

Usporedba atomske apsorpcijske spektrometrije i energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije za određivanje sadržaja odabranih metala u uzorcima kave

Hajduk, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:498327>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



Nikolina Hajduk

**Usporedba atomske apsorpcijske spektrometrije i
energetski disperzivne rendgenske
fluorescencijske spektrometrije za određivanje
sadržaja odabranih metala u uzorcima kave**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Jablan na stručnom vodstvu i svim savjetima i znanjima prenesenim prilikom izrade ovog diplomskog rada.

*Veliko hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i motivaciji tijekom studiranja.
Na Vas sam uvijek mogla računati!*

Hvala mojem Nikoli za svaku riječ potpore i razumijevanje tijekom ispitnih rokova te za sve trenutke ispunjenje ljubavlju.

Hvala mojim prijateljima koji su unijeli radost u studentske dane te ih učinili posebnima.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1 Kava..... | 1 |
| 1.1.1 Vrste kave | 1 |
| 1.1.2 Kemijski sastav kave | 2 |
| 1.2 Cink u organizmu | 2 |
| 1.3 Bakar u organizmu | 4 |
| 1.4 Željezo u organizmu..... | 5 |
| 1.5 Mangan u organizmu..... | 7 |
| 1.6 Atomska apsorpcijska spektrometrija..... | 8 |
| 1.7 Energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija | 9 |
| 1.8 Validacija analitičkog postupka | 10 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME..... | 13 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 14 |
| 3.1 Materijali..... | 14 |
| 3.1.1 Kemikalije..... | 14 |
| 3.1.2 Laboratorijski pribor..... | 14 |
| 3.1.3 Radni instrumenti | 15 |
| 3.1.4 Uzorci | 15 |
| 3.2 Metode | 16 |
| 3.2.1 Priprema otopina..... | 16 |
| 3.2.2 Priprema uzoraka za analizu AAS-om | 17 |
| 3.2.3 Analiza cinka, bakra, željeza i mangana u uzorcima AAS-om..... | 18 |
| 3.2.4 Priprema uzoraka za analizu EDXRF-om | 19 |
| 3.3 Statistička analiza..... | 19 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 21 |
| 4.1 Validacija analitičke metode..... | 21 |
| 4.1.1 Linearnost | 21 |
| 4.1.2 Preciznost..... | 21 |
| 4.1.3 Točnost | 25 |
| 4.1.4 Granica dokazivanja i granica određivanja..... | 27 |
| 4.2 Usporedba metoda digestije..... | 27 |
| 4.3 Određivanje cinka, bakra, željeza i mangana u uzorcima | 27 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 31 |

| | | |
|----|---|----|
| 6. | LITERATURA..... | 32 |
| 7. | SAŽETAK / SUMMARY | 35 |
| 8. | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1 Kava

Kava (lat. *Coffea*) je jedan od najčešće konzumiranih bezalkoholnih napitaka današnjice, odmah iza vode. U međunarodnoj trgovini je jedan od najvažnijih poljoprivrednih proizvoda. Razlozi ovakve popularnosti kave su različiti; prisustvo kofeina koji djeluje kao stimulans, zdravstvene dobrobiti, izvrstan okus i miris (Butt i Sultan, 2011).

Kava, biljni rod koji pripada porodici broćevki (lat. *Rubiaceae*), raste kao drvenasti grm na velikim nadmorskim visinama. Uzgaja se u više od 70 zemalja, a kao najveći proizvođači ističu se Brazil, Kolumbija, Etiopija i Indija (Butt i Sultan, 2011).

Sirova kava je naziv koji obuhvaća plodove i sjemenke biljke roda *Coffea* i njihove proizvode u različitim fazama proizvodnje. Dobiva se sušenjem sjemenki biljke i uklanjanjem mezokarpa, endokarpa i djelomično srebrnaste opne. Prema botaničkoj vrsti, razlikuje se arabika, robusta, liberika, excelsa i arabusta kava. Na tržištu se nalaze i različiti proizvodi od kave koji se dijele na prženu kavu i ekstrakte kave. Pržena kava može biti u zrnju ili mljevena, sa kofeinom ili bez kofeina. Ekstrakti kave su proizvodi koji se dobivaju ekstrakcijom iz prženih zrna kave, a kao ekstrakcijsko sredstvo koristi se voda. Ekstrakti kave se najčešće nazivaju topiva kava ili instant kava. U proizvode od kave dozvoljeno je umiješati različite dodatke (šećer, mlijeko u prahu, biljne masnoće) (NN 172/2004).

1.1.1 Vrste kave

Rod *Coffea* obuhvaća 70 različitih biljnih vrsti od kojih su najzastupljenije *C. arabica* i *C. canephora*. *C. canephora* je biljna vrsta koja je otpornija na bolesti i raste na nižim nadmorskim visinama, a zbog toga je i jeftinija na tržištu. Robusta kava, koja se dobiva od *C. canephora*, ima veći sadržaj kofeina (2,2 - 2,8 %), ali manje intenzivnu aromu nego arabika (Wei i Tanokura, 2015; Butt i Sultan, 2011; Grembecka i sur., 2007).

Manje zastupljene vrste kave su liberika (lat. *Coffea liberica Hiern*), excelsa (lat. *Coffea dewevrei De wild i Durand var. excelsa Chevalier*) i arabusta. Arabusta kava je hibrid između biljnih vrsta *Coffea arabica* i *Coffea canephora*. Različite vrste kave mogu se miješati radi postizanja željene arome (NN 172/2004).

1.1.2 Kemijski sastav kave

Glavne sastavnice zrna kave su polisaharidi, lipidi i proteini. Polisaharidi su najzastupljeniji (43-54 %) i pojavljuju se kao polimeri arabinogalaktana, manana i celuloze. Udio polisaharida u robusta i arabika kavi je vrlo sličan. Lipidnu frakciju zrna kave čine uglavnom triacilgliceroli, steroli i tokoferoli. Sadržaj lipida obično je veći u arabika kavi (15 %) nego u robusti (10 %). Proteini i peptidi važni su za nastanak arome kave. Temeljem sadržaja proteina, peptida i slobodnih aminokiselina mogu se razlikovati različite vrste kave ili iste vrste s različitim geografskih područja (Wei i Tanokura, 2015).

Kofein (1,3,7-trimetil ksantin) je glavni aktivni sastojak zrna kave. To je bijeli kristalični prašak koji daje gorak okus kavi. Kofein se metabolizira u jetri pomoću enzima CYP1A2. Kofein sa svojim metabolitima (dimetilksantin, paraksetin, teobromin, teofilin) stimulira središnji živčani sustav. Kao stimulator središnjeg živčanog sustava, kofein smanjuje osjećaj umora, povećava budnost i pažnju (Butt i Sultan, 2011).

Klorogenska kiselina, kava kiselina i hidroksikinon su potentni antioksidansi prisutni u zrnu kave koji štite organizam od slobodnih radikala (Butt i Sultan, 2011).

Kava je izvor mnogih minerala: kalcija, kalija, magnezija, natrija, kobalta, mangana, željeza, kroma, nikla, cinka, bakra (Jarošová i sur., 2014; Grembecka i sur., 2007; Dos Santos i Oliveira, 2002; Krivan i sur., 1993). Za razliku od organskih tvari, minerali su značajno stabilniji i pogodniji za analizu. Sastav tla, koji je karakteristika svake pojedine geografske regije, može utjecati na unos metala u biljku, odnosno, u zrno kave. Zbog toga je moguće razlikovati različite vrste kave unatoč malom sadržaju metala u zrnu kave (4%) (Wei i Tanokura, 2015; Krivan i sur., 1993). Zbog složenosti tla i interakcija među elementima prilikom njihova unosa u biljku, zasad je nemoguće predvidjeti promjene u nakupljanju minerala u zrnu kave na temelju promjena u sastavu tla. Međutim, provodi se usporedba sadržaja elemenata u uzorcima kave različitog podrijetla (Krivan i sur., 1993).

1.2 Cink u organizmu

Cink je esencijalni element za ljudski organizam koji ima važnu ulogu u staničnom rastu, diferencijaciji i metabolizmu. Kod prosječnog čovjeka ukupan sadržaj cinka u tijelu je između 1,5 i 2 grama. Većina cinka u organizmu smještena je unutarstanično, najviše u mišićima, kostima i jetri. U plazmi se nalazi manje od 0,2 % ukupnog cinka što odgovara prosječnoj koncentraciji od 15 $\mu\text{mol/L}$. Plazmatski cink uglavnom je vezan za albumine, ali i za

oligopeptide i α 2-makroglobulin (Roohani i sur., 2013; Brown i sur., 2001). Cink je esencijalna komponenta mnogih enzima koji sudjeluju u sintezi ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Nadalje, cink stabilizira molekularnu strukturu staničnih membrana i na taj način pridonosi održavanju integriteta stanica i organa (WHO, 2004). Funkcija cinka u stanicama i tkivima usko je vezana uz metaloproteinaze, enzime koji su povezani s reproduktivnim, živčanim, imunskim i gastrointestinalnim sustavom. Cink je neophodan za organogenezu, spermatogenezu, razvoj timusa, pravilan rad neurotransmitera, lučenje enzima gušterače i želuca te za pravilnu epitelizaciju tijekom zacjeljivanja rana. U imunskom sustavu, cink je važan za razvoj i aktivaciju T-limfocita. Cink podupire normalan rast i razvoj tijekom trudnoće, djetinjstva i adolescencije, a zaslužan je i za osjet okusa i mirisa (Prashanth i sur., 2015; www.ods.od.nih.gov).

Budući da sinteza cinka u organizmu nije moguća, kao i sve esencijalne elemente, cink je potrebno unositi u organizam putem prehrane ili suplemenata. Potrebe za cinkom kod zdravih odraslih osoba kreću se između 30 i 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$, a povećane su kod djece (120-140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$), adolescenata (60-80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$), trudnica (60-80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$) i dojilja (90-120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$) (WHO, 2004). Tijekom probave hrane, cink se oslobađa u obliku slobodnih iona (Zn^{2+}) i apsorbira u tankom crijevu (Roohani i sur., 2013). Cink se izlučuje gastrointestinalnim sustavom, urinom, znojem i deskvamacijom epitelnih stanica. Kao najznačajniji izvori cinka u prehrani ističu se cjelovite žitarice, nemasno crveno meso, mahunarke i orašasti plodovi (WHO, 2004; Brown i sur., 2001).

