

# Primjena plamene atomske apsorpcijske spektrometrije i kemometrijske analize za klasifikaciju uzoraka kave na osnovu sadržaja cinka, bakra, mangana i željeza

---

Henčel, Iva

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:163:274986>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

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



Iva Henčel

**Primjena plamene atomske apsorpcijske  
spektrometrije i kemometrijske analize za  
klasifikaciju uzoraka kave na osnovu sadržaja  
cinka, bakra, mangana i željeza**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2022.

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

*„Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Jablan na stručnom vodstvu i strpljenju tijekom izvedbe i pisanja ovog Diplomskog rada.*

*Najviše sam zahvalna obitelji, mami Mariji, tati Vinku i bratu Filipu na iznimno velikoj podršci tijekom studija bez koje vjerojatno ne bih završila isti.*

*Hvala prijateljima, posebice Nini, Maji, Sandri, Duvnjak, Mervić, Križanić, Ces ces, docimi Emi kao i mojem najboljem krznenom prijatelju Rokiju.“*

# SADRŽAJ

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Uvod</b> .....                                                                                | <b>1</b>  |
| 1.1. Kava .....                                                                                     | 1         |
| 1.2. Utjecaj kave na zdravlje.....                                                                  | 1         |
| 1.2.1. Pozitivni utjecaj kave na zdravlje.....                                                      | 2         |
| 1.2.2. Negativni utjecaj kave na zdravlje .....                                                     | 3         |
| 1.3. Mikrominerali .....                                                                            | 4         |
| 1.3.1. Minerali u kavi .....                                                                        | 5         |
| 1.3.1.1. Cink.....                                                                                  | 6         |
| 1.3.1.2. Bakar.....                                                                                 | 7         |
| 1.3.1.3. Željezo.....                                                                               | 8         |
| 1.3.1.4. Mangan.....                                                                                | 9         |
| 1.4. Atomska Apsorpcijska Spektrometrija (AAS).....                                                 | 11        |
| 1.4.1. Princip metode .....                                                                         | 11        |
| 1.4.2. Dijelovi plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra .....                                  | 12        |
| 1.4.2.1. Žarulja sa šupljom katodom .....                                                           | 13        |
| 1.4.2.2. Deuterijski korektor .....                                                                 | 13        |
| 1.5. Obrada uzorka .....                                                                            | 14        |
| 1.5.1. Suha digestija.....                                                                          | 14        |
| 1.5.2. Mikrovalna digestija .....                                                                   | 14        |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....                                                                   | <b>15</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....                                                                 | <b>16</b> |
| 3.1. Materijali .....                                                                               | 16        |
| 3.1.1. Kemikalije .....                                                                             | 16        |
| 3.1.2. Aparatura.....                                                                               | 16        |
| 3.1.3. Laboratorijski pribor .....                                                                  | 17        |
| 3.1.4. Uzorci.....                                                                                  | 18        |
| 3.2. Metode .....                                                                                   | 19        |
| 3.2.1. Razgradnja organske matice metodom mokre digestije.....                                      | 19        |
| 3.2.1.1. Princip metode .....                                                                       | 19        |
| 3.2.1.2. Postupak obrade uzorka i priprema otopina za analizu .....                                 | 19        |
| 3.2.2. Određivanje koncentracija metala pomoću plamenog atomskog apsorpcijskog<br>spektrometra..... | 22        |
| 3.2.2.1. Princip metode .....                                                                       | 22        |
| 3.2.2.2. Priprema standardnih otopina .....                                                         | 22        |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3. Statistička analiza .....                                     | 23        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>                                  | <b>24</b> |
| 4.1. Prikaz rezultata mjerenja.....                                  | 24        |
| 4.2. Kemometrijska obrada podataka .....                             | 29        |
| 4.2.1. Univarijantna analiza .....                                   | 29        |
| 4.2.2. Multivarijantna analiza .....                                 | 30        |
| 4.2.2.1 Analiza glavnih komponentata .....                           | 30        |
| 4.2.2.2. Klaster analiza.....                                        | 33        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>                                            | <b>35</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                                           | <b>36</b> |
| <b>7. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>                                      | <b>44</b> |
| <b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD</b> |           |

## **1. Uvod**

### **1.1. Kava**

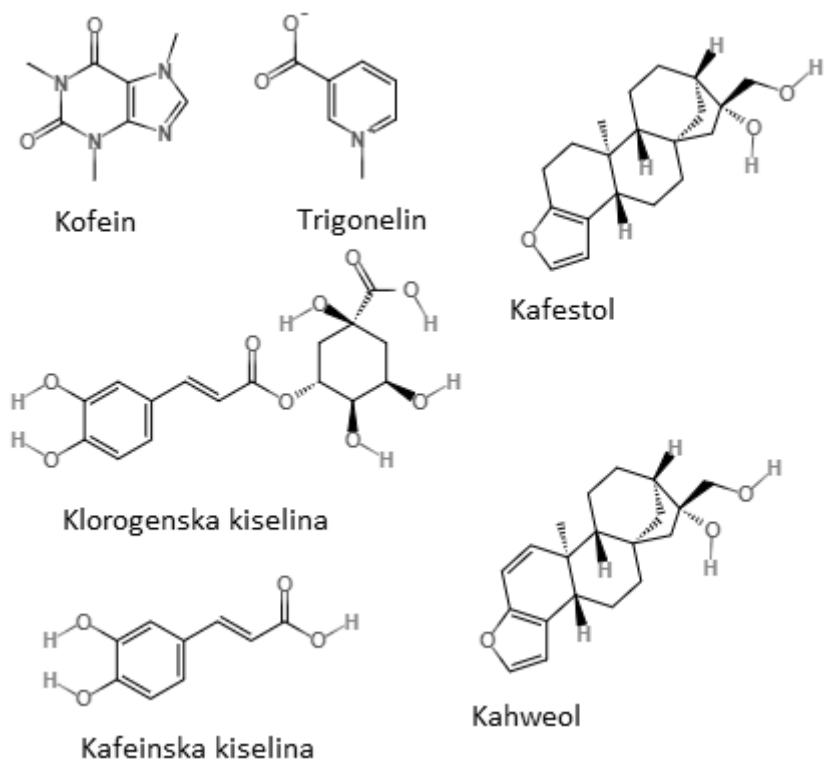
Kava je jedan od najpopularnijih napitaka u svijetu. Procjenjuje se da u kavi uživa 40 % svjetske populacije. Biljka od koje se pripravlja taj napitak, biljka kavovac, jedan je od najunosnijih poljoprivrednih proizvoda u svijetu. Svjetska tržišna vrijednost kavovca procjenjuje se na otprilike 35 milijardi američkih dolara godišnje (Pohl i sur., 2012; Grembecka i sur., 2007).

Najčešće komercijalno korištene biljne vrste za kavu su arabica, *Coffea arabica L.* i robusta, *Coffea canephora Pierre ex Froehner* (Olechno i sur., 2021).

### **1.2. Utjecaj kave na zdravlje**

Kava je najkonzumiraniji farmakološki aktivan napitak u svijetu, zbog visokog udjela kofeina djeluje kao stimulans središnjeg živčanog sustava (Cappelletti i sur., 2015).

Uživanje u kavi, osim psihološkog i društvenog aspekta, također pokazuje i određene zdravstvene benefite koji se pripisuju bioaktivnim sastavnicama kao što su alkaloidi kofein i trigonelin, polifenoli klorogenska i kofeinska kiselina te diterpeni kafestol i kahweol. Količina aktivnih tvari koje nalazimo u kavi ovisi o vrsti kavovca, stupnju prženja zrna kave, načinu pripravljanja kave te količini kave koja je korištena za pripremu napitka (Butt i Sultan, 2011; Socała i sur., 2021; Godos i sur., 2014).



Slika 1. Biološki aktivne sastavnice kave (nacrtane pomoću molview.org)

Benefit od ispijanja kave nije izravno proporcionalan s količinom unosa. Unos veći od tri šalice kave na dan nije pokazao štetan učinak, no nije pokazao niti veću zdravstvenu korist. Uzimajući u obzir spol, pokazano je da osobe ženskog spola uživaju u većoj zdravstvenoj koristi od konzumacije većih količina kave dnevno od osoba muškog spola (Poole i sur., 2017).

Postoje brojna istraživanja koja proučavaju utjecaj kave na zdravlje. Rezultati studija su podvojeni što se pripisuje različitim načinima pripremljanja kave, utjecajima drugih vanjskih faktora kao što je istovremena konzumacija cigareta od strane ispitanika tijekom istraživanja i slično.

### 1.2.1 Pozitivni utjecaj kave na zdravlje

Neke epidemiološke studije povezuju uživanje u kavi sa smanjenom stopom neurokognitivnog propadanja i smanjenom incidencijom neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest (Eskelinen i Kivipelto, 2010). U drugim istraživanjima ta korelacija izostaje (Ritchie i sur., 2007; Socała i sur., 2021).

Studije pokazuju da kofein ima antioksidativni, protuupalni i kemoprotektivni učinak. Njegovo fiziološko djelovanje uključuje stimulaciju središnjeg živčanog sustava, povećanje krvnog tlaka i stope staničnog metabolizma (ergogeno djelovanje) te diurezu. Povećanje stope metabolizma u ljudskom organizmu pripisuje se vezanju kofeina za fosfodiesterazu prilikom čega dolazi do povećanja cikličkog adenozin monofosfata koji posljedično uzorkuje povećanu transkripciju gena kojih povežujemo sa povećanom stopom lipidne oksidacije (Socala i sur., 2021; Higdon i Frei, 2006; Vaughan i sur., 2012).

Istraživanje koje su proveli Acheson i sur. (1980) bilježi značajan porast u stopi lipidne oksidacije tri sata nakon ingestije kofeina u odnosu na placebo skupinu. Povećanje stope lipidne oksidacije se očitovalo kao povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi.

Klorogenska i kofeinska kiselina u *in vitro* studijama pokazuju svojstva antioksidansa. Apsorbiraju se putem crijeva, no njihovo antioksidativno djelovanje u organizmu je smanjeno jer podliježu metabolizmu crijevnih bakterija koje stvaraju metabolite nižeg antioksidativnog potencijala (Higdon i Frei, 2006).

Pojedina istraživanja povezuju konzumaciju napitaka od kave sa smanjenjem rizika od razvoja dijabetesa tipa 2 kod osoba koje redovito konzumiraju 3-4 šalice kave dnevno. Taj učinak se u najvećoj mjeri pripisuje kofeinu i klorogenskoj kiselini. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja, koji je uočen u istraživanjima na štakorima, je kompetitivna inhibicija glukoza-6-fosfataze u jetri od strane klorogenske kiseline te kompetitivna inhibicija intestinalne apsorpcije glukoze koja se pripisuje klorogenskoj kiselini i ostalim fenolnim sastavnicama iz kave (Santos i Lima, 2016; Higdon i Frei, 2006).

Nadalje, pojedine studije su pokazale poboljšanje u vazodilatatornoj funkciji endotelnih stanica krvnih žila (Kujawska i sur., 2021).

### **1.2.2. Negativni utjecaj kave na zdravlje**

Pojedine studije uživanje u kavi povezuju s povećanjem serumskih koncentracija ukupnog i LDL kolesterola što se pripisuje djelovanju diterpena kafestola i kahweola iako im mehanizmi djelovanja nisu posve razjašnjeni. Rezultati studija su podvojeni te se pretpostavlja da je razlog tomu način pripreme kave. Filtriranjem kave diterpeni se u većoj mjeri uklone iz napitka. Kod konzumacije kave koja se pripravlja bez filtriranja, kao što su skandinavski kuhana kava, turska



kava i francuska prešana kava (engl. French press coffee, na taj način pripremljenu kavu Francuzi nazivaju fran. Cafetière), uočeno je povećanje serumskih koncentracija ukupnog i LDL kolesterola dok kod filter kave, perkolirane kave i instant kave taj učinak izostaje (Higdon i Frei, 2006).

Nadalje, u meta-analizi od Jee i sur., (2001), koja se sastoji od četrnaest randomiziranih kontroliranih studija, analiziran je učinak konzumacije kave na koncentraciju serumskog kolesterola. Pokazano je povećanje ukupnog i LDL kolesterola koje je ovisno o dozi unesene kuhane kave dok kod konzumacije filtrirane kave dolazi do iznimno malog porasta serumskog kolesterola.

Istraživanja koja bilježe utjecaj kave na krvni tlak su podvojena. S jedne strane se bilježi akutni porast sistoličkog krvnog tlaka za 3-14 mmHg i dijastoličkog krvnog tlaka za 4-13 mmHg nakon ispijanja 2-3 šalice kave, taj učinak se u najvećoj mjeri pripisuje djelovanju kofeina te se objašnjava agonističkim utjecajem kofeina na adenozičke i norepinefrinske receptore (Kujawska i sur., 2021). S druge strane postoje istraživanja i rezultati koji ukazuju da kava smanjuje rizik od hipertenzije (Grosso i sur., 2017), te istraživanja koja tvrde da ne postoji značajan učinak kave na krvni tlak kao što je istraživanje od Poole i sur., (2017).

