvici od 100 mL . U tikvicu se stavi $1,001 \text{ g}$ hidrokinona te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Ova otopina korištena je za pripremu standardnih otopina i otopina uzoraka.

Otopina fenantrolina

Otopina fenantrolina pripravljena je otapanjem $1,2501 \text{ g}$ 1,10-fenantrolina u odmjernoj tikvici od 500 mL . U tikvicu se stavi $1,2501 \text{ g}$ 1,10-fenantrolina zatim se doda 50 mL etanola te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Ova otopina korištena je za pripremu standardnih otopina i otopina uzoraka.

Otopina Na-citrata

Otopina Na-citrata pripravljena je otapanjem $2,5002 \text{ g}$ Na-citrata $\times 2\text{H}_2\text{O}$ u odmjernoj tikvici od 100 mL . U tikvicu se stavi $2,5002 \text{ g}$ Na-citrata $\times 2\text{H}_2\text{O}$ te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Ova otopina korištena je za pripremu standardnih otopina i otopina uzoraka.



Slika 9. Pripremljene otopine Na-citrata, fenantrolina, hidrokinona i stock otopine željeza

Priprema radnih otopina za UV-Vis

Iz pripremljenih otopina napravljena su serijska razrjeđenja u odgovarajućim rasponima koncentracija s ultra čistom vodom. Tako pripremljene standardne otopine korištene su za izradu baždarnih pravaca.

Standardne otopine su pripremljene u odmjernim tikvicama od 100 mL razrjeđivanjem različitih volumena stock otopine željeza (0, 1, 2, 5, 7,10 mL) s 8 mL otopine Na-citrata, 2 mL otopine hidrokinona, 3 mL otopine fenantrolina te nadopunjavanjem do oznake s ultračistom vodom.

Izrada je prikazana u tablici 1, a izrađeni niz otopina na slici 10.



Slika 10. Niz standardnih otopina željeza, s desne strane prema lijevoj u koncentraciji 0; 0,4; 0,8; 2; 2,8 i 4 ppm

Tablica 1. Koncentracije i priprema standardnih otopina željeza za izradu baždarnog pravca metodom UV-Vis

| Koncentracija Fe u standardnoj otopini (ppm) | Volumen (mL) stock otopine Fe, 0,04 μg Fe/mL | Volumen otopine Na-citrata (mL) | Volumen otopine hidrokinona (mL) | Volumen otopine fenantrolina (mL) | Volumen dodane ultračiste vode (mL) | Ukupan volumen standarde otopine Fe (mL) |
|--|---|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| 0 | 0 | 8 | 2 | 3 | 87 | 100 |
| 0,4 | 1 | 8 | 2 | 3 | 86 | 100 |
| 0,8 | 2 | 8 | 2 | 3 | 85 | 100 |
| 2,0 | 5 | 8 | 2 | 3 | 82 | 100 |
| 2,8 | 7 | 8 | 2 | 3 | 80 | 100 |
| 4,0 | 10 | 8 | 2 | 3 | 77 | 100 |

3.2.2. Priprema otopina za AAS

Priprema 2% HNO₃

2% otopina HNO₃ pripremljena je razrjeđivanjem 20 mL koncentrirane HNO₃ u odmjernoj tikvici od 1000 mL. U tikvicu se stavi dio ultračiste vode, zatim se doda 20 mL koncentrirane HNO₃ te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Ova otopina korištena je za ispiranje instrumenta.

Stock otopina željeza koncentracije 100 µL/mL

Stock otopina željeza pripremljena je razrjeđivanjem 5 mL standardne otopine Fe za AAS koncentracije 1000 µL/mL u odmjernoj tikvici od 50 mL. U tikvicu se stavi 5 mL standardne otopine Fe te nadopuni ultračistom vodom do oznake. Ova otopina korištena je za pripremu standardnih otopina.

Radne otopine za AAS

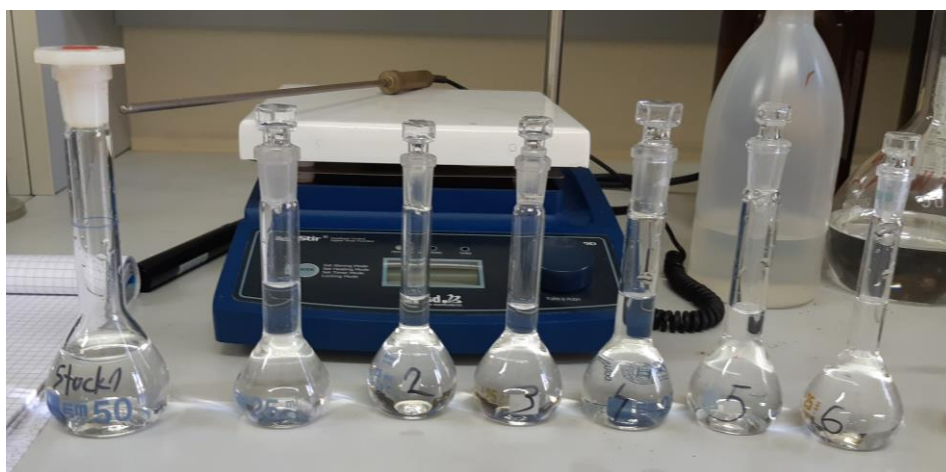
Iz matične otopine za Fe koncentracije 1000 µg/mL napravljena je stock otopine željeza koncentracije 100 µg/mL. Iz ovako pripremljene otopine napravljena su serijska razrjeđenja standarda u odgovarajućim rasponima koncentracija s ultra čistom vodom. Tako pripremljene standardne otopine korištene su za izradu baždarnih pravaca.

Standardne otopine pripremljene su u odmjernim tikvicama od 25 mL razrjeđivanjem različitih volumena stock otopine željeza koncentracije 100 µg/mL (0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 3,75; 5mL) s ultračistom vodom nadopunjavanjem do oznake.

Izrada je prikazana u tablici 2, a izrađeni niz otopina na slici 11.

Tablica 2. Koncentracije i priprema standardnih otopina željeza za izradu baždarnog pravca metodom AAS

| Koncentracija Fe u standardnoj otopini ($\mu\text{g/mL}$) | Volumen stock otopine Fe (mL) | Volumen dodane ultračiste vode (mL) | Ukupan volumen standarde otopine Fe (mL) |
|---|-------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1 | 0,25 | 24,75 | 25 |
| 2 | 0,50 | 24,50 | 25 |
| 5 | 1,25 | 23,75 | 25 |
| 10 | 2,50 | 22,50 | 25 |
| 15 | 3,75 | 21,25 | 25 |
| 20 | 5,00 | 20,00 | 25 |



Slika 11. Stock otopina željeza koncentracije $100 \mu\text{L/mL}$ i niz standardnih otopina željeza u koncentracijama s lijeva na desno 1, 2, 5, 10, 15 i $20 \mu\text{g/mL}$

3.2.3. Priprema uzoraka

U staklenu čašu od 100 mL stavi se izvagana tableta uzorka (odvaga₁=4,4082 g, odvaga₂=4,9328 g) koja se prelije s 25 mL 6M HCl. Nakon 10 min tako pripremljen uzorak se grije 15 min na električnoj grijalici uz miješanje. Ohlađena otopina se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni s ultračistom vodom do oznake. 10 mL tako pripremljene otopine uzorka prenese se u čistu odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti do oznake s ultračistom vodom.

