

Valorizacija komine rajčice kao izvora nutritivno važnih minerala

Gašparac, Borna

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:588915>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-19**



Repository / Repozitorij:

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



Borna Gašparac

**Valorizacija komine rajčice kao izvora nutritivno
važnih minerala**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb,2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane na Zavodu za kemiju prehrane i Zavodu za analitičku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko - biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom prof.dr.sc Dubravke Vitali Čepo i izv.prof.dr.sc Jasne Jablan.

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Komina rajčice.....	2
1.1.1.	Karotenoidi, Likopen, β-karoten.....	2
1.1.1.1.	Likopen.....	2
1.1.1.2.	β-karoten.....	3
1.1.2.	Prehrambena vlakna.....	5
1.1.3.	Lipidi.....	6
1.1.3.1.	Fitosteroli	7
1.1.4.	Proteini	7
1.2.	Biološke uloge nutritivno važnih minerala	7
1.2.1.	Bakar	7
1.2.2.	Brom	8
1.2.3.	Cink.....	8
1.2.4.	Kalcij.....	9
1.2.5.	Kalij	9
1.2.6.	Krom	9
1.2.7.	Magnezij.....	10
1.2.8.	Mangan.....	10
1.2.9.	Rubidij.....	10
1.2.10.	Stroncij	10
1.2.11.	Željezo.....	11
1.3.	Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF).....	11
2.	Obrazloženje teme	14
3.	Materijali i metode	16
3.1.	Kemikalije.....	17
3.2.	Aparatura i instrumenti	17

3.3.	Priprema uzorka komine rajčice	17
3.4.	Priprema uzorka za TXRF.....	18
3.4.1.	Priprema uzorka za TXRF postupkom mikrovalne digestije.....	18
3.4.2.	Priprema uzorka u obliku suspenzije.....	20
3.4.3.	Priprema otopina Triton X-100®-a	20
3.4.4.	Priprema otopine internog standarda	21
3.4.5.	Priprema kvarcnih nosača	21
3.4.6.	Dizajn eksperimenta.....	21
3.5.	Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)	22
3.5.1.	Priprema uzorka pomoću mikrovalne digestije za TXRF analizu	22
3.5.2.	Priprema uzorka u obliku suspenzije za TXRF analizu.....	23
3.6.	Statistička obrada rezultata.....	24
4.	Rezultati i rasprava	25
4.1.	Mineralni sadržaj certificiranog referentnog materijala i analiziranih uzoraka pripremljenih metodom digestije	26
4.2.	Optimizacija TXRF metode primjenom metode eksperimentalnog dizajna	27
4.3.	Mineralni sadržaj certificiranog referentnog materijala i analiziranih uzoraka pripremljenih metodom suspendiranja	32
4.4.	Usporedba dobivenih rezultata mineralnog sadržaja uzorka pripremljenih s dvije različite metode.....	34
4.5.	Usporedba mineralnog sadržaja komine i pokožice rajčice te utjecaj sušenja na mineralni sastav.....	37
5.	Zaključak	40
6.	Literatura.....	42
7.	Sažetak / Summary.....	45

1. Uvod

1.1. Komina rajčice

Prehrambena industrija povezana s kulturom rajčice zasigurno je jedna od najvažnijih u svijetu, a prema važnosti zauzima drugo mjesto nakon krumpira. Prema procjenama Eurostata 2017. godine, 11,7% zasada EU se upravo odnosi na usjeve rajčice. Rajčica se, kao što znamo, ne konzumira samo kao svježa nego ju pronalazimo i u različitim oblicima prerađevina u obliku paste, pirea, pelata, pasirane rajčice i soka. Ovako velik obim proizvodnje za sobom povlači i veliku količinu nusproizvoda. Prilikom proizvodnje 344 g soka od rajčice, generira se 80,5 g gubitaka (ostataka proizvodnje). Nakon uklanjanja vode, koja bi mogla pružiti plodno tlo za razvoj različitih kontaminanata (bakterije, gljivice i pljesni), tiješnjenjem slijedi korak završnog sušenja (različitim postupcima o kojima će biti riječ u kasnijim poglavljima). Suha se komina rajčice sastoji od približno 33% sjemenki, 27% kože i 40% pulpe. Svaka od tih sastavnica sadrži unikatan postotak nutraceutika koji imaju nebrojene pozitivne učinke na sva živa bića koja ih konzumiraju, uključujući domaće životinje i ponajprije ljude (Farag i Ramadan.2022; Coelho i sur., 2023).

1.1.1. Karotenoidi, Likopen, β -karoten

Karotenoidi su jedna od najzastupljenijih tvari u komini rajčice i na prvi ih pogled možemo primijetiti jer su oni odgovorni za njenu karakterističnu crveno-narančastu boju. Obuhvaćaju širok spektar spojeva koje možemo podijeliti u oksigenirane oblike (ksantofili) i hidrokarbonske derivate (karoteni) u čiju skupinu ubrajamo i likopen i β -karoten. Navedene skupine dijele nekoliko zajedničkih obilježja kao što su polienski lanac s 9-11 dvostrukih veza koji može biti završen prstenima te svi posjeduju određenu količinu antioksidativne aktivnosti (Coelho i sur., 2023).

1.1.1.1. Likopen

Likopen, kao najzastupljeniji karotenoid rajčice, uvrštavamo u fotosintetske i fotozaštitne karotenoide. Nezasićeni je i aciklički karotenoid s optimalnom stabilnošću u pH području od 3,5 do 4,5. Rajčica duguje svoju crvenu boju upravo nakupljanju likopena do kojeg dolazi zbog supresije gena za likopen ciklazu koja, zbog činjenice da je likopen aciklički spoj, može katalizirati zatvaranje dva prstena na krajevima strukture pretvarajući likopen u β -karoten.

Njegovo pozitivno djelovanje na ljudski organizam ponajprije se temelji na njegovom antioksidativnom potencijalu. Likopen ,u usporedbi s drugim karotenoidima, posjeduje najveći antioksidativni potencijal u rajčici. Naime, dokazano je da likopen pri Amesovom testu neutralizira singletni kisik smanjujući mutagenezu genetskog materijala. Također

pokazuje da sinergizam s ostalim karotenoidima, promjerice luteinom, daje znatno jači učinak u odnosu na svaki karotenoid pojedinačno (Heber i Lu, 2002).

Likopen pokazuje i izrazito antiproliferativno i prodiverencirajuće djelovanje, a pogotovo u kombinaciji s 1,25-dihidroksikolekalcigerolom (vitamin D3). Dokazano je djelovanje na stanični ciklus HL-60 stanica koje povezujemo s promijelotičkom leukemijom. Također je u drugim studijama pokazana učinkovitost likopena na smanjenje stimulacije IGF-om (eng. Insuline-like growth factor) što direktno smanjuje rizik oboljenja od karcinoma prostate i dojke (Heber i Lu, 2002).

Važno je naglasiti kako se takva vrsta djelovanja na ljudske tumorske stanice ne može poistovjetiti niti povezati s toksičnošću karotenoida već isključivo s interferencijom u signaliziranju putem IGF receptora. Štoviše, preventivno djelovanje, što se kanceroznih promjena tiče, nastavlja se na sposobnost karotenoida i retinoida da stabiliziraju koneksin 43 mRNA što stimulira GJC (eng. gap junctional communication) koja je poremećena u gotovo svim stanicama karcinoma (Heber i Lu, 2002).

Hipokolesterolnijski utjecaj komine rajčice, ponajprije njegovih sastavnica likopena kao i β -karotena zasigurno je vrijedan pažnje. Naime, provedena su ispitivanja utjecaja karotenoida na metabolizam kolesterola u makrofagima, stanične linije J-774 A.1 valoriziranog prema smanjenju produkcije LDL-a (eng. low-density lipoprotein), uz usporedbu s komercijalnom supresijom njegove produkcije – fluvastatinom. Za početnu točku sinteze uziman je ^3H cetat, dakle radi se o „de novo“ sintezi kolesterola. Rezultati su pokazali da je sinteza LDL-a smanjena za 63%, odnosno 73% nakon inkubacije u uzorku s β -karotenom i likopenom (10 μM), u odnosu na uzorak s fluvastatinom (10 $\mu\text{g/mL}$) čiji je pad sinteze iznosio 90%, odnosno 91% nakon inkubacije. Štoviše, u uzorku s karotenoidima došlo je do povećanja aktivnosti makrofagnih LDL receptora. Stoga je zaključeno da je suplementacija likopenom u dozi od 60 mg dnevno u periodu od 3 mjeseca rezultirala 14%-im padom koncentracije serumskog LDL-a čime se smanjio rizik od stvaranja aterosklerotskih plakova i kardiovaskularnih oboljenja (Heber i Lu, 2002).

1.1.1.2. β -karoten

β -karoten, osim antioksidativnog djelovanja, prekursor je vitamina A jer unutar njegove strukture pronalazimo dvije molekule retinola koje nastaju pod utjecajem enzima β -karoten-15,15'-oksigenaze. Treba napomenuti da samo β -karoten, za razliku od ostalih prekursora vitamina A, može teoretski proizvesti dvije molekule iako je mala vjerojatnost da se takvo što događa u *in vivo* uvjetima (Burri, 1997).

In vivo modeli pokazuju da od prosječno dvije molekule β -karotena nastaje jedna molekula vitamina A u obliku retinala i to ukazuje na činjenicu da konverzija ovisi o statusu vitamina A. Valja napomenuti kako biodostupnost β -karotena također ovisi o prisutnosti masti u prehrani koja na nju pozitivno utječe. Nadalje, različita stanja kao što su infekcije, groznice, kronična malnutricija i parazitske infekcije uvelike smanjuju potencijal konverzije što valja uzeti u obzir pri preporuci suplementacije β -karotenom kao prevencije deficitu vitaminom A.

Deficit vitamina A globalno je gledano najvažniji uzrok dječje sljepoće i pogoda godišnje 250000 djece. Važnost vitamina A naglašava i činjenica da suplementacija vitaminom A na globalnoj razini smanjuje mortalitet dojenčadi za 60 % (Burri, 1997).

Vitamin A u biološkom razvoju ima vrlo važnu ulogu u ekspresiji gena nazvanih „retinoidima regulirani geni“. Oni su posebice uključeni u organogenezu, formiranje neuralne cijevi te utječuju na sintezu glikoproteina i na brojne funkcije u organizmu kao što su imunološke funkcije. Funkcionalnost imunološkog sustava dodatno se osigurava održavanjem zdravlja mukoznih stanica koje tvore primarnu barijeru prema infekcijama te osiguravaju pravilan razvoj leukocita kao obrambenih stanica (Burri, 1997).

Budući da postoje negativne strane suplementacije vitaminom A, ponajprije toksično i teratogeno djelovanje, nekoliko se trenutnih programa za suplementaciju okrenulo suplementaciji pomoću pročišćenog β -karotena iz voća i povrća. Postoje dokazi da kapsule β -karotena pružaju jednaku razinu zaštite kao i kapsule vitamina A bez ili sa vrlo malo toksičnih učinaka.

Kao glavna nuspojava ističe se karotodermija, odnosno benigno obojenje kože u narančasto. Uočeno je da do nje dolazi pretjeranim unosom karotenoida putem hrane (pogotovo mrkve, ali i citrusa) ili suplemenata te da intenzitet ovisi o samoj dozi unesenoj u organizam. Procjenjuje se da unos mora biti barem 15 mg β -karotena dnevno iako se pojavljuje tek u četvrtini osoba koji konzumiraju 30 mg β -karotena dnevno. O sigurnosti primjene β -karotena možemo govoriti i iz prizme njegove dostupnosti kao bojila u hrani te u raznim medicinskim i kozmetičkim postupcima bez pronađenih bilo kakvih dokaza o kroničnoj toksičnosti. Različite studije su to dovele u pitanje u populaciji teških pušača, a posebno onih koji su i teški alkoholičari, jer su povezali dulje farmakološko liječenje β -karotenom s kanceroznim i toksičnim incidentima (Burri, 1997).