### **1.3. Mikrominerali**

Nutrijenti su za organizam esencijalne kemijske tvari koje se unose hranom, dijele se na makronutrijente i mikronutrijente. Makronutrijentima se nazivaju ugljikohidrati, lipidi i proteini koje organizmu služe kao izvor energije. Pod mikronutrijente spadaju vitamini i minerali koji svoju ulogu u organizmu ispoljavaju u sklopu različitih enzima (Morris i Mohiuddin, 2022).

Minerali se klasificiraju u odnosu na dnevne potrebe ljudskog organizma. Minerali koje su ljudskom organizmu potrebne u količinama većim od 100 mg dnevno nazivaju se makrominerali, dok se minerali koje ljudski organizam zahtjeva u količinama manjim od 100 mg dnevno nazivaju mikrominerali ili elementi u tragovima (Morris i Mohiuddin, 2022).

Postoji više klasifikacija elemenata u tragovima od kojih je jedna Friedenova klasifikacija iz 1981. godine koja svrstava elemente u tragovima u tri skupine na osnovu njihove koncentracije u tkivima:

- Esencijalni elementi u tragovima pod kojim spadaju bor, kobalt, bakar, jod, željezo, mangan, molibden i cink.
- Vjerojatno esencijalni elementi u tragovima pod kojim spadaju krom, fluor, nikal, selen i vanadij.
- Fiziološki promotivni elementi u tragovima pod kojim spadaju brom, litij, silicij, kositar i titanij (Bhattacharya i sur., 2016).

U sklopu ovog rada analizirani su cink, bakar, željezo i mangan koji se ubrajaju u esencijalne elemente u tragovima prema Friedenovoj klasifikaciji (1981).

### 1.3.1. Minerali u kavi

Kava sadrži 5 % (m/m) minerala. Biljka kavovac pomoću korijena iz zemlje apsorbira minerale i teške metale te ih ugrađuje u svoje plodove. Uzimajući rečeno u obzir, bitnu ulogu u mineralnom sastavu zrna kavovca ima vrsta kavovca te mineralni sastav zemlje koja se razlikuje po tipovima zemlje, geografskoj širini, nadmorskoj visini i količini kiše koja na tom području pada. Ostali faktori koji utječu na mineralni sastav zemlje pa tako i na mineralni sastav plodova kave su onečišćenja zemlje i postupci obrade zemlje uključujući gnojidbu (Pohl i sur., 2012; Olechno i sur., 2021).

Pretpostavlja se da napitak od kave može biti značajan izvor minerala u prehrani osoba koje ju konzumiraju u većim količinama. Bitan utjecaj na koncentraciju minerala u napitku ima način pripreme kave što podrazumijeva vrstu i temperaturu vode, vrijeme i tlak pri kojim se kava kuha, omjer kave i vode, vrsta i porijeklo kavovca, vrijeme prženja zrna kave te stupanj usitnjenja zrna (Olechno i sur., 2021).

Prema Suseela i sur., (2001) elementi koji se u najvećoj mjeri unose konzumacijom kave padajućim redoslijedom su: kalij, magnezij, kalcij, željezo, mangan, bakar, cink, stroncij, nikal, krom, olovo i kadmij. Nadalje, istraživanje prikazuje usporedbu količine elemenata unesenih u organizam putem napitka pripremljenog od 2 g kave sa prosječnim unosom istog elementa kod Indijaca. Rezultati ukazuju da je udio ukupnog dnevnog unosa većine elemenata putem kave manja ili istovjetna 1 %, dok se za krom, željezo i nikal bilježe vrijednosti od 2,9 %, 1,7 % i 3,2 % ukupnog dnevnog unosa.

U studiji od Olechno i sur. (2021) proučavao se unos mikroelemenata putem infuza kava u odnosu na ukupni dnevni unos istog mikroelementa gdje su dobiveni sljedeći rezultati:

- 4,0 % i 3,1 % cinka za žene i muškarce,
- 2,7 % i 2,1 % bakra za žene i muškarce,
- 0,4 % i 0,6 % željeza za žene i muškarce,
- 0,4 % i 0,2 % kroma za žene i muškarce,
- 0,1 % kobalta.

### **1.3.1.1. Cink**

Po količini u ljudskom tijelu cink je drugi najprisutniji esencijalni element u tragovima. Pohranjuje se u prostati, očima, mozgu, kostima, bubrezima i jetri (Bhattacharya i sur., 2016).

U sklopu enzima vrši brojne funkcije u ljudskom organizmu od kojih najznačajniji sudjeluju u procesima rasta organizma, radu imunskog sustava, kognitivnoj funkciji i zdravlju kostiju. Deficit cinka u ljudskom organizmu se očituje sa smanjenim rastom, dermatitisom, alopecijom, smanjenom funkcijom spolnih žlijezda i oslabljenim imunskim sustavom. Preporučeni dnevni unos (engl. Recommended Dietary Allowance, RDA) cinka za odraslu osobu muškog spola iznosi 11 mg dnevno, dok za odraslu osobu ženskog spola iznosi 8 mg dnevno. Uočava se povećana potreba za cinkom kod djece koja ulaze u pubertet, trudnica i dojilja. Intoksikacija cinkom je rijetka zbog dobre homeostatske regulacije unosa i ekskrecije tog minerala (Huang i sur., 2015).

Razlikujemo egzogeni i endogeni cink. Egzogeni cink u organizam ulazi putem vanjskih izvora, primjerice ingestijom hrane, podliježe apsorpciji putem enterocita tankog crijeva te ekskreciji putem fecesa. Endogeni cink je već prethodno prisutan u organizmu te podliježe resorpciji enterocitima tankog crijeva i ekskreciji fecesom, dolazi u lumen crijeva gastroduodenalnim, gušteračnim i žučnim sekretima te transepitelnim efluksom enterocita. Transporteri cinka koji se nalaze na apikalnoj membrani enterocita održavaju homeostazu cinka u organizmu. Porodica transportera SLC39 služi za apsorpciju cinka u enterocite, dok porodica transportera SLC30 služi za ekskreciju cinka u lumen. Pri prekomjernom unosu cinka dolazi do endocitoze apsorpcijskih transportera te se time sprječava prekomjerna apsorpcija, istovremeno efluksni transporteri izlučuju višak cinka u lumen crijeva. Na bazolateralnoj strani enterocita nalaze se

ZNT1 transporteri koji prenose cink iz enterocita u portalnu krv gdje se cink veže za albumin te se kao takav transportira organizmom. Određena količina cinka se također može apsorbirati putem pasivne difuzije kroz čvrste spojeve (engl. Tight junctions) enterocita koja je značajana pri iznimno visokim koncentracijama cinka u lumenu crijeva (Krebs, 2000; Valentine i sur., 2007; Maares i Haase, 2020; Bhattacharya i sur., 2016; Nishito i Kambe, 2018).

Opažena je smanjena apsorpcija i deficit bakra pri dugotrajnoj suplementaciji cinka većom od maksimalnog preporučenog dnevnog unosa (engl. Tolerable Upper Level Intake, UL) koja za odrasle osobe iznosi 40 mg dnevno (Huang i sur., 2015).

### **1.3.1.2. Bakar**

Bakar je po količini prisutnoj u ljudskom organizmu treći najprisutniji element u tragovima. Primarno se pohranjuje u jetri, potom u mozgu, srcu, bubrezima i mišićima (Bhattacharya i sur., 2016).

Bakar ima značajnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima u ljudskom organizmu od kojih su najznačajniji angiogeneza, regulacija genske ekspresije, razvoj mozga, proizvodnja melanina i rad imunskog sustava (ods.od.nih.gov).

Deficit bakra se manifestira preko različitih anemija, neutropenija, trombocitopenija, neurološkog propadanja, osteopenije te propadanja zuba (Gregg i sur., 2002; Moon i sur., 2021; Sierpinska i sur., 2014).

Za odrasle osobe RDA i UL bakra iznose 900 µm, odnosno 10 000 µm dnevno (Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, 2001).

Jednovalentni bakar ( $\text{Cu}^+$ ) se apsorbira putem CTR1 transportera koji se nalaze na apikalnoj membrani enterocita. Pri visokoj koncentraciji u lumenu tankog crijeva dolazi do endocitoze CTR1 transportera dok pri deficitu dolazi do povećane ekspresije gena koji taj protein kodiraju zbog čega posljedično dolazi do povećane apsorpcije bakra. Eksport bakra kroz bazolateralnu membranu enterocita u portalnu krv nije posve razjašnjena, smatra se da transporter ATP7A ima značajnu ulogu u tom procesu. U portalnoj krvi se bakar veže za albumin i alfa2-makroglobulin te se pomoću njih transportira do jetre gdje se veže za ceruloplazmin koji je najznačajniji tjelesni transporter bakra. Pretpostavlja se da je 90 % bakra u krvlju vezano upravo za ceruloplazmin (Nishito i Kambe, 2018; Bhattacharya i sur., 2016).

Prilikom unosa visokih doza mangana, željeza i kositra opaža se kompetitivna inhibicija apsorpcijskih mehanizama bakra (Burkhead i Collins, 2021).

### 1.3.1.3. Željezo

Željezo je najprisutniji element u tragovima u ljudskom organizmu koji se u najvećoj mjeri nalazi u krvi, potom u jetri, koštanoj srži i mišićima (Bhattacharya i sur., 2016).

Željezo ima razne fiziološke uloge u ljudskom organizmu od kojih je najznačajniji prijenos kisika krvlju organizmom u sklopu hemoglobina (Fernández-Lázaro i sur., 2020).

Deficit željeza je jedan od najčešćih uzroka anemije, deficit se također povezuje sa sindromom nemirnih nogu (DeLoughery, 2017). Djeca, premenopauzalne žene, osobe slabijeg imovinskog stanja te osobe koje ne konzumiraju crveno meso su skupine najsklonije deficitu željeza (Pasricha i sur., 2021; West i Oates, 2008).

RDA za osobe muškog spola i postmenopauzalne žene iznosi 8 mg dnevno, dok za premenopauzalne žene iznosi 18 mg dnevno. UL iznosi 45 mg dnevno (Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, 2001).

Kod apsorpcije željeza razlikujemo hemsko željezo, koje nalazimo u prehrani animalnog porijekla i ionsko željezo, koje nalazimo u hrani biljnog porijekla. Divalentno ionsko željezo (fero-oblik) se apsorbira putem DMT1 transportera koji se nalaze na apikalnoj membrani enterocita (Nishito i Kambe, 2018). Apsorpciji trovalentnog željeza (feri-oblik) prethodi redukcija u fero-oblik gdje sudjeluju reducenski u želudcu i lumenu crijeva kao što su askorbatna kiselina, enzimi željezo reduktaza i Dcytb. U enterocitima se željezo veže za protein apoferritin koji zajedno tvore ferritin. Ferritin može ostati pohranjen u enterocitima ili ući u krvotok putem efluksnog sustava na bazolateralnoj membrani enterocita nazvan feroportin (Ems i sur., 2022). Ulaskom u krvotok ferritin se veže za transferitin te se kao takav prenosi u hepatocite gdje se željezo pohranjuje u obliku ferritina (Anderson i Shah, 2013).

Hemsko željezo, koje se nalazi u sklopu hemoglobina i mioglobina, pokazuje bolju bioraspoloživost od ionskog željeza. Pretpostavljeni mehanizmi apsorpcije henskog željeza putem enterocita jesu receptorom potpomognuta endocitoza i direktna apsorpcija hema u citoplazmu putem PCFT/HPC1 transportera. Receptorom potpomognutom endocitozom dolazi do apsorpcije hema u enterocite putem endosoma. U endosomu se hem razgrađuje na ionsko

željezo i biliverdin putem enzima HO-2. Ionsko željezo se iz vezikule transportira u citosol putem DMT1 transportera koji dalje slijedi mehanizme apsorpcije za ionsko željezo u enterocitima. Drugim pretpostavljenim mehanizmom apsorpcije henskog željeza dolazi do direktne apsorpcije hema u citosol enterocita pomoću PCFT/HPC1 transportera nakon čega se putem FLVCR transportera, koji su smješteni na bazolateralnoj membrani enterocita, prenosi iz enterocita u cirkulaciju gdje se veže za hemopeksin te se kao takav transportira do hepatocita (West i Oates, 2008).

Željezo nema mehanizam ekskrecije već se reciklira i zadržava u ljudskom tijelu (Abbaspour i sur., 2014).

Homeostaza koncentracije željeza se održava putem transportera enterocita i hormonom hepcidinom. Pri povećanoj fiziološka potražnja za željezom dolazi do povećane apsorpcije, analogno tomu, kada je fiziološka potražnja za željezom zadovoljena, apsorpcija željeza je smanjena (Bhattacharya i sur., 2016). Takva regulacija statusa željeza u organizmu je omogućena putem peptidnog hormona hepcidina. Pri povećanoj koncentraciji željeza u organizmu dolazi do povećane sinteze hepcidina u jetri. Hepcidin se veže za ferroportin na bazolateralnoj membrani enterocita što uzrokuje internalizaciju i degranulaciju ferroportina te se posljedično smanjuje prekomjerni ulazak željeza u krvotok (Ganz, 2016; Ems i sur., 2022).