Uloga cinka u staničnoj diobi, sintezi proteina i rastu je najvažnija za novorođenčad, djecu, adolescente i trudnice. Zbog povećane potrebe za cinkom, u navedenim skupinama postoji veći rizik za nedostatkom cinka (WHO, 2004). Nedostatak cinka u organizmu očituje se kroz niz različitih, često nespecifičnih, simptoma. Jedan od najčešćih simptoma deficijencije je usporen fizički rast i razvoj. Klinička slika deficijencije cinka mijenja se s obzirom na dob osobe. U ranom djetinjstvu najčešće je prisutna dijareja, a nedostatak cinka tijekom djetinjstva dovodi do poremećaja kognitivnih funkcija i atrofije neurona (Roohani i sur., 2013). Česti simptomi nedostatka cinka koji se pojavljuju kod odraslih osoba su gubitak apetita, alopecija, kožne lezije i veća podložnost organizma infekcijama. U nekim slučajevima deficijencije dolazi i do gubitka ili poremećaja osjeta okusa i mirisa (Gamulin i sur., 2011; WHO, 2004). Deficijencija cinka može biti i posljedica autosomno-recesivno nasljedne bolesti koja se naziva akrodermatitis enterohepatika (lat. *Acrodermatitis Enterohepatica*), a karakterizira je smanjena crijevna apsorpcija cinka. Koncentracije cinka u serumu, kosi i mokraći su smanjene, a kao posljedice

ovog deficita pojavljuju se promjene na koži, alopecija i distrofija (Prashanth i sur., 2015; Gamulin i sur., 2011; Brown i sur., 2001).

Suficit cinka u organizmu događa se vrlo rijetko. Zabilježeni su toksični učinci nakon uzimanja 4 do 8 grama cinka na dan koji su popraćeni mučninom, povraćanjem, proljevom i povišenom tjelesnom temperaturom. Dugotrajan unos cinka u visokim dozama može utjecati na metabolizam drugih esencijalnih elemenata u tragovima, posebno bakra (WHO, 2004). Udisanjem cinkovih para također može doći do suficita cinka koji je popraćen grčevima i vrućicom. Budući da do udisanja cinkovih para obično dolazi kod radnika u industriji, ovaj poremećaj naziva se i „ljevačka groznica“. Simptomi se obično postupno smiruju nakon prestanka izlaganja parama i radnici se idući dan oporavljaju i vraćaju na posao (Gamulin i sur., 2011).

1.3 Bakar u organizmu

Bakar je esencijalni element koji je zaslužan za održavanje normalne funkcije mnogih enzima u organizmu. Kao kofaktor enzima, uključen je u aktivaciju neuropeptida, sintezu vezivnog tkiva, aminokiselina (npr. triptofan) i neurotransmitera. Bakar ima važnu ulogu u angiogenezi i regulaciji genske ekspresije. Prosječna odrasla osoba ima ukupni sadržaj bakra u tijelu između 50 i 120 mg. U ljudskoj krvi, bakar se nalazi raspoređen između eritrocita i u plazmi. U eritrocitima je 60 % bakra vezano za metaloenzim superoksid dismutazu, a preostali dio za proteine i aminokiseline. Normalna funkcija superoksid dismutaze važna je za obranu organizma od oksidativnih oštećenja. Većina bakra u plazmi vezana je za ceruloplazmin, protein koji transportira željezo u stanice (Prashanth i sur., 2015; www.ods.od.nih.gov). Ceruloplazmin je važan i u procesima pigmentacije kože (Gamulin i sur., 2011).

Dnevna potreba za bakrom je 2-5 mg od čega se oko 50 % apsorbira iz gastrointestinalnog trakta. Višak bakra izlučuje se uglavnom putem žuči, a manja količina putem bubrega (Prashanth i sur., 2015). Fiziološke koncentracije bakra kreću se između 11,0 i 24,3 mmol/L, a ovise o okolišnim čimbenicima i prehrani. Apsorpcija bakra ovisi o sadržaju cinka, željeza i kalcija u hrani (Gamulin i sur., 2011). Na apsorpciju bakra utječe i njegova količina u hrani; veća količina bakra uzrokuje njegovu manju bioraspoloživost. Namirnice bogate bakrom su školjke, sjemenke, orašasti proizvodi, cjelovite žitarice i čokolada (www.ods.od.nih.gov).

Nedostatak bakra rijedak je kod ljudi. Deficit bakra kroz dulji period tijekom faze aktivnog rasta dovodi do anemije, usporenog rasta, neispravne keratinizacije i pigmentacije te promjena u koštanom sustavu (Prashanth i sur., 2015). Bakar je važan za održavanje elastičnosti stijenki

krvnih žila pa tako njegov manjak dovodi do smanjene sinteze elastina, a u teškim slučajevima deficita može dovesti i do rupture aorte (Gamulin i sur., 2011).

Veći rizik od deficita bakra prisutan je kod ljudi oboljelih od celijakije i Menkesovog sindroma. Kod celijakije, deficit bakra rezultat je crijevne malapsorpcije koja je posljedica promjena na crijevnoj sluznici. Menkesov sindrom (lat. *Tricho-polydystrophia*) je rijedak recesivno nasljedni poremećaj homeostaze bakra koji je uzrokovan mutacijama gena koji kodiraju za enzim koji prenosi bakar. Klinička slika osoba s ovim sindromom uključuje usporen rast i kognitivni razvoj, aneurizme aorte i neobično zamršenu kosu. Ako se ne liječe, većina osoba umire u ranom djetinjstvu. Međutim, supkutana primjena bakra može smanjiti rizik od smrtnosti i poboljšati razvoj (www.ods.od.nih.gov). Rizik od deficijencije bakra javlja se i kod ljudi koji unose povećane količine cinka u organizam jer dolazi do smanjenja apsorpcije bakra i hiperkolesterolemije (Gamulin i sur., 2011).

Kronična izloženost visokim razinama bakra može uzrokovati oštećenje jetre i probavne smetnje; grčeve, mučninu, proljev i povraćanje. Toksičnost bakra rijetka je kod zdravih osoba (www.ods.od.nih.gov). Kinnier-Wilsonova bolest koja se naziva i hepatolentikularnom degeneracijom je autosomno-recesivno nasljedni poremećaj metabolizma bakra. Apsorpcija bakra iz crijeva je normalna, ali je smanjena koncentracija ceruloplazmina u plazmi. U plazmi je povišena koncentracija slobodnog bakra koji se odlaže u parenhimskim organima i uzrokuje stvaranje slobodnih radikala koji mogu izazvati cirozu jetre i psihičke poremećaje. U bubrezima višak bakra oštećuje tubule i dovodi do gubitka aminokiselina, fosfata i bikarbonata putem urina (Gamulin i sur., 2011).

1.4 Željezo u organizmu

Željezo je esencijalan element za ljudski organizam koji ima važnu ulogu u eritropoezi, staničnom disanju i brojnim drugim fiziološkim procesima. Prosječna odrasla osoba ima ukupan sadržaj željeza od 3 do 5 grama. Većina željeza u organizmu (75 %) nalazi se u krvi, dok je ostatak u jetri, mišićima i koštanoj srži (Prashanth i sur., 2011).

Apsorpcija željeza iz hrane započinje u želucu gdje se Fe^{3+} prisutan u hrani reducira u Fe^{2+} . Najveća apsorpcija događa se u dvanaesniku. U crijevnoj sluznici dolazi do oksidacije željeza u Fe^{3+} i djelomičnog vezanja za apoferitin pri čemu nastaje feritin, protein koji pohranjuje željezo. U plazmi se željezo veže za ceruloplazmin i transferin. Transferin je protein koji prenosi željezo po organizmu i može ga predati tkivima, gdje će se skladištiti kao feritin, ili koštanoj srži. U koštanoj srži pomoću ferokelataze u mitohondrijima eritrocita dolazi do

vezanja Fe^{2+} i protoporfirina IX pri čemu nastaje hem. Četiri molekule hema vežu se s proteinom globinom i tvore hemoglobin (Gamulin i sur., 2011). Hemoglobin je molekula koja prenosi kisik po organizmu, od pluća do tkiva (www.ods.od.nih.gov). Osim u hemoglobinu, hem se nalazi i u mioglobinu, citokromu te brojnim enzimima; glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, katalaze, peroksidaze (Prashanth i sur., 2015). Kao komponenta mioglobina, željezo je važno za normalan metabolizam mišića i zdravo vezivno tkivo. Također, željezo je neophodno za fizički rast, neurološki razvoj i sintezu hormona (www.ods.od.nih.gov).

Željezo se obično izlučuje u malim količinama urinom, fecesom i preko kože. Međutim, kod žena tijekom menstruacije ti gubitci mogu biti puno veći. Apsorpcija i distribucija željeza u organizmu kontrolirana je hormonom hepcidinom (www.ods.od.nih.gov).

U prehrani se željezo pojavljuje u dva oblika; kao hemsko i nehemsko željezo. Hemski oblik većinom se pronalazi u hrani životinjskog porijekla i bolje se apsorbira nego nehemsko željezo prisutno u namirnicama biljnog i životinjskog porijekla (Blanco-Rojo i Vaquero, 2019). Kao najbogatiji izvori henskog željeza ističu se morski plodovi i nemasno meso, dok su za nehemsko željezo značajni orašasti plodovi, mahunarke i povrće (www.ods.od.nih.gov). Na bioraspoloživost željeza utječu različiti pojačivači i inhibitori apsorpcije. Askorbinska kiselina je najjači promotor apsorpcije željeza koji kod niskog pH kelira željezo i sprječava njegovu interakciju s drugim ligandima. Apsorpciju željeza povećava i životinjsko tkivo (meso ribe, peradi), ali mehanizam nije potpuno razjašnjen. S druge strane, fitati su spojevi prisutni u žitaricama, mahunarkama, orašastim plodovima i sjemenkama koji inhibiraju apsorpciju željeza. Kao inhibitori apsorpcije djeluju i polifenoli i kalcij (Blanco-Rojo i Vaquero, 2019).

Preporučeni dnevni unos željeza za odrasle muškarce je 8 mg, a za žene 18 mg. Povećane potrebe za željezom javljaju se kod trudnica (27 mg/dnevno) i tijekom puberteta (11-15 mg/dnevno) (www.ods.od.nih.gov).

Deficit željeza u organizmu posebno je čest kod djece, žena i trudnica. Manjak željeza može nastati kao posljedica nedovoljnog unosa željeza prehranom, zbog poremećaja apsorpcije ili zbog krvarenja (www.ods.od.nih.gov; Gamulin i sur., 2011). Najčešći poremećaj uzrokovan nedostatkom željeza je anemija. Simptomi prisutni kod anemije su umor, atrofija epitela, manjak koncentracije i razdražljivost (Prashanth i sur., 2015).

