

# Kritička procjena energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije za multielementarnu analizu kave

---

Todorić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:691537>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Todić

**Kritička procjena energetski disperzivne  
rendgenske fluorescencijske spektrometrije za  
multielementarnu analizu kave**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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

*„Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Jablan na stručnom vodstvu, pojašnjavanju detalja i prenošenju znanja tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala mojim roditeljima na velikom strpljenju, ljubavi i podršci tijekom cijelog studija.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima na koje sam uvijek mogla računati i bez čije podrške bi kraj cijele ove priče bio gotovo nemoguć.“*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kava .....	1
1.1.1. Kemijski sastav kave i utjecaj na zdravlje .....	2
1.2. Minerali u kavi.....	4
1.2.1. Cink u organizmu .....	4
1.2.2. Mangan u organizmu .....	5
1.2.3. Željezo u organizmu .....	5
1.2.4. Bakar u organizmu .....	7
1.3. Instrumentalne metode za ispitivanje metala u kavi.....	8
1.4. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija.....	9
1.4.1. Načelo energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije.....	10
1.4.2. Posebnosti EDXRF tehnike.....	11
1.5. Induktivno spregnuta plazma s optičkom emisijskom spektrometrijom .....	12
1.6. Načelo ICP-OES tehnike .....	12
1.7. Prednosti i nedostaci ICP-OES tehnike.....	13
1.8. Kemometrija .....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3. MATERIJALI I METODE .....	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Kemikalije.....	16
3.1.2. Laboratorijski pribor .....	16
3.1.3. Aparatura .....	17
3.1.4. Uzorci .....	19
3.2. Metode .....	21
3.2.1. Priprema uzoraka za analizu EDXRF-om.....	21
3.2.2. Priprema uzoraka za ICP-OES analizu.....	23
3.2.3. Analiza glavnih komponenata (PCA) .....	23
3.2.4. Analiza parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS).....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. Evaluacija pripreme uzoraka kave za analizu EDXRF metodom .....	25
4.2. Uvjeti mjerenja EDXRF tehnikom za multielementarnu analizu.....	27
4.3. Provjera kvalitete rezultata dobivenih ICP-OES tehnikom .....	28
4.4. Kvantifikacijski pristupi EDXRF metode.....	29

4.5. Kemometrijske strategije u kombinaciji s EDXRF podacima za klasifikaciju tipa kave .....	33
5. Zaključak.....	36
6. Literatura .....	37
7. Sažetak/Summary .....	46
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA ISKAZNICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. Kava

Kava je bezalkoholni kofeinski napitak poznat diljem svijeta, jedno od najčešće konzumiranih pića i jedan je od najvažnijih poljoprivrednih proizvoda u međunarodnom poslovanju. Kava je, u smislu međunarodne trgovine, drugi proizvod po vrijednosti i njen doprinos iznosi približno 35 milijardi američkih dolara godišnje što je usporedivo samo s naftom (dos Santos i de Oliveira, 2001).

Riječ „kava“ potječe od latinske riječi „*Coffea*“ te predstavlja biljke iz porodice *Rubiaceae*. U spomenutu porodicu spadaju *Coffea arabica* (čini približno 75 % svjetske proizvodnje), *Coffea canephora*, također nazvana *Coffea robusta* (~ 25 %) i *Coffea liberica* (<1 %) (Filho i sur., 2007; Grembecka i sur., 2007; Bertrand i sur., 2008). Počeci kave i prve evidencije o istoj vežu se uz religijske ceremonije u svetištima Jemena u Sufi u 15. stoljeću (Weinberg i Baeler, 2001). Danas se biljke kave uzgajaju u više od 70 zemalja, a u glavne proizvođače spadaju Indija, Afrika, Južna Azija i Amerika tj. njihova ekvatorijalna područja (Ferreira i sur., 2019).

Dijelovi biljke koji se koriste u prehrambenoj industriji za proizvodnju kave su plod (bobice) i zelene bobice pečene na visokoj temperaturi od 100–230 °C, kako bi se postigla puna aroma kave (Ashu i Chandravanshi, 2011). Spomenuti postupak također rezultira značajnim promjenama boje boba od svijetlosmeđe do tamnosmeđe i promjeni kemijskog sastava, posebno kad se govori o udjelu hlapljivih vrsta (Belitz i sur., 2009). Sirova kava podrazumijeva osušena zrna kave dobivena od ploda kave kojem se uklonio endokarp i mezokarp te ukoliko je moguće i srebransta opna (tegument), te se na tržištu nalazi pod nazivom sirova kava, a razvrstava se kao Arabica, Robusta, Liberica, Arabust i Exscelsa, i kava bez kofeina. Beskofeinska kava se dobiva ekstrakcijom uz otapala poput tekućeg ugljičnog dioksida, etilacetata, metilacetata, etilmetilketona te diklormetana i vode pri čemu se moraju ukloniti sve primjese (NN 172/2004).

Kao proizvodi kave na tržištu mogu se naći pržena kava (ne sadrži više od 0,1 % kofeina) i ekstrakti kave. Potonji su dobiveni ekstrakcijom prženih zrna kave uz vodu kao jedino dozvoljeno ekstrakcijsko sredstvo i mogu sadržavati aromatske i topljive spojeve te netopljiva ulja koja potječu iz kave (NN 172/2004).

### **1.1.1. Kemijski sastav kave i utjecaj na zdravlje**

Procjenjuje se da oko 40% stanovništva danas konzumira kavu svaki dan (Mussatto i sur., 2011; Oliveira i sur., 2012). U zemljama kao što je Republika Hrvatska ona je važan dio životnog stila i jutarnjeg rituala brojnih potrošača. Razlozi ovakve dominacije nad drugim napitcima leže u njenim stimulativnim učincima, prepoznatljivim mirisom i aromom, pozitivnom utjecaju na zdravlje te ostalim dobrobitima koji proizlaze iz sastavnica kave (Oliveira i sur., 2012). U sastavnice se ubrajaju ugljikohidrati, klorogenska kiselina, alkoholi, diterpeni, proteini, peptidi i aminokiseline, kofein, trigonelin, melanodi, minerali i dr. (Farah, 2012).

Kemijski sastav kave ovisi o vrsti kave i njenog zrna. Prženo zrno, za razliku od zelenog, sadrži manje proteina, ugljikohidrata i klorogenske kiseline i blago veći udio lipida te melanoidnih spojeva čiji se broj prženjem povećava. Naime, 50% suhe tvari čine različiti saharidi koji su važni za kemijske reakcije kojima nastaju spojevi koji pridonose razvijanju boje i arome te povećavaju kiselost. Kuhanjem kave dobivaju se prehrambena vlakna koja postižu probiotske učinke u ljudskim crijevima (Farah, 2012).

Klorogenske kiseline polifenolne strukture (kafainska, p-kumarinska i ferulična) posjeduju brojne antioksidativne, antitumorske, antibakterijske učinke, a prženjem istih nastaju laktoni odgovorni za gorčinu i kvalitetu kave. Prema epidemiološkim studijama klorogenske kiseline su se pokazale relevantnima za smanjenje rizika od nastanka dijabetesa tipa 2, nekih vrsta tumora i neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (Jaiswail i Kuhnert, 2010).

Lipide u kavi uglavnom čine triacilgliceroli, a uz njih se još mogu naći diterpeni, steroli, tokoferoli i slobodne masne kiseline. Većina potonjih su nezasićene masne kiseline te preveniraju gubitak svježine kave uzrokovan hidrolizom i oksidacijom. Od diterpena u kavi se nalaze kafestol i kahvelol koji zajedno sa svojim metiliranim oblicima pokazuju antikancerogena i hepatoprotektivna svojstva. Međutim, konzumiranje kave u visokim količinama može djelovati kontraproduktivno te povećati kardiovaskularni rizik, a prženjem zrna kave se diterpeni razgrađuju (Farah, 2012).

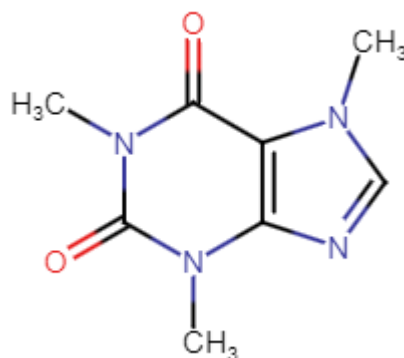
Proteini, peptidi i aminokiseline su prekursori melanoidnih spojeva odgovornih za boju kave te donekle pridonose njenom antioksidativnom i antibakterijskom djelovanju. S druge strane, kava se ne može smatrati važnim izvorom proteina jer ne sadrži esencijalne aminokiseline

potrebne za normalno funkcioniranje organizma te se, također, prženjem kave mijenja i njen proteinski sastav (Farah, 2012).

Trigonelin je kemijski spoj pretežito prisutan u *Coffei robusti* (nešto manje u *Coffei arabici*) i prženjem kave se demetilira u nikotinsku kiselinu, poznatu kao vitamin B<sub>3</sub>. Bolest koja se javlja zbog nedostatka ovog vitamina naziva se pelagra (Mazzafera, 1991). Prema istraživanjima trigonelin djeluje neuroregenerativno te inhibira invazivnost tumora in vitro (Farah, 2012).

Od minerala najvažniji je kalij (K) čiji udio iznosi oko 40% u mljevenoj kavi, zatim slijedi fosfor s udjelom 4% te ostali minerali kao što su natrij, magnezij, kalcij, sumpor, cink, stroncij, silicij, mangan, željezo i dr. (Farah, 2012).

Kofein je najpopularniji kemijski spoj kave, strukturno definiran kao 1,3,7-trimetil ksantin (*Slika 1*), koji djeluje stimulatивно na centralni živčani sustav i postiže antagonističko djelovanje na adenoziinske receptore. Pri umjerenom unosu kofeina povećava se budnost, sposobnost obavljanja raznih zadataka, poboljšanje koncentracije i raspoloženja, međutim, velike količine mogu potaknuti anksioznost, nesanicu i tahikardiju. Također, pokazalo se da kofein u velikim dozama može oslabiti toleranciju glukoze na inzulin, osobito u pacijenata s dijabetesom tipa 2 i s obzirom da djeluje kao diuretik, može prouzrokovati izlučivanje nekih minerala. S druge strane, ovi akutni učinci kod dugotrajne primjene prestaju imati veliki značaj zbog metaboličke prilagodbe organizma. (Farah, 2012; Cano-Marquinaa i sur., 2013).



*Slika 1. Strukturna formula kofeina (izrađeno u rcsb.org/chemical-sketch).*



## 1.2. Minerali u kavi

Iako je sadržaj elemenata (osim onih iz organske matrice kave) u kavi samo oko 5%, njihovo određivanje je važno jer, ovisno o koncentraciji i tipu, mogu utjecati na kvalitetu proizvoda (Pohl i sur., 2013). Neki mikroelementi prisutni u kavi su biokemijski važni sa zdravstvenog gledišta. Na primjer, spojevi željeza (Fe), cinka (Zn), bakra (Cu) i mangana (Mn) su nedavno pokazali antioksidativna svojstva (Olechno i sur., 2021). Međutim, drugi elementi primjerice kadmij (Cd), olovo (Pb) i živa (Hg) koji su potencijalno toksični također se mogu naći u zrnima kave ovisno o mjestu sadnje, korištenog gnojiva i pesticida ili kontaminacije tijekom procesa mljevenja ili skladištenja (Oliveira i sur., 2012). S obzirom na to, određivanje elementarnog sastava kave je od velike važnosti za potvrdu njene kvalitete i sigurnosti konzumacije.

### 1.2.1. Cink u organizmu

Ukupni tjelesni sadržaj cinka u odraslih ljudi varira od oko 1,5 do 2,5 g, od čega se većina nalazi intracelularno, prvenstveno u mišićima, kostima, jetri i dr. Preostali cink čini takozvani brzo izmjenjivi depo cinka, za koji se smatra da je osobito važan za održavanje funkcija bioloških sustava ovisnih o cinku. Manje od 0,2% ukupnog sadržaja cinka u tijelu cirkulira u plazmi, te ima srednju koncentraciju od približno 15  $\mu\text{mol/L}$  (oko 100  $\mu\text{g/dL}$ ). Cink se u plazmi prenosi uglavnom vezan za albumin, a u manjoj mjeri za  $\alpha$ 2-makroglobulin i oligopeptide (Brown i sur., 2001). Čimbenici koji utječu na koncentraciju cinka u organizmu su trudnoća, crijevne bolesti koje ometaju apsorpciju cinka, hipoalbuminemija, operativne ozljede tkiva, infekcije, pušenje i drugi okidači staničnog stresa (Brown i sur., 2001).

Cink je uključen u mnoge aspekte staničnog metabolizma. Potreban je za katalitičku aktivnost velikog broja enzima i ima ulogu u sintezi proteina i DNA, zacjeljivanju rana te staničnoj signalizaciji i diobi. Usko je povezan s pre i postnatalnim rastom i razvojem, diferencijacijom te ima ključnu ulogu u funkciji imunskog sustava i gastrointestinalnog trakta. Istraživanja na životinjama s nedostatkom cinka su pokazala dramatične promjene u nekoliko komponenti imunskog sustava kao npr. atrofija timusa, oslabljena stanično posredovana imunost, limfopenija i smanjena proizvodnja antitijela (Brown i sur., 2001). Suplementacija cinkom može smanjiti učestalost dijareje i respiratornih infekcija. Također, kod nedostatka istog primijećen je raspon neurobihevioralnih abnormalnosti istražen na fetusima štakora, te oni s

deficijencijom imali su neurodegenerativne promjene i smanjenje veličine mozga (Prohaska i sur., 1974; McKenzie i sur., 1975).