Pokazano je da prekomjerne količine cinka i mangana interferiraju s apsorpcijom željeza (Rossander-Hultén i sur., 1991).

#### **1.3.1.4. Mangan**

Mangan je esencijalni element u tragovima koji se u najvećoj mjeri nalazi u kostima, jetri, gušterači, bubrezima i mozgu (ods.od.nih.gov).

Neki od fizioloških uloga u kojima sudjeluje mangan su regulacija razine šećera u krvi, proizvodnja energije u stanicama, probava, rad imunskog sustava, rast kostiju i koagulacija krvi. Mangan je esencijalan za rad određenih skupina enzima kao što su oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Preko tih enzima sudjeluje u metabolizmu aminokiselina, kolesterola, glukoze, ugljikohidrata i hvatanju reaktivnih kisikovih radikala (Aschner i Erikson, 2017; Aschner JL i Aschner M, 2005; ods.od.nih.gov).

RDA mangana za odrasle osobe iznosi 2 mg dnevno dok za djecu iznosi 1,5 mg dnevno. Deficit se očituje kao stagnacija rasta i problematičan razvoj kostiju kod djece, slabija tolerancija na glukozu te za organizam nepovoljne promjene u metabolizmu lipida i ugljikohidrata (Aschner i Erikson, 2017).

Apsorpcijski mehanizam mangana nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavljeni mehanizmi su pasivna difuzija i aktivni transport u tankom crijevu. Bioraspoloživost mangana je mala, istraživanja ukazuju da organski mangan ima bolju bioraspoloživost od anorganskog (Hardwick i sur., 1990; Ji i sur., 2006).

Pokazano je da mangan koristi transportere drugih minerala prilikom apsorpcije iz lumena crijeva u enterocite kao što su porodice transportera ZIP i ZNT za cink te transporter za dvovalentne katione DMT1. Nedavna istraživanja ukazuju da su za aktivni transport mangana u većoj mjeri zaslužni transporteri SLC30A10, SLC39A8 i SLC39A14 koji također imaju ulogu u apsorpciji željeza. Pasivna difuzija kroz čvrste spojeve enterocita je značajna kada je mangan prisutan u visokim koncentracijama u lumenu crijeva (Fujishiro i Kambe, 2022; Au i sur., 2008; Liu i sur., 2021; ods.od.nih.gov).

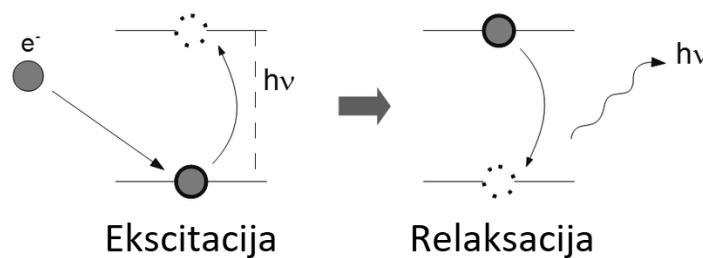
Nakon apsorpcije u enterocite mangan se izlučuje u portalnu krv putem koje se prenosi u jetru. Također je moguć i povratni mehanizam prilikom ekskrecije mangana gdje dolazi do apsorpcije iz krvi natrag u enterocite preko kojih se izlučuje u lumen crijeva. Mangan se iz jetre izlučuje u žuč putem koje podliježe resorpciji u tankom crijevu i ekskreciji putem fecesa. Navedeni mehanizmi ekskrecije su iznimno bitni u održavanju homeostaze mangana (Winslow i sur., 2020).

Uzimajući u obzir da mangan u velikoj mjeri dijeli transportere s drugim mineralima, prisutnost oba elementa u lumenu crijeva uzrokuje uzajamnu kompetitivnu inhibiciju mehanizama apsorpcije koja je najuočljivija sa željezom i cinkom. Nadalje, željezo, cink i fosfor smanjuju vrijeme zadržavanja mangana u crijevima čime se smanjuje njegova bioraspoloživost (Rossander-Hultén i sur., 1991; Davis i sur., 1992; Nebert i sur., 2012; lpi.oregonstate.edu).

## 1.4. Atomska Apsorpcijska Spektrometrija (AAS)

### 1.4.1. Princip metode

Atomska apsorpcijska spektrometrija je instrumentalna analitička tehnika kojom se određuje količina pojedinog elementa u uzorku. Temelji se na principu da slobodni atomi i ioni imaju sposobnost apsorpcije energije zračenja određene valne duljine (ultraljubičastog ili vidljivog dijela spektra elektromagnetskog zračenja). Obasjavajući atom zračenjem specifične valne duljine dolazi do apsorpcije energije od strane atoma čiji elektroni prelaze iz temeljnog u pobuđeno stanje (ekscitacija) prilikom čega se bilježi smanjenje intenziteta zračenja u odnosu na izvor (Zettner, 1964).



Slika 2. Shematski prikaz ekscitacije i relaksacije elektrona posredovana energijom vrijednosti  $h\nu$  (preuzeto i prilagođeno prema Tomas-Garcia i sur., 2012)

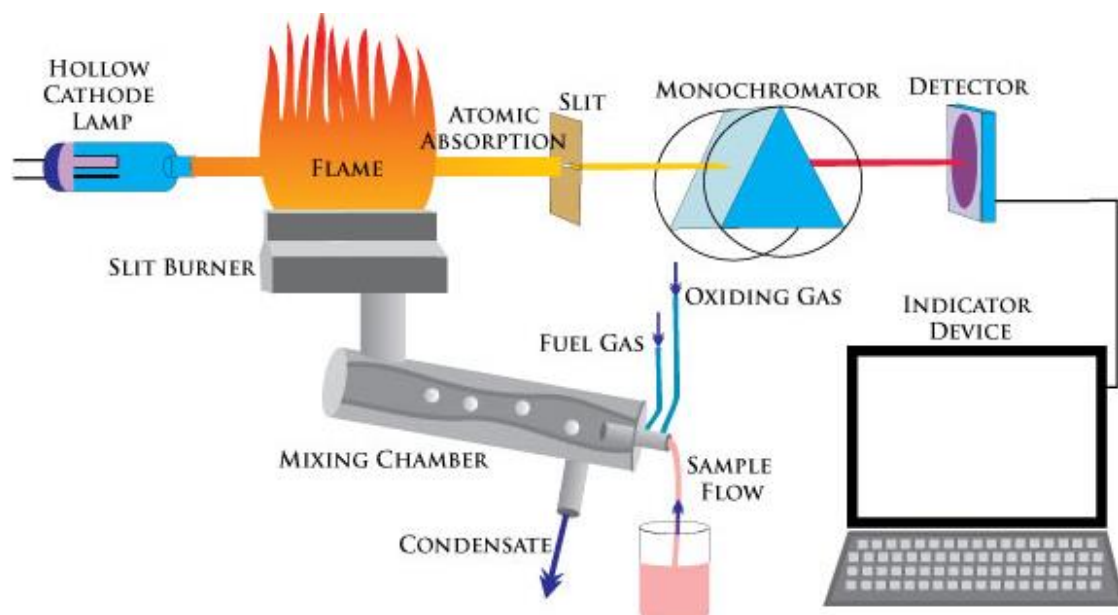
Količina atoma u uzorku izravno je proporcionalna količini apsorbiranog zračenja odnosno smanjenju intenziteta zračenja izvora. Tu zakonitost opisuje Beer Lambertov zakon koji tvrdi da je količina apsorbiranog zračenja izravno proporcionalna količini ekscitiranih atoma u uzorku (Welz i Sperling, 1999).

Beer Lambertov zakon se iskazuje kao  $A = \epsilon cl$ , odnosno dovodi u linearnu proporcionalnu vezu smanjenje intenziteta zračenja koje je prošlo kroz uzorak (Apsorbancija,  $A$ , logaritam omjera intenziteta upadnog i propuštenog zračenja kroz uzorak) sa koncentracijom elementa u otopini ( $c$ , [mol/L]) preko molarog apsorpcijskog koeficijenta ( $\epsilon$ , [L/mol\*cm], fizikalna veličina koja opisuje sposobnost apsorpcije elektromagnetskog zračenja pojedinog elementa) i duljine puta koju je svjetlost prešla kroz uzorak ( $l$ , [cm]) (Watson, 1999).



To saznanje je iznimno bitno za razumijevanje principa rada plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra koji kao izvor zračenja koristi žarulju sa šupljom katodom obloženom elementom od interesa. Uzastopnim ekscitacijama i relaksacijama atoma šuplje katode stvara se izvor zračenja uskog spektra valnih duljina koja pogoduje apsorpciji (ekscitaciji) istovjetnih elementa u uzorku.

### 1.4.2. Dijelovi plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra



Slika 3. Shematski prikaz dijelova plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra (preuzeto sa [www.chemistry.stackexchange.com](http://www.chemistry.stackexchange.com))

Dijelovi plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra koji su vidljivi na Slici 3 su sljedeći:

1. Žarulja sa šupljom katodom
  - Linijski izvor zračenja
2. Generator atomske pare (nebulizator)
  - Raspršuje smjesu uzorka, goriva i oksidansa u plamen. Sagorijevanjem uzorka dolazi do atomizacije elemenata prisutnih u uzorku.

### 3. Deuterijski korektor (monokromator)

- Smanjuje utjecaj interferirajućeg zračenja iz plamena.

### 4. Fotodetektor

- optoelektronički uređaj koji prevodi elektromagnetsko zračenje u električni signal (Hui, 2020).

### 5. Računalo

- Instrument koji pohranjuje i preračunava apsorpciju u koncentraciju elementa u uzorku.

## **1.4.2.1 Žarulja sa šupljom katodom**

Kod plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra izvor zračenja je žarulja sa šupljom katodom koja je obložena elementom od interesa. Radom žarulje emitira se elektromagnetsko zračenje uskog spektra valnih duljina koji nastaje uzastopnim ekscitacijama i relaksacijama atoma elementa kojima je obložena. Takav izvor zračenja se naziva linijski izvor zračenja te pogoduje ekscitaciji istovjetnih atoma elementa u uzorku (Welz i Sperling, 1999).

Žarulja sa šupljom katodom je ujedno i ograničavajući čimbenik plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra jer za analizu elementa od interesa analitičar mora posjedovati odgovarajuću žarulju sa šupljom katodom.

## **1.4.2.2. Deuterijski korektor**

Deuterijski korektor smanjuje utjecaj interferirajućeg (pozadinskog) zračenja iz plamena na rezultate mjerenja. Ekscitirani deuterij proizvodi kontinuirani elektromagnetski spektar zračenja u rasponu od 190 nm do 330 nm. U tom rasponu utjecaj interferirajućeg zračenja je najznačajnija jer u njemu većina elemenata proizvodi apsorpcijske i emisijske spektre. Signal deuterijske lampe se oduzima signalu kojeg proizvodi analit te se time korigira interferirajuće zračenje (Welz i Sperling 1999).

## 1.5. Obrada uzorka

Analizi elemenata na plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometru prethodi obrada uzoraka. Izdvajaju se tri načina obrade uzorka:

- Suha digestija (engl. Dry ashing),
- Mokra digestija (engl. Wet digestion),
- Mikrovalna digestija (engl. Microwave digestion) (Korn i sur., 2008).

Mokra digestija je metoda korištena u sklopu ovoga rada te je pobliže objašnjena u odlomku 3.2.1.

### 1.5.1. Suha digestija

Metodom suhe digestije se organska matica razara pomoću termalne energije. Najčešće se 0,1 g do 1 g uzorka stavlja u mufolnu peć kojom se zagrijava na 450 °C do 550 °C (ili više) pri atmosferskom tlaku tijekom nekoliko sati (4 h do 16 h). Pozitivan aspekt metode je u tome što ne zahtjeva uporabu kemijskih reagensa, dok je negativan aspekt dugotrajnost zbog koje nije pogodna za analizu velikog broja uzoraka (Korn i sur., 2008).

### 1.5.2. Mikrovalna digestija

Mikrovalnom digestijom dolazi do razaranja organske matice prilikom zagrijavanja smjese uzorka i dušične kiseline ili mješavine dušične i klorovodične kiseline, kao pomoćno sredstvo se može koristiti hidrogen peroksid. Razlikujemo mikrovalnu digestiju otvorenog i zatvorenog tipa. Kod mikrovalne digestije zatvorenog tipa dovoljno je zagrijavanje smjese na 200 °C tijekom 5 min do 15 min. Pozitivni aspekti ove metode su skraćeno vrijeme digestije, smanjena potrošnja kiselina kao reagensa te veća točnost i preciznost u odnosu na ostale digestijske metode. Kod mikrovalne digestije zatvorenog tipa glavni je nedostatak mogućnost eksplozije uređaja prilikom razvijanja visokog tlaka tijekom digestije (Korn i sur., 2008; Parente, 2020; [www.lab-training.com](http://www.lab-training.com)).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Analiza elemenata u hranidbenim proizvodima je značajna za procjenu kvalitete i toksičnosti samog proizvoda. Uzimajući u obzir opširnost i količinu konzumacije kave u svijetu javlja se potreba za brzom i točnom metodom analize elemenata prisutnih u kavi.