Suficit željeza u organizmu naziva se hemokromatoza koja može biti nasljedna primarna i sekundarna. Primarna hemokromatoza posljedica je urođene mutacije gena za protein u epitelnim stanicama crijeva koji regulira apsorpciju željeza. Povećana je apsorpcija željeza, a višak se odlaže u jetru i parenhimske stanice. Do sekundarne hemokromatoze dolazi kad je unos

željeza u organizam toliko povećan da se nadmaši mogućnost njegova uklanjanja bubrezima, kožom i plućima (Gamulin i sur., 2011). Ako se ne liječi kelacijom ili flebotomijom, hemokromatoza može uzrokovati cirozu jetre, bolesti srca i oštećenje funkcije gušterače (www.ods.od.nih.gov).

1.5 Mangan u organizmu

Mangan je esencijalni nutrijent za ljudski organizam koji je neophodan za normalan razvoj, metabolizam te funkciju imunskog i reproduktivnog sustava. Mangan ima i važnu ulogu u rastu kostiju i vezivnog tkiva te u zgrušavanju krvi (Avila i sur., 2019). Kao aktivator enzima i kofaktor metaloenzima, mangan je neophodan za oksidativnu fosforilaciju, metabolizam masnih kiselina i kolesterola te za urea ciklus. U ljudskom tijelu mangan se nalazi u tkivima bogatim mitohondrijima i pigmentima. Zbog toga je velik sadržaj mangana prisutan u retini i tamnoj koži. Najveće tkivno skladište mangana su kosti, a prisutan je još i u jetri, gušterači i bubrezima (Prashanth i sur., 2015).

Apsorpcija mangana odvija se u tankom crijevu aktivnim transportom, a kod visokog unosa mangana i difuzijom. Većina mangana se nakon apsorpcije u plazmi veže na transferin, albumin i α 2-makroglobulin. Manji dio mangana ostaje slobodan u plazmi. Mehanizam kojim mangan dolazi do jetre i drugih tkiva nije potpuno razjašnjen (www.ods.od.nih.gov).

Dnevna potreba za manganom je 2-5 mg. Kao glavni prehrambeni izvori mangana ističu se orašasti plodovi i cjelovite žitarice. Visok sadržaj mangana pronađen je i u instant kavama i čaju (Prashanth i sur., 2015).

Nedostatak mangana u organizmu je vrlo rijedak poremećaj. Kod djece može uzrokovati demineralizaciju kostiju i spori rast, a kod odraslih može promijeniti metabolizam lipida i ugljikohidrata i tako dovesti do razvoja šećerne bolesti. Također, mogu se pojaviti i nespecifični simptomi kao što je kožni osip i depigmentacija kose (www.ods.od.nih.gov).

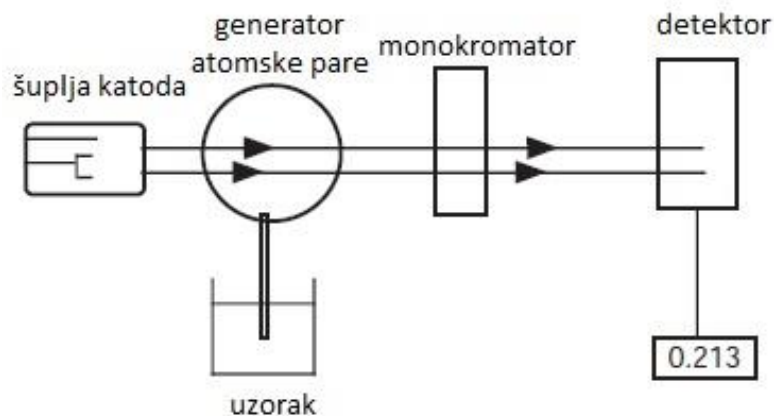
Suficit mangana najteže pogađa središnji živčani sustav. Dosad nije zabilježen suficit uzrokovan prekomjernim unosom mangana prehranom, nego isključivo kod ljudi u industriji (rudarstvo, zavarivanje) koji su kronično izloženi manganovoj prašini (www.ods.od.nih.gov). Manganizam je naziv za kronično trovanje manganom. Višak mangana se nakuplja u područjima mozga bogatim dopaminergičkim neuronima. Mangan može oksidirati katekolamine, uključujući i dopamin, i tako uzrokovati simptome slične Parkinsonovoj bolesti. U početnom stadiju manganizma javlja se razdražljivost, manija, kompulzivno ili agresivno ponašanje, smanjena brzina reakcije i halucinacije. U kasnijim fazama trovanja dolazi do

ekstrapiramidalnog sindroma gdje je izražena ukočenost udova, tremor, otežano hodanje, nejasan govor i pretjerano lučenje sline i znoja (Avila i sur., 2019).

1.6 Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija (engl. *Atomic Absorption Spectroscopy*, AAS) je vrlo specifična analitička tehnika koja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata u uzorku (Watson, 2012; Skoog i sur., 1999).

Svaki atomski apsorpcijski spektrometar sastoji se od osnovnih dijelova koji su shematski prikazani na *Slici 1*.



Slika 1. Shematski prikaz atomske apsorpcijske spektrometrije
(preuzeto i prilagođeno prema: Watson, 2012)

Prva komponenta atomske apsorpcijske spektrometrije je izvor linijskog zračenja koji emitira zračenje na istoj valnoj duljini kao što je valna duljina apsorpcijskog maksimuma ispitivanog elementa. Najčešće korišten izvor zračenja je žarulja sa šupljom katodom koja se sastoji od volframove anode i cilindrične katode koje su zataljene u staklenoj cijevi s inertnim plinom. Katoda je presvučena metalom koji se analizira. Najvažniji korak u analizi je atomizacija, proces kojim se uzorak isparava i razgrađuje pri čemu nastaje atomska para. Atomizaciju je moguće provesti u plamenu, elektrotermički, u induktivno spregnutoj plazmi ili u plazmi istosmjerne struje. Plamena atomizacija, koja je provedena u ovom radu korištenjem smjese zraka i acetilena, odvija se na 2200 - 2400 °C. Monokromator je komponenta spektrometra koji se koristi za odabir uske vrpce zračenja koje emitira izvor zračenja. Na taj način se uklanjaju interferencije zračenja emitirane iz plamena, iz inertnog plina kojim je punjena šuplja katoda

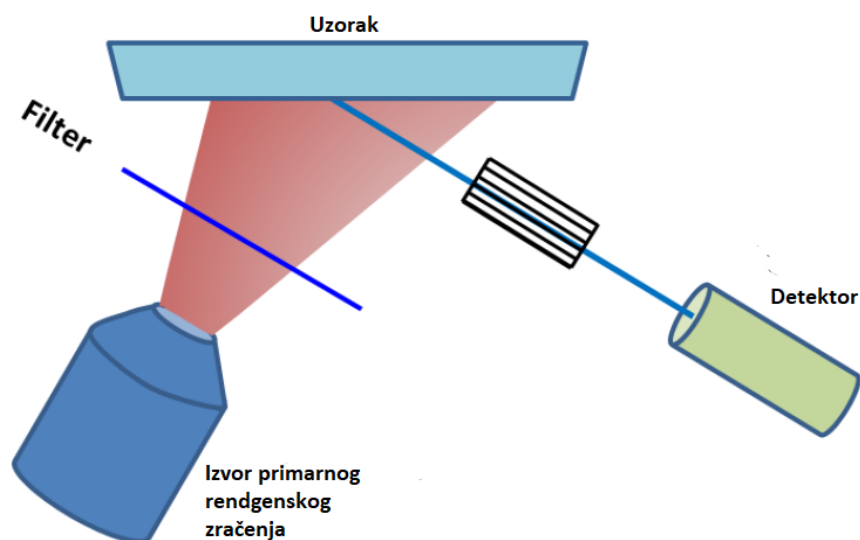
ili od ostalih elemenata u uzorku. Detektor koji se koristi je fotoosjetljiva ćelija koja detektira apsorpciju zračenja pri valnoj duljini zračenja koju apsorbira ispitivani atom (Watson, 2012; Skoog i sur., 1999).

Zbog visoke selektivnosti, AAS se najčešće koristi za određivanje metala prisutnih u različitim biološkim uzorcima i hrani (Güldaş, 2008). Također, ova metoda pogodna je za određivanje metalnih onečišćenja zaostalih iz procesa proizvodnje u različitim pripravcima. Prednosti analize AAS-om su brzina, prikladnost i umjerena cijena. Međutim, ova metoda je pogodna samo za analizu tekućih uzoraka, a kao glavni nedostatak ističe se potreba za posebnom šupljom katodom za svaki ispitivani element (Watson, 2012; Skoog i sur., 1999).

1.7 Energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija

Energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija (engl. *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*, EDXRF) je tehnika koja omogućuje kvantitativnu analizu elemenata u organskim i anorganskim uzorcima (Paltridge i sur., 2012; Noda i sur., 2006; Perring i Andrey, 2003).

Na *Slici 2.* prikazan je shematski prikaz EDXRF-a. Izvor primarnog rendgenskog zračenja obasjava uzorak prilikom čega atomi u uzorku apsorbiraju zračenje odgovarajuće valne duljine i prelaze u pobuđeno stanje. Pri povratku u osnovno energetsko stanje atomi emitiraju fluorescentno rendgensko zračenje većih valnih duljina. Sekundarno emitirano fluorescentno zračenje dolazi do detektora koji razlikuje rendgenske zrake na temelju energije i intenziteta. Detektor omogućuje istovremenu detekciju različitih elemenata. Budući da su energija i intenzitet emitiranog zračenja karakteristični za svaki pojedini element, koriste se u rendgenskoj fluorescencijskoj spektrometriji za određivanje elementarnog sastava uzoraka (Paltridge i sur., 2012).



Slika 2. Shematski prikaz EDXRF-a
(preuzeto i prilagođeno prema: Schramm, 2015)

EDXRF je jednostavna i brza metoda koja se može primijeniti direktno na krute i na tekuće uzorke. Metoda ne zahtjeva složenu pripremu uzoraka, ni uporabu kemikalija pa se može karakterizirati kao ekološki prihvatljiva i brza metoda. S obzirom na kratko vrijeme potrebno za analizu, EDXRF se koristi u rutinskim laboratorijskim analizama (Paltridge i sur., 2012; Noda i sur., 2006; Perring i Andrew, 2003).

