

Određivanje aniona u funkcionalnim vodama ionskom kromatografijom

Fijavž, Mojca

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:351890>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



8438/7200

Mojca Fijavž

**Određivanje aniona u funkcionalnim vodama
ionskom kromatografijom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u laboratoriju Odsjeka kemijsko-fizikalnih vještačenja u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ministarstva unutarnjih poslova RH pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan, uz komentorstvo dr. sc. Ivane Bačić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Jasni Jablan i komentorici, dr. sc. Ivani Bačić, na velikoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

SADRŽAJ

| | |
|---------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. FUNKCIONALNA HRANA I FUNKCIONALNE VODE | 2 |
| 1.2. IONSKA KROMATOGRFIJA | 3 |
| 1.2.1. Kratka povijest ionske kromatografije..... | 4 |
| 1.2.2. Princip ionske kromatografije..... | 4 |
| 1.3. PREDNOSTI IONSKE KROMATOGRFIJE | 5 |
| 1.3.1. Brzina analize..... | 5 |
| 1.3.2. Osjetljivost | 6 |
| 1.3.3. Selektivnost..... | 6 |
| 1.3.4. Simultana detekcija aniona | 6 |
| 1.3.5. Stabilnost kolona..... | 6 |
| 1.4. KLORIDI..... | 7 |
| 1.4.1. Učinci na ljude | 8 |
| 1.5. SULFATI..... | 9 |
| 1.5.1. Učinci na ljude | 10 |
| 1.6. FLUORIDI..... | 11 |
| 1.6.1. Učinci na ljude | 11 |
| 1.7. FOSFATI | 12 |
| 1.7.1. Učinci na ljude | 13 |
| 1.8. ACETATI..... | 13 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 16 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 17 |
| 3.1.1. Korištene kemikalije | 17 |
| 3.1.2. Radni instrumenti i pribor | 17 |
| 3.1.3. Uzorci..... | 17 |
| 3.2. METODE..... | 17 |
| 3.2.1. Priprema otopina | 17 |
| 3.2.2. Priprema uzoraka | 18 |
| 3.2.3. Ionski kromatograf ICS 2000 Dionex..... | 19 |
| 3.2.4. Statistička analiza..... | 20 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 4.1. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA..... | 22 |
| 4.2. KEMOMETRIJSKE METODE OBRADJE PODATAKA | 29 |

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 5. ZAKLJUČAK | 33 |
| 6. LITERATURA..... | 35 |
| 7. SAŽETAK/ SUMMARY..... | 40 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. FUNKCIONALNA HRANA I FUNKCIONALNE VODE

Pojam „funkcionalna hrana“ prvi put se pojavio u Japanu 1980-tih i odnosio se na prehrambene proizvode obogaćene nutrijentima koji posjeduju korisna fiziološka djelovanja (Kwak i Jukes, 2001). Prema Europskoj komisiji funkcionalna hrana se definira kao prehrambeni proizvod koji se može smatrati funkcionalnim samo ako zajedno s osnovnim nutritivnim sastavnicama prehrane ima blagotvorne učinke na jednu ili više funkcija ljudskog organizma, čime se poboljšavaju opći fizički uvjeti i / ili smanjuje rizik od nastanka bolesti (Orrù i sur., 2018). Funkcionalna hrana može pozitivno utjecati na opće stanje organizma u smislu njegovog poboljšanja, može smanjiti rizik od različitih bolesti ili se može koristiti tijekom liječenja određenih bolesnih stanja (Mark-Herbert, 2004).

Usklađena akcija Europske komisije o znanstvenom pristupu Funkcionalnoj hrani u Europi (FUFOSE) imala je za cilj uspostavljanje znanstveno utemeljenog pristupa konceptima u znanosti o funkcionalnoj hrani u Europi koristeći znanstvenu bazu koja podupire dokaze da određene hranjive tvari pozitivno utječu na fiziološke funkcije. Prema definiciji FUFOSE najbitnije značajke funkcionalne hrane su:

- treba biti svakodnevna hrana
- prirodnog sastava
- pozitivno djelovanje na fiziološke funkcije
- može poboljšati zdravlje ili smanjiti rizik nastanka bolesti
- može se uzimati kao dio uobičajene prehrane (Roberfroid, 2000).

Među različitim vrstama funkcionalne hrane koja je slobodno dostupna na tržištu, funkcionalni napitci su najpopularniji i lako ispunjavaju zahtjeve potrošača u pogledu veličine, oblika, skladištenja i mogućnosti sadržavanja poželjnih hranjivih sastojaka (Sanguansri i Augustin, 2010). Tijekom proteklih desetljeća, tržište funkcionalnih napitaka razvilo je sve veći broj proizvoda, koji se oglašavaju zbog prepoznatljivih značajki kao što su poboljšanje zdravlja crijeva ili kardiovaskularnog sustava, jačanje imunskog sustava, kontroliranje tjelesne težine ili suzbijanje procesa starenja (Kenefick i Chevront, 2012).

Funkcionalni napitci dijele se na:

a.) napitci na bazi mlijeka koja uključuju probiotike i mineralima obogaćena pića

b.) napitci od voća i povrća

c.) sportski i energetske napitci (Corbo i sur., 2014).

Funkcionalni napitci koji sadrže omega-3-masne kiseline i CoQ10 promoviraju se za poboljšanje zdravlje srca, vlakna i probiotici za zdravlje crijeva i kontrolu tjelesne mase, kolagen za poboljšanje cjelokupnog izgleda kože, a cink i vitamin D za pojačano djelovanje imunološkog sustava (Orrù i sur., 2018).

1.2. IONSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda odjeljivanja u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna i kreće se u određenom smjeru (Ettre, 1993). Nepokretna faza može biti čvrsta i tekuća. Ako je tekuća može biti raspoređena na čvrstoj fazi koja može, ali ne mora, sudjelovati u procesu odjeljivanja. Tekuća faza može biti kemijski vezana na čvrstu fazu kovalentnom vezom ili imobilizirana na nju (Bolanča i Ukić, 2013).

Glavne podjele unutar same metode su frontalna kromatografija, kromatografija ispiranjem i kromatografija istisnućem. U frontalnoj kromatografiji se uzorak, koji može biti tekućina ili plin, kontinuirano unosi u kromatografsku podlogu i u njoj se ne koristi dodatna pokretna faza. Kod kromatografije ispiranjem i kod kromatografije istisnućem uzorak se u ograničenoj količini mora unositi u sustav. Kromatografija istisnućem je u slučaju kad pokretna faza sadrži spoj koji se na nepokretnoj fazi zadržava jače nego sastojak uzorka koji se ispituje pri čemu dolazi do istiskivanja spomenutog uzorka. Kod kromatografije ispiranjem pokretna faza (eluens) kontinuirano prolazi kroz ili uzduž kromatografske podloge (Bolanča i Ukić, 2013).

S obzirom na oblik kromatografske podloge razlikujemo kolonsku i plošnu kromatografiju. Kod kolonske kromatografije se nepokretna faza nalazi unutar kolone, a kod plošne kromatografije je nepokretna faza ploha ili se nanosi na plohu.

Ovisno o fizikalnom stanju faza kromatografija se dijeli na plinsko-tekućinsku, plinsko-čvrstu, tekućinsku-tekućinsku i tekućinsku-čvrstu. A prema fizikalnom stanju pokretne faze kromatografija se dijeli na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (Bolanča i Ukić, 2013).

1.2.1. Kratka povijest ionske kromatografije

Za početak moderne ionske kromatografije mnogi obilježavaju godinu 1975, kad su Hamish Small, Timothy S. Stevens, i William C. Bauman izdali rad pod naslovom Ionsko izmjenjivačka kromatografija za razdvajanje i konduktometrijsko otkrivanje anionskih i kationskih vrsta. U tom radu autori opisuju ionsku izmjenjivačku kromatografiju s konduktometrijskim detektorom, koja je univerzalna i jako osjetljiva na sve ione (Small i sur., 1975).

1.2.2. Princip ionske kromatografije

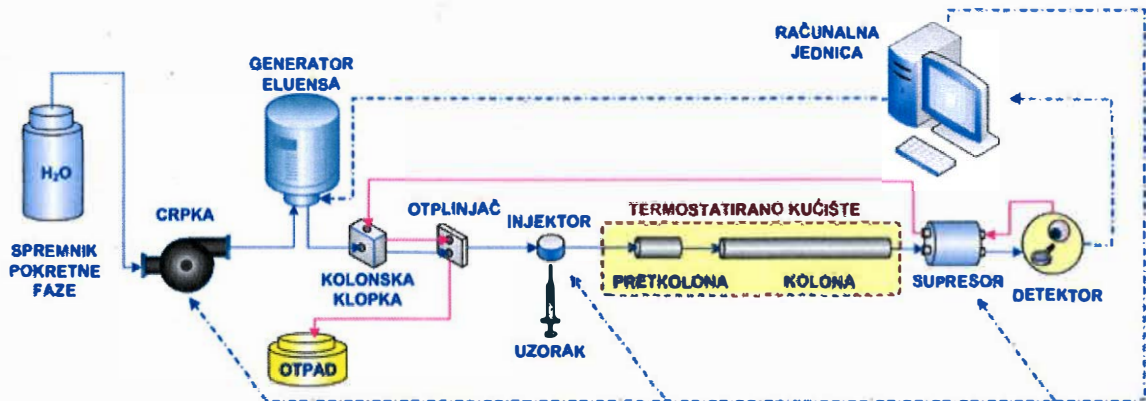
Ionska kromatografija je varijanta ionsko-izmjenjivačke kromatografije u kojoj se ioni, pogotovo anorganski, odjeljuju i/ili analiziraju primjenom ionskih izmjenjivača (Luterotti, 2014).

Kromatografija s ionskom izmjenom temelji se na stehiometrijskom omjeru između iona uzorka i mobilne faze u stacionarnoj fazi. Stacionarna faza obično je čvrsta i na nju su vezane funkcionalne skupine. Nosač funkcionalnih skupina obično je kopolimerizat stiren-divinilbenzen. Na polimer kolone kod kationsko izmjenjivačke kromatografije obično je vezana sulfonska skupina, dok se kod anionsko izmjenjivačke kromatografije vežu kvarterne amonijeve soli (Eith i sur., 2001).

Ionska kromatografija je tekućinska kromatografija koja razdvaja ione i polarne molekule na temelju njihovog afiniteta prema ionskom izmjenjivaču, koji može biti u krutom ili gel obliku (Small, 1989).

Na Slici 1 prikazan je dijagram osnovnih sastavnica modernog ionskog kromatografa s konduktometrijskom detekcijom. Voda kao pokretna faza potiskuje se kroz sustav tako da se crpi iz spremnika pomoću visokotlačne crpke s prigušivačem pulsova. Eluens nastaje elektrolitičkim putem u računalno kontroliranoj jedinici i onda putuje dalje kroz sustav. Ako je u sustavu prisutna jedinica za generiranje eluensa onda se iza nje nalazi kolonska klopka, pomoću koje se uklanjaju smetajuće ionske vrste te se reducira povećanje pozadinskog šuma s porastom koncentracijskog gradijenta eluensa. Nakon što eluens izlazi iz kolonske klopke iz njega se uklanjaju potencijalno prisutni plinovi. Nakon toga se u injektorskoj jedinici uzorak uvodi u tok pokretne faze i tako nosi dalje kroz kromatografsku pretkolonu i kolonu gdje dolazi do odjeljivanja sastojaka uzoraka. Obično se pretkolona i kolona nalaze u termostatiranom

kućištu. Kad analit izlazi iz kolone ulazi u elektrokemijski supresor, gdje dolazi do smanjenja pozadinskog šuma i do pojačanja signala analita. Tu se također nalazi detektor koji mjeri signal, koji se sakuplja i obrađuje u računalnoj jedinici. Svi materijali koji se koriste moraju biti odgovarajuće čistoće te su stoga dijelovi koji dolaze u kontakt s pokretnom fazom obično načinjeni od polietereeterketona i drugih polimera i materijala kao što je safir, rubin ili keramika, a koji se koriste u glavama crpki, sigurnosnim ventilima i injektoru (Bolanča i Ukić, 2015).