Glavni cilj ovog diplomskog rada je ispitati kvantitativni sastav željeza, bakra, cinka i mangana u prikupljenim komercijalno dostupnim uzorcima kava koji se razlikuju po svom sastavu primjenom atomske apsorpcijske spektrometrije.

Specifični cilj istraživanja je primjena univarijantne i multivarijantne statističke analize, metode glavnih komponenata (principal component analysis, PCA) i klaster analize na dobivene rezultate te ih usporediti kako bi se utvrdila moguća povezanost između elementnog sastava kod različitih uzoraka kave.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

- 65 % HNO<sub>3</sub> (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- 70 % HClO<sub>4</sub> (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- Standard Cu 1000 mg/L (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard Fe 1000 mg/L (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard Mn 1000 mg/L (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Standard Zn 1000 mg/L (PerkinElmer, Shelton, SAD)
- Ultračista voda (provodljivost 0,055 μScm<sup>-1</sup>, dobivena pomoću Milli-Q sustava, Milipore, Bradford, USA)

Sve korištene kemikalije su *pro analysi* čistoće.

##### 3.1.2. Aparatura

- Thermolyne Cimarec 2 grijača ploča sa magnetskom miješalicom (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa, SAD).
- Analitička vaga (AB204-S, Mettler Toledo, Švicarska)

Za atomsku apsorpcijsku spektrometriju korišten je plameni atomski apsorpcijski spektrometar Aanalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektorom nespecifične površine prema parametrima:

- Žarulja sa šupljom katodom (15mA)
- Valna duljina (nm) za pojedini metal:
  - Bakar- 324,8
  - Cink- 213,9
  - Mangan- 279,5
  - Željezo- 248,3
- Gorivo / oksidans: acetilen / zrak
- Acetilen (tlak (Pa) /protok (dm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>): 0,9x105/2

- Zrak (tlak (Pa) /protok ( $\text{dm}^3\text{min}^{-1}$ ):  $5,5 \times 10^5 / 17$
- Širina pukotine (nm): 0,7
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Fotodetektor
- Računalo: Dell OptiPlex GX270, AA Winlab 32 Software
- Printer: HP 5652



Slika 4. Plameni atomski apsorpcijski spektrometar u laboratoriju Zavoda za Analitičku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

### 3.1.3. Laboratorijski pribor

- Odmjerne tikvice od 25,00 mL, 50,00 mL i 100,00 mL
- Staklena čaša od 150 mL

- Mikropipete od 10 - 100  $\mu\text{L}$  (PhysioCare), 100 - 1000  $\mu\text{L}$  (Physiocare) i 500 - 5000  $\mu\text{L}$  (Sartorius, Biohit)
- Eppendorfove bočice od 15 mL i 50 mL
- Stalak za eppendorfove bočice
- Lijevak
- Plastična šprica od 15 mL
- Membranski politetrafluoroetilenski (PTFE) filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Fisherbrand, Göteborg, Švedska)
- Tarionik s pistilom
- Magneti za magnetsku miješalicu
- Satna stakalca
- Menzure od 10 mL i 50 mL

### 3.1.4. Uzorci

Prikupljeni su uzorci (n=19) različitih komercijalno dostupnih kava u prodavaonicama Republike Hrvatske tijekom prosinca 2021. godine.

Svi prikupljeni uzorci razlikuju se prema svom sastavu te su prema tome podijeljeni u sljedeće skupine:

- pet kava sa dodatkom šećera i mlijeka (dalje u tekstu „3u1“)
  - uzorci 1, 2, 3, 4, 12.
- jedna kava u kombinaciji sa mlijekom (dalje u tekstu „kava s mlijekom“)
  - uzorak 19.
- jedna kava sa dodatkom proteina (dalje u tekstu „kava s proteinima“)
  - uzorak 9.
- jedna u obliku granulirane kave kod koje nakon otapanja u vrućoj vodi ne zaostaje talog (dalje u tekstu „kava bez taloga“)
  - uzorak 17.
- jedanaest klasičnih kava kod kojih nakon pripravljanja zaostaje talog (dalje u tekstu „turska kava“)
  - uzorci 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18.

Svi prikupljeni uzorci mogu se u osnovi podijeliti u dvije glavne skupine:

- kava s dodacima, u kojoj spadaju podskupine 3u1, kava s mlijekom i kava s proteinima,
- uzorci čiste kave, u kojoj spadaju podskupine turska kava i kava bez taloga.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Razgradnja organske matice metodom mokre digestije

#### 3.2.1.1. Princip metode

Princip mokre digestije temelji se na razgradnji interferirajućeg organskog sadržaja uzorka putem kiseline ili smjese kiselina pri povišenoj temperaturi u otvorenoj posudi prilikom čega anorganski sadržaj ostaje nerazgrađen (Korn i sur., 2008).

#### 3.2.1.2. Postupak obrade uzorka i priprema otopina za analizu

Izvaže se 2 g uzorka (Tablica 1), prenese u staklenu čašu u koju se doda magnet za miješanje, 10 mL 65 %  $\text{HNO}_3$  i 15 mL 70 %  $\text{HClO}_4$ . Čaša se prekrije satnim stakalcem i stavlja na grijaču ploču s magnetskom miješalicom koja se nalazi u digestoru. Uzorak se zagrijava na 80 °C dok se otopina razbistri (60 min do 120 min).



Slika 5. Mokra digestija uzoraka u digestoru



Dobivena otopina kvantitativno se prenese u odmjernu tikvici od 100 mL te nadopuni s ultračistom vodom do oznake. Ovako pripremljena otopina se neposredno prije analize na plamenom apsorpcijskom spektrometru filtrira kroz filtar veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonile čestice koje bi mogle zaostati i ometati rad uređaja. Filtrati se pohranjuju u označenim eppendorfovima od 15 mL (Slika 6).

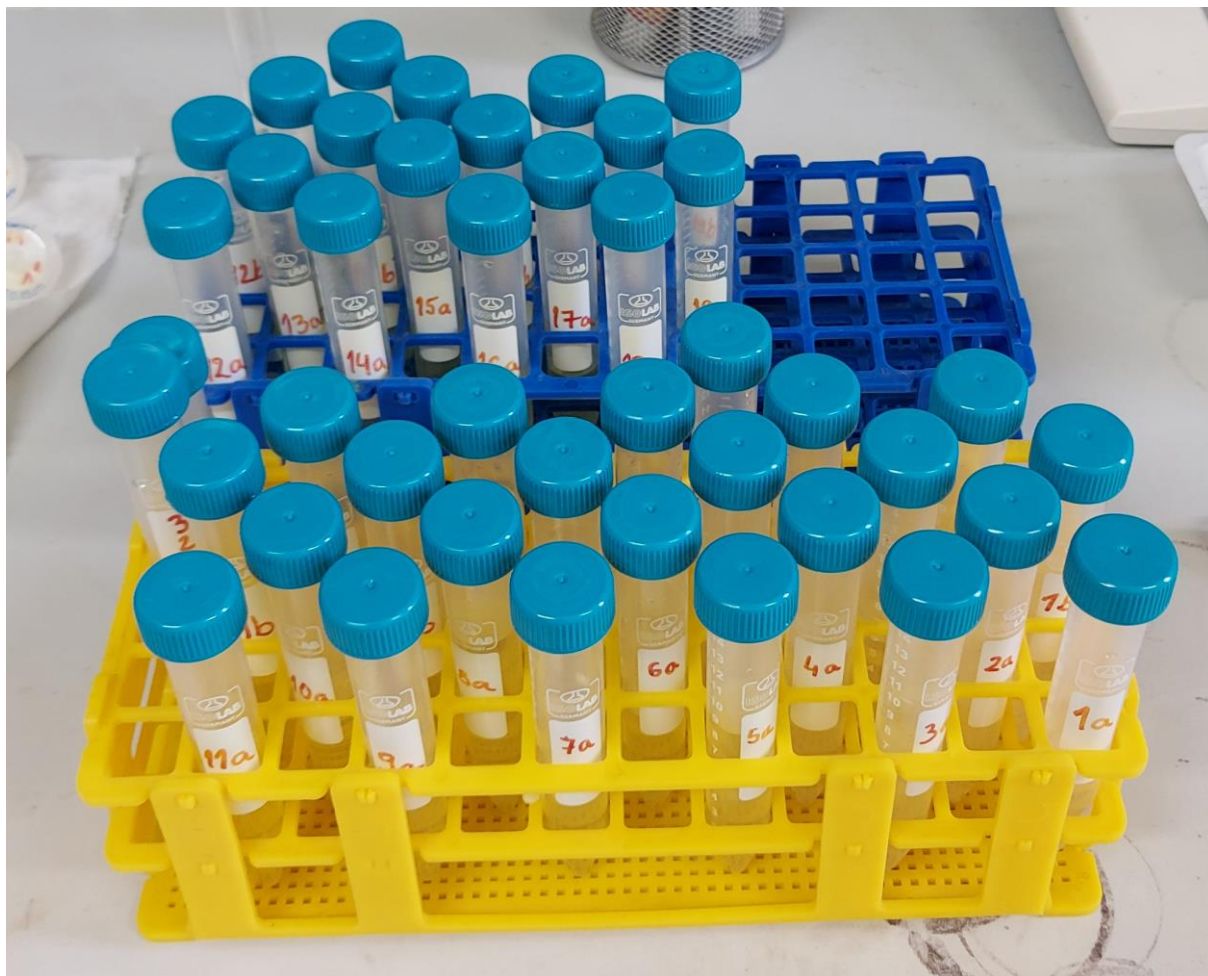
Za ispiranje plamenog atomizatora pripravljena je 2% otopina  $\text{HNO}_3$  na sljedeći način:

- 30 mL 65 %  $\text{HNO}_3$  se razrijedi s ultračistom vodom do 1000 mL u odmjernoj tikvici.

Kao slijepa proba korištena je ultračista voda.

Radi potrebe za mijenjanjem šuplje katode prilikom mjerenja svakog sljedećeg elementa, elementi su analizirani u svakom uzorku pojedinačno u slijedu.

Uzorci su pripremljeni u duplikatu te su kao takvi označeni kao spoj numeričkog i alfabetskog broja.



Slika 6. Uzorci spremni za analizu na plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometru

Tablica 1. Odvage uzoraka kave prije mokre digestije

| <b>Vrsta kave</b> | <b>Broj uzoraka</b> | <b>Oznaka uzorka</b> | <b>Odvaga (g)</b> | <b>Oznaka uzorka</b> | <b>Odvaga (g)</b> |
|-------------------|---------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| 3u1               | 1                   | 1a                   | 2,0044            | 1b                   | 2,0016            |
| 3u1               | 2                   | 2a                   | 2,0024            | 2b                   | 2,0085            |
| 3u1               | 3                   | 3a                   | 1,9974            | 3b                   | 1,9984            |
| 3u1               | 4                   | 4a                   | 2,0040            | 4b                   | 2,0045            |
| Turska kava       | 5                   | 5a                   | 2,0042            | 5b                   | 2,0035            |
| Turska kava       | 6                   | 6a                   | 2,0031            | 6b                   | 1,9993            |
| Turska kava       | 7                   | 7a                   | 2,0063            | 7b                   | 2,0017            |
| Turska kava       | 8                   | 8a                   | 2,0097            | 8b                   | 2,0072            |
| Kava s mlijekom   | 9                   | 9a                   | 2,0026            | 9b                   | 1,9985            |
| Turska kava       | 10                  | 10a                  | 1,9995            | 10b                  | 2,0022            |
| Turska kava       | 11                  | 11a                  | 2,0058            | 11b                  | 2,0040            |
| 3u1               | 12                  | 12a                  | 2,0030            | 12b                  | 2,0049            |
| Turska kava       | 13                  | 13a                  | 1,9993            | 13b                  | 2,0018            |
| Turska kava       | 14                  | 14a                  | 1,9916            | 14b                  | 2,0021            |
| Turska kava       | 15                  | 15a                  | 2,0007            | 15b                  | 2,0056            |
| Turska kava       | 16                  | 16a                  | 1,9999            | 16b                  | 2,0019            |
| Kava bez taloga   | 17                  | 17a                  | 2,0021            | 17b                  | 2,0037            |
| Turska kava       | 18                  | 18a                  | 2,0010            | 18b                  | 2,0050            |
| Kava s proteinima | 19                  | 19a                  | 2,0022            | 19b                  | 2,0028            |

## 3.2.2. Određivanje koncentracija metala pomoću plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra

### 3.2.2.1. Princip metode

Princip metode mjerenja koncentracije metala u uzorku pomoću plamenog atomskog apsorpcijskog spektrometra bazira se na saznanju da svaki metal apsorbira zračenje određene valne duljine. Smanjenje intenziteta zračenja izvora izravno je proporcionalno količini atoma pojedinog elementa u uzorku. Pomoću te spoznaje se kvantificira količina traženog elementa u uzorku.