1.8 Validacija analitičkog postupka

Prilikom razvoja i uvođenja nove metode ili promjene dijela prethodno validirane metode, potrebno je provesti validaciju metode. Validacija analitičkog postupka provodi se kako bi se dokazalo da je odabrani analitički postupak prikladan za određenu namjenu. U propisanim uvjetima provođenja validiranog postupka, rezultati će biti reprezentativni. U svrhu validacije određuju se slijedeći parametri: specifičnost, selektivnost, točnost, preciznost, linearnost, radno područje, granica dokazivanja, granica određivanja i izdržljivost. Ako se provodi validacija već postojeće metode nije potrebno provesti ispitivanje svih parametara, već se ispituju oni parametri koji su značajni za namjenu ispitivane metode (Nigović i sur., 2019; Crowther, 2001). Specifičnost analitičke metode definira se kao nedvojbena sposobnost razlikovanja analita od matrice uzorka. Selektivnost metode je njena mogućnost točnog određivanja ispitivanog analita u prisutnosti ostalih komponenata uzorka, kao što su onečišćenja, razgradni produkti ili pomoćne tvari (Nigović i sur., 2019).

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje eksperimentalno dobivene srednje vrijednosti sa stvarnim ili prihvaćenim referentnim vrijednostima. Kako bi se odredila točnost potrebno je provesti tri mjerenja za najmanje tri koncentracije unutar radnog područja metode. Točnost se najčešće izražava kao analitički prinos (engl. *recovery*) prema formuli:

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}},$$

gdje je \bar{x} srednja eksperimentalno određena vrijednost analita u uzorku, a \hat{x} stvarna vrijednost (Nigović i sur., 2019).

Preciznost metode je mjera za slaganje rezultata dobivenih nizom ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost pokazuje podudaranje rezultata mjerenja dobivenih istom metodom pod istim uvjetima unutar kratkog vremenskog intervala, najčešće unutar istog dana. Srednja preciznost definira se kao odstupanje rezultata mjerenja dobivenih istom metodom pod različitim uvjetima unutar istog laboratorija. Za određivanje srednje preciznosti mjerenje se provodi u različitim danima ili ih provodi drugi analitičar na istom ili drugom instrumentu. Obnovljivost metode označava odstupanje rezultata mjerenja koja su dobivena istom metodom u različitim laboratorijima. Najčešće se preciznost iskazuje kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD, %) ili raspon pouzdanosti oko srednje vrijednosti (Nigović i sur., 2019; Crowther, 2001).

Linearnost analitičke metode predstavlja njenu sposobnost da u određenom intervalu daje rezultate izravno proporcionalne koncentraciji analita. Za utvrđivanje linearnosti potrebno je provesti tri do šest uzastopnih mjerenja kod najmanje pet različitih koncentracija analita. Linearnost se grafički prikazuje kalibracijskom krivuljom koja pokazuje ovisnost izmjerene analitičkog signala o koncentraciji analita. Baždarna krivulja opisana je jednadžbom regresijskog pravca $y = ax + b$ i koeficijentom korelacije regresijskog pravca (R^2) (Nigović i sur., 2019).

Radno područje je raspon koncentracije analita u uzorku unutar kojega odabrana analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost (Nigović i sur., 2019).

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ne nužno i odrediti. Granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) je najniža koncentracija analita koju je moguće odrediti sa prihvatljivom preciznošću i točnošću (Nigović i sur., 2019; Crowther, 2001). Granica dokazivanja izračunava se prema formuli:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a},$$

a granica određivanja prema formuli:

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a},$$

gdje je σ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, odnosno standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2019).

Otpornost (engl. *robustness*) je mjera sposobnosti analitičke metode da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, namjernih promjena parametara metode. Otpornost ili izdržljivost je pokazatelj pouzdanosti metode prilikom normalnih uvjeta njene primjene. Ispitivanje otpornosti provodi se variranjem jednog parametra, dok su ostali nepromijenjeni (Nigović i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kava je najčešće konzumirani funkcionalni napitak i određivanje mineralnih nutrijenata prisutnih u zrnu kave može biti od velikog interesa kako za potrošače, tako i za proizvođače. Mineralni sastav kave razlikuje se s obzirom na geografsko porijeklo i vrstu kave. U prethodno provedenim istraživanjima, koja su uključivala uzorke kave različitih vrsta i geografskog porijekla, ali i različite metode pripreme i analize, dobiven je širok raspon koncentracija ispitivanih elemenata.

Cink, bakar, mangan i željezo su esencijalni mikronutrijenti koji imaju važne uloge u mnogim fiziološkim procesima. Važno je regulirati status esencijalnih minerala u organizmu kako bi se spriječio njihov deficit ili suficit koji bi narušio fiziološke funkcije organizma.

Glavni cilj ovog rada je usporedba dvije različite analitičke tehnike za određivanje sadržaja metala (cinka, bakra, mangana i željeza) u sakupljenim uzorcima kave. Specifični ciljevi su:

- validirati metodu plamene atomske apsorpcijske spektrometrije i primjenom validirane metode odrediti sadržaj cinka, bakra, mangana i željeza u odabranim uzorcima kave koji su pripremljeni na dva načina
- odrediti mineralni sastav odabranih uzoraka energetski disperzivnom rendgenskom fluorescencijskom spektrometrijom.

Rezultati dobiveni dvjema tehnikama su uspoređeni prema sljedećim kriterijima: parametri metode („zelena kemija“), vrijeme potrebno za analizu te ekonomski kriterij.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- 70 % HClO₄ (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- 65 % HNO₃ (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- Standard Cu 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, USA)
- Standard Fe 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, USA)
- Standard Mn 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, USA)
- Standard Zn 1000 µg/mL (PerkinElmer, Shelton, USA)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 µScm⁻¹, dobivena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, USA)
- Standardna poredbena tvar, lišće zelenog čaja (engl. *Certified Reference Material*) CRM 3254 *Camellia sinensis* (NIST, Gaithersburg, USA)

Sve korištene kemikalije su *pro analysi* čistoće.

3.1.2 Laboratorijski pribor

- plastične epruvete volumena 15 mL, 50 mL (Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Njemačka)
- membranski politetrafluoroetilenski (PTFE) filter veličine pora 0,45 µm (Fisherbrand, Göteborg, Švedska)
- automatske mikropipete volumena 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) i 500-5000 µL (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- odmjerne tikvice volumena 25 ml, 50 ml, 100 ml, 1000 ml
- laboratorijske čaše volumena 100 ml, 150ml
- kivete, satno staklo, stakleni lijevak, menzura
- boca štrcaljka, injekcijska štrcaljka
- porculanski lončić, eksikator
- ručna preša

3.1.3 Radni instrumenti

Za vaganje uzoraka korištena je analitička vaga AB204-S (Mettler Toledo, Švicarska). Suha digestija provedena je u mufolnoj peći na Zavodu za analitičku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Za mokru digestiju korištena je magnetska mješalica s grijačem Cimarec 2 (Barnstead/ThermoLyne, Dubuque, Iowa, USA). Mjerenja su provedena na atomskom apsorpcijskom spektrometru AAnalyst 800 (PerkinElmer Instruments, CT, USA) pomoću plamene tehnike u slijedećim radnim uvjetima;

- žarulja sa šupljom katodom (15 mA)
- valna duljina (nm): 213,9 (Zn), 324,8 (Cu), 248,3 (Fe), 279,5 (Mn)
- gorivo/oksidans: acetilen/zrak
- acetilen (tlak (Pa) / protok ($\text{dm}^3\text{min}^{-1}$): $0,9 \times 10^5/2$
- zrak (tlak (Pa) / protok ($\text{dm}^3\text{min}^{-1}$): $5,5 \times 10^5/17$
- širina pukotine (nm): 0,2
- korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- fotodetektor
- AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalo, monitor i pisač HP 5652

Za EDXRF analizu korišten je energetska disperzivni rendgenski fluorescencijski spektrometar S2 Ranger (Bruker AXS, GmbH, Karlsruhe, Njemačka). EDXRF spektrometar opremljen je paladijskom rendgenskom cijevi maksimalne snage 50 W i XFLASH™ LE silikonskim drift detektorom (SDD). Instrument je opremljen s devet primarnih filtera koji se mogu koristiti ispred cijevi prije nego što rendgenska zraka udari u površinu uzorka i tako poboljšati uvjete mjerenja za elemente od interesa ili omogućiti rad u vakuumskim uvjetima.

3.1.4 Uzorci

Tijekom prosinca 2021. prikupljeni su uzorci kave različitih proizvođača koji su korišteni u eksperimentalnom dijelu ovog rada. Uzorci uključuju mljevenu kavu, instant kavu i mješavine kave sa šećerom, mlijekom ili drugim dodacima.

3.2 Metode

3.2.1 Priprema otopina

- Priprema 2 %-tne otopine HNO₃

Za ispiranje atomskog apsorpcijskom spektrometra korištena je 2 %-tna otopina dušične kiseline koja je pripremljena tako što je 20 mL koncentrirane (65 %) HNO₃ razrijeđeno ultračistom vodom do oznake u odmjerne tikvici od 1000 mL.

- Priprema standardnih otopina cinka i bakra

Matične standardne otopine cinka i bakra koncentracije 100 µg/mL (Stock otopine) pripremljene su iz komercijalno dostupnih standardnih otopina koncentracije 1000 µg/mL. Za pripremu stock otopine cinka automatskom mikropipetom je u odmjernu tikvicu od 50 mL dodano 5 mL komercijalne standardne otopine cinka i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake na odmjerne tikvici. Na isti način pripremljena je i matična standardna otopina bakra. Za izradu kalibracijskih pravaca za oba metala pripremljeno je pet standardnih otopina koncentracija 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL i 5 µg/mL. Standardne otopine za kalibraciju pripremljene su razrjeđivanjem stock otopina ultračistom vodom i nadopunjavanjem do oznake u odmjerne tikvici od 25 mL. Priprema otopina cinka i bakra za baždarni pravac prikazana je u *Tablici 1*.