Slika 1. Shema modernog ionskog kromatografskog sustava s konduktometrijskom detekcijom (Bolanča i Ukić, 2015).

1.3. PREDNOSTI IONSKE KROMATOGRAFIJE

Za analizu kationa koriste se različite brze, precizne i osjetljive analitičke metode poput atomske apsorpcijske spektroskopije, induktivno spregnute plazme i dr. Klasične analitičke metode koje se primjenjuju za dokazivanje i određivanje aniona poput titrimetrije, gravimetrije, turbidimetrije ili kolorimetrije su dugotrajne, zahtijevaju dosta rada, a znaju biti i neprecizne. Prednosti ionske kromatografije nad ostalim metodama detekcije ili kvantifikacije iona su prvenstveno velika brzina analize, osjetljivost, visoka selektivnost kao i simultana detekcija većeg broja aniona (Weiss, 2016).

1.3.1. Brzina analize

Vrijeme potrebno za provođenje analize je vrlo važan parametar uslijed značajnog porasta broja uzoraka za analizu u svakodnevnom životu. Posljednjih godina uvođenjem kolona s visokom

učinkovitosti separacije, prosječno vrijeme analize smanjilo se na otprilike 10 minuta. Prosječno potrebno vrijeme za odjeljivanje aniona manje je od 5 minuta.

1.3.2. Osjetljivost

Granica detekcije za jednostavne anorganske anione i katione je 5 µg/L uz injektirani volumen od 25 µL. Korištenjem pretkoncentracijskih tehnika granica detekcije se može sniziti i na vrijednosti od 1 ng/L. Glavni faktor koji onemogućava daljnje snižavanje granica detekcije je onečišćenje sveprisutnim kloridnim i natrijevim ionima.

1.3.3. Selektivnost

Selektivnost ionske kromatografije za analizu anorganskih i organskih aniona i kationa osigurana je odabirom prikladnih sustava za odjeljivanje i detekciju. Visok stupanj selektivnosti postiže se korištenjem specifičnih detektora kao što je primjerice UV/Vis detektor za analizu nitrita u prisutnosti velikih količina klorida. Visok stupanj selektivnosti olakšava identifikaciju nepoznatih komponenata uzorka.

1.3.4. Simultana detekcija aniona

Glavna prednost ionske kromatografije je njezina sposobnost istovremene detekcije više komponenti uzorka. Uslijed toga, anionski i kationski sastav može se dobiti u kratkom vremenu što daje informaciju o sastavu ispitivanog uzorka kao i izostanak dugotrajnih testova. Međutim sposobnost ionske kromatografije za simultano određivanje sadržaja prisutnih iona u uzorku ograničena je uglavnom zbog velikih razlika u koncentracijama među različitim komponentama uzorka.

1.3.5. Stabilnost kolona

Stabilnost kolone uvelike ovisi o vrsti materijala koja se koristi za kolonu. U ionskoj kromatografiji najčešće se koriste smolasti materijali za kolonu kao što su npr. polimeri na bazi stirena. Visoka pH stabilnost ovih smola omogućuje upotrebu jakih kiselina i baza kao eluenta, što je preduvjet za široku primjenjivost ove metode. Kako stacionarne faze na bazi polimera pokazuju malu osjetljivost prema složenim matricama, kao što su otpadne vode, hrana ili tjelesne tekućine, jednostavno razrjeđenje uzorka s deioniziranom vodom prije filtracije ponekad je jedini postupak pripreme uzorka (Weiss, 2016).

1.4. KLORIDI

Kloridi su glavni izvanstanični ioni u tijelu (Health Canada, 1987). U prirodi su široko rasprostranjeni kao natrijeve (NaCl), kalijeve (KCl) i kalcijeve soli (CaCl₂) (www.who.int). Kloridi u vodi najčešće potječu iz prirodnih izvora kao što su minerali u tlu, ali često mogu biti posljedica antropogenih aktivnosti poput ispuštanja komunalnih i industrijskih voda. Povećane koncentracije klorida u prirodnim vodama mogu se javiti i kao posljedica miješanja vodnih tijela s morskom vodom te ispiranja umjetnih gnojiva koja sadrže KCl s poljoprivrednih površina. Sol koja se koristi tijekom zime za odleđivanje cesti može također utjecati na povišene koncentracije klorida u podzemnim vodama (Perera i sur., 2013).

Granica okusa kloridnog aniona u vodi ovisi o kationu koji je s njim povezan. Okusni pragovi za natrijev klorid i kalcijev klorid u vodi kreću se u rasponu od 200-300 mg/L (Zoeteman, 1980). Okus kave se mijenja ako je pripremljena sa vodom koja sadrži kloride u obliku natrijevog klorida u koncentraciji od 400 mg/L ili kloride u obliku kalcijeva klorida u koncentraciji od 530 mg/L (Lockhart i sur., 1955). Ako voda sadrži više od 250 mg/L klorida to joj daje slankasti okus. Ljudi uglavnom dolaze u kontakt sa kloridima putem hrane, odnosno dodavanjem kuhinjske soli (natrijeva klorida) hrani. Obično koncentracija klorida u namirnicama ne prelazi 0,36 mg/g hrane ali određene vrste prehrambenih proizvoda kao što su suhomesnati proizvodi mogu sadržavati velike količine klorida. Takvi proizvodi mogu sadržavati i do 70 mg/g klorida (AFSSA, 2002). Zabilježen je prosječni unos od 100 mg /dan kada se konzumira dijeta bez soli. Međutim, dodavanje soli tijekom obrade, kuhanja ili jedenja može značajno povećati razinu klorida u hrani, što rezultira prosječnim unosom putem hrane od 6 g/dan, što u nekim slučajevima može porasti i na 12 g/dan (Toft i sur., 1987). Studije u Hrvatskoj pokazale su da je procijenjen dnevni unos soli kod odraslih osoba između 12-13

g/dan, što se prvenstveno odnosi na unos soli putem hrane. Unos klorida putem konzumne vode zanemariv je u usporedbi sa unosom klorida putem prehrambenih namirnica. Vodom se unosi negdje do 8% ukupnog unosa klorida (AFSSA, 2002).

Klorid je neophodan za različite biološke funkcije. Olakšava izmjenu iona kroz transmembranske kloridne kanale. Tvori soli sa svim glavnim kationima (Na, K, Ca i Mg). Dobro je topljiv, a u okolišu postoji prvenstveno kao disocirani monovalentni anion (Elphic i sur., 2011).

Natrijev klorid se široko primjenjuje u proizvodnji industrijskih kemikalija kao što su kaustična soda, klor, natrijev klorit i natrijev hipoklorit. Natrijev klorid, kalcijev klorid i magnezijev klorid se intenzivno koriste u kontroli snijega i leda dok se kalijev klorid koristi u proizvodnji gnojiva (Toft i sur., 1987).

Kloridi se u vodi mogu određivati pomoću različitih analitičkih tehnika. Obično se određuju titrimetrijskim metodama kao što su jodometrijske titracije, titracije sa $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, ionskom kromatografijom ili pomoću različitih spektrofotometrijskih metoda (Parvinen i Lajunen, 1999). Granice detekcije za titraciju iznose oko 5mg/L (www.who.int).

1.4.1. Učinci na ljude

Sadržaj klorida u odraslim osobama iznosi između 82 i 105 g (Toft i sur., 1987). Normalno tijelo odraslog čovjeka sadrži približno 81,7 g klorida. Na temelju ukupnog gubitka klorida dnevno koji iznosi približno 530 mg/dan, preporučuje se prehrambeni unos za odrasle osobe približno 9 mg klorida po kg tjelesne težine što je nešto više od 1 g kuhinjske soli po osobi dnevno. Za djecu mlađu od 18 godina trebao bi biti dovoljan dnevni unos od 45 mg klorida putem prehrane (Toft i sur., 1987). Studije su pokazale da doza od 1 g natrijevog klorida po kg tjelesne težine može biti smrtonosna kod djeteta starog 9 tjedana (www.who.int).

Toksičnost klorida nije primijećena kod ljudi, osim u slučajevima gdje postoji poremećen metabolizam natrijevog klorida kao što je primjerice kod kongestivnog zatajenja srca (Wesson, 1969). Zdrave osobe mogu tolerirati unose velikih količina klorida pod uvjetom da postoji istodobni unos slatke vode. O učinku dugotrajnog uzimanja velikih količina klorida u prehrani malo se zna. Kao i kod pokusnih životinja čini se da je i kod ljudi hipertenzija povezana s povećanim unosom natrijevog klorida, a uzrokovana je povećanom koncentracijom natrijeva, a ne kloridnog iona (Toft i sur., 1987). Brojna istraživanja su pokazala da povećani unos klorida

ne uzrokuje značajne toksične učinke na ljude osim kod bubrežnih bolesnika koji već imaju prisutne poremećaje u regulaciji vode i elektrolita (Afssa, 2003).

1.5. SULFATI

Najviše oksidirani oblik sumpora je sulfatni ion. Tetraedarske je strukture, gdje je sumpor okružen s četiri atoma kisika koji tvore dvovalentni anion SO_4^{2-} (Wells, 1975). U prirodi sulfati nastaju oksidacijom sulfita kisikom. Sulfat ima brojne biosintetske i farmakološke funkcije te sudjeluje u mnogim fiziološkim procesima kao što je na primjer sulfoniranje što je bitan korak u biotransformaciji i detoksikaciji mnogih ksenobiotika (uključujući analgetike i protuupalna sredstva), steroida, kateholamina i žučnih kiselina (Markovich, 2001). Sulfoniranje se odvija u citosolu i Golgijevu aparatu (Klaassen i Boles, 1997).

Sulfati su prirodno prisutni u brojnim mineralima uključujući barit (BaSO_4), epsomit ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) i gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Greenwood i Earnshaw, 1984). Navedeni otopljeni minerali pridonose sadržaju minerala mnogih pitkih voda. Granične koncentracije okusa u vodi za piće iznose za natrijev sulfat 250-500 mg/L, za kalcijev sulfat 250-10000 mg/L, i 400-600 mg/L za magnezijev sulfat (NAS, 1977).

Sulfati i spojevi od sumporne kiseline se koriste u proizvodnji gnojiva, kemikalija, bojila, stakla, papira, sapuna, tekstila, fungicida, insekticida, adstrigensa i emetičkih spojeva. Osim toga koriste se i u rudarstvu, industriji drvne celuloze, metala te u preradi kože (Greenwood i Earnshaw, 1984). Aluminijski sulfat koristi se kao sedimentacijsko sredstvo u obradi vode za piće. Bakrov sulfat se koristio za kontrolu odnosno suzbijanje algi u javnom vodoopskrbnom sustavu (McGuire i sur., 1984).

Sulfati se u vodu ispuštaju iz različitih industrijskih objekata kao što su rudnici i talionice, iz tvornica celuloze i papira, tekstilnih tvornica i tvornica kože. Sulfatni spojevi različito su topljivi u vodi, pa su tako natrijev, kalijev i magnezijev sulfat dobro topljivi u vodi za razliku od kalcijevog i barijevog sulfata koji se slabo otapaju u vodi. Atmosferski sumporov dioksid, koji je nastao izgaranjem fosilnih goriva, može pridonositi sadržaju sulfata u površinskim vodama (Delisle i Schmidt, 1977).

Sulfati se u vodenim otopinama mogu odrediti pomoću gravimetrijske metode, u kojoj se sulfat istaloži u obliku barijevog sulfata. Ta metoda je prikladna za koncentracije sulfata iznad 10 mg/L (ISO, 1990).

Sulfati se također mogu koristiti kao aditivi u prehrambenoj industriji (Codex Alimentarius Commission, 1992). Kao aditivi, sulfati pridonose prosječno 453 mg dnevnoj količini unosa sulfata kod Amerikanaca (NAS, 1972).

Prosječni dnevni unos sulfata iz različitih izvora kao što su piće, zrak i hrana iznosi približno 500 mg.