Suplementi β -karotena i danas ostaju u upotrebi za određene bolesti kao što su eritropoetska protoporfirija i cistična fibroza. Pokazani su pozitivni učinci i kod pacijenata oboljelih od infekcije AIDS-om gdje su kratkotrajne suplementacije β -karotenom u dozi od 180 mg povećale količinu bijelih krvnih zrnaca, limfocita te CD4⁺ T-stanica i njihov odnos prema

CD8⁺ T - stanicama supresorima uz dodatne antioksidativne elemente djelovanja neutralizacijom slobodnih radikala (Burri, 1997).

1.1.2. Prehrambena vlakna

Prehrambena vlakna vrlo su heterogena skupina spojeva čija je zajednička osobina građa, odnosno sastoje se od 10 ili više monomera ugljikohidrata koji su nedostupni za razgradnju probavnim enzimima. Sadržaj prehrambenih vlakana u komini rajčice varira, prema različitim izvorima, od 50,74% do 59,03% od čega je 40,5% netopljivo vlakno. Nevezano za postotak, komina rajčice čini idealan izvor prehrambenih vlakna te se koristi u mnogim prehrambenim proizvodima na deklaracijama pod imenom „izvor vlakana“.

Prema aktualnim smjernicama preporučeni unos prehrambenih vlakana iznosi 14 g/1000 kcal, odnosno preračunato na preporučenu prehranu za osobu ženskog spola od 2000 kcal iznosi 28 g, dok za muškarce iznosi 32 g dnevno bazirano na prehrani od 2600 kcal/ dnevno.

U SAD-u titula glavnog uzroka mortaliteta pripada kardiovaskularnim bolestima koje pogađaju više od 80 milijuna ljudi, a dokazano je kako prehrambena vlakna pozitivno djeluju na nekoliko razina liječenja i prevencije upravo bolesti povezanih sa srcem i krvnim žilama.

Sedam kohortnih studija koje su pratile opažanja na više od 158 tisuća pojedinaca ukazuju da je pojavnost koronarnih bolesti srca kod pacijenata s visokim unosom vlakana za 29% manja u odnosu na one koji su ih unesili u znatno manjoj količini. Ishemijski događaji su također smanjeni za 26% (Anderson i sur., 2009).

Ovo smanjenje oboljenja prvenstveno možemo zahvaliti hipolipemičkom djelovanju vlakana, a činjenica je da je povišen LDL kolesterol jedan od glavnih rizičnih čimbenika. Vlakna koja ubrajamo u fermentabila bivaju razgrađena od strane crijevne mikroflore te kao jedan od njihovih produkata nastaje propionat koji inhibira enzim HMG-CoA reduktazu, odnosno samu sintezu kolesterola smanjujući njegovu razinu u krvi.

Nefermentabilna vlakna također mogu „vezati“ žučne kiseline onemogućavajući formiranje micela, odnosno povećavaju sekreciju kolesterola kroz stolicu.

Podaci o šestomjesečnom korištenju psyllium ljuskica kao izvora vlakana govore o 6,7%-tnom sniženju razine LDL-a, dok 24-mjesečno korištenje guar gume dovodi do pada od zapanjujućih 25,6% (Anderson i sur., 2009).

Smanjenje koncentracije LDL-a, nažalost, povlači za sobom i sniženje „dobrog“ HDL-kolesterola (eng. high-density lipoprotein). Nakon smanjenja lipida u krvi, naravno slijedi i pad tlaka čije vrijednosti variraju zavisno o duljinu primjene i izvoru vlakana, no kreću se od neznačajnih 1 do nešto značajnijih 6 mmHg.

Već spomenuta fermentabilna vlakna kao svoj produkt metabolizma daju kratkolančane masne kiseline koje služe kao idealna hrana za bakterije crijevne mikroflore, pogotovo za važne rodove Laktobacila i Bifidobakterija. Spomenuti rodovi bakterija reguliraju broj patogenih bakterija, proizvode vitamine te omogućuju apsorpciju kalcija koji pozitivno utječe na imunološki sustav te prevenira konstipaciju (Anderson i sur., 2009).

Povećanje volumena stolice zbog sposobnosti navlačenja vode i posljedičnog laksativnog djelovanja na „prirodnoj bazi“, gledana kroz prizmu uklanjanja toksičnih produkata ,uz zdravu mikrofloru i antikancerozni učinak kratkolančanih masnih kiselina u opservacijskim studijama pokazuju da su vlakna preventiva formiranju polipa i karcinoma.

Prehrambena vlakna, kao što je pokazano u kratkotrajnim studijama, smanjuju i postprandijalnu glikemiju i inzulinemiju te povećavanju inzulinsku osjetljivost što je posebno važno za pacijente s šećernom bolešću. Vlakna pritom smanjuju i HbA1c koji predstavlja dugoročniji pokazatelj stanja dijabetesa, nakon 8 tjedana za -5,3% (prosjek dvije studije). (Anderson i sur., 2009). Budući da je 80 do 90% oboljelih od dijabetesa 2 pretilo, osjećaj sitosti i usporeno gastrično pražnjenje samo doprinosi gubitku ukupne tjelesne mase i polaganom rastu razine glukoze u krvi (Anderson i sur., 2009).

1.1.3. Lipidi

Lipide u komini rajčice možemo naći u dijelu kore (32 do 60 g/kg) i nešto više u sjemenkama (40,4 do 63,7 g/kg). Njihov glavni udio otpada na nezasićene masne kiseline, ponajprije linolensku i oleinsku kiselinu (77,04%), dok ostatak otpada na zasićene među kojima je najveći udio palmitinske kiseline. Ulje sjemenki rajčice se zbog svog emolijentnog i UV zaštitnog učinka već koristi u raznim kozmetičkim formulacijama (Farag i Ramadan., ured., 2022).

Studije koje prate incidenciju kardiovaskularnih bolesti u različitim populacijama primijetile su znatno manju incidenciju upravo takvih bolesti kod populacija, kao što su Inuiti na Grenlandu, koje unose znatno više dugolančanih n-3 polinezasićenih masnih kiselina u usporedbi s tipičnom zapadnjakačkom prehranom kojoj pripada i linolenska kiselina.

Pozitivan učinak na ljudsko zdravlje linolenska kiselina može zahvaliti i antihipertenzivnom učinku. Naime, prema istraživanjima 1% povećan udio alfa-linolenske kiseline povezuje se s padom sistoličkog i dijastoličkog tlaka za 5 mmHg (Burde i Calder, 2006).

Oleinska kiselina se potencijalno može koristiti u dermatologiji jer djeluje inhibitorno na aktivnost bakterija i gljivica te na taj način prevenira infekcije površinskih rana. Zacjeljivanje

rana dodatno potiče i povećanom količinom dušikovog oksida u tkivu što je potvrđeno na kirurški induciranim ranama u eksperimentalnim miševima (Burdge, 2004).

1.1.3.1. Fitosteroli

Fitosterole ponajprije pronađemo u frakciji sjemenki u komini rajčice. Najzastupljeniji među njima je β -sitosterol kojeg pronađemo u količini od 938 do 1088 mg/kg. Kao i neke prethodno navedene sastavnice komine rajčice, on također posjeduje hipokolesterolni djelovanje. β -sitosterol snižava LDL u krvi te posjeduje protuupalno djelovanje inhibirajući cikloksigenazni put odgovoran za nastanak prostaglandina E2. Njegov potencijal u indukciji apoptoze stanica te sposobnost da zajedno s taraksasterolom utječe na sprječavanje razvoja karcinoma kolona i dojke na način da inhibira stvaranje, promociju i indukciju tumorskih stanica te procese metastaziranja, zasigurno je vrijedan daljnog istraživanja (Saeidnia i sur, 2014).

1.1.4. Proteini

Na proteine otpada 21,9 % suhe mase komine rajčice te 38,7% mase odmašćenih koštica rajčice. Sama komina sadrži 8 esencijalnih aminokiselina od čega su najzastupljeniji leucin, lizin i izoleucin. Dakle, komina rajčice može poslužiti kao izvrstan izvor proteina biljnog podrijetla u samoj prehrani te dodacima prehrani (Farag i Ramadan., ured., 2022; Coelho i sur., 2023).

1.2. Biološke uloge nutritivno važnih minerala

Sami minerali u ljudskom organizmu imaju vrlo važne uloge, od funkcije kofaktora u različitim enzimima preko funkcije prijenosa elektrona u redoks reakcijama do prijenosa drugih molekula poput kisika te staničnom signaliziranju i održavanju integriteta svih staničnih struktura. Iako su u svom optimalnom rasponu neophodni za funkcioniranje ljudskoga organizma u cjelini, u prevelikoj količini postaju toksični. U premaloj količini primjećuju se simptomi deficitne koji variraju prema stupnju nedostatka i specifičnoj funkciji minerala u ljudskom organizmu (Aliasgharpour , 2020).

1.2.1. Bakar

Bakar u organizmu nalazimo u obliku jedno- i dvo-valentnog kationa. Ljudsko tijelo sadrži otprilike 150 mg bakra, esencijalni je element za ljudski organizam te je prema RDA (eng. Recommended dietary allowance) preporučen unos od 2 mg/dnevno. Bakar je zbog svoje

prirode postojanja u dva valentna stanja posebno važan u oksidoreduktičkim reakcijama u organizmu (kao sastavni oblik enzima citokrom oksidaze), neutralizaciji mnogih oksidanasa (kao sastavni oblik superoksid dismutaze) te njihovoj neutralizaciji i sprječavanju njihovog negativnog djelovanja. Važan je kao sastavni dio enzima dopamin monooksigenze u sintezi neurotransmitera te još nekih hormona kao što je primjerice melatonin koji je važan za ciklus budnosti i spavanja. Ne treba zanemariti i njegovu ulogu u pravilnom razvoju kostiju te križnom povezivanju molekula kolagena čime osigurava strukturnu stabilnost kose i kože. Nadalje, neophodan je za pravilnu apsorpciju vitamina C (također važnog za lijep izgled i zdravlje kože) i željeza. Važno je napomenuti kako je deficit bakra vrlo rijedak među zdravim pojedincima, ali je nešto češći u novorođenčadi kod kojih su jedni od prvih simptoma malaksalost, anemija i smanjen broj bijelih krvnih zrnaca. Zbog njegove funkcije u formiranju mijelinskih ovojnica, ulozi u metabolizmu steroida, normalnom razvoju kostiju te održavanju membrana stanica, njegov manjak dovodi do trzaja i slabosti mišića (Aliasgharpour i Farzami, 2015; Al-Fartusie i Mohssan, 2017; Aliasgharpour, 2020).

1.2.2. Brom

Uloga bromu u ljudskom organizmu nije potpuno razjašnjena, no u studiji Sveučilišta Vabderbilt primijećeno je da se kolagen tip IV neće pravilno smotati bez prisutnosti bromu što dovodi do nepravilnog razvoja vezivnoga tkiva. (www.zrtlab.com). Prihvatljiv unos bromu iznosi 1 mg po kilogramu tjelesne težine. Povjesno gledano zapaženo je da brom na ljudski organizam, u dozama cca. 6 g dnevno, ima sedativno, anti-konvulzivno i anti-libidoidno djelovanje. U suvremenom svijetu u ljudski organizam unosi se najčešće putem hrane s obzirom da se koristi kao sastavni dio fumiganata, pesticida i bromiranog ulja kojeg pronalazimo u popularnim gaziranim pićima. Bromizam, odnosno toksičnost bromu, u značajnom je padu te se danas vrlo rijetko primijeti no glavne karakteristike su mu glavobolja, konfuzija, halucinacije, stupor i koma (www.zrtlab.com).