Tablica 1. Priprema standardnih otopina cinka i bakra za izradu baždarnog pravca

| Oznaka standarda | Koncentracija standardne otopine (µg/mL) | Volumen stock otopine (µL) | Ukupno razrjeđenje u odnosu na stock otopinu | Konačni volumen standardne otopine (mL) |
|------------------|--|----------------------------|--|---|
| STD 1 | 0,1 | 25 | 1000x | 25 |
| STD 2 | 0,5 | 125 | 200x | 25 |
| STD 3 | 1,0 | 250 | 100x | 25 |
| STD 4 | 2,5 | 625 | 40x | 25 |
| STD 5 | 5,0 | 1250 | 20x | 25 |

- Priprema standardnih otopina željeza i mangana

Pripremljene su stock otopine željeza i mangana koncentracije 100 µg/mL. Za njihovu pripravu korištene su komercijalno dostupne standardne otopine željeza i mangana čija je koncentracija

1000 µg/mL. Stock otopine željeza i mangana pripremljene su na isti način kao i prethodno opisane stock otopine cinka i bakra.

Za izradu baždarnih pravaca za željezo i mangan pripremljeno je pet standardnih otopina koncentracija 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL i 20 µg/mL. Standardne otopine koncentracije 2 µg/mL i 5 µg/mL pripremljene su razrjeđivanjem stock otopina ultračistom vodom i nadopunjavanjem do oznake u odmjernoj tikvici od 25 mL. Standardi veće koncentracije (10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL) pripremljeni su razrjeđivanjem komercijalne standardne otopine u odmjernoj tikvici od 25 mL. Priprema otopina mangana i željeza prikazana je u *Tablici 2*.

Tablica 2. Priprema standardnih otopina mangana i željeza za izradu baždarnog pravca

| Oznaka standarda | Koncentracija standardne otopine (µg/mL) | Volumen stock otopine (µL) | Volumen komercijalne standardne otopine (µL) | Ukupno razrjeđenje u odnosu na stock otopinu | Konačni volumen standardne otopine (mL) |
|------------------|--|----------------------------|--|--|---|
| STD 1 | 2 | 500 | - | 50x | 25 |
| STD 2 | 5 | 1250 | - | 20x | 25 |
| STD 3 | 10 | - | 250 | 10x | 25 |
| STD 4 | 15 | - | 375 | 6,66x | 25 |
| STD 5 | 20 | - | 500 | 5x | 25 |

3.2.2 Priprema uzoraka za analizu AAS-om

Uzorci kave za analizu atomskim apsorpcijskim spektrometrom moraju biti pripremljeni u obliku otopine pa se zbog toga provodi digestija krutih uzoraka. U ovom radu provedena je suha i mokra digestija.

- Suha digestija

Za suhu digestiju izvagan je 1 gram uzorka kave i kvantitativno prenesen u porculansku zdjelicu. Porculanske zdjelice s uzorcima stavljene su u mufolnu peć pri temperaturi 500 °C. Postupak suhe digestije završen je nastankom bijelog praha (~10 h). Nakon digestije, uzorci su stavljani na hlađenje u eksikator. Ohlađeni uzorci kvantitativno su preneseni u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Dodano je 10 mL ultračiste vode i 1 mL koncentrirane dušične

kiseline. Odmjerna tikvica nadopunjena je do 50 mL ultračistom vodom (Grembecka i sur., 2007; Güldaş, 2008).

- Mokra digestija

Za mokru digestiju izvagano je 2 grama uzorka kave u laboratorijsku čašu. Uzorku je dodano 10 mL 65 % dušične kiseline i 15 mL 70 % perklorne kiseline. Uzorci su grijani na magnetskoj miješalici s grijačem na 80 °C do nastanka bistre otopine (~2 h) (Slika 3). Nakon digestije uzorak je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL i razrijeđen ultračistom vodom do oznake (Güldaş, 2008).



Slika 3. Priprema uzoraka mokrom digestijom

Dobivene otopine filtrirane su pomoću membranskog politetrafluoroetilenskog filtra s veličinom pora 0,45 µm.

Standardna poredbena tvar pripremljena je za analizu na isti način kao i uzorci. Svaki uzorak pripremljen je za analizu u duplikatu.

3.2.3 Analiza cinka, bakra, željeza i mangana u uzorcima AAS-om

Određivanje koncentracije cinka, bakra, željeza i mangana u odabranim uzorcima kave provedeno je korištenjem plamene tehnike atomskog apsorpcijskog spektrometra. Prije analize potrebno je isprati instrument razrijeđenom (2 %) dušičnom kiselinom, a nakon toga ultračistom vodom. Za svaki element najprije se izmjeri apsorbanacija standardnih otopina i na temelju rezultata se konstruira kalibracijski pravac. Korištenjem kalibracijskog pravca moguće je

odrediti koncentraciju metala u uzorcima kave. Mjerenje apsorbancije provodi se uranjanjem plastične cjevčice u epruvetu s uzorkom prilikom čega instrument uzima dio otopine i vrši tri mjerenja apsorbancije. Analize su provedene mjerenjem apsorbancije na 213,9 nm za cink, 324,8 nm za bakar, 248,3 nm za željezo i na 279,5 nm za mangan. Između mjerenja različitih uzoraka cjevčica instrumenta se uranja u ultračistu vodu kako bi se isprao plameni atomizator.

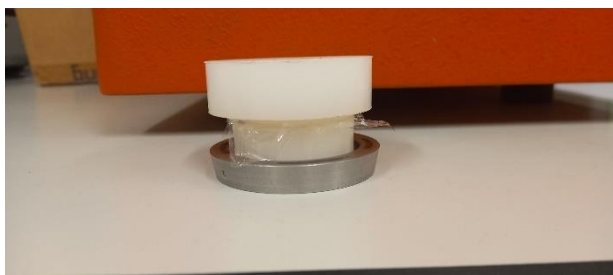
3.2.4 Priprema uzoraka za analizu EDXRF-om

Uzorci kave za analizu energetski disperzivnom rendgenskom fluorescencijskom spektrometrijom pripremljeni su na dva načina; kao rastresiti prašak u kiveti i kao prašak komprimiran u pelete (*Slika 4*).



Slika 4. Uzorci za analizu EDXRF-om

U oba slučaja korišteno je 2 grama uzorka, a konačni promjer uzorka bio je 2,8 cm. Peleti su pripremljeni prešanjem uzorka pomoću ručne preše tijekom 2 minute na 10 Tm. Prije analize uzoraka EDXRF-om dodan je teflonski zadrživač (engl. *backstopper*) koji sprječava utjecaj podloge nosača na oblik spektra i na same rezultate (*Slika 5*) (Marguí i sur., 2018).



Slika 5. Teflonski zadrživač za analizu uzoraka EDXRF-om

3.3 Statistička analiza

Za statističku obradu prikupljenih podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, USA). Svi uzorci pripremljeni su u duplikatu te podvrgnuti analizi pomoću AAS i EDXRF tehnike, a rezultati su iskazani kao

srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Analiza statističke značajnosti rezultata rađena je u programu GraphPad Prisma 9.0 uz nivo značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode provedena je pomoću standardnih otopina cinka, bakra, željeza i mangana, uzoraka i standarda poredbene tvari. U postupku validacije metode ispitivana je linearnost, preciznost, točnost, granica dokazivanja i granica određivanja.

4.1.1 Linearnost

Linearnost analitičke metode određena je mjerenjem apsorbancije pet standardnih otopina cinka, bakra, željeza i mangana poznatih koncentracija. Za svaku koncentraciju standarda izmjerena je apsorbancija u triplikatu i izračunata srednja vrijednost. Za svaki od ispitivanih metala izrađena je krivulja baždarnog pravca koja prikazuje ovisnost odaziva detektora o koncentraciji standarda. Kalibracijska krivulja opisana je jednadžbom pravca $y = ax + b$ i koeficijentom korelacije regresijskog pravca R^2 (Nigović i sur., 2019).

U *Tablici 3* prikazane su jednadžbe baždarnih pravaca za svaki od ispitivanih elemenata s pripadajućim koeficijentom korelacije. Na temelju dobivenih krivulja baždarnih pravaca za standardne otopine može se zaključiti da je metoda linearna za određivanja cinka, bakra, željeza i mangana.

Tablica 3. Linearnost metode izražena pomoću jednadžbi baždarnih pravaca

| Ispitivani element | Raspon koncentracija (mg/L) | Jednadžba baždarnog pravca | Koeficijent korelacije, R^2 |
|--------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Zn | 0,1 – 5 | $y = 0,2147 x + 0,0235$ | 0,9978 |
| Cu | 0,1 – 5 | $y = 0,0302 x - 0,0008$ | 1 |
| Fe | 2 – 20 | $y = 0,0311 x - 0,0094$ | 0,9996 |
| Mn | 2 – 20 | $y = 0,0555 x + 0,1192$ | 0,9781 |

4.1.2 Preciznost

Preciznost analitičke metode određena je kao ponovljivost unutar istog dana i kao srednja preciznost. Izvršeno je šest mjerenja za tri različite koncentracije standardnih otopina svakog

od ispitivanih elemenata kako bi se ispitala ponovljivost. Preciznost je izražena kao standardna devijacija i relativna standardna devijacija u postotku. Prihvatljiva vrijednost RSD je manja od 2 % (Nigović i sur., 2019).

Dobivene vrijednosti mjerenja ponovljivosti za određivanje cinka prikazane su u *Tablici 4*. Vrijednosti dobivene relativne standardne devijacije su unutar prihvatljivih granica.

Tablica 4. Ponovljivost metode za određivanje cinka izražena kao RSD

| CINK | koncentracija (mg/L) | | |
|--|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | STD 2 (0,5 mg/L) | STD 3 (1 mg/L) | STD 4 (2,5 mg/L) |
| 1. mjerenje | 0,491 | 0,988 | 2,413 |
| 2. mjerenje | 0,495 | 0,993 | 2,412 |
| 3. mjerenje | 0,494 | 0,998 | 2,426 |
| 4. mjerenje | 0,507 | 0,995 | 2,411 |
| 5. mjerenje | 0,506 | 0,998 | 2,414 |
| 6. mjerenje | 0,506 | 0,995 | 2,426 |
| Srednja vrijednost | 0,500 | 0,995 | 2,417 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,007 | 0,004 | 0,007 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 1,451 | 0,375 | 0,291 |

U *Tablici 5* prikazani su rezultati ispitivanja ponovljivosti metode za određivanje bakra. Može se uočiti kako su vrijednosti relativne standardne devijacije u ovom ispitivanju unutar prihvatljive granice od 2 %.