U hrani mogu biti prisutni i sulfidi. Dio sulfida, prisutnih u hrani, može se oksidirati i preći u sulfate u probavnom traktu (Thienes i Haley, 1972).

1.5.1. Učinci na ljude

Uzimanje velikih količina magnezijevog ili natrijevog sulfata može uzrokovati dehidraciju (Fingl, 1980). Djeca te starije osobe imaju potencijalno visok rizik od dehidracije zbog proljeva, koji može biti uzrokovan visokom razinom sulfata u vodi za piće (US EPA, 1999a). Istraživanja su pokazala da voda koja sadrži više od 1000 mg sulfata po litri može uzrokovati laksativne učinke kod odraslih (US EPA, 1999b). Vode se prema razinama sulfata mogu podijeliti na hipolaksativne (od 0-100 mg SO₄/L), normolaksativne (od 101-250 mg SO₄/L) i hiperlaksativne (više od 250 mg SO₄/L) (Štambuk-Giljanović i sur., 2006).

Za zdravstvene ustanove se preporuča, da budu obaviještene o izvorima pitke vode koja sadržava više od 500 mg/L sulfata, zbog mogućih loših fizioloških učinaka pri višim koncentracijama sulfata. Nisu utvrđeni pogubni utjecaji sulfata na ljudsko zdravlje. Prosječna serumska koncentracija sulfata kod odraslih ljudi je 3,1 mg/100 mL. Sulfati su prisutni u svim tkivima u tijelu, ali najviše se ga nalazi u vezivnim tkivima (Dziewiatkowski, 1951).

Prevelike razine sulfata u krvi se brzo odstranjuju uglavnom urinom, ali se dio može izlučiti i preko žuči. Približno 85% sumpora u urinu nalazi se kao anorganski sulfat, 10% je u obliku organskog sulfata, dok se ostatak izlučuje kao alkil sulfat (Diem K. 1972).

Sulfatni anion je najmanje toksični anion. Smrtna doza za ljude u obliku kalcijevog sulfata je 45 g (McKee i Wolf, 1963).

1.6. FLUORIDI

Fluoridni ion izrazito je otrovan. Stupanj oksidacije mu je -1 (Filipović i Lipanović, 1995). Obično se određuje pomoću ion selektivne elektrode, što omogućuje mjerenje ukupne količine slobodnog i vezanog fluorida otopljenog u vodi. Metoda se može koristiti za vodu koja sadrži najmanje 20 µg/L fluorida (Slooff i sur., 1988). Za kišnicu u kojoj je fluorid bio prisutan u koncentraciji od 10 µg/L prijavljena je granica detekcije od 1 µg/L (Barnard i Nordstrom, 1982).

Tragovi fluorida prisutni su u mnogim vodama. Veće koncentracije često su povezane s podzemnim izvorima. U morskoj vodi zabilježena je ukupna koncentracija fluorida od 1,3 mg/L (Slooff i sur., 1988). U područjima koja su bogata mineralima koja sadrže fluoride, bunarska voda može sadržavati do oko 10 mg fluorida po litri. Najviša prijavljena prirodna razina je 2800 mg/L. Fluoridi također mogu ući i u rijeku kao rezultat industrijskog ispuštanja (Slooff i sur., 1988). U podzemnim vodama koncentracije fluorida variraju ovisno o vrsti stijene kroz koju voda prolazi, ali obično ne prelaze 10 mg/L (US EPA, 1985a). Sva vegetacija sadrži nekoliko fluorida koji se apsorbira iz tla i vode. Najveće razine se mogu naći u kelju i endiviji (Slooff i sur., 1988). Ostale namirnice koje sadrže visoke razine fluorida jesu riba i čaj. Visoke koncentracije u čaju mogu biti posljedica visokih prirodnih koncentracija u biljkama čaja ili posljedica upotrebe aditiva tijekom rasta ili fermentacije (IPCS, 1984).

Dnevne izloženosti fluoridu uglavnom ovise o zemljopisnom području. U Nizozemskoj su izračunali da ukupni dnevni unos iznosi 1,4–6,0 mg fluorida. Hrana predstavlja 80–85% ukupnog unosa fluorida a konzumna voda 0,03–0,68 mg/dan dok se putem pasti za zube unosi 0,2–0,3 mg fluorida dnevno. Djeca unose manje količine fluorida zbog manje konzumacije hrane i vode (Slooff i sur., 1988).

1.6.1. Učinci na ljude

Visoke razine fluorida u koncentracijama od 10 mg/L povezuju se sa zubnom fluorozom, gdje dolazi do pojave žućkastih ili smeđih mrlja na caklini, što u težim slučajevima može rezultirati i erozijom cakline, dok razina fluorida u koncentraciji manjoj od 0,1 mg/L može za posledicu imati propadanje zubi (Edmunds i Smedley, 1996). Koncentracije u vodi za piće od oko 1 mg/L

povezane su sa niskom učestalošću zubnog karijesa, pogotovo u djece dok više razine fluorida mogu rezultirati već spomenutom zubnom fluorozom (IPCS, 2002).

Endemska koštana fluoroza javlja se u ozbiljnom obliku uglavnom u Indiji, Kini i određenim regijama Afrike. Prvenstveno se povezuje sa konzumacijom vode za piće koja sadrži povišene razine fluorida ali izloženost dodatnim razinama fluora putem drugih izvora kao što je npr. ugljen sa visokim udjelom fluora može dodatno pridonositi pojavi koštane fluoroze. Tome pridonose i brojni drugi čimbenici kao što su potrošnja vode, nutritivni status, prehrana, dodatni izvori fluorida te izloženost drugim faktorima koji mijenjaju apsorpciju fluorida u tijelo. Jedna od mogućih značajki fluoroze je prijelom kostiju, iako su neka istraživanja pokazala protektivni učinak fluorida na frakturu (IPCS, 2002).

Većina fluorida izlučuje se putem bubrega (USNRC, 1993). Stoga je razumno da osobe s oštećenom bubrežnom funkcijom imaju veći rizik od toksičnosti fluorida od onih bez (WHO, 1996).

Povećani unos fluorida može također imati ozbiljne učinke na koštana tkiva. Koštana fluoroza, kod koje se javljaju nepovoljne promjene u strukturi kostiju, može se primjetiti kada voda za piće sadrži 3–6 mg fluorida po litri (IPCS, 1984).

1.7. FOSFATI

Fosfor je element koji se u periodnom sustavu nalazi u 15. skupini. U prirodi je dosta rasprostranjen ali se ne nalazi u elementarnom stanju zbog njegove velike kemijske aktivnosti. Glavni prirodni spojevi fosfora jesu fosforit koji se sastoji od kalcijeva fosfata, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ i različite vrste apatita koje sadrže kalcijev fluorid fosfat, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, kalcijev klorid fosfat, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ili kalcijev hidroksid fosfat, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Spojevi sa fosforom se također nalaze u sastavu životinjskih i biljnih tvari. U kostima je tako maseni udio kalcij-fosfata približno 60% (Filipović i Lipanović, 1991)a.

Fosfati se koriste u različite svrhe, u proizvodnji čelika, u vojnoj opremi za izradu zapaljivih bombi. Također se koriste u pirotehničkim sredstvima, kao pesticidi, u pastama za zube i deterdžentima.

1.7.1. Učinci na ljude

Ako se fosfat ne unosi u pravilnoj količini u organizam to može utjecati na metabolizam kalcija. Prekomjerman unos fosfata uz istovremeni manji unos kalcija može dovesti do negativnog odnosa kalcija. Povećane razine fosfata nakon obroka inhibiraju aktivaciju vitamina D koji je bitan za unos kalcija putem intestinalne apsorpcije te tako prekoračenje prihvatljivog unosa fosfata utječe na resorpciju kalcija ili može uzrokovati otpuštanje kalcija iz kostiju. Ako se smanje razine kalцитriola onda se paratiroidni hormon pojačano luči, zato da bi se kompenzirala interferencija povišenih količina fosfata s aktivacijom vitamina D. To stanje se opisuje kao nutritivna sekundarna hiperparatireoza koja uzrokuje povećanu koštanu pregradnju što može rezultirati gubitkom koštane mase i smanjenjem gustoće kostiju (Habuda-Stanić i sur., 2016).

1.8. ACETATI

Octena kiselina je jedna od najjednostavnijih struktura u kojima se može naći acetat (Chao i sur., 1978). Acetatni ioni su najstabilnije konjugirane baze. Acetat posjeduje dvije C-O veze jednake duljine. Stabiliziran je rezonantnim strukturama gdje obje strukture daju negativan naboj na kisikov atom (Smith, 2011).

Acetatni ion ima ogromnu ulogu u brojnim metaboličkim procesima poput acetil konenzima. Također se koristi u proizvodnji papira, plastike i boja. Natrijeve soli acetata glavni su elementi prisutni u prehrambenim proizvodima poput octa, lijekova, kozmetike i ribe (Matsuo i sur., 1998).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Funkcionalna hrana predstavlja prehrambene proizvode koji osim hranjive vrijednosti mogu imati i učinak na zdravlje ljudi. Konzumiranje funkcionalne hrane može dovesti do poboljšanja bioloških obrambenih mehanizama, prevencije ili oporavka od određenih bolesti, kontrole tjelesnih i mentalnih stanja i usporavanje procesa starenja. Na europskom tržištu prisutna je od sredine 90-ih godina prošlog stoljeća. Među različitim vrstama funkcionalne hrane funkcionalni napitci su najpopularniji te njihovo tržište iznimno raste. Među funkcionalnim napitcima, funkcionalne vode zauzimaju visoko mjesto po potrošnji u cijelom svijetu. Osim što sadrže nisku razinu šećera i kalorija obogaćene su aktivnim sastojcima, prirodnim ekstraktima, vitaminima i mineralima te na taj način pridonose očuvanju i poboljšanju općeg zdravlja. Komercijalno dostupni funkcionalni napitci formulirani su na način da opskrbljuju organizam energijom, nadoknađuju elektrolite, preveniraju dehidraciju te služe za hidrataciju prije i nakon vježbanja.

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati kvalitativni i kvantitativni sastav aniona u prikupljenim uzorcima funkcionalnih voda kao i u uzorku vode iz vodovodne mreže primjenom ionske kromatografije. Dobiveni rezultati analizirani su koristeći multivarijatnu statističku analizu, metodu glavnih komponenata (principal component analysis, PCA) i klustersku analizu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Korištene kemikalije

- Standard fluorid (F^-) 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Fluka Honeywell, USA)
- Standard acetat (CH_3COO^-) 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Fluka Honeywell, USA)
- Standard klorid (Cl^-) 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Fluka Honeywell, USA)
- Standard sulfat (SO_4^{2-}) 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Fluka Honeywell, USA)
- Standard fosfat (PO_4^{3-}) 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Fluka Honeywell, USA)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm^{-1} , pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, SAD)

3.1.2. Radni instrumenti i pribor

- Ionski kromatograf ICS 2000 Dionex (ThermoFisher Scientific, USA)
- mikropipete Rainin pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS, L-20 LTS i L-200 LTS (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- odmjerne tikvice, 10 mL; 25 mL
- poliviniliden fluorid membranski filteri za filtraciju uzoraka veličine pora 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

3.1.3. Uzorci

Uzorci funkcionalnih voda ($n=6$) komercijalno dostupnih na tržištu sakupljeni su u lokalnim trgovinama te je uzet jedan uzorak vode iz slavine. Svi prikupljeni uzorci pohranjeni su na sobnoj temperaturi do same analize.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema otopina

Priprema standardne otopine

Pripremljene su standardne otopine detektiranih aniona u rasponu koncentracija od 2-10 $\mu\text{g/mL}$.

Standardne otopine smjese aniona (F^- , CH_3COO^- , Cl^- , SO_4^{2-} i PO_4^{3-}) pripremljene su razrjeđivanjem pojedinačnih certificiranih referentnih otopina aniona za ionsku kromatografiju "FLUKA".