1.2.3. Cink

Biološke uloge cinka, kao i mnogih drugih metala, leže u činjenici da je sastavni dio više od 300 enzima. Neophodan je u formiranju DNA i proteina te aktivno sudjeluje u radu mnogih žlijezda kao što je gušterača (u inzulinskoj aktivnosti) te u održavanju normalne funkcije ovarija i testisa. Deficijencija cinka upravo je pokazala kako je njegova funkcija također i sprječavanje raznih respiratornih infekcija, posebice pneumonija. Od ostalih simptoma su prisutni gubitak kose, impotencija, hipogonadizam u muškaraca, mentalna letargija te zakašnjelo zacjeljivanje rana. Stoga, mnogi posežu za dodatcima prehrani kako bi unaprijedili

svoj imunitet te zadovoljili dnevni unos (RDA) od 8 mg za žene i 11 mg za muškarce. Nije rijedak primjer da se prevelik unos cinka karakterizira prolaznim pojavama poput proljeva, abdominalnih bolova te povraćanja (Aliasgharpour i Farzami, 2015; Al-Fartusie i Mohssan, 2017; Aliasgharpour, 2020).

1.2.4. Kalcij

Na kalcij otpada otprilike 2% mase ljudskog organizma, od čega se 98% nalazi kao gradivni element u kostima, dok se ostatak nalazi u krvi i tkivima. Harmoniju između ova dva „skladišta“ kalcija održavaju doštitne žljezde koje u slučaju manjka kalcija u krvi šalju signale za njegovu reapsorpciju iz kostiju te veću apsorpciju iz gastrointestinalnog trakta. Potrebe za unosom kalcija variraju s obzirom na dob i spol pojedinca. Naime, zbog izrastanja kostiju kod adolescenata ona iznosi od 0,8 do 1 g dnevno, dok je za usporedbu odraslim pojedincima potrebno 0,7 g dnevno. Naravno u žena u postmenopauzi potrebe za kalcijem također rastu zbog preveniranja osteoporotskih promjena na kostima. Nedostatak kalcija može biti uzrokovan lijekovima, zatajenjem organa i niskim nutritivnim unosom, a ponajprije se ogleda u grčenju mišića, suhoj koži, lomljivim noktima te u konačnici lomovima kostiju. Suplementacija preparatima kalcija najčešće ide ruku pod ruku i s nadomještanjem vitamina D kako bi se povećala apsorpcija kalcija koja opada s godinama života (Pravina i sur. 2013).

1.2.5. Kalij

Normalna razina kalija u ljudskoj plazmi iznosi od 3,5 do 5,0 mEq/L. Ona se održava pomoću Na-K pumpe koja funkciju kalija čini neodvojivom od funkcije natrija. Sama pumpa, zapravo je membranski transporter, koja uz potrošnju molekule ATP-a (adenozin trifosfat) iz stanice izbacuje tri atoma Na^+ , a u stanicu se pasivno vraćaju dva atoma K^+ . Njenim djelovanjem reguliraju se kontrakcije mišića, ponajprije srca. Kalij sudjeluje i u brojnim drugim procesima kao što su sinteza aminokiselina te konverzija glukoze u glikogen. Hiperkalemija i hipokalemija, odnosno stanje viška i manjka kalija, imaju vrlo slične simptome kao što su poremećaj kontrakcije i slabosti mišića te različite vrste aritmija i prestanka rada srca kao fatalnog ishoda (Pohl i sur., 2013).

1.2.6. Krom

Krom ima dvojaku ulogu s obzirom na njegovu valenciju. Naime, trovalentni krom biološki je aktivni oblik kojeg pronalazimo u hrani, dok je šesterovalentni krom toksičan te nastaje kao produkt industrijskog onečišćenja. Dokazano je da krom uzrokuje značajan porast enzimske aktivnosti te igra važnu ulogu u metabolizmu makronutrijenata (ugljikohidrata i masti) te

sintezi kolesterola, a što je najvažnije povećava osjetljivost tikva na inzulin. Preporučeni unos iznosi 20-35 µg dnevno, ali nisu zapaženi značajniji oblici deficit (Aliasgharpour i Farzami, 2015; Al-Fartusie i Mohssan, 2017; Aliasgharpour, 2020).

1.2.7. Magnezij

Za više od 300 kemijskih reakcija u organizmu potreban je magnezij kao kofaktor. Među njima su sinteza proteina, kontrola glikemije, normalna funkcija živčanog sustava i mišića. RDA iznosi 400 mg dnevno za muškarce te 320 mg dnevno za žene. Iako su simptomi deficit-a magnezija rijetki, možemo ih primijetiti kod alkoholičara zbog malog unosa istoga hranom, a uključuju mučninu, umor, gubitak apetita, retenciju natrija, teže halucinacije, nisku razinu paratiroidnih hormona i srčane poteškoće (Al-Fartusie i Mohssan, 2017).

1.2.8. Mangan

Prosječan ljudski organizam sadrži otprilike samo 12 mg mangana od čega se većina nalazi u kostima. Zato ne čudi minimalni preporučeni dnevni unosi od 2,3 mg dnevno za muškarce te 1,8 mg dnevno za žene. Kao kofaktor odgovoran je za formiranje vezivnoga tkiva te oksidativni metabolizam jer kao antioksidans on hvata slobodne radikale. Njegov manjak uzrokuje hiperkolesteroliju, dermatitise te potencijalne probleme s zgrušavanjem krvi jer ima utjecaj na vitamin K-ovisne faktore zgrušavanja. Njegov se suvišak, posebice u bazalnim ganglijima, povezuje s nastankom poremećaja sličnim Parkinsonovojoj bolesti i stoga je njegov tolerabilni unos ograničen na 11 mg dnevno (Aliasgharpour i Farzami, 2015; Al-Fartusie i Mohssan, 2017; Aliasgharpour, 2020).

1.2.9. Rubidij

Iako se godinama tvrdilo da rubidij nije esencijalan element za čovjeka, studija provedena na kozama dovela je takvo mišljenje pod znak pitanja. Naime, čini se kako bi, kako u kozama tako potencijalno u čovjeku, imao ulogu u očuvanju trudnoće. Grupa koza koja nije imala dovoljnu razinu rubidija nije imala niti dovoljnu količinu progesterona što je direktno uzrokovalo pobačaj (Anke M., 2005).

1.2.10. Stroncij

Stroncij iako nikad nije pokazano da je esencijalni element, svoju biološku ulogu može zahvaliti relativnom sličnošću s atomima kalcija. Primjerice, sol stroncija - stroncijev ranelat se gotovo u potpunosti deponira u kosti, osigurava njihova mehanička svojstva i smanjuje incidenciju fraktura kod oboljelih od osteoporoze (Weber i sur., 2004).

1.2.11. Željezo

Željezo je primarno, u ljudskom organizmu, potrebno za prijenos kisika do svake stanice u organizmu. Naime, željezo u sklopu hemoglobina tu funkciju obavlja u sistemskoj cirkulaciji, dok istu funkciju u obliku mioglobin obavlja u mišićima. Ne treba zanemariti i njegovu ulogu u normalnom rastu i razvoju stanica, a samim time i tkiva te sintezi nekih hormona. Potreba za dnevnim unosom željeza najviše ovisi o spolu te o menstrualnom statusu osobe. Stoga, RDA za muškarce i postmenopausalne žene iznosi 8 mg dnevno, dok za žene s aktualnim menstrualnim ciklusom kod kojih je mjesecni gubitak velik, iznosi 18 mg dnevno. Nedostatak željeza liječi se njegovim različitim oblicima, a glavni simptomi koji karakteriziraju deficit su umor, malaksalost i blijedoća kože (Aliasgharpour i Farzami, 2015; Al-Fartusie i Mohssan, 2017; Aliasgharpour, 2020).

1.3. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)

Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (eng. Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry, TXRF) varijacija je energetsko disperzne rendgenske fluorescencijske spektrometrije (eng. Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry, EDXRF) s poboljšanim svojstvima. Koristi se za kvalitativnu i kvantitativnu kemijsku elementarnu analizu. TXRF je instrumentalna analitička tehnika čija se mjerena temelje na fizikalnom fenomenu totalne refleksije X-zraka. Primarna upadna zraka obasjava uzorak pod iznimno malim kutom ($<0,1^\circ$) što dovodi do povećanja reflektivnosti X-zraka. Vrlo mali upadni kut omogućava da se detektor nalazi u neposrednoj blizini uzorka ($\sim 0,5\text{ mm}$) što uzrokuje povećan prinos fluorescencije, dok je apsorpcija zrakom vrlo mala zbog male udaljenosti između samog uzorka i detektora. Posljedica ovakve izvedbe instrumenta je mogućnost postizanja nižih granica detekcije u usporedbi s dostupnim konvencionalnim EDXRF tehnikama ($\mu\text{g/kg}$ i $\mu\text{g/L}$). Također, zbog totalne refleksije X-zraka efekti matrice kao što su apsorpcija i sekundarno pobuđenje u većini slučajeva se mogu zanemariti (Klockenkämper R. i von Bohlen A., 2015). TXRF je multielementarna tehnika koja se može primijeniti za analizu različitih uzoraka, kao što su npr. biljni materijali, kozmetika, voda za piće, biološki uzorci (krv, plazma, serum, urin, tkiva, kosa i dr.), uzorci tla i dr. Dodatna prednost TXRF-a u odnosu na druge tehnike za elementarnu analizu je u tome što može analizirati uzorce u čvrstom stanju, u obliku otopina i u obliku suspenzija. Ovisno o tipu uzorka analiza može biti direktna ili nakon pripreme uzorka (razrjeđenje, suha ili mokra digestija, mikrovalna digestija i dr.). Većina drugih tehnika kao što su atomska apsorpcijska

spektroskopija (eng. Atomic absorption spectroscopy, AAS), induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (eng. Inuctively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) te inuktivno spregnuta plazma s atomskom emisijskom spektroskopijom (eng. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-OES) može analizirati samo tekuće uzorke i sama priprema uzorka je uglavnom zahtjevnija. Analiza zahtijeva vrlo malu količinu uzorka i malu količinu otapala nekoliko μL ili ng . Kvantifikacija je brza i jednostavna te se u većini slučajeva može provesti pomoću unutarnjeg standarda (eng. Internal standard, IS). Kao unutarnji standard koristi se element koji se ne nalazi u samom uzorku, a najčešće primjenjivani su Ga, Y, V, Rh i dr. Jednostavna je za uporabu, a novi stolni sustavi ne trebaju plin ili medij za hlađenje što uveliko utječe i na samu cijenu analize. Kako se danas posvećuje velika pažnja primjeni analitičkih tehnika/metoda koje vode brigu o načelu "zelene analitičke kemije" prvenstveno potrošnja manje količine reagensa, energije, stvaranje manjih količina otpada, siguran i brz postupak, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu (Dalipi i sur., 2018; Marguí i sur., 2022). Za procjenu „zelenosti“ metode korišten je AGREE kalkulator (Pene Pereira F., 2020). Kroz 12 pitanja o metodi koji se temelje na 12 principa zelene kemije prikazanih u Tablici 1., dajući jednaku težinu svakom pitanju, procjenjuje njenu ekološku prihvatljivost pritom ih ocjenjujući od 0,00 kao ekološki najneprihvatzivije metode do 1,00 kao ekološki najbolje metode (www.sigmaldrich.com).

Tablica 1. 12 principa zelene kemije.

Princip	Pojašnjenje
1. Prevencija	Bolje je prevenirati nastanak otpada nego se nositi s posljedicama njegovog zbrinjavanja
2. Ekonomično iskorištavanje materijala	Potrebno je maksimizirati uklapanje svih materijala u konačni proizvod
3. Manje stvaranje toksičnih supstanci	Kada god je moguće potrebno je minimizirati nastanak toksičnih supstanci
4. Dizajn sigurnijih supstanci	Uz zadržavanje njihovih funkcija potrebno je izbjegavati korištenje toksičnih supstanci
5. Sigurnija otapala i pomoćne tvari	Cilj je izbjegavati korištenje otapala gdje god je moguće, ukoliko to nije moguće potrebno je koristiti „zelenija“ otapala
6. Energetska učinkovitost	Najbolje bi bilo koristiti korake koji se odvijaju na „sobnoj temperaturi“
7. Obnovljivi izvor	Potrebno je u metodu uvrstiti što više supstanci iz obnovljivih izvora
8. Redukcija derivatizacije	Bilo bi dobro ukloniti međukorake koji zahtijevaju dodatno generiranje otpada pri manipulaciji i promjeni ispitivanog uzorka
9. Kataliza	Katalizatori su preferirani u odnosu na povećanje stehiometrijskih odnosa
10. Dizajn raspada	Produkti analize trebali bi biti nepostojani u okolišu
11. „Real time“ analiza	Proces analize idealno bi bio u realnom vremenu spriječio formiranje štetnih supstanci
12. Prevencija nesreća	Potrebno je koristiti supstance koje minimiziraju rizik od nesreća pri radu (požar, eksplozija, trovanje...)