### **1.2.2. Mangan u organizmu**

Mangan je esencijalni nutrijent koji igra važnu ulogu u raznim metaboličkim funkcijama ljudskog organizma kao što su aktivacija pojedinih metaloenzima, funkcija imunskog, živčanog i reproduktivnog sustava te sudjeluje u antioksidativnim procesima enzima koji štite organizam od slobodnih radikala (Avila i sur., 2013). Također je važan za regulaciju energetskih procesa u stanici, rast kostiju i vezivnog tkiva, zgrušavanja krvi i kofaktor je brojnih enzima uključenih u metabolizam i sintezu neurotransmitora (Erikson i Aschner, 2003). Postoje naznake da je mangan bitan za funkciju astrocita, razvoj mozga te da sudjeluje u procesu sinteze glutamina iz glutamata, reakcijom kataliziranom glutamin sintetazom (GS) (Avila i sur., 2013).

Budući da je mangan neophodan sudionik brojnih enzimatskih procesa, njegova deficijencija rezultira različitim zdravstvenim posljedicama poput smanjenja fertiliteta, poremećaja izgradnje kostiju, promjenama u metabolizmu ugljikohidrata, proteina i lipida, dermatitisa, usporenog rasta kose i noktiju i dr. (Keen i sur., 1999; Finely i sur., 2003). Zabilježeno je da se kod nedostatka mangana smanjuje razina kolesterola, povećava koncentracija kalcija, fosfora i alkalne fosfataze u serumu. Iako je uloga mangana u sljedeće navedenim bolestima nejasna, njegova se niska koncentracija povezuje s incidencijom epilepsije, osteoporozom, Downovim sindromom i Perthestovom bolesti (Avila i sur., 2013).

### **1.2.3. Željezo u organizmu**

U ljudskom tijelu željezo uglavnom postoji u složenim oblicima vezano za proteine (hemoprotein), kao hem spojevi (hemoglobin ili mioglobin), hem enzimi ili nehem spojevi (flavin-željezni enzimi, prijenosni proteini i feritin) (McDowell, 2003). Željezo je potrebno za sintezu transportnih proteina za prijenos kisika, posebno hemoglobina i mioglobina, te za formiranje hema i enzima koji sadrže željezo, a uključeni su u prijenos elektrona i oksido-redukciju (Hurrel, 1997; McDowell, 2003). Gotovo dvije trećine željeza u organizmu nalazi se u hemoglobinu prisutnom u cirkulirajućim eritrocitima, 25% sadržano je u zalihama željeza koja se lako mobiliziraju, a preostalih 15% vezano je za mioglobin u mišićnom tkivu i nizu

enzima uključenih u oksidativni metabolizam i mnoge druge stanične funkcije (Abbaspour i sur., 2014).

Željezo se reciklira i na taj način čuva u tijelu. Dostavlja se u tkiva cirkulirajućim transferinom, prijenosnikom koji hvata željezo otpušteno u plazmu uglavnom iz crijevnih enterocita ili retikuloendotelinih makrofaga (Abbaspour i sur., 2014).

Tijekom ranog djetinjstva potrebe za željezom zadovoljavaju male količine željeza sadržane u ljudskom mlijeku. Potreba za željezom značajno raste 4-6 mjeseci nakon rođenja i iznosi oko 0,7-0,9 mg/dan. Između 1. i 6. godine života sadržaj željeza u tijelu ponovno se udvostručuje. Potrebe za željezom također su vrlo visoke u adolescenata, osobito tijekom razdoblja ubrzanog rasta (Abbaspour i sur., 2014). Prosječna odrasla osoba skladišti oko 1-3 g željeza u svom tijelu. U nekim situacijama se povećavaju potrebe za ovim metalom kao što su menstruacija, povećanje tjelesne mase novorođenčadi za vrijeme ubrzanog rasta (Cook i sur., 1986).

Razlozi nedostatka željeza su oni kod kojih apsorpcija ili zalihe željeza tijekom duljeg razdoblja ne mogu pratiti njegove gubitke. Najčešće se radi o gubitku krvi, specifičnim stanjima u kojima je potreba povećana (trudnoća, menstruacija, brzi rast), nedovoljnim unosom kroz hranu, infestacijama parazitima i sl. (Abbaspour i sur., 2014). Ostali čimbenici rizika za deficijenciju ovog nutrijenta su vegeterijanska prehrana i korištenje intrauterinih uložaka (Beard, 2000).

Danas se u mnogim zemljama konzumira jednolična hrana i često ona siromašna željezom pa učestalost anemije kod djece prelazi i 50%. Kada se rezerve potonjeg metala potroše, ne preostaje ga dovoljno za eritropoezu pa se u eritrocitnim prekursorima poremeti sinteza hemoglobina. Deficijencija se može javiti sa ili bez anemije, međutim, čini se da većina funkcionalnih nedostataka javlja s razvojem anemije. Umjereni, pa čak i blagi nedostaci mogu utjecati na kognitivni razvoj, umor i slabost, poremećaj imunosne funkcije i radnu sposobnost. Nedovoljna koncentracija željeza u trudnoći također može imati niz opasnih posljedica poput povećanog rizika od sepse, smrtnosti majke, perinatalne smrtnosti i niske porođajne težine djeteta (Abbaspour i sur., 2014).

#### 1.2.4. Bakar u organizmu

Bakar je esencijalni kofaktor za niz važnih enzima uključenih u redoks reakcije u organizmu. Relativno visok redoks potencijal za  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  sustava koristi superoksid dismutaza i katehol tirozinaza. Između ostalog, enzimi ovisni o bakru sudjeluju u biološkim procesima kao što je energetska metabolizam (npr. citokrom c oksidaza), antioksidativna obrana (Zn,Cu dismutaza) i metabolizam željeza (npr. ceruloplazmin) (Scheiber i sur., 2013).

S obzirom na potrebu za bakrom s jedne strane i potencijalnu toksičnost bakra s druge strane, stanice su razvile mehanizme za regulaciju stanične koncentracije bakra. Mnoge komponente uključene u njegovu staničnu homeostazu su dobro poznate na molekularnoj razini. To se odnosi na prijenosnike koji posreduju u unosu i izlučivanju bakra, biomolekule koje pohranjuju bakar i šaperoni (specifični enzimi koji dovode bakar do organela i enzima ovisnih o bakru) (Scheiber i sur., 2013).

Nedostatak bakra u ljudi uzrokovan je većim brojem mehanizama. Primijećen je kod nedonoščadi i novorođenčadi niske porođajne težine koja imaju niske zalihe bakra u jetri (Walravens, 1980), pacijenata na parenteralnoj prehrani bez adekvatne nadoknade bakra, nakon nekih kirurških zahvata (npr. operacija želučane prenosnice kod pretilosti) ili osoba sa malapsorpcijskim sindromima (Scheiber i sur., 2013). Smatra se i da tipična zapadnjačka hrana ne zadovoljava dnevni unos ovog metala (Klevay, 2011). Sekundarni nedostaci bakra mogu biti uzrokovani povećanim unosom cinka u hrani (Scheiber i sur., 2013).

Rani i uobičajeni znakovi stečenog nedostatka bakra su hematološke manifestacije kao što su anemija, leukopenija, neutropenija i pancitopenija (Halfdanarson i sur., 2008). Mogu se javiti i problemi s lokomotornim sustavom poput osteoporoze, povećanog rizika od prijeloma kostiju te koštane malformacije kod dojenčadi. Stečena deficijencija može se manifestirati i neurološkim poremećajima. Potonji su primijećeni kod ovaca s demijelinizirajućom bolesti i smatra se da je uzrok smanjena aktivnost citokrom oksidaze, ali mehanizam nije do kraja shvaćen. Zanimljivo je da se neuropatološka klinička slika kod nedostatka bakra i vitamina B12 ne može razlikovati (Scheiber i sur., 2013). Također, pronađena je veza koncentracije bakra i kardiovaskularnih bolesti. Naime, enzim superoksid dismutaza 3 (SOD3) dobiva bakar od ATPaze (ATP7A) za koju je utvrđeno da je jako eksprimirana u kardiovaskularnom sustavu (Qin i sur., 2006). Mišji mutant s mutiranim ATP7A je imao izraženiju hipertenziju u odnosu na onog koji ima normalnu ekspresiju istog (Qin i sur., 2008). Godine 1981. Prohaska i Lukasewycz potvrdili su da deficijencija bakra utječe i na humoralni odgovor te da su štakori s

nedostatkom bakra bili osjetljiviji na infekciju salmonelom. Međutim, točna uloga bakra u imunom sustavu još nije poznata (Scheiber i sur., 2013).

Teški nedostatak bakra obilježje je X-vezane recesivne mišićne distrofije. Uzrokovana je genetskim defektima u ATPazi koja prenosi bakar. Klinička obilježja uključuju abnormalnost vezivnog tkiva, mišićnu hipotoniju, tešku progresivnu neurološku degeneraciju, hipopigmentaciju kože i kose. Mnogi od simptoma mogu se pripisati smanjenju aktivnosti enzima ovisnih o bakru (Scheiber i sur., 2013).

### **1.3. Instrumentalne metode za ispitivanje metala u kavi**

S obzirom na veliku proizvodnju i potrošnju kave u svijetu, određivanje elemenata u njoj, uključujući one koji se smatraju nutrijentima i one koji su klasificirani kao toksični i opasni za zdravlje, svakako je od velikog interesa i važnosti (Dos Santos i de Oliveira, 2001; Oleszczuk i sur., 2007). Stoga je razvoj instrumentalnih metoda prikladnih za pouzdanu elementarnu analizu kave, koja omogućuje mjerenje koncentracija mineralnih nutrijenata i elemenata u tragovima, bitan za cijeli sektor proizvodnje kave jer na kompetentan način osigurava visoku kvalitetu konačnog proizvoda (Ribeiro i sur., 2003; Tagliaferro i sur., 2006).

Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (engl. Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS) s korektorom pozadine s deuterijskom lampom ili s korektorom pozadine s efektom Zeeman (Filho i sur., 2007) često se koristi za selektivno određivanje različitih metala poput kalcija, kalija, magnezija i natrija (Ca, K, Mg, Na), te bakra, željeza, mangana i cinka (Cu, Fe, Mn, Zn) i elemenata u tragovima kao što su aluminij, kadmij, kobalt, krom, nikal i olovo (Al, Cd, Co, Cr, Ni, Pb) u kavi (Krivan i sur. 1993; Onianwa i sur., 1999; Ashu i Chandravanshi, 2011). FAAS s kontinuiranim izvorom visoke razlučivosti (engl. High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry, HRCS-FAAS) također se može koristiti u tu svrhu (Oliveira i sur., 2012). Koncentracije K i Na često se mjere plamenom atomskom emisijskom spektrometrijom (engl. Flame Atomic Emission Spectrometry, FAES) pomoću zasebnih fotometara (Filho i sur., 2007) ili istih instrumenata kao za FAAS, ali koji rade u emisijskom modu (Ashu i Chandravanshi, 2011). Nažalost, poznato je da FAAS nije dovoljno osjetljiva za kvantificiranje nekih važnih elemenata u tragovima tj. Cd, Cr, Ni i Pb (Grembecka i sur., 2007). Za potonje elemente preferira se induktivno spregnuta plazma s optičkom emisijskom spektrometrijom (engl. Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy, ICP-OES) (dos

Santos i sur., 2010) Za ispitivanje metala može se koristiti i induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (engl. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS). Priprema uzoraka za sve prethodno navedene tehnike je dosta kompleksna i dugotrajna (Pohl i sur., 2013).

Nadalje, za elementarnu analizu koristi se i elektrotermalna atomska apsorpcijska spektrometrija (engl. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, ETAAS) s pozadinom deuterija (Oleszczuk i sur., 2007) ili Zeemanovom korekcijom (Krivan i sur., 1993; Magalhaes i sur. 1999; Anthemidis i Pliatsika, 2005). Alternativno se može primijeniti atomska apsorpcijska spektrometrija (engl. Atomic Absorption Spectrometry, AAS) visoke razlučivosti koja kao način atomizacije koristi grafitnu peć (engl. High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, HR-CS-GFAAS) (Oliveira i sur., 2012). Obje gore navedene tehnike prvenstveno se koriste za određivanje elemenata u tragovima i elemenata u niskim koncentracijama, tj. Al, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Mn i Sr. Slično kao i za FAAS, uzorci kave koji se analiziraju moraju se digestirati i to rezultira razaranje matriksa te oslobađanje željenih supstancija (Magalhaes i sur., 1999; Oliveira i sur., 2012).