Tablica 5. Ponovljivost metode za određivanje bakra izražena kao RSD

| BAKAR | koncentracija (mg/L) | | |
|--|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | STD 2 (0,5 mg/L) | STD 3 (1 mg/L) | STD 4 (2,5 mg/L) |
| 1. mjerenje | 0,534 | 1,040 | 2,543 |
| 2. mjerenje | 0,542 | 1,055 | 2,552 |
| 3. mjerenje | 0,548 | 1,061 | 2,560 |
| 4. mjerenje | 0,548 | 1,060 | 2,562 |
| 5. mjerenje | 0,550 | 1,068 | 2,548 |
| 6. mjerenje | 0,554 | 1,064 | 2,552 |
| Srednja vrijednost | 0,546 | 1,058 | 2,553 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,007 | 0,010 | 0,007 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 1,290 | 0,928 | 0,281 |

Rezultati ispitivanja ponovljivosti metode za određivanje željeza (Tablica 6) ukazuju na prihvatljivu ponovljivost metode za određivanje željeza.

Tablica 6. Ponovljivost metode za određivanje željeza izražena kao RSD

| ŽELJEZO | koncentracija (mg/L) | | |
|--|----------------------|-----------------|-----------------|
| | STD 2 (5 mg/L) | STD 3 (10 mg/L) | STD 4 (15 mg/L) |
| 1. mjerenje | 4,794 | 9,957 | 14,75 |
| 2. mjerenje | 4,831 | 9,987 | 14,73 |
| 3. mjerenje | 4,849 | 9,957 | 14,85 |
| 4. mjerenje | 4,870 | 9,931 | 14,88 |
| 5. mjerenje | 4,854 | 9,936 | 14,84 |
| 6. mjerenje | 4,861 | 9,851 | 14,80 |
| Srednja vrijednost | 4,843 | 9,937 | 14,808 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,027 | 0,046 | 0,059 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 0,566 | 0,466 | 0,399 |

Rezultati dobiveni ispitivanjem ponovljivosti za određivanje mangana prikazani su u Tablici 7. RSD vrijednost dobivena ispitivanjem zadovoljava postavljene uvjete.

Tablica 7. Ponovljivost metode za određivanje mangana izražena kao RSD

| MANGAN | koncentracija (mg/L) | | |
|--|----------------------|-----------------|-----------------|
| | STD 2 (5 mg/L) | STD 3 (10 mg/L) | STD 4 (15 mg/L) |
| 1. mjerenje | 4,964 | 9,798 | 14,71 |
| 2. mjerenje | 4,983 | 9,784 | 14,72 |
| 3. mjerenje | 4,997 | 9,816 | 14,80 |
| 4. mjerenje | 4,981 | 9,839 | 14,69 |
| 5. mjerenje | 4,974 | 9,824 | 14,76 |
| 6. mjerenje | 4,974 | 9,864 | 14,73 |
| Srednja vrijednost | 4,979 | 9,821 | 14,735 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,011 | 0,029 | 0,039 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 0,223 | 0,292 | 0,267 |

Srednja preciznost određena je mjerenjem apsorbancije triju standardnih otopina svakog metala različitih koncentracija tijekom tri dana. Rezultati dobiveni mjerenjem srednje preciznosti za

određivanje cinka (*Tablica 8*) upućuju na zadovoljavajuću srednju preciznost metode za određivanje cinka.

Tablica 8. Srednja preciznost metode za određivanje cinka izražena kao RSD

| CINK | koncentracija (mg/L) | | |
|--|----------------------|----------------|------------------|
| | STD 2 (0,5 mg/L) | STD 3 (1 mg/L) | STD 4 (2,5 mg/L) |
| 1. radni dan | 0,500 | 0,995 | 2,417 |
| 2. radni dan | 0,496 | 0,991 | 2,490 |
| 3. radni dan | 0,507 | 1,010 | 2,536 |
| Srednja vrijednost | 0,501 | 0,999 | 2,481 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,007 | 0,009 | 0,050 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 1,328 | 0,949 | 2,003 |

Srednja preciznost metode za određivanje bakra prikazana je u *Tablici 9*. Uočeno je da je kod nižih koncentracija bakra RSD neznatno iznad 2 %. Metoda unatoč tome pruža dovoljnu preciznost za određivanje bakra u uzorcima.

Tablica 9. Srednja preciznost metode za određivanje bakra izražena kao RSD

| BAKAR | koncentracija (mg/L) | | |
|--|----------------------|----------------|------------------|
| | STD 2 (0,5 mg/L) | STD 3 (1 mg/L) | STD 4 (2,5 mg/L) |
| 1. radni dan | 0,529 | 1,057 | 2,550 |
| 2. radni dan | 0,538 | 1,058 | 2,553 |
| 3. radni dan | 0,546 | 1,058 | 2,553 |
| Srednja vrijednost | 0,538 | 1,058 | 2,552 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,011 | 0,010 | 0,008 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 2,135 | 0,963 | 0,316 |

U *Tablici 10*, prikazani su rezultati dobiveni mjerenjem 3 standardne otopine željeza tijekom 3 dana. Može se primijetiti da vrijednosti RSD odstupaju od zadanih granica prihvatljivosti, ali metoda još uvijek osigurava dobru srednju preciznost.

Tablica 10. Srednja preciznost metode za određivanje željeza izražena kao RSD

| ŽELJEZO | koncentracija (mg/L) | | |
|--|----------------------|-----------------|-----------------|
| | STD 2 (5 mg/L) | STD 3 (10 mg/L) | STD 4 (15 mg/L) |
| 1. radni dan | 4,843 | 9,937 | 14,808 |
| 2. radni dan | 5,155 | 10,987 | 15,745 |
| 3. radni dan | 5,017 | 9,625 | 14,960 |
| Srednja vrijednost | 5,005 | 10,183 | 15,171 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,134 | 0,601 | 0,425 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 2,682 | 5,898 | 2,799 |

Rezultati dobiveni ispitivanjem srednje preciznosti za određivanje mangana prikazani su u *Tablici 11*. Srednja preciznost metode izražena kao RSD je unutar propisanih granica od 2 % što znači da metoda omogućuje precizno određivanje mangana u uzorcima.

Tablica 11. Srednja preciznost metode za određivanje mangana izražena kao RSD

| MANGAN | koncentracija (mg/L) | | |
|--|----------------------|-----------------|-----------------|
| | STD 2 (5 mg/L) | STD 3 (10 mg/L) | STD 4 (15 mg/L) |
| 1. radni dan | 4,979 | 9,821 | 14,74 |
| 2. radni dan | 5,110 | 10,07 | 15,05 |
| 3. radni dan | 4,971 | 9,859 | 14,87 |
| Srednja vrijednost | 5,045 | 9,945 | 14,893 |
| Standardna devijacija (SD) | 0,067 | 0,114 | 0,143 |
| Relativna standardna devijacija, RSD (%) | 1,326 | 1,142 | 0,958 |

4.1.3 Točnost

Ispitivanje točnosti provedeno je određivanjem ispitivanih metala u standardnoj poredbenoj tvari (CRM 3254) i metodom standardnog dodatka. Korištena je standardna poredbena tvar lišća zelenog čaja koja je pripremljena na isti način kao i uzorci. U uzorku lišća zelenog čaja određene su koncentracije svih ispitivanih metala (bakar, cink, željezo, mangan) i dobivene vrijednosti su uspoređene s deklariranim vrijednostima (*Tablica 12*). Vrijednosti analitičkog prinosa za ispitivane metale su u rasponu 92,17 - 111,18 %. Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa za cink, bakar i mangan su unutar prihvatljivog raspona (90 - 110 %) (Shabir, 2004).

Analitički prinos za željezo je neznatno iznad propisane granice od 110%. Unatoč tome, metoda pruža dovoljnu točnost za određivanje željeza.

Tablica 12. Analitički prinos dobiven usporedbom deklariranog i izmjerenog sadržaja metala u standardnoj poredbenoj tvari

| Metal | Deklarirani sadržaj (µg/mL) | Izmjereni sadržaj (µg/mL) | Analitički prinos (%) |
|-----------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Zn | 24,7 | 24,01 | 97,21 |
| Cu | 11,34 | 10,78 | 95,06 |
| Fe | 273 | 303,5 | 111,17 |
| Mn | 943 | 869,2 | 92,17 |

Pripremljeno je još osam dodatnih uzoraka. U te uzorke dodane su otopine standarda bakra i cinka koncentracije 2,5 µg/mL i 5 µg/mL te otopine standarda željeza i mangana koncentracije 25 µg/mL i 50 µg/mL. Iz rezultata dobivenih mjerenjem apsorbancija izračunat je analitički prinos za cink, bakar, željezo i mangan (*Tablica 13*). Vrijednosti analitičkog prinosa za ispitivane elemente su između 91,81 % i 108,42 % što upućuje na zadovoljavajuću točnost metode.

Tablica 13. Analitički prinos dobiven metodom standardnog dodatka

| Metal | koncentracija metala u uzorku (µg/mL) + koncentracija dodanog standarda (µg/mL) | Ukupna koncentracija (µg/mL) | Izmjerena koncentracija (µg/mL) | Koncentracija dodatka (µg/mL) | Analitički prinos (%) |
|-----------|---|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Zn | 0,481 + 2,5 | 2,981 | 2,737 | 2,295 | 91,81 |
| | 0,481 + 5 | 5,481 | 5,593 | 5,102 | 102,04 |
| Cu | 0,216 + 2,5 | 2,716 | 2,593 | 2,386 | 95,47 |
| | 0,216 + 5 | 5,216 | 4,955 | 4,750 | 95,00 |
| Fe | 17,41 + 25 | 42,41 | 45,98 | 27,10 | 108,42 |
| | 17,41 + 50 | 67,41 | 73,04 | 54,18 | 108,35 |
| Mn | 5,78 + 25 | 30,78 | 31,46 | 25,55 | 102,21 |
| | 5,78 + 50 | 55,78 | 53,53 | 47,98 | 95,97 |

4.1.4 Granica dokazivanja i granica određivanja

Granice dokazivanja i određivanja izračunate su prema formulama opisanim u uvodnom poglavlju (poglavlje 1.7), a njihove vrijednosti prikazane su u *Tablici 14*.

Tablica 14. Granice dokazivanja (LOD) i granice određivanja (LOQ) za ispitivane elemente

| Metal | LOD (mg/L) | LOQ (mg/L) |
|--------------|-------------------|-------------------|
| Zn | 0,017 | 0,053 |
| Cu | 0,002 | 0,006 |
| Fe | 0,091 | 0,276 |
| Mn | 0,003 | 0,009 |

4.2 Usporedba metoda digestije

U preliminarnim ispitivanjima uzorci kave pripremljeni su suhom i mokrom digestijom. Razmatrano je vrijeme potrebno za pripremu uzoraka i razlike u dobivenim rezultatima analize. Priprema uzoraka suhom digestijom trajala je prosječno 10 sati po uzorku. Mokra digestija provodila se u prosjeku tijekom 2 sata za svaki od uzoraka. Usporedbom dobivenih rezultata analize utvrđeno je da nema značajnih razlika ($P = 0,8307$) u koncentracijama ispitivanih elemenata među uzorcima pripremljenim različitim metodama digestije. Zbog značajne razlike u vremenu potrebnom za provođenje, mokra digestija odabrana je za izvođenje u analizama.