Navedeni postupak pripreme uzorka isti je za obje metode i za sve analizirane uzorke.

Priprema otopine uzorka za mjerenje na UV-Vis

10 mL prethodno pripremljene otopine uzorka prenese se u čistu odmjernu tikvicu od 100 mL te doda 8 mL otopine Na-citrata, 2 mL otopine hidrokinona, 3 mL otopine fenantrolina i nadopuni do oznake s ultračistom vodom.

Priprema otopine uzorka za mjerenje na AAS

Pripremljena otopina uzorka se prije analize filtrirati kroz filtar veličine pora 0,45 µm.

Priprema uzoraka sa standardnim dodatkom otopine željeza poznate koncentracije

a) UV-Vis

Uzorak br. 1

U svaku od 3 odmjerne tikvice od 50 mL označene kao A, B i C, dodano je po 10 mL uzorka. U tikvicu A zatim je dodano 2 mL, u tikvicu B 5 mL i u tikvicu C 7,5 mL standardnog dodatka željeza koncentracije 0,04 mg/L da bi konačna koncentracije otopina u tikvicama bile 2 mg/L, 4 mg/L i 6 mg/L. Tikvice se na kraju dopune do oznake ultračistom vodom te se provodi mjerenje.

b) AAS

uzorak br.1

U svaku od 3 odmjerne tikvice od 10 mL označene kao A, B i C dodano je po 1 mL uzorka. U tikvicu A zatim je dodano 0,2 mL, u tikvicu B 0,4 mL i u tikvicu C 0,6 mL standardnog dodatka željeza koncentracije 100 µg/mL da bi konačna koncentracije otopina u tikvicama bile 2 mg/L, 4 mg/L i 6 mg/L. Tikvice se na kraju dopune do oznake ultračistom vodom te se provodi mjerenje.

3.2.4. 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).

4. REZULTATI I RASPRAVA

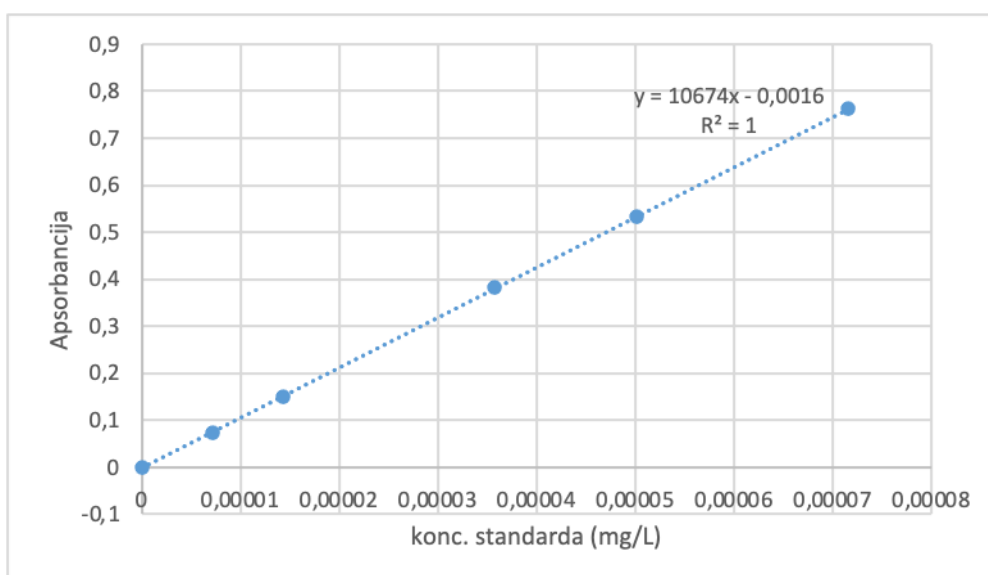
4.1. Validacija analitičkih metoda

U prikupljenim uzorcima analiziran je sadržaj željeza metodom atomske apsorpcijske spektroskopije i UV-Vis spektroskopijom, koji su opisani u poglavlju materijali i metode. Ispitivani su validacijski parametri metoda kao što su linearnost, preciznost, granica dokazivanja i granica određivanja te točnost. Nakon što su metode validirane određen je sadržaj željeza u uzorcima dodataka prehrane i dobivene vrijednosti uspoređene su s deklariranim.

4.1.1. UV-Vis

Linearnost

Mjerenjem apsorbancije standardnog niza otopina različitih koncentracija željeza (tablica 1, slika 10, poglavlje 3.2.1.) izrađena je kalibracijska krivulja koja grafički prikazuje ovisnost signala, odnosno apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji željeza. Na temelju kalibracijske krivulje se onda određuju koncentracije željeza u uzorcima. Linearnost je izražena koeficijentom korelacije regresijskog pravca, R^2 .

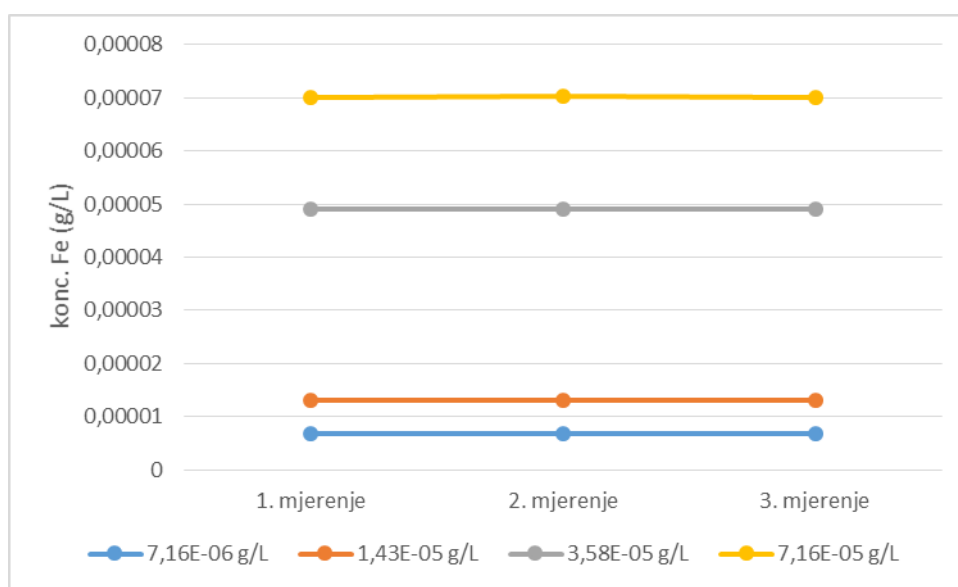


Slika 12. Kalibracijska krivulja, graf ovisnosti apsorbancije o koncentraciji željeza na valnoj duljini 510nm

Dobivena jednađba pravca kalibracijske krivulje je $y=10674x-0,0016$ s koeficijentom korelacije $R^2=1$. Temeljem dobivenih rezultata zaključujemo da je analitička metoda linearna i primjerena za određivanje koncentracije željeza u ispitivanim uzorcima.