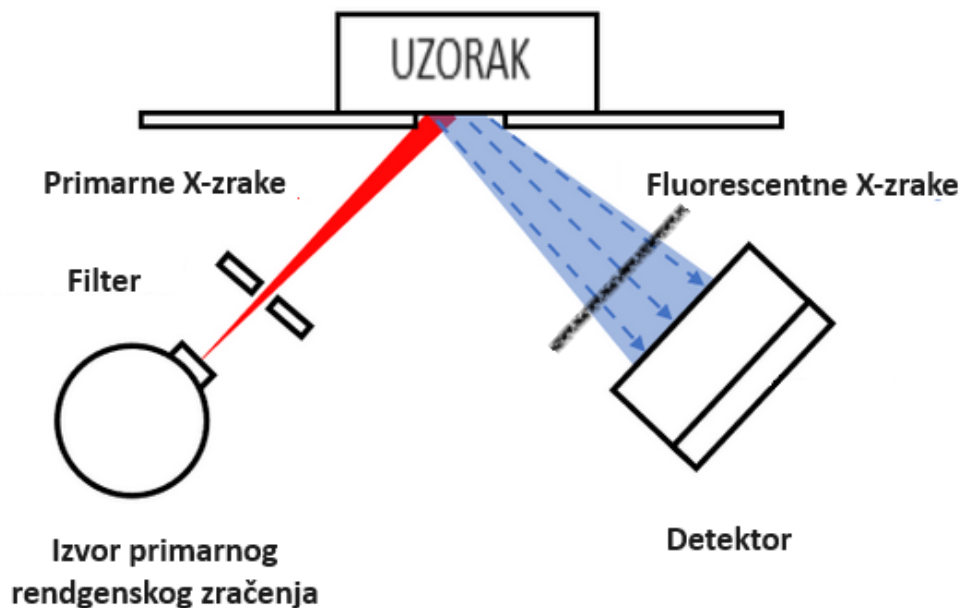
#### **1.4. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija**

U zadnje vrijeme postoji sve veća potražnja za tehnikama/metodama koje uključuju manju ili nikakvu prethodnu obradu uzorka za multielementarnu analizu prehrambenih proizvoda, koja je više u skladu sa načelima „Zelene analitičke kemije“ (Gałuszka i sur., 2013). Rendgenska fluorescencijska spektrometrija prethodno se koristila u kvantitativnoj elementarnoj analizi širokog raspona organskih i anorganskih uzoraka (West i sur., 2009; West i sur., 2010). Od raznih dostupnih tehnika spektrometrije X-zraka, laboratorijska 'bench-top' energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija (engl. Energy Dispersive X-ray Fluorescence, EDXRF) se najčešće koristi za rutinsku analizu velikog broja uzoraka. U EDXRF se koriste detektori koji razlikuju rendgenske zrake na temelju energije, omogućujući istovremeno otkrivanje više elemenata. Drugi oblik rendgenske fluorescencijske spektrometrije (engl. X-ray Fluorescence, XRF) koji se koristi je valno disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija (engl. Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence, WD-XRF), koja utvrđuje emisije zračenja nakon difrakcije kroz kristal. Glavna prednost EDXRF-a u odnosu na WD-XRF je ta što je oprema jednostavnija i jeftinija, međutim nedostatak leži u nižoj razlučivosti u odnosu na WD-XRF. Također su razvijeni prijenosni XRF uređaji koji imaju

slične analitičke performanse kao EDXRF, ali im nedostaje mogućnost analize višestrukih uzoraka (Melquiades i Appolini, 2004).

### 1.4.1 Načelo energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije

Osnova EDXRF tehnike je da svi elementi emitiraju sekundarne fluorescentne X-zrake karakteristične energije kada su izloženi X-zrakama odgovarajuće veće energije, pri čemu se energija i intenzitet emitiranih X-zraka koriste za određivanje elementarnog sastava uzorka. Općenito, što je teži element koji se analizira, to je veća energija X-zraka potrebna za izazivanje fluorescencije, veća je energija fluorescencije i lakše ju je detektirati (Melquiades i Appolini, 2004.) Na *Slici 2* je prikazano načelo EDXRF. Primarni izvor rendgenskih zraka obasjava uzorak s upadnim zrakama od  $45^\circ$  pri čemu atomi u uzorku (tj. njihovi elektroni) apsorbiraju energiju odgovarajuće valne duljine te prelaze na pobuđenu razinu. Nakon toga slijedi emisija energije pri prijelazu elektrona na osnovno energetska stanje i ta emisija predstavlja sekundarnu fluorescenciju. Potonja fluorescencija dolazi do detektora koji razlučuje zrake na temelju intenziteta i energije. Ovi detektori imaju sposobnost simultanog mjerenja cijelog spektra koji dolazi iz uzorka. Pošto su intenzitet i energija emitiranog zračenja karakteristični za svaki pojedini element EDXRF se može koristiti za određivanje elementarnog sastava uzorka (Paltridge i sur., 2012).



Slika 2. Načelo tehnike EDXRF (Preuzeto i prilagođeno prema: Horiba Scientific).

## 1.4.2. Posebnosti EDXRF tehnike

EDXRF je nedestruktivna tehnika jer omogućuje višestruka mjerenja istog uzorka. Također je i brza i jednostavna metoda koja se može izravno primijeniti na tekuće i krute uzorke. Kao što je ranije spomenuto, ne zahtijeva kompliciranu pripremu uzorka i korištenje toksičnih kemijskih sredstava te je iz istih razloga ekološki prihvatljivija. Budući da se EDXRF signal dobiva prijelazom među elektronima unutarnjih ljuski, a ne veznim elektronima, EDXRF također ima prednost jer je signal neovisan o kemijskom obliku. Još jedna od posebnosti ove tehnike je kratko vrijeme trajanja analize stoga se nerijetko koristi u rutinskim laboratorijskim analizama (Paltridge i sur., 2012; Noda i sur., 2006). Međutim, postoji nedostatak konsenzusa o najboljem načinu pripreme uzorka kave i kvantifikacije. U većini slučajeva uzorci kave pripremaju se prešanjem određene količine praha (0,2-5 g) prije EDXRF mjerenja. U nekim slučajevima uzorci kave se izravno unose u obliku rasutog praha kave u kivetu (Worku i sur., 2019). Međutim, kada se EDXRF analiza provodi na krutim uzorcima u obliku praha, potrebno je obratiti pozornost na fizičku strukturu matrice, u smislu veličine čestica i pakiranja, budući da se interferencija matrice može primijetiti ako raspodjela uzorka nije homogena. Te se smetnje mogu svesti na najmanju moguću mjeru korištenjem matematičkih i kemometrijskih alata, kao što je ispravljanje pogrešaka učinka matrice i devijacija preklapajućih spektralnih linija (Almeida i sur., 2021). EDXRF za razliku od ostalih tehnika (ICP-MS, ICP-OES, FAAS) daje kontinuirani spektar kao izlaz i može se koristiti kao otisak uzorka prsta (kontinuirani spektar je specifičan za pojedini element). Ovaj pristup se široko koristi u analizi kao što je bliska infracrvena spektroskopija (engl. Near Infrared Spectroscopy, NIR) (Dos santos i sur., 2021). Kalibracija EDXRF-a može se postići pomoću jedne od dvije sljedeće metode. U situacijama kada su potrebne kalibracije opće namjene koje pokrivaju veliki izbor tipova uzoraka, mogu se koristiti principi temeljnih parametara (FP), koji koriste složene matematičke algoritme za modeliranje odgovora EDXRF-a na čiste elemente u određenoj vrsti uzorka (Rousseau i sur., 1996). U primjenama gdje je raspon koncentracija analita ograničen i gdje se mogu razviti skupovi standarda koji su po sastavu i morfologiji slični uzorcima od interesa, uobičajenije je koristiti empirijski pristup kalibracije. Ovdje se koncentracije elemenata mjere u skupu kalibracijskih standarda korištenjem utvrđene 'referentne' tehnike (kao što je ICP-OES), a te su vrijednosti povezane s intenzitetom emisija X-zraka za te uzorke. Takve se kalibracije zatim potvrđuju usporedbom EDXRF vrijednosti i vrijednosti referentne metode na neovisnom skupu uzoraka (Perring i sur., 2003).



## 1.5 Induktivno spregnuta plazma s optičkom emisijskom spektrometrijom

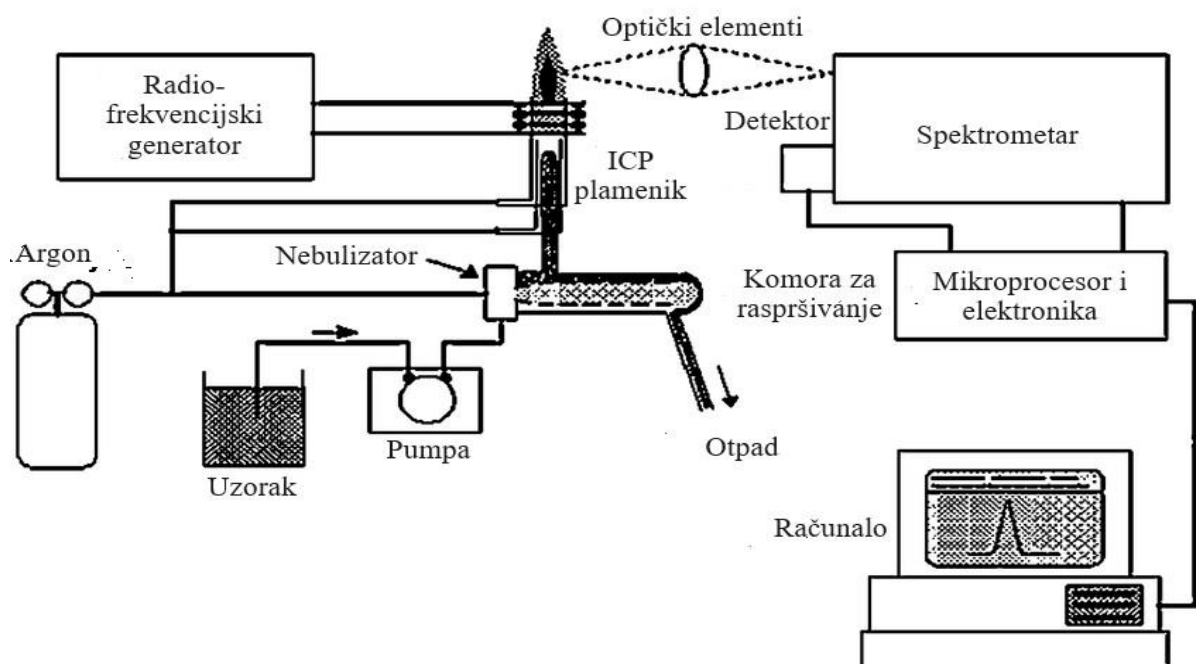
ICP-OES je analitička tehnika koja se koristi za analizu atomskog sastava određenog uzorka. Tehnika koristi jedinstvene fotofizikalne signale svakog elementa za uspješno otkrivanje vrste i relativne količine svakog elementa unutar uzorka. ICP-OES ima posebnu primjenu u analizi složenih uzoraka i koristi se u slučajevima kao što su analiza elemenata u tragovima u ljudskom mozgu, određivanje kemijskog sastava elektroničkih cigareta, pregled pesticida i procjena čistoće farmaceutskih spojeva. Tehnika je također pronašla rutinsku primjenu u analizi pitke vode, vina i petrokemijskih tvari gdje ima ulogu u procesu otkrivanja, ekstrakcije i pročišćavanja. ( <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/icp-oes-icp-chemistry-icp-oes-analysis-strengths-and-limitations-342265> ). Szymczycha-Madeja i sur. (2015) su opisali upotrebu ICP-OES tehnike za multielementarnu analizu kave koja se u ovom radu koristi kao referentna tehnika.

## 1.6. Načelo ICP-OES tehnike

Princip ICP-OES tehnike se bazira na činjenici da atomi i ioni mogu apsorbirati energiju za prelazak elektrona iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje. U ICP-OES tehnici uzorak je podvrgnut visokim temperaturama koje uzrokuju disocijaciju uzorka u atome i prelazak značajnog dijela atoma u ione. Nakon što su atomi i ioni prešli u pobuđeno stanje oni se vraćaju u osnovno stanje i pri tom emitiraju energiju. Intenzitet specifičnog zračenja na određenoj valnoj duljini karakterističan je za pojedini element te se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju elemenata od interesa (Nolte, 2021).

Plazma visoke energije se najčešće sastoji od argona iako se također mogu naći dušik i drugi plinovi. Generira se korištenjem radiofrekvencijskog signala velike snage ili mikrovalnim zračenjem, što uzrokuje ionizaciju plina kako bi se formirali elektroni i druge nabijene vrste unutar matrice plazme. Interakcije između matrice plazme i uzorka ključne su za uspješnu analizu, a postizanje tih interakcija zahtijeva da se uzorak rasprši. Aerosolizacija uzorka općenito se događa upotrebom raspršivača, a također je potreban mehanizam za prijenos uzorka od otvora za ubrizgavanje do točke aerosolizacije. Nakon uspješne aerosolizacije, interakcije između visokoenergetske plazme i uzorka rezultiraju degradacijom uzorka na njegove

pojedinačne elemente, od kojih svaki ima karakterističan optički signal koji se može spektroskopski detektirati ( <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/icp-oes-icp-chemistry-icp-oes-analysis-strengths-and-limitations-342265> ). Shematski prikaz ICP-OES nalazi se na *Slici 3*.



*Slika 3. Shematski prikaz ICP-OES tehnike (Preuzeto i prilagođeno: Analytical instruments)*

### 1.7. Prednosti i nedostaci ICP-OES tehnike

Ključne prednosti ICP-OES-a uključuju sposobnost identificiranja vrste i određivanja koncentracije elemenata u složenim uzorcima. Na primjer, ICP-OES se učinkovito koristi za analizu sastava kontaminiranog tla (Battsengel i sur., 2020). Tehnika je visokoselektivna i omogućuje simultanu multielementarnu analizu, što je također velika prednost u odnosu na pojedine tehnike (Li i sur., 2017). Čak i u slučaju radioaktivnih uzoraka, ICP-OES se i dalje može koristiti za određivanje elementarnog sastava uzorka s posebnim mjerenjima koja se koriste za određivanje stupnja radioaktivnosti (Wakasungi i sur., 2020). Glavni nedostatak je činjenica da se ICP-OES uzorci plazmom atomiziraju i uništavaju, što znači da se ne mogu povratiti nakon analize (Szymczycha-Madeja i sur., 2015). ICP-OES analiza može biti dugotrajan proces, budući da nužno uključuje više koraka: izvođenje grube analize kako bi se

dobila osnovna ideja o elementima prisutnim u uzorku i odabir valne duljine, optimizacija razdvajanja signala tako da signali različitih valnih duljina imaju ograničeno preklapanje, usporedbu s unutarnjim standardom radi validacije metode i izvedbe sustava, analizu spektralnih smetnji i načine za njihovo uklanjanje bez uklanjanja ciljanih signala. Konačno, ICP-OES zahtijeva skupe instrumente za stvaranje plazme, raspršivanje uzoraka i analizu signala, iako po relativno nižoj cijeni od drugih usporedivih tehnika kao što je ICP-MS

(<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/icp-oes-icp-chemistry-icp-oes-analysis-strengths-and-limitations-342265> ).