Tablica 1. Certificirane referentne otopine iona za ionsku kromatografiju

| Anioni | Koncentracija, $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------------|---------------------------------|
| Fluorid (Li^+) | 1000 |
| Acetat (CH_3COO^-) | 1000 |
| Klorid (Na^+) | 1000 |
| Sulfat (SO_4^{2-}) | 1000 |
| Fosfat (PO_4^{3-}) | 1000 |

Standardne otopine (2, 4, 6, 8 i 10 $\mu\text{g/mL}$) pripremljene su na način da je u odmjerne tikvice od 25 mL otpipetiran odgovarajući volumen certificiranih referentnih otopina aniona koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$ (prema tablici 2), a tikvice su nadopunjene ultra čistom vodom do oznake i dobro promućkane.

Tablica 2. Priprema standardnih otopina u tikvici od 25 mL.

| $V_{\text{aniona}} (\mu\text{L})$ | Koncentracija standardne otopine, $\mu\text{g/mL}$ |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
| 50 | 2 |
| 100 | 4 |
| 150 | 6 |
| 200 | 8 |
| 250 | 10 |

3.2.2. Priprema uzoraka

Uzorci (komercijalno dostupnih) funkcionalnih voda označeni su brojevima od 1 do 6, dok je uzorak vode iz slavine označen brojem 7. Uzorci za analizu pripremljeni su na način da je u

odmjerne tikvice od 10 mL otpipetiran odgovarajući volumen uzorka (Tablica 3), a tikvice su nadopunjene ultra čistom vodom do oznake i dobro promućkane. Svi uzorci funkcionalnih voda razrijeđeni su u omjeru 1:1. Kako su dobivene koncentracije za neke uzorke izašle iz područja linearnosti uzorci 2 i 7 su razrijeđeni dodatno 10 puta, a uzorak 4, 20 puta.

Tablica 3. Priprema uzoraka funkcionalnih voda i vode iz slavine u tikvici od 10 mL.

| Uzorak | V _{uzorka} (mL) | Ukupno razrjeđenje |
|----------------|--------------------------|--------------------|
| 1 | 5 | 2x |
| 2 ¹ | 5 | 2x |
| 2 ² | 1 | 10x |
| 3 | 5 | 2x |
| 4 ¹ | 5 | 2x |
| 4 ² | 0,5 | 20x |
| 5 | 5 | 2x |
| 6 | 5 | 2x |
| 7 | 1 | 10x |

3.2.3. Ionski kromatograf ICS 2000 Dionex

Koncentracije aniona u analiziranim uzorcima voda određene su pomoću ionskog kromatografa ICS 2000 Dionex koji je prikazan na slici 2.



Slika 2. Ionski kromatograf ICS 2000 Dionex.

Uzorci se u instrument injektiraju (ubrizgavaju/uvode) pomoću injekcijske šprice. Rezultat analize je kromatogram koji prikazuje ovisnost signala pojedinog iona izraženog u μS o vremenu izraženog u minutama. U tablici 4 prikazani su kromatografski uvjeti.

Tablica 4. Kromatografski uvjeti.

| | |
|------------------------|-----------------------------------------------------|
| Kolona | AS 19 (4x250 mm) |
| Pretkolona | AG 19 (4x50 mm) |
| Supresor | ASRS 4 mm |
| Pokretna faza (eluent) | KOH (EGC III KOH, DIONEX) |
| Gradijentna metoda | Promjena koncentracije pokretne faze od 10 do 58 mM |
| Protok pokretne faze | 1 mL/min |
| Temperatura | 30 °C |
| Tlak | 2000 psi |
| Volumen injektiranja | 20 μL |
| Detektor | Konduktometrijski detektor |
| Trajanje analize | 46,2 min |

3.2.4. Statistička analiza

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti 3 mjerenja. Za statističku obradu podataka korišten je program *Microsoft Excell 2016* programskog paketa *Microsoft Office* (Microsoft, SAD) i *PrismGraphPad 9* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, SAD, www.graphpad.com). Za multivarijatnu analizu (PCA i klusterska analiza) korišten je programski paket *XLStat* (*XLStat Software, New York, SAD*).

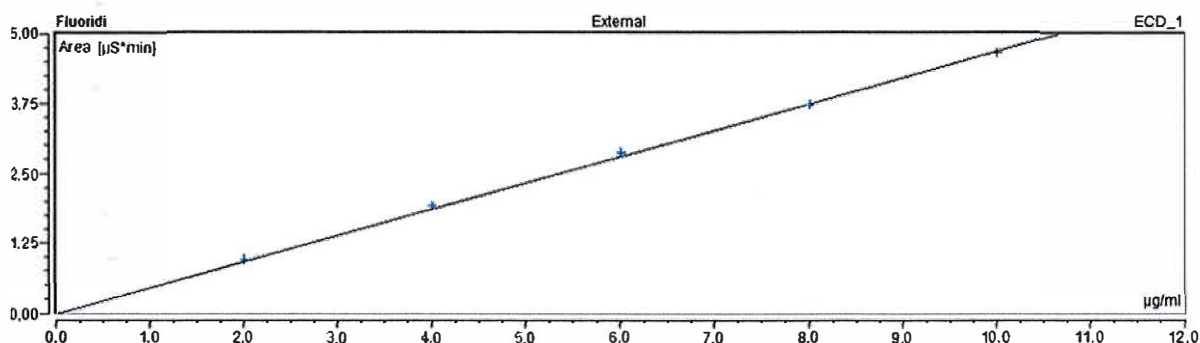
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA

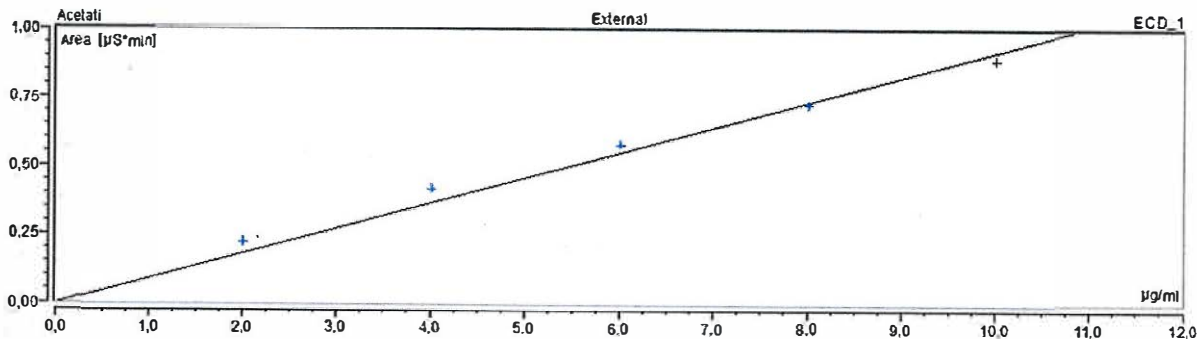
Za potrebe ovog rada prvo je napravljena kvalitativna analiza ispitivanih uzoraka. Svi prikupljeni uzorci funkcionalnih voda su pomiješani te analizirani kvalitativno kako bi se vidjelo koje od "klasičnih" aniona sadrže. Analiza je pokazala prisutnost fluorida (F^-), acetata (CH_3COO^-), klorida (Cl^-), sulfata (SO_4^{2-}) i fosfata (PO_4^{3-}). Analiza je također pokazala i prisutnost velike količine još jednog, najvjerojatnije organskog aniona, a pretpostavka je da se radi o citratu čija je prisutnost u uzorcima naknadno potvrđena metodom plinske kromatografije s masenim spektrometrom (GC/MS, rezultati nisu prikazani u ovom radu).

Rezultati su dobiveni postupcima analize uzoraka voda tehnikom ionske kromatografije primjenom ionskog kromatografa ICS 2000 Dionex. Analizirano je šest uzoraka komercijalno dostupnih funkcionalnih voda i jedan uzorak vode iz slavine. Sva kromatografska mjerenja izvedena su pri temperaturi od 30 °C. Za kalibraciju uređaja korištene su pripremljene standardne otopine detektiranih aniona u rasponu koncentracija od 2-10 $\mu g/mL$. Kalibracija je izvedena pomoću 5 različitih koncentracijskih nivoa, a mjerenja su rađena u duplikatu.

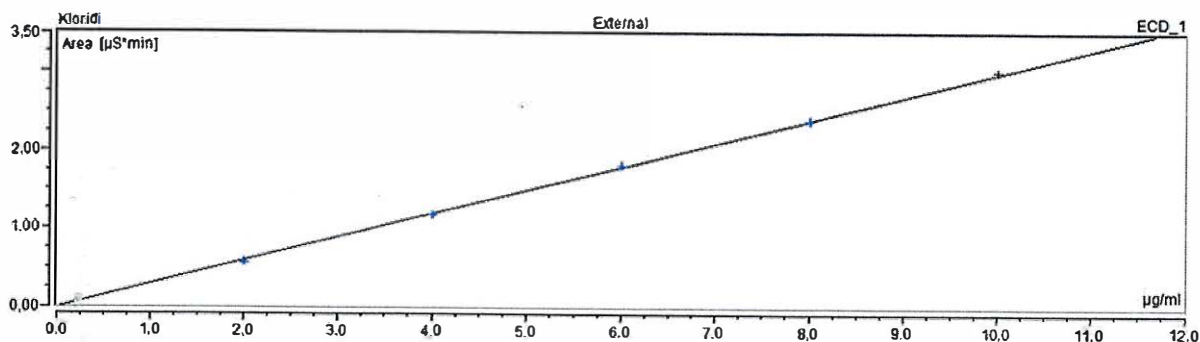
Dobiveni kalibracijski dijagrami za analizirane standardne otopine prikazani su na slikama 3., 4., 5., 6. i 7..



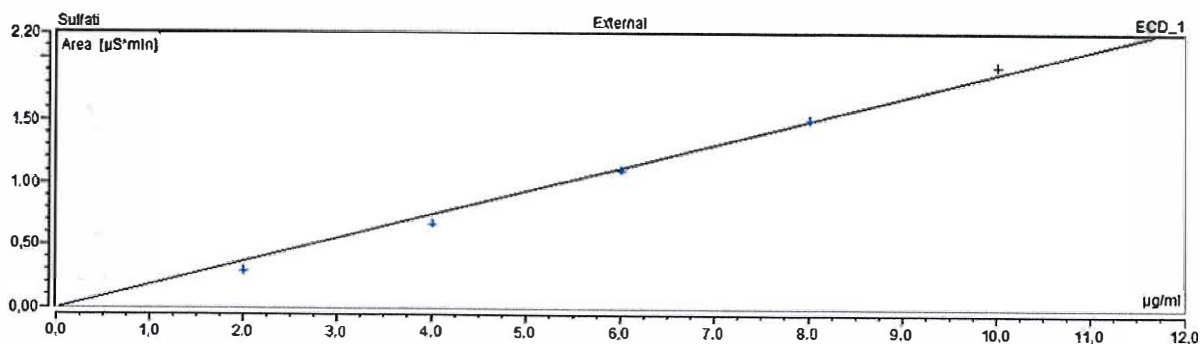
Slika 3. Kalibracijski pravac za analizu fluorida (F^-) ionskom kromatografijom.



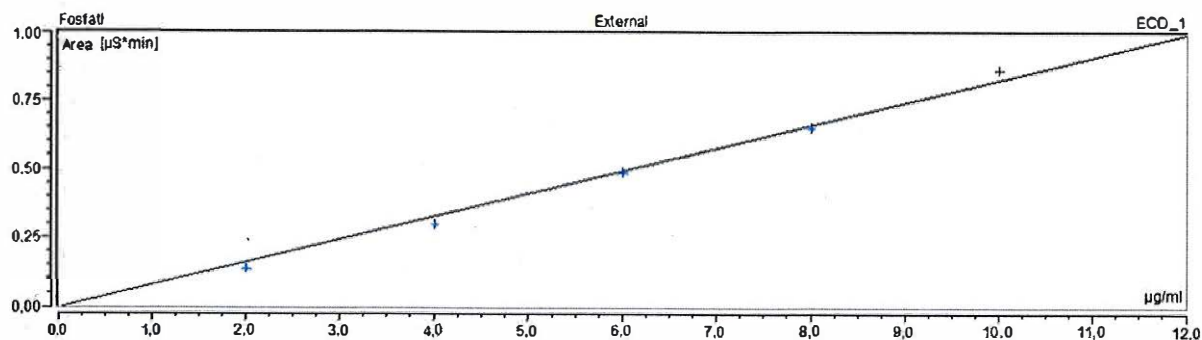
Slika 4. Kalibracijski pravac za analizu acetata (CH_3COO^-) ionskom kromatografijom.