Preciznost

Ponovljivost analitičke metode ispitana je mjerenjem tri puta 4 različite koncentracije standardnih otopina i dobivene vrijednosti prikazuju ponovljivost u danu. Ponovljivost mjerenja u danu prikazana je slikom 13.

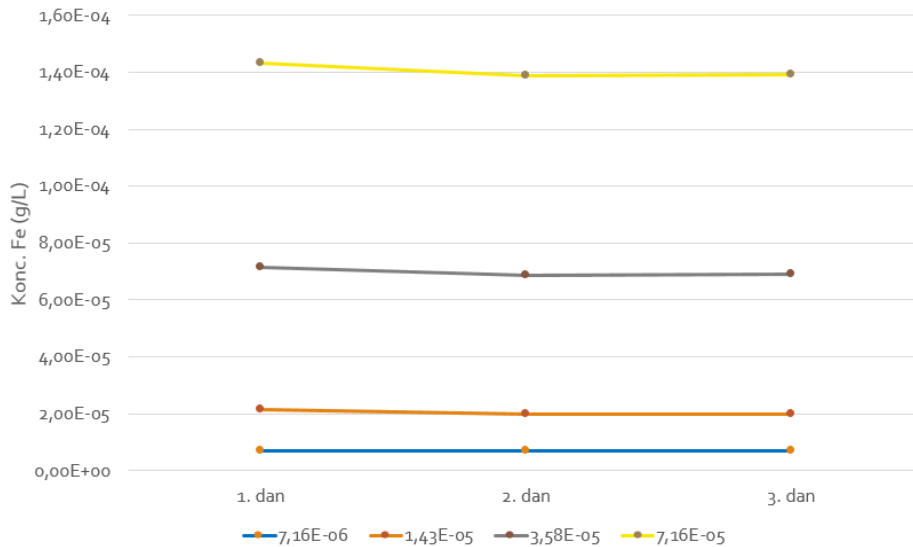


Slika 13. Grafički prikaz ponovljivosti u danu

Dobivene vrijednosti za ponovljivost u danu izražene kao RSD su u prihvatljivim granicama (0,054-0,426 %) što ukazuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode.

Ponovljivost iz dana u dan

Ponovljivost iz dana u dan izražava se kao srednja preciznost provođenjem mjerenja za 4 različite koncentracije standardne otopine 3 dana zaredom, a rezultati se iskazuju se kao relativna standardna devijacija RSD (%).



Slika 14. Grafički prikaz ponovljivosti kroz 3 dana

Dobivene vrijednosti za ponovljivost u danu izražene kao RSD su u prihvatljivim granicama (1,29-5,37 %) što ukazuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode.

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ)

Standardna devijacija SD iznosila je 0,0013; a nagib regresijskog pravca je 10673,83. Prema formulama opisanim u uvodnom poglavlju (poglavlje 1.4.) izračunate su granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) te su njihove vrijednosti iznosile

$$\text{LOD} = 4,16 \cdot 10^{-7} \text{ g/L}$$

$$\text{LOQ} = 1,26 \cdot 10^{-6} \text{ g/L}$$

Točnost

Mjerenjem koncentracije uzorka sa standardnim dodatkom otopine željeza poznate koncentracije izračunata je vrijednost analitičkog prinosa R (eng. Recovery). Vrijednosti R su unutar prihvatljivih granica (97,45-106,15%).

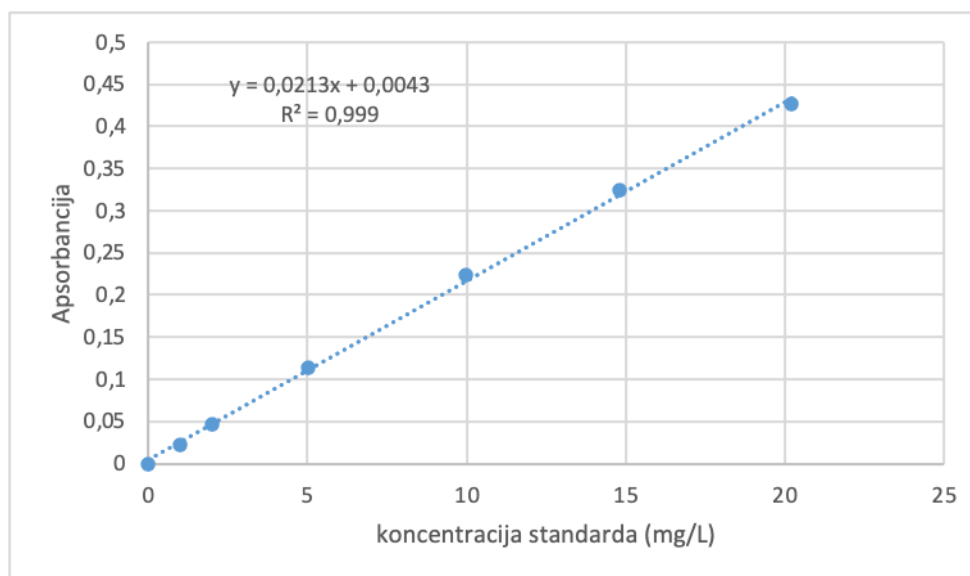
Tablica 3. Uzorak1

| konc. Fe u uzorku + konc. Fe dodane stock otopine Fe ($\mu\text{g/mL}$) | Ukupna koncentracija Fe u spike-uzorku ($\mu\text{g/mL}$) | Izmjerena/dobivena ukupna koncentracija Fe spike-uzorka ($\mu\text{g/mL}$) | koncentracija dodanog/spikeanog Fe ($\mu\text{g/mL}$) | R (%) |
|---|---|--|---|--------|
| 4,0294 + 2 | 6,0294 | 5,8756 | 1,95 | 97,45 |
| 4,0294+ 4 | 8,0294 | 8,5234 | 4,25 | 106,15 |
| 4,0294+ 6 | 10,0294 | 10,52377 | 6,296 | 104,93 |

4.1.2. AAS

Linearnost

Mjerenjem apsorbancije standardnog niza otopina različitih koncentracija željeza (tablica 2, slika 11, poglavlje 3.2.1.) izrađena je kalibracijska krivulja koja grafički prikazuje ovisnost signala, odnosno apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji željeza. Linearnost je izražena koeficijentom korelacije regresijskog pravca, R^2 .