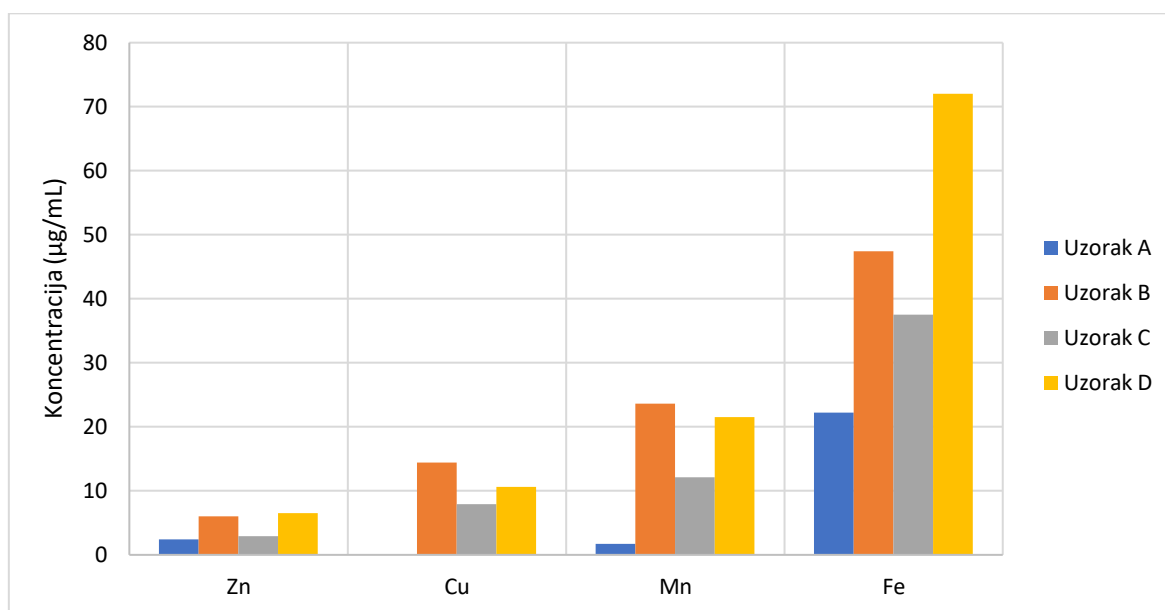
4.3 Određivanje cinka, bakra, željeza i mangana u uzorcima

Nakon validacije metode provedena je analiza uzoraka na atomskom apsorpcijskom spektrometru. Dva uzorka kave pripremljena su postupcima mokre i suhe digestije kako bi se odabrao bolji način pripreme uzoraka. Rezultati analize ispitivanih uzoraka prikazani su u *Tablici 15*.

Tablica 15. Koncentracije metala u uzorcima dobivene mokrom i suhom digestijom

| Metal | Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|-------|------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | UZORAK 1 | | UZORAK 2 | |
| | Mokra digestija | Suha digestija | Mokra digestija | Suha digestija |
| Zn | $11,258 \pm 0,38$ | $11,209 \pm 0,22$ | $6,5356 \pm 0,13$ | $6,0193 \pm 0,08$ |
| Cu | $7,4138 \pm 0,17$ | $6,8666 \pm 0,15$ | $10,617 \pm 0,11$ | $10,447 \pm 0,12$ |
| Fe | $62,383 \pm 2,28$ | $55,690 \pm 2,58$ | $71,968 \pm 10,82$ | $61,039 \pm 5,62$ |
| Mn | $5,0675 \pm 0,11$ | $5,9578 \pm 0,38$ | $21,534 \pm 0,08$ | $22,187 \pm 0,12$ |

Za potrebe daljnje analize uzorci su pripremljeni mokrom digestijom kako bi se uštedjelo vrijeme potrebno za analizu. Analizirana su četiri uzorka kave različitih proizvođača. Svi uzorci pripremljeni su u duplikatu. Rezultati analize prikazani su na *Slici 6*. Ispitana koncentracija cinka kretala se između $2,39 \mu\text{g/mL}$ i $6,54 \mu\text{g/mL}$. Koncentracija bakra u uzorku A je ispod limita detekcije, a najveća je u uzorku B ($14,42 \mu\text{g/mL}$). Sadržaj mangana također se znatno razlikovao između uzoraka ($1,67 - 23,64 \mu\text{g/mL}$). Od ispitivanih elemenata, željezo je najviše zastupljeno u svim uzorcima. Koncentracija željeza kretala se u rasponu od $22,19 \mu\text{g/mL}$ do $71,97 \mu\text{g/mL}$.



Slika 6. Koncentracije ispitivanih elemenata u uzorcima dobivene tehnikom AAS

Rezultati dobiveni AAS analizom podudaraju se s rezultatima nekih ranije provedenih istraživanja (Jarošová i sur., 2014; Grembecka i sur., 2007; Krivan i sur., 1993). Grembecka i suradnici (2007) proveli su analizu različitih uzoraka kave i odredili sadržaj 14 elemenata, među kojima su bili i cink, bakar, željezo i mangan. Sadržaj cinka kretao se u rasponu 1,8 – 9,5 µg/mL. Koncentracija bakra bila je između 0,3 µg/mL i 30,1 µg/mL, željeza između 18,4 µg/mL i 82,6 µg/mL, a mangana između 9,3 µg/mL i 46,6 µg/mL.

Analiza istih uzoraka provedena je i EDXRF tehnikom. Uzorci su analizirani u obliku rastresitog praška i peleta. Priprema rastresitog praška je brža od pripreme peleta. Uzorci pripremljeni kao rastresiti prašak u kiveti mogu se ponovno koristiti u daljnjim analizama, dok su peleti krhki i nestabilni.

Rezultati EDXRF analize prašaka i peleta uspoređeni su s rezultatima dobivenim AAS tehnikom (*Tablica 16*). Rezultati dobiveni EDXRF analizom prašaka i peleta se podudaraju međusobno, kao i s rezultatima prethodno provedene AAS analize.

Tablica 16. Usporedba sadržaja ispitivanih elemenata dobivenih EDXRF i AAS tehnikama

| | | koncentracija (%) | | | |
|-----------------|--------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | Zn | Cu | Mn | Fe |
| UZORAK A | | | | | |
| | prašak | 0,0001 | 0,0006 | 0 | 0,0012 |
| | pelet | 0,0002 | 0,0007 | 0 | 0,0014 |
| | AAS | 0,0002 | < LOD | 0,0002 | 0,0022 |
| UZORAK B | | | | | |
| | prašak | 0,0005 | 0,0017 | 0,0021 | 0,0042 |
| | pelet | 0,0004 | 0,0015 | 0,002 | 0,0043 |
| | AAS | 0,0006 | 0,0014 | 0,0023 | 0,0047 |
| UZORAK C | | | | | |
| | prašak | 0,0002 | 0,0007 | 0,0011 | 0,0017 |
| | pelet | 0,0003 | 0,0009 | 0 | 0,0024 |
| | AAS | 0,0003 | 0,0008 | 0,0012 | 0,0037 |
| UZORAK D | | | | | |
| | prašak | 0,0005 | 0,0015 | 0,0021 | 0,0061 |
| | pelet | 0,0005 | 0,0014 | 0,0021 | 0,0054 |
| | AAS | 0,0007 | 0,0011 | 0,0021 | 0,0072 |

Budući da je EDXRF multi elementna tehnika, osim elemenata određenih AAS tehnikom, detektirani su i fosfor, sumpor, klor, kalij, kalcij, brom, rubidij i stroncij. Brom je detektiran u

samo jednom od ispitivanih uzoraka, stoga bi se u buduća istraživanja moglo uključiti i njegovo određivanje u uzorcima.

Obje metode pokazale su se kao pouzdane, točne i ekonomski prihvatljive metode za određivanje sadržaja cinka, bakra, mangana i željeza u uzorcima kave. Za pripremu uzoraka za AAS mokrom digestijom potrebno je kraće vrijeme nego kod suhe digestije. Kao glavni nedostatak mokre digestije ističe se uporaba koncentriranih kiselina u većim količinama nego kod suhe digestije. Atomska apsorpcijska spektrometrija je tehnika kod koje je potrebno duže vrijeme za provedbu analize zbog složenije pripreme uzoraka i činjenice da je za svaki ispitivani metal potrebno mijenjati šuplju katodu. S druge strane, EDXRF je tehnika kod koje je priprema uzorka mnogo jednostavnija i brža. Budući da EDXRF omogućuje istovremenu analizu više elemenata, postupak analize traje kraće nego kod AAS tehnike. Analiza EDXRF tehnikom provodi se u skladu s načelima „zelene kemije“ – prevenira nastanak kemijskog otpada, ne koristi kemikalije štetne za okoliš, smanjuje uporabu tvari koje mogu imati štetne posljedice (eksplozija, požar, štetno isparavanje).

Buduća istraživanja mogla bi koristiti ove metode na većem broju uzoraka kako bi se utvrdile razlike sadržaja elemenata u kavama različitih proizvođača i vrsta. Također, u analizu bi se mogli uključiti i infuzi kava budući da je to oblik u kojem se kava obično konzumira.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja, na temelju dobivenih rezultata i rasprave doneseni su sljedeći zaključci:

- AAS i EDXRF su jednostavne, jeftine i pouzdane metode za određivanje metala u uzorcima kave.
- EDXRF je bolja metoda za određivanje elemenata u uzorcima kave jer je brža, ekološki prihvatljivija i omogućuje istovremeno određivanje više elemenata.
- Rastresiti prašak je bolji način pripreme uzoraka za EDXRF u odnosu na pelet. Za pripremu rastresitog praška potrebno je kraće vrijeme, a uzorak se može ponovno koristiti u daljnjim analizama.
- Validacijom AAS metode potvrđena je točnost, preciznost, linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja metode.
- Mokra digestija pokazala se boljom metodom pripreme uzoraka za AAS u odnosu na suhu digestiju. Mokra digestija iziskivala je kraće vrijeme potrebno za provedbu, a rezultati analize uzoraka nisu se značajno razlikovali od uzoraka pripremljenih suhom digestijom.
- U uzorcima kave AAS-om i EDXRF-om potvrđena je prisutnost cinka, bakra, mangana i željeza. EDXRF-om su detektirani i fosfor, sumpor, klor, kalij, kalcij, brom, rubidij i stroncij.
- Postoje razlike u sadržaju cinka, bakra, mangana i željeza među različitim uzorcima kave. Cink je detektiran u rasponu koncentracija 2,39 - 6,54 $\mu\text{g/mL}$, bakar u rasponu $< \text{LOD}$ - 14,42 $\mu\text{g/mL}$, mangan u rasponu 1,67 - 23,64 $\mu\text{g/mL}$, a željezo u rasponu 22,19 - 71,97 $\mu\text{g/mL}$.
- Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja dvjema metodama se podudaraju.
- Dobiveni rezultati analize su u skladu s ranije provedenim istraživanjima.