2. Obrazloženje teme

Budući da je okolišni otisak proizvodnje i prerade hrane sve veći kao i potreba za sirovinama, nužno je poboljšati valorizaciju nusproizvoda koji nastaju kao sekundarne sirovine u procesima dobivanja nutritivno važnih spojeva – prirodnih aditiva, funkcionalnih sastavnica ili nutraceutika.

Godišnje se u svijetu proizvede i preradi oko 130 milijuna tona rajčice nakon čega zaostaje oko 8 milijuna tona otpada što predstavlja veliki ekonomski gubitak i ima negativne učinke na okoliš. Otpad rajčice čine uglavnom kožica i sjemenke rajčice, a bogat je različitim fitokemikalijama (karotenoidima i polifenolima), prehrambenim vlaknima (osobito pektinom) i esencijalnim nutrijentima (vitaminima i mineralima).

U postupku valorizacije komine rajčice kao sekundarne sirovine važno je primjenjivati jednostavne, reproducibilne i točne analitičke tehnike/metode koje udovoljavaju principima zelene kemije te smanjuju ili u potpunosti izbjegavaju korištenje toksičnih i oksidirajućih kemikalija. „Zeleniji“ pristup određivanju mineralnog sadržaja svakako predstavlja i primjena TXRF-a koja se u posljednje vrijeme sve više koristi u analitici hrane te postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu.

Osnovni ciljevi ovog rada su istražiti primjenjivost rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom u istraživanju mineralnog sadržaja komine rajčice procesuirane u različitim uvjetima. Rezultati ovog istraživanja doprinijet će trenutnim saznanjima o prednostima i nedostacima navedene analitičke tehnike te daljnjoj valorizaciji komine rajčice kao sekundarne sirovine bogate nutritivno važnim mineralima.

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije

- Dušična kiselina 65% (Carlo Erba, Milano, Italija)
- Vodikov peroksid 30% (Gram mol, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina silikona u izopropanolu (Serva, Heidelberg, Njemačka)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ultra-čista voda (provodljivost 0,055 µScm-1)
- Galij Standard 1000 µg/mL (Agilent, Santa Clara, SAD)
- Certificirani referentni materijal listova rajčice CRM 1573a – Tomato leaves (Institute of National Institute of Standards and Technology NIST, Gaithersburg, SAD)

3.2. Aparatura i instrumenti

- Uredaj za ultračistu vodu (SG Ultra Clear UV Plus povezan sa ionskim izmjenjivačem SG-2800, Barsbüttel, Njemačka)
- Analitička vaga LE225D (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Uredaj za soniciranje Transsonic T570 (Elma, Singen, Njemačka)
- Jedinica za mikrovalnu digestiju MLS1200mega (Milestone, Italija)
- Vortex GENIUS 3 (IKA, Wilmington, SAD)
- Grijača ploča C-MAG HS7 digital (IKA, Wilmington, SAD)
- Automatske pipete 10/ 100/ 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- TXRF uređaj S2 PICOFOX (BrukerNano, GmbH, Berlin, Germany)
- Vibracijska tresilica za određivanje veličina čestica AS 200 Basic (Retsch Mill, Düsseldorf, Njemačka)
- Mlin Polymix© PX-MFC 90D-Blade grinding (Kinematika AG, Malters; Switzerland)
- Program Microsoft Excel 2016 / dio programa Microsoft Office (Microsoft, SAD).
- Programska paket GraphPad (Dotmatics, SAD)
- Program Design Expert 12.0.8.0. (Stat-Ease, SAD).
- Program AGREE calculator (Pene Pereira F. 2020)

3.3. Priprema uzorka komine rajčice

Uzorak korišten u istraživanju je komina autohtonih vrsta rajčice koje potječu s područja Republike Hrvatske, a koja je zaostala nakon obrade cjelovitog ploda kuhanjem u vremenskom periodu od 60 minuta nakon ključanja, pasiranjem i odvajanjem soka. Komina rajčice predstavlja ostatak ploda rajčice nakon dobivanja soka. Samu kominu čine sjemenke,

kožica i dio perikarpa te placente ploda. Komina je sušena na 70 °C u termostatu ili liofilizacijom tijekom 48 sati. Nakon sušenja, komina je samljevena pomoću mlini pri brzini 6000 rpm (eng. revolution per minute) koristeći sito promjera pora od 2 mm pri čemu se dobiva nešto manje grub prah. Vrste i oznake analiziranih uzoraka s obzirom na frakciju komine i uvjete sušenja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Opis korištenih uzoraka.

Podrijetlo uzorka	Predobrada uzoraka	Godina proizvodnje	Naziv	Oznaka uzorka
Komina rajčice (KR)	Sušena na 70 °C (70 °C)	2022.	KR 2022. 70 Š2	KR70
Komina rajčice (KR)	Sušena liofilizacijom (LIO)	2022.	KR 2022. LIO Š2	KRLIO
Pokožica rajčice (POK)	Sušena na 70 °C (70 °C)	2022.	KR 2022. 70 °C Š1- pokožica	POK70

3.4. Priprema uzorka za TXRF

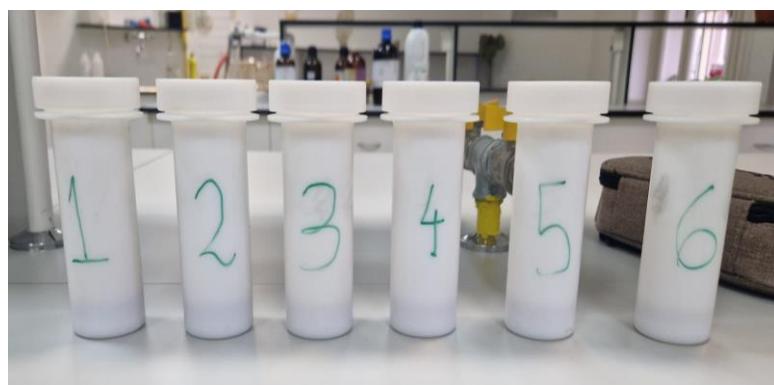
3.4.1. Priprema uzorka za TXRF postupkom mikrovalne digestije

Svo posuđe korišteno u procesu demineralizacije uzorka namočeno je preko noći u 10% HNO₃ i nakon toga isprano demineraliziranim vodom i osušeno. Uzorci su izvagani direktno u teflonskim kivetama za digestiju (Slika 1), dodano je 2 mL 30% H₂O₂ i 5mL 65% HNO₃ te stavljeni na mikrovalnu digestiju u uređaj Milestone (MLS1200 mega) Italija (Slika 2) prema programu kojeg proizvođač preporuča za organske uzorce sa brzim egzotermnim reakcijama poput voća, povrća i raznih biljnih produkata, a sastoji se od sljedećih koraka :

- Korak 1 – 250W, 1 minuta
- Korak 2 – 0W , 2 minute
- Korak 3 – 250W, 5 minuta
- Korak 4 – 400W, 5 minuta
- Korak 5 – 600W, 5 minuta

Nakon postupka spaljivanja, uzorci su ohlađeni u uređaju za hlađenje s tekućom vodovodnom vodom uz napomenu kako sama voda nikako nije mogla pristupiti uzorcima pa samim time

niti kontaminirati uzorak s obzirom da su teflonske kivete hermetički zatvorene. Nakon hlađenja uzorci su kvantitativno prebačeni u odmjerne tikvice od 50 mL i tikvice su nadopunjene do oznake ultra čistom vodom. Otopine su prebačene u plastične bočice u kojima su čuvani do trenutka analize. Odvage uzorka prikazane su Tablici 3 (uzorci 9. i 10 predstavljaju slijepu probu, koja se sastoji isključivo od 2 mL 30% H_2O_2 te 5 mL 65% HNO_3 , tretiranu na identičan način kao i ostali uzorci).



Slika 1. Teflonske kivete s izvaganim uzorcima.



Slika 2. Teflonske kivete s izvaganim uzorcima smještene u uređaj za mikrovalnu digestiju.

Tablica 3. Odvage digeriranih uzoraka.

Redni broj uzorka	Naziv uzorka	Masa uzorka (g)
1.	KR70 1 digest.	0,4012
2.	KR70 2 digest.	0,4000
3.	KRLIO 1 digest.	0,3996
4.	KRLIO 2 digest	0,3742
5.	POK 1 digest.	0,3993
6.	POK 2 digest.	0,4119
7.	CRM 1 digest.	0,2013
8.	CRM 2 digest.	0,2028
9.	SLIJEPA 1 digest.	0,0000
10.	SLIJEPA 2 digest.	0,0000

*kratica digest. označava uzorak pripremljen postupkom digestije

3.4.2. Priprema uzorka u obliku suspenzije

Jedan od kritičnih parametara za pripremu homogenih suspenzija je veličina čestica samog praškastog uzorka. Gallardo i sur. (2016) pokazali su da se korištenjem veličina čestica praškastog uzorka $< 63 \mu\text{m}$ postiže zadovoljavajuća homogenost suspenzije. 0,5 do 1 kg originalnih uzoraka preneseno je na sito veličine pora $45 \mu\text{m}$ te mehanički protresivano na tresilici do pojave finog puderastog praha u donjoj posudi ispod sita. Nekoliko grama tog puderastog praha preneseno je u Eppendorf® epruvetu i čuvano do trenutka analize. Prilikom uzimanja uzorka, svi su laboratorijski instrumenti prethodno bili u potpunosti oprani detergentom, isprani demineraliziranim vodom te osušeni, a uzorak koštica nije dalje tretiran budući da nema mogućnost postizanja dovoljnog stupnja usitnjjenosti. Naime, nakon izdvajanja koštica pincetom, pokušano je nekoliko načina njihovog usitnjavanja. Primarno je pokušano u tarioniku s tučkom pa i u električnom mlinu, no niti jedan način nije se pokazao dobrim jer uzorak nije bio odmašćen te se formirala masna „pasta“ s potpunom nemogućnošću prolaska kroz sito veličine $45 \mu\text{m}$.

3.4.3. Priprema otopina Triton X-100®-a

Triton X-100® je neionski surfaktant korišten u mnogim sredstvima za čišćenje. Po konzistenciji je gusta tekućina čija je uloga povećanje homogenosti sustava Razrijedjene

otopine od 1% i 5% pripremljene su vaganjem odgovarajuće količine Tritona X-100®-a te se nadopune s ultračistom vodom do odgovarajućeg volumena.

3.4.4. Priprema otopine internog standarda

U ovom istraživanju kao unutarnji standard korištena je standardna otopina Ga. Iz maticne otopine Ga koncentracije 1000 µg/mL pripremljena je radna otopina IS koncentracije 200 mg/kg razrjeđenjem s ultračistom vodom.

3.4.5. Priprema kvarcnih nosača

Nakon temeljitog čišćenja kvarcnih nosača prema koracima koje preporuča proizvođač, na kvarcne nosače se nanese otopina silikona u izopropanolu (10 µL) te se osuše na grijaćoj ploči (~40 °C). Nakon sušenja nosači su spremni za nanošenje uzorka i daljnju analizu.

3.4.6. Dizajn eksperimenta

Za dizajn eksperimenata korišten je program Design-Expert (Stat Ease, USA). Za optimizaciju pripreme uzorka korišten je Box – Behnkenov dizajn koji se temelji na metodi odzivne površine (engl. Response Surface Methodology, RSM).