Slika 15. Kalibracijska krivulja, graf ovisnosti apsorbancije o koncentraciji željeza

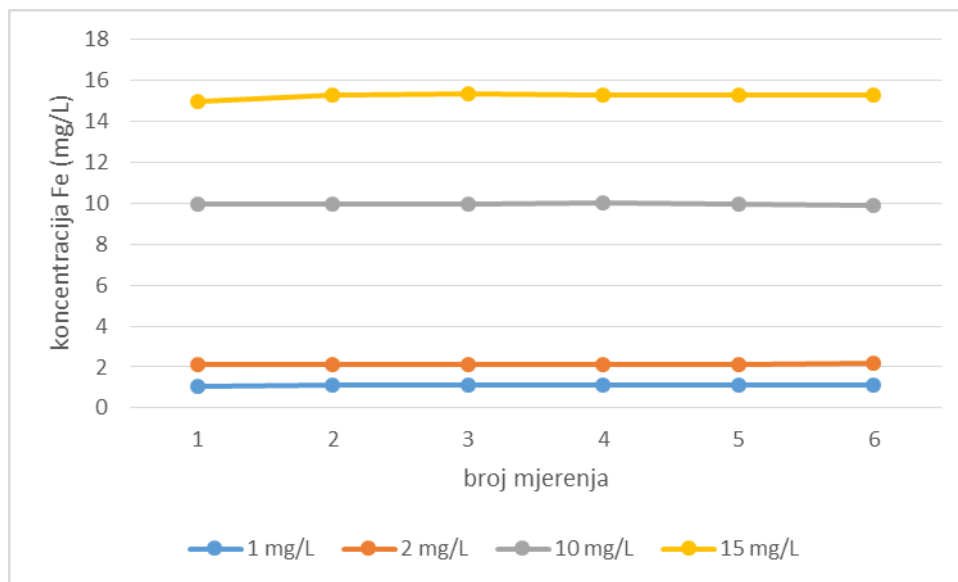
Dobivena jednadžba pravca kalibracijske krivulje je $y=0,0213x-0,0043$ s koeficijentom korelacije $R^2=0,999$. Temeljem dobivenih rezultata zaključujemo da je analitička metoda linearna i primjerena za određivanje koncentracije željeza u ispitivanim uzorcima.

Preciznost

Preciznost analitičke metode predstavlja njenu sposobnost podudaranja između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima.

Ponovljivost u danu

Ponovljivost u danu izražava preciznost u seriji, tj. u kraćem vremenskom periodu. Određena je provođenjem 6 mjerenja za 4 različite koncentracije standardne otopine u kratkom vremenskom razdoblju unutar istog dana. Rezultati se iskazuju se kao relativna standardna devijacija RSD (%).



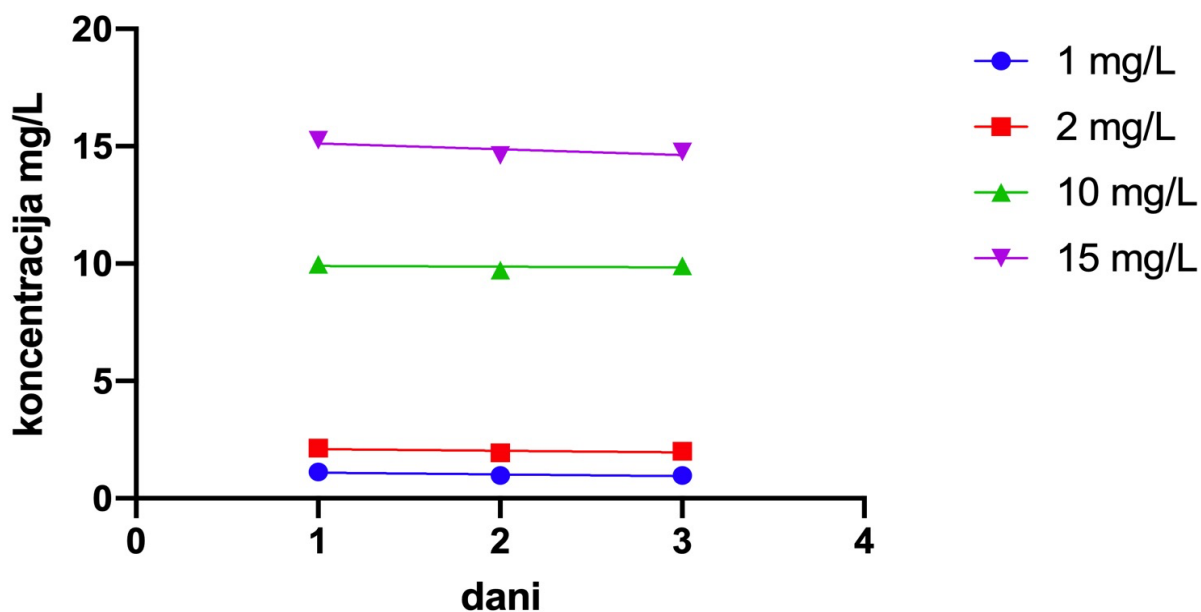
Slika 16. Ponovljivost mjerenja u prvom danu

Dobivene vrijednosti za ponovljivost u danu izražene kao RSD su u prihvatljivim granicama (0,32-2,17%) što ukazuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode. Ponovljivost za najnižu

koncentraciju standarda (1 mg/L) pokazuje najveće odstupanje što se može objasniti nestabilnošću standardnih otopina.

Ponovljivost iz dana u dan

Ponovljivost iz dana u dan izražava se kao srednja preciznost provođenjem mjerenja za 4 različite koncentracije standardne otopine 3 dana zaredom, a rezultati se iskazuju se kao relativna standardna devijacija RSD (%).



Slika 17. Ponovljivost kroz 3 dana

Dobivene vrijednosti za ponovljivost iz dana u dan izražene kao RSD su u prihvatljivim granicama (1,35-8,36%) što ukazuje na zadovoljavajuću ponovljivost metode. Ponovljivost za najnižu koncentraciju standarda (1 mg/L) pokazuje najveće odstupanje što se može objasniti nestabilnošću standardnih otopina.

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ)

Standardna devijacija SD iznosila je 0,0058, a nagib regresijskog pravca a je 0,0212. Prema formulama opisanim u uvodnom poglavlju (poglavlje 1.4.) izračunate su granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) te su njihove vrijednosti iznosile

$$\text{LOD} = 0,901 \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 2,730 \text{ mg/L}$$

Točnost

Mjerenjem koncentracije uzorka sa standardnim dodatkom otopine željeza poznate koncentracije izračunata je vrijednost analitičkog prinosa R (eng. Recovery). Vrijednosti R su unutar prihvatljivih granica (99,21-100,19%).