## **1.8. Kemometrija**

Kemometrija je disciplina koja se pojavila 1970. godine, a podrazumijeva upotrebu matematičkih i statističkih metoda u kemijskim analizama. Razvoj je stekla upotrebom PC računala preko kojih se podaci prikupljaju, obrađuju i interpretiraju te obilježava novo doba u kemiji kao znanosti. Glavna uloga kemometrije je pojednostavniti složene matematičke modele i uz razvoj numeričkih softwera olakšana je njena primjena. Svoju svrhu nalazi u laboratorijskoj automatizaciji, upravljanju spektroskopskim bazama podataka i metodama umjetne inteligencije. Često se koristi u svrhu kvantitativne i kvalitativne analize u kombinaciji s drugim tehnikama (Fagan i sur., 2007).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom na veliku popularnost kave diljem svijeta, od iznimne je važnosti ispitati njen sastav kako bi se utvrdila sigurnost konzumacije. Analizom elementarnog sastava kave mogu se dobiti informacije o njevoj kvaliteti, porijeklu i nutritivnim obilježjima.

Cilj ovog istraživanja bio je kritički evaluirati primjenu EDXRF za određivanje elementarnog sastava uzoraka kave. Fokus je bio na metalima poput kalija, kalcija, mangana, željeza, bakra, cinka, stroncija i rubidija. Primjenjeno je te uspoređeno nekoliko postupaka obrade uzorka i strategija kvantifikacije. Također, uspoređeni su različiti klasifikacijski i razlikovni kemometrijski alati poput analize glavnih komponentata (PCA) i parcijalne regresije najmanjih kvadrata (PLS) za razlikovanje različitih vrsta kave (čiste kave, instant kave i kave s aditivima).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

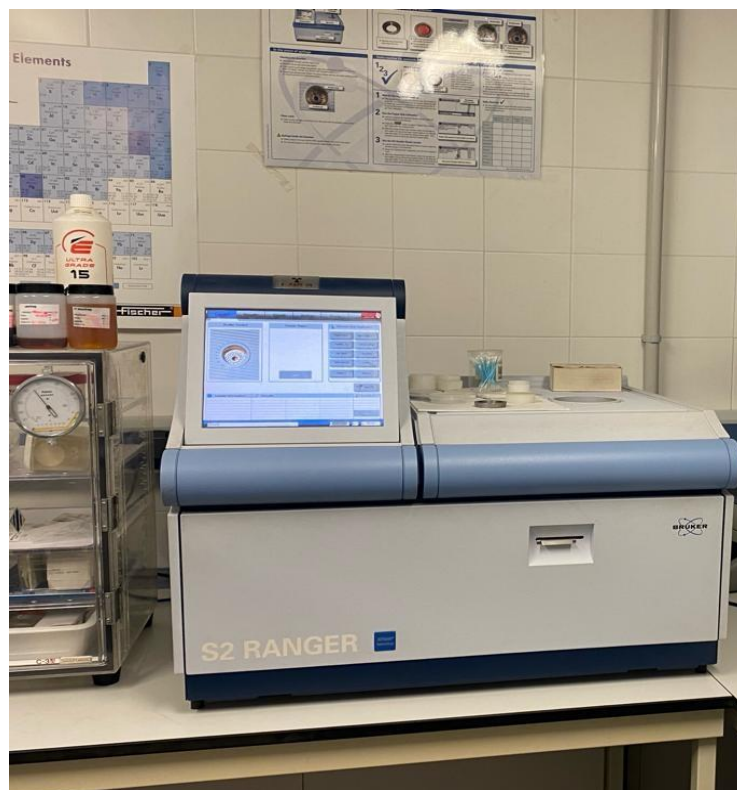
- ROMIL PrimAg® monokomponente referentne otopine 1000 mg/L
- Ultračista voda (provodljivost  $0,055 \mu\text{Scm}^{-1}$ , dobivena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, USA)
- 69 %  $\text{HNO}_3$  (HIPERPUR, Panreac, Španjolska)
- 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (TraceSELECT®, Sigma-Aldrich, Španjolska)
- $\text{C}_{38}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_2$  (C vosak u obliku mikropraha, Merck KGaA, Njemačka)
- Standardni referentni materijal, (engl. Certified Reference Material, CRM) lišće topole GBW07604 Populi folii (Nacionalni centar za analizu željeza i čelika, Peking, Kina)
- Standardni referentni materijal, (engl. Certified Reference Material, CRM), zeleni čaj NCS ZC73036 Camelia sinensis (Nacionalni centar za analizu željeza i čelika, Peking, Kina)
- Standardni referentni materijal, (engl. Certified Reference Material, CRM), mrkva NCS ZC73031 Daucus carota (Nacionalni centar za analizu željeza i čelika, Peking, Kina)

##### 3.1.2. Laboratorijski pribor

- Plastične epruvete volumena 15 mL i 30 mL (Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Njemačka)
- membranski politetrafluoroetilenski (PTFE) filter veličine pora  $0,45 \mu\text{m}$  (Fisherbrand, Göteborg, Švedska)
- Automatske mikropipete volumena 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) i 500-5000  $\mu\text{L}$  (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Ručna preša

### 3.1.3 Aparatura

Za EDXRF analizu korišten je energetski disperzivni rendgenski fluorescencijski spektrometar S2 Ranger (Bruker AXS, GmbH, Karlsruhe, Njemačka) prikazan na *Slici 4*. Spektrometar sadrži paladijsku rendgensku cijev maksimalne snage 50 W i XFLASH™ LE silikonski drift detektor (SDD) s ultratankim berilijskim prozorom (0,3 μm debljine). Instrument je opremljen s devet primarnih filtera i može raditi u uvjetima vakuuma. Prednost upotrijebljenog EDXRF sustava uključuje niske operativne troškove jer ne zahtijeva rashladni medij za funkciju. Softver koji se koristi za upravljanje opremom i izvođenje obrade podataka bio je Spectra EDX (Bruker AXS, GmbH, Njemačka). Ovaj softver može izvesti prilagodbu profila pune linije, dekonvoluciju kada se linije preklapaju, korekciju intenziteta za interelementne učinke i potpunu kvantifikaciju. Posebni uvjeti mjerenja koji se koriste za analizu uzoraka kave EDXRF spektrometrom prikazani su u *Tablici 1*.



*Slika 4. EDXRF spektrometar S2 Ranger.*

Tablica 1. Instrumentalni parametri i uvjeti mjerenja EDXRF analizom.

<b>EDXRF sustav ( S2 Ranger, Bruker, AXS)</b>	
Anodna rendgenska cijev	Pd
kV; mA	40; 0,200
Ozračeno područje	30 mm u promjeru
Primarni filter	Al 500 $\mu\text{m}$
Način mjerenja	Vakuum (peleti), He atmosfera (rastresiti prašak)
Vrijeme mjerenja	200 s

Za ICP-OES tehniku korišten je Agilent ICP-OES 5100 spektrometar sinkronog vertikalnog dvostrukog prikaza (SVDV). Instrument je prikazan na *Slici 5*. Specifične instrumentalne karakteristike i mjerni uvjeti prikazani su u *Tablici 2*.



Slika 5. Agilent ICP-OES 5100.

Tablica 2. Instrumentalni parametri i uvjeti mjerenja ICP-OES analizom.

<b>ICP-OES Agilent 5100</b>	
Snaga	1200 W
Brzina protoka plazme	12 L min <sup>-1</sup>
Položaj plamena	aksijalan
Nebulizator	koncentrični
Analitičke linije	K (766,491 nm), Ca (317,933 nm), Mn (257,610 nm), Fe (238,204 nm), Cu (327,295 nm), Rb (780,026 nm), Sr (407,771 nm), Zn (213,857 nm)

Kemometrijska analiza provedena je pomoću programa IBM SPSS (verzija 28). Analiza glavnih komponenti (eng. Principal component analysis, PCA) i parcijalnih najmanjih kvadrata u kombinaciji s diskriminacijskom analizom (eng. Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA) primijenjene su za analizu podataka. Za obradu dobivenih spektara korišten je jednostavan program Fortran 95 (Lahey/Fujitsu Fortran 95 express v 7.20.00 compiler) koji je omogućio čitanje dobivenih .txt datoteka. Nadalje, interno razvijeni program korišten je za automatizaciju postupka unakrsne valjanosti izostavljanja (engl. Leave-one-out, LOO).

### 3.1.4. Uzorci

Uzorci kave, komercijalno dostupni na hrvatskom tržištu, prikupljeni su iz različitih trgovina. Odabrane su različite vrste kava te podijeljene u tri grupe: čista kava, instant kava i kava s dodacima (npr. s mlijekom, čokoladom, vanilijom, „Irish cream“ i lješnjakom). U radu je korišteno 20 uzoraka čiste kave, 8 uzoraka instant kave i 31 uzorak kave s dodacima (Tablica 3). Set od 11 uzoraka je korišten kao kalibracijski standard za EDXRF analizu pri korištenju empirijske kalibracije kao kvantitativne metode.



Tablica 3. Prikaz prikupljenih uzoraka za analizu podijeljenih u grupe.

Oznaka uzorka	Čista kava	Instant kava	Kava s dodacima
A 1			+
A 2			+
A 3			+
IG 1			+
IG 2			+
IG 3			+
IG 4			+
IG 5			+
IG 6			+
IG 7			+
F 1			+
F 2			+
F 3			+
J 1			+
J 2			+
J 3			+
J 4			+
J 5			+
J 6			+
N 1			+
N 2			+
N 3			+
N 4			+
N 5			+
A		+	
B		+	
C		+	
D		+	
E		+	
F	+		
G	+		
H	+		
I	+		
J	+		
K	+		
L	+		
M	+		

<b>N</b>	+		
<b>O</b>	+		
<b>P</b>		+	
<b>1</b>			+
<b>2</b>			+
<b>3</b>			+
<b>4</b>			+
<b>5</b>	+		
<b>6</b>	+		
<b>7</b>	+		
<b>8</b>	+		
<b>9</b>			+
<b>10</b>	+		
<b>11</b>		+	
<b>12</b>			+
<b>13</b>	+		
<b>14</b>	+		
<b>15</b>	+		
<b>16</b>	+		
<b>17</b>		+	
<b>18</b>	+		
<b>19</b>			+

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema uzoraka za analizu EDXRF-om

Uzorci kave pripremljeni su kao prešane pelete promjera 40 mm miješanjem 2 g praškastog uzorka s 0,2 g voska i prešanjem smjese na 20 Tm 60 s. Ovaj postupak korišten je za sve vrste analiziranih uzoraka kave (čistu kavu, instant kavu i kavu s dodacima). Za usporedbu, uzorci kave također su analizirani EDXRF-om u obliku rastresitog praha. Na *Slici 6* prikazana je ručna preša za dobivanje prešanih peleta, a na *Slici 7* oba oblika uzoraka korištenih za EDXRF analizu. U tu svrhu, 2 g kave je uneseno u posebnu teflonsku posudu s prstenom za pričvršćivanje nosača tankog filma (*Slika 8*). U ovom slučaju je korišten Prolene® rendgenski film debljine 4,0 µm (isporučuje Chemplex Industries, Inc., Palm City, FL, USA).



*Slika 6. Ručna preša korištena za dobivanje prešanih peleta uzoraka kave.*

a)



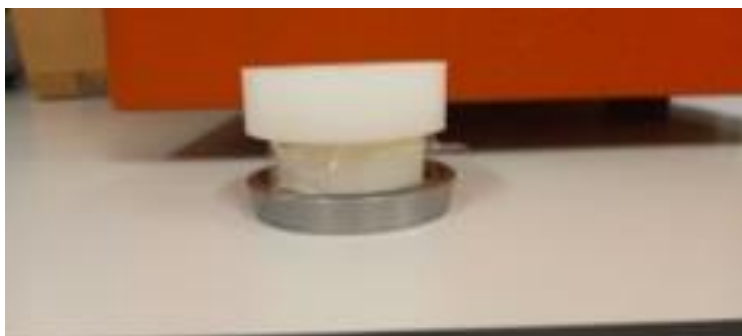
b)



*Slika 7. Pripremljeni uzorci za analizu EDXRF.*

*a) rastresiti prašak*

*b) komprimirani prašak*



*Slika 8. Teflonski držač uzorka za analizu EDXRF tehnikom.*

### **3.2.2. Priprema uzoraka za ICP-OES analizu**

Da bi se uzorci mogli ispitati pomoću ICP-OES analize potrebno je provesti digestiju krutih uzoraka kako bi isti bili u obliku otopine. U ovom radu provodila se mikrovalna digestija.

250 mg uzorka je izvagano i stavljeno u teflonske posude visoke gustoće. Zatim je dodano 9 mL koncentrirane dušične kiseline i 1 mL vodikovog peroksida. Posude su zatvorene i zagrijavane tijekom dvostupanjskog procesa digestije koji se sastoji od prvog koraka od 5 minuta gdje se postiže 180 °C i drugog koraka od 10 minuta gdje se uzorci digeriraju na postignutoj temperaturi. Nakon hlađenja, digerirane otopine uzorka su prebačene u tikvicu od 30 mL i napunjene do oznake ultračistom vodom.