Slika 5. Kalibracijski pravac za analizu klorida (Cl^-) ionskom kromatografijom.



Slika 6. Kalibracijski pravac za analizu sulfata (SO_4^{2-}) ionskom kromatografijom.



Slika 7. Kalibracijski pravac za analizu fosfata (PO_4^{3-}) ionskom kromatografijom.

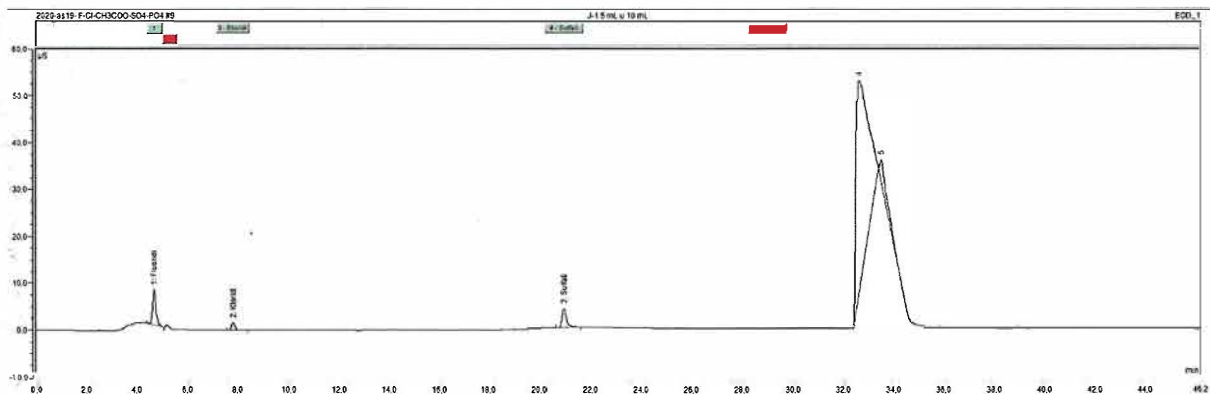
Parametri linearnosti dobiveni su mjerenjem površine ispod pika i prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Parametri linearnosti za analizirane anione.

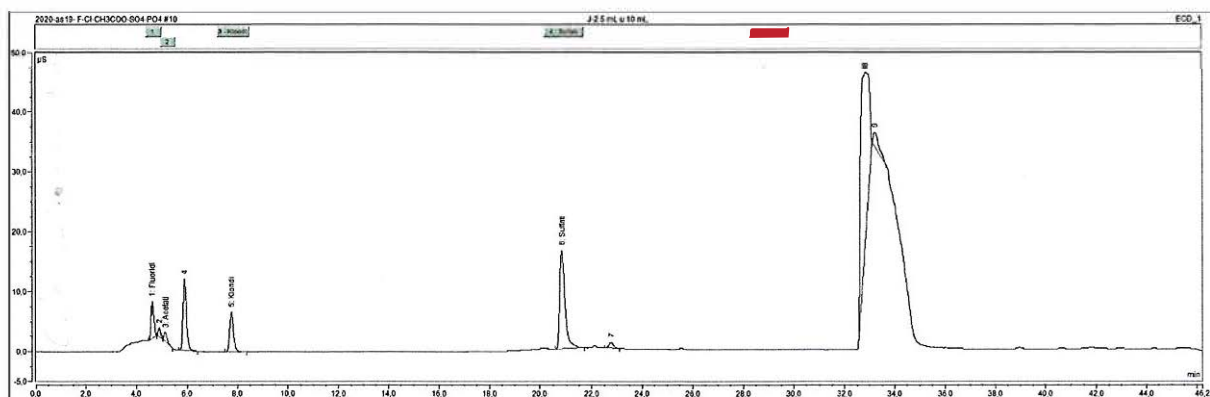
| A | B | C | D | E | F | G | H | I |
|----------|-----------|----------|---------|-------------------|------------------|--------|--------|--------|
| No. | Peak Name | Cal.Type | #Points | Rel.Std.Dev. % | Corr.Coeff. % | Offset | Slope | Curve |
| 1 | Fluoridi | Lin | 5 | 1,6505 | 99,9746 | 0,0000 | 0,4688 | 0,0000 |
| 2 | Acetati | Lin | 5 | 6,8547 | 99,8680 | 0,0000 | 0,0922 | 0,0000 |
| 4 | Kloridi | Lin | 5 | 1,3369 | 99,9938 | 0,0000 | 0,2994 | 0,0000 |
| 5 | Sulfati | Lin | 5 | 5,8705 | 99,9808 | 0,0000 | 0,1883 | 0,0000 |
| 6 | Fosfati | Lin | 5 | 5,7068 | 99,8877 | 0,0000 | 0,0829 | 0,0000 |
| Average: | | | 5 | 4,2839 | 99,9410 | 0,0000 | 0,2263 | 0,0000 |

Dobivene visoke vrijednosti koeficijenta korelacije ($R^2 > 0,9987$) ukazuju na veliku linearnost odziva instrumenta u području ispitivanih koncentracija.

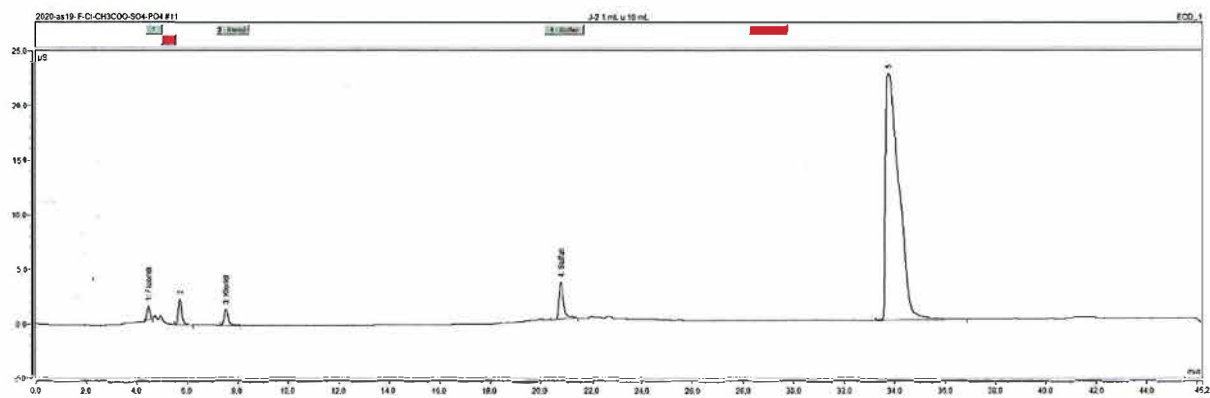
Kako bi se uklonile lebdeće čestice dobivene otopine su prije injektiranja u ionski kromatograf filtrirane kroz poliviniliden fluorid (PVDF) membranske filtere veličine pora $0,45 \mu\text{m}$. Rezultati analize pojedinih uzoraka, kao i vrijednosti preračunate na koncentraciju u originalnoj tekućini, prikazani su u tablici 6, dok su ionski kromatogrami uzoraka prikazani na slikama 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15. i 16.



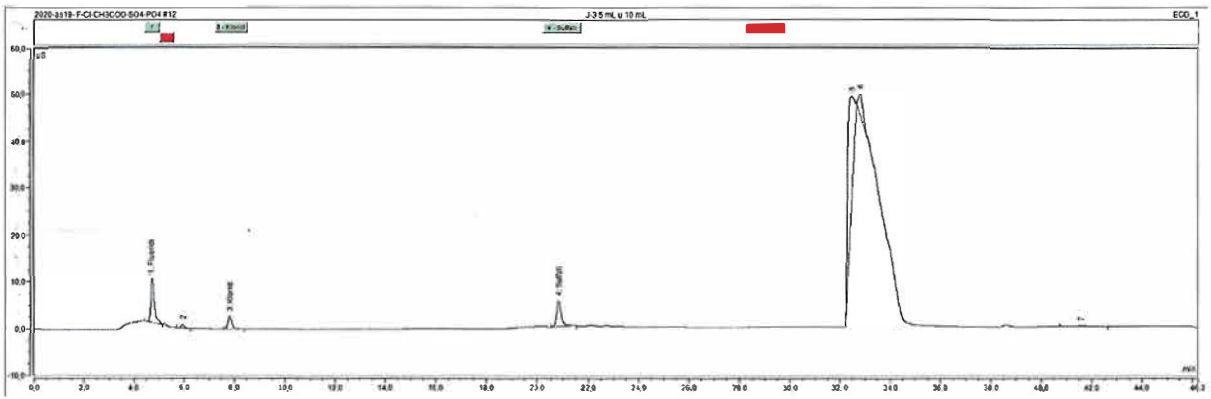
Slika 8. Ionski kromatogram uzorka vode 1.



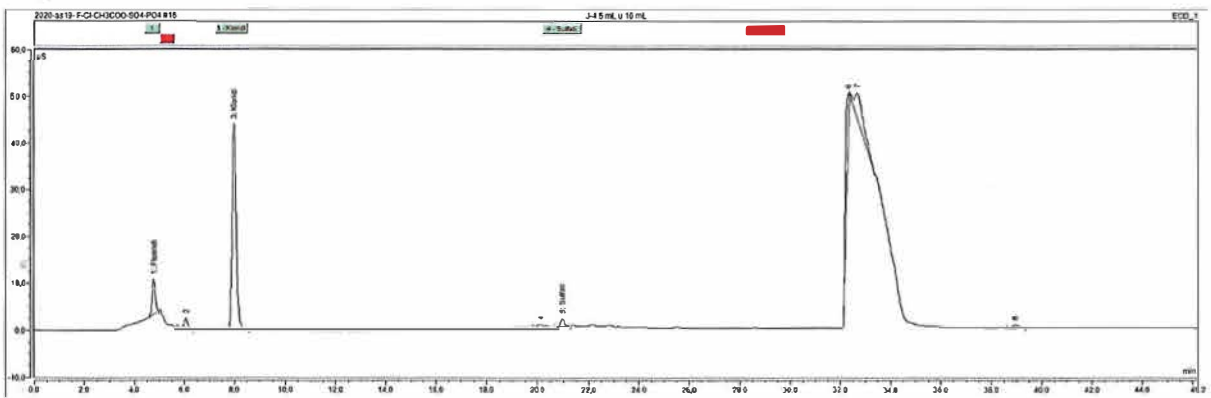
Slika 9. Ionski kromatogram uzorka vode 2 razrijeđen postupkom 1.



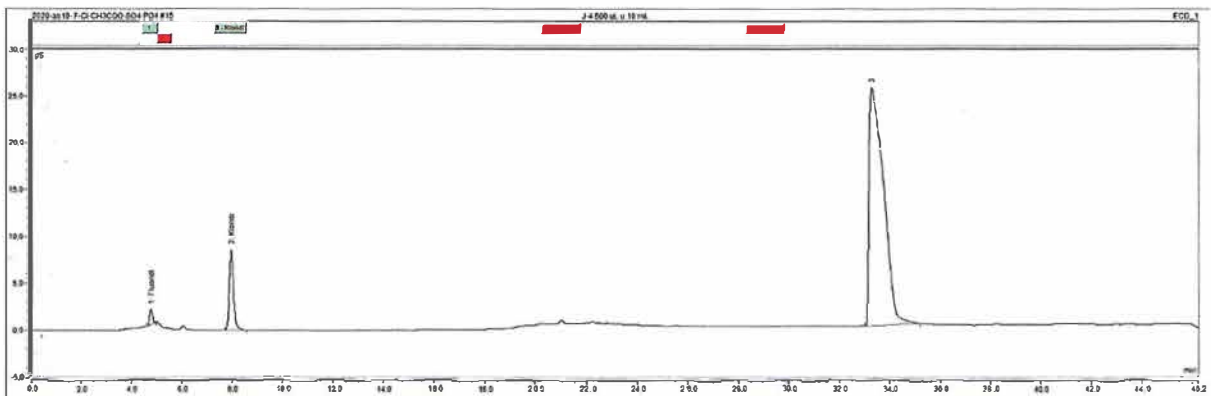
Slika 10. Ionski kromatogram uzorka vode 2 razrijeđen postupkom 2.