Tablica 4. Uzorak1

| konc. Fe u uzorku + konc. Fe dodane stock otopine Fe ($\mu\text{g/mL}$) | Ukupna koncentracija Fe u spike-uzorku ($\mu\text{g/mL}$) | Izmjerena/dobivena ukupna koncentracija Fe spike-uzorka ($\mu\text{g/mL}$) | koncentracija dodanog/spikeanog Fe ($\mu\text{g/mL}$) | R (%) |
|---|---|--|---|--------|
| 3,8302 + 2 | 5,8302 | 5,817 | 1,9954 | 99,77 |
| 3,8302+ 4 | 7,8302 | 7,768 | 3,9682 | 99,21 |
| 3,8302+ 6 | 9,8302 | 9,849 | 6,0115 | 100,19 |

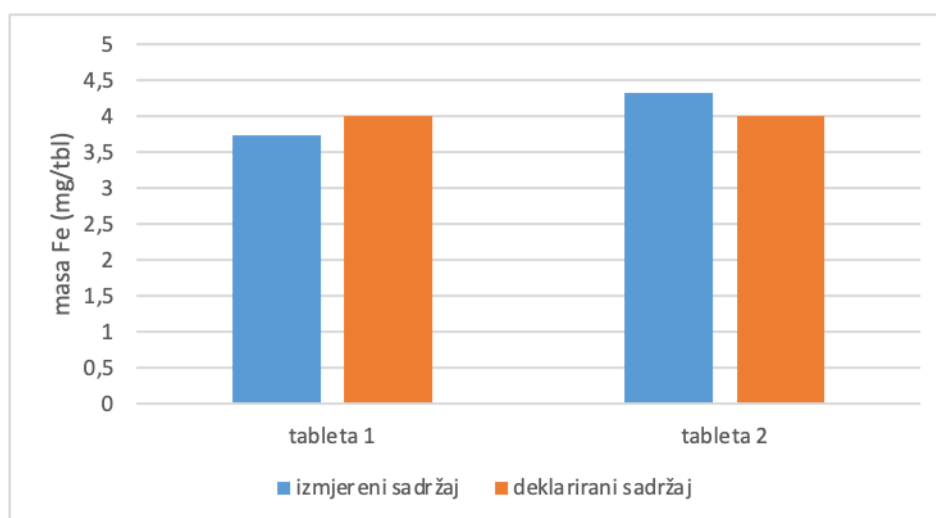
4.2. Određivanje koncentracije željeza u uzorcima

4.2.1. UV-Vis spektrofotometrija

Prethodno validiranom metodom i izrađenom kalibracijskom krivuljom (slika 12.) određena je koncentracija željeza u otopinama uzoraka dodataka prehrani. Uzorak svakog od 2 testirana proizvođača pripremljen je u duplikatu od 2 različite šumeće tablete te je u njima određen sadržaj željeza. Dobivene vrijednosti analiziranih uzoraka uspoređene su s deklariranim vrijednostima sadržaja željeza. Otopine uzoraka pripremljene su kako je prethodno objašnjeno u poglavlju 3.2.3. Dobiveni rezultati prikazani u tablicama 5. i 6. te grafovima na slikama 18. i 19. Iz dobivene kalibracijske krivulje odredila se količina željeza u analiziranim uzorcima (Watson,1999).

Tablica 5. Izmjerene koncentracije željeza u ispitivanim uzorcima proizvođača 1

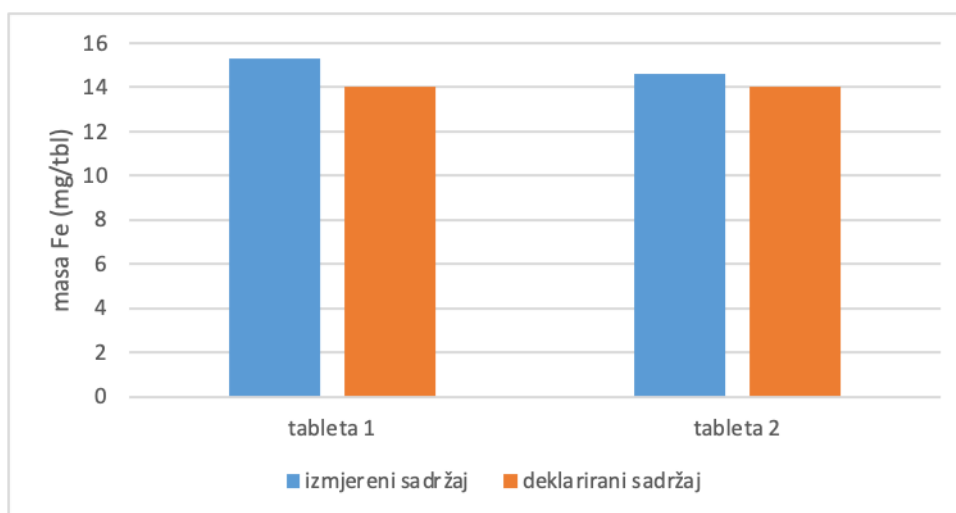
| koncentracija | Tableta 1 | Tableta 2 |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| 1.mjerenje | $6,65 \times 10^{-6}$ | $7,71 \times 10^{-6}$ |
| 2. mjerenje | $6,71 \times 10^{-6}$ | $7,76 \times 10^{-6}$ |
| 3.mjerenje | $6,73 \times 10^{-6}$ | $7,74 \times 10^{-6}$ |
| Srednja vrijednost | $6,695 \times 10^{-6}$ | $7,74 \times 10^{-6}$ |
| SD | $4,161 \times 10^{-8}$ | $2,393 \times 10^{-8}$ |
| RSD | 0,6215 | $3,09 \times 10^{-1}$ |
| mg Fe/tableta | 3,74 | 4,32 |



Slika 18. Odnos izmjerenog i deklariranog sadržaja željeza u uzorku 1 izraženog kao masa Fe u mg u jednoj tableti šumećeg dodatka prehrani

Tablica 6. Izmjerene koncentracije željeza u ispitivanim uzorcima proizvođača 2

| koncentracija | Tableta 1 | Tableta 2 |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. mjerenje | $2,72 \times 10^{-5}$ | $2,62 \times 10^{-5}$ |
| 2. mjerenje | $2,75 \times 10^{-5}$ | $2,62 \times 10^{-5}$ |
| 3. mjerenje | $2,76 \times 10^{-5}$ | $2,62 \times 10^{-5}$ |
| Srednja vrijednost | $2,74 \times 10^{-5}$ | $2,62 \times 10^{-5}$ |
| SD | $2,16 \times 10^{-7}$ | $2,60 \times 10^{-8}$ |
| RSD | $7,87 \times 10^{-1}$ | $9,93 \times 10^{-2}$ |
| mg Fe/tableta | 15,31 | 14,63 |