### **3.2.3. Analiza glavnih komponenata (PCA)**

PCA je vrlo raširena i korisna statistička tehnika koja se koristi za identifikaciju obrasca ponašanja u distribuciji podataka kao i za olakšavanje interpretacije velikog broja podataka. PCA je najčešće primjenjivan postupak koji se koristi u svrhu klasifikacije ispitivanih varijabli. Koristi se za ispitivanje veza između različitih varijabli, detektiranje i interpretiranje ponašanja unutar uzorka npr. grupiranje, sličnost ili razlike ispitivanih elemenata. Princip PCA analize sastoji se od standardizacije podataka nakon čega se mijenja osnova. Novu osnovu čine vektori koji su linearne kombinacije izvornih deskriptora uzorka i automatski su odabrani na takav

način da su nove osi ortogonalne i skupljaju u svojim projekcijama najveću moguću količinu varijabilnosti podataka. Matematički, ti uvjeti dovode do jednostavnog postupka: matrica podataka je simetrizirana u skladu s korelacijskom matricom i rezultirajući svojstveni vektori su novi deskriptori ili ortogonalizirane glavne komponente (PC). Doprinosi svake izvorne varijable u svakoj glavnoj komponenti nazivaju se opterećenja, dok se nove koordinate uzoraka, u smislu novih osi, nazivaju rezultatima. Uz to, pokazano je da svojstvene vrijednosti pridružene svakom svojstvenom vektoru pokazuju udio varijance podataka zadržanog u njemu. Na taj način, glavne komponente su poredane od većih svojstvenih vrijednosti prema manjim. Obično samo prva dva ili tri svojstvena vektora razmatraju se u novom uzorku kartezijanskih prikaza. Važno je napomenuti da PCA izračun ne uključuje korištenje vrijednosti ili kategorije ovisne o svojstvu uzorka. Vrijednost svojstva je prikazana nakon što su dobiveni i predstavljeni rezultati novog uzorka i očekuje se da će nova reprezentacija moći razotkriti odgovarajuće grupacije ili asocijacije uzoraka.

### **3.2.4. Analiza parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS)**

U nekom smislu, PLS predstavlja postupak povezan s PCA. Glavna razlika nalazi se u činjenici da PLS uzima u obzir vrijednosti svojstava ili kategoriju uzoraka u izračunima. Algoritam kombinira iterativne korake koji se odnose na dijagonalizaciju i regresiju (Geladi i Kowalski, 1986). Konačni rezultat ponovno je skup ortogonalnih osi, ovdje nazvanih latentne varijable (LV), što se može tumačiti na isti način kao i PC-ovi, ali ovaj put uz optimizirano vrijeme za korelaciju s vrijednošću ili kategorijom svojstva uzorka. U slučaju klasifikacije uzoraka, postupak ima diskriminirajuće funkcije. Ako su uzorci svrstani u tri klase, model PLS-DA sastoji se od dvije diskriminirajuće funkcije. Prikazi uzoraka prema dvjema funkcijama, koje djeluju kao nove osi, trebale bi otkriti razdvajanje grupa u dvodimenzionalnoj karti. Obično se vrijednosti diskriminativne funkcije priložene svakom uzorku mogu tumačiti kao vjerojatnosti pripadanja nekoj skupini.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Evaluacija pripreme uzoraka kave za analizu EDXRF metodom

U većini studija za XRF analizu uzorci kave su pripremljeni u obliku prešanih peleta npr. Fiamengos i sur. (2021), Almeida i sur. (2021), Worku i sur. (2019). S druge strane Guazzeli i sur. (2022) su koristili rastresite praške za elementarnu analizu.

U ovom radu testirani su različiti postupci za pripremu uzoraka kave. S obzirom da su mnogi prikupljeni uzorci bili već pakirani u vrećice, količina korištenog uzorka bila je fiksirana na 2 g. U prvom nizu eksperimenata proučavan je utjecaj sadržaja veziva pripreme prešanih peleta. Pripremljeni su peleti s dodatkom 10% i 20% voska te čisti sirovi prašak bez dodataka. Vosak je organski spoj koji omogućava česticama bolju koheziju. Kako bi se otkrilo koji način pripreme uzorka je najbolji, sva tri načina testirana su na omjer signala i šuma. Omjer signala i šuma koristi se kao parametar kod određivanja analita niske koncentracije te što je on veći, to je analiza prikladnija. U *Tablici 4* prikazani su dobiveni rezultati. Za sve vrste kave (instant kavu, čistu kavu i kavu s dodacima), omjer signala i šuma je smanjen pri povećanom sadržaju voska. Ova se činjenica može povezati s razrjeđivanjem uzoraka pri dodatku veziva ili s matricom samog veziva koja može povećati pozadinu EDXRF spektra. Ovaj učinak je relevantniji u slučaju elemenata u tragovima (npr. određivanje Mn u kavi s aditivima). S obzirom da je osim omjera signala i šuma jako važna i kohezija uzoraka sirove kave, na kraju je odabrana priprema prešanih peleta s dodatkom 10% voska kao kompromis između prihvatljivih vrijednosti gore navedenih parametara.

Osim ovog načina pripreme uzorka ispitao se još jedan način pripreme uzorka za analizu kave pomoću EDXRF tehnike. Ispitana je izravna analiza rastresitog praha kave taloženjem 2 g materijala u posudi za uzorke bez ikakve dodatne pripreme što čini lakšu i bržu strategiju same pripreme uzorka te i analiza 2g kave u obliku prešanih peleta s dodatkom 10% voska. U *Tablici 5* prikazana je usporedba osjetljivosti i preciznosti rezultata dobivenih analizom čiste kave pripremljene na gore opisane načine. Kao što je prikazano, u svim slučajevima bolji rezultati su postignuti pri pripremi kave u obliku prešanih peleta. Uz to, kod rastresitog praška veličina zrna može varirati što može biti uzrok varijacije rezultata mjerenja. Dobiveni rezultati su pokazali da je najbolji način pripreme uzoraka kave u obliku prešanih peleta koji sadrže 2 g uzorka i 0,2 g voska (10% voska).

Tablica 4. Učinak sadržaja veziva (voska) koji se koristi za pripremu prešanih peleta kave na omjer signala i šuma. U svim slučajevima količina uzoraka kave bila je 2 g. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti duplikata mjerenja.

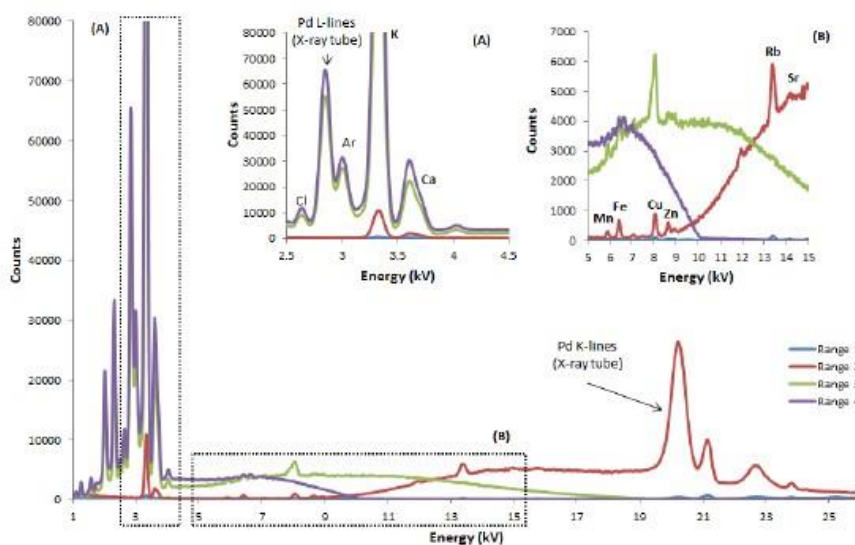
Element	Instant kava			Čista kava			Kava s dodacima		
	0% voska	10% voska	20% voska	0% voska	10% voska	20% voska	0% voska	10% voska	20% voska
K	50,6	44,9	36,7	44,8	38,9	29,5	23,0	15,5	14,8
Ca	8,7	5,3	4,0	7,4	5,7	5,0	13,1	8,7	7,5
Mn	2,9	1,9	1,9	2,5	1,9	1,5	1,4	0,4	n.d
Fe	5,4	3,3	3,2	9,2	9,9	7,8	2,9	1,0	0,9
Cu	2,4	1,8	1,9	5,0	4,8	4,9	n.d	n.d	n.d
Zn	2,2	1,1	1,1	2,9	1,8	1,6	2,1	0,9	0,7
Rb	1,8	0,9	0,7	0,5	0,5	0,4	1,2	0,1	0,08
Sr	1,1	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	n.d	n.d	n.d

Tablica 5. Učinak pripreme uzorka kave na elementarnu osjetljivost i preciznost procijenjenih korištenjem 5 nezavisnih uzoraka. Preciznost je izražena kao RSD, a osjetljivost je izražena omjerom intenziteta i koncentracije (mg/kg).

Element	Prešani peleti (2 g uzorka + 10% voska)		Rastresiti prašci (2 g uzorka)	
	RSD	Osjetljivost	RSD	Osjetljivost
K	0,7	0,27	3,7	0,27
Ca	6,5	0,27	3,7	0,29
Mn	9,2	1,28	17,9	0,92
Fe	8,4	1,22	8,8	0,95
Cu	3,5	2,17	7,7	1,54
Zn	7,0	1,44	61,9	0,36
Rb	9,9	0,31	91,7	0,25
Sr	24,4	0,02	17,0	0,03

## 4.2. Uvjeti mjerenja EDXRF tehnikom za multielementarnu analizu

Kako bismo dobili najbolju moguću ekscitaciju uzorka ispitani su najprikladniji uvjeti mjerenja EDXRF tehnikom. Eksperiment je proveden analizom uzoraka čiste kave pripremljenih u obliku prešanih peleta. Intenzitet se automatski podešava kako bi se postigla maksimalna brzina brojanja (100 000 cps). Vrijeme mjerenja od 200 s je odabrano kao kompromis između ukupnog vremena trajanja analize i prihvatljive ponovljivosti mjerenja. Izbor filtera snopa i radnih uvjeta temeljio se na najboljem postignutom omjeru signala i šuma za svaki element. Slika 9 prikazuje EDXRF spektre različitih uvjeta mjerenja. Zaključuje se da je za elemente poput Ca i K najbolji izbor bilo korištenje napona od 20 kV bez ikakvog primarnog filtra. S druge strane, za elemente koji imaju linije koje prikazuju veću emisiju energije (Mn, Fe, Cu, Zn, Rb i Sr) bila je bolja kombinacija primarnog aluminijskog filtra (500  $\mu\text{m}$  debljine) i rendgenske cijevi napona 40 kV. Budući da se u ovom radu istražuje više elemenata na kraju je odabrana uporaba prethodno navedene kombinacije filtra i rendgenske cijevi napona 40 kV za izvođenje analize uzoraka.



Slika 9. EDXRF spektri koji pokazuju utjecaj mjernih uvjeta na multielementarnu analizu uzoraka kave (Raspon 1: 50 kV Cu filter 100 $\mu\text{m}$ , Raspon 2: 40 kV Al filter 500 $\mu\text{m}$ , Raspon 3: 20 kV bez filtera, Raspon 4: 10kV bez filtera).



### 4.3. Provjera kvalitete rezultata dobivenih ICP-OES tehnikom

Za provjeru kvalitete rezultata dobivenih primjenom ICP-OES tehnike analizirana su tri organska referentna materijala. Kao što je prikazano u *Tablici 6*, u većini slučajeva bilo je dobro slaganje između koncentracija dobivenih ICP-OES tehnikom i referentnih vrijednosti. Ova činjenica upućuje na prikladnost korištenja koncentracija određenih ICP-OES tehnikom kao referentnih vrijednosti.

*Tablica 6. Vrijednosti koncentracije dobivene za multielementarnu analizu referentnih materijala korištenjem ICP-OES tehnike. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pridruženom standardnom devijacijom duplikata analize uzorka (u mg kg<sup>-1</sup>)*

	Lišće topole	Lišće topole CRM	Zeleni čaj	Zeleni čaj CRM	Mrkva	Mrkva CRM
<b>Element</b>	<b>ICP-OES</b>	<b>Referentna vrijednost</b>	<b>ICP-OES</b>	<b>Referentna vrijednost</b>	<b>ICP-OES</b>	<b>Referentna vrijednost</b>
K	1,34 ± 0,01	1,38 ± 0,07	1,56 ± 0,15	1,55 ± 0,07	0,99 ± 0,10	1,08 ± 0,04
Ca	1,76 ± 0,16	1,81 ± 0,13	1.12 ± 0,6	1,21 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Mn	38,8 ± 0,3	45 ± 4	1258 ± 97	1170 ± 60	10,8 ± 0,9	12,1 ± 0,5
Fe	290 ± 26	274 ± 17	357 ± 12	322 ± 23	171 ± 12	148 ± 15
Cu	9,1 ± 01	9,3 ± 1,0	25.9 ± 4,7	24 ± 1	4,4 ± 0,3	4,1 ± 0,3
Zn	37,2 ± 2,0	37 ± 3	33,6 ± 2,0	35 ± 2	11,7 ± 1,0	11,2 ± 0,5
Rb	7,88 ± 0,05	7,6 ± 0,8	83,9 ± 8,5	89 ± 9	8,0 ± 0,4	6,9 ± 0,5
Sr	192 ± 18	154 ± 9	29,0 ± 0,9	36 ± 2	19,0 ± 1,4	22 ± 2