### 3.2.2.2. Priprema standardnih otopina

Za rad na atomskom apsorpcijskom spektrometru neophodna je kalibracija uređaja pomoću baždarnog pravca koja stavlja u omjer odgovor uređaja sa koncentracijama standardnih otopina.

Za svaki analizirani element pripravljene su standardne otopine na jedan od dva načina:

- Razrjeđivanjem komercijalno dostupnog standard za AAS koncentracije 1000 mg/L,
- Razrjeđivanjem matične standardne otopine koncentracije 100 mg/L koja je pripravljena razrjeđivanjem 5 mL standarda koncentracije 1000 mg/L ultračistom vodom u odmjerne tikvici od 50 mL.

Način pripreme i koncentracije standardnih otopina željeza i mangana su istovjetne te su iz tog razloga prikazane u jednoj tablici (Tablica 2), kao i standardne otopine cinka i bakra (Tablica 3).

Tablica 2. Koncentracija i priprema standardnih otopina željeza/mangana

| Koncentracija standardne otopine željeza/mangana (mg/L) | Način pripreme standardne otopine                                                                 |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2                                                       | 0,5 mL matične otopine od 100 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerne tikvici od 25 mL  |
| 5                                                       | 1,25 mL matične otopine od 100 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerne tikvici od 25 mL |

|    |                                                                                                         |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 | 2,5 mL standardne otopine od 1000 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL  |
| 15 | 3,75 mL standardne otopine od 1000 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL |
| 20 | 5 mL standardne otopine od 1000 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL    |

Tablica 3. Koncentracija i priprema standardnih otopina cinka/bakra

| Koncentracija standarda cinka/bakra (mg/L) | Priprema standarda                                                                                   |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,1                                        | 0,025 mL matične otopine od 100 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL |
| 0,5                                        | 0,125 mL matične otopine od 100 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL |
| 1                                          | 0,25 mL matične otopine od 100 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL  |
| 2,5                                        | 0,625 mL matične otopine od 100 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL |
| 5                                          | 1,25 mL matične otopine od 100 mg/L razrijedi se sa ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 25 mL  |

### 3.2.3. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je program Microsoft Excell 2016 programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i PrismGraphPad 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Svi uzorci su pripremljeni u duplikatu te mjereni tri puta. Dobiveni rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) kako bi se opisala tendencija i varijacija podataka. U prvom koraku statističke analize, Kolmogorov-Smirnov test primijenjen je za ispitivanje tipa distribucije svih analiziranih uzoraka. Pearsonov koeficijent korelacije primijenjen je za određivanje odnosa između proučavanih parametara kao funkcije dobivenih koncentracija ( $p \leq 0,0001$ ). Za univarijantnu i multivarijantnu analizu (PCA i klaster analiza) korišten je programski paket XLStat (XLStat Software, New York, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Prikaz rezultata mjerenja**

Mjerenju koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima kave na plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometru prethodila je validacija metode koja je opisana u diplomskom radu “Usporedba atomske apsorpcijske spektrometrije i energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije za određivanje sadržaja odabranih metala u uzorcima kave” (Nikolina Hajduk, 2022).

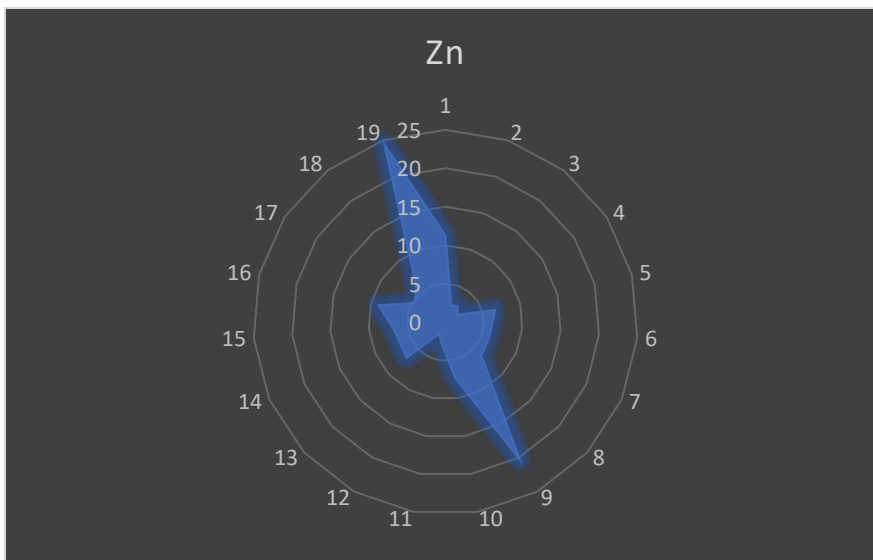
Dobivene koncentracije ispitivanih elemenata prikazane su u Tablici 4 kao i grafički na Slikama 7 do 10.

Rezultati dobiveni za bakar u uzorcima 2a, 2b i 3a su odbačeni jer im je vrijednost manja od granice dokazivanja (engl. Limit Of Detection, LOD) (Hajduk, 2022). Kao krajnja koncentracija za uzorak 3 u Tablici 4 korištena je izračunata vrijednost bakra (mg/L) u uzorku 3b, dok vrijednost bakra za uzorak 2 u potpunosti izostaje.

Tablica 4. Koncentracija elemenata u uzorcima kave izražena kao srednja vrijednost koncentracija izmjerenih u duplikatima sa standardnom devijacijom izražene u mg/L

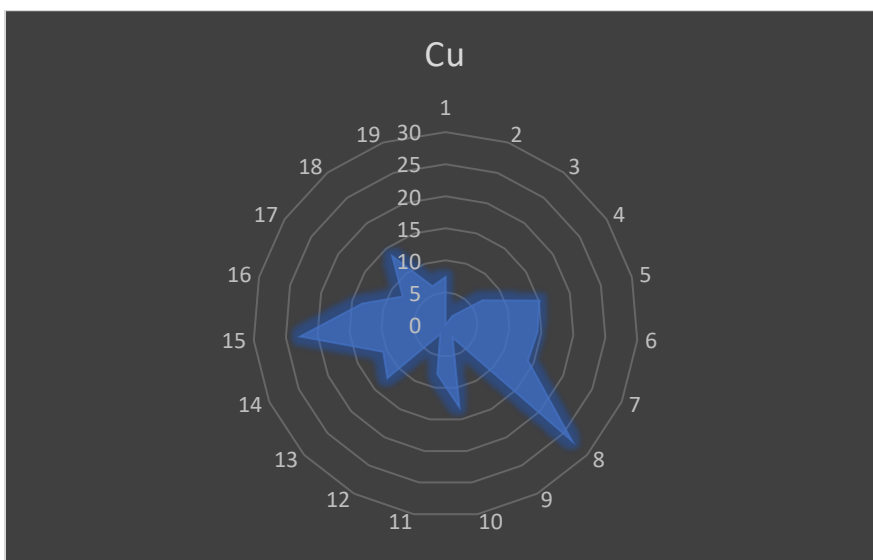
| <b>UZORAK</b> | <b>Zn<br/>Srednja<br/>vrijednost ± SD<br/>(mg/L)</b> | <b>Cu<br/>Srednja<br/>vrijednost ± SD<br/>(mg/L)</b> | <b>Mn<br/>Srednja<br/>vrijednost ± SD<br/>(mg/L)</b> | <b>Fe<br/>Srednja<br/>vrijednost ± SD<br/>(mg/L)</b> |
|---------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>1</b>      | 11,258 ± 0,377                                       | 7,414 ± 0,169                                        | 5,067 ± 0,111                                        | 62,383 ± 2,286                                       |
| <b>2</b>      | 2,394 ± 0,499                                        | <LOD                                                 | 1,670 ± 0,243                                        | 22,188 ± 1,645                                       |
| <b>3</b>      | 2,628 ± 0,176                                        | 1,701                                                | 1,301 ± 0,141                                        | 11,687 ± 0,881                                       |
| <b>4</b>      | 1,821 ± 0,106                                        | 6,860 ± 0,316                                        | 1,547 ± 0,070                                        | 81,028 ± 2,032                                       |
| <b>5</b>      | 6,687 ± 0,069                                        | 15,121 ± 0,286                                       | 22,557 ± 3,252                                       | 128,852 ± 4,055                                      |
| <b>6</b>      | 6,046 ± 0,204                                        | 14,416 ± 0,087                                       | 23,636 ± 0,173                                       | 47,396 ± 0,678                                       |
| <b>7</b>      | 6,038 ± 0,080                                        | 14,022 ± 0,517                                       | 25,674 ± 0,218                                       | 65,572 ± 3,917                                       |
| <b>8</b>      | 6,348 ± 0,111                                        | 26,837 ± 0,869                                       | 30,694 ± 2,261                                       | 156,991 ± 9,433                                      |
| <b>9</b>      | 20,469 ± 0,077                                       | 2,349 ± 0,003                                        | 3,599 ± 0,147                                        | 18,697 ± 2,854                                       |
| <b>10</b>     | 7,322 ± 0,806                                        | 13,094 ± 0,083                                       | 27,288 ± 0,045                                       | 47,331 ± 2,731                                       |
| <b>11</b>     | 2,918 ± 0,108                                        | 7,881 ± 1,416                                        | 12,146 ± 2,089                                       | 37,482 ± 2,904                                       |
| <b>12</b>     | 1,772 ± 0,036                                        | 1,722 ± 0,034                                        | 3,743 ± 0,073                                        | 9,956 ± 0,959                                        |
| <b>13</b>     | 6,898 ± 0,913                                        | 12,322 ± 1,036                                       | 28,067 ± 1,636                                       | 63,259 ± 3,696                                       |
| <b>14</b>     | 6,536 ± 0,131                                        | 10,617 ± 0,110                                       | 21,534 ± 0,080                                       | 71,968 ± 10,816                                      |
| <b>15</b>     | 6,964 ± 0,047                                        | 22,738 ± 1,408                                       | 35,294 ± 0,080                                       | 291,602 ± 13,495                                     |
| <b>16</b>     | 9,046 ± 0,643                                        | 13,394 ± 0,009                                       | 45,230 ± 0,103                                       | 44,131 ± 1,727                                       |
| <b>17</b>     | 4,668 ± 0,033                                        | 7,989 ± 0,781                                        | 27,161 ± 0,510                                       | 87,026 ± 6,121                                       |
| <b>18</b>     | 6,340 ± 0,273                                        | 13,531 ± 1,219                                       | 30,428 ± 1,334                                       | 66,500 ± 0,165                                       |
| <b>19</b>     | 24,619 ± 0,076                                       | 6,317 ± 0,952                                        | 15,780 ± 0,562                                       | 137,802 ± 3,890                                      |

LOD- granica dokazivanja; SD- standardna devijacija



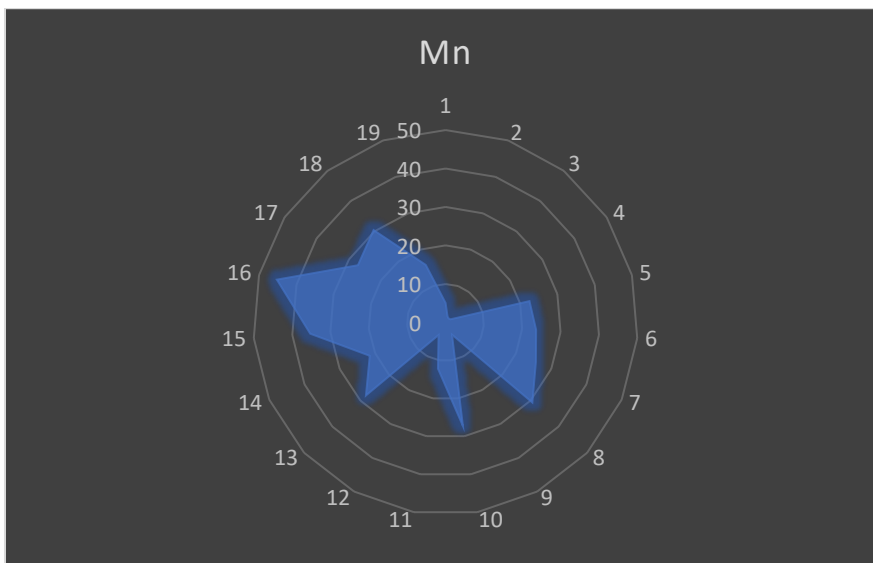
Slika 7. Grafički prikaz koncentracija cinka (mg/L) po uzorcima (n=19)

Koncentracija cinka u uzorcima se kretala u rasponu od 1,772 mg/L (uzorak 12) do 24,619 mg/L (uzorak 19). Uz uzorak 19, relativno visoka koncentracija cinka izmjerena je u uzorku 9 koja iznosi 20,469 mg/L (Slika 7). Uzorci 9 i 19 spadaju u skupinu kave s dodacima odnosno kava s proteinima i kava s mlijekom. Uz uzorak 12, uočljivo niske koncentracije cinka se pronalaze u uzorcima 2, 3 i 11 koje redom iznose 2,394 mg/L, 2,628 mg/L i 2,918 mg/L gdje uzorci 2, 3 i 12 spadaju u skupinu 3u1, a uzorak 11 u skupinu turska kava (Slika 7).