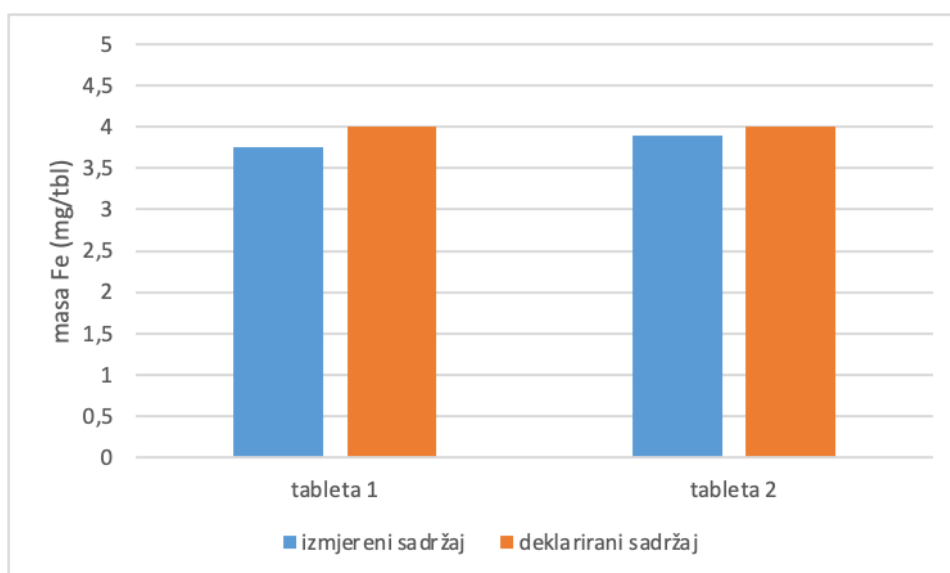
Slika 19. Odnos izmjerene i deklarirane količine željeza u uzorku2 izraženog kao masa Fe u mg u jednoj tableti šumećeg dodatka prehrani

4.2.2. AAS

Prethodno validiranom metodom određena je koncentracija željeza u otopinama uzoraka dodataka prehrani. Uzorak svakog od 2 testirana proizvođača pripremljen je u duplikatu od 2 različite šumeće tablete te je u njima određen sadržaj željeza. Dobivene vrijednosti analiziranih uzoraka uspoređene su s deklariranim vrijednostima sadržaja željeza. Otopine uzoraka pripremljene su kao što je prethodno objašnjeno u poglavlju 3.2.2. Rezultati ispitivanja su prikazani u tablicama 7 i 8 te grafovima na slikama 20. i 21.

Tablica 7. Izmjerena masa željeza u ispitivanim uzorcima proizvođača 1

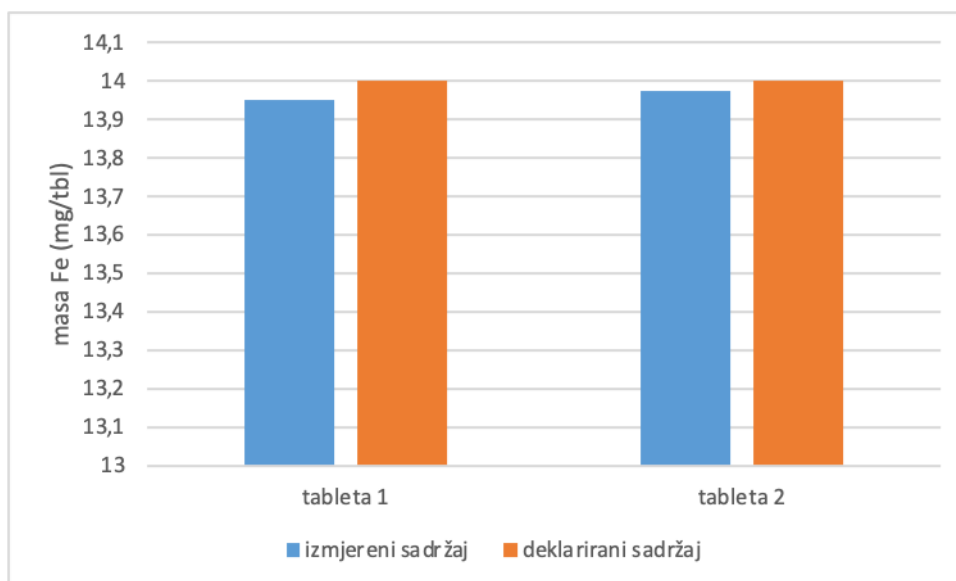
| Masa Fe u 1 tableti (mg) | Tableta 1 | Tableta 2 |
|--------------------------|-----------|-----------|
| 1. mjerenje | 3,751 | 3,864 |
| 2. mjerenje | 3,748 | 3,898 |
| 3. mjerenje | 3,754 | 3,898 |
| Srednja vrijednost | 3,751 | 3,887 |
| SD | 0,003 | 0,020 |
| RSD | 0,080 | 0,505 |



Slika 20. Odnos izmjerenog i deklariranog sadržaja željeza u uzorku izraženog kao masa Fe u mg u jednoj tableti šumećeg dodatka prehrani

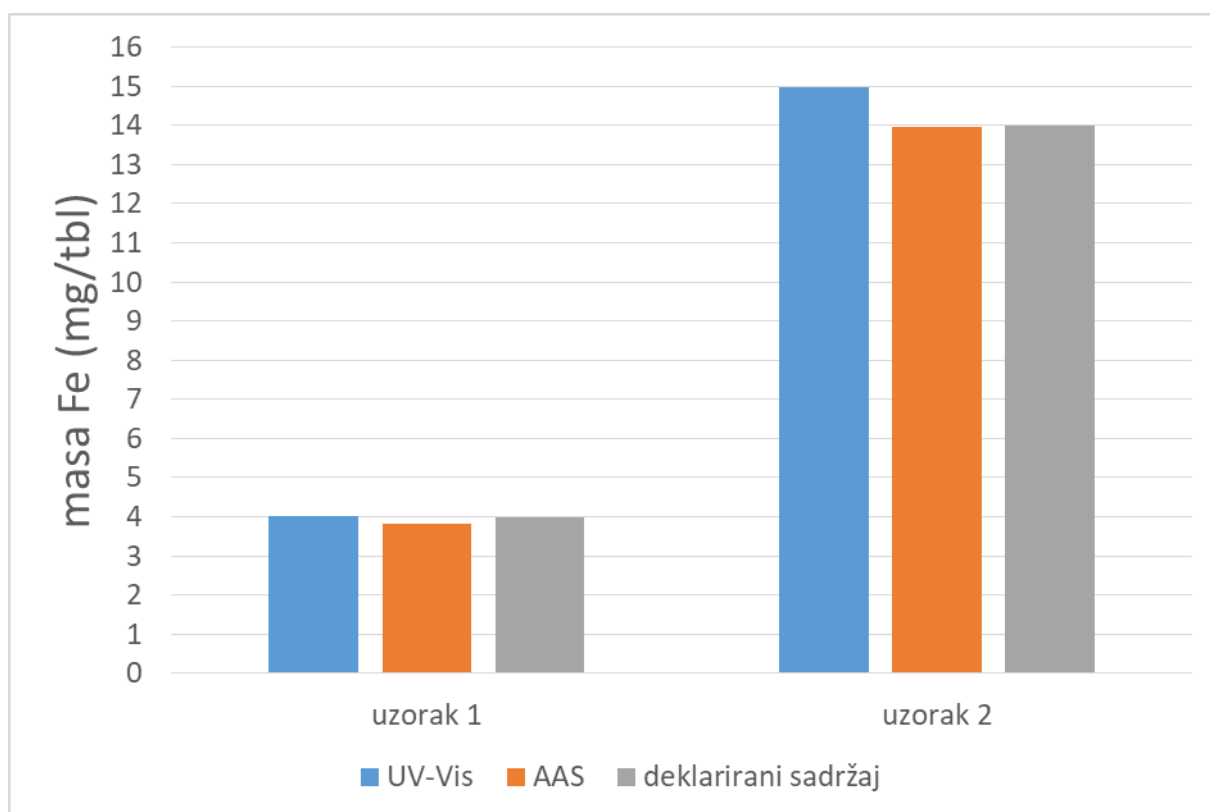
Tablica 8. Izmjerena masa željeza u u ispitivanim uzorcima proizvođača 2

| koncentracija | Tableta 1 | Tableta 2 |
|--------------------|-----------|-----------|
| 1. mjerenje | 13,95 | 14,04 |
| 2. mjerenje | 13,96 | 13,96 |
| 3. mjerenje | 13,94 | 13,92 |
| Srednja vrijednost | 13,95 | 13,973 |
| SD | 0,01 | 0,061 |
| RSD | 0,072 | 0,437 |