RSM je skup statističkih i matematičkih modela kojima se analiziraju utjecaji nekoliko nezavisnih varijabli na promatrani odziv. U ovom radu analiziran je utjecaj sljedećih nezavisnih varijabli: otapalo (X_1), vrijeme soniciranja (X_2) i volumen uzorka koji se nanosi na nosač (X_3) na promatrani odziv (koncentracija Mn, Fe, Cu i Zn u uzorcima referentnog materijala NIST CRM 1573a – Tomato leaves).

Cilj korištenja Box-Behnken dizajna je odrediti najvažnije parametre za pripremu uzorka. Analitički odgovor bio je prinos ispitivanih elemenata izračunat korištenjem vrijednosti dobivenih za kontrolni uzorak lista rajčice (NIST CRM 1573a). Regresijskom analizom rezultata predviđene su optimalne kombinacije tri nezavisne varijable (uvjeti pripreme uzorka) s obzirom na dobivene vrijednosti zavisne varijable (sadržaj Mn, Fe, Cu i Zn). Uzimajući u obzir dizajn optimizacije procesa koji ima tri eksperimentalne varijable (X_1 , X_2 i X_3) i eksperimentalni odgovor (Y), eksperimentalni podaci se mogu uklopiti u linearni polinomni model i kvadratni polinomni model prema sljedećim jednadžbama:

$$(Y) = a + b(X_1) + c(X_2) + d(X_3) + h(X_1)(X_2) + i(X_1)(X_3) + j(X_2)(X_3) \quad (1)$$

$$(Y) = a + b(X_1) + c(X_2) + d(X_3) + e(X_1)^2 + f(X_2)^2 + g(X_3)^2 + h(X_1)(X_2) + i(X_1)(X_3) + j(X_2)(X_3) \quad (2)$$

gdje je (Y) eksperimentalni odgovor koji treba optimizirati (zavisna varijabla); (a) regresijski koeficijenti za odsječak; (b), (c) i (d) koeficijenti linearnih faktora; (e), (f) i (g) koeficijenti kvadratnih članova, a (h), (i) i (j) koeficijenti interakcije između tri varijable (X_1 - otapalo; X_2 – vrijeme soniciranja; X_3 – volumen uzorka). U svrhu lakšeg signiranja varijablama su dodijeljene oznake sukladno Tablici 4.

Tablica 4. Neovisne varijable i njihove vrijednosti u Box-Behnken-ovom dizajnu.

Razine				
Nezavisne varijable	Kod	-1	0	1
Otapalo	X_1	miliQ voda	1% Triton	5% Triton
Vrijeme soniciranja (min)	X_2	0	15	30
Volumen uzorka (μL)	X_3	5	8	10

3.5. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)

Multielementna analiza svih uzoraka provedena je korištenjem TXRF sustava (S2 PICOFOX, Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin, Njemačka) opremljenog rendgenskom cijevi od 40 W s molibdenovom (Mo) anodom i višeslojnim monokromatorom (17,5 keV). Karakteristično zračenje elemenata prisutnih u uzorku detektira se silikonskim detektorom s aktivnim područjem od 10 mm^2 i razlučivosti od 139,43 eV (Mn $K\alpha$). Mjerenja su izvršena pri 50 kV i $750 \mu\text{A}$ uz vrijeme mjerenja od 600 s.

3.5.1. Priprema uzorka pomoću mikrovalne digestije za TXRF analizu

1g otopine mineraliziranog uzorka prenese se u Ependorff® epruvetu i doda se 0,05 g otopine IS-a koncentracije 200 mg/kg. Uzorak se homogenizira pomoću vortex mješača (~15 sekundi). $10 \mu\text{L}$ tako pripremljene otopine prenese se na sredinu kvarcnog nosača. Isti postupak ponavlja se za svaki od digestiranih uzoraka, a potom se nosači postave na grijaču ploču približne temperature 40°C . Nakon sušenja, uzorci se unose u instrument te analiziraju.

U Tablici 5 nalaze se podaci o točnim odvagama/koncentracijama otopina uzoraka i unutarnjeg standarda te faktorima razrjeđenja.

Tablica 5. Priprema digeriranih uzoraka.

Naziv uzorka	Masa otopine (g)	Ukupna masa (g)	Masa otopine Ga (g)	Masa Ga (μg)	Faktor razrjeđenja	Koncentracija Ga (ppm)
POK-1 digest.	1,0453	1,0932	0,0479	9,81	1,05	8,97
POK-2 digest.	1,0289	1,0776	0,0487	9,97	1,05	9,26
KR70-1 digest.	1,0394	1,0894	0,05	10,24	1,05	9,40
KR70-2 digest.	1,0414	1,0904	0,049	10,04	1,05	9,20
KRLIO-1 digest.	1,0385	1,0874	0,0489	10,02	1,05	9,21
KRLIO-2 digest.	1,0446	1,093	0,0484	9,913	1,05	9,07
CRM-1 digest	1,0435	1,0928	0,0493	10,10	1,05	9,24
CRM-2 digest	1,0429	1,092	0,0491	10,06	1,05	9,21

*u dalnjem tekstu srednja vrijednost svakoga uzorka označavat će se s imenom uzorka uz oznaku digest. koja označava kako je uzorak pripremljen postupkom digestije

3.5.2. Priprema uzoraka u obliku suspenzije za TXRF analizu

Praškasti uzorci pripreme se u obliku suspenzije vaganjem približno 0,02 g uzorka te dodavanjem 1 g otopine 1% Triton-a i 0,05 g otopine IS-a. Uzorci se zatim homogeniziraju pomoću vorteks mješača približno 1 minutu. Na kvarcni nosač nanese se 10 μL pripremljene suspenzije te se osuši na grijačoj ploču, temperature približno 40. Nakon postupka sušenja nosač se unosi u TXRF (Slika 3). Točne odvage/koncentracije uzoraka i unutarnjeg standarda prikazani su u Tablici 6.



Slika 3. Priprema uzoraka u obliku suspenzije za TXRF analizu.

Tablica 6. Odvage, parametri dilucije i parametri internog standarda (Ga) suspendiranih uzoraka.

Naziv uzorka	Masa uzorka(g)	Masa otopine (g)	Ukupna masa (g)	Masa otopine Ga (g)	Masa Ga (μg)	Koncentracija Ga (ppm)
KR70Š1 1	0,0222	0,9727	1,0224	0,0497	10,18	9,96
KR70Š1 2	0,0205	1,0131	1,0644	0,0513	10,51	9,87
POK70Š1 1	0,0205	0,9994	1,0489	0,0495	10,4	9,67
POK70Š1 2	0,0217	1,0215	1,0711	0,0496	10,16	9,48
KRLIOŠ2 1	0,0198	0,9986	1,0444	0,0458	9,38	8,98
KRLIOŠ2 2	0,021	1,0166	1,0659	0,0493	10,10	9,47
CRM 1	0,02	1,0037	1,0525	0,0488	9,99	9,50
CRM 2	0,0228	1,0239	1,0772	0,0533	10,92	10,13

*u dalnjem tekstu srednja vrijednost svakoga uzorka označavat će se s imenom uzorka uz oznaku susp. koja označava kako je uzorak pripremljen postupkom suspenzije

3.6. Statistička obrada rezultata

Sve analize provedene su u duplikatu. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti paralelnih mjerena \pm standardna devijacija. Usporedba dobivenih rezultata provedena je primjenom studentovog t – testa ili jednosmjerne analize varijance (ANOVA) uz granicu značajnosti definiranu kao $p \leq 0,05$. Statistička obrada podataka napravljena je računalnim programom Microsoft Excel 2016 koji je dio programa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Dizajn eksperimenta temeljio se na Box-Behnkenovom modelu koji je obrađen u program Design Expert 12.0.8.0. (Stat-Ease, SAD). Valjanost modela potvrđena je analizom varijance (ANOVA) pri čemu su P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane statistički značajnima.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Mineralni sadržaj certificiranog referentnog materijala i analiziranih uzoraka pripremljenih metodom digestije

Analizom standardnog referentnog materijala (NIST 1573a) TXRF-om te usporedbom izmjerene vrijednosti s onim dobivenim od strane proizvođača, procjenjuje se točnost same metode (Tablica 7). Iz rezultata je vidljivo da je točnost zadovoljavajuće razine, sve su vrijednosti približne deklariranim vrijednostima.

Tablica 7. Dobiveni rezultati sadržaja elemenata u standardnom referentnom materijalu pripremljenog postupkom mikrovalne digestije pomoću TXRF analize.

Mineral	CRM pripremljen mikrovalnom digestijom				
	TXRF	Deklarirana vrijednost		Točnost (%)	
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	
K(mg/kg)	21 775	3007	26 760	480	81,4
Ca(mg/kg)	45 227	8080	50 450	550	89,6
Cr(mg/kg)	1,5607	0,3679	1,988	0,034	78,5
Mn(mg/kg)	258,3	15,082	246,3	7,1	104,9
Fe(mg/100g)	384,75	9,5645	367,5	4,3	104,7
Cu(mg/kg)	5,8527	0,1839	4,7	0,14	124,5
Zn(mg/kg)	37,457	0	30,94	0,55	121,1
Br(mg/kg)	586,83	58,491	1300	/	45,1
Rb(mg/kg)	10,795	0,1839	14,83	0,31	72,8
Sr(mg/kg)	90,782	1,1036	85	/	106,8

Na isti način dobiveni su rezultati mineralnog sadržaja i za ispitivane uzorke pripremljene metodom digestije. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Dobivene vrijednosti elemenata u uzorcima pripremljenih metodom mikrovalne digestije.

Mineral	KR70 digest.		POK70 digest.		KRLIO digest.	
	Srednja vrijedost	Standardna Devijacija (SD)	Srednja vrijedost	Standardna Devijacija (SD)	Srednja Vrijedost	Standardna Devijacija (SD)
K(mg/kg)	10788	725,1	19207	1277	11771	3361
Cr(mg/kg)	1,243	0,6489	1,169	0,7543	1,060	0,0831
Mn(mg/kg)	15,30	2,056	25,97	4,011	18,17	0,6783
Fe(mg/100g)	117,5	34,64	202,9	125,7	131,4	0,6784
Ni(mg/kg)	2,026	1,014	1,423	0,3947	1,66	0,2235
Cu(mg/kg)	10,92	1,772	14,98	1,409	37,14	17,67
Zn(mg/kg)	28,11	2,074	31,18	2,022	45,76	10,03
Br(mg/kg)	3,072	0,273	5,093	0,3495	3,227	0,214
Rb(mg/kg)	3,665	0,087	8,975	0,8266	3,562	0,094
Sr(mg/kg)	2,288	0,089	4,848	0,9226	2,852	0,3169

4.2. Optimizacija TXRF metode primjenom metode eksperimentalnog dizajna

Korištenjem Box – Behnkenovog dizajna dobiveno je 15 različitih kombinacija nezavisnih varijabli s 3 ponavljanja u centralnoj točki (1% Triton, soniciranje 15 min, volumen uzorka 8 μL) kod uzoraka 3., 4., 8. kao što je prikazano u Tablici 9. što čini jednu od prednosti ovog dizajna jer značajno smanjuje broj potrebnih ispitivanja za dizajniranje modela.

Tablica 9. Prikaz korištenog Box-Behnken dizajn za optimizaciju parametara za određivanje sadržaja minerala i dobivene vrijednosti iskorištenja.

Redni broj mjerena	Otapalo	Vrijeme soniciranja (min)	Volumen uzorka (μL)	Mn* (%)	Fe* (%)	Cu* (%)	Zn* (%)
1	0	-1	1	104,31	103,67	106,92	117,26
2	-1	0	1	108,79	99,64	114,57	122,29
3	0	0	0	102,85	102,97	110,93	136,94
4	0	0	0	99,07	97,51	105,90	111,81
5	0	1	-1	104,07	110,50	110,91	134,70
6	-1	1	0	114,50	92,23	109,88	129,45
7	1	0	1	95,15	112,09	119,97	108,87
8	0	0	0	101,64	108,34	107,25	118,32
9	0	-1	-1	104,07	112,61	108,19	125,57
10	0	0	-1	97,85	95,06	102,25	133,30
11	-1	1	1	169,03	206,14	188,81	243,53
12	0	0	-1	108,95	90,63	131,51	154,93
13	-1	-1	0	105,53	104,58	103,74	121,31
14	1	1	0	97,03	119,66	114,41	132,50
15	1	-1	0	100,49	102,88	110,66	133,74

*Vrijednosti iskorištenja izračunate na osnovu dobivenih vrijednosti TXRF

analizom uzoraka i FAAS analizom uzetom za referentnu metodu.