6. LITERATURA

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

Blanco-Rojo R, Vaquero MP. Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review. *Innovative Food Sci Emerging Technol*, 2019, 51. 126-138.

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.

Butt MS, Sultan M. Coffee and its Consumption: Benefits and Risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2011, 51. 363-373.

Copper. 2021, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-HealthProfessional/>, pristupljeno 20.03.2022.

Crowther JB. Validation of Pharmaceutical Test Methods. U: Handbook of modern pharmaceutical analysis, Ahuja S, Scypinski S, urednici, San Diego, Academic Press, 2001, str. 415-442.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici. Patofiziologija, sedmo, obnovljeno i izmijenjeno izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 258-264, 271-273.

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.

Güldaş M. Comparison of digestion methods and trace elements determination in chocolates with pistachio using atomic absorption spectrometry. *J. Food Nutr. Res.*, 2008, 47. 92-99.

Iron. 2021, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-HealthProfessional/>, pristupljeno 20.03.2022.

Jarošová M, Milde D, Kuba M. Elemental Analysis of Coffee: a Comparison of ICP-MS and AAS Methods. *Czech. J. Food Sci.*, 2014, 32. 354-359.

Krivan V, Barth P, Morales AF. Multielement Analysis of Green Coffee and Its Possible Use for the Determination of Origin. *Mikrochim. Acta.*, 1993, 110. 217-236.

Marguí E, Queralt I, García-Ruiz E, García-González E, Rello L, Resano M. Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the direct multi-element analysis of dried blood spots. *Spectrochim. Acta Part B*, 2018, 139. 13-19.

Manganese. 2021, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Manganese-HealthProfessional/>, pristupljeno 20.03.2022.

Nigović B, Mornar Turk A, Sertić M, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodríguez J. Vježbe iz analitike lijekova, Priručnik za studente farmacije. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019, str. 150-154.

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.

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.

Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VRR, Prasad LK. A Review on Role of Essential Trace Elements in Health and Disease. *J Dr NTR Univ Health Sc*, 2015, 75-85.

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

Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci*, 2013, 18. 144-157.

Schramm R. X-Ray Fluorescence Analysis: Practical and Easy, 2nd edition, Bedburg-Hau, FLUXANA, 2015.

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

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of analytical chemistry, 6th Edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti V, Živković A. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str 595-611.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, Third Edition. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2012, str. 145-150.

Wei F, Tanokura M. Coffee in Health and Disease Prevention: Organic Compounds in Green Coffee Beans. Preedy VR, urednik, London, Academic Press, 2015, 149-162.

WHO, Vitamin and mineral requirements in human nutrition, Second Edition. World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations. Geneva, 2004, str. 230-272, 338.

Zinc, 2021, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>, pristupljeno 19.3.2022.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Kava je najčešće konzumirani funkcionalni napitak i određivanje mineralnog sastava zrna kave može biti od velikog interesa za potrošače i proizvođače. Mineralni sastav kave razlikuje se s obzirom na geografsko porijeklo i vrstu kave. Cink, bakar, mangan i željezo su esencijalni mikronutrijenti koji imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima. Budući da ih ljudski organizam ne može sintetizirati potrebno ih je unositi hranom ili suplementima.

Glavni cilj ovog istraživačkog rada je usporediti AAS i EDXRF tehnike za određivanje sadržaja ispitivanih metala u odabranim uzorcima kave. Specifični ciljevi su validirati metodu plamene atomske apsorpcijske spektrometrije i odrediti sadržaj ispitivanih metala primjenom validirane metode u uzorcima kave koji su pripremljeni mokrom i suhom digestijom. Rezultati dobiveni dvjema tehnikama su uspoređeni prema parametrima metode, vremenu potrebnom za analizu te ekonomskom kriteriju.

Analizom je utvrđeno da se rezultati dobiveni dvjema različitim analitičkim tehnikama podudaraju. Mokra digestija je brža metoda pripreme uzoraka kod AAS tehnike. Priprema uzoraka u obliku rastresitih prašaka je brža od pripreme peleta kod EDXRF tehnike. Prednost rastresitih prašaka je i što se mogu višekratno koristiti u analizama. EDXRF tehnika pokazala se bržom i ekološki prihvatljivijom. Analizom odabranih uzoraka kave je utvrđeno da su koncentracije ispitivanih metala u korelaciji s rezultatima iz prethodnih istraživanja te da postoje razlike u sadržaju bakra, cinka, željeza i mangana među različitim uzorcima.

Coffee is the most commonly consumed functional beverage and determining the mineral composition of coffee beans can be of great interest to consumers and producers. The mineral composition of coffee differs depending on the geographical origin and type of coffee. Zinc, copper, manganese and iron are essential micronutrients that play an important role in many physiological processes. Since the human body cannot synthesize them, it is necessary to take them in with food or supplements.

The main goal of this research paper is to compare AAS and EDXRF techniques for determining the content of tested metals in selected coffee samples. The specific objectives are to validate the method of flame atomic absorption spectrometry and to determine the content of tested metals using a validated method in coffee samples prepared by wet and dry digestion. The results obtained by the two techniques were harmonized according to the parameters of the methods, the time required for analysis and the economic criteria.

The analysis found that the results obtained by two different analytical techniques match. Wet digestion is a faster method of sample preparation in the AAS technique. The preparation of samples in the form of loose powders is faster than the preparation of pellets with the EDXRF technique. The advantage of loose powders is that they can be used multiple times in the analyses. The EDXRF technique has proven to be faster and more environmentally friendly. The analysis of selected coffee samples showed that the concentrations of the tested metals correlated with the results of previous studies and that there were differences in the content of copper, zinc, iron and manganese between different samples.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

USPOREDBA ATOMSKE APSORPCIJSKE SPEKTROMETRIJE I ENERGETSKI DISPERZIVNE RENDGENSKE FLUORESCENCIJSKE SPEKTROMETRIJE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA ODABRANIH METALA U UZORCIMA KAVE

Nikolina Hajduk

SAŽETAK

Kava je najčešće konzumirani funkcionalni napitak i određivanje mineralnog sastava zrna kave može biti od velikog interesa za potrošače i proizvođače. Mineralni sastav kave razlikuje se s obzirom na geografsko porijeklo i vrstu kave. Cink, bakar, mangan i željezo su esencijalni mikronutrijenti koji imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima. Budući da ih ljudski organizam ne može sintetizirati potrebno ih je unositi hranom ili suplementima. Glavni cilj ovog istraživačkog rada je usporediti AAS i EDXRF tehnike za određivanje sadržaja ispitivanih metala u odabranim uzorcima kave. Specifični ciljevi su validirati metodu plamene atomske apsorpcijske spektrometrije i odrediti sadržaj ispitivanih metala primjenom validirane metode u uzorcima kave koji su pripremljeni mokrom i suhom digestijom. Rezultati dobiveni dvjema tehnikama su uspoređeni prema parametrima metode, vremenu potrebnom za analizu te ekonomskom kriteriju. Analizom je utvrđeno da se rezultati dobiveni dvjema različitim analitičkim tehnikama podudaraju. Mokra digestija je brža metoda pripreme uzoraka kod AAS tehnike. Priprema uzoraka u obliku rastresitih prašaka je brža od pripreme peleta kod EDXRF tehnike. Prednost rastresitih prašaka je i što se mogu višekratno koristiti u analizama. EDXRF tehnika pokazala se bržom i ekološki prihvatljivijom. Analizom odabranih uzoraka kave je utvrđeno da su koncentracije ispitivanih metala u korelaciji s rezultatima iz prethodnih istraživanja te da postoje razlike u sadržaju bakra, cinka, željeza i mangana među različitim uzorcima.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 6 grafičkih prikaza, 16 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kava, cink, bakar, željezo, mangan, atomska apsorpcijska spektrometrija, energetski disperzivna rendgenska fluorescencijska spektrometrija

Mentor: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Suzana Inić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

COMPARISON OF ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY AND ENERGY DISPERSIVE X-RAY FLUORESCENCE SPECTROMETRY FOR DETERMINING THE CONTENT OF SELECTED METALS IN COFFEE SAMPLES

Nikolina Hajduk

SUMMARY

Coffee is the most commonly consumed functional beverage and determining the mineral composition of coffee beans can be of great interest to consumers and producers. The mineral composition of coffee differs depending on the geographical origin and type of coffee. Zinc, copper, manganese and iron are essential micronutrients that play an important role in many physiological processes. Since the human body cannot synthesize them, it is necessary to take them in with food or supplements. The main goal of this research paper is to compare AAS and EDXRF techniques for determining the content of tested metals in selected coffee samples. The specific objectives are to validate the method of flame atomic absorption spectrometry and to determine the content of tested metals using a validated method in coffee samples prepared by wet and dry digestion. The results obtained by the two techniques were harmonized according to the parameters of the methods, the time required for analysis and the economic criteria. The analysis found that the results obtained by two different analytical techniques match. Wet digestion is a faster method of sample preparation in the AAS technique. The preparation of samples in the form of loose powders is faster than the preparation of pellets with the EDXRF technique. The advantage of loose powders is that they can be used multiple times in the analyses. The EDXRF technique has proven to be faster and more environmentally friendly. The analysis of selected coffee samples showed that the concentrations of the tested metals correlated with the results of previous studies and that there were differences in the content of copper, zinc, iron and manganese between different samples.

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

Thesis includes: 36 pages, 6 figures, 16 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: coffee, zinc, copper, iron, manganese, atomic absorption spectrometry, energy dispersive X-ray 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 Inić, 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: July 2022.