Slika 21. Odnos izmjerenog i deklariranog sadržaja željeza u uzorku2 izraženog kao masa Fe u mg u jednoj tableti šumećeg dodatka prehrani

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata nisu uočena statistički značajna odstupanja ($P < 0,05$) izmjerenog sadržaja željeza u odnosu na deklarirani sadržaj izražen kao masa željeza u jednoj tableti (mg/tbl).



Slika 22. Usporedba dviju metoda po izmjerenoj masi željeza u odnosu na deklariran sadržaj

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, obje korištene metode, UV-Vis spektrofotometrija i AAS, pokazale su se prikladne za pouzdano i jednostavno određivanje sadržaja željeza u dodacima prehrani. Predložene metode validirane su prema važećim smjernicama, a dobiveni rezultati pokazali su da su metode linearne, precizne, točne i brze.

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija pokazala se kao jednostavnija i brža u izvedbi u odnosu na UV-Vis spektrofotometriju. S obzirom da je AAS skuplja metoda, potrebne su posebne žarulje za svaki ispitivani metal te se koriste plinovi, metoda izbora u budućim istraživanjima bila bi UV-Vis spektrofotometrija.

6. LITERATURA

- After Absorption in Atomic Absorption Spectrometry (AAS) do electrons re-emit the absorbed light, 2017., www.quora.com., pristupljeno 30.1.2021.
- Ahuja S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. London, San Diego, Academic press 2001, Vol. III, str. 340.-341
- Anatomy and physiology, 2013., <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/18-3-erythrocytes>, pristupljeno 30.1.2021.
- Anemija i manjak željeza u krv, 2020., <https://www.dietpharm.com/blog/anemija-i-manjak-zeljeza-u-krvi/>, pristupljeno 30.1.2021.
- Božikov V., Bačić-Vrca V. Klinička farmacija i terapija. Zagreb, Školska knjiga 2004., str. 148., 175., 189., 703-717.
- Brozović M., Suvereni farmaceutski oblici željeza za oralnu i parenteralnu primjenu. *Repozitorij Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Zagreb*, 2018.
- Harris D. C. Quantitative chemical analysis 9th ed, Spectrophotometric determination of iron in drinking water. New York, W. H. Freeman and Company, 2015
- ICH, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), 2005., str. 5.
- Mihoci M., Spektrofotometrijsko određivanje boja. *Kemija u industriji*, 2015., str. 683-685.
- Millikan M., Nutritional Metals in Foods by AAS. *InTech*, 2012
- Nigović B. Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija, Atomska emisijska i apsorpcijska spektroskopija, Validacija analitičkih postupaka. Interna skripta – predavanja. 2018
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Validacija analitičkog postupka. *Analitika lijekova – Praktikum. Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb*, 2014, str. 135-137
- Peters, Maurer, Review: Bioanalytical method validation- How, how much and why?. 2002.
- Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VR, Prasad LK., A review on role of essential trace elements in health and disease. *J NTR Univ Health Sci*, 2015, 75-85.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2006., str. 331-333.
- Shimadzu Hrvatska, 2017., <https://www.shimadzu.hr/izvrsna-prilika-za-va%C5%A1-laboratorij-novi-i-demo-ure%C4%91aji-na-popustu-i-do-45>, pristupljeno 13.2.2021.
- Watson D.G. Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill livingstone. 1999., str. 4., 11-14., 75-97., 125-133.
- Welz B., Sperling M. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. United States of America, Wiley-Vch 1999.
- White C., Atomic Absorption Determination of Zinc and Copper in a Multivitamin. *Athens Technical College, Athens, GA*, 2009
- WHO, Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition, Second Edition, World Health Organisation and Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2004, Geneva, str. 246-272.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Željezo je prijelazni metal s vrlo važnom ulogom u ljudskom organizmu. Jedna od glavnih uloga željeza je prijenos kisika iz pluća do tkiva putem krvi i to kao sastavni dio hemoglobina u eritrocitima te je sastavni dio enzima u različitim tkivima. Većina željeza u ljudskom tijelu nalazi se u eritrocitima kao hemoglobin (Hb), odnosno kao fero oblik željeza (Fe^{2+}) u hemu (*slika 1*). U jednoj molekuli hemoglobina prisutne su četiri polipeptidne jedinice od kojih svaka veže prostetičnu skupinu koja sadrži hem. Hem se sastoji od tetrapironskog porfirinskog prstena koji sadrži željezo kao Fe^{2+} . Svaki hem može nositi jednu molekulu kisika. Mioglobin je također važan protein u mišićima koji prenosi kisik jer u svojoj strukturi sadrži jednu hemsku skupinu u kojoj je prisutno željezo. Enzimi koji sadrže željezo u svojoj strukturi ponašaju se kao prenositelji elektrona te imaju ulogu u oksidativnom metabolizmu da prenose energiju unutar stanice, posebno u mitohondriju.

Tijelo ne može samo sintetizirati željezo pa ga je neophodno unositi hranom i suplementirati dodacima prehrani. Dodaci prehrane koji sadrže željezo često su u kombinaciji s askorbinskom kiselinom (vitamin C) koja povećava apsorpciju željeza ili u multivitaminskim kombinacijama. Fitati, oksalati, kofein, tanin i neki lijekovi (tetraciklini, penicilamin, fluorokinoloni i teobromin) smanjuju apsorpciju željeza. Preporučeni dnevni unos (engl. Recommended Daily Intake, RDI) željeza je 15 mg, a kod trudnice je povećana potreba.

Današnje tržište sadrži mnogobrojne vitaminske dodatke prehrani koji uglavnom ne podliježu strogim kontrolama kvalitete kao lijekovi. Zbog zdravstvene ispravnosti takvih pripravaka važno je provoditi i kontrolu takvih pripravaka.

Prvi cilj ovog rada bio je validacija dvije analitičke metode, atomske apsorpcijske spektroskopije i UV-Vis spektroskopije za kvantitativnu analizu dodataka prehrani koji u sebi sadrže željezo. Drugi cilj bio je primjena validiranih metoda za određivanje sadržaja željeza u ispitivanim uzorcima dodataka prehrani. Usporedbom dobivenih rezultata zaključilo se o preciznosti i točnosti primijenjenih metoda u svrhu određivanja sadržaja željeza.