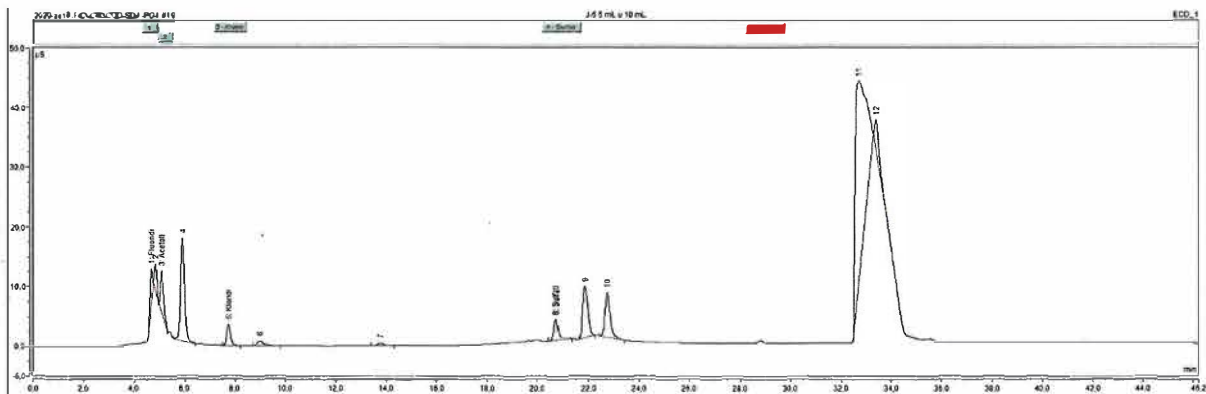
Slika 11. Ionski kromatogram uzorka vode 3.



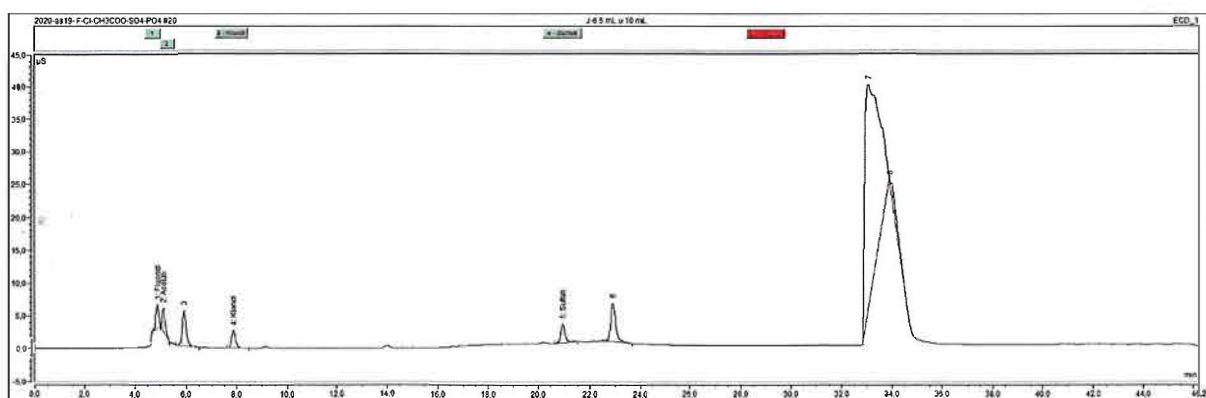
Slika 12. Ionski kromatogram uzorka vode 4 razrijeđen postupkom 1.



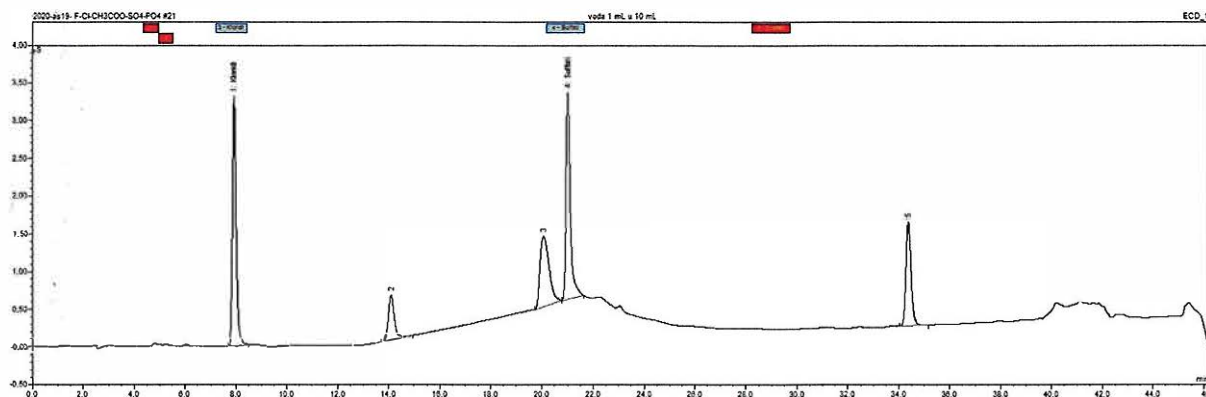
Slika 13. Ionski kromatogram uzorka vode 4 razrijeđen postupkom 2.



Slika 14. Ionski kromatogram uzorka vode 5.



Slika 15. Ionski kromatogram uzorka vode 6.



Slika 16. Ionski kromatogram uzorka vode 7.

U tablici 6 prikazane su izmjerene i izračunate koncentracije aniona u prikupljenim uzorcima funkcionalnih voda i u uzorku vode iz slavine .

Tablica 6. Koncentracije aniona u analiziranim uzorcima voda.

| Uzorak | koncentracija, mg/L | F ⁻ | CH ₃ COO ⁻ | Cl ⁻ | SO ₄ ²⁻ | PO ₄ ³⁻ |
|--------|---------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | izmjerena | 2,44 | n/d | 0,96 | 4,42 | n/d |
| | preračunata | 4,88 | | 1,92 | 8,84 | |
| 2 | izmjerena | 1,70 ¹ | 2,19 ¹ | 3,92 ¹ | 3,72 ² | n/d |
| | preračunata | 3,40 | 4,38 | 7,84 | 37,2 | |
| 3 | izmjerena | 3,16 | n/d | 1,57 | 6,18 | n/d |
| | preračunata | 6,32 | | 3,14 | 12,36 | |
| 4 | izmjerena | 2,28 ¹ | n/d | 5,31 ² | 1,60 ¹ | n/d |
| | preračunata | 4,56 | | 106,2 | 3,20 | |
| 5 | izmjerena | 1,24 | 9,91 | 2,08 | 3,69 | < GK |
| | preračunata | 2,48 | 19,82 | 4,16 | 7,38 | |
| 6 | izmjerena | 1,02 | 5,15 | 1,60 | 3,03 | n/d |
| | preračunata | 2,04 | 10,30 | 3,20 | 6,06 | |
| 7 | izmjerena | n/d | n/d | 1,93 | 2,85 | n/d |
| | preračunata | | | 19,3 | 28,5 | |

n/d – nije detektiran,

¹ i ² - način razrjeđivanja uzorka za analizu sukladno tablici 3

GK – granica kvantifikacije

Tablica 7. Parametri zdravstvene ispravnosti vode za piće

| Pokazatelj | Jedinice | M.D.K. | Napomena |
|------------|----------|--------|----------|
| Acetati | np | np | |
| Fosfati* | µg/L | 300 | |
| Fluoridi | mg/L | 1,5 | |
| Kloridi | mg/L | 250,0 | 1 |
| Sulfati | mg/L | 250,0 | 1 |

*ne određuje se u vodama u boci ili drugoj ambalaži

Napomena 1. - Voda ne smije biti agresivna

np- nema podataka

U svim analiziranim uzorcima dobivene vrijednosti aniona pokazuju velike varijacije u količinama: fluoridi se nalaze u rasponu od 2,04 – 6,32 mg/L; acetati od 2,19 – 19,82 mg/L; kloridi od 1,92 do 106,2 mg/L; sulfati od 3,2 – 37,2 mg/L dok fosfati u svim uzorcima su bili

ispod granice detekcije. Dobivene vrijednosti aniona u ispitivanim uzorcima uspoređene su s maksimalno dopuštenim vrijednostima koncentracija aniona koje su navedene u Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti. Svi određeni anioni izuzev fluorida nalaze se u dozvoljenim rasponima prema gore navedenom Pravilniku. Dobivene velike razlike u koncentracijama pojedinih aniona u ispitivanim uzorcima u skladu su s prijašnjim istraživanjima. Mogu biti posljedica različitih proizvodnih procesa, tipu vode koja se koristi (fluorirana ili nefluorirana), kao i različitosti sirovina koje se koriste u proizvodnji što uveliko ovisi o zemlji porijekla samog proizvoda. Nadalje, poznato je da dodatak različitih aroma u funkcionalne vode može dovesti do razlika u koncentracijama aniona. Sadržaj fluorida u prirodnim vodama ovisi o njegovoj koncentraciji u tlu, geološkim svojstvima tla, topljivosti minerala koji sadržavaju fluoride te prisutnosti drugih elemenata kao što su kalcij, aluminiј, željezo koji mogu stvarati komplekse s tim spojem. Nadalje, izvori fluorida mogu biti i industrija fosfatnih gnojiva kao i proizvodnja kemikalija (npr. fluorovodična kiselina, kalcijev i natrijev fluorid te sumporni heksafluorid), korištenje pesticida s fluoridima i dr. (Camargo, 1996). Povišena koncentracija fluorida u ispitivanim uzorcima također može biti uzrokovana samim analitičkim procesom koji treba biti strogo kontroliran (Lopez i Navia, 1988). Odabir odgovarajućeg posuđa, reagensa kao i način pripreme uzorka je ključan u sprečavanju kontaminacije samog uzorka. Kako sadržaj aniona u funkcionalnim vodama može ovisiti o različitim parametrima, buduća istraživanja usmjerit će se na ispitivanja utjecaja različitih izvora kontaminacije.