#### 4.4. Kvantifikacijski pristupi EDXRF metode

S obzirom da referentni materijali za kavu nisu komercijalno dostupni, u ovom radu odabran je postupak bez primjene standardnog referentnog materijala koji se bazira na temeljnim parametrima (FP). Za ovu svrhu odabran je FP pristup koji nudi softver S2 EDXRF Ranger. Ovom metodom mogu se odrediti koncentracije elemenata primjenom modela koji uspoređuje eksperimentalne spektre s teorijskim. Neki parametri vezani uz pripremu uzorka primjerice promjer, masa i debljina uzorka mogu biti uključeni u ovaj model kako bi se postiglo bolje slaganje između spektara. Nadalje, moguće je i uključiti molekulska formulu uzorka matrice kako bi se smanjio utjecaj samoapsorpcije te postigao bolji efekt slaganja spektara. U ovom radu sastav matrice uzorka procijenjen je iz omjera vrhova raspršenja izmjerenih intenziteta. Eksperimentalna kalibracija omjera nekoherentnih i koherentnih Pd (anodna rendgenska cijev) vrhova raspršenja za mjerene spojeve prikazane na *Slici 10* koji imaju efektivni atomski broj ( $Z_{eff}$ ) između 6,16 i 14,65 poslužio je za uspostavljanje jednadžbe za određivanje efektivnog broja za nepoznate uzorke.  $Z_{eff}$  je izračunat pomoću sljedećeg izraza:

$$Z_{eff} = \frac{\sum(W_k Z_k A_k)}{\sum(W_k A_k)}$$

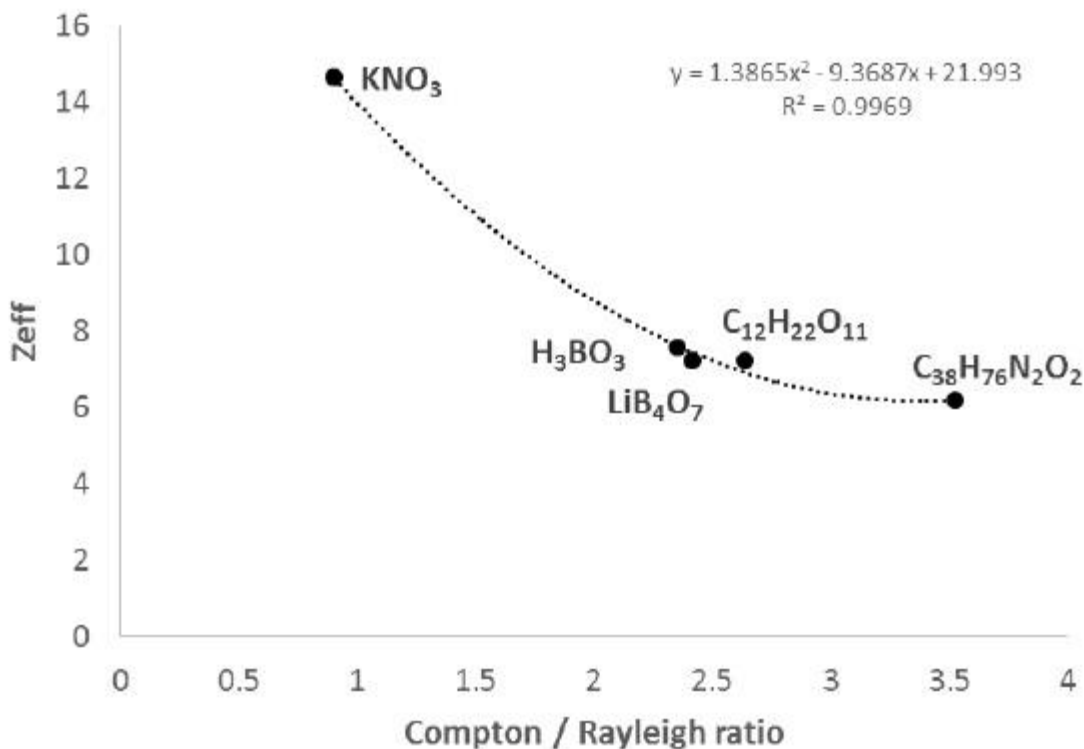
Gdje je:

$W_k$  postotak mase elementa  $k$  u spoju,

$Z_k$  je atomski broj elementa  $k$ ,

$A_k$  je atomska masa elementa  $k$ .

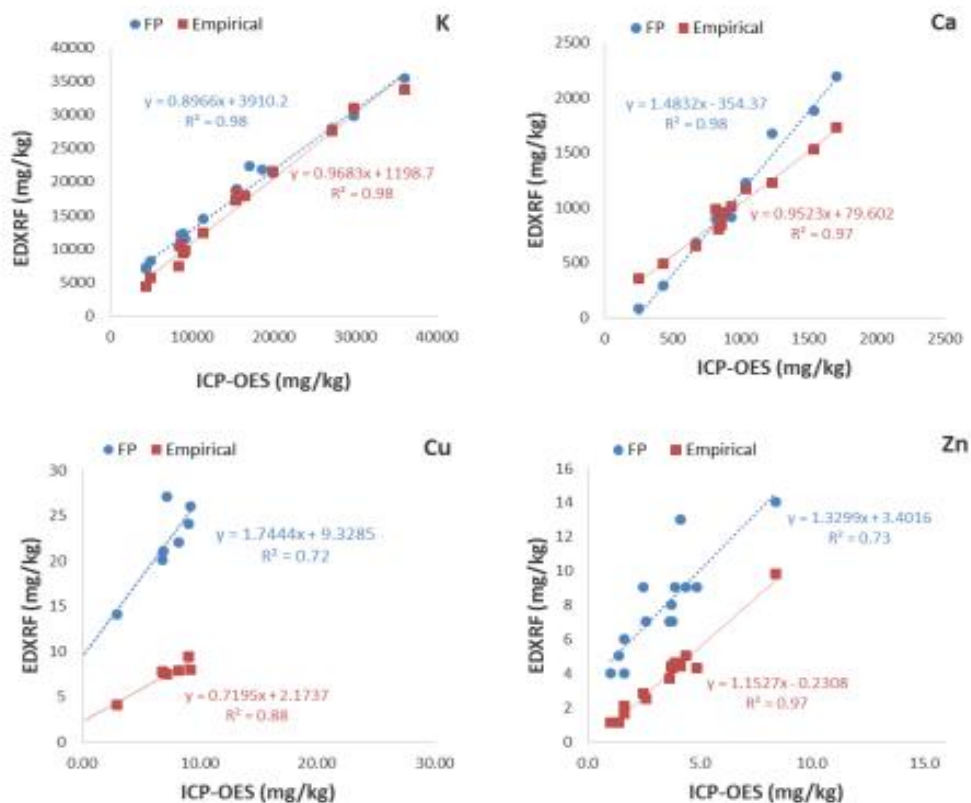
Potom je  $Z_{eff}$  procijenjen za svaku vrstu uzorka kave koji se razmatra. Dobiveni rezultati nisu pokazali značajne razlike između  $Z_{eff}$  vrijednosti za različite vrste kave. Za čistu kavu dobiven je  $Z_{eff} = 6,92 \pm 0,16$  gdje je  $n=10$ , za instant kavu  $Z_{eff} = 7,01 \pm 0,13$  gdje je  $n=2$  i za kavu s dodacima  $Z_{eff} = 6,88 \pm 0,19$  gdje je  $n=7$ . Uzimajući rezultate u obzir, procijenjena je srednja  $Z_{eff}$  vrijednost ( $Z_{eff} = 6,916$ ,  $n=19$ ) koja je korištena za određivanje matrice koju čini smjesa elemenata koji imaju takav efektivan atomski broj ( $C_{25}H_{32}N_{10}O_{12}$ ).



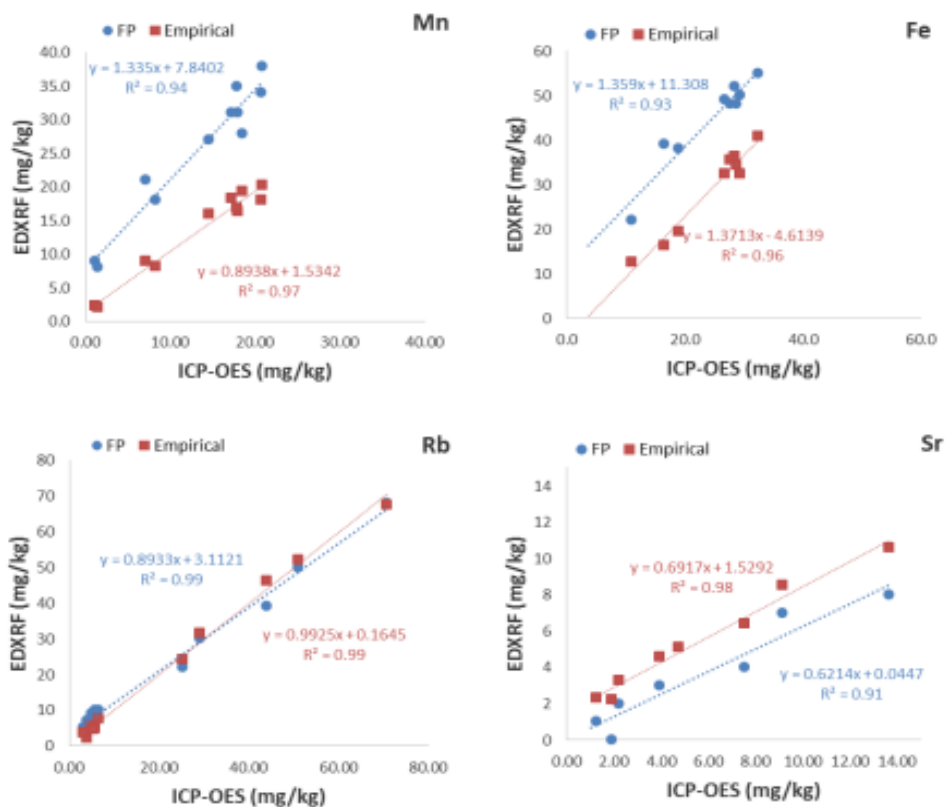
Slika 10. Eksperimentalna kalibracija omjera raspršenja.

Kako bi se proučila kvaliteta rezultata dobivenih FP metodom, set uzoraka kave pripremljen je metodom mikrovalne digestije te analiziran pomoću ICP-OES tehnike. Dobiveni rezultati smatrani su referentnim u ovom radu te su uspoređeni s onima dobivenim primjenom FP EDXRF metode uz linearnu regresiju. Za usporedbu su procijenjeni koeficijent korelacije ( $R^2$ ), odsječak i nagib pravaca. Ako su rezultati za obje metode jednaki, ovi parametri se ne bi trebali značajno razlikovati od  $R^2 = 1$ , nagiba = 1 i presjeka = 0. Regresijski dijagrami korelacije rezultata dobivenih za uzorke kave pripremljene mikrovalnom digestijom te analizirane ICP-OES tehnikom i FP EDXRF metodom prikazani su na *Slici 10* i *Slici 11*. Općenito, za većinu elemenata postignuta je prihvatljiva linearnost (osim za elemente u tragovima kao što su Cu i Zn), dok su vrijednosti nagiba i presjeka bile su značajno različite od 1 odnosno 0. S obzirom na rezultate dobivene FP-EDXRF metodom, drugi kvantifikacijski pristup, koji se temelji na korištenju empirijske kalibracije, također je istražen. Empirijska kalibracija postignuta je koristeći set od 11 uzoraka kave koji pokrivaju cijeli raspon koncentracija elemenata (prikazano u *Tablici 6*). Za sve analite, kalibracija se temeljila na regresijskom dijagramu uz korekciju intenziteta analita (kompenzirajući međuelementarne učinke i preklapanje linija) u odnosu na

koncentraciju (referentna vrijednost dobivena pripremom uzorka pomoću mikrovalne digestije te ICP-OES tehnikom). Kao što je prikazano u *Tablici 7* dobivena je dobra linearnost za većinu proučavanih elemenata ( $R^2 = 0,98-0,99$ ). Zatim je proveden korak validacije korištenjem dobivenih kalibracijskih modela za određivanje koncentracije analita u drugoj skupini uzoraka koji je potpuno neovisan o uzorcima korištenim za kalibraciju. Ovi su uzorci bili isti oni prethodno kvantificirani metodom FP-EDXRF. Iz rezultata prikazanih na *Slici 11 i 12* može se zaključiti kako su korištenjem metode empirijske kalibracije dobiveni bolji rezultati. Iako su dobivene značajne razlike u usporedbi s ICP-OES za elemente prisutne u vrlo niskim razinama koncentracije (npr. Cu), rezultati su bili svakako poboljšani. Stoga je empirijska kalibracija odabrana kao način kvantifikacije uzoraka kave pomoću EDXRF tehnike.



*Slika 11. Regresijski dijagram korelacije rezultata dobivenih za analizirane uzorke kave pomoću ICP-OES-a u odnosu na EDXRF pomoću različitih pristupa kvantifikacije za K, Ca, Cu, Zn. (FP: temeljni parametri, Empirical: Empirijska kalibracija).*



Slika 12. Regresijski dijagram korelacije rezultata dobivenih za analizirane uzorke kave pomoću ICP-OES-a u odnosu na EDXRF pomoću različitih pristupa kvantifikacije za Mn, Fe, Rb, S. (FP: temeljni parametri, Empirical: Empirijska kalibracija).

Tablica 7. Raspon koncentracija elemenata u uzorcima kave korištenim za kalibraciju i dobivene vrijednosti za linearnu regresiju. Usporedba rezultata dobivenih pomoću EDXRF tehnike i referentnih vrijednosti (mokra digestija + ICP-OES).