Slika 8. Grafički prikaz koncentracija bakra (mg/L) po uzorcima (n=18)

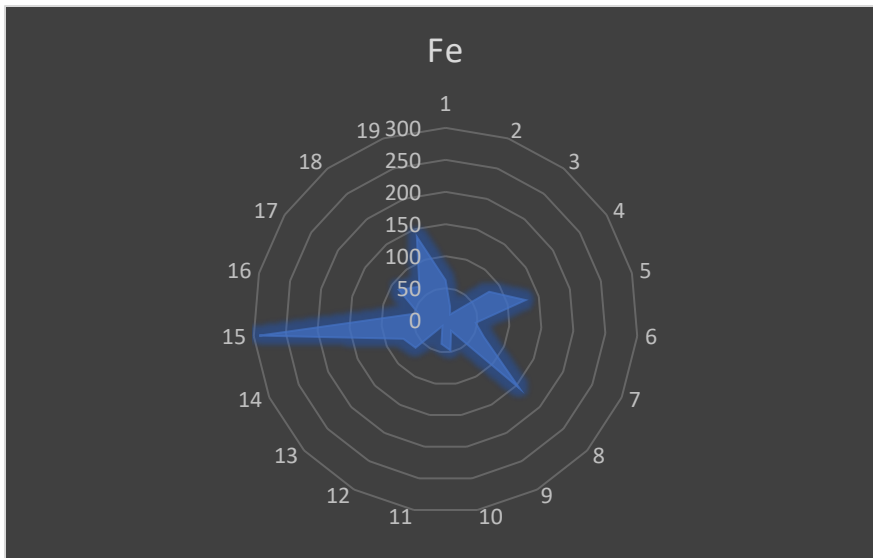
Izmjerene vrijednosti bakra bile su u intervalu od 1,701 mg/L (uzorak 3) do 26,837 mg/L (uzorak 8). Uz uzorak 8 veća koncentracija bakra određena je i u uzorku 15 koja iznosi 22,738 mg/L (Slika 8). Oba ova uzorka pripadaju skupini turska kava. Gledajući najniže koncentracije bakra, uz uzorak 3, se izdvajaju uzorci 9 i 12 sa relativno niskim koncentracijama od 2,394 mg/L i 1,722 mg/L koje spadaju u skupinu kave s dodacima odnosno uzorci 3 i 12 spadaju u skupinu 3u1 dok uzorak 9 spada u skupinu kave s proteinima.



Slika 9. Grafički prikaz koncentracija mangana (mg/L) po uzorcima (n=19)

Relativno niske koncentracije mangana dobivene su u uzorcima 2, 3, 4, 9 i 12 gdje su izmjerene koncentracije niže od 10 mg/L od kojih je najniža koncentracija izmjerena u uzorku 3 koja je iznosila 1,301 mg/L. Svi navedeni uzorci spadaju u skupinu kave s dodacima, odnosno uzorci 2,3, 4 i 12 spadaju u skupinu 3u1 dok uzorak 9 spada u skupinu kava s proteinima. Najviša koncentracija je izmjerena u turskoj kavi uzorka 16 koja je iznosila 45,230 mg/L, uz nju se mogu izdvojiti uzorci 8, 15 i 18 u kojima su izmjerene koncentracije veće od 30 mg/L koje također spadaju u skupinu turska kava (Slika 9).





Slika 10. Grafički prikaz koncentracija željeza (mg/L) po uzorcima (n=19)

Relativno visoke koncentracije željeza su dobivene kod uzoraka 5, 8, 15 i 19 u kojima su izmjerene vrijednosti više od 120 mg/L od kojih je najviša vrijednost izmjerena u uzorku 15 (291,602 mg/L). Uzorci 5, 8 i 15 spadaju u skupinu turska kava dok uzorak 19 spada u skupinu kava s mlijekom. Najniža vrijednost je izmjerena u uzorku 12 koja je iznosila 9,956 mg/L. Koncentracije niže od 30 mg/L su izmjerene još u uzorcima 2, 3, 9 i 12 od kojih svi spadaju u skupinu kave s dodacima, odnosno uzorci 2, 3 i 12 spadaju u skupinu 3u1 dok uzorak 9 spada u skupinu kava s proteinima (Slika 10).

## 4.2. Kemometrijska obrada podataka

Dobivene vrijednosti ispitivanih elemenata u ovom istraživanju pokazale su veliku varijaciju kod različitih vrsta kava. Kako bi se dobio što bolji uvid u sadržaj određivanih elemenata kod ispitivanih uzoraka kave dobiveni podaci podvrgnuti su kemometrijskim metodama analize.

### 4.2.1. Univarijantna analiza

Univarijantna karakterizacija je provedena kako bi se provjerio tip distribucije. Skup podataka ispitan je na prirodu distribucije pomoću Shapiro-Wilk's testa s razinom značajnosti  $p \leq 0,0001$  (Shapiro i Wilk, 1965). Statistička obrada rezultata pokazala je da ne postoji odstupanje od normalne distribucije za sve dobivene koncentracije elemenata te su nadalje korištene dobivene vrijednosti bez logaritamske transformacije. Grubbsov test se primijenio radi otkrivanja eventualno dobivenih sumnjivih vrijednosti koje se nadalje mogu odbaciti ili ne (engl. Outliers,  $\alpha = 0,05$ ;  $n = 19$ ). Dobiveni rezultati pokazali su jednu sumnjivu vrijednost u slučaju cinka (24,619 mg/L) i jednu u slučaju željeza (291,602 mg/L). Obje vrijednosti su bile više u odnosu na ostale. U daljnim postupcima multivarijantne obrade podataka ove dvije vrijednosti su izostavljene kako bi se spriječio eventualno negativan učinak na kemometrijsku analizu.

Nadalje, primjenjena je korelacijska analiza (engl. Pearson's correlations) između elemenata sa stupnjem značajnosti od 95 %.

Pearsonova korelacijska matrica procjenjuje međusobnu povezanost varijabli. Povezanost se izražava putem korelacijskog koeficijenta koji se kreće u intervalu od -1 do 1. Značajne korelacije između elemenata ukazuju na isti izvor elemenata. Rezultati korelacijskih koeficijenata prikazani su u Tablici 5. Dobiveni rezultati ukazuju da Cu-Mn (0,761), Cu-Fe (0,627) te Mn-Fe (0,393) pokazuju najveću pozitivnu korelaciju. Ostale varijable nisu pokazale značajnu korelaciju. Što je vrijednost koeficijenta korelacije bliži 1, postoji veća povezanost između varijabli. Kod ovog ispitivanja veće vrijednosti koeficijenta korelacije upućuju na pretpostavku o sličnom porijeklu elemenata u ispitivanim uzorcima.

Tablica 5. Korelacijska matrica ispitivanih elemenata.

| Varijable | Zn     | Cu           | Mn           | Fe |
|-----------|--------|--------------|--------------|----|
| Zn        | 1      |              |              |    |
| Cu        | -0,030 | 1            |              |    |
| Mn        | 0,098  | <b>0,761</b> | 1            |    |
| Fe        | -0,037 | <b>0,627</b> | <b>0,393</b> | 1  |

## 4.2.2. Multivarijantna analiza

Multivarijantna analiza je statistička metoda obrade podataka koja prilikom analize uzima u obzir međusobnu povezanost varijabli. Svrha analize je identifikacija obrasca ponašanja u distribuciji podataka te njihovo grupiranje u homogene skupine čime se olakšava interpretacija velikog broja podataka. Dobivene koncentracije elemenata korištene su kao kemijski deskriptori. Analiza glavnih komponentata i klaster analiza korišteni su za utvrđivanje odnosa između ispitivanih elemenata i različitih vrsta kava.

### 4.2.2.1 Analiza glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata (engl. Principal component analysis, PCA) je statistički postupak kojim se smanjuje dimenzionalnost velikog skupa podataka zadržavajući pritom većinu informacija. Glavni cilj PCA je pojednostavljenje i klasifikacija ispitivanih varijabli odnosno podataka na način da se olakša uočavanje korelacije između varijabli. Prilikom analize se iz skupine podataka identificiraju faktori od iznimne važnosti koji su povezani s ispitivanim varijablama te se putem faktora objašnjava ukupna varijabilnost dobivenih podataka.

PCA je proveden na svim uzorcima kava uključujući i varijable kako bi se utvrdio utjecaj različite vrste kava na elementarni profil. Ukupni skup podataka sastojao se od 19 redova koji predstavljaju uzorke kave (uzorci kave proučavani u svakoj kategoriji promatrani su kao vektori) i 4 stupca kao kemijski deskriptori (koncentracije ispitivanih elemenata) te je na taj način stvorena matrica podataka. PCA omogućuje vizualizaciju informacija skupa podataka u nekoliko glavnih komponenti (F) čuvajući maksimum moguće varijabilnosti unutar ovog skupa.

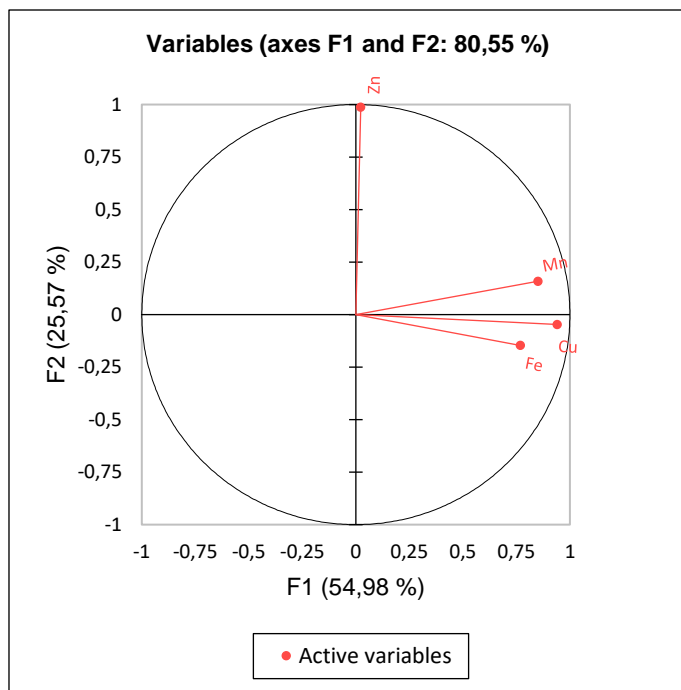
Tablica 6. Faktorska analiza korelacijske matrice

|                                  | <b>F1</b> | <b>F2</b> | <b>F3</b> | <b>F4</b> |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Vrijednost faktora</b>        | 2,199     | 1,023     | 0,600     | 0,178     |
| <b>Varijanca(%)</b>              | 54,982    | 25,569    | 15,007    | 4,443     |
| <b>Kumulativna varijanca (%)</b> | 54,982    | 80,550    | 95,557    | 100,000   |

Uzimajući u obzir Kaiserove kriterije, tri glavne komponente bile su odabrane, što je objasnilo 95,557 % ukupne varijance, gdje je prva komponenta (F1) doprinijela 54,982 % ukupne varijance, druga komponenta (F2) pridonijela je 25,569 % ukupne varijance, a treća komponenta (F3) pridonijela je 15,007 % ukupne varijance. Dobivene vrijednosti i varijanca objašnjene svakom komponentom prikazane su u Tablici 6.

Najznačajnija komponenta (F1) pokazuje snažnu povezanost s vrijednostima bakra, mangana i željeza u pozitivnom području F1 što objašnjava udio od 54,982 % ukupne varijabilnosti (0,940; 0,850 i 0,769). Kod druge komponente (F2) cink pokazuje visok pozitivni utjecaj (0,987) dok ostale varijable imaju relativno nizak koeficijent što objašnjava niži postotak varijabilnosti u odnosu na prvu PCA komponentu. Treća i četvrta PCA komponenta (F3 i F4) pokazuju najslabiji utjecaj na ukupnu varijabilnost uslijed niskih koeficijenata pojedinih elemenata.

Grafika opterećenja povezana je s varijablama i ukazuje na sličnosti i korelacije između elemenata. Ekstrahirana korelacijska matrica i odgovarajući dijagram opterećenja, kao vizualizacija varijabli na dvofaktorskoj ravni (F1 vs F2) prikazana je na Slici 11. Iz dobivenih vrijednosti koeficijenata korelacije između faktora i varijabli iz korelacijske matrice, mogu se razlikovati dvije skupine elemenata. Dakle, blizak odnos nalazi se između koncentracija (a) bakra i mangana, (b) bakra i željeza, i nešto slabiji odnos između (c) mangana i željeza. Osim toga, određena su dva značajna čimbenika povezana s izvorom elemenata u ispitivanim uzorcima kave. Prvi faktor određen je pozitivnim vrijednostima za sve elemente, pokazujući visoko pozitivno opterećenje za bakar, mangan i željezo (0,940; 0,850 i 0,769). Cink (0,987) ima značajno pozitivna opterećenja za drugi faktor. Treći faktor sastoji se od pozitivnog opterećenja za željezo (0,609) te mangan (-0,441) s negativnim opterećenjem (Tablica 7). Općenito, pozitivna opterećenja pokazuju da elementi dolaze iz istog izvora dok negativna opterećenja pokazuju da dolaze iz različitih izvora.