Postotak iskorištenja varirao je :

od 95,15% do 169,03% za Mn,

od 90,63% do 206,14% za Fe,

od 102,25% do 188,81% za Cu,

od 108,87% do 243,53% za Zn.

Analizom eksperimentalnih podataka utvrđeno je da se utjecaj uvjeta pripreme uzorka na koncentraciju izmjerениh elemenata u slučajevima Mn i Fe može prikazati modelom kvadratne polinomne jednadžbe dok u slučajevima Cu i Zn može prikazati modelom linearne polinomne jednadžbe:

$$\text{Mn (\%)} = 101,18 - 3,13(X_1) + 8,78(X_2) + 7,79(X_3) - 7,24(X_1)^2 + 10,44(X_2)^2 + 8,74(X_3)^2 - 3,11(X_1)(X_2) - 6,18(X_1)(X_3) + 16,18(X_2)(X_3) \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{Fe (\%)} = & 102,94 + 4,22(X_1) + 13,099(X_2) + 14,09(X_3) - 15,99(X_1)^2 + 17,89(X_2)^2 + 12,40(X_3)^2 \\ & + 7,28(X_1)(X_2) + 4,22(X_1)(X_3) + 26,14(X_2)(X_3) \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \text{Cu (\%)} = & 116,39 + 5,76(X_1) + 11,81(X_2) + 9,68(X_3) - 0,60(X_1)(X_2) - 5,96(X_1)(X_3) + \\ & 19,79(X_2)(X_3) \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \text{Zn (\%)} = & 134,97 + 2,96(X_1) + 17,79(X_2) + 5,43(X_3) - 2,34(X_1)(X_2) - 8,76(X_1)(X_3) + \\ & 29,28(X_2)(X_3) \end{aligned} \quad (6)$$

Analiza varijance (ANOVA) je korištena za procjenu značaja svake ispitivane varijable. Nakon uklapanja eksperimentalnih podataka u odgovarajuće polinomne modele, valjanost modela potvrđena je analizom varijance. Odabrani kvadratni modeli pokazali su se statistički značajnima (P -vrijednost $< 0,05$). Vrijednosti koeficijenta determinacije kod svih ispitivanih elemenata ($r^2 > 0,979$) relativno su blizu jediničnoj vrijednosti što pokazuje dobru reprezentativnost modela. Odstupanje modela se niti u jednom slučaju nije pokazalo kao statistički značajno na što ukazuju niske F -vrijednosti te visoke P -vrijednosti (Tablica 10).

Tablica 10. Analiza varijance (ANOVA) za kvadratni model optimizacije ekstrakcijskih parametara za Mn i Fe.

Mn

Izvor	SS	Df	MS	F-vrijednost	P-vrijednost
Model	3,333	9	0,370	95,57	0,02847
Odstupanje modela	1,067	3	0,355	1,72	0,104
Čista pogreška	0,0616	2	0,0205		

Fe

Izvor	SS	Df	MS	F-vrijednost	P-vrijednost
Model	3,333	9	0,370	95,57	0,02847
Odstupanje modela	1,067	3	0,355	2,92	0,125
Čista pogreška	0,0616	2	0,0205		

Tablica 11. Analiza varijance (ANOVA) za polinomni model optimizacije ekstrakcijskih parametara za Cu i Zn.

Cu

Izvor	SS	Df	MS	F-vrijednost	P-vrijednost
Model	0,384	6	0,64	60,55	0,0163
Odstupanje modela	0,248	6	0,413	2,05	0,1709
Čista pogreška	0,137	2	0,684		

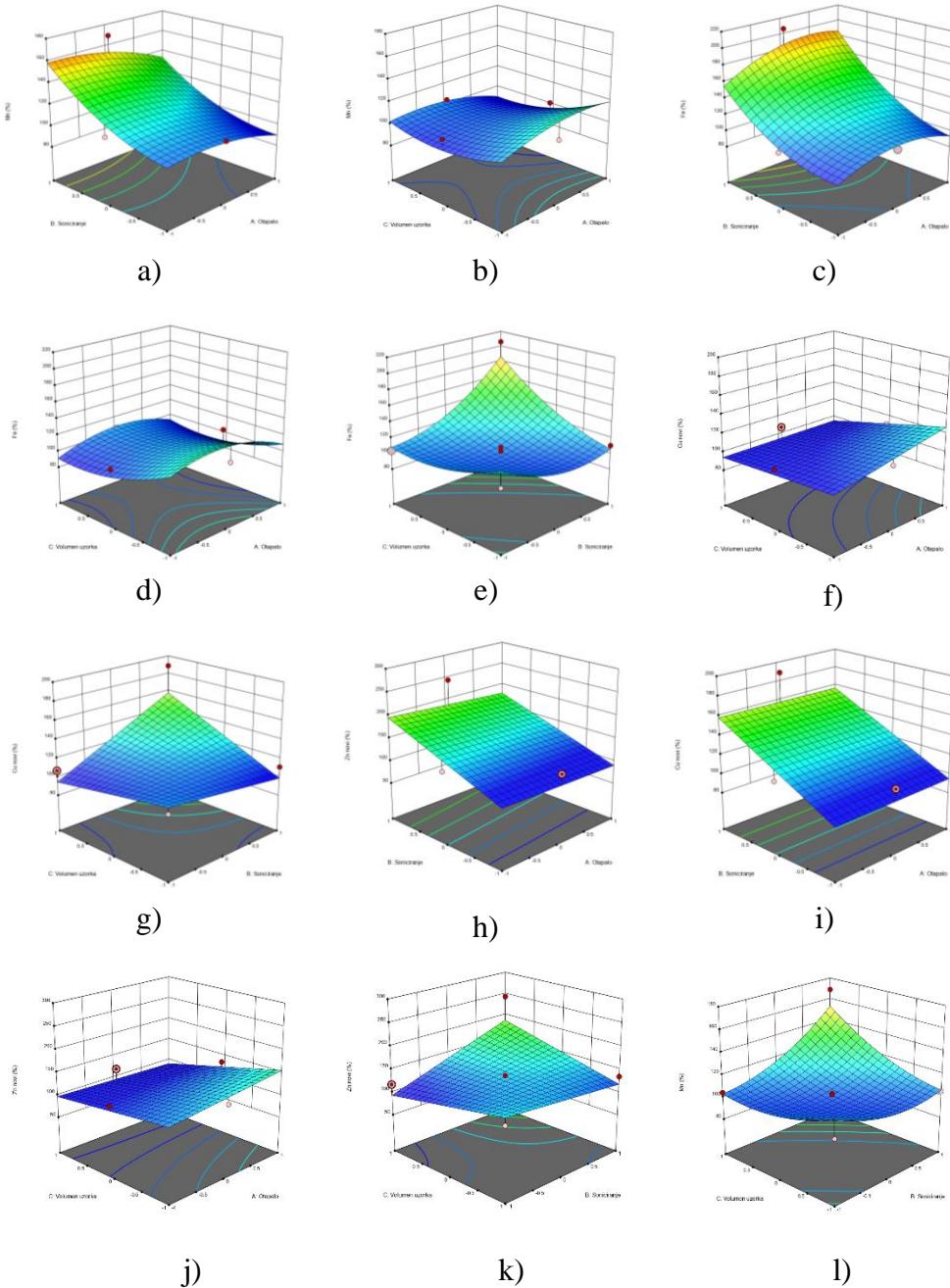
Zn

Izvor	SS	Df	MS	F-vrijednost	P-vrijednost
Model	0,659	6	0,109	7,38	0,0429
Odstupanje modela	0,787	6	0,125	1,12	0,1241
Čista pogreška	0,340	2	0,17		

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

Na osnovu dobivenog matematičkog modela, konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara te njihove interakcije na iznos zavisne varijable. Grafički prikaz odzivne površine dobiven je tako da su jedna zavisna

varijabla te dvije nezavisne varijable smještene na odgovarajućim osima koordinatnog sustava (x,y,z), dok je srednja vrijednost treće nezavisne varijable uzeta kao fiksna.



Slika 4. Grafički prikaz odzivne površine pojedinog metala o dva parametra optimizacije metode.

- a) Grafički prikaz odzivne površine Mn(%) o soniciranju i otapalu; b) Grafički prikaz odzivne površine Mn(%) o volumenu i otapalu;c) Grafički prikaz odzivne površine Fe (%) o soniciranju i otapalu; d) Grafički prikaz odzivne površine Fe(%) o volumenu uzorka i otapalu; e) Grafički prikaz odzivne površine Fe(%) o volumenu uzorka i soniciranju; f) Grafički prikaz odzivne površine Cu(%) o volumenu uzorka i otapalu; g) Grafički prikaz odzivne površine Cu (%) o volumenu i soniciranju; h) Grafički prikaz odzivne površine Zn(%) o soniciranju i otapalu; i) Grafički prikaz odzivne površine

Cu(%) o soniciranju i otapalu; j) Grafički prikaz odzivne površine Zn(%) o volumenu uzorka i otapalu; k) Grafički prikaz odzivne površine Zn(%) o volumenu uzorka i soniciranje; l) Grafički prikaz odzivne površine Mn(%) o volumenu i soniciranju

Iz navedenih rezultata, pomoću modela, zaključujemo kako optimalan doprinos za naš tip suspendiranih uzorka daje sljedeća kombinacija parametara:

- bez soniciranja
- volumen uzorka od 8 μl
- 1% Triton[®] kao otapalo

4.3. Mineralni sadržaj certificiranog referentnog materijala i analiziranih uzoraka pripremljenih metodom suspendiranja

Istovjetno standardnom referentnom materijalu pripremljenom pomoću metode mikrovalne digestije, rezultati analize CRM-a pripremljenog u obliku suspenzije, uspoređuju se s deklariranim vrijednostima te se određuje točnost metode za svaki pojedini element. (Tablica 12). Iz rezultata je vidljivo da i suspendirani, kao i uzorak pripremljen metodom digestije ranije, ima usporedive rezultate s deklariranim vrijednostima.

Tablica 12. Dobiveni rezultati sadržaja elemenata u standardnom referentnom materijalu pripremljenog u obliku suspenzije pomoću TXRF analize.

Mineral	CRM suspendirano					Točnost (%)
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)		
K(mg/kg)	20 037	151,99	26760	480	74,9	
Ca(mg/kg)	43 709	475,97	50450	550	86,6	
Cr(mg/kg)	1,938	0,10	1,988	0,034	97,5	
Mn(mg/kg)	249,7	0,47	246,3	7,1	101,4	
Fe(mg/100g)	354,6	13,33	367,5	4,3	96,5	
Cu(mg/kg)	5,496	0,2	4,7	0,14	116,9	
Zn(mg/kg)	31,00	0,36	30,94	0,55	100,2	
Br(mg/kg)	1431	33,87	1300	/	110,1	
Rb(mg/kg)	11,41	0,11	14,83	0,31	76,9	
Sr(mg/kg)	86,99	1,36	85	/	102,3	

Mineralni sadržaj analiziranih uzoraka, pripremljenih metodom suspendiranja prikazan je u Tablici 13.

Tablica 13. Mineralni sadržaj uzoraka pripremljenih u obliku suspenzije prethodno optimiziranom metodom.