Iron is an essential trace element. It has several vital functions in the body. It serves as a carrier of oxygen to tissues from the lungs through the hemoglobin of red blood cells, as a transport medium for electrons within cells, and as an integral part of important enzyme systems in various tissues. Most of the iron in the human body is found in erythrocytes as hemoglobin (Hb), or the ferrous form of iron (Fe^{2+}) in heme (Figure 1). There are four polypeptide units in a hemoglobin molecule, each of which binds a prosthetic group containing heme. Heme contains a tetrapyrrole porphyrin ring that contains iron as Fe^{2+} . Each heme can carry one molecule of oxygen. Myoglobin is also an important protein in muscles that transports oxygen because its structure contains a heme group in which iron is present.

Several iron-containing enzymes, cytochromes, act as electron transporters within the cell and their structure does not allow reversible loading and unloading of oxygen. Their role in oxidative metabolism is to transfer energy within the cell and specifically in the mitochondria.

The human body cannot synthesize iron on its own, so it must be supplied in the diet and through supplements. Iron-containing supplements are often combined with ascorbic acid (vitamin C), which increases iron absorption. Phytates, oxalates, caffeine, tannin and some drugs (tetracyclines, penicillamine, fluoroquinolones and theobromine) reduce iron absorption. The recommended daily intake (RDI) of iron is 15 mg, but the requirement is increased in pregnant women.

There are many vitamin supplements on the market today that are generally not subject to strict quality controls as medications are. Due to the health safety of such supplements, it is important to control such supplements.

The first objective of this work was to validate two analytical methods, atomic absorption spectroscopy and UV-Vis spectroscopy for the quantitative analysis of iron-containing dietary supplements. The second objective was to implement validated methods for the determination of iron content in the analyzed samples of dietary supplements. By comparing the obtained results, the precision and accuracy of the applied methods for the determination of the iron content were concluded.

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

USPOREDBA SADRŽAJA ŽELJEZA S DVIJE ANALITIČKE METODE U UZORCIMA DODATAKA PREHRANI

Andrea Raguz

SAŽETAK

Željezo je prijelazni metal s vrlo važnom ulogom u ljudskom organizmu. Jedna od glavnih uloga željeza je prijenos kisika iz pluća do tkiva putem krvi i to kao sastavni dio hemoglobina u eritrocitima te je sastavni dio enzima u različitim tkivima. Većina željeza u ljudskom tijelu nalazi se u eritrocitima kao hemoglobin (Hb), odnosno kao fero oblik željeza (Fe^{2+}) u hemu (*slika 1*). U jednoj molekuli hemoglobina prisutne su četiri polipeptidne jedinice od kojih svaka veže prostetičnu skupinu koja sadrži hem. Hem se sastoji od tetrapironskog porfirinskog prstena koji sadrži željezo kao Fe^{2+} . Svaki hem može nositi jednu molekulu kisika. Mioglobin je također važan protein u mišićima koji prenosi kisik jer u svojoj strukturi sadrži jednu hemsku skupinu u kojoj je prisutno željezo. Enzimi koji sadrže željezo u svojoj strukturi ponašaju se kao prenositelji elektrona te imaju ulogu u oksidativnom metabolizmu da prenose energiju unutar stanice, posebno u mitohondriju.

Tijelo ne može samo sintetizirati željezo pa ga je neophodno unositi hranom i suplementirati dodacima prehrani. Dodaci prehrane koji sadrže željezo često su u kombinaciji s askorbinskom kiselinom (vitamin C) koja povećava apsorpciju željeza ili u multivitaminskim kombinacijama. Fitati, oksalati, kofein, tanin i neki lijekovi (tetraciklini, penicilamin, fluorokinoloni i teobromin) smanjuju apsorpciju željeza. Preporučeni dnevni unos (engl. Recommended Daily Intake, RDI) željeza je 15 mg, a kod trudnice je povećana potreba. Današnje tržište sadrži mnogobrojne vitaminske dodatke prehrani koji uglavnom ne podliježu strogim kontrolama kvalitete kao lijekovi. Zbog zdravstvene ispravnosti takvih pripravaka važno je provoditi i kontrolu takvih pripravaka.

Prvi cilj ovog rada bio je validacija dvije analitičke metode, atomske apsorpcijske spektroskopije i UV-Vis spektroskopije za kvantitativnu analizu dodataka prehrani koji u sebi sadrže željezo. Drugi cilj bio je primjena validiranih metoda za određivanje sadržaja željeza u ispitivanim uzorcima dodataka prehrani. Usporedbom dobivenih rezultata zaključilo se o preciznosti i točnosti primijenjenih metoda u svrhu određivanja sadržaja željeza.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 8 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: AAS, UV-Vis, validacija, željezo

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

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

Dr. sc. Marijana Zovko Končić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Bival Štefan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Travanj 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

COMPARISON OF IRON CONTENT WITH TWO ANALYTICAL METHODS IN DIETARY SUPPLEMENT SAMPLES

Andrea Raguč

SUMMARY

Iron is an essential trace element. It has several vital functions in the body. It serves as a carrier of oxygen to tissues from the lungs through the hemoglobin of red blood cells, as a transport medium for electrons within cells, and as an integral component of important enzyme systems in various tissues. Most of the iron in the human body is found in erythrocytes as hemoglobin (Hb), or the ferrous form of iron (Fe^{2+}) in heme (Figure 1). There are 4 polypeptide units in a hemoglobin molecule, each of which binds a prosthetic group containing heme. Heme contains a tetrapyrrolone porphyrin ring that contains iron as Fe^{2+} . Each heme can carry one molecule of oxygen. Myoglobin is also an important protein in muscles that transports oxygen because its structure contains a heme group in which iron is present. Several iron-containing enzymes, cytochromes, act as electron transporters within the cell and their structure does not allow reversible loading and unloading of oxygen. Their role in oxidative metabolism is to transfer energy within the cell and specifically in the mitochondria. The human body cannot synthesize iron on its own, so it must be supplied through diet and supplements. Iron-containing supplements are often combined with ascorbic acid (vitamin C), which increases iron absorption. Phytates, oxalates, caffeine, tannin, and some drugs (tetracyclines, penicillamine, fluoroquinolones, and theobromine) reduce iron absorption. The recommended daily intake (RDI) of iron is 15 mg, but the requirement is increased in pregnant women. There are many vitamin supplements on the market today that are generally not subject to strict quality controls as medications are. Due to the health safety of such supplements, it is important to control such supplements. The first objective of this work was to validate two analytical methods, atomic absorption spectroscopy and UV-vis spectroscopy, for the quantitative analysis of dietary supplements containing iron. The second objective was to implement validated methods for the determination of iron content in the analyzed samples of dietary supplements. By comparing the obtained results, the precision and accuracy of the applied methods for the determination of iron content were concluded.

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

Thesis includes: 44 pages, 8 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: AAS, UV-Vis, validation, iron

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

Reviewers: Jasna Jablan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2021.