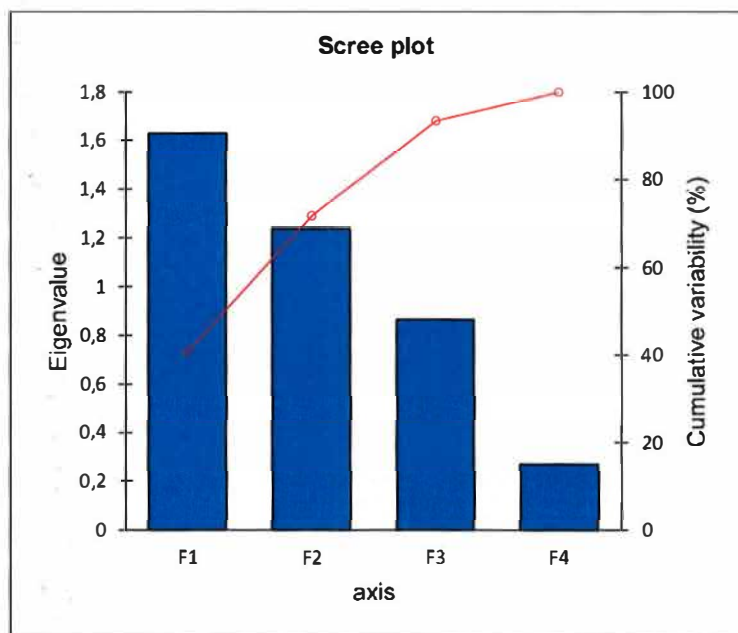
4.2. KEMOMETRIJSKE METODE OBRADE PODATAKA

Koncentracije aniona dobivenih u ovom istraživanju pokazale su velike varijacije kod različitih vrsta funkcionalnih voda te su dobiveni podaci podvrgnuti kemometrijskim metodama analize. Multivarijantna analiza primijenjena je kako bi se identificirao glavni izvor varijabilnosti anionskog sadržaja. Dobiveni podaci analizirani su metodom glavnih komponenata (PCA) i klusterskom analizom. PCA je najčešće primjenjivan postupak koji se koriste 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 parametara. Analiza glavne komponente provedena je uzimajući u obzir standardizirane podatke, što znači da su početne varijable transformirane tako da budu centrirane i imaju jedinstvenu disperziju. Prema PCA, dimenzionalnost sustava može se svesti na dvije glavne komponente (Slika 17), što odgovara vlastitim vrijednostima matrice

kovarijance veće od 1. Jedan od osnovnih ciljeva PCA analize je da identificira faktore od iznimne važnosti iz skupa podataka. Osnovna statistika Eigen analize prikazana je u Tablici 8. Prve dvije komponente čine 71,63 % varijabilnosti ispitivane serije: F1(PC1) čini 40,69 % i F2 (PC2) 30,936 %.

Tablica 8. Eigen analiza

| | F1 | F2 | F3 | F4 |
|--------------------------|--------|--------|--------|---------|
| Eigen vrijednosti | 1,628 | 1,237 | 0,865 | 0,270 |
| Varijabilnost (%) | 40,693 | 30,936 | 21,628 | 6,743 |
| Kumulativna vrijednost % | 40,693 | 71,629 | 93,257 | 100,000 |



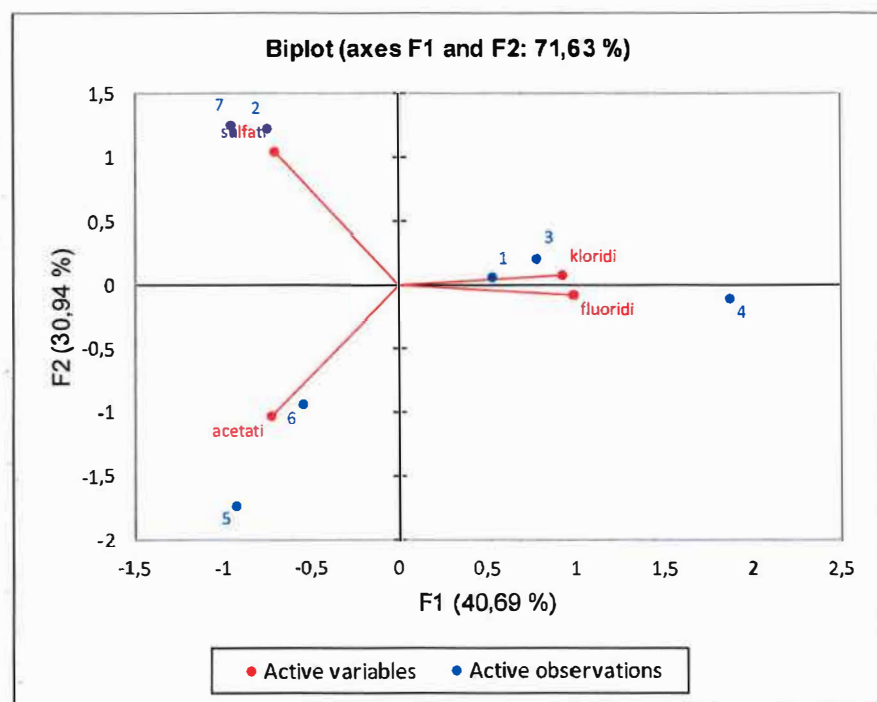
Slika 17. Doprinos glavnih komponenata varijabilnosti analiziranih podataka

Varijable, fluoridi i kloridi, raspoređene u pozitivnom području prve PCA komponente (F1) imaju visoke pozitivne koeficijente (0,741 i 0,697) objašnjavajući 40,69 % ukupne varijance. Sulfati imaju visok negativan koeficijent (-0,790), a acetati visok pozitivan (0,779) u

negativnom području druge PCA komponente (F2) objašnjavajući 30,936 % ukupne varijance (Tablica 9).

Tablica 9. Doprinos varijabli (%)

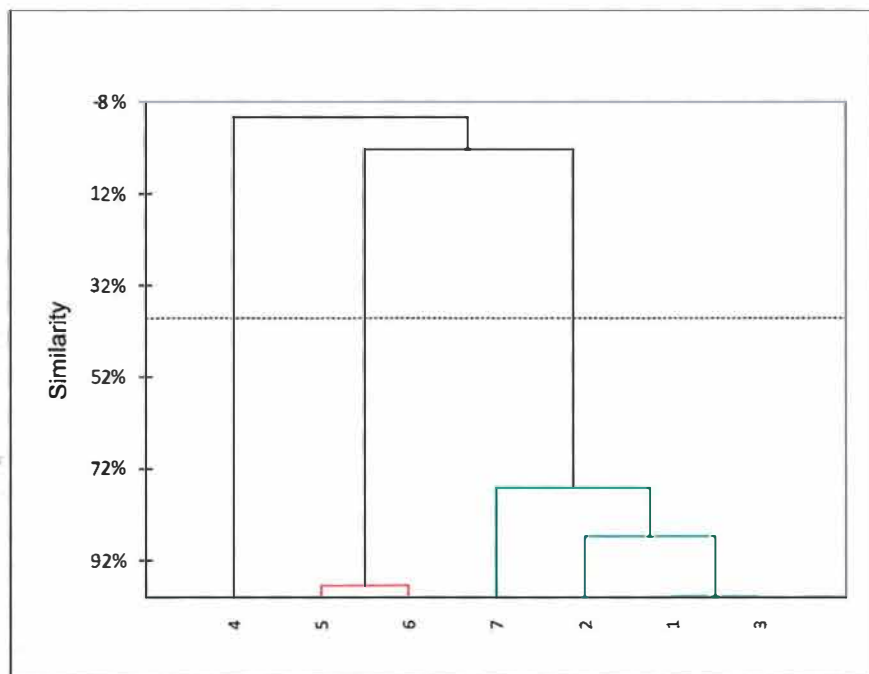
| | F1 | F2 |
|----------|--------|--------|
| fluoridi | 0,741 | 0,060 |
| acetati | -0,561 | 0,779 |
| kloridi | 0,697 | -0,057 |
| sulfati | -0,538 | -0,790 |



Slika 18. Graf dobivenih podataka za anione u ispitivanim uzorcima

Na slici 18. prikazani su utjecaji ispitivanih aniona na prva dva faktora u svim ispitivanim uzorcima. Analizirani uzorci prema dobivenim rezultatima mogu se podijeliti u 2 osnovne skupine prema sadržaju aniona. Također dobiveni rezultati ukazuju da su fluoridi – ionska vrsta koja izaziva najvažniju varijabilnost kod svih ispitivanih uzoraka.

Klasterska analiza se često koristi u kemometriji s ciljem pojašnjenja veze između uzoraka bez prethodnih informacija o toj vezi. Uzorci će se grupirati u klastere prema njihovoj sličnosti odnosno u ovom slučaju prema sadržaju aniona u ispitivanim uzorcima voda. U ovom istraživanju primjenjena je Ward's metoda za hierarhijsku klustersku analizu. Dobiveni rezultati prikazani su pomoću dendograma, Slika 19.



Slika 19. Dendrogram klusterske analize za 5 varijabli i 7 uzoraka

Iz prikazanih dendograma vidljiva je podjela na 2 osnovna klastera. Dobiveni klasteri pokazuju sličnost između funkcionalnih voda i uzorka vode iz slavine na osnovu sadržaja ispitivanih aniona. Uzorak broj 4 ne korelira s ostalim analiziranim uzorcima što je u skladu s dobivenim rezultatima prikazanim u Tablici 6. prvenstveno prema sadržaju klorida.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu analizirani su uzorci kupovne vode te jedan uzorak vode iz slavine pomoću ionske kromatografije. U navedenim uzorcima provedena je prvo kvalitativna analiza pomoću koje su detektirani prisutni anioni. Zatim su određene koncentracije prisutnih aniona: acetata, klorida, fluorida fosfata i sulfata. Dobivene vrijednosti bile su u rasponu koncentracija za fluoridne ione od 2,04 – 6,32 mg/L, za acetate od 2,19 – 19,82 mg/L, kloride od 1,92 do 106,2 mg/L te sulfate od 3,2 – 37,2 mg/L. Vrijednosti za fosfate u svim uzorcima bile su ispod granice detekcije. Dobivene vrijednosti aniona u ispitivanim uzorcima uspoređene su s maksimalno dopuštenim vrijednostima koncentracija aniona koje su navedene u Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti. Svi određeni anioni izuzev fluorida nalaze se u dozvoljenim rasponima prema gore navedenom Pravilniku. Provedena multivarijatna analiza glavnih komponenata i klusterska analiza pokazala je da su fluoridi – ionska vrsta koja izaziva najvažniju varijabilnost kod svih ispitivanih uzoraka. Prema sadržaju aniona ispitivani uzorci su grupirani u dva glavna klastera.

6. LITERATURA

Barnard WR, Nordstrom DK. Fluoride in precipitation & Methodology with fluoride-selective electrode. *Atmos Environ*, 1982, 16, 99.

Bolanča T, Ukić Š. Ionska kromatografija. Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 1, 4-5.

Camargo JA. Comparing levels of pollutants in regulated rivers with safe concentrations of pollutants for fishes: a case study. *Chemosphere*, 1996, 33(1), 81-90.

Chloride in drinking water, 1996., <https://www.who.int>, pristupljeno 25.10.2020.

Corbo MR, Bevilacqua A, Petruzzi L, Casanova FP, Sinigaglia M. Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2014, 13(6), 1192-1206.

Delisle CE, Schmidt JW. The effects of sulphur on water and aquatic life in Canada. U: Sulphur and its inorganic derivatives in the Canadian environment. Ottawa, Ontario, urednici, Canada, National Research Council of Canada, 1977.

Department Of National Health And Welfare. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality, 1978., <https://www.canada.ca>, pristupljeno 27.10.2020.

Diem K. Documenta Geigy scientific tables. Švicarska, Geigy Pharmaceuticals, 1972., str. 533.

Dziwiatek DD. Isolation of chondroitin sulfates-S35 from articular cartilage of rats. *J Biol Chem*, 1951, 189(1), 187-190.

Edmunds WM, Smedley PL. Groundwater geochemistry and health: an overview. U: Environmental Geochemistry and Health. Appleton, Fuge i McCall, urednici, Geological Society Special Publication, 1996, str. 91–105.

Eith C, Kolb M, Seubert A, Viegweger KH, Rumi A. Practical Ion Chromatography. An introduction. *Metrohm Ltd Herisau*, 2001.

Elphick JR, Bergh KD, Bailey HC. Chronic toxicity of chloride to freshwater species: effects of hardness and implications for water quality guidelines. *Environ Toxicol Chem*, 2011, 30(1), 239-246.

Ettre LS. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure Appl Chem*, 1993, 65(4), 819-872.

Evaluation and recommendations, 2002., <http://www.afssa.fr>, pristupljeno 25.10.2020.

Filipović I, Lipanović S. Opća i anorganska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 656-657a, 775-776b.

Fingl E. Laxatives and cathartics. U: Pharmacological basis of therapeutics. Gilman AG i sur., urednici, New York, MacMillan Publishing, 1980.

Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the elements. Oxford, Pergamon Press, 1984.