Mineral	KR70 susp.		POK70 susp.		KRLIO susp.	
	Srednja vrijedost	Standardna Devijacija (SD)	Srednja vrijedost	Standardna Devijacija (SD)	Srednja vrijedost	Standardna Devijacija (SD)
K(mg/kg)	14 446	1110	16 911	483,3	18 919	544,9
Cr(mg/kg)	1,7695	0,3924	2,863	1,777	1,66	0,1471
Mn(mg/kg)	19,55	0,1047	24,84	2,888	16,15	0,4639
Fe(mg/100g)	124,3	22,00	213,2	1,901	123,4	1,653
Ni(mg/kg)	1,029	0,1655	0,7895	0,1661	0,965	0,181
Cu(mg/kg)	12,34	0,0651	17,75	0,012	19,30	1,393
Zn(mg/kg)	35,01	1,157	37,38	3,709	36,80	1,331
Br(mg/kg)	3,623	0,5735	8,512	0,4243	3,676	0,145
Rb(mg/kg)	3,92	0,5841	9,752	0,4653	4,927	0,1796
Sr(mg/kg)	1,122	0,1541	2,168	0,3642	1,482	0,1909

4.4. Usporedba dobivenih rezultata mineralnog sadržaja uzoraka pripremljenih s dvije različite metode

Rezultati analize CRM-a uspoređeni su s deklariranim mineralnim sadržajem određenim ICP-MS-om s obzirom da u trenutku izrade ovoga rada komercijalno nije bio dostupan niti jedan standardizirani referentni uzorka, sličnog matriksa, za TXRF metodu.

Obje metode pripreme uzoraka pokazale su usporedive rezultate s onim deklariranim, stoga se prednost daje metodi suspendiranja zbog njene jednostavnosti i usmjerenu ka „zelenoj kemiji“

Razina značajnosti razlika u točnosti dva analitička pristupa analizirana je primjenom t - testa, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 14.

Tablica 14. p-vrijednosti dobivene usporedbom rezultata analiza uzorka pripremljenih postupkom mikrovalne digestije i u obliku suspenzije.

Mineral	p vrijednost (KR70 digest.- KR70 susp.)	p vrijednost (POK70 digest.- POK70 susp.)	p vrijednost (KRLIO digest.- KRLIO susp.)
K(mg/kg)	0,06	0,14	0,10
Cr(mg/kg)	0,43	0,28	0,04
Mn(mg/kg)	0,10	0,78	0,19
Fe(mg/100g)	0,84	0,89	0,02
Ni(mg/kg)	0,30	0,17	0,08
Cu(mg/kg)	0,37	0,11	0,29
Zn(mg/kg)	0,05	0,17	0,34
Br(mg/kg)	0,35	0,01	0,13
Rb(mg/kg)	0,69	0,37	0,01
Sr(mg/kg)	0,01	0,06	0,03

Značajnima se smatraju razlike gdje je $p \leq 0,05$. a u tablici su označene podebljanim fontom

Iz dobivenih p -vrijednosti, uz kritičnu vrijednost $p = 0,05$, vidljivo je kako pojedine razlike u rezultatima pokazuju statistički značajno odstupanje. Navedene razlike mogu biti posljedica nehomogenosti pripremljenog uzorka, pogreška sustava ili neka vrsta specifične kontaminacije. Ipak, većina dobivenih vrijednosti nije se međusobno razlikovala s obzirom na način pripreme uzorka ($p > 0,05$).

Nadalje, u okviru provedenog istraživanja provedena je usporedba dvije metode pripreme uzorka s obzirom na njihov procijenjeni ekološki otisak. Za procjenu ekološke prihvatljivosti metoda korišten je AGREE kalkulator. Navedeni program kroz 12 pitanja o karakteristikama pojedine metode kvantificira razinu ekološke prihvatljivosti na način da svakom od 12 aspekata pridaje ocjenu od 0,00 (kao ekološki najneprihvatljivije metode) do 1,00 (kao ekološki najprihvatljivije metode). U Tablici 15 prikazana su pitanja i odgovori za postupke pripreme uzorka pomoću mikrovalne digestije i u obliku suspenzije.

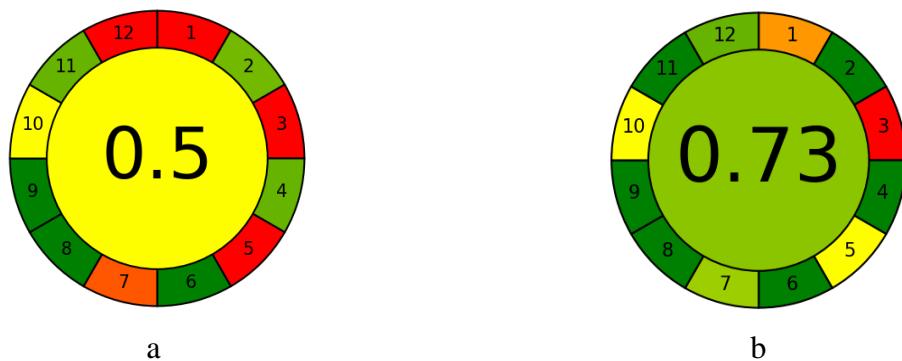
Tablica 15. Parametri dvaju različitih metoda pripreme uzorka.

Kriterij	Metoda s mikrovalnom digestijom	Metoda suspendiranja
Uzorkovanje	Vanjski uzorak (veliki broj koraka)	Vanjski uzorak (reduciran broj koraka)
Minimalna količina uzorka*	0,4 g	0,02 g
Položaj analitičkog instrumenta	Off- line	Off-line
Broj značajnih koraka	4	3
Automatizacija / priprema uzorka	Manualno/ ne minimizirano	Manualno/ minimizirano
Derivatizacija	/	/
Količina otpada	50 mL	1 g
Broj analita u jednom mjerenuju/ broj analita po satu	10/ 60	10 / 60
Korak najveće potrošnje energije	TXRF	TXRF
Podrijetlo reagenasa	Neki reagensi su iz obnovljivog izvora	Neki reagensi su iz obnovljivog izvora
Korištenje toksičnih reagensa i otapala	DA	NE
Prijetnje koje nisu izbjegnute	Toksično za vodenim okolišem, bioakumulirajuće, zapaljivo, oksidativno, ekspozivno, oksidativno i korozivno	Toksično za vodenim okolišem

*za parametar „minimalna količina uzorka“ prikazan je utrošak originalnog uzorka , dok je za količinu otpada prikazana masa uzorka preostalog nakon postupka mjerjenja.

Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 5. Iz prikaza je vidljivo da je AGREE score za postupak pripreme uzorka metodom mikrovalne digestije iznosio 0,5, dok je za postupak pripreme uzorka postupkom suspendiranja iznosio 0,73. Iz navedenog je vidljivo da

primjenom postupka pripreme uzorka suspendiranjem ekološku prihvatljivost postupka možemo povećati za čak 68,49 %.



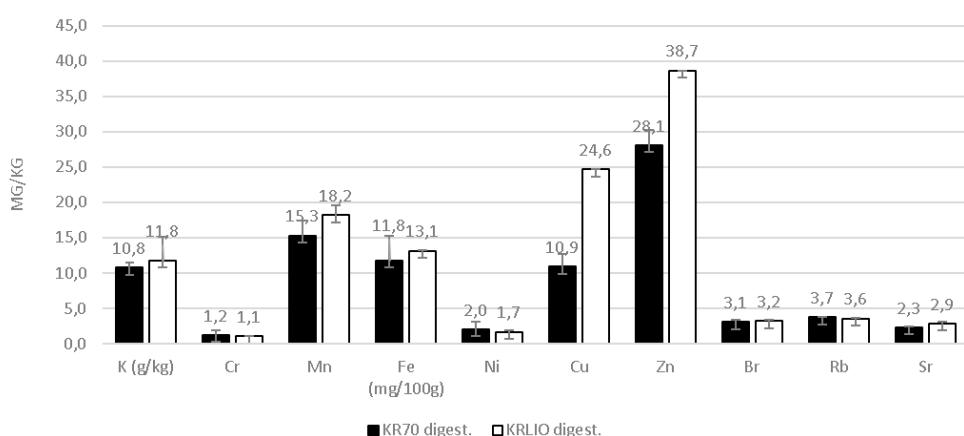
Slika 5. Rezultati dobiveni primjenom Agree kalkulatora za dvije različite metode.

a-AGREE score uzoraka pripremljenih postupkom mikrovalne digestije;

b-AGREE score uzoraka pripremljenih u obliku suspenzije.

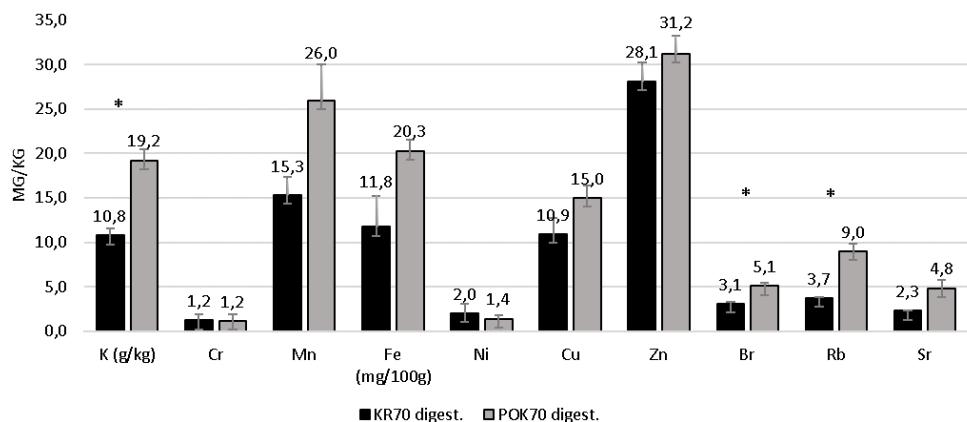
4.5. Usporedba mineralnog sadržaja komine i pokožice rajčice te utjecaj sušenja na mineralni sadržaj

Kako bi se istražio mogući utjecaj načina sušenja (sušenje u termostatu na 70 °C i liofilizacija) na udio nutritivno važnih minerala te utvrdila razlika u mineralnom sadržaju čiste pokožice i cjelovite komine rajčice, uspoređen je mineralni sadržaj uzoraka KR70 digest. i KRLIO digest. te KR70 digest. i POK70 digest.



Slika 6. Usporedba rezultata analize uzoraka KR70 digest. i KRLIO digest.

Iz rezultata prikazanih na Slici 6 je vidljivo kako je najzastupljeniji mineral u analiziranim uzorcima kalij (K), dok se od ostalih ističu mangan (Mn), bakar(Cu) i cink (Zn). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u udjelu pojedinih minerala u uzorcima pripunjjenim različitim postupcima sušenja ($p>0.05$).



Statistički značajne razlike u rezultatima mineralne analize na grafičkom prikazu označene su zvjezdicom ()

Slika 7. Usporedba rezultata analize uzoraka KR70 digest. i POK70 digest.

Na Slici 7 prikazana je usporedba mineralnog sadržaja cjelovite komine i čiste pokožice. Iz rezultata je vidljivo kako je mineralni sadržaj pokožice i cjelovite komine sličan, uz nekoliko iznimki. Naime udio kalija (K), bromra (Br) i rubidija (Rb) značajno je veći u čistoj pokožici u odnosu na intaktnu kominu.

Kako bi se rezultati mogli smjestiti u odgovarajući kontekst, potrebno je rezultate analize usporediti s drugim literaturnim navodima (Tablica 15). Prema Nour i sur. (2018) te Rehal i sur. (2022) mineralni sadržaj praha cjelovite komine pokazuje sljedeće rezultate u usporedbi s rezultatima ovoga rada (Tablica 16).

Tablica 16. Usporedba mineralnog satava uzorak KR70 digest. s literaturnim podacima.