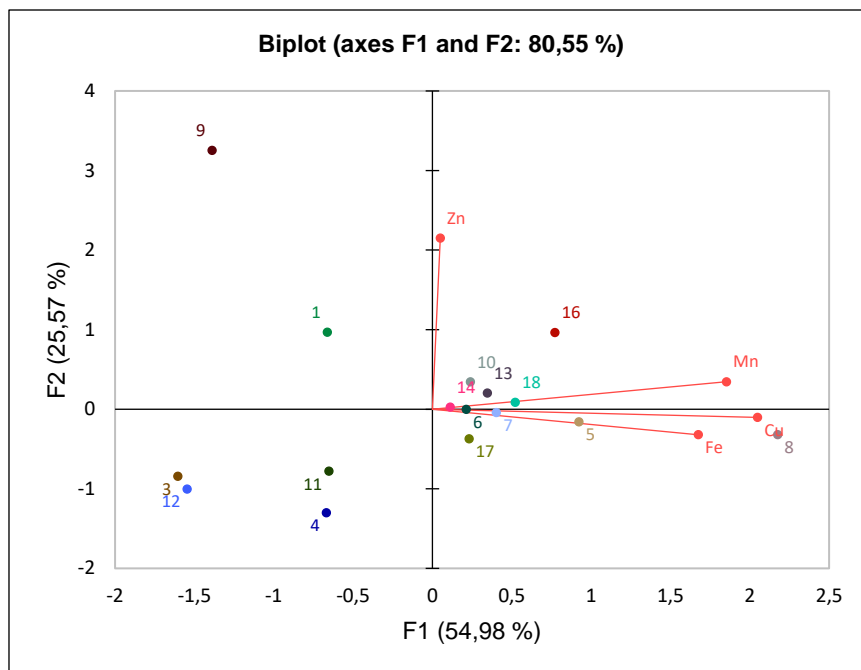


Slika 11. PCA dijagram podataka o elementima u uzorcima kave.

Tablica 7. Korelacija između varijabli i faktora

|           | <b>F1</b> | <b>F2</b> | <b>F3</b> | <b>F4</b> |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Zn</b> | 0,023     | 0,987     | 0,157     | 0,035     |
| <b>Cu</b> | 0,940     | -0,047    | -0,103    | 0,321     |
| <b>Mn</b> | 0,850     | 0,159     | -0,441    | -0,239    |
| <b>Fe</b> | 0,769     | -0,147    | 0,609     | -0,128    |

PCA rezultat (Slika 12) za sve ispitivane uzorke kave pokazuje projekciju slučajeva u funkciji vrste kave u koordinativnom sustavu definiran glavnim faktorima 1 i 2, kako bi se utvrdilo koji elementi najbolje karakteriziraju vrstu kave. Na grafu se vidi podjela uzoraka kave u dvije skupine. Na F1, u pozitivnom dijelu (na desnoj strani grafikona) nalaze se čisti uzorci kava bez dodataka i odijeljeni su od uzoraka kava s različitim dodacima (na lijevoj strani grafikona). Može se reći da je F1 povezan s vrstom kave. Elementi kao što su bakar, mangan i željezo pokazuju jaku pozitivnu korelaciju s F1. Model temeljen na značajnim komponentama izveden iz izvornog skupa podataka prema sadržaju elemenata u ispitivanim uzorcima kava dao je prilično zadovoljavajuće razdvajanje u slučaju uzoraka čiste kave i uzoraka kave s različitim dodacima. U budućim istraživanjima potrebno je uključiti svakako veći broj uzoraka kave.

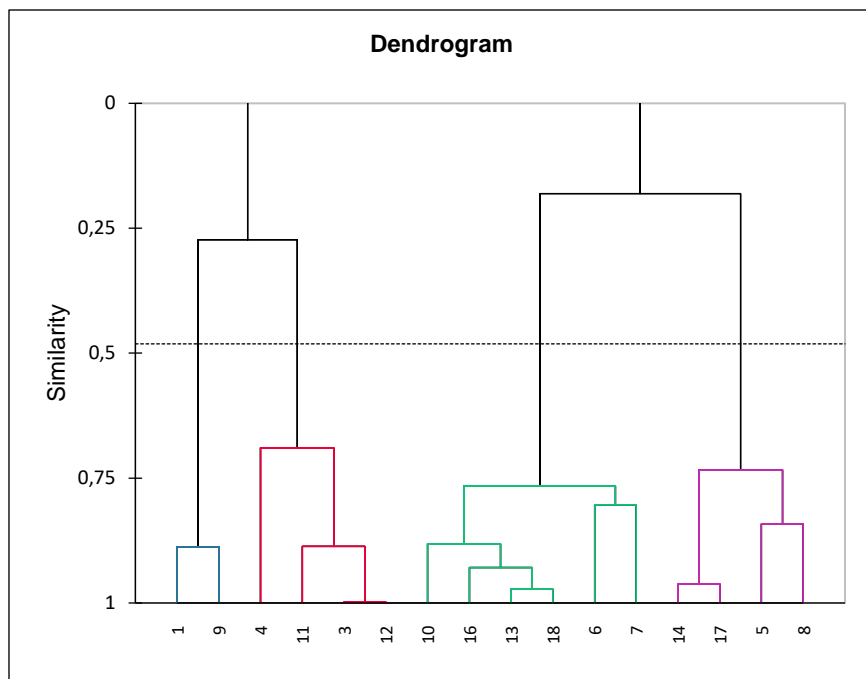


Slika 12. Rezultati uzoraka kave definirani s dvije glavne komponente

#### 4.2.2.2. Klaster analiza

Klaster analiza (engl. Agglomerative Hierarchical Clustering, AHC) je statistička metoda u kojoj se podaci grupiraju u odnosu na njihovu sličnost ili različitost. Produkt analize je dendrogram u kojem se uočava grananje uzoraka u skupine i podskupine (engl. clusters) zavisno o detektiranoj sličnosti između skupina.

Klaster analiza je primijenjena za svrstavanje uzoraka kave u različite klase na osnovu sadržaja ispitivanih metala. Uzorci kava grupirani su u klastere prema njihovoj sličnosti. Klaster analiza primijenjena je na standardiziranim podacima, euklidska udaljenost korištena je za izračun sličnosti uzoraka, a Wardov hijerarhijski aglomerativni postupak korišten je za formiranje klastera. Dobiveni rezultati prikazani su kao dendrogram (Slika 13). Multivarijantna klaster analiza je pokazala svrstavanje uzoraka kave u 4 glavne skupine (klaster) prema njihovom elementnom sastavu. Prvi klaster se sastoji od 2 uzorka kave s dodatcima dok drugi klaster čine 2 podgrupe od kojih svaka sadrži uzorke kave s dodatcima osim jednog izuzetka (11). Treći i četvrti klaster također imaju svaki po 2 podskupine u koje su svrstani uzorci čiste kave. Prema gore navedenom opažanju može se zaključiti da se ispitivane varijable mogu koristiti za razlikovanje vrste kave u smislu čiste kave ili kave s dodatcima.



Slika 13. Dendrogram dobiven hijerarhijskom klaster analizom na temelju euklidske udaljenosti između uzoraka za elemente određene pomoću AAS tehnike za 4 varijable i 19 uzoraka kave. Za kratice uzoraka, pogledati Tablicu 1.

## 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada je pomoću plamene atomske apsorpcijske spektrometrije određen sadržaj cinka, bakra, željeza i mangana u devetnaest različitih uzoraka kave komercijalno dostupnih na području Republike Hrvatske.

Prisutna je značajna varijacija sadržaja elemenata u ovisnosti o ispitivanom uzorku kave. Granične vrijednosti za cink su iznosile 1,772 mg/L (uzorak 12) i 20,469 mg/L (uzorak 9). Vrijednosti bakra su se kretale u intervalu od 1,701 mg/L (uzorak 3) do 26,837 mg/L (uzorak 8). Najniža vrijednost mangana je iznosila 1,301 mg/L (uzorak 3), dok je najviša vrijednost iznosila 45,230 mg/L (uzorak 16). Koncentracije željeza su se kretale u intervalu od 9,956 mg/L (uzorak 12) do 156,991 mg/L (uzorak 8).

Odabrani elementi korišteni su za karakterizaciju ispitivanih uzoraka koji se razlikuju po svom sastavu. Univarijantna analiza pokazala je da se bakar, mangan i željezo mogu smatrati elementima koji prave najveću razliku između ispitivanih uzoraka. PCA i AHC pokazale su moguću korelaciju između ispitivanih elemenata te su pokazali da korištene varijable imaju dovoljnu snagu za grupiranje ispitivanih uzoraka prema svom sastavu. Unatoč potrebi za analizom puno većeg broja uzoraka, dobiveni rezultati pokazali su da elementni sastav može biti vrlo dobar pokazatelj sastava kave te se može koristiti kao kriterij za razlikovanje uzoraka kave.



## 6. LITERATURA

Abbaspour, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*, 2014, 19(2), 164–174.

Acheson, K.J., Zahorska-Markiewicz, B., Pittet, P., Anantharaman, K. and Jéquier, E. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *Am J Clin Nutr*, 1980, 33(5), 989–997.

Analytical chemistry - Why should AAS use element lamps?, 2019., <https://chemistry.stackexchange.com>, pristupljeno 17.01.2022.

Anderson, E.R., Shah, Y.M. Iron Homeostasis in the Liver. *Compr*, 2013, 315-330.

Andrade Korn, M. das G., da Boa Morte, E.S., Batista dos Santos, D.C.M., Castro, J.T., Barbosa, J.T.P., Teixeira, A.P., Fernandes, A.P., Welz, B., dos Santos, W.P.C., Nunes dos Santos, E.B.G., Korn, M. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. *Appl Spectrosc Rev*, 2008, 43(2), 67–92.

Aschner, J.L., Aschner, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med*, 2005, 26(4-5), 353–362.

Aschner, M., Erikson, K. Manganese. *Adv Nutr*, 2017, 8(3), 520–521.

Au, C., Benedetto, A., Aschner, M. Manganese transport in eukaryotes: The role of DMT1. *NeuroToxicology*, 2008, 29(4), 569–576.

Benefits of Microwave Digestion over Open Acid Digestions, 2014., <https://lab-training.com>, pristupljeno 15.05.2022.

Bhattacharya, P., Misra, S., Hussain, M. Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review. *Scientifica*, 2016, 1-12.

Burkhead, J.L., Collins, J.F. Nutrition Information Brief—Copper. *Adv Nutr*, 2021, 13(2), 681–683.

Butt, M.S., Sultan, M.T. Coffee and its Consumption: Benefits and Risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2011, 51(4), 363–373.

Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., Aromatario, M. Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(1), 71–88.

Davis, C.D., Wolf, T.L., Greger, J.L. Varying Levels of Manganese and Iron Affect Absorption and Gut Endogenous Losses of Manganese by Rats. *J Nutr*, 1992, 122(6), 1300–1308.

DeLoughery, T.G. Iron Deficiency Anemia. *Med Clin North Am*, 2017, 101(2), 319–332.

Ems T, St Lucia K, Huecker MR. Biochemistry, Iron Absorption. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2022.

Eskelinen, M.H., Kivipelto, M. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*, 2010, 20(s1), s167-s174.

Fernández-Lázaro, D., Mielgo-Ayuso, J., Córdova Martínez, A., Seco-Calvo, J. Iron and Physical Activity: Bioavailability Enhancers, Properties of Black Pepper (Bioperine®) and Potential Applications. *Nutrients*, 2020, 12(6), 1886.

Fujishiro, H., Kambe, T. Manganese transport in mammals by zinc transporter family proteins, ZNT and ZIP. *J Pharmacol*, 2022, 148(1), 125–133.

Ganz, T. Heparin. *Rinsho Ketsueki*, 2016, 57(10), 1913–1917.

Godos, J., Pluchinotta, F.R., Marventano, S., Buscemi, S., Li Volti, G., Galvano, F., Grosso, G. Coffee components and cardiovascular risk: beneficial and detrimental effects. *Int J Food Sci Nutr*, 2014, 65(8), 925–936.

Gregg, X.T. Copper deficiency masquerading as myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2002, 100(4), 1493–1495.

Grembecka, M., Malinowska, E., Szefer, P. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Sci Total Environ*, 2007, 383(1-3), 59–69.

Grosso, G., Micek, A., Godos, J., Pajak, A., Sciacca, S., Bes-Rastrollo, M., Galvano, F., Martinez-Gonzalez, M.A. Long-Term Coffee Consumption Is Associated with Decreased Incidence of New-Onset Hypertension: A Dose–Response Meta-Analysis. *Nutrients*, 2017, 9(8), 890.

Hajduk, N., Usporedba atomske apsorpcijske spektrometrije i energetski disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije za određivanje sadržaja odabranih metala u uzorcima kave, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2022.