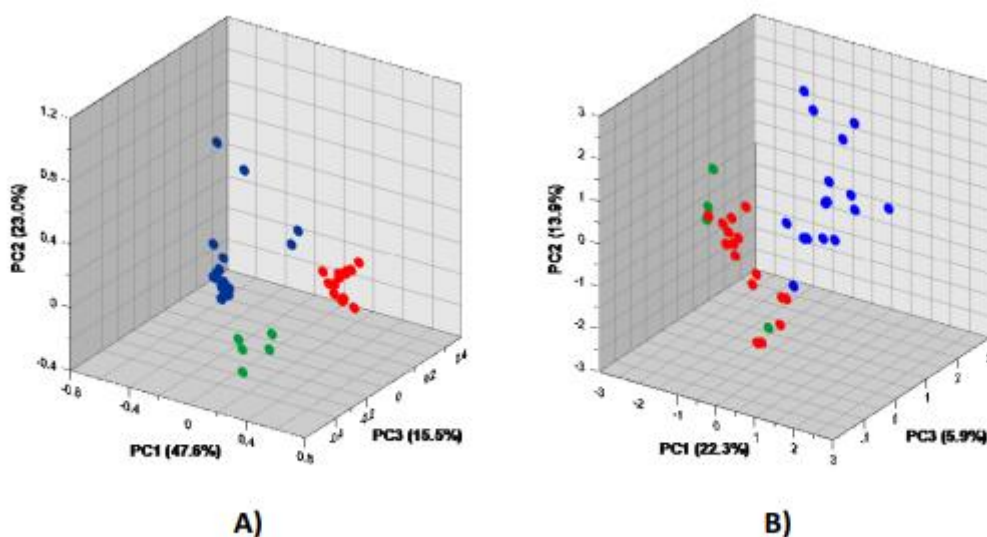
Element	Min (mg kg <sup>-1</sup> )	Max (mg kg <sup>-1</sup> )	n	R <sup>2</sup>
K <sup>1</sup>	0,34	3,58	11	0,99
Ca <sup>1</sup>	0,0246	0,1854	11	0,97
Mn	0,84	16,62	10	0,95
Fe	3,3	33,7	8	0,99
Cu	0,34	9,89	7	0,99
Zn	0,945	13,6	9	0,98
Rb	3,22	98,21	9	0,99
Sr	1,25	22,57	10	0,90

<sup>1</sup> – u postotku (g 100g<sup>-1</sup>)

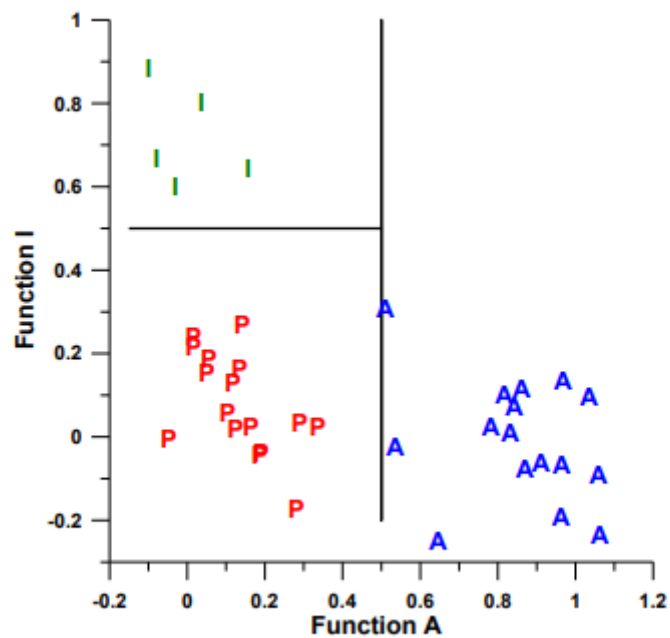
#### 4.5. Kemometrijske strategije u kombinaciji s EDXRF podacima za klasifikaciju tipa kave

Nakon što je razvijena EDXRF metoda za analizu uzoraka kave, različite kemometrijske tehnike kao što su PCA i PLS-DA primijenjene su na dobivene podatke kako bi se istražio njihov potencijal za klasifikaciju različitih vrsta kava (čista kava, instant kava i kava s dodacima). PCA je jedan od najčešće korištenih kemometrijskih alata koji se koristi u kombinaciji s nekom od XRF tehnika za razlikovanje vrste ispitivanih uzoraka (prema njihovom podrijetlu, kvaliteti, vrsti, sorti itd.) u znanosti o prehrani (Feng i sur., 2021; Čepo i sur., 2022). U ovoj studiji, koncentracije elemenata (K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb i Sr) određene empirijskom EDXRF metodom korištene su kao varijable. Prije statističke analize, sadržaj elemenata je bio standardiziran kako bi se kompenzirale različite ljestvice. Kao što je prikazano na *Slici 13A*, tri glavne komponente (PC) izdvojene su za skup podataka, što objašnjava 86,1% ukupnog broja varijabilnosti. Prema dobivenim rezultatima pojedinih varijabli kao najznačajnija komponenta pokazala se PC1. Pokazalo se da je PC1 izrazito povezan sa gotovo svim varijablama (osobito sa sadržajem Mn), izuzev sadržaja Ca i Zn. Sadržaj Ca i Zn čine informaciju druge glavne komponente, PC2 (gotovo 50% za svaki element). Glavni doprinosi treće glavne komponente, PC3 dolaze uglavnom od sadržaja Rb (s negativnom korelacijom), a zatim od sadržaja K (negativna korelacija), te sadržaja Fe i Cu. Dobiveni rezultati (*Slika 13A*) pokazali su dobro grupiranje uzoraka kave ovisno o njihovoj vrsti (čista kava, instant kava i kava s dodacima). U slučaju uzoraka kave iz skupine kava s dodacima, može se uočiti veća disperzija uzoraka u usporedbi s uzorcima čiste kave i one za uzorke instant kave. Ova se činjenica može povezati s inherentnim varijabilnim elementarnim sastavom dodataka kavi (mlijeko, čokolada, vanilija, irska krema i lješnjak). Kao alternativa za ubrzanja cijelog analitičkog procesa, primjena PCA izravno na dobiveni EDXRF spektar (bez potrebe prilagođavanja i kvantifikacije) također je testirana. Odabrano je 1570 kanala ekstrahiranih iz EDXRF spektra i korišteno kao varijable. Dobiveni rezultati prikazani su na *Slici 13B*. Primjenom ovih varijabli pokazalo se da PC1, PC2 i PC3 objašnjavaju samo 42,1% ukupne varijabilnosti i grupiranja između ispitanih skupina uzoraka. Kako bi se postigla bolja klasifikacija uzoraka pomoću EDXRF spektra, primjenjena je i PLS-DA analiza. Dobiveni rezultati su pokazali da su svi ispitani uzorci bili ispravno klasificirani u svoje skupine. Kako bi se testirala pouzdanost modela, smatralo se da je potrebno dobiti predviđanje klasifikacije uzorka. Spomenuti postupak je proveden pomoću „Leave-one-out“ (LOO) izračuna. Ovaj se postupak sastoji od predviđanja članstva svakog uzorka pomoću isključenja istog iz podataka,

izgradi se model s preostalih 36 uzoraka i na kraju se primijeni model na uklonjeni uzorak. Procedura zahtijeva izradu ukupno 37 PLS-DA modela, jedan po predviđenom uzorku. Na *Slici 14* prikazani su rezultati PLS-DA-LOO. Svaki uzorak je prikazan prema modelu sastavljenom od dviju diskriminantnih funkcija koje su različite za sve uzorke (jer je svaki model klasifikacije dobiven iz različitih izračuna prilagodbe). Za prvu klasifikaciju svakog predviđenog uzorka primjenjuje se funkcija (funkcija A). Ako je dobivena vrijednost veća od 0,5 uzorak je klasificiran kao kava tipa A, odnosno kava s dodacima. Ako je vrijednost manja od 0,5 tada se razmatra još jedna diskriminantna funkcija (funkcija I). A ako je vrijednost dobivena za ovu funkciju veća od 0,5 uzorak je klasificiran kao kava tipa I, odnosno instant kava. U drugim slučajevima uzorak je klasificiran kao tip P, odnosno čista kava. Slika pokazuje dobro grupiranje (ograničenja vrijednosti funkcija prikazana su kao granični pragovi) gdje su tri vrste kave međusobno odvojene. U ovom slučaju nisu pronađene pogreške u klasifikaciji. Ova činjenica potvrđuje da se razmotrene vrste uzoraka mogu izravno klasificirati koristeći EDXRF spektar kao varijable i PLS-DA bez potrebe za korištenjem koncentracije elemenata kao varijabli. Unatoč tome, potrebna su dodatna istraživanja primjenom ovog pristupa i na druge vrste hrane.



*Slika 13. Dijagram rezultata analize glavnih komponenti (PCA) izveden iz: (A) koncentracija elemenata (K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb i Sr) utvrđena u uzorcima kave empirijskom kalibracijom i (B) EDXRF analiza iz informacija cijelog EDXRF spektra (plava boja označava kavu s dodacima, zelena predstavlja instant kavu, a crvena čistu kavu).*



Slika 14. Razvrstavanje uzoraka postupkom „Leave one out“ (I: instant kava, P: čista kava, A: kava s dodacima) koristeći PLS-DA iz potpunih neobrađenih spektrografskih podataka. Svako predviđanje skupine uzoraka dobiveno je iz drugog para klasifikacijskih funkcija A i I.



## 5. Zaključak

U ovom radu razvijena je EDXRF metoda za određivanje elementarnog sastava (K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr i Rb) različitih vrsta uzoraka kave. Metoda je jednostavna i brza i sastoji se od izrade peleta od 2 g praškastog materijala s 0,2 g voska i koristeći empirijske kalibracije spektrometra sa setom karakteriziranih uzoraka kave (prethodno pripremljeni uzorci postupkom mikrovalne digestije te analiziranih ICP-OES tehnikom). Rezultati različitih kemometrijskih pristupa koji su istraženi za klasifikaciju tipa kave (čistu kavu, instant kavu i kavu s dodacima) pokazali su da primjena PLS-DA na EDXRF spektru može biti obećavajući pristup. Primjenom PLS-DA na EDXRF spektru nije potrebno odrediti sadržaj pojedinih elemenata što se obično koristi kao varijabla u PCA analizi. Smatra se da rezultati dobiveni u ovom radu mogu biti korisni za uspostavljanje pouzdane jednostavne metode za multielementarnu analizu različitih uzoraka kave pomoću EDXRF-a, kao i za pružanje dobre osnove za daljnju primjenu EDXRF spektara kao otiska uzorka u drugim studijama sljedivosti i/ili provjere autentičnosti prehrambenih proizvoda u budućnosti.

## 6. Literatura

Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*, 2014, 19 164–174.

Almeida JS, Meira AL, Oliveira MS, Teixeira LSG. Direct multielement determination of Cd, Pb, Fe, and Mn in ground coffee samples using energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *X-ray Spectrom* 2021, 50 2-8.

Anthemidis AN, Pliatsika VG. On-line slurry formation and nebulization for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Multi-element analysis of cocoa and coffee powder samples. *J Anal At Spectrom* 2005, 20 1280–1286.

Ashu R, Chandravanshi BS Concentration levels of metals in commercially available Ethiopian roasted coffee powders and their infusions. *Bull Chem Soc Ethiop* 2011. 25 11–24.

Avila DS, Puntel RL, Aschner M. Manganese in health and disease. *Met Ions Life Sci*, 2013, 13 199-227.

Battsengel E, Murayama T, Fukushi K, Nishikizawa S, Chonokhuu S, Ohir A, Tsetsgee S, Davaasuren D. Ecological and Human Health Risk Assessment of Heavy Metal Pollution in the Soil of the Ger District in Ulaanbaatar, Mongolia. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, 17(13) 4668

Beard JL. Iron requirement in adolescent females. Symposium: Improving adolescent iron status before childbearing. *J Nutr*. 2000, 130 440–442.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Food chemistry. Berlin, Springer Science & Business Media, 2009, str. 938–970.

Bertrand B, Villarreal D, Laffargue A, Posada H, Lashermes P, Dussert S. Comparison of the effectiveness of fatty acids, chlorogenic acids, and elements for the chemometric discrimination of coffee (*Coffea arabica* L.) varieties and growing origins. *J Agric Food Chem* 2008, 56 2273–2280.

Brown KH, Wuehler SE, Peerson JM. The Importance of Zinc in Human Nutrition and Estimation of the Global Prevalence of Zinc Deficiency. *Food Nutr Bull*, 2001, 22 113-125.

Cano-Marquinaa A, Tarín JJ, Cano A. The impact of coffee on health. *Maturitas* 2013, 75 7-21.

Cook JD, Skikne BS, Lynch SR, Reusser ME. Estimates of iron sufficiency in the US population. *Blood*. 1986, 68 726–31

Čepo DV, Karoglan M, Borgese L, Depero LE, Marguí E, Jablan J. Application of benchtop total-reflection X-ray fluorescence spectrometry and chemometrics in classification of origin and type of Croatian wines. *Food Chem* 2022.

dos Santos EJ, de Oliveira E. Determination of mineral nutrients and toxic elements in Brazilian soluble coffee by ICP-AES. *J Food Comp Anal* 2001, 14 523–531.

dos Santos FR, de Oliveira JF, Bona E, Barbosa GMC, Melaquiades FL. Evaluation of pre-processing and variable selection on energy dispersive X-ray fluorescence spectral data with partial least square regression: A case study for soil organic carbon prediction. *Spectr Acta Part B* 2021, 175.

dos Santos JS, dos Santos MLP, Conti MM. Comparative study of metal contents in Brazilian coffees cultivated by conventional and organic agriculture applying principal component analysis. *J Braz Chem Soc* 2010, 21 1468–1476.

Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity and GABA/glutamate interactions. *Neurochem Int* . 2003, 43 475–480.

Fagan CC, Everard C, O'donnell CP, Downey G, Sheenan EM, Delahunty CM, O'Callaghan DJ, Howard V. Prediction of processed cheese instrumental texture and meltability by mid-infrared spectroscopy coupled with chemometric tools, *J of Food Engin*, 2007, 80 1068-1077.

Farah A. Coffee Constituents. U: Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. Prvo izdanje. Chu YF, urednik, SAD, Blackwell Publishing Ltd., 2012, str. 21-58.

Feng X, Zhang H, Yu P. X-ray fluorescence application in food, feed, and agricultural science: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2021 61 2340-2350.

Ferreira, T., Shuler, J., Guimarães, R., Farah, A. Introduction to Coffee Plant and Genetics. U: Coffee: Production, Quality and Chemistry, Farah A., urednica, London, The Royal Society of Chemistry, 2019. str. 1-25.

Fiamengos Y, Papoci S, Dumitrascu C, Ghidotti M, Zdiniakova T, Ulberth F, De la Calle Guntiñas MB. Are the elemental fingerprints of organic and conventional food different? (2021), ED-XRF as screening technique. *J Food Comp Anal* 2021, 99.