Mineral	Uzorak KR70 digest.	Literaturni podatak
K(mg/kg)	10 788	10 115 (Rehal i sur., 2022)
Cr(mg/kg)	1,24	3,50 (Nour i sur., 2018)
Mn(mg/kg)	15,30	13,50 (Nour i sur., 2018)
Fe(mg/100g)	117,50	92,60 (Rehal i sur., 2022)
Cu(mg/kg)	10,92	11,50 (Nour i sur., 2018)
Zn(mg/kg)	28,11	34,60 (Rehal i sur., 2022)

Iz prikazane tablice vidljivo je da su rezultati dobiveni u ovom radu u skladu s dostupnim literaturnim podacima. Ipak, s obzirom na brojne faktore koji utječu na mineralni sadržaj cjelovite komine (poput sorte rajčice, vrste tla, karakteristikama vode za navodnjavanje, klime, različite predobrade uzorka) za očekivati je da se rezultati različitih autora mogu značajno razlikovati.

5. Zaključak

- Na temelju rezultata istraživanja mineralnog sadržaja referentnog materijala (CRM), pokazalo se da je rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF) prihvatljiva analitička tehnika za određivanje sadržaja minerala u komini rajčice pripremljenih i postupkom mikrovalne digestije i u obliku suspenzije (dobiveni rezultati su u skladu s deklariranim sadržajem CRM-a).
- Rezultati optimizacije metode ukazuju da kombinacija 1%-tnog Triton-a X-100[®] uz izostavljanje koraka soniciranja i volumen uzorka od 8 µL daje najtočnije rezultate.
- Priprema uzorka u obliku suspenzije je kraća, jednostavnija i ima značajno manji ekološki otisak od pripreme uzorka vlažnim spaljivanjem potpomognutim mikrovalovima.
- Mineralni sadržaj komine rajčice određen u okviru ovog rada u skladu je s rezultatima drugih dostupnih istraživanja.
- Način sušenja komine rajčice ne utječe značajno na njezin mineralni sadržaj.
- Pokožica rajčice ima mineralni sadržaj usporediv s intaktnom kominom rajčice s iznimkom nešto većeg sadržaja kalija, rubidija i barija.

6. Literatura

1. Al-Fartusie FS, Mohssan SN. Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body. *IJACS*, 2017, 127-136.
2. Aliasgharpour M, Farzami M. Trace Elements in Human Nutrition: A Review. *Inter J Med Invest*, 2015, 115-128.
3. Aliasgharpour M. Trace elements in human nutrition (II) - An update. *Inter J of Prev Med*, 2020, 1-12.
4. Anderson JW, Baird P, Davis RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams CL. Health benefits of dietary fiber. *Nut Rev*, 2009, 188–205.
5. Anke M, Arnold W, Schafer U, Muller R. Recent progress in exploring the essentiality of the ultratrace element rubidium to the nutrition of animals and man. *Biomed Res Trace Elements* 2005, 203–207.
6. Burdge G. α-Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 137–144.
7. Burdge GC, Calder PC. Dietary α-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutr Rev*, 2006, 19, 26–52.
8. Burri BJ. Beta-carotene and human health : a review of current research. *Nutr Rev*, 1997, 547-580
9. Coelho MC, Rodrigues AS, Teixeira JA i Pintado ME. Integral valorisation of tomato by-products towards bioactive compounds recovery: Human health benefits. *J Food Chem* , 2023, 410.
10. Dalipi R, Borgese L, Tsuji K, Bontempi E, Depero LE. Elemental analysis of teas, herbs and their infusions by means of total reflection X-ray fluorescence. *J Food Comp Anal* , 2018,128–134.
11. Gallardo H i sur. Bromine and bromide content in soils:Analitycal approach from total reflection X-ray fluorescence spectrometry, 2016.
12. Green chemistry principles, 2023.,<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/green-chemistry-principles>
Pristupljeno: 11 .6. 2023.
13. Heber D i Lu QY.Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med.*, 2002, 920–923.
14. Kiralan M, Ketenoglu O. Utilization of Tomato (*Solanum Lycopersicum*) by-Products:An Overview U: Mediterranean Fruits Bio-wastes. Farag MA. i Ramadan MF, urednici, Cham, Springer International Publishing. 2022. str 799-818.
15. Klockenkämper R, von Bohlen A. Fundamentals of x-ray fluorescence, 2015.

16. Marguí E, Queralt I, Andrey D, Perring L Analytical potential of total reflection X-ray fluorescence (TXRF) instrumentation for simple determination of major and trace elements in milk powder samples. *J Food Chem*, 2022, 383.
17. Nour V, Panaite TD, Ropota M, Turcu R, Trandafir I i Corbu AR. Nutritional and bioactive compounds in dried tomato processing waste. *CYTA - J Food*, 2018. 16(1), 222–229.
18. Pene Pereira F. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software., 2020, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c01887> Pristupljen: 12. 6. 2023.
19. Pohl HR, Wheeler JS, Murray HE. Sodium and potassium in health and disease. *Met Ions in Life Sci*, 2013, 13, 29–47.
20. Pravina P, Sayaji D i Avinash M. Calcium and its Role in Human Body. *Int J Research Pharm Bio Sci*, 2013, 4(2). 659-668.
21. Rehal JK, Aggarwal P, Dhaliwal I, Sharma M i Kaushik P. A Tomato Pomace Enriched Gluten-Free Ready-to-Cook Snack's Nutritional Profile, Quality, and Shelf Life Evaluation. *Hort* , 2022, 8(5). 403-419.
22. Saeidnia S, Manayi A, Gohari AR, Abdullahi M. The Story of Beta-sitosterol- A Review. *Eur J Med Plant*, 2014, 4(5), 590–609.
23. Szoboszlai N., Polgári Z., Mihucz VG. i Záray G. Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Anal Chim Acta* .2009, 633(1),1–18.
24. Weber K, Kasching C, Erben RG, U: Bone. München, Instituty of Animal Physiology, 2004. str. 583–588.
25. Zava T. Bromine : An Essential Element 2014.
<https://www.zrtlab.com/blog/archive/bromine-an-essential-element>,
Pristupljen 12.5. 2023.

7. Sažetak / Summary

Godišnje u svijetu zaostane oko 8 milijuna tona otpada od prerade rajčice što ima negativne učinke na okoliš te, s obzirom na činjenicu da je bogata esencijalnim nutrijentima i biološki vrijednim fitokemikalijama predstavlja, veliki ekonomski gubitak.

Osnovni ciljevi ovog rada su istražiti primjenjivost rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom (TXRF) i zelenih tehnika pripreme uzorka u istraživanju mineralnog sadržaja različitih frakcija komine rajčice sušenih u različitim uvjetima (sušenje u termostatu na 70 °C i sušenje smrzavanjem).

Rezultati optimizacije metode ukazuju da kombinacija 1%-tnog Triton-a X-100® uz izostavljanje koraka soniciranja i volumen uzorka od 8 µL daje najtočnije rezultate.

Rezultati istraživanja su pokazali da je TXRF prihvatljiva tehnika za određivanju mineralnog sadržaja pripremljenih uzoraka te da priprema uzorka zelenim procesom u obliku suspenzije daje jednako točne rezultate kao i konvencionalne tehnike pripreme uzoraka (npr. mikrovalna digestija) koje karakterizira puno veći ekološki otisak. Mineralni sadržaj komine rajčice u skladu je s dostupnim literaturnim podacima, a način sušenja uzorka ne utječe značajno na mineralni sadržaj analiziranih uzoraka. Rezultati ovog istraživanja doprinijet će trenutnim saznanjima o prednostima i nedostacima navedene analitičke tehnike te daljnjoj valorizaciji komine rajčice kao sekundarne sirovine bogate nutritivno važnim mineralima.

Annually, approximately 8 million tons of tomato processing waste is generated worldwide, which has a negative environmental impact. Considering how rich in essential nutrients and biologically valuable phytochemicals this waste is, this represents a significant economic loss. The main objectives of this study are to investigate the applicability of total reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF) and green sample preparation techniques in exploring the mineral composition of different fractions of tomato pomace dried under different conditions (thermostatic drying at 70°C and freeze-drying).

The results of the method optimization indicate that the combination of 1% Triton X-100® with omission of sonication and sample volume of 8 µL gives most accurate results.

The results of this research have demonstrated that TXRF can be utilized for determining the mineral composition of the analyzed samples. Furthermore, sample preparation using green suspension methods yields equally accurate results as conventional techniques, characterized by a much larger ecological footprint. The mineral composition of tomato pomace is in accordance with available literature data, and the drying method does not significantly affect the mineral composition of the analyzed samples. The findings of this research could contribute to current knowledge regarding the advantages and limitations of the aforementioned analytical technique and further valorization of tomato pomace as a secondary resource rich in nutritionally important minerals.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju Prehrane ; Zavod za analitičku kemiju
Domagojeva 2 ; A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Valorizacija komine rajčice kao izvora nutritivno važnih minerala

Borna Gašparac

SAŽETAK

Godišnje u svijetu zaostane oko 8 milijuna tona otpada od prerade rajčice što ima negativne učinke na okoliš te, s obzirom na činjenicu da je bogata esencijalnim nutrijentima i biološki vrijednim fitokemikalijama predstavlja, veliki ekonomski gubitak.

Osnovni ciljevi ovog rada su istražiti primjenjivost rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom (TXRF) i zelenih tehnika pripreme uzorka u istraživanju mineralnog sadržaja različitih frakcija komine rajčice sušenih u različitim uvjetima (sušenje u termostatu na 70 °C i sušenje smrzavanjem).

Rezultati optimizacije metode ukazuju da kombinacija 1%-tnog Triton-a X-100® uz izostavljanje koraka soniciranja i volumen uzorka od 8 µL daje najtočnije rezultate.

Rezultati istraživanja su pokazali da se TXRF može koristiti u određivanju mineralnog sadržaja analiziranih uzoraka te da priprema uzorka zelenim procesom suspendiranja daje jednako točne rezultate kao i konvencionalne tehnike koje karakterizira puno veći ekološki otisak. Mineralni sadržaj komine rajčice u skladu je s dostupnim literaturnim podacima, a način sušenja uzorka ne utječe značajno na mineralni sadržaj analiziranih uzoraka. Rezultati ovog istraživanja doprinijeti će trenutnim saznanjima o prednostima i nedostacima navedene analitičke tehnike te daljnjoj valorizaciji komine rajčice kao sekundarne sirovine bogate nutritivno važnim mineralima.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 7 grafičkih prikaza, 16 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Komina rajčice, liofilizacija, mikrovalna digestija, ICP-MS, TXRF, zelena kemija, minerali

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.**

Dr. sc. Jasna Jablan, izvanredni Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta**

Dr. sc. Jasna Jablan, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Lovorka Vujić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Course of Study: Pharmacy
Department of Food Chemistry; Department of Analytical
Chemistry
Domagojeva 2; A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Valorization of Tomato Pomace as a Source of Nutritionally Important Minerals

Borna Gašparac

SUMMARY

Annually, approximately 8 million tons of tomato processing waste is generated worldwide, which has a negative environmental impact. Considering how rich in essential nutrients and biologically valuable phytochemicals this waste is, this represents a significant economic loss. The main objectives of this study are to investigate the applicability of total reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF) and green sample preparation techniques in exploring the mineral composition of different fractions of tomato pomace dried under different conditions (thermostatic drying at 70°C and freeze-drying). The results of the method optimization indicate that the combination of 1% Triton X-100® with omission of sonication and sample volume of 8 µL gives most accurate results.

The results of this research have demonstrated that TXRF can be utilized for determining the mineral composition of the analyzed samples. Furthermore, sample preparation using green suspension methods yields equally accurate results as conventional techniques, characterized by a much larger ecological footprint. The mineral composition of tomato pomace is in accordance with available literature data, and the drying method does not significantly affect the mineral composition of the analyzed samples. The findings of this research could contribute to current knowledge regarding the advantages and limitations of the aforementioned analytical technique and further valorization of tomato pomace as a secondary resource rich in nutritionally important minerals.

Thesis was archived in the Central Library of the University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 47 pages, 7 figures, 16 tables and 25 references. Original written in Croatian.

Keywords: Tomato pomace, lyophilization, microwave digestion, ICP-MS, TXRF, green chemistry, minerals

Mentor: **Dubraka Vitali Čepo, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, Ph.D. Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Date of theses acceptance: July 2023.