Hardwick, L.L., Jones, M.R., Brautbar, N., Lee, D.B. Site and mechanism of intestinal magnesium absorption. *Miner Electrolyte Metab*, 1990, 16(2-3), 174–180.

Higdon, J.V., Frei, B. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006, 46(2), 101–123.

Huang, L., Drake, V.J., Ho, E. Zinc. *Adv Nutr*, 2015, 6(2), 224–226.

Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC), National Academies Press (US), 2001, str. 224, 290.

Jee, S.H., He, J., Appel, L.J., Whelton, P.K., Suh, I., Klag, M.J. Coffee Consumption and Serum Lipids: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Am J Epidemiol*, 2001, 153(4), 353–362.

Ji, F., Luo, X.G., Lu, L., Liu, B., Yu, S.X. Effect of manganese source on manganese absorption by the intestine of broilers. *Poult*, 2006, 85(11), 1947–1952.

Krebs, N. Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract. *J Nutr*, 2000, 130(5), 1374S-1377S.

Kujawska, A., Kujawski, S., Hajec, W., Skierkowska, N., Kwiatkowska, M., Husejko, J., Newton, J.L., Simoes, J.A., Zalewski, P., Kędziora-Kornatowska, K. Coffee Consumption and Blood Pressure: Results of the Second Wave of the Cognition of Older People, Education, Recreational Activities, Nutrition, Comorbidities, and Functional Capacity Studies (COPERNICUS). *Nutrients*, 2021, 13(10), 3372.

Linus Pauling Institute. Manganese, 2019, <https://lpi.oregonstate.edu>, pristupljeno 11.04.2022.

Liu, Q., Barker, S., Knutson, M.D. Iron and manganese transport in mammalian systems. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868(1), 118890.

Maares, M., Haase, H. A Guide to Human Zinc Absorption: General Overview and Recent Advances of In Vitro Intestinal Models. *Nutrients*, 2020, 12(3), 762.

Moon, N., Aryan, M., Westerveld, D., Nathoo, S., Glover, S., Kamel, A.Y. Clinical Manifestations of Copper Deficiency: A Case Report and Review of the Literature. *Nutr Clin Pract*, 2021, 36(5), 1080–1085.

Morris, A.L., Mohiuddin, S.S. Biochemistry, Nutrients. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2020.

National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements – Copper, 2017., <https://ods.od.nih.gov>, pristupljeno 09.04.2022.

National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements – Manganese, 2017., <https://ods.od.nih.gov>, pristupljeno 11.04.2022.

Nebert, D.W., Gálvez-Peralta, M., Hay, E.B., Li, H., Johansson, E., Yin, C., Wang, B., He, L., Soleimani, M. ZIP14 and ZIP8 zinc/bicarbonate symporters in *Xenopus oocytes*: characterization of metal uptake and inhibition. *Metallomics*, 2012, 4(11), 1218–1225.

Nishito, Y., Kambe, T. Absorption Mechanisms of Iron, Copper, and Zinc: An Overview. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2018, 64(1), 1–7.

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

Parente, E. Elemental and inorganic impurities. *Specification of Drug Substances and Products*, 2020, 367–392.

Pasricha, S., Tye-Din, J., Muckenthaler, M., Swinkels, D. Iron deficiency. *Lancet*, 2021, 397(10270), 233-248.

Pohl, P., Stelmach, E., Welna, M., Szymczycha-Madeja, A. Determination of the Elemental Composition of Coffee Using Instrumental Methods. *Food Anal*, 2012, 6(2), 598–613.

Poole, R., Kennedy, O.J., Roderick, P., Fallowfield, J.A., Hayes, P.C., Parkes, J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ*, 2017, 359, j5024.

Ritchie, K., Carriere, I., de Mendonca, A., Portet, F., Dartigues, J.F., Rouaud, O., Barberger-Gateau, P., Ancelin, M.L. The neuroprotective effects of caffeine: A prospective population study (the Three City Study). *Neurology*, 2007, 69(6), 536–545.

Rongqing Hui, Introduction to Fiber-Optic Communications, Chapter 4 - Photodetectors, urednici, Rongqing Hui, Academic Press, 2020, str. 125-154.

Rossander-Hultén, L., Brune, M., Sandström, B., Lönnerdal, B., Hallberg, L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am J Clin Nutr*, 1991, 54(1), 152–156.

Santos, R.M.M., Lima, D.R.A. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. *Eur J Nutr*, 2016, 55(4), 1345–1358.

Shapiro, S.S., Wilk, M.B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 1965, 52, 591-611.

Sierpinska, T., Konstantynowicz, J., Orywal, K., Golebiewska, M., Szmitkowski, M. Copper deficit as a potential pathogenic factor of reduced bone mineral density and severe tooth wear. *Osteoporos Int*, 2014, 25(2), 447–454.

Socąła, K., Szopa, A., Serefko, A., Poleszak, E., Właż, P. Neuroprotective Effects of Coffee Bioactive Compounds: A Review. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1).

Suseela, B., Bhalke, S., Vinod Kumar, A. Daily intake of trace metals through coffee consumption in India. *Food Addit Contam*, 2001, 18(2), 115–120.

Tomas-Garcia, Antonio & Li, Qingfeng & Bjerrum, Niels. Transition metal carbides as electrode materials for high-temperature PEM systems. 3rd CARISMA International Conference on Medium and High Temperature Proton Exchange Membrane Fuel Cells, Copenhagen, 2012, 32.

Valentine, R.A., Jackson, K.A., Christie, G.R., Mathers, J.C., Taylor, P.M., Ford, D. ZnT5 Variant B Is a Bidirectional Zinc Transporter and Mediates Zinc Uptake in Human Intestinal Caco-2 Cells. *J Biol Chem*, 2007, 282(19), 14389–14393.

Vaughan, R.A., Garcia-Smith, R., Bisoffi, M., Trujillo, K.A., Conn, C.A. Effects of Caffeine on Metabolism and Mitochondria Biogenesis in Rhabdomyosarcoma Cells Compared with 2,4-Dinitrophenol. *Nutr Metab Insights*, 2012, 5, 59-70.

Watson, D.G. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 79.

Welz B., Sperling M. Atomic Absorption Spectrometry. Weinheim, Wiley-VCH, 1999, str. 89-92, 103-110, 121-122.

West, A.R., Oates, P.S. Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(26), 4101.

Winslow, J.W.W., Limesand, K.H., Zhao, N. The Functions of ZIP8, ZIP14, and ZnT10 in the Regulation of Systemic Manganese Homeostasis. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9), 3304.

Zettner, A. Principles and Applications of Atomic Absorption Spectroscopy. *Adv Clin Chem*, 1964, 7, 1–62.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Kava je jedan od najpopularnijih napitaka na svijetu. Pretpostavlja se da može biti značajan izvor mikrominerala kod osoba čija je konzumacija u većim količinama.

U sklopu ovog rada određen je sadržaj cinka, bakra, mangana i željeza u devetnaest različitih uzoraka kave pomoću FAAS, čijoj je analizi prethodila obrada uzoraka putem mokre digestije. Uzorci su podijeljeni u dvije osnovne skupine: kava s dodacima, koja se sastoji od sedam uzoraka i čista kava, koja se sastoji od dvanaest uzoraka.

Specifični cilj istraživanja bio je utvrditi moguću povezanost elementarnog sastava uzoraka kava s tipom kave putem kemometrijske obrade podataka koja je uključivala univarijantnu i multivarijantnu analizu. Univarijantna analiza pokazala je da se bakar, mangan i željezo mogu smatrati elementima koji prave najveću razliku među ispitivanim uzorcima. PCA analiza provedena je na svim uzorcima kave uključujući i varijable (analizirani elementi), gdje je grafika opterećenja pokazala blizak odnos između bakra i mangana, bakra i željeza, mangana i željeza te su određena dva značajna čimbenika povezana s izvorom elemenata u ispitivanim uzorcima kave. Klaster analiza primijenjena je za svrstavanje uzoraka u skupine na osnovu sličnosti elementarnog sastava. Dobiveni dendrogram pokazuje svrstavanje uzoraka kave u 4 glavne skupine gdje uzorci unutar iste skupine pokazuju sličnost po tipu kave s jednim izuzetkom. Uočena je dobra korelacija elementarnog sastava s tipom kave te istraživanje ukazuje na to da se ispitivane varijable mogu koristiti za razlikovanje vrste kave u smislu čiste kave i kave s dodacima.

Coffee is one of the most popular beverages in the world. It is believed that coffee can be a significant source of microminerals in people who consume it in larger quantities.

For the present work, samples were prepared by wet ashing and the composition of zinc, copper, manganese and iron in nineteen different coffee samples were quantified using FAAS. The samples were divided into two main groups according to their nature: Coffee with additives, comprising seven samples, and pure coffee, comprising twelve samples.

The specific objective of this work was to determine the possible relationship between the elemental composition of the samples and the coffee variety using chemometrics, which consisted of univariate and multivariate analysis. The univariate analysis showed that copper, manganese and iron accounted for the greatest difference between the samples. PCA analysis was performed for all samples, including the variables (of the elements analyzed), which showed a close association between copper and manganese, copper and iron, and manganese and iron; two main factors were identified and linked to the element source in the samples analyzed. Cluster analysis was performed to divide the samples into groups based on similarity of elemental composition, resulting in a division into four main clusters. In each cluster, the samples show good similarity between coffee types, leading to the conclusion that the analyzed variables can be used to distinguish coffee types, especially pure coffee and coffee with additives.

**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

### Primjena plamene atomske apsorpcijske spektrometrije i kemometrijske analize za klasifikaciju uzoraka kave na osnovu sadržaja cinka, bakra, mangana i željeza

Iva Henčel

#### SAŽETAK

Kava je jedan od najpopularnijih napitaka na svijetu. Pretpostavlja se da može biti značajan izvor mikrominerala kod osoba čija je konzumacija u većim količinama.

U sklopu ovog rada određen je sadržaj cinka, bakra, mangana i željeza u devetnaest različitih uzoraka kave pomoću FAAS, čijoj je analizi prethodila obrada uzoraka putem mokre digestije. Uzorci su podijeljeni u dvije osnovne skupine: kava s dodacima, koja se sastoji od sedam uzoraka i čista kava, koja se sastoji od dvanaest uzoraka.

Specifični cilj istraživanja bio je utvrditi moguću povezanost elementarnog sastava uzoraka kava s tipom kave putem kemometrijske obrade podataka koja je uključivala univarijantnu i multivarijantnu analizu. Univarijantna analiza pokazala je da se bakar, mangan i željezo mogu smatrati elementima koji prave najveću razliku među ispitivanim uzorcima. PCA analiza provedena je na svim uzorcima kave uključujući i varijable (analizirani elementi), gdje je grafika opterećenja pokazala blizak odnos između bakra i mangana, bakra i željeza, mangana i željeza te su određena dva značajna čimbenika povezana s izvorom elemenata u ispitivanim uzorcima kave. Klaster analiza primijenjena je za svrstavanje uzoraka u skupine na osnovu sličnosti elementarnog sastava. Dobiveni dendrogram pokazuje svrstavanje uzoraka kave u 4 glavne skupine gdje uzorci unutar iste skupine pokazuju sličnost po tipu kave s jednim izuzetkom. Uočena je dobra korelacija elementarnog sastava s tipom kave te istraživanje ukazuje na to da se ispitivane varijable mogu koristiti za razlikovanje vrste kave u smislu čiste kave i kave s dodacima.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 13 grafičkih prikaza, 7 tablica i 63 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Cink, bakar, mangan, željezo, plamena atomska apsorpcijska spektrometrija, kava

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: rujan 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

### Application of flame atomic absorption spectrometry and chemometric analysis to classify coffee samples based on their zinc, copper, manganese and iron content

Iva Henčel

#### SUMMARY

Coffee is one of the most popular beverages in the world. It is believed that coffee can be a significant source of microminerals in people who consume it in larger quantities.

For the present work, samples were prepared by wet ashing and the composition of zinc, copper, manganese and iron in nineteen different coffee samples were quantified using FAAS. The samples were divided into two main groups according to their nature: Coffee with additives, comprising seven samples, and pure coffee, comprising twelve samples.

The specific objective of this work was to determine the possible relationship between the elemental composition of the samples and the coffee variety using chemometrics, which consisted of univariate and multivariate analysis. The univariate analysis showed that copper, manganese and iron accounted for the greatest difference between the samples. PCA analysis was performed for all samples, including the variables (of the elements analyzed), which showed a close association between copper and manganese, copper and iron, and manganese and iron; two main factors were identified and linked to the element source in the samples analyzed. Cluster analysis was performed to divide the samples into groups based on similarity of elemental composition, resulting in a division into four main clusters. In each cluster, the samples show good similarity between coffee types, leading to the conclusion that the analyzed variables can be used to distinguish coffee types, especially pure coffee and coffee with additives.

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

Thesis includes: 45 pages, 13 figures, 7 tables and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Zinc, copper, manganese, iron, flame atomic absorption spectroscopy, coffee

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: September 2022.