Filho VRM, Polito WL, Neto JAG Comparative studies of the sample decomposition of green and roasted coffee for determination of nutrients and data exploratory analysis. *J Braz Chem Soc* 2007, 18 47–53.

Finley JW, Penland JG, Pettit RE, Davis CD. Manganese in Health and Disease. *J Nutr.* 2003, 133 2849–2856

Gałaszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem*, 2013, 50 78.

Grembecka M, Malinowska E, Szefer P. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Sci Total Environ* 2007, 383 59–69.

Guazelli MA, Curado JF, Loureiro KP, Medina NH Rizzutto MA. Ingestion dose and elemental composition in coffee by X-ray fluorescence and gamma-ray spectrometry. *J Phys Conf ser* 2022, 2340.

Halfdanarson TR, Kumar N, Li CY, Phyllyk RL, Hogan WJ. Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review. *Eur. J. Haematol.* 2008, 80 523–531.

Hurrell RF. Bioavailability of iron. *Eur J Clin Nutr.* 1997, 51 4–8.

ICP-OES-ICP Chemistry, ICP OES Analysis, Strengths and Limitations, 2021.,  
<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/icp-oes-icp-chemistry-icp-oes-analysis-strengths-and-limitations-342265> , pristupljeno 11. 2 2024.

Jaiswal R, Kuhnert N. Hierarchical scheme for liquid chromatography/ multi-stage spectrometric identification of 3,4,5-triacyl chlorogenic acids in green Robusta coffee beans. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010, 24, 2283-2294.

Keen CL, Ensunsa JL, Watson MH, Baly DL, Donovan SM, Monaco MH, Clegg MS. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology* 1999, 20 213–223.

Klevay LM. Is the Western diet adequate in copper? *Trace J Elem. Med. Biol.* 2011, 25 204–212

Krivan V, Barth P, Morales AF. Multielement analysis of green coffee and its possible use for the determination of origin. *Microchim Acta* 1993, 110 217–236.

Li F, Gong A, Qui L, Zhang W, Li J, Liu Y, Liu Y, Yuan H. Simultaneous determination of trace rare-earth elements in simulated water samples using ICP-OES with TODGA extraction/back-extraction. *Plos One* 2017

Magalhaes CEC, Lima EC, Krug FJ, Arruda MAZ. Direct analysis of coffee and tea for Al determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Microchim Acta* 1999, 132 95–100.

Mazzafera P. Trigoneline in coffee. *Phytochemistry.* 1991, 30 2309-2310

McDowell LR. Minerals in Animal And Human Nutrition; 2nd ed. Amsterdam, Elsevier Science, 2003, str 660.

McKenzie JM, Fosmire GJ, Sandstead HH. Zinc deficiency during the latter third of pregnancy: effects on fetal rat brain, liver and placenta. *J Nutr* 1975, 105 1466–1475.

Melquiades FL, Appolini CR. Application of XRF for environmental analysis. *J Radioanal Nucl Chem* 2004, 262 533–541.

Mussatto SI, Machado EMS, Martins S, Teixeira JA. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocess Technol* 2011, 4 661–672.

Noda T, Tsuda S, Mori M, Takigawa S, Matsuura-Endo C, Kim SJ, Hashimoto N, Yamauchi H. Determination of the phosphorus content in potato starch using an energy-dispersive X-ray fluorescence method. *Food Chem*, 2006, 95 632–637.

Nolte J. ICP Emission Spectrometry: A practical guide, 2. edition. Weinheim, WILEY-VCH, 2021, str 3

Olechno E, Puścion-Jakubik A, Socha K, Zujko ME. Coffee Brews: Are They a Source of Macroelements in Human Nutrition? *Foods*, 2021, 10(6), 1328.

Oleszczuk N, Castro JT, da Silva MM, Korn MGA, Welz B, Vale MGR Method development for the determination of manganese, cobalt and copper in green coffee avilaehucomparing direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 2007, 73 862–869.

Oliveira M, Casal S, Morais S, Alves C, Dias F, Ramos S, Mendes E, Delerue-Matos C, Oliveira BPP. Intra- and interspecific mineral composition variability of commercial coffees and coffee substitutes. Contribution to mineral intake. *Food Chem*, 2012, 130 702–709.

Onianwa PC, Adetola IG, Iwegbue CMA, Ojo MF, Tella OO. Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks. *Food Chem* 1999, 66 275–279.

Paltridge NG, Palmer LJ, Milham PJ, Guild GE, Stangoulis JCR. Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain. *Plant Soil*, 2012, 361 251-260.

Perring L, Andrey D. ED-XRF as a Tool for Rapid Minerals Control in Milk-Based Products. *J Agric Food Chem*, 2003, 51 4207-4212.

Pohl P, Stelmach E, Welna M, Szymczycha-Madeja A. Determination of the Elemental Composition of Coffee Using Instrumental Methods. *Food anal methods*, 2013, 6, 598-613.

Pravilnik o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina, 2004, Zagreb, Narodne novine, broj 172 (NN 172/2004).

Prohaska JR, Lukasewycz OA. Copper deficiency suppresses the immune response of mice. *Science*, 1981, 213, 559-561.

Prohaska JR, Luecke RW, Jasinski R. Effect of zinc deficiency from day 18 of gestation and/or during lactation on the development of some rat brain enzymes. *J Nutr* 1974, 104 1525–1531.

Qin Z, Gongora MC, Ozumi K, Itoh S, Akram K, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of Menkes ATPase in Angiotensin II-Induced Hypertension. *AHA J*. 2008, 52 945–951

Qin Z, Itoh S, Jeney V, Ushio-Fukai M, Fukai T. Essential role for the Menkes ATPase in activation of extracellular superoxide dismutase: implication for vascular oxidative stress *Faseb J* 2006, 20 334–336



Ribeiro AS, Moretto AL, Arruda MAZ, Cadore S. Analysis of powdered coffee and milk by ICP OES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchim Acta* 2003, 141 149–155.

Rousseau RM, Willis JP, Duncan AR. Practical XRF calibration procedures for major and trace elements. *X-ray Spectrom* 1996, 25 179–189.

Scheiber I, Dringer R, Mercer JFB. Copper: effects of deficiency and overload. *Met ions life sci* 2013, 11 361-374.

Szymczycha-Madeja A, Welna M, Pohl P. Fast method of elements determination in slim coffees by ICP-OES. *Food chem.* 2015, 32(9) 1488-1500

Tagliaferro FS, de Nadai Fernandes EA, Bacchi MA Quality assessment of organic coffee beans for the preparation of a candidate reference material. *J Radioanal Nucl Chem* 2006, 269 371–375.

Wakasungi DSM, Damatto SR, Ulrich JC. Natural radionuclides  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{228}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  and inorganic chemical elements determined in mineral waters from Águas de Contendas and Lambari, Brazil. *J Radioanal Nucl Chem* 2020, 9 14

Walravens PA. Nutritional importance of copper and zinc in neonates and infants. *Clin Chem.* 1980, 26 185–189

Weinberg BA, Bealer BK. The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug. New York, Routledge, 2001, str. 3-4.

West M, Ellis AT, Potts PJ, Strelci C, Vanhoof C, Wegrzynek D, Wobrauschek P. Atomic spectrometry update. XRay fluorescence spectrometry. *J Anal At Spectrom* 2009. 24 1289–1326.

West M, Ellis AT, Potts PJ, Strelci C, Vanhoof C, Wegrzynek D, Wobrauschek P. Atomic spectrometry update–XRay fluorescence spectrometry. *J Anal At Spectrom* 2010, 25 1503–1545.

Worku M, Upadhyay HR, Latruwe K, Taylor A, Blake W, Vanhaecke F, Duchateau L, Boeck P. Differentiating the geographical origin of Ethiopian coffee using XRF- and ICPbased multi-element and stable isotope profiling, *Food Chem*, 2019. 290 295-307.

## 7. Sažetak/Summary

Kava je jedan od najpopularnijih napitaka diljem svijeta stoga je ispitivanje sastava kave od iznimne važnosti kako za proizvođače tako i za potrošače. Minerali zastupljeni u kavi su, osim za kvalitetu krajnjeg proizvoda, bitni sa zdravstvenog gledišta jer neki od njih djeluju kao antioksidansi, sudjeluju u biološkim procesima u organizmu, a određeni posjeduju i toksične učinke.

Cilj ovog rada bio je kritički procijeniti EDXRF tehniku za multielementarnu analizu uzoraka čiste kave, instant kave i kave s dodacima koristeći rezultate dobivene ICP-OES tehnikom kao referentne vrijednosti. Ispitani su najbolji način pripreme uzorka za EDXRF analizu, najprikladniji uvjeti mjerenja te najtočniji način kvantifikacije uzoraka. Za provjeru kvalitete rezultata dobivenih primjenom ICP-OES tehnike analizirana su tri organska referentna materijala te uspoređena sa spomenutim rezultatima. Nadalje, različite kemometrijske tehnike kao što su PCA i PLS-DA primijenjene su na dobivene podatke kako bi se istražio njihov potencijal za klasifikaciju različitih vrsta kava.

Dobiveni rezultati u ovom radu pokazali su da mogu biti korisni za uspostavljanje pouzdane jednostavne metode za multielementarnu analizu različitih uzoraka kave pomoću EDXRF-a, kao i za pružanje dobre osnove za daljnju primjenu EDXRF spektara kao otiska uzorka u drugim studijama sljedivosti i/ili provjere autentičnosti prehrambenih proizvoda u budućnosti.

Coffee is one of the most popular beverages around the world, which is why studying the composition of coffee is extremely important for both producers and consumers. The minerals contained in coffee are, not only important for the quality of the final product, but also for health as some of them act as antioxidants, and are involved in biological processes in the body, while others have toxic effects.

The aim of this work was to critically evaluate the EDXRF technique for the multielemental analysis of samples of pure coffee, instant coffee and coffee with additives using the results obtained with the ICP-OES technique as reference values. The best method of sample preparation for EDXRF analysis, the most suitable measurement conditions and the most accurate method for quantifying the samples were examined. In order to verify the quality of the results obtained with the ICP-OES technique, three organic reference materials were analyzed and compared with the aforementioned results. Finally, different chemometric methods such as PCA and PLS-DA were applied to the data obtained to investigate their potential for the classification of different coffee varieties.

It is concluded that the results obtained in this work can be useful to establish a reliable simple method for the multielemental analysis of different coffee samples by EDXRF and provide a good basis for further application of EDXRF spectra as sample fingerprinting in other traceability and/or authentication studies of food in the future.

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

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Kritička procjena energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije za multielementarnu analizu kave

Ana Todorčić

#### SAŽETAK

Kava je jedan od najpopularnijih napitaka diljem svijeta stoga je ispitivanje sastava kave od iznimne važnosti kako za proizvođače tako i za potrošače. Minerali zastupljeni u kavi su, osim za kvalitetu krajnjeg proizvoda, bitni sa zdravstvenog gledišta jer neki od njih djeluju kao antioksidansi, sudjeluju u biološkim procesima u organizmu, a određeni posjeduju i toksične učinke. Cilj ovog rada bio je kritički procijeniti EDXRF tehniku za multielementarnu analizu uzoraka čiste kave, instant kave i kave s dodacima koristeći rezultate dobivene ICP-OES tehnikom kao referentne vrijednosti. Ispitani su najbolji način pripreme uzorka za EDXRF analizu, najprikladniji uvjeti mjerenja te najtočniji način kvantifikacije uzoraka. Za provjeru kvalitete rezultata dobivenih primjenom ICP-OES tehnike analizirana su tri organska referentna materijala te uspoređena sa spomenutim rezultatima. Nadalje, različite kemometrijske tehnike kao što su PCA i PLS-DA primijenjene su na dobivene podatke kako bi se istražio njihov potencijal za klasifikaciju različitih vrsta kava. Dobiveni rezultati u ovom radu pokazali su da mogu biti korisni za uspostavljanje pouzdane jednostavne metode za multielementarnu analizu različitih uzoraka kave pomoću EDXRF-a, kao i za pružanje dobre osnove za daljnju primjenu EDXRF spektara kao otiska uzorka u drugim studijama sljedivosti i/ili provjere autentičnosti prehrambenih proizvoda u budućnosti.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 14 grafičkih prikaza, 7 tablica i 66 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Minerali, kava, energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija

Mentor: **Izv. prof. dr. sc. Jasna Jablan**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Izv. prof. dr. sc. Jasna Jablan**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Izv. prof. dr. sc. Suzana Inić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2024.

## 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

### Critical evaluation of energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for multielemental analysis of coffee

Ana Todoric

#### SUMMARY

Coffee is one of the most popular beverages around the world, which is why studying the composition of coffee is extremely important for both producers and consumers. The minerals contained in coffee are, not only important for the quality of the final product, but also for health as some of them act as antioxidants, and are involved in biological processes in the body, while others have toxic effects. The aim of this work was to critically evaluate the EDXRF technique for the multielemental analysis of samples of pure coffee, instant coffee and coffee with additives using the results obtained with the ICP-OES technique as reference values. The best method of sample preparation for EDXRF analysis, the most suitable measurement conditions and the most accurate method for quantifying the samples were examined. In order to verify the quality of the results obtained with the ICP-OES technique, three organic reference materials were analyzed and compared with the aforementioned results. Finally, different chemometric methods such as PCA and PLS-DA were applied to the data obtained to investigate their potential for the classification of different coffee varieties. It is concluded that the results obtained in this work can be useful to establish a reliable simple method for the multielemental analysis of different coffee samples by EDXRF and provide a good basis for further application of EDXRF spectra as sample fingerprinting in other traceability and/or authentication studies of food in the future.

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

Thesis includes: 47 pages, 14 figures, 7 tables and 66 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Minerals, coffee, energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry

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

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Suzana Inic, Ph.D.** Associate 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: March 2024.