Habuda-Stanić M, Niseteo T, Pollak L, Martinis I. Znanstveno mišljenje o utjecaju kakvoće vode za ljudsku potrošnju na nutritivnu vrijednost dojenačkih mliječnih pripravaka. Hrvatska agencija za hranu, 2016, (Znanstvena mišljenja, Zahtjev HAH-Z-2014-5).

IPCS. Fluorides. Environmental Health Criteria 227. World Health Organization, Geneva, 2002., <http://www.inchem.org>, pristupljeno 28.10.2020.

IPCS. Fluorine and fluorides. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 1984., <http://www.inchem.org>, pristupljeno 28.10.2020.

ISO. Water quality — determination of sulfate. Geneva, International Organization for Standardization, 1990., <https://www.iso.org>, pristupljeno 28.10.2020.

Kenefick RW, Chevront SN. Hydration for recreational sport and physical activity. *Nutrition reviews*, 2012, 70, 137-142.

Klaassen D, Boles JW. Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation, *Faseb J*, 1997, 11, 404-418.

Kwak NS, Jukes DJ. Functional foods Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, 2001, 12(2), 99-107.

Lockhart EE, Tucker CL, Merritt MC. The effect of water impurities on the flavour of brewed coffee. *Food res*, 1955, 20, 598.

Lopez H, Navia JM. A method to assay fluoride in foods, beverages, and diets. *Caries Res*, 1988, 22(4), 210-6.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 223.

Mark-Herbert C. Innovation of a new product category—functional foods. *Technovation*, 2004, 24(9), 713-719.

Markovich D. Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. *Physiol Rev*, 2001, 81, 1499–1533.

Matsuo S, Kiyomiya KI, Kurebe M. Mechanism of toxic action of fluoride in dental fluorosis: whether trimeric G proteins participate in the disturbance of intracellular transport of secretory ameloblast exposed to fluoride. *Arch toxicol*, 1998, 72, 798-806.

McGuire MJ. Controlling attached blue-green algae with copper sulphate. *J Am Water Works Assoc*, 1977, 76, 60.

McKee JE, Wolf HW. Water quality criteria. Sacramento, California State Water Quality Control Board, 1963.

NAS. Drinking water and health. Washington, National Academy of Sciences, 1977, str. 117.

NAS. Food ingredients. Washington, National Academy of Sciences, 1972.

Orrù S, Imperlini E, Nigro E, Alfieri A, Cevenini A, Polito R, Daniele A, Buono P, Mancini A. Role of Functional Beverages on Sport Performance and Recovery. *Nutrients*, 2018, 10, 1470.

Parvinen P, Lajunen LH. Determination of chloride in drinking and ground water by AlCl molecular absorption spectrometry using graphite furnace atomic absorption spectrometer. *Talanta*, 1999, 50(1), 67-71.

Perera N, Gharabaghi B, Howard K. Groundwater chloride response in the Highland Creek watershed due to road salt application: A re-assessment after 20 years. *J Hydrol*, 2013, 479, 159-168.

Proceedings of international meeting, 2003., <http://www.afssa.fr>, pristupljeno 25.10.2020.

Roberfroid M. Global view on functional foods: European perspectives, *Br J Nutr*, 2002, 88, 133-138.

Sanguansri L, Augustin MA. Microencapsulation in functional food product development. U: Functional Food Product Development. Smith J, Charter E, urednici, New York, Blackwell Publishing Ltd, 2010, str. 3–23.

Slooff W. Basis document fluoriden. Bilthoven, National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1988.

Small H. Ion Chromatography, New York, Plenum Press, 1989.

Small H, Stevens TS, Bauman WC. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Anal Chem*, 1975, 1801–1809.

Smith JG. *Organic Chemistry*, New York, McGraw-Hill, 2011, str. 689-699.

Sodium, chlorides and conductivity in drinking-water, 1979., <https://www.who.int>, pristupljeno 24.10.2020.

Štambuk-Giljanović N, Dumanić T, Ledić M, Poljak M, Bakavić AS, Zwirn M. Razine sulfata u vodama Dalmacije. *Voda i javna vodoopskrba*, 2006, 131.

Thienes CH, Haley TJ. *Clinical toxicology*. 5th edition. Philadelphia, Lea and Fegiger, 1972, str. 56.

Toft P, Malaiyandi M, Hickman JR. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*. U: *Organic Pollutants in Water*. IH Suffet, M Malaiyandi, 1986, str. 735–750.

US EPA. *Drinking water criteria document on fluoride*. Washington, US Environmental Protection Agency, Office of Drinking Water, 1985, str. 823-825.

US EPA. *Health effects from exposure to high levels of sulfate in drinking water workshop*. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Water, 1999.

USNRC. *Health Effects of Ingested Fluoride*. Washington, National Research Council, National Academy Press, 1993.

Weiss J. *Handbook of Ion Chromatography*, Weinheim, Wiley-VCH, 2016, str. 8-10.

Wells F. *Structural Inorganic Chemistry* 4th edition, London, Oxford University Press, 1975, str. 570–604.

Wesson LG. *Physiology of the human kidney*. New York, Grune and Stratton, 1969, str. 591.

WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Volume 2. *Health Criteria and Other Supporting Information*. 2nd edition. Geneva, World Health Organization, 1996.

Zoeteman BCJ. *Sensory assessment of water quality*. New York, Pergamon Press, 1980.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

U zadnjih nekoliko godina interes potrošača za kvalitetnom i nutritivno bogatom hranom, koja sadrži komponente s potencijalnim pozitivnim učinkom na zdravlje ljudi, u velikom je porastu. Značajan segment u kategoriji funkcionalnih proizvoda predstavljaju funkcionalni napitci. Moderni funkcionalni napitci odraz su dinamičnih novih trendova u prehrambenoj industriji. Funkcionalnim napitcima dodaju se različite aktivne tvari u obliku izoliranih sastojaka i ekstrakata iz hrane i bilja, sve sa ciljem poboljšanja općeg zdravlja ljudi.

U ovom diplomskom radu cilj je bio utvrditi koje „klasične“ anione sadrže uzorci funkcionalnih voda dostupnih na tržištu te u kojoj koncentraciji. Rezultati su dobiveni postupcima analize uzoraka voda tehnikom ionske kromatografije primjenom ionskog kromatografa ICS 2000 Dionex. Analiza je pokazala prisutnost acetata, fluorida, fosfata klorida i sulfata. Analiza je također pokazala i prisutnost velike količine još jednog, najvjerojatnije organskog aniona. Dobivene vrijednosti aniona u ispitivanim uzorcima uspoređene su s maksimalno dopuštenim vrijednostima koncentracija aniona koje su navedene u Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti. Svi određeni anioni izuzev fluorida nalaze se u dozvoljenim rasponima prema gore navedenom Pravilniku. Provedena multivarijatna analiza glavnih komponenata i klusterska analiza pokazala je da su fluoridi – ionska vrsta koja izaziva najvažniju varijabilnost kod svih ispitivanih uzoraka. Prema sadržaju aniona ispitivani uzorci su grupirani u dva glavna klastera.

In recent years, there has been an increase in demand for nutritious and high quality foods that contain ingredients with potential impact on health. Functional beverages represent a significant segment in the functional products category. Modern functional beverages reflect new dynamic trends in the food industry. Various active ingredients are added to functional beverages in the form of isolated substances, foods and plant extracts with the aim of improving overall health. In this work, it was investigated which "basic" anions are present in the functional bottled water products on the market and in what concentration. Results were obtained by analyzing water samples using the ICS 2000 Dionex ion exchange chromatograph. The analysis showed the presence of acetate, fluoride, phosphate, chloride and sulfate. A large concentration of another, probably organic, anion was found by our analysis. The obtained values of anions in the analysed samples were compared with the maximum allowable values of anion concentrations given in the Health Protection Ordinance. All the determined anions except fluoride are within the permissible ranges according to the above mentioned regulation. The multivariate principal components analysis and cluster analysis carried out showed that fluorides are the ion species causing the highest variability in all the samples studied. According to the anion content, the investigated samples were divided into two main clusters.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Centar za forenzička ispitivanja, istraživanja i vještačenja
"Ivan Vučetić"
Ilica 335, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ODREĐIVANJE ANIONA U FUNKCIONALNIM VODAMA IONSKOM KROMATOGRAFIJOM

Mojca Fijavž

SAŽETAK

U zadnjih nekoliko godina interes potrošača za kvalitetnom i nutritivno bogatom hranom, koja sadrži komponente s potencijalnim pozitivnim učinkom na zdravlje ljudi, u velikom je porastu. Značajan segment u kategoriji funkcionalnih proizvoda predstavljaju funkcionalni napitci. Moderni funkcionalni napitci odraz su dinamičnih novih trendova u prehrambenoj industriji. Funkcionalnim napitcima dodaju se različite aktivne tvari u obliku izoliranih sastojaka i ekstrakta iz hrane i bilja, sve sa ciljem poboljšanja općeg zdravlja ljudi.

U ovom diplomskom radu cilj je bio utvrditi koje „klasične“ anione sadrže uzorci funkcionalnih voda dostupnih na tržištu te u kojoj koncentraciji. Rezultati su dobiveni postupcima analize uzoraka voda tehnikom ionske kromatografije primjenom ionskog kromatografa ICS 2000 Dionex. Analiza je pokazala prisutnost acetata, fluorida, fosfata klorida i sulfata. Analiza je također pokazala i prisutnost velike količine još jednog, najvjerojatnije organskog aniona. Dobivene vrijednosti aniona u ispitivanim uzorcima uspoređene su s maksimalno dopuštenim vrijednostima koncentracija aniona koje su navedene u Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti. Svi određeni anioni izuzev fluorida nalaze se u dozvoljenim rasponima prema gore navedenom Pravilniku. Provedena multivarijatna analiza glavnih komponenata i klasterka analiza pokazala je da su fluoridi – ionska vrsta koja izaziva najvažniju varijabilnost kod svih ispitivanih uzoraka. Prema sadržaju aniona ispitivani uzorci su grupirani u dva glavna klastera

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

Rad sadrži: 41 stranica, 19 grafičkih prikaza, 9 tablica i 56 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Funkcionalni napitci, ionska kromatografija, anioni

Mentor: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Ivana Bačić, *dipl. Ing., Glavni vještak za požare i eksplozije, Centar za forenzička ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić", Zagreb*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Ivana Bačić, *dipl. Ing., Glavni vještak za požare i eksplozije, Centar za forenzička ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić", Zagreb*
Dr. sc. Maja Bival Štefan, *docentica sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: ožujak 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Forensic Science Centre "Ivan Vučetić", Zagreb
Ilica 335, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DETERMINATION OF ANIONS IN FUNCTIONAL WATERS BY ION CHROMATOGRAPHY

Mojca Fijavž

SUMMARY

In recent years, there has been an increase in demand for nutritious and high quality foods that contain ingredients with potential impact on health. Functional beverages represent a significant segment in the functional products category. Modern functional beverages reflect new dynamic trends in the food industry. Various active ingredients are added to functional beverages in the form of isolated substances, food and plant extracts with the aim of improving overall health. In this work, it was investigated which "basic" anions are present in the functional bottled water products on the market and in what concentration. Results were obtained by analyzing water samples using the ICS 2000 Dionex ion exchange chromatograph. The analysis showed the presence of acetate, fluoride, phosphate chloride and sulfate. A large concentration of another, probably organic, anion was found by our analysis. The obtained values of anions in the tested samples were compared with the maximum allowable values of anion concentrations given in the Health Protection Ordinance. All the determined anions except fluoride are within the permissible ranges according to the above mentioned regulation. The multivariate principal components analysis and cluster analysis carried out showed that fluorides are the ion species causing the highest variability in all the samples studied. According to the anion content, the investigated samples were divided into two main clusters.

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

Thesis includes: 41 pages, 19 figures, 9 tables and 56 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Functional drinks, ion chromatography, anions

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Bačić, Ph.D., Chief Expert for Fire and Explosions, Forensic Science Centre "Ivan Vučetić", Zagreb

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Bačić, Ph.D. Chief Expert for Fire and Explosions, Forensic Science Centre "Ivan Vučetić", Zagreb
Